

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4581266号
(P4581266)

(45) 発行日 平成22年11月17日(2010.11.17)

(24) 登録日 平成22年9月10日(2010.9.10)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 O 1 A
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 D
 GO 1 N 33/53 M
 GO 1 N 33/53 S

請求項の数 9 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2001-50140 (P2001-50140)	(73) 特許権者	000002853 ダイキン工業株式会社
(22) 出願日	平成13年2月26日 (2001.2.26)		大阪府大阪市北区中崎西2丁目4番12号 梅田センタービル
(65) 公開番号	特開2002-250727 (P2002-250727A)	(74) 代理人	100062144 弁理士 青山 稜
(43) 公開日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		(74) 代理人 100068526 弁理士 田村 恭生
審査請求日	平成19年11月7日 (2007.11.7)	(72) 発明者	楠 慎一郎 東京都練馬区大泉学園町2丁目23番の2 1
		(72) 発明者	新井 潤一郎 茨城県つくば市御幸が丘3番地 株式会社 ダイキン環境研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物由来微量成分の検出方法およびそのための装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

採取した検体中のタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる1種の成分に、タンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる1種の成分のみと反応する条件下で抗体結合物質を直接結合させてタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる1種の成分 - 抗体結合物質の結合物とし、その抗体結合物質に特異的な抗体を該結合物に結合させることを特徴とする、検体中の該タンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる1種の成分を検出し、または検体中の該タンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる1種の成分の総量を定量する方法。

【請求項 2】

該抗体が結合している該結合物に該抗体に特異的な標識二次抗体を結合させ、標識レベルを測定する工程をさらに含む、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

タンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる1種の成分がタンパク質である請求項 1 または 2 記載の方法。

【請求項 4】

検体が気体または液体である、請求項 1 から 3 までのいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

1) 抗体結合物質、2) 検体中のタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体

の中から選ばれる 1 種の成分に抗体結合物質を直接結合させるための試薬、3) その抗体結合物質に特異的な抗体、および 4) 該抗体に特異的な標識二次抗体の中から選ばれる 2 つまたはそれ以上を含む、検体中のタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる 1 種の成分を検出し、またはタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる 1 種の成分の総量を定量するためのキット。

【請求項 6】

採取した検体中のタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる 1 種の成分に、タンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる 1 種の成分のみと反応する条件下で抗体結合物質を直接結合させてタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる 1 種の成分 - 抗体結合物質の結合物とし、その抗体結合物質に特異的な抗体を該結合物に結合させることを特徴とする、検体中の該タンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる 1 種の成分を検出し、または検体中の該タンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる 1 種の成分の総量を定量するための装置。

10

【請求項 7】

該抗体が結合している該結合物に該抗体に特異的な標識二次抗体を結合させ、標識レベルを測定する工程がさらに存在する、請求項 6 記載の装置。

【請求項 8】

タンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる 1 種の成分がタンパク質である請求項 6 または 7 記載の装置。

20

【請求項 9】

検体が気体または液体である、請求項 6 から 8 までのいずれか 1 項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は抗原抗体反応を利用する、生物由来の微量成分、詳細にはタンパク質、糖質、脂質、核酸等およびそれらの複合体の中から選ばれる成分の検出および/または定量方法に関し、生物、医学分野の基礎研究から食品科学、環境科学、医療などの分野の研究開発や応用研究に有用である。

【0002】

30

【従来の技術】

タンパク質を検出、定量する方法としては従来から、紫外外部吸収測定法 ("Handbook of Biochemistry and Molecular Biology", Vol.2, Fasman, G.D. ed., CRC press, Ohio (1976), p383)、ビュレット法 (Gornoll, A.G. et al., (1949): J.Biol.Chem.177,751) またはLowry法 (Lowry, O.H. et al., (1951): J.Biol.Chem.193, 265) 等が知られているが、いずれの方法も、多量の試料が必要であったり、妨害物質の存在により測定不能となったりと何らかの欠点を有しており、特に微量タンパク質を検出、定量する方法としては適していない。

【0003】

一方、ポリアクリルアミドゲル中などの微量タンパク質を検出する方法として、クーマシー・ブリリアント・ブルー等の色素を用いる微量定量法が提案されている (Bramhal, S. et al., (1969): Anal. Biochem. 31,146)。しかし、この方法では大量のタンパク質が必要となり、タンパク質の検出限界は 100 ng である。他に銀染色によるタンパク質の測定方法もあるがこれは再現性に乏しく、ng レベル (正確には 0.2 ng) のタンパク質を検出するのが限界である (Oakley, B.r., et al., (1980): Anal. Biochem. 105, 261; Merril, C.R., et al., (1981): Science 211, 1437)。

