

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2005/070969

発行日 平成20年1月17日(2008.1.17)

(43) 国際公開日 平成17年8月4日(2005.8.4)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>C07K 17/00 (2006.01)</b>	C07K 17/00	2G045
<b>G01N 33/53 (2006.01)</b>	G01N 33/53 D	4H045
<b>G01N 33/68 (2006.01)</b>	G01N 33/68	
<b>G01N 33/543 (2006.01)</b>	G01N 33/543 525G	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 51 頁)

出願番号	特願2005-517266 (P2005-517266)	(71) 出願人	000252300 和光純薬工業株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2005/000737		大阪府大阪市中央区道修町3丁目1番2号
(22) 国際出願日	平成17年1月21日(2005.1.21)	(71) 出願人	501203344
(31) 優先権主張番号	PCT/JP2004/000504		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(32) 優先日	平成16年1月21日(2004.1.21)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	河野 直幸 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社 ゲノム研究所内
		(72) 発明者	上森 仁志 兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社 試薬研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛋白質の固定化方法及び定量方法

## (57) 【要約】

従来の固相化法では容易に固定化できなかった試料中の蛋白質を固相に固定化できる固定化方法、該固定化方法を用いた試料中に共存する阻害物質の影響を軽減できる蛋白質の定量方法、並びに該固定化方法を用いた従来よりも迅速且つ精度の高い異常型PrPの検出方法及びBSEの判定方法に関するものであり、「低級アルコールと、ハロゲンカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、蛋白質を疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、当該蛋白質の当該固相への固定化方法及びそれに用いる固定化用試液。該固定化方法により蛋白質が固定化された固相に蛋白質染色液を接触させそれにより生じた発色の程度に基づいて行うことを特徴とする蛋白質の定量方法及び該固定化方法により蛋白質が固定化された固相を用いることを特徴とするイムノブロットング方法、並びに該固定化方法を用いた異常型PrPの検出方法及びBSEの判定方法」を提供する。

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、当該蛋白質の当該固相への固定化方法。

**【請求項 2】**

低級アルコールとハロゲノカルボン酸と長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、請求項 1 に記載の固定化方法。

**【請求項 3】**

低級アルコールがエタノール又はメタノールである、請求項 1 に記載の固定化方法。 10

**【請求項 4】**

ハロゲノカルボン酸がトリクロロ酢酸（以下、TCAと略記する。）又はトリフルオロ酢酸（以下、TFAと略記する。）である、請求項 1 に記載の固定化方法。

**【請求項 5】**

長鎖アルキル硫酸塩がドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDSと略記する。）である、請求項 1 に記載の固定化方法。

**【請求項 6】**

蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の低級アルコール濃度が、30～50 V/V%である、請求項 1 に記載の固定化方法。

**【請求項 7】**

蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる際のハロゲノカルボン酸濃度が、0.08～10 W/V%である、請求項 1 に記載の固定化方法。 20

**【請求項 8】**

蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の長鎖アルキル硫酸塩濃度が、0.1～1 W/V%である、請求項 1 に記載の固定化方法。

**【請求項 9】**

固相が疎水性膜である、請求項 1 に記載の固定化方法。

**【請求項 10】**

低級アルコールがエタノール又はメタノールであり、ハロゲノカルボン酸がTCA又はTFAであり、長鎖アルキル硫酸塩がSDSである、請求項 1 に記載の固定化方法。 30

**【請求項 11】**

蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の、低級アルコール濃度が30～50 V/V%であり、ハロゲノカルボン酸濃度が0.08～10 W/V%であり、長鎖アルキル硫酸塩濃度が0.1～1 W/V%であって、固相が疎水性膜である、請求項 10 に記載の固定化方法。

**【請求項 12】**

請求項 1 の方法により蛋白質が固定化された固相に蛋白質染色液を接触させ、それにより生じた発色の程度に基づいて行うことを特徴とする、蛋白質の定量方法。

**【請求項 13】**

請求項 1 の方法により蛋白質が固定化された固相を用いることを特徴とする、イムノブロットング方法。 40

**【請求項 14】**

異常型プリオン蛋白質を含有する被検試料を、請求項 1 の方法により処理して異常型プリオン蛋白質を当該固相に固定化させた後、異常型プリオン蛋白質と結合し得る抗体を反応させ、それにより生じた抗原抗体複合物の量を測定し、その結果に基づいて行うことを特徴とする、異常型プリオン蛋白質の検出方法。

**【請求項 15】**

異常型プリオン蛋白質を含有する被検試料中の異常型プリオンを固相に結合させた後、固相に結合しなかった被検試料中の成分を吸引濾過により除去する、請求項 14 に記載の検出方法。

**【請求項 16】**

50

請求項 1 5 記載の吸引濾過の工程を行った後、非イオン性界面活性剤を含有する溶液で固相を洗浄する工程を更に追加して行う、請求項 1 4 に記載の検出方法。

【請求項 1 7】

非イオン性界面活性剤を含有する溶液が、更に低級アルコール及びハロゲノカルボン酸を含有するものである請求項 1 6 に記載の検出方法

【請求項 1 8】

抗体が標識物質で標識されたものである請求項 1 4 に記載の検出方法。

【請求項 1 9】

異常型プリオン蛋白質に結合した標識抗体の標識物質の量を測定し、その結果に基づいて抗原抗体結合物の量を測定する請求項 1 8 に記載の検出方法。 10

【請求項 2 0】

標識物質が酵素であり、酵素免疫測定法により抗原抗体結合物の量を測定する、請求項 1 9 に記載の検出方法。

【請求項 2 1】

異常型プリオン蛋白質と酵素標識抗体との抗原抗体複合物に、当該酵素に対する基質溶液を反応させて当該酵素の作用により発色反応を起こさせた後、基質溶液を吸引濾過により除去する、請求項 2 0 に記載の検出方法。

【請求項 2 2】

下記工程により得られた異常型プリオン蛋白質を含有する動物組織由来試料を被検試料として用いる、請求項 1 4 に記載の検出方法。 20

1) 異常型プリオン蛋白質を検出すべき動物組織を界面活性剤の存在下に破碎処理する工程、

2) 不溶物を除去する工程、

3) 上清に分解酵素を加えて正常型PrPを分解する工程、

4) 異常型プリオン蛋白質を沈降させる工程、

5) 沈降物を回収したのち、沈降物の溶液を得る工程、

【請求項 2 3】

請求項 1 4 に記載の方法により異常型プリオン蛋白質を検出し、その結果に基づいて行う、プリオン病の判定方法。 30

【請求項 2 4】

低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩とを含有する、蛋白質固定化用試液。

【請求項 2 5】

低級アルコールとハロゲノカルボン酸と長鎖アルキル硫酸塩とを含有する、請求項 2 4 記載の試液。

【請求項 2 6】

低級アルコールがエタノール又はメタノールである、請求項 2 4 記載の試液。

【請求項 2 7】

ハロゲノカルボン酸がTCA又はTFAである、請求項 2 4 に記載の試液。

【請求項 2 8】 40

長鎖アルキル硫酸塩がSDSである、請求項 2 4 に記載の試液。

【請求項 2 9】

低級アルコール濃度が、30～50 V/V%である、請求項 2 4 に記載の試液。

【請求項 3 0】

ハロゲノカルボン酸濃度が、0.1～10 W/V%である、請求項 2 4 に記載の試液。

【請求項 3 1】

長鎖アルキル硫酸塩濃度が、0.1～1 W/V%である、請求項 2 4 に記載の試液。

【請求項 3 2】

(1)低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸とを含有する固定化用試液 1、(2)非イオン性界面活性剤を含有する固定化用試液 2、及び(3)異常型プ 50

