

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) **公開特許公報** (A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 149246

(P2003 - 149246A)

(43)公開日 平成15年5月21日(2003.5.21)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/544			G 0 1 N 33/544	A
	33/532		33/532	Z
	33/543	501	33/543	501 D
	33/566		33/566	

審査請求 未請求 請求項の数 26 O L (全 12数)

(21)出願番号 特願2002 - 237477(P2002 - 237477)

(22)出願日 平成14年8月16日(2002.8.16)

(31)優先権主張番号 特願2001 - 256579(P2001 - 256579)

(32)優先日 平成13年8月27日(2001.8.27)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000001029

協和醗酵工業株式会社

東京都千代田区大手町1丁目6番1号

(72)発明者 加藤 滋雄

京都府京都市左京区吉田上阿達町21

(72)発明者 熊田 陽一

兵庫県神戸市灘区弓木町5丁目2 - 1

(74)代理人 100105647

弁理士 小栗 昌平 (外 4 名)

(54)【発明の名称】 物質の検出法

(57)【要約】

【課題】 リポソームを破壊することなく高感度でクリアーなシグナルを得られる検出方法および該方法に用いるキットを提供する。

【解決手段】 リポソームを用いる被検物質を検出する方法において、リポソームが該被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソームであり、リポソームを破壊する工程を有することなく該被検物質を検出することを特徴とする検出法、並びに、被検物質を固定化するための担体、被検物質を認識する抗体（一次抗体）、被検物質を認識する抗体（一次抗体）を認識することのできる抗体（二次抗体）を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 リポソームを用いる被検物質を検出する方法において、リポソームが該被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソームであり、リポソームを破壊する工程を有することなく該被検物質を検出することを特徴とする検出法。

【請求項2】 リポソームに被検物質を認識させた後、リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を添加することを特徴とする請求項1記載の検出法。

【請求項3】 リポソームを用いる被検物質を検出する方法において、該被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソームに被検物質を認識させた後、該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を添加することを特徴とする検出法。

【請求項4】 被検物質が、担体に固定化された被検物質である、請求項1～3のいずれか1項に記載の検出法。

【請求項5】 被検物質と、リポソームの表面に存在する該被検物質を特異的に認識する物質との関係が、免疫学的な関係にあることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の検出法。

【請求項6】 免疫学的な関係が抗原と抗体の関係であることを特徴とする請求項5記載の検出法。

【請求項7】 被検物質と、リポソームの表面に存在する該被検物質を特異的に認識する物質が、酵素と基質、酵素と阻害剤、ホルモンと受容体、レクチンと糖鎖、DNAとRNA、DNAとDNA、血清アルブミンと色素ブルー、酵素と補酵素、およびタンパク質とコンビナトリアルリガンドペプチドの群より成る組み合わせから選ばれる組み合わせの関係を有することを特徴とする、請求項1～3のいずれか1項に記載の検出法。

【請求項8】 酵素と補酵素の組み合わせが、酸化還元酵素と補酵素NADHの組み合わせである、請求項7記載の検出法。

【請求項9】 リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質が、さらに該標識物質との反応によりリポソームの脂質膜に不透過となり得るものであることを特徴とする請求項2または3記載の検出法。

【請求項10】 リポソームを用いる被検物質を検出する方法が、ドットプロット法、ウェスタンブロット法、サザンブロット法およびノーザンブロット法から選ばれる方法である請求項1～3のいずれか1項に記載の検出法。

【請求項11】 被検物質が抗原であり、該被検物質を特異的に認識する物質が抗体であるか、または被検物質が抗体であり、該被検物質を特異的に認識する物質が抗原であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項

に記載の検出法。

【請求項12】 被検物質が抗原であり、リポソームの表面に存在する該被検物質を特異的に認識する物質が、前記被検物質を認識する抗体（一次抗体）を認識することのできる抗体（二次抗体）であり、該被検物質に一次抗体を認識させた後に、該リポソームを添加することを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の検出法。

【請求項13】 標識物質が酵素であることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項に記載の検出法。

【請求項14】 酵素が西洋わさびペルオキシダーゼであることを特徴とする請求項13記載の検出法。

【請求項15】 リポソームの脂質膜を透過可能でかつ前記標識物質と反応して検出が可能になり得る物質が、4-クロロ-1-ナフトールであることを特徴とする請求項2または3記載の検出法。

【請求項16】 前記リポソームの脂質膜を透過可能でかつ前記標識物質と反応して検出が可能になり得る物質が、ルミノールおよび過酸化水素から構成されることを特徴とする請求項2または3記載の検出法。

【請求項17】 検出時にエンハンサーを用いることを特徴とする請求項16記載の検出法。

【請求項18】 エンハンサーがp-ヨードフェノールである、請求項17記載の検出法。

【請求項19】 担体が、膜状、チップ状、アレイ状およびビーズ状のいずれかの状態である、請求項4記載の検出法。

【請求項20】 担体が、ポリビニリデンフルオリド、ニトロセルロース、またはナイロンであることを特徴とする請求項19記載の検出法。

【請求項21】 担体が細胞である、請求項4記載の検出法。

【請求項22】 担体の孔径が、前記リポソームの粒子径よりも大きいことを特徴とする請求項4記載の検出法。

【請求項23】 被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

【請求項24】 被検物質を固定化するための担体、被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

【請求項25】 被検物質を認識する抗体（一次抗体）、被検物質を認識する抗体（一次抗体）を認識することのできる抗体（二次抗体）を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり

得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

【請求項26】被検物質を固定化するための担体、被検物質を認識する抗体（一次抗体）、被検物質を認識する抗体（一次抗体）を認識することのできる抗体（二次抗体）を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、リポソームを用いる、被検物質の高感度検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】抗原と抗体間の特定且つ強い免疫学的な相互作用は、多くの生物学的素材の分析評価方法において、広く使用されている。近年、プロテオミクス（たんぱく質機能分析）、臨床の分析評価およびバイオインダストリーにおいて、タンパク質の検出、性質決定、および選別のために測定を必要とするサンプルの数は顕著に増加していることより、多数のサンプルを迅速かつ自動

的に測定できる方法が要求されている。
【0003】酵素結合免疫吸着検定法(EIA)は、免疫学的相互作用に基づく多くの方法の中で、最も一般的な免疫測定法であるが、結合および遊離している抗体および抗原の分離のために、インキュベーションおよび洗浄工程を多数繰り返す必要がある。従って、測定に多くの時間を要し、多数のサンプルの処理には適していない。また、EIAでは、検出時の発色が、空気に触れる事で徐々に退色してしまう欠点がある。

【0004】免疫プロット測定法やコロニー検出免疫測定法のような、膜プロットング測定法は、自動化されたマイクロアレイ法等に適用可能であるが、測定感度は、ラベル試薬の量とシグナル強度により制限される。例えば、免疫プロット測定法において検出に用いる抗体1分子には、2～3の酵素分子しか結合することしかできない。感度増加および測定値のシグナル増幅のために、多くの改良法が提案されている。