40

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

細菌、カビ、ウイルス、原虫、アレルゲン等の空気・水環境汚染物質を検出するには、それらが極微量でしか存在しないため少なくとも 10 pg レベルでそれらを検出できる方法

50

が求められる（大谷武司ら、(1992)：アレルギー-41 (3) 411-417）。よって、これらの汚染物質は特にアレルゲンの場合、その殆どがタンパク質で構成されるが、従来のタンパク質検出方法ではそれらを高精度で検出および定量することはできない。

また、糖質、脂質、核酸等の微量検出についても十分な低レベルでの検出手段を提供することは、生物・医学分野の基礎研究から食品科学などの分野の応用研究に役立つ。

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決するため鋭意検討した結果、本発明の検出および/または定量方法を見出した。即ち、本発明は、

第1の態様として、採取した検体中の生物由来目的成分に他の成分とは反応しない条件下に抗体結合物質を結合させて生物由来目的成分-抗体結合物質の結合物とし、その抗体結合物質に特異的な抗体を該結合物に結合させることを特徴とする、検体中の該生物由来目的成分を検出し、または検体中の該生物由来目的成分の総量を定量する方法；特に、該抗体が結合している該結合物に該抗体に特異的な標識二次抗体を結合させ、標識レベルを測定する工程をさらに含む本発明方法；また、生物由来目的成分がタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる、好ましくは生物由来目的成分がタンパク質である本発明方法；特に、検体が気体または液体である本発明方法；

10

【0006】

第2の態様として、1) 抗体結合物質、2) 検体中の生物由来目的成分に抗体結合物質を結合させるための試薬、3) その抗体結合物質に特異的な抗体、および4) 該抗体に特異的な標識二次抗体の中から選ばれる2つまたはそれ以上を含む、検体中の生物由来目的成分を検出し、または生物由来目的成分の総量を定量するためのキット；

20

【0007】

第3の態様として、採取した検体中の生物由来目的成分に他の成分とは反応しない条件下に抗体結合物質を結合させて生物由来目的成分-抗体結合物質の結合物とし、その抗体結合物質に特異的な抗体を該結合物に結合させることを特徴とする、検体中の該生物由来目的成分を検出し、または検体中の該生物由来目的成分の総量を定量するための装置；特に、該抗体が結合している該結合物に該抗体に特異的な標識二次抗体を結合させ、標識レベルを測定する工程がさらに存在する本発明装置；また、生物由来目的成分がタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体の中から選ばれる、好ましくは生物由来目的成分がタンパク質である本発明装置；特に、検体が気体または液体である本発明装置、に関する。

30

【0008】

好ましい態様では、本発明は、採取した検体中の生物由来タンパク質に他の成分とは反応しない条件下に抗体結合物質を結合させて生物由来タンパク質-抗体結合物質の結合物とし、その抗体結合物質に特異的な抗体を該結合物に結合させることを特徴とする、検体中の該生物由来タンパク質を検出し、または検体中の該生物由来タンパク質の総量を定量する方法またはそのための装置、要すれば該抗体が結合している該結合物に該抗体に特異的な標識二次抗体を結合させ、標識レベルを測定する工程をさらに含む本発明方法またはそのための装置、に関する。より好ましくは、抗体結合物質が2,4-ジニトロフェノール

40

【0009】

従来における抗原抗体反応を利用する測定方法は、測定しようとする個々の標的物質に対して特異的な方法であった。これに対し、本発明の方法および装置は、標的物質が特異的な単一物質ではなく、検体に含まれる単一の成分、例えばタンパク質などを総合的に、即ち非特異的に検出および/または定量することを目的とする。この従来にない目的を達成する手段として、本発明は上記の各方法および装置を提供するものである。

【0010】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

50

1) 検体中の生物由来目的成分を検出および/または定量する方法

本発明は第1の態様として、採取した検体中の生物由来目的成分に他の成分とは反応しない条件下に抗体結合物質を結合させて生物由来目的成分-抗体結合物質の結合物とし、その抗体結合物質に特異的な抗体を該結合物に結合させることを特徴とする、検体中の該生物由来目的成分を検出し、または検体中の該生物由来目的成分の総量を定量する方法に関する。