リオン蛋白質と結合し得る標識抗体、を構成試薬として含有してなる、異常型プリオン蛋白質検出用キット。

【請求項 3 3】

固定化用試液 2 が、更に低級アルコール及びハロゲンカルボン酸を含むものである、請求項 3 2 に記載のキット。

【請求項 3 4】

標識抗体が酵素標識抗体である場合に、更に当該酵素の反応により検出可能なシグナルを発生し得る当該酵素の基質を構成試薬として含有して成る、請求項 3 2 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、固相への蛋白質の新規な固定化方法、それを用いた蛋白質の定量方法、免疫ブロッティング方法並びに蛋白質固定化用試液、更には該固定化方法を用いた異常型プリオン蛋白質の検出方法及びプリオン病（特に牛海綿状脳症、Bovine Spongiform Encephalopathy、以下BSEと略記する。）の判定方法等に関するものである。

【背景技術】

【0002】

蛋白質の定量は、従来、溶液内で蛋白質の化学的反応性の高い部分と蛋白質反応試液とを反応させたり [Lowry, O.H. et al., J. Biol. Chem., 193: 265-275 (1951), Smith, P.K. et al., Anal. Biochem., 150: 76-85 (1985)]、蛋白質と特異的に吸着する色素試液と反応させることで [Bradford, M., Anal. Biochem., 72: 248-254 (1976), Watanabe, N. et al., Clin. Chem., 32: 1551-1554 (1986)]、溶液の吸光度を変化させ、その吸光度変化に基づいて測定する方法、いわゆる液相法が主流であった。しかしながら、生化学的サンプルには、通常、蛋白質の他、非蛋白質性生体成分や緩衝剤、塩類、酸化防止剤、キレート剤、糖類、有機溶媒、人工ポリマー、界面活性剤等多数の物質が共存しており、多くのサンプルでは、これらの共存物質が原因となって蛋白質と蛋白質測定試液の相互作用（反応・結合）を阻害し、正確な蛋白質の測定ができない場合が多々ある。そこで、蛋白質を膜等の固相面に吸着させ、上記共存物質のような蛋白質測定に対する阻害物質を洗い流し、固相面に滞留した蛋白質を蛋白質測定試液で反応させ定量する方法、いわゆる固相法が開発された（非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3、非特許文献 4、非特許文献 5）。

20

30

【0003】

しかしながら、これらの蛋白質の膜固定化方法は、阻害物質を除去することはできるが、一定の割合で蛋白質を膜に固定化することができず、やはり正確な蛋白質の定量を行えないため、問題解決には至っていない。

【0004】

一方で、蛋白質の固定化法として蛋白質変性・チャージ中和作用のあるトリクロロ酢酸や酢酸溶液、酢酸/メタノール溶液を夫々固定化溶液として用いる方法が古くから行われている。しかし、蛋白質によっては十分な固定化ができない場合があるため、蛋白質の測定を定量的に行えない。そのため、新たな蛋白質の固定化/定量方法の開発が望まれている現状にあった。

40

【0005】

ところで、BSE、ヒツジのスクレイピー及びヒトのクロイツフェルト・ヤコブ病に代表されるプリオン病は、プリオン蛋白質 (Prion Protein、以下、PrPと略記する。) が異常化し、脳の組織がスポンジ状になり、運動失調などの神経症状を引き起こす病気である。PrPの遺伝子自体はウシだけでなく、ヒトやヒツジ、ネコ等、ほ乳類が普通に持っている。正常な個体の正常組織に存在するPrP (以下、正常型PrPと記載する。) は、プロテイナーゼ K で容易に分解される。しかし、BSE等の疾患でみられるPrPは、蛋白質分解酵素や、加熱、紫外線照射などの物理化学的処理にも抵抗性であるという特徴を有する (このPrPを以下、異常型PrPと記載する)。BSEでは、この異常型PrPが脳内に蓄積され、細胞が死滅することで脳がスポンジ状になり神経障害を引き起こすことが知られている。

50

## 【0006】

プリオン病の判定は、異常型PrPを検出することにより行われるが、異常型PrPの検出方法としては、ELISA法とウェスタン・ブロット法が知られている。

## 【0007】

ELISA法による異常型PrPの検出方法は、まず被検試料中のPrPのうち正常型PrPを酵素処理等により分解し、異常型PrPのみにしたのち、ELISA用プレートに結合した抗PrP抗体(一次抗体)、次いで標識物質で標識した抗PrP抗体(二次抗体)と反応させ、異常型PrPに結合した抗PrP抗体の標識を発色させて測定するというものである。この方法では、異常型PrPのみと抗PrP抗体を結合させるために、予め正常型PrPと他の蛋白質を完全に分解させる必要があるが、実際には正常型PrPやその他の蛋白質が完全には分解されずに、残ったこれらの蛋白質が抗PrP抗体と結合する場合があります(偽陽性判定がされる原因)、異常型PrPを特異的に検出することが困難であるという問題がある。

10

## 【0008】

またウェスタン・ブロット法による判定方法は、ELISA法の場合と同様に被検試料中のPrPのうち正常型PrPを分解した後、電気泳動を行う。分離した電気泳動分画をシートに転写し、異常型PrPと結合して発色する試薬を添加し、その発色を測定する方法である。この方法では、電気泳動を行うことで、被検試料中の蛋白質を分子量別に分類できるので、被検試料中に正常型PrPやその他の蛋白質があったとしても、異常型PrP画分だけを判別することが出来る。しかしながら、ウェスタン・ブロット法では、電気泳動の結果を得るために数時間を要し、また一度に泳動できる検体数が限られているという問題がある。