【0005】その代表的なものとして、リポソーム(liposome)を用いた免疫測定法(LIA)が知られている。1つのリポソームは多数の抗体（もしくは抗原）分子とその表面で結合可能であり、ラベルされた抗体よりも非常に多くのマーカーを含むことができるため、ラベルされた抗体に代えて、マーカーを閉じ込めている免疫リポソームは上記目的に使用することができる〔ロンゲン(Rongen)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジー・メソッズ(J. Immunol. Methods)、204巻、105頁(1997)、シング(Singh)ら、"Liposome in Immunodiagnos tics, Handbook of Nonmedical Applications of Liposomes. D. D. Lasic and Y. Barenholz ed. 209～228頁、CRC Press, Boca Raton, USA" (1996)〕。

10 【0007】

【発明が解決しようとする課題】リポソームを用いたこれまでの検出法では、シグナル発生時にリポソームを破壊することが必須要件とされており、該破壊工程により、液層へ発色生成物の拡散が起こるため、感度が低下し、クリアーなシグナルを得ることはできなかった。本発明の目的は、リポソームを破壊することなく高感度でクリアーなシグナルを得られる検出方法および該方法に用いるキットを提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、以下の(1)～(26)に関する。

(1) リポソームを用いる被検物質を検出する方法において、リポソームが該被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソームであり、リポソームを破壊する工程を有することなく該被検物質を検出することを特徴とする検出法。

【0009】(2) リポソームに被検物質を認識させた後、リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を添加することを特徴とする(1)記載の検出法。

(3) リポソームを用いる被検物質を検出する方法において、該被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソームに被検物質を認識させた後、該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を添加することを特徴とする検出法。

【0010】(4) 被検物質が、担体に固定化された被検物質である、(1)～(3)のいずれか1項に記載の検出法。

(5) 被検物質と、リポソームの表面に存在する該被検物質を特異的に認識する物質との関係が、免疫学的な関係にあることを特徴とする(1)～(3)のいずれか1項に記載の検出法。

【0011】(6) 免疫学的な関係が抗原と抗体の関係であることを特徴とする(5)記載の検出法。

(7) 被検物質と、リポソームの表面に存在する該被検物質を特異的に認識する物質が、酵素と基質、酵素と阻害剤、ホルモンと受容体、レクチンと糖鎖、DNAとRNA、DNAとDNA、血清アルブミンと色素ブルー、酵素と補酵素、およびタンパク質とコンピナトリアルリガンドペ

ブチドの群より成る組み合わせから選ばれる組み合わせの関係性を有することを特徴とする、(1)~(3)のいずれか1項に記載の検出法。

【0012】(8) 酵素と補酵素の組み合わせが、酸化還元酵素と補酵素NADHの組み合わせである、(7)記載の検出法。

(9) リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質が、さらに該標識物質との反応によりリポソームの脂質膜に不透過となり得るものであることを特徴とする(2)または(3)記載の検出法。

【0013】(10) リポソームを用いる被検物質を検出する方法が、ドットプロット法、ウェスタンプロット法、サザンプロット法およびノーザンプロット法から選ばれる方法である(1)~(3)のいずれか1項に記載の検出法。

【0014】(11) 被検物質が抗原であり、該被検物質を特異的に認識する物質が抗体であるか、または被検物質が抗体であり、該被検物質を特異的に認識する物質が抗原であることを特徴とする(1)~(3)のいずれか1項に記載の検出法。

(12) 被検物質が抗原であり、リポソームの表面に存在する該被検物質を特異的に認識する物質が、前記被検物質を認識する抗体(一次抗体)を認識することのできる抗体(二次抗体)であり、該被検物質に一次抗体を認識させた後に、該リポソームを添加することを特徴とする(1)~(3)のいずれか1項に記載の検出法。

(13) 標識物質が酵素であることを特徴とする(1)~(3)のいずれか1項に記載の検出法。

【0015】(14) 酵素が西洋わさびペルオキシダーゼであることを特徴とする(13)記載の検出法。

(15) リポソームの脂質膜を透過可能でかつ前記標識物質と反応して検出が可能になり得る物質が、4-クロロ-1-ナフトールであることを特徴とする(2)または(3)記載の検出法。

【0016】(16) 前記リポソームの脂質膜を透過可能でかつ前記標識物質と反応して検出が可能になり得る物質が、ルミノールおよび過酸化水素から構成されることを特徴とする(2)または(3)記載の検出法。

(17) 検出時にエンハンサーを用いることを特徴とする(16)記載の検出法。

【0017】(18) エンハンサーがp-ヨードフェノールである、(17)記載の検出法。

(19) 担体が、膜状、チップ状、アレイ状およびビーズ状のいずれかの状態である、(4)記載の検出法。

【0018】(20) 担体が、ポリビニリデンフルオリド、ニトロセルロース、またはナイロンであることを特徴とする(19)記載の検出法。

(21) 担体が細胞である、(4)記載の検出法。

(22) 担体の孔径が、前記リポソームの粒子径より

も大きいことを特徴とする(4)記載の検出法。

【0019】(23) 被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

(24) 被検物質を固定化するための担体、被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

【0020】(25) 被検物質を認識する抗体(一次抗体)、被検物質を認識する抗体(一次抗体)を認識することのできる抗体(二次抗体)を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

【0021】(26) 被検物質を固定化するための担体、被検物質を認識する抗体(一次抗体)、被検物質を認識する抗体(一次抗体)を認識することのできる抗体(二次抗体)を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含む、被検物質を検出するためのキット。

【0022】本発明の方法は、リポソームを用いた被検物質を検出する方法において、リポソームを破壊することなく該被検物質を検出することを特徴とする高感度検出法である。リポソームを破壊することがないため、高感度かつクリアーなシグナルを得ることができる。

【0023】また、リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になる物質(例えば、発色基質、発光基質、蛍光基質)を用いることによって、リポソーム内に該物質が拡散、反応でき、検出シグナルを向上させることができる。更に、該物質として標識物質と反応後、溶解度が減少し析出するものを利用することにより、一旦リポソーム内で生じた検出可能物質を、再びリポソーム外に拡散させることなく、内部に蓄積させることができるため、更に検出シグナルを向上させることができる。また、該物質として発光時間の短いものを利用することにより、リポソーム外への拡散を防ぐことができ、検出シグナルを向上させることもできる。

【0024】本発明の方法によれば、被検物質に結合したリポソームの位置でのみ検出シグナルを発生(例えば発色、発光等)させることができ、小さなスポットでの高感度、迅速な検出を可能とすることができる。従って、本発明の方法は、被検物質を膜に負荷、吸着させて分析を行うイムノプロットアッセイ等にも応用できる。