【0011】

本発明における「検体」には、生体由来の細胞、組織、形質転換細胞等の抽出物、および食品、気体や液体など、あらゆる材料が含まれる。これらの材料は精製品であっても、材料の化学的合成品であっても、本発明における検出および/または定量の対象とすることができる。よって、検体には食品、細胞・組織から抽出された粗抽出物、あるいは遺伝子導入された細胞からの遺伝子導入産物を含む粗抽出物が含まれる。

【0012】

本発明における微量成分たる「生物由来目的成分」としては、細菌、カビ、ウイルス、原虫、ダニあるいは哺乳動物細胞または組織を起源とするタンパク質、糖質、脂質、核酸およびそれらの複合体が挙げられる。タンパク質には単純タンパク質あるいはメチル化、リン酸化などされた修飾タンパク質が含まれる。糖質には多糖類や糖鎖などが含まれ、核酸にはデオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)などが含まれる。複合体には、糖または脂質などがタンパク質に結合している複合タンパク質、あるいは糖脂質などが含まれる。

【0013】

本発明における「抗体結合物質」とは抗体結合能を有しているあらゆる物質を意味し、それ自身は免疫原性を有していても有していなくてもよい。抗体結合物質は典型的には、抗体との結合能を有しているが免疫原性を有していないハプテンなどが例示される。より具体的には、タンパク質成分を修飾する場合には、免疫学分野で通常用いられるジニトロフェノール(DNP、2,4-ジニトロフェノール)、トリニトロフェノール(TNP、2,4,6-トリニトロフェノール)、オキサゾロン(4-エトキシメチレン-2-フェニル-2-オキサゾリン-5-オン)、ベンジルペニシリン(BPO-)K等が抗体結合物質として好適に使用される。

生物由来目的成分がタンパク質である場合、生化学分野で用いられるタンパク質の染色剤、例えばクーマシー・ブリリアント・ブルー(CBB)、また絹、羊毛等の動物素材の染色剤(染料・顔料)等も抗体結合物質として使用できる。

生物由来目的成分が糖質の場合、ジフェニールアミン-アニリン、ニンヒドリンなどの生化学分野で用いられている糖質の発色剤、および綿、麻などの多糖類繊維の染色剤が例示される。

生物由来目的成分が核酸の場合、エチジウムブロマイド、サイバーゴールドなどの生化学分野で用いられている核酸(DNA、RNA)の蛍光発色剤、および細胞組織染色で用いられている色素類が例示される。

【0014】

「生物由来目的成分に他の成分とは反応しない条件下に抗体結合物質を結合させる」における条件とは、生物由来目的成分がタンパク質であり、抗体結合物質がDNPの場合を例に説明すると以下のとおりである。

タンパク質と抗体結合物質との反応水素イオン濃度、反応温度、反応時間、反応気圧等の結合条件は特に限定されないが、反応温度は大気圧下10~100℃が良いが室温~37℃が使用しやすい。反応時間は10分から24時間が良いが1時間~16時間が実行しやすい。反応水素イオン濃度(pH)はアルカリ条件下が好ましい。

DNPをタンパク質に結合させるため2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムを用いた場合、反応時間は37℃、1時間とすることができ、あるいは25℃にて24時間の反応条件も使用できる。

なお、単純タンパク質は複合タンパク質や修飾タンパク質よりもその検出感度は高い。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

上記のようにして生物由来目的成分と抗体結合物質との結合物を調製した後、それに抗体を結合させる。

本発明における「抗体」としては市販品を使用することができる。例えばジニトロフェノールについてはウサギ抗-DNP（バイオジェネシス社）、トリニトロフェノールについてはラット抗-TNP（エル・エス・エル社）がある。しかし、抗体は、例えばMakela, O. and Seppala (1986) In Weir, D.M. (ed), Handbook of Experimental Immunology, Col. 1. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th edition, p. 3.1.等に記載されている方法により抗体結合物質-キャリア-複合体を調製し、次いでそれを用いる通常の抗体作製手法に従って、容易に作製することができる。

10

【 0 0 1 6 】

上記のようにして作製された抗体が結合した結合物を検出および/または定量することにより、生物由来目的成分を検出および/または定量する。

かかる結合物の検出および/または定量は、その結合物に結合している上記抗体を検出および/または定量するための当業者に既知の種々の方法によって行うことができる。

例えば、抗体の検出および/または定量はラジオイムノアッセイ（RIA）、酵素イムノアッセイ（EIA）、酵素結合イムノソーブントアッセイ（ELISA）、イムノラジオメトリックアッセイ（IRMA）、ウェスタン・ブロッティング（WB）等によって行うことができる。