20

## 【0009】

そのため、より迅速且つ精度の高い異常型PrPの検出方法及びプリオン病の判定方法が望まれている現状にあった。

## 【0010】

【非特許文献1】 Kuno, H. et al., Nature, 1967, 215, p.974-975

【非特許文献2】 Gates, R., Anal. Biochem., 1991, 196, p.290-295

【非特許文献3】 Said-Fernandez, S. et al., Anal. Biochem. 1990, 191, p.119-126

【非特許文献4】 Ghosh, S. et al., Anal. Biochem., 1988, 169, p.227-233

【非特許文献5】 Lim, M.K. et al., BioTechniques, 1996, 21, p.888-895

【発明の開示】

30

【発明が解決しようとする課題】

## 【0011】

本発明は、これら上記した如き状況に鑑みなされたもので、従来の固相化法では容易に固定化できなかった試料中の蛋白質を固相に固定化でき、且つ試料中に共存する阻害物質の影響を軽減して蛋白質の定量的測定/検出を行うことができる固定化方法、それを用いた蛋白質の定量方法、イムノブロッティング方法並びに蛋白質固定化用試液、更には該固定化方法を用いた異常型PrPの迅速且つ精度の高い検出方法及びプリオン病(特にBSE)の判定方法等を提供することを課題とする。

【課題を解決するための手段】

## 【0012】

40

本発明は、上記課題を解決する目的でなされたものであり、以下の構成よりなる。

(1) 低級アルコールと、ハロゲンカルボン酸及び/又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、当該蛋白質の当該固相への固定化方法。

(2) 上記(1)の方法により蛋白質が固定化された固相に蛋白質染色液を接触させ、それにより生じた発色の程度に基づいて行うことを特徴とする、蛋白質の定量方法。

(3) 上記(1)の方法により蛋白質が固定化された固相を用いることを特徴とする、イムノブロッティング方法。

(4) 異常型PrPを含有する被検試料を、上記(1)の方法により処理して異常型PrPを当該固相に固定化させた後、異常型PrPに結合し得る抗体を反応させ、それにより生じた抗原

50

抗体複合物の量を測定し、その結果に基づいて行うことを特徴とする、異常型PrPの検出方法。

(5) 上記(4)の方法により異常型PrP蛋白質を検出し、その結果に基づいて行う、プリオン病の判定方法。

(6) 低級アルコールと、ハロゲンカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩とを含有する、蛋白質固定化用試液。

(7) 低級アルコールと、ハロゲンカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸とを含有する固定化用試液1、(2)低級アルコール、ハロゲンカルボン酸及び非イオン性界面活性剤を含有する固定化用試液2、及び(3)異常型PrPと特異的に結合し得る標識抗体、を構成試薬として含有してなる、異常型PrP検出用キット。

10

【発明の効果】

【0013】

本発明に係る蛋白質固定化方法によれば、従来の固定化方法よりも十分に蛋白質を固相に固定化できる。また、従来の固定化方法では正確に行えなかった蛋白質の定量も行うことができる。更に、本発明に係る蛋白質固定化方法を用いれば、イムノブロットィングを行った際の感度も高くなるという効果を奏する。

更に、本発明に係る異常型PrPの検出方法によれば、より迅速且つ高精度で異常型PrPを検出し、プリオン病(特にBSE)をより迅速に精度良く判定することができるという効果を奏する。

【図面の簡単な説明】

20

【0014】

【図1】実施例1において得られた、各固定化用試料中の蛋白質を固定化したポリビニリデンジフロライド膜(PVDF膜)をPyromollex試液で染色した後、600nmにおける吸光度(シグナル強度)を測定した結果を示す。

【図2】実施例2に於いて得られた、各固定化用試料中の蛋白質を固定化したPVDF膜をPyromollex試液で染色した後、600nmにおける吸光度(シグナル強度)を測定した結果を示す。

【図3】実施例3に於いて得られた、各固定化用試料中の蛋白質を固定化したPVDF膜をPyromollex試液で染色した後、600nmに於ける吸光度(シグナル強度)を測定した結果を示す。

30

【図4】実施例4に於いて得られた、各固定化用試料中の蛋白質を固定化したPVDF膜をPyromollex試液で染色した後、600nmに於ける吸光度(シグナル強度)を測定した結果を示す。

【図5】実施例5に於いて得られた、蛋白質試料として卵白アルブミン(OVA)を用いて、PVDF膜に固定化、定量を行って得られた検量線を示す。

【図6】実施例6に於いて得られた、固相法により蛋白質を測定した結果又は液相法により蛋白質を測定した結果に基づいて得られた相対値を示す。

【図7】実施例7に於いて得られた、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)を含有しないIgG試料又はSDSを含有するIgG試料を蛋白質試料として用い、本発明に係る固定化、蛋白質の定量を行って得られた検量線を示す。

40

【図8】実施例10に於いて得られた、イムノブロットィングの結果を示し、AはPVDF膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発光反応により行い、X線フィルムに感光させ検出したものである。Bは、PVDF膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発色反応により行い、検出したものである。

【図9】実施例14及び比較例4に於いて得られた、希釈試料を用いて本発明に係る固定化、蛋白質の定量を行って得られた結果と、従来法であるELIZA法により蛋白質の定量を行って得られた結果を併せて示したものである。

【符号の説明】

【0015】

図2において、-△-はリゾチーム、---はチトクロームc、-○-はIgG、-□-は

50

フィブリノーゲン、—●—はBSA、—◆—はOVA、—◇—はトリプシンインヒビターを含有する蛋白質試料を用いた場合の結果を夫々示す。

図7において、—◆—はSDSを含有しないIgG試料を用いた場合、—△—はSDSを含有するIgG試料を用いた場合の結果を夫々示す。

図9において、—□—、—■—、—■—は、実施例14について得られた、夫々試料No.1、2及び3を用いた結果を夫々示し、—○—、—●—、—●—は、比較例4について得られた、夫々試料NO.1、2及び3を用いた結果を夫々示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0016】

即ち、本発明者等は、従来の固相化法では蛋白質の固定化がうまく行かない要因について検討を行ったところ、その最大の要因は、蛋白質を固相に固定化する段階で、目的の蛋白質を十分に（一定の割合で）固相に固定化できないために、蛋白質の定量的な測定が行えないのが原因であるということを見出した。

そこで、固定化を効率よく行う方法について更に検討を行った結果、エタノール等の低級アルコール類と、トリクロロ酢酸等のハロゲノカルボン酸の共存下に蛋白質の固定化を行うと、固相に蛋白質を十分に固定化できることを見出した。

【0017】

また、界面活性剤のうち、長鎖アルキル硫酸塩が蛋白質の固定化にユニークな特性を持つことを見出した。即ち、長鎖アルキル硫酸塩を、低級アルコール、又は低級アルコールとハロゲノカルボン酸とが存在する条件下で蛋白質の固定化を行うと、蛋白質の吸引・ろ過を行う過程で、蛋白質に何らかの影響を及ぼし、その結果、蛋白質の膜吸着を促進し安定化する一方、阻害物質等の共存物質を膜固相面から排除するように働く（阻害物質の膜滞留を抑える）ことが明らかとなった。長鎖アルキル硫酸塩のこうした働きは、蛋白質含有固定化用試料溶液をマイクロプレートウエル等の固相面に静置した場合でも起こり得る。