【0025】上記理由より、本発明の方法は、EIAと比較して高感度であり、任意のプロットングサイズで

分析を行うことができ、コロニーリフトやマイクロアレイアッセイ等へ応用することが可能である。本発明の検出法では、高感度化以外に、ウェルから膜を用いることによって迅速性、自動化、マイクロ化の可能性も改善されているため、様々なバイオアフィニティーを及ぼし合う物質のライブラリーからのスクリーニングに利用することができ、プロテオーム解析のための重要な手法となり得る。

【0026】更に、EIAに用いられる酵素標識抗体に比べて、リポソームは様々な物質を包含することができ、用途に応じて様々なマーカーを選択することが可能となる。また膜の流動性を制御することでリポソーム内での酵素-基質反応、それに続くシグナルの蓄積もそれぞれのマーカーに対して可能である。また、本発明はEIAと同じ発色方法で検出でき、リポソーム内に発色反応生成物を蓄積させることにより、空気に触れる事で徐々に退色してしまうEIAとは異なり、発色後の膜上のシグナルの退色を防ぐことが可能である。

【0027】

【発明の実施の形態】以下、本発明について詳細に説明する。本発明の検出法における、被検物質は、該被検物質を特異的に認識する物質が存在する物質であれば、特に限定されることはない。

【0028】被検物質と、該被検物質を特異的に認識する物質の関係の一例としては、免疫学的な関係にある物質が挙げられる。具体的には、抗原と抗体の関係が挙げられる。抗原と抗体の関係において、被検物質が抗原である場合、該抗原を特異的に認識する物質は抗体であり、被検物質が抗体である場合、該抗体を特異的に認識する物質は抗原である。

【0029】また、被検物質を特異的に認識する物質は、被検物質を間接的に認識できる物質であってもよい。即ち、被検物質を特異的に認識する物質を認識することのできる物質であってもよい。具体的には、被検物質を認識する抗体（一次抗体）を認識することのできる抗体（二次抗体）が挙げられる。

【0030】二次抗体として、被検物質を認識できる一次抗体作製に用いた動物種に特異的な抗体を認識することのできる抗体を用いることにより、該動物種で一次抗体を作製可能な様々な被検物質に対して共通してこの同じ二次抗体を使用することが可能となる。本発明の検出法を利用したキットを作製する上で、この二次抗体を表面に有するリポソームは有用である。

【0031】上記抗体を作製するために用いる動物としては、ウサギ、マウス、ヤギ、ヒツジ、ウマ、ウシ等が挙げられる。抗体としては、動物に免疫することによって得られるポリクローナル抗体でも、ハイブリドーマ法から得られるモノクローナル抗体でもよい。ポリクローナル抗体を用いる場合には、動物として取り扱いやすいウサギ抗体が好ましい。

【0032】抗原としての被検物質として、例えば血液中などに微量に存在するタンパク質ホルモン、活性ペプチド、オータコイド、腫瘍マーカー、免疫グロブリン等の生体成分や薬剤等が挙げられるが、これらに限定されることはなく、被検物質に対する抗体を作製できるもの等であれば特に制限はない。

【0033】その他、本発明の検出法における、被検物質と、該被検物質を特異的に認識する物質として、酵素と基質、酵素と阻害剤、ホルモンと受容体、レクチンと糖鎖、DNAとRNA、DNAとDNA、血清アルブミンと色素ブルー、酵素と補酵素、タンパク質とコンビナトリアルリガンドペプチド等の、様々な組み合わせのものを挙げるができる。酵素と補酵素の組み合わせの例としては、酸化還元酵素と補酵素NADHの組み合わせ等を挙げるができる。

【0034】本発明の検出法においては、EIA測定用に調製された被検物質をそのまま使用することができる。また、被検物質を担体に固定化して用いてもよい。被検物質を固定化する担体としては、被検物質を固定化可能な担体であれば、特に限定されることはない。

【0035】上記担体の形状としては、膜状、チップ状、アレイ状、ビーズ状のもの等が挙げられる。上記担体の素材例としては、被検物質を固定化可能な素材であれば特に限定されないが、ポリビニリデンフルオリド、ニトロセルロース、ナイロン等が挙げられる。

【0036】担体の孔径は、後述のリポソームの粒子径に合わせて適宜選定すればよい。リポソームの粒子径よりも大きい孔径の担体を用いることにより、検出感度を向上させることができる。また、担体として、細胞を用いることもできる。即ち、被検物質を細胞表面に発現している細胞を担体として挙げることができ、該細胞は遺伝子組換えにより被検物質を発現するように改変されたものであってもよい。

【0037】本発明の検出法は、ドットプロットング法、ウエスタンプロットング法、サザンプロットング法、ノザンプロットング法等の様々な測定法に適用することができる。本発明の検出法において用いる、リポソームは、被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包できるリポソームであれば特に制限はない。

【0038】該リポソームに内包される標識物質としては、リポソームの脂質膜を透過可能な物質と反応して該物質を検出可能にさせるものであれば、特に限定されず、例えば、EIAで用いられる酵素等を挙げることができ、具体的には、西洋わさびペルオキシダーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素等が挙げられる。

【0039】本発明の検出法において用いられるリポソームの粒子径は、後述の方法で作製可能なリポソームの有する粒子径であればいずれでもよい。作製したリポソ

ームの粒子径に応じて適宜好ましい孔径を有する担体を選定すればよい。また、逆に、担体の孔径に応じて適宜好ましい粒子径を有するリポソームを選定してもよい。

【0040】前述のように、担体の孔径よりも粒子径が小さいリポソームを選定することにより感度を向上させることができる。次いで、本発明の検出法において用いるリポソームの作製法について説明する。本発明の方法で用いるリポソームを作製する際に使用できる脂質としては、リン脂質、糖脂質、コレステロールなどが挙げられ、リン脂質としては、動物や微生物などの細胞膜に広く存在するリン脂質、例えばホスファチジルエタノールアミン類、ホスファチジルコリン類、ホスファチジルセリン類、スフィンゴミエリン類などの各種リン脂質が挙げられる。天然の卵黄、牛脳や大豆などから得られるホスファチジルコリンも使用できる。

【0041】このようなリン脂質中の脂肪酸の種類には各種の飽和または不飽和脂肪酸が含まれる。例えばホスファチジルコリンの場合、ジヘプタノイル-、ジカプロイル-、ジデカノイル-、ジラウロイル-、ジヘプタデカノイル-、ジベヘノイル-、ジミリストイル-、ジバルミトイル-ホスファチジルコリン等が挙げられ、前述のその他のリン脂質も同様に各種飽和および不飽和脂肪酸が含まれる。