好ましくは、抗体に特異的な二次抗体を用いる方法である。このような二次抗体としては市販品を使用することができる。通常この二次抗体は標識することにより検出および/または定量に供する。標識物としてはRI標識、蛍光標識、酵素標識等を用いることができる。

20

以下の実施例では、DNP化タンパク質を電気泳動後、酵素標識二次抗体によるウェスタン・ブロッティングを用いて常法に従い検出方法を行っており、本方法では全工程を6時間程度で行うことができた。

【 0 0 1 7 】

検体が気体あるいは液体の場合、本発明方法では、気体、液体をフィルター等で濾過した後、フィルターに捕捉されている成分を検定する。例えば、空気中の微量成分である生物由来目的成分を検定するには、検体である空気をフィルターに通し、目的成分が捕捉されたフィルターを、抗体結合物質を含む反応液に浸し、上記所定の反応条件により抗体結合物質を目的成分に結合させて結合物を調製する。次いで、未反応の抗体結合物質を除去し、抗体結合物質に特異的な抗体を該結合物に結合させ、検出/定量を行う。検出/定量は上記のようにRIA、EIA、ELISA、IRMA、WB等によって行うことができる。

30

【 0 0 1 8 】

本発明検出方法はpg（ピコグラム）の生物由来目的成分を、殊にタンパク質を検出するのに有用な方法であり、測定範囲として100ngから1pg、特に1ngから10pgの生物由来目的成分を検出するのに好適である。

また、本発明方法では、検体中に存在する生物由来目的成分のすべてを捕捉することが可能であるので、検体中に存在する生物由来目的成分の総量を定量するための方法として有用である。

40

【 0 0 1 9 】

2) 検体中の生物由来の目的成分を検出および/または定量するためのキット

本発明は第2の態様として、1) 抗体結合物質、2) 検体中の生物由来目的成分に抗体結合物質を結合させるための試薬、3) その抗体結合物質に特異的な抗体、および4) 該抗体に特異的な標識二次抗体の中から選ばれる2つまたはそれ以上を含む、検体中の生物由来目的成分を検出し、または生物由来目的成分の総量を定量するためのキットに関する。好ましい組み合わせは、1) 抗体結合物質、2) 検体中の生物由来目的成分に抗体結合物質を結合させるための試薬、および3) その抗体結合物質に特異的な抗体を含むキット、

50

あるいは1)抗体結合物質、および3)その抗体結合物質に特異的な抗体を含むキットである。

【0020】

3)検体中の生物由来の目的成分を検出および/または定量するための装置
本発明は第3の態様として、採取した検体中の生物由来目的成分に他の成分とは反応しない条件下に抗体結合物質を結合させて生物由来目的成分-抗体結合物質の結合物とし、その抗体結合物質に特異的な抗体を該結合物に結合させることを特徴とする、検体中の該生物由来目的成分を検出し、または検体中の該生物由来目的成分の総量を定量するための装置に関する。本発明装置は、本発明検出方法に基づくものであり、それはエアコンなどの一部材を構成し、空気中のアレルギー、喘息等の原因物質を容易に検出できる手段を提供する。

10

【0021】

【実施例】

実施例1

DNP化タンパク質マーカーのウェスタン・ブロッティングによる検出

タンパク質分子量スタンダード・高分子用(GIBCO BRL Cat#1600-018)を100ng/mlから2倍希釈を5段階行い、サンプル溶液を作製した。それぞれのサンプル溶液における最終タンパク質量は1バンド当たり250pg、125pg、62.5pg、31.3pgおよび15.7pgとなる。

2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸ナトリウム(東京化成社製)に1M Na₂CO₃を加えたアルカリ溶液を作製し、DNBS溶液とした。