【0018】

一般的に非イオン性界面活性剤等の界面活性剤は、疎水性物質の吸着を阻害する性質を有しており、一方、蛋白質と膜の結合は疎水結合によると考えられている。そのため、これまで界面活性剤が蛋白質の固定化時に好んで用いられることはなく、それ故に界面活性剤の持つ蛋白質に対する作用と、作用を受けた蛋白質の固相面に対する相互作用を詳細に論じた報告は殆ど無い。そのため、界面活性剤の一種である長鎖アルキル硫酸塩が、蛋白質の固定化に有効であるということは今まで知られていなかった。

【0019】

従って、長鎖アルキル硫酸塩を、従来から蛋白質固定化に用いられていた低級アルコール類、若しくは低級アルコールとハロゲノカルボン酸と共存させることで、蛋白質を十分に固相に固定化できるということは、本発明者らが初めて見出したことである。更に、従来の固相法では界面活性剤が共存する試料中の蛋白質を効率よく固定化することができなかったため、このような試料については蛋白質の定量も行えなかったが、本発明の固定化法によれば、そのような試料中の蛋白質も効率よく固定化することができ、極めて有効な、利用価値の高い蛋白質固定化方法を完成した。

【0020】

更に、当該蛋白質固定化方法を用いて異常型PrPを検出し、その結果を基にプリオン病の判定を行えば、従来のELISA法やウェスタン・ブロット法よりも迅速で高精度の判定が行えるのではないかと考え、鋭意研究の結果、従来の組織試料の調製方法及び本発明に係る蛋白質固定化方法を利用することによって、従来のELISA法に比較して偽陽性が出ずに精度良く判定が行え、また従来のウェスタン・ブロット法に比較して判定に要する時間を1/3に短縮することができることを見出し、本発明を完成した。

【0021】

尚、本発明に於いて、蛋白質の固定化法という場合、蛋白質を固相に固定化する方法をいい、固相法による蛋白質の測定又は定量という場合は、本発明に係る固定化方法で蛋白

質を固相に固定化した後、蛋白質の測定又は定量を行うことを意味する。

【0022】

本発明に係る低級アルコールとしては、メタノール、エタノール、プロパノール等が挙げられ、中でもエタノール又はメタノールが好ましい。

【0023】

本発明に係るハロゲノカルボン酸のハロゲン原子としては、臭素、フッ素、塩素等が挙げられ、中でも塩素が好ましい。カルボン酸としては、酢酸、プロピオン酸等が挙げられ、中でも酢酸が好ましい。このようなハロゲノカルボン酸としては、例えばトリクロロ酢酸 (TCA)、トリフロロ酢酸 (TFA) 等が挙げられる。

【0024】

本発明に係る長鎖アルキル硫酸塩の長鎖アルキル基としては、炭素数7~25のものが好ましく、中でも8~15が好ましい。より好ましくはドデシル基である。また、硫酸塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩等が好ましく、中でもナトリウム塩が好ましい。このような長鎖アルキル硫酸塩の具体例としては、例えばドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 等が挙げられる。

10

【0025】

本発明に係る固定化方法に於いて、蛋白質を低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び/又は長鎖アルキル硫酸塩と共存させる方法としては、蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させる際に、当該蛋白質が低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び/又は長鎖アルキル硫酸塩と共存している状態にできるものであれば、どのような方法でも良い。

20

【0026】

例えば、(1) 蛋白質を含有する試料と、低級アルコールを含有する溶液と、ハロゲノカルボン酸を含有する溶液及び/又は長鎖アルキル硫酸塩を含有する溶液を混合する方法、(2) 蛋白質を含有する試料と、低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び/又は長鎖アルキル硫酸塩を直接混合する方法等が挙げられるが、特に限定されるものではない。

【0027】

低級アルコールを含有する溶液、長鎖アルキル硫酸塩を含有する溶液及びハロゲノカルボン酸を含有する溶液を調製する際に用いられる溶液としては、例えば精製水、緩衝液等が挙げられ、緩衝液を構成する緩衝剤としては、例えばMOPS, HEPES等のグッド緩衝剤、トリス (Tris) 緩衝剤、リン酸緩衝剤、ペロナール緩衝剤、ホウ酸緩衝剤等、通常この分野で用いられている緩衝剤が挙げられるが、なるべく蛋白質の固定化や測定に対する影響を回避するために、精製水を用いるのが好ましい。

30

【0028】

蛋白質と疎水性表面を有する固相とを接触させる固定化用試料中の各試薬の好ましい濃度としては、低級アルコール濃度が30~50 V/V%、好ましくは35~50W/V%、ハロゲノカルボン酸濃度が0.08~10W/V%、好ましくは0.5~5 W/V%、長鎖アルキル硫酸塩濃度が0.1~1 W/V%、好ましくは0.1~0.4W/V%である。

【0029】

本発明に係る疎水性表面を有する固相としては、例えば疎水性表面を有する膜、疎水性表面を有するプレート等が挙げられる。疎水性表面を有する膜の具体例としては、例えば疎水性膜であるポリビニリデンジフロライド膜 (PVDF膜)、ニトロセルロース膜、濾紙等が挙げられ、疎水性表面を有するプレートの具体例としては、例えば通常ELISA等によく用いられるプラスチックプレート等が挙げられる。

40

【0030】

蛋白質を、疎水性表面を有する固相と接触させる方法としては、上記方法により調製した、蛋白質と、低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び/又は長鎖アルキル硫酸塩を含有する固定化用試料を、当該疎水性表面を有する固相と接触させればよい。例えば固定化用試料を当該固相上に滴下する、塗布する等の方法がある。

【0031】

50

当該固相として疎水性膜を用いる場合には、当該疎水性膜上に当該固定化用試料を滴下等した後、静置して当該疎水性膜に当該固定化用試料を浸透させるか、又は固定化用試料を、当該疎水性膜を通して吸引濾過する、通常のフィルトレーション法、或いは遠心濾過法による方法を用いれば良い。

【0032】

フィルトレーション法による蛋白質の固定化方法を、市販のドットプロッターもしくはスロットプロッターを用いる方法を例に挙げて具体的に説明すると、以下の通りである。

【0033】

まず、メタノール、次いで蒸留水に浸したPVDF膜等の疎水性膜及び要すればその上に蒸留水に浸した濾紙となるようにドットプロッターにセットする。次に、一定量の蛋白質と低級アルコール、長鎖アルキル硫酸塩及び／又はハロゲンカルボン酸を含有する固定化用試料（最大400 $\mu$ L）をドットプロッターのウェルにアプライし、真空ポンプで、約15Kpa程度の引圧でゆっくり吸引する（フィルトレーションする）と、固定化用試料中の蛋白質はPVDF膜に吸着される。固定化試料を完全に吸引した後、洗浄液を各ウェルにアプライし、吸引する。次いで、ドットプロッターからPVDF膜を取り出し、ペーパータオル、濾紙等の上に乗せ、約30分以上かけて真空乾燥を行う。