【0042】標識物質を封入したリポソームの作製法としては、公知のリポソーム作製法に準じた作製法が挙げられる。例えば、以下の方法等を挙げることできる。

(1) 有機溶媒に溶解したリン脂質を容器に入れ、減圧下にエバポレータまたは窒素ガスの吹き付けにより溶媒を除去して薄い脂質膜を形成させ、次いで、あらかじめ封入したい標識物質を含む適当な塩類溶液やあらかじめ標識物質を溶解した水溶液を加え振盪する方法〔エー・ディー・バンガム(A. D. Bangham)ら、ジャーナル・オブ・モレキュラー・バイオロジー(J. Mol. Biol.)、13巻、238頁(1965)およびディー・パパジョポウラス(D. Papahadjopoulos)ら、バイオキミカ・エテ・バイオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta)、135巻、639頁(1967)〕やボルテックスミキサーで振盪攪拌する方法〔ケー・イノウエ(K. Ioue)ら、バイオキミカ・エテ・バイオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta)、339巻、390頁(1974)およびエス・シー・キンスキー(S. C. Kinsky)ら、バイオケミストリー(Biochemistry)、8巻、4149頁(1969)〕。

【0043】(2) 前記(1)の方法で得られた多重膜リポソーム(MLVs)をさらに超音波発振装置で超音波処理し小さな一枚膜リポソーム(SUVs)を作製する方法〔ディー・パパジョポウラスら、バイオキミカ・エテ・バイオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta)、311巻、310頁(1973)〕。

【0044】(3) 有機溶媒に溶解したリン脂質を急激

に標識物質を含む塩類溶液と混和する方法〔エス・バツィーリ(S. Batzri)ら、バイオキミカ・エテ・バイオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta)、298巻、1015頁(1973)〕。

(4) エーテルに溶解したリン脂質をエーテルの沸点より高くした、あらかじめ標識物質を溶解した水溶液にゆっくりと吹き出させる方法〔ディー・ダブリュー・ディーマー(D. W. Deamar)、アニュアル・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンス(Ann. N. Y. Acad. Sci.)、308巻、259頁(1978)〕。

【0045】(5) ホスファチジルセリン単独あるいは等量のホスファチジルセリンとコレステロールからなるリポソームを超音波発振装置で超音波処理してSUVsを作成し、カルシウム処理の後、標識物質を含む塩類溶液とEDTAを加え大きな一枚膜リポソーム(LUVs)を作成する方法〔ディー・パパジョポウラス、アニュアル・ニューヨーク・アカデミー・オブ・サイエンス、308巻、259頁(1978)〕。

【0046】(6) 脂質を含む有機溶媒に標識物質を溶解した水溶液を加え超音波発振装置で超音波処理した後、ロータリーエバポレータで有機溶媒を除去し逆相リポソームとする方法〔エフ・ズオカ・ジュニア(F. Szo ka, Jr.)ら、プロシーディング・オブ・ナショナル・アカデミー・オブ・サイエンス・イン・ユー・エス・エー(Proc. Natl. Acad. Sci. USA)、75巻、4149頁(1978)〕。

【0047】(7) 脂質やジアルキルリン酸、ジアルキルアンモニウム塩などにアクリル基、メタクリル基、ジアセチレン基、ジエン基などの重合可能な官能基を導入し、この重合性の脂質などを含んだリポソームを前記(1)~(6)のいずれかの方法で作製し、その後紫外線を照射したり重合開始剤を加えるなどの方法により、リポソーム膜中で重合を起こさせリポソームを安定化する方法〔例えば、エイチ・オオノ(H. Ohno)ら、マクロモレキュールズ(Macromolecules)、20巻、929頁(1987)、およびイー・ツチダ(E. Tsuchida)ら、マクロモレキュラー・ヘミー(Makromol. Chem.)、187巻、1351頁(1986)〕。

【0048】リポソームの重合を行うと、膜の物理的強度が増大し、リポソーム内に封入する標識物質の保持能が改善され、またリポソームどうしの融合を防止できるため、長期間安定に保存可能であり、また測定の高感度化を図ることができるため好ましい。また重合性化合物と非重合性の脂質等からなる混合リポソームの場合、それらの組合せにより、相溶性のものおよび相溶性がなくリポソーム膜内で相分離を起こすものを選択することができ、これらはまた重合性化合物と非重合性の脂質等の組成の割合を変えることによって、膜の物理的強度、安定性を制御することもできる。

【0049】上記の手法等により調製されたリポソーム

の表面に、被検物質と特異的に結合する物質を結合する方法についても、公知の方法、例えば(1)ホスファチジルエタノールアミンと抗体をグルタルアルデヒドで架橋する方法〔ブィ・ピー・トールチリン(V. P. Torchilin)ら、バイオケミカル・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーション(Biochem. Biophys. Res. Comm.)、85巻、983頁(1978)〕、(2)ホスファチジルエタノールアミンにSH基と反応する試薬を共有結合したものをリポソームに組み込み、これにSH基を導入した抗体を結合する方法〔エル・ディー・レーザーマン(L. D. Leserman)ら、ネイチャー(Nature)、288巻、602頁(1980)およびワイ・ハシモト(Y. Hashimoto)ら、ジャーナル・オブ・イムノロジカル・メソッズ、62巻、155頁(1983)〕、および(3)リポソーム内に糖脂質を組込んでおき、過ヨウ素酸処理で生じたアルデヒド基と抗体を反応させる方法〔ティー・ディー・ヒース(T. D. Heath)ら、バイオキミカ・エテ・バイオフィジカ・アクタ(Biochim. Biophys. Acta)、640巻、66頁(1981)〕などが利用できる。

【0050】リポソームの表面に結合させる、被検物質を特異的に認識する物質の数は、リポソームの粒子径に依存して増加させることができる。リポソームの粒子径を大きくすることによりリポソーム1個当たり200以上の該物質を結合させることができる。5~200結合させるのが一般的であるが、50以上結合させてもシグナル感度は余り向上しないため、10~50の結合でも十分な感度が得られる。

【0051】被検物質の担体への固定化および被検物質とリポソームとの反応は、従来のEIAあるいはLIAで用いられている、常法に従って行うことができる。被検物質とリポソームとの反応として、例えば、該リポソームをスキムミルク・PBS溶液として、担体と共に、室温で適当な時間インキュベートする等の方法が挙げられる。

【0052】担体に固定化した被検物質と該リポソームとを直接的または間接的に結合させた後に適用する物質としては、リポソームの脂質膜を破壊することなく前記標識物質と反応して検出が可能になり得るものであれば、特に限定されない。このような物質として、リポソームの脂質膜を透過可能でかつ前記標識物質と反応して検出が可能になる物質(例えば、発色基質)を挙げることができる。