20

【0022】

サンプル溶液10μlとDNBS溶液10μlをマイクロチューブに入れ、ピペットチップの中で良く混和した。次いで37℃で1時間静置した。

SDSサンプル緩衝液(62.5mM トリス-HCL pH6.8、2% SDS、25% グリセロール、0.01% ブロムフェノールブルーおよび2% 2-メルカプトエタノール)20μlを加え、5分間加熱変性する。それぞれのサンプルを泳動緩衝液(25mM トリス-HCL pH8.3、192mM グリシンおよび0.1% SDS)中、5-20%のポリアクリルアミドグラジエントゲル(Bio Rad社製レディーゲル)で電気泳動した。泳動後のゲルを、転写緩衝液(25mM トリス-HCL pH8.3、192mM グリシンおよび15% メタノール)で5分間洗浄した。洗浄後のゲルをセミドライ型転写装置でPVDFメンブレン(ミリポア社製)に転写させた。転写後のメンブレンを、洗浄緩衝液(TBS-T:20mM トリス-HCL pH7.6、137mM NaClおよび0.1% Tween-20)で3分間洗浄した。メンブレンをブロッキング溶液(20mM トリス-HCL pH7.6、137mM NaCl、0.1% Tween-20および5% スキムミルク)に室温で1時間浸した。

30

【0023】

1次抗体(ウサギ抗-DNP(バイオジェネシス社製):ブロッキング溶液にて2000倍希釈)を室温1時間反応させ、洗浄緩衝液で3分間×4回洗浄した。次いで、2次抗体(ヤギ抗-ウサギIgG-西洋ワサビペルオキシダーゼ(ICN-カベル社製):ブロッキング溶液にて5000倍希釈)を室温で30分反応させ、洗浄緩衝液で3分間×4回洗浄した。化学発光基質(Lumi-Light PLUS:Roche Diagnostics社製)に5分間浸し、ECLカメラ(Amersham社製)にて、ポラロイドフィルム(#667)に露光時間1分間にて露光した。

40

【0024】

得られた結果を図1に示す。図1中、右から順にレインボーマーカー(非DNP化)(バイオラッド社製)、250pgタンパク質、125pgタンパク質、62.5pgタンパク質、31.3pgタンパク質、15.7pgのバンドをそれぞれ示している。高分子量タンパク質マーカーの分子量は大きい方から200kDa、97.4kDa、68kDa、43kDa、29kDa、18.4kDa、14.3kDaである。レインボーマーカーのレーンで強く光っているバンドは45.2kDaの分子量を持つタンパク質マーカーである。

50

図 1 は、本発明方法が、タンパク質を数 1 0 p g まで検出可能なことを示している。

【 0 0 2 5 】

【発明の効果】

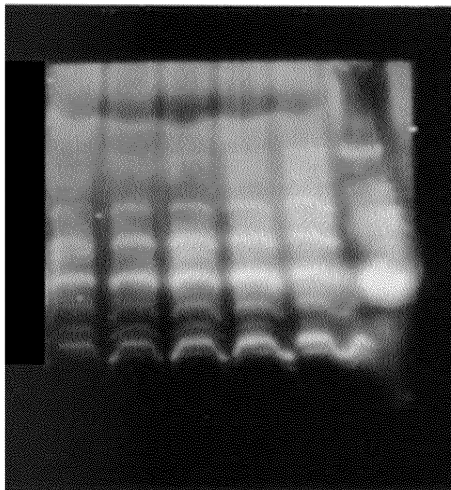
本発明方法は、微量成分の検出方法として生物・医学分野の基礎研究から食品科学、環境科学、医療などの分野の研究開発や応用研究において非常に有効である。また、本発明検出方法に基づく、検体中の微量成分、特にタンパク質を検出または該タンパク質の総量を定量するためのシステムを備えた装置を作製すれば、それはエアコンなどの一部材を構成し、空気中のアレルギー、喘息等の原因物質になる汚染原を検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】D N P 化タンパク質マーカーのウェスタン・ブロッティングによる検出結果を示す電気泳動の図面に代わる写真である。

10

【図 1】



フロントページの続き

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開平03-048766(JP,A)
特開平08-089296(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	用于检测生物衍生物的方法和设备		
公开(公告)号	JP4581266B2	公开(公告)日	2010-11-17
申请号	JP2001050140	申请日	2001-02-26
[标]申请(专利权)人(译)	大金工业株式会社		
申请(专利权)人(译)	大金工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	大金工业株式会社		
[标]发明人	楠慎一郎 新井潤一郎		
发明人	楠 慎一郎 新井 潤一郎		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.501.A G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.S		
其他公开文献	JP2002250727A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种有效检测和/或确定样品中痕量组分的方法。解决方案：痕量组分与抗体结合物质结合，然后通过免疫测定法检测和/或测定。