10

【0034】

蛋白質が吸着し易いか否かは、その蛋白質の疎水性と固相膜面の疎水性の関係により決まる。例えばその条件下で吸着し易い蛋白質は、速く吸引した場合も十分吸着されるが、中程度もしくは弱い吸着性しか示さない蛋白質の吸着の程度は吸引速度に大きく影響される。従って、目的の蛋白質を十分吸着させるためには、一般にゆっくり吸引することが好ましい。例えば10分以上をかけて吸引することが好ましい。

20

【0035】

当該固相として、疎水性表面を有するプレートを用いる場合には、例えば当該プレート上に当該固定化用試料を滴下又は塗布等した後、静置して自然乾燥させる方法等を行えばよい。

【0036】

蛋白質の定量を行うには、蛋白質を固定化した固相を通常の蛋白質定量方法に付し、試料中の蛋白質量を測定すればよい。

【0037】

本発明に係る蛋白質の定量方法としては、上記方法により蛋白質を固相に固定化させた後、蛋白質染色液として例えばアミノブラック、ピロガロールレッド-モリブデン酸複合体 (Pyromollex) 溶液を用いた方法、クマシーブリリアントブルー (CBB)-G250を用いたブラッドフォード法、ピシンコニン酸を用いたBCA法等によって染色を行い、生じた発色の程度を測定することによって行う、自体公知の蛋白質測定方法によって測定を行えばよい。

30

【0038】

実際の定量には、測定しようとする蛋白質毎に、蛋白質濃度既知の蛋白質試料を用いて同様に固定化、染色、測定を行い、検量線を作成しておく。そして、その検量線をもとに、試料中の蛋白質濃度を決定する。

40

【0039】

例えば、Pyromollex発色法による定量方法を例にとり説明すると、先ず、蛋白質試料中の蛋白質を本発明の方法によりPVDF膜に固定化させた後、PVDF膜を精製水又はリン酸緩衝食塩水 (PBS) 等の緩衝液で洗浄する。要すれば室温で30分程度真空乾燥させた後、Pyromollex含有染色試液に20~35分程度浸漬させて、発色させる。その後、デンストメーター、CCDカメラ等により600nmの吸光度を測定する。得られた吸光度を、予め濃度既知の蛋白質試料を用いて同様に蛋白質の固定化、測定を行って得られた検量線から、蛋白質の濃度を決定すればよい。

【0040】

尚、蛋白質の固定化、蛋白質濃度測定等の各工程の間に固相の洗浄処理操作を行うのは

50

任意であるが、行うことが好ましい。その際の洗浄液としては、精製水又はPBS等の緩衝液等が用いられる。

【0041】

本発明に係るイムノプロットイング方法としては、本発明の方法によって固相に蛋白質を固定化させる以外は、当該蛋白質に対する抗体や標識抗体を用いて抗原抗体反応による当該蛋白質の測定／検出を行う、通常のイムノプロットイング方法が適用できる。本発明に係る固定化方法を行えば、蛋白質を効率的に固相に固定化できるので、本発明に係るイムノプロットイング方法によれば、従来よりも感度よく蛋白質の検出及び分析を行うことができる。

【0042】

本発明の固定化方法によって固定化できる蛋白質は、従来の固相化法によって固定化されていた蛋白質は全て挙げられるが、例えば血液、血清、血漿、髄液等の各種体液や尿、リンパ球、血球、細胞類等の生体由来の試料中に含まれる蛋白質が挙げられる。

【0043】

具体的には、例えばリゾチーム、チトクロームc、DNase等の酵素、IgG、IgM、IgE等の抗体、フィブリノーゲン等の糖蛋白質、ウシ血清アルブミン (BSA)、ヒト血清アルブミン (HAS) 等の血清蛋白質、卵白アルブミン (OVA)、PrP等の蛋白質、トリプシンインヒビター等のインヒビター、インシュリン等のホルモン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

【0044】

尚、本発明は、例えば従来の固相化法では固相に充分固定化できなかったチトクロームc等の塩基性蛋白質をも固定化することができ、蛋白質の定量を行える点で、特に有効である。

【0045】

本発明に係る蛋白質の固定化方法に於いて、固相に固定化できる蛋白質の濃度上限は、例えば、固相が膜の場合約 $500\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 程度、固相がマイクロプレートの場合約 $10\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 程度であるので、固定化用試料中の蛋白質の量は、固定化する固相の種類に応じて、その最大保持能を超えないように、調製することが望ましい。

【0046】

本発明に係る異常型PrPの検出方法は、異常型PrPを含有する被検試料を、本発明に係る蛋白質の固定化方法により処理して異常型PrPを当該固相に固定化させた後、異常型PrPに結合し得る抗体を反応させ、それにより生じた抗原抗体複合物の量を測定し、その結果に基づいて行う方法である。

【0047】

本発明に係る異常型PrPの検出方法に用いられる異常型PrPを含有する被検試料の調製方法は、従来のBSEの判定方法に於いて行われている、動物組織由来の試料の調製方法に従って行ってもよい。

【0048】

即ち、異常型PrPを検出すべき動物組織を、適当な緩衝液や糖類溶液中でホモジナイズし、得られたホモジネートをプロテイナーゼKで処理して正常型PrPを分解させる。次いで反応物に蛋白質沈降剤を加えて異常型PrPを沈殿させ、沈殿物を適当な溶媒（緩衝液、尿素水溶液等）に溶解して、ELISA又はウェスタン・プロットイングに付すという方法である。

【0049】

但し、下記工程による調製方法で異常型PrPを検出すべき動物組織を処理すれば、上記した従来法よりも、効率よく動物組織から異常型PrPを抽出することが出来る。

【0050】

即ち、

- 1) 異常型PrPを検出すべき動物組織を界面活性剤の存在下に破碎処理する工程、
- 2) 不溶物を除去する工程、

10

20

30

40

50

- 3) 上清に分解酵素を加えて正常型PrPを分解する工程、  
 4) 異常型PrPを沈降させる工程、  
 5) 沈降物を回収したのち、沈降物の溶液を得る工程、  
 である。