【0053】前記標識物質としてEIAで用いられるような酵素を用いた場合には、上記物質として、リポソームの脂質膜を透過可能でかつ前記標識物質と反応して検出可能な該酵素の基質が挙げられる。通常EIAで用いられる酵素の基質はリポソームの脂質膜を透過できないため、リポソームの脂質膜を透過可能な基質を選択するあるいは透過可能な基質に改変する必要がある。基質の疎水性を増加させることによりリポソームの脂質膜を透過

可能な基質に改変することが可能である。

【0054】例えば、標識物質として西洋わさびペルオキシダーゼを用いた場合には、上記条件を満たす基質として4-クロロ-1-ナフトール(4-CN)等を挙げることができる。また、西洋わさびペルオキシダーゼの基質として過酸化水素を用いることもできる。この場合、酵素反応により発生する酸素ラジカルを、ルミノールのような化学発光基質による発光により検出することができる。

【0055】4-CNを用いた場合には、西洋わさびペルオキシダーゼと反応後生成した発色物質は、溶解度が低く、リポソーム内で析出、蓄積するため、該発色物質のリポソーム外への拡散がなく、特に検出シグナルを向上させることができる。即ち、リポソームの脂質膜を透過可能であり、かつ酵素と反応後生成する発色物質が溶解度の低い、リポソーム内で析出、蓄積するような物質を用いることにより、更に検出シグナルを向上させることができる。

【0056】過酸化水素を用いた場合には、ルミノール等の化学発光基質による発光時間を短く調整することにより、リポソーム外への拡散を防ぐことができ、検出シグナルを向上させることができる。このとき、p-ヨードフェノール等のエンハンサーを用いることにより更に検出シグナルを向上させることができる。このエンハンサーは予めリポソーム内に封入しておいても、基質と共に添加してもよい。

【0057】即ち、基質として膜透過性化学発光物質を用い、標識物質との反応後の発光時間を調整することにより高感度の検出シグナルを得ることができる。このときにエンハンサーを利用することにより更に感度を向上させることが可能となる。前記標識物質と反応して検出が可能となる検出シグナルとしては、特に限定されないが、例えば酵素反応等による色素の生成等が挙げられる。

【0058】生成した色素、発光、蛍光等の検出シグナルは、従来のEIA法、LIA法と同様に、肉眼や、分光光度計、発光光度計、蛍光光度計、CCDカメラ等により検出することができる。実際の測定に際しては、あらかじめ既知の濃度の被検物質を用いて検量線を作製しておき、これをもとにして同じ条件下で測定を行うことにより、被検試料中の未知の濃度の被検物質量を測定することができる。

【0059】本発明の方法は、上記のように、多検体を少量で迅速且つ高感度で測定可能な方法であるため、該方法に基づいたキットを作製することにより、簡便に自動化を図ることができる。本発明のキットの特徴は、被検物質を特異的に認識する物質を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソームおよび該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含むことである。

【0060】従来のEIAで測定可能な被検物質あるいはEIA測定用に調製された被検物質は、上記を含む本発明のキットを用いることにより高感度で測定できる。本発明のキットに、被検物質を固定化するための担体が含まれていてもよい。被検物質を認識する抗体（一次抗体）、被検物質を認識する抗体（一次抗体）を認識することのできる抗体（二次抗体）を表面に有しかつ標識物質を内包したリポソーム、および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質を含むキットも本発明のキットである。二次抗体として、被検物質を認識できる一次抗体作製に用いた動物種に特異的な抗体を認識することのできる抗体を用いることにより、該動物種で一次抗体を作製可能な様々な被検物質に対して共通してこの同じ二次抗体を使用することが可能となり、キット化には適している。該キットに被検物質を固定化するための担体が含まれていてもよい。

【0061】本発明のキットで用いる、担体、リポソーム、被検物質を特異的に認識する物質および該リポソームの脂質膜を透過可能でかつ標識物質と反応して検出が可能になり得る物質については、それぞれ前記本発明の検出法に使用したものをを用いることができる。

【0062】

【実施例】以下、実施例により本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0063】実施例1. 抗体結合リポソームの作製
ジパルミトイルホスファチジルコリン (Dipalmitoylphosphatidylcholine : DPPC, ナカライテスク社 (nacalaitesque)), ジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン (dipalmitoylphosphatidylethanolamine : DPPE, Sigma Aldrich)、コレステロール (cholesterol : Chol, Wako Pure Chemical Industries, Ltd.), ジセチルホスフェート (dicetylphosphate : DCP, Sigma Aldrich) および N - サクシンイミジル - 4 - (p - マレイミドフェニル) ブチレート (N-succinimidyl-4-(p-maleimidophenyl)-butyrate : SMPB, Pierce) をリポソームを作製するために使用した。

【0064】リポソームに封入する標識物質として、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP, 100U/mg, III級, TOYOBO) を使用し、基質として、4 - クロロ - 1 - ナフトールを使用した。N - サクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート [N-succinimidyl-3-(2-pyridyl-dithio)propionate, SPDP] は Amersham Pharmacia Biotech より、ジチオスレイトール (dithiothreitol, DTT) は ナカライテスク社 (nacalaitesque) より、抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) および抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) -HRP は カッペル社 (Cappel Products Co.) より、ヒト IgM は ケミコン社 (Chemicon Int) より購入した。

【0065】抗 - キモトリプシノーゲン A 抗体および抗ヒト IgM 抗体は、加藤 (Katoh) らの方法 [アブライド・マイクロバイオロジー・アンド・バイオテクノロジー (A

ppl. Microbiol. Biotechnol.), 42 巻, 36 頁 (1994)) で作製した。抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) をリポソームと結合させた。

【0066】なお、SPDP、DTT は、抗体にチオール基を導入し、リポソーム膜へ固定化するのに用いた。抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) および抗ウサギ IgG 抗体 (ヤギ) -HRP は、イムノリポソーム作製、および免疫測定に用いた。他の使用したすべての化学薬品は試薬グレードのものであった。

【0067】この研究で使用した緩衝液は以下のように調製した：PBS (NaCl 9.0 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9 g/l, KH₂PO₄ 0.2g/l, pH=7.4) および MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid 4.27 g/l, NaCl 8.77 g/l, pH=5.5)。

【0068】ブロッキング溶液 (pH 7.2, ナカライテスク社) および 1.0 % および 0.1 % のスキムミルクを含む PBS 溶液 (スキムミルク PBS 溶液) をブロッキングおよび洗浄に用いた。孔径 450nm [イモビロン P (Immobilin P)、ミリポア (Millipore)] および 200 nm [イムノブロット (Immuneblot)、Bio-Rad Laboratories] の PVDF 膜をブロッキングに使用した。

【0069】なお、比較用の HRP に対する発色基質として、2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩 (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt, ABTS) を用いた。