【0051】

上記工程1)に於いて用いられる界面活性剤としては、SDS、ラウリルベンゼンスルホン酸、デオキシコール酸、コール酸、トリス(ヒドロキシメチル)アミノメタンジシメチルサルフェイト(Tris DS)等の陰イオン性界面活性剤、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル類、例えばポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル(Triton X-100、ローム アンド ハース社商品名)等のポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル類、例えばポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート、ポリオキシエチレンソルビタントリオレート等のポリオキシエチレンアルキルエステル類、例えばオクタノイル-N-メチルグルカミド、ノナノイル-N-メチルグルカミド、デカノイル-N-メチルグルカミド等のメチルグルカミド誘導体、例えばn-オクチル-β-D-グルコシド等のアルキル糖誘導体等の非イオン界面活性剤等が挙げられる。中でもTriton X-100、デオキシコール酸が好ましい。これらは単独又は二種以上混合して用いられる。

【0052】

動物組織を界面活性剤の存在下に破碎処理する方法としては、動物組織を破碎処理する際に界面活性剤が共存するように、動物組織に界面活性剤又はこれを含有するホモジナイズ用溶液を添加しても、またその逆に界面活性剤又はホモジナイズ用溶液に動物組織を加えても良い。

【0053】

工程1)に於いて用いられる界面活性剤の濃度は、ホモジナイズされた時のホモジネート中の濃度が0.015~15.6W/V%、好ましくは0.078~7.8W/V%である。また、ホモジナイズ用溶液中の濃度として、0.02~20W/V%、好ましくは0.1~10W/V%である。

【0054】

尚、当該ホモジナイズ溶液中には上記界面活性剤の他に例えばトリス緩衝剤、リン酸緩衝剤、ペロナル緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、グッド緩衝剤等の緩衝剤、糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。

【0055】

上記工程2)に於ける不溶物を除去する方法としては、不溶物を分離除去することが出来る方法で有れば良く、遠心分離による方法が簡便である。

【0056】

上記工程3)に於いて用いられる分解酵素としては、正常型PrPを分解するが異常型PrPを分解しない性質を持つ酵素であればよい。例えば従来の異常型PrPの検出に於いて用いられるプロテイナーゼK等が挙げられる。その濃度及び分解反応時の条件等は、分解酵素が正常型PrPを分解できる条件、濃度であればよい。

【0057】

上記工程4)に於いて異常型PrPを沈降させるために用いられる蛋白質沈降剤としては、異常型PrPを沈降させる性質を持つものであれば良く、従来の異常型PrPの検出に於いて用いられるものを使用すればよいが、例えば3-ブタノール、2-ブタノールとメタノールの混合溶媒等が挙げられる。

【0058】

工程5)に於いて沈降物を回収する方法としては、上清を除いて沈殿した異常型PrPを回収できる方法で有れば良く、遠心分離による方法が簡便である。

【0059】

また、工程5)に於いて沈降物の溶液を得るには、沈降物を適当な沈降物溶解液中に溶解すればよい。

## 【0060】

沈降物溶解液を構成する溶媒としては、異常型PrPが固相上に吸着或いは結合するのを妨げる性質を有するものでなければ良く、例えば精製水、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナル緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等、この分野で普通に用いられている緩衝液は全て挙げられる。緩衝液のpHとしては抗原抗体反応を抑制しない範囲であれば特に限定されないが、通常5～9の範囲が好ましい。

## 【0061】

また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常10～500mM、好ましくは10～300mMの範囲から適宜選択される。また、この溶解液中には、抗PrP抗体が固相上に吸着或いは結合するのを妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。

10

## 【0062】

更に、沈降物溶解液中には、工程3)の分解酵素を失活させ、異常型PrPを不活性化させる(病原性-感染性を失わせる)ために、例えば尿素、SDS、蟻酸、チオシアン酸グアニジン、塩酸グアニジン、三塩化酢酸、フェノール等の界面活性剤、酸化剤又は蛋白質変性剤を共存させておく必要がある。その濃度は、沈降物溶解液中の濃度として0.5%W/V%以上、好ましくは2%W/V%以上である。

## 【0063】

尚、分解酵素を失活させる為、この分野で用いられる加熱処理を行っても良い。

## 【0064】

また、工程1)～5)の各工程に於いて使用するその他の試薬、器具類や、処理条件等(反応温度、反応時間等)は、すべて自体公知の上記した如き異常型PrPを検出すべき動物組織を処理する方法に準じて選択すればよい。

20

## 【0065】

従来のBSEの判定方法における動物組織由来の試料の調製方法では、動物組織をホモジナイズ処理及びプロテイナーゼK処理後、蛋白質沈降剤により異常型PrPを沈降させるが、ここに至るまでの過程でホモジネートを除去する操作を行わない。そのため得られた異常型PrPを含有する被検試料中には、異常型PrP以外の多種の蛋白質も多量に共存することになり、抗PrP抗体の非特異的結合を起こさせBSEの判定の際に偽陽性の判定をもたらす危険性が高くなる。

30

## 【0066】

これに対し、上記工程1)では、非イオン性界面活性剤等の界面活性剤の存在下に動物組織を破碎処理することにより、細胞膜を可溶化して細胞膜に結合した形で存在するPrPを細胞膜より遊離させることが出来る。そのため、次の工程2)で沈降物を除去する工程を行っても、PrPは組織片と一緒に沈殿してしまわないので、上清を回収すれば、PrPを含有し且つ動物組織片を含有しない溶液が得られる。この溶液について工程3)を行えば、従来のホモジネートをそのまま酵素処理するよりも、効率よく正常型PrPを分解出来るので、正常型PrPを含有しない、且つ異常型PrPを含有する被検試料を得ることが出来るのである。

## 【0067】

また、工程2)及び5)の工程に於いて異常型PrP以外の成分の除去操作が複数回行われることにより、動物組織片や異常型PrP以外の蛋白質が除かれるので、次の固定化処理の工程で、固相が目詰まりしてしまう危険性を排除できる。

40

## 【0068】

更に工程1)及び5)に於いて、被検試料を非イオン性界面活性剤と共存させることにより、測定対象でない他の蛋白質や、正常型PrPを分解できる。一方異常型PrPは変性、分解しにくい蛋白質なので、非イオン性界面活性剤の共存下でも変性、分解されない。そのため、固相への固定化方法を行った際に、分解された蛋白質は固相を通過してしまうが、分解されなかった異常型PrPは固相上に残るので、異常型PrPを効率よく固相に固定化することができるのである。

50

## 【0069】

異常型PrPを含有する被検試料中の異常型PrPを固相に固定化させる方法は、本発明に係る蛋白質の固定化方法に従い、上記の方法により調製した異常型PrPを含有する被検試料から、低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩を含有する異常型PrP固定化用試料を調製し、当該疎水性表面を有する固相と接触させればよい。

## 【0070】

当該方法に用いられる低級アルコール、ハロゲノカルボン酸、長鎖アルキル硫酸塩の具体例、これらを含有する溶液の調製方法及び当該溶液中の濃度、当該被検試料を低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩と共存させる方法等の好ましい態様及び具体例は、前記した通りである。