【0070】既報 [キシムラ (Kishimura) ら、ジャーナル・オブ・ファーマンテーション・アンド・バイオエンジニアリング (J. Ferment. Bioeng.), 68 巻, 395 頁 (1989)] に準じて、SMBP を用いて、DPPE を N-[4-(p-taleimidophenyl) butyryl] dipalmitoylphosphatidylethanolamine (MPB-DPPE) に活性化した。

【0071】クロロホルム中に DPPC (20 mmol)、Chol (20 mmol)、DCP (2 mmol) および MPB-DPPE (1 mmol) を含む脂質混合液を、ロータリーエバポレーターを使用し、ナスフラスコの内壁面に脂質薄膜が形成されるまで、42 または減圧下で乾燥させた。エバポレーションを繰り返した後、デシケータ中、減圧下で脂質膜を乾燥させた。

【0072】次に、PBS 中に 5 mg/ml 溶解させた HRP を、マーカーとして封入するために、6 ml 該フラスコに添加し、50 近辺で、約 10 分間ボルテックスミキサーで振とうし、脂質膜を剥がし、多重膜リポソーム (MLVs) を形成させた。小さな一枚膜リポソーム (SUVs) を取得するために、MLVs の懸濁液を触針型超音波発生器 (UD 201, TOMY) を用い、氷冷下 40W で 20 ~ 30 分間超音波処理した。大きな一枚膜リポソーム (LUVs) は、メイヤー (Mayer) らの方法 [バイオキミカ・エテ・バイオフィジカ・アクタ (Biochim. Biophys. Acta)、858 巻, 161 頁 (1986)] に準じて、MLVs よりエクストルダ (The

rmobarrel Extruder, Lipex Biomembrane Inc.) を使用して作製した。このようにして作製したリポソームを、PBSで平衡化したBio-Gel A-15m充填カラム(Bio-Rad Laboratories) を用い、ゲルクロマトグラフィーにより、リポソームに封入されていないHRPと分離した。

【0073】活性化したリポソーム分子と共有結合により蛋白質を結合させるために、異種2価架橋剤であるSPDPを用いた。既報〔キシムラ(Kishimura)ら、ジャーナル・オブ・ファーマンテーション・アンド・バイオエンジニアリング(J. Ferment. Bioeng.)、68巻、395頁(1989)〕に準じて、抗ウサギIgG抗体をSPDPにより修飾した。修飾された抗体溶液と活性化したリポソーム懸濁液を混合し、室温で一晩穏やかに攪拌した。結合していない抗体をPBSで平衡化したBio-Gel A-15m充填カラムで除去した。取得された抗体結合リポソームは4で保存した。

【0074】抗体結合リポソームの平均粒子径は動的光散乱法(DLS 7000, Photal Otsuka Electronics)により測定した。SUVsの粒子径は60nmであり、孔径100nm、200nmおよび400nmの膜を使用して調製したLUVsの粒子径は、それぞれ130nm、200nmおよび350nmであった。

【0075】DPPCと蛋白質の濃度は、各サンプル100μlに10%デオキシコール酸ナトリウム塩を10μl添加した後に測定した。HRPIは90で10分間加熱することにより不活化した。リポソーム懸濁液中のDPPC濃度は、リン脂質Cテストワコー(Wako Pure Chemical Ind. Ltd.)を用い、コリンオキシダーゼ法により測定した。リポソーム上に結合した蛋白質の濃度は、DC-protein assay (Bio-Rad Laboratories)により測定した。

【0076】実施例2．本発明のリポソーム免疫プロット測定法(LIA)

本発明のLIAおよび従来の免疫プロット測定法(EIA)測定法を比較したものを図式的に図1に示した。抗原1として0~10μg/mlの異なる濃度のIgMを含むサンプル20μlを、孔径200nmもしくは450nmのPVDF膜2上に固定化した。PBSで洗浄後、非特異的吸着を避けるために、ブロッキング溶液(ナカライテスク社)で膜2をブロックした。該膜2を1%スキムミルクPBS溶液で洗浄し、1%スキムミルクPBS溶液に1次抗体として3μg/mlの抗ヒトIgM抗体(ウサギ)を溶解した溶液にインキュベートした。

【0077】LIAにおいて、該膜2を1%スキムミルクPBS溶液で洗浄し、実施例1で作製した抗ウサギIgG抗体(ヤギ)結合リポソーム4を1μg/mlの抗体濃度に1%スキムミルクPBS溶液で希釈し、1時間インキュベートした。PBSで洗浄した後、基質5として0.5mg/mlの4-クロロ-1-ナフトール(4-CN)、0.015% H₂O₂ および17%メタノールを含むPBS溶液で30分間発色させた。

【0078】図1に示したように、標識酵素6である

HRPIによる4-クロロ-1-ナフトール由来の発色生成物7はリポソーム4中に沈殿し、蓄積した。従って、全ての発色生成物7はリポソーム4外に拡散することはなく、元の位置で検出することができた。

【0079】従来のEIAにおいては、該膜2を1%スキムミルクPBS溶液で洗浄し、PBS-Tween 20で2,000倍に希釈した、標識酵素結合抗体8である抗ウサギIgG抗体(ヤギ)-HRP(0.05vol% Tween20-PBSで抗体濃度を2μg/mlに希釈)と、1時間インキュベートした。PBSで洗浄した後、LIAと同じ手順で発色させた。この場合、発色生成物7の一部が膜上に吸着され、検出される。

【0080】実施例3．リポソーム膜を通る発色生成物の透過効果

HRPの2種類の基質、4-クロロ-1-ナフトール(4-CN)および2,2'-アジノ-ビス(3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸)ジアンモニウム塩(ABTS)を発色させ抗体結合リポソームを検出するために使用した。両基質ともリポソーム透過性であるが、前者の発色生成物は沈殿を形成し、リポソームのリン脂質膜をもはや通過できなくなる。両基質をHRP含有リポソームまたは抗ウサギIgG抗体(ヤギ)-HRPと混合で15分間発色させた。4-CN且つ抗ウサギIgG抗体(ヤギ)を用いた場合には、4-CN由来の発色生成物の凝集物が、9,200×gの遠心分離により沈殿化しているが、リポソーム中に封入された発色生成物はこの遠心分離条件では沈殿化しなかった。ABTSを用いた時には沈殿は観察されなかった。

【0081】何れの基質を用いた場合にも、発色を確認することができ、リポソームを破壊することなく抗体結合リポソームを検出可能であることがわかった。4-CN且つリポソームを用いた場合、600,000×gの遠心分離条件で、リポソームは沈殿し、透明な上清が得られた。このことは、この場合発色生成物はリポソーム内に保持されていることを示している。それに対し、ABTS且つリポソームを用いた場合には、発色生成物は上清に拡散した。

【0082】以上、基質としてABTSを使用した場合には、発色生成物が拡散してしまうため、発色時間を測定可能な時間内のなるべく短時間に設定し、発色生成物のリポソーム外への拡散を防ぐことが好ましかった。一方、基質として4-CNを使用した場合には、発色生成物が沈殿として形成され、リポソーム内部に蓄積されるため、安定した測定が可能であった。

【0083】実施例4．本発明のリポソーム免疫プロット測定法(LIA)と従来の免疫プロット測定法(EIA)との感度比較

0.0001~10μg/ml(0.0001、0.001、0.01、0.1、1、10μg/ml)のヒトIgMを、本発明のLIAおよびEIAの2種類の免疫プロット測定法で測定し、感度比較を行った。サンプル緩衝液で1:3に希釈したサンプル溶液を20μlをSDS-PAGEにアプライし、電気泳動後、ヒトIgMを孔径4

50nmのPVDF膜に従来法で固定化した。

【0084】一次抗体反応はEIA、LIAとも同じく、PVDF膜に1次抗体として、3 μ g/mlの抗ヒトIgM抗体(ウサギ)を添加した。標識抗体反応は、LIAではHRP包含イムノリポソーム溶液(抗体濃度は1 μ g/ml、粒子径350nm、0.1%スキムミルク-PBS)を、EIAではHRP標識抗体溶液(0.05vol% Tween20-PBSで抗体濃度を3 μ g/mlに希釈)を加えて室温で1時間インキュベートした。洗浄は、1%スキムミルク-PBS(10分 \times 3回)で行った。発色は、リン脂質膜透過性の基質4-CNを含む溶液(0.5mg/mlの4-CN、0.015%のH₂O₂ および17%メタノールを含有するPBS溶液)を添加し、30分後の発色状況を観察した。

【0085】HRPを含有する抗体結合リポソームを使用した本発明のLIAでは、0.02 ngのIgM(0.02 fmol)と非常に低量のIgMまで検出されるが、抗体-HRP融合体を用いた、従来のEIAでは2 ngのIgMと100倍の量のIgMが存在しないと検出できなかった。

【0086】即ち、本発明のLIAにより、従来のEIAと比較しおよそ100倍感度が向上し、アルカリホスファターゼを用いたウエスタンブロット法の最大感度よりも高い感度が得られた。

【0087】更に、従来のEIAにおける発色は、1日後に色あせたが、本発明のLIAでは、発色は安定していた。以上、本発明のLIAによれば、高感度かつ安定した膜マイクロアレイ測定法を提供することができる。

【0088】実施例5．ウエスタンブロットティングへの応用

0.01 μ g/ml~10 μ g/mlの数種の -キモトリプシノーゲンサンプル(サンプル緩衝液で1:3に希釈)15 μ lをSDS-PAGEにアプライし、電気泳動後、 -キモトリプシノーゲンを孔径450nmのPVDF膜に従来法で固定化した。

【0089】固定化後、該膜をブロッキング溶液でブロックし、1%スキムミルクPBS溶液で洗浄した後、該膜を、1%スキムミルクPBS溶液に5 μ g/mlの濃度で抗 -キモトリプシノーゲン抗体(ウサギ)を溶解した溶液と、1時間インキュベートした。1%スキムミルクPBS溶液で充分洗浄した後、実施例4と同様の方法で、HRPを含有する抗ウサギIgG抗体結合リポソームまたは抗ウサギIgG抗体(ヤギ)-HRPを用いて発色させた。

【0090】本発明のLIAにおける感度は、従来のEIAよりおよそ100倍高い感度を与えた。当然ながら、ウエスタンブロットティングの感度は、一次抗体の結合親和性に強く依存するが、本発明のLIAにより、ウエスタンブロットティングにおいて、簡便で高感度の検出法を提供することができた。

【0091】実施例6．サンプルの添加容量と感度の関係

PVDF膜(孔径200nm、イムノプロット、Bio-Rad)に、各濃度が10、1、0.1、0.01、0.001、0 μ g/mlの -キモトリプシノーゲンサンプルを、添加容量を1 μ lから500 μ l

(1、5、10、50、100、500 μ l)まで変化させて固定化した。

【0092】固定化後、該膜を用いて、実施例5と同様の方法で -キモトリプシノーゲンの検出を行った。その結果、サンプルの添加容量を増加させるに伴い、HRP含有抗体結合リポソームによる検出感度が増加した。PVDF膜は吸着量が150~300 μ g/cm²であり、希薄なサンプルでも添加容量を増やすことで高感度な分析が可能であることがわかった。

10 【0093】実施例7．PVDF膜におけるリポソーム粒子径と発色感度の関係

PVDF膜(孔径200nm、イムノプロット、Bio-Rad)に各濃度10、1、0.1、0.01、0.001、0 μ g/mlのヒトIgM溶液を50 μ lずつドットプロットした。該ドットプロット済みのPVDF膜に1次抗体として、3 μ g/mlの抗ヒトIgM抗体(ウサギIgG)を添加した。

【0094】添加後、該膜に、各粒子径が350、200、130、60nmのHRP含有抗ウサギIgG抗体(ヤギ)結合リポソーム(抗体濃度1 μ g/ml)を作用させ、前記と同様に、4-CNを含む溶液を添加し、発色状況を観察した。マイクロタイタープレートを用いた免疫測定ではリポソームの粒子径の増加に伴い、高い感度が得られたが、孔径200nmのPVDF膜を用いた免疫測定では粒子径200nmのLUVsが最も高い感度を示した。

【0095】実施例8．孔径200、450nmの二種類のPVDF膜を用いたEIAの検討

孔径200 nm(イムノプロット、Bio-Rad)、450nm(イモピロンP、ミリポア)の二種類のPVDF膜に、ヒトIgMを200、20、2、0.2、0ngずつドットプロットした。該ドットプロット済みのPVDF膜に1次抗体として、3 μ g/mlの抗ヒトIgM抗体(ウサギIgG)を添加した。

【0096】添加後、該膜に、1 μ g/ml HRP標識 -抗ウサギIgG抗体(ヤギ)を添加し、前記と同様に、4-CNを含む溶液を加え、発色状況を観察した。その結果、EIAの場合、酵素標識抗体は微小なことから、膜の孔径に対する発色感度の影響は見られなかった。さらに吸着容量が多いために、添加した抗体ほぼ完全に膜に吸着しており、二種類の膜におけるタンパク固定化量に差はないことが分かった。

40 【0097】実施例9．PVDF膜の孔径とリポソームの粒子径の検出感度における相関

孔径200および450nmの二種類の膜、および粒子径200、350nmのLUVsを用い、本発明のLIAにおける発色感度を比較検討した。孔径200 nm(イムノプロット、Bio-Rad)、450nm(イモピロンP、ミリポア)の二種類のPVDF膜に、ヒトIgMを200、20、2、0.2、0.02、0.002、0ngずつドットプロットした。該ドットプロット済みのPVDF膜に1次抗体として、3 μ g/mlの抗ヒトIgM抗体(ウサギIgG)を添加した。