10

## 【0071】

また、当該異常型PrP固定化用試料を疎水性表面を有する固相と接触させる方法に用いられる固相の具体例は前記した通りであるが、例えば疎水性膜であるPVDF膜、ニトロセルロース膜、濾紙等が好ましい。

## 【0072】

異常型PrP固定化用試料を、疎水性表面を有する固相と接触させる方法及び接触させる条件等は前記した通りであるが、中でも、当該疎水性膜を通して吸引濾過する、通常のフイルトレーション法、或いは遠心濾過法による方法が、好ましい。これらの方法により、固相上には測定対象である異常型PrPが固定化され、それ以外の蛋白質は固相を通過してしまうので、より効率的である。

20

## 【0073】

当該方法では、異常型PrPを固相に固定化するために試料を固相と接触させた後、1分～30分、好ましくは10分程度静置し、その後吸引濾過処理を行う。従来のELISA法によれば、ELISA用プレートに蛋白質を固定化するために約75分程度静置する必要があったが、本発明の方法によれば、この時間を大幅に短縮することが出来る。

## 【0074】

フイルトレーション法による異常型PrPの固定化方法を、市販のドットプロッターもしくはスロットプロッターを用いる方法を例に挙げて具体的に説明すると、以下の通りである。

## 【0075】

30

まず、メタノール、次いで蒸留水に浸したPVDF膜等の疎水性膜及び要すればその上に蒸留水に浸した濾紙となるようにドットプロッターにセットする。次に、例えば上記の方法で調製した、異常型PrP、低級アルコール、長鎖アルキル硫酸塩及び／又はハロゲノカルボン酸を含有する異常型PrP固定化用試料（最大400 $\mu$ L）をドットプロッターのウェルにアプライし、真空ポンプで、約15Kpa程度の引圧でゆっくり吸引する（フイルトレーションする）と、異常型PrP固定化用試料中の異常型PrPはPVDF膜に吸着される。溶液を完全に吸引した後、洗浄液を各ウェルにアプライし、吸引する。

## 【0076】

異常型PrPを固相に固定化するための吸引操作は、異常型PrPを十分吸着させる条件で行えば良く、約2Kpa～30Kpa程度の引圧で吸引すればよい。吸引に要する時間、吸引速度等は特に制限されない。

40

## 【0077】

異常型PrPを含有する被検試料中の異常型PrPを固相に結合させた後、吸引濾過することにより、固相に結合しなかった正常型PrPやその他の蛋白質等の被検試料中の成分を除去することが出来、測定対象である異常型PrPを効率よく固相に固定化することが出来る。

## 【0078】

尚、固相上には抗体を変性させる恐れのあるSDSが残存している。そこで、本発明に係る固定化方法では、固定化処理の後固相を精製水又はPBS等の緩衝液で洗浄することを任意に行うことは先に述べた通りである。異常型PrPを固相に固定化する方法に於いては、上記の吸引濾過の工程を行った後、非イオン性界面活性剤を含有する溶液で固相を洗浄す

50

る工程を更に追加して行うことにより、試料中のSDSを除き、続く異常型PrPの検出工程に付すことが好ましい。この方法では、(1)他の蛋白質は非イオン性界面活性剤により変性してしまう可能性があるが、異常型PrPはこの処理では変性しないこと、(2)非イオン性界面活性剤が、固相に蛋白質を一様に広げる作用があることから、特に異常型PrPのような変性しにくい蛋白質の固定化を行うには有効な方法である。

【0079】

当該洗浄工程に用いられる溶液には、非イオン性界面活性剤の他に、低級アルコール及びハロゲノカルボン酸を含有していることが望ましい。

【0080】

当該洗浄処理に用いられる、低級アルコール、ハロゲノカルボン酸及び非イオン性界面活性剤の好ましい具体例は上記した通りである。 10

【0081】

また、当該洗浄処理における洗浄剤（固定化用試液2とする）中の好ましい濃度としては、低級アルコール濃度が80～50V/V%、好ましくは30～50V/V%、ハロゲノカルボン酸濃度が0.08～10W/V%、好ましくは1～4 W/V%非イオン性界面活性剤濃度が0.01～10V/V%、好ましくは0.04～2 V/V%程度である。

【0082】

本発明に係る異常型PrPの検出方法に於いて、固相に固定化できる蛋白質の濃度上限は、前記した通りである。

【0083】

本発明に係る異常型PrPの検出方法に於いては、本発明の方法によって固相に異常型PrPを固定化させる以外は、当該蛋白質に対する抗体や標識抗体を用いて自体公知の免疫測定法〔例えば酵素免疫測定法（EIA）、放射免疫測定法（RIA）、蛍光免疫測定法（FIA）等〕の測定操作法に準じて異常型PrPの測定／検出を行う、通常のイムノブロッティング方法が適用できる。また、その際に使用する例えば緩衝剤、発色剤、蛍光物質、酵素、基質、放射性同位元素等の試薬類もこれら自体公知の免疫学的測定法に於いて用いられるものの中から適宜選択して用いれば足りる。 20

【0084】

本発明の異常型PrPの検出方法において用いられる抗体としては、異常型PrPに結合し得る性質を有するものであれば、正常型PrPとも反応性を有するものであっても良く、特に限定されない。 30

【0085】

また、これらの抗体の由来については特に限定されないが例えば、ヒト、兔、馬、ウシ、羊、山羊、ラット、マウス等に由来する、上記した如き性質を有するものが挙げられる。

【0086】

また、抗PrP抗体は、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体でも何れにても良い。例えば、モノクローナル抗体は、市販品、或いは細胞融合技術や遺伝子組換え技術等を利用した自体公知の方法〔Eur.J immunol, 6, 511 (1976)〕等によって産生された、上記した如き性質を有するモノクローナル抗体は全て使用可能である。また、ポリクローナル抗体は、市販のものを使用しても良いし、また、動物抗血清から公知の方法（例えば、「タンパク質精製法、Robert.K.Scopes著、シュプリンガー・フェアラク東京株式会社、1985年、37頁～179頁」等に記載された方法等。）で取得されるポリクローナル抗体を使用しても良い。これらを単独で或はこれらを適宜組み合わせる等は任意である。 40

【0087】

また、これら抗体は、要すればペプシン、パパイン等の酵素を用いて消化してF(ab')<sub>2</sub>、Fab'、或はFabとして使用してもよいことは言うまでもない。