50 【0098】添加後、該膜に、各粒子径が350、200の1

μg/ml HRP含有抗ウサギIgG抗体(ヤギ)結合リポソーム(抗体濃度1μg/ml)を作用させ、前記と同様に、4-CNを含む溶液を加え、発色状況を観察した。その結果、膜の孔径より粒子径の小さなLUVs、孔径とほぼ同じ粒子径のLUVs、孔径よりも粒子径の大きなLUVsの順に感度が下がっていた。このことから、プロット膜細孔径に応じて適当なりポソーム粒子径が存在することがわかった。

【0099】実施例10. 化学発光反応を検出に用いた本発明のリポソーム免疫プロット測定法(LIA)

2枚のPVDF膜(孔径450nm、イモピロンP、ミリアポア)を100%メタノールに30秒間浸し、PBS中で15分間振とうした。水分をよく切り、パラフィルム上に静置した。膜が乾かないうちに膜上に各濃度(0、0.0001、0.001、0.01、0.1、1ng/μl)のヒトIgMを20μlずつ滴下して膜内に浸透させ、固定化した。固定化されたIgMの量はそれぞれ、0、0.002、0.02、0.2、2、20ngである。膜をPBS中で10分間振とうして洗浄した後、ブロッキング溶液(ナカライテスク社、pH7.2)に膜を浸して室温で1時間インキュベートし、残りの吸着サイトをブロッキング

した。1%スキムミルクPBS溶液で10分間振とうすることを3回繰り返すことにより膜を洗浄した。1次抗体として3μg/mlの抗ヒトIgM抗体(ウサギ)を含む1%スキムミルクPBS溶液に膜を浸し、室温で1時間インキュベートすることにより、膜上のIgMと反応させた。この膜を1枚ずつ以下のLIAおよび従来のEIAに用いた。
【0100】LIAにおいては、1%スキムミルクPBS溶液で10分間振とうすることを3回繰り返すことにより膜を洗浄した後、実施例1で作製したHRPを包含した抗ウサギIgG抗体(ヤギ)結合リポソーム(粒子径350nm)を0.1μg/mlの抗体濃度で含む1%スキムミルクPBS溶液に膜を浸し、室温で1時間インキュベートすることにより、膜上の1次抗体と反応させた。膜をPBSで10分間振とうすることを3回繰り返すことにより洗浄した後、化学発光基質溶液[10μg/mlルミノール、75μg/ml p-ヨードフェノール、0.063% H_2O_2 を含むTBS(2.4g/l Tris、0.8g/l NaCl、0.2g/l KCl、pH8.0)]に一定時間(30秒~1分間)膜を浸し、冷却CCDカメラ(東洋紡績株式会

*社、FAS-1000)を用いて撮影することにより、シグナルを検出した。従来のEIAにおいては、1%スキムミルクPBS溶液で10分間振とうすることを3回繰り返すことにより膜を洗浄した後、0.05% Tween20を含むPBSで64,000倍に希釈した、標識酵素結合抗体である抗ウサギIgG抗体(ヤギ)-HRP(抗体濃度として約74ng/ml)に膜を浸し、室温で1時間インキュベートすることにより、膜上の1次抗体と反応させた。膜をPBSで10分間振とうすることを3回繰り返すことにより洗浄した後、LIAと同じ手順で化学発光によるシグナルの検出を行なった。

【0101】その結果、EIAでは0.2ngのIgMまでしか検出できなかったのに対し、LIAでは0.02ngのIgMまで検出できた。したがって、リポソームの脂質膜を透過可能な、HRPの基質である H_2O_2 、化学発光基質のルミノール、およびエンハンサーとなるp-ヨードフェノールを用いることにより、本発明のLIAにおいて、化学発光によっても非常に高感度でシグナルの検出を行なうことが可能であった。

【0102】

【発明の効果】本発明により、ドットプロット法やウエスタンプロット法などの膜を用いたアッセイにおいても、拡散等による感度低下や輪郭がぼやけることなく、EIAよりも高い感度で被検物質を検出可能な、方法および該方法に基づくキットを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】本発明のリポソーム免疫プロット測定法と従来の免疫プロット測定法の概略図である。

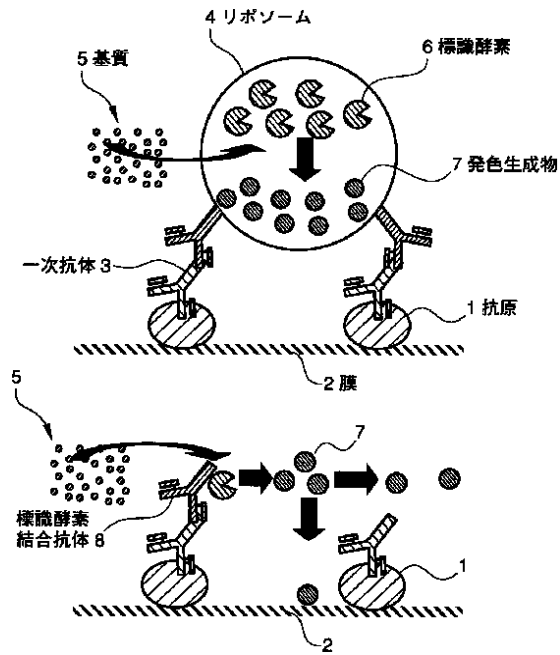
【符号の説明】

- 1 抗原
- 2 膜
- 3 一次抗体
- 4 リポソーム
- 5 基質
- 6 標識酵素
- 7 発色物質
- 8 標識酵素結合抗体

30

*

【図1】



专利名称(译)	检测物质的方法		
公开(公告)号	JP2003149246A	公开(公告)日	2003-05-21
申请号	JP2002237477	申请日	2002-08-16
申请(专利权)人(译)	协和醱酵工业株式会社		
[标]发明人	加藤滋雄 熊田陽一		
发明人	加藤 滋雄 熊田 陽一		
IPC分类号	G01N33/544 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/566		
FI分类号	G01N33/544.A G01N33/532.Z G01N33/543.501.D G01N33/566		
优先权	2001256579 2001-08-27 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种能够在不破坏脂质体的情况下获得高度敏感和清晰的信号的检测方法，以及用于该方法的试剂盒。在使用脂质体检测被检物质的方法中，脂质体是具有在其表面上特异性识别被检物质并包封标记物质的脂质体。一种检测方法，其特征在于，在不具有识别被测物质的抗体（一抗）和识别被测物质的抗体，以及用于固定被测物质的载体的情况下进行检测。具有在表面上能够识别（第一抗体）并包封标记物质的抗体（第二抗体）的脂质体，和可透过脂质体的脂质膜并通过与标记物质反应而检测的脂质体 用于检测包含潜在物质的测试物质的试剂盒。