【0088】

尚、均一の性質を有する抗体の特異性を考慮すると、ポリクローナル抗体よりもモノクローナル抗体の方が好ましい。 50

## 【0089】

本発明に係る異常型PrPの検出方法に於いて、抗PrP抗体を標識するために用いられる標識物質としては、例えばEIAに於いて用いられる西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ等のペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、マイクロパーオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコース-6-リン酸脱水素酵素、リンゴ酸脱水素酵素、ルシフェラーゼ等の酵素類、例えばRIAで用いられる $^{99m}\text{Tc}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^3\text{H}$ 等の放射性同位元素、例えばFIAで用いられるフルオレセイン、ダンシル、フルオレスカミン、クマリン、ナフチルアミン或はこれらの誘導体等の蛍光物質、例えばルシフェリン、イソルミノール、ルミノール、ビス(2,4,6-トリフロロフェニル)オキサレート等の発光性物質、例えばフェノール、ナフトール、アントラセン或はこれらの誘導体等の紫外部に吸収を有する物質、例えば4-アミノ-2,2,6,6-テトラメチルピペリジン-1-オキシル、3-アミノ-2,2,5,5-テトラメチルピロリジン-1-オキシル、2,6-ジ-*t*-ブチル- $\alpha$ -(3,5-ジ-*t*-ブチル-4-オキシ-2,5-シクロヘキサジエン-1-イリデン)-*p*-トリルオキシル等のオキシル基を有する化合物に代表されるスピンドラベル化剤としての性質を有する物質等が挙げられるが、これらに限定されるものではないことは言うまでもない。

10

## 【0090】

中でもペルオキシダーゼ等の酵素類が、取扱いが簡便なため好ましい。

## 【0091】

また、上記した如き標識物質を抗PrP抗体に結合させる(標識する)には、例えば自体公知のEIA、RIAあるいはFIA等において一般に行われている自体公知の標識方法[例えば、医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971; 図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983; 酵素免疫測定法、石川栄治、河合忠、室井潔編、第2版、医学書院、1982等]を適宜利用して行えばよい。尚、当該標識物質を標識した抗PrP抗体は市販されているので、それを用いても良い。

20

## 【0092】

標識抗PrP抗体含有溶液を調製するための溶媒としては、標識抗PrP抗体が固相上に吸着或いは結合するのを妨げる性質を有するものでなければ良く、例えば精製水、例えばトリス緩衝液、リン酸緩衝液、ペロナル緩衝液、ホウ酸緩衝液、グッド緩衝液等通常抗原抗体反応を利用した測定法に用いられている緩衝液は全て挙げられる。緩衝液のpHとしては抗原抗体反応を抑制しない範囲であれば特に限定されないが、通常5~9の範囲が好ましい。

30

また、これらの緩衝液中の緩衝剤濃度としては、通常10~500mM、好ましくは10~300mMの範囲から適宜選択される。また、この溶液中には、抗PrP抗体が固相上に吸着或は結合するのを妨げない量であれば、例えば糖類、NaCl等の塩類、界面活性剤、防腐剤、蛋白質等が含まれていても良い。

## 【0093】

抗原抗体反応の結果生成する抗原抗体複合物中の標識量を測定する方法としては、標識物質の種類により異なるが、標識物質が有している何らかの方法により検出し得る性質に応じて、夫々所定の方法に従い実施すればよい。例えば、標識物質が酵素の場合にはEIAの常法、例えば「酵素免疫測定法」(蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川栄治編集、51~63、共立出版(株)、1987)等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、標識物質が放射性物質の場合にはRIAの常法に従い、該放射性物質の出す放射線の種類および強さに応じて液浸型GMカウンター、液体シンチレーションカウンター、井戸型シンチレーションカウンター、HPLC用カウンター等の測定機器を適宜選択して使用し、測定を行えばよい(例えば医化学実験講座、第8巻、山村雄一監修、第1版、中山書店、1971等)。また、標識物質が蛍光性物質の場合には蛍光光度計等の測定機器を用いるFIAの常法、例えば「図説 蛍光抗体、川生明著、第1版、(株)ソフトサイエンス社、1983」等に記載された方法に準じて測定を行えばよく、標識物質が発光性物質の場合にはフォトカウンター等の測定機器を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法」(蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川栄治編集、252~263、共立出

40

50

版(株)、1987)等に記載された方法に準じて測定を行えばよい。さらに、標識物質が紫外部に吸収を有する物質の場合には分光光度計等の測定機器を用いる常法によって測定を行えばよく、標識物質がスピンの性質を有する場合には電子スピン共鳴装置を用いる常法、例えば「酵素免疫測定法」(蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.31、北川常廣・南原利夫・辻章夫・石川榮治編集、264~271、共立出版(株)、1987)等に記載された方法に準じて夫々測定を行えばよい。

#### 【0094】

より具体的には、例えば標識物質が酵素である場合は、これを酵素反応で発色を生じる基質等の発色試薬と反応させて発色反応に導き、その結果生成する色素量を分光光度計等により測定する方法等の自体公知の方法が挙げられる。

10

#### 【0095】

このような目的で用いられる発色試薬としては、例えばトリメチルベンジルピペラジン(TMB)、テトラメチルベンジジン、*o*-フェニレンジアミン、*o*-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトシド、2,2'-アジノビス(3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸)(ABTS)、*N*-エチル-*N*-スルホプロピル-*m*-アニシジン(ADPS)、*p*-ニトロフェニルリン酸等、通常この分野で用いられる発色試薬が挙げられる。

#### 【0096】

また、発色反応を停止させるには、例えば反応液に1~6Nの硫酸等の酵素活性阻害剤を添加する等、通常この分野で行われている反応停止方法を利用すればよい。

#### 【0097】

本発明の異常型PrPの検出方法に於いて使用する標識抗体、発色試薬及びその他の試薬や、測定条件等(反応温度、反応時間、測定波長、測定装置等)はすべて自体公知の上記した如き免疫学的測定法におけるそれらに準じて選択すれば足り、自体公知の免疫学的測定法の測定操作法に準じて実施すれば良く、自動分析装置、分光光度計等も通常この分野で使用されているものは何れも例外なく使用し得る。

20

#### 【0098】

本発明の異常型PrPの検出方法を、以下に具体的に説明する。

#### 【0099】

即ち、本発明に係る方法で得た異常型PrPを固定化した固相に、例えばPOD標識抗PrP抗体をアプライし、10分程度静置後、吸引濾過して、PrPに結合しなかった標識PrP抗体を除く。次いで洗浄剤をアプライし、吸引する。この洗浄操作を数回行うことは任意である。次いでTMBを含有する発色液をアプライし、30分程度反応させる。反応後吸引濾過して発色液を除去した後、停止液を添加して反応を停止させる。450nmに於ける吸光度をマイクロプレートリーダー等により測定する。

30

本発明に係る固定化方法を行えば、異常型PrPを効率的に固相に固定化できるので、本発明に係るイムノプロットング方法によれば、ELISA法やウェスタン・ブロット法等の従来の異常型PrP検出方法よりも、感度よく異常型PrPの検出及び分析を行うことができる。

#### 【0100】

本発明に係る異常型PrPの検出方法に於いて異常型PrPを検出し得る動物組織としては動物由来の延髄、小脳、脊髄その他の中枢神経系組織、リンパ節等の細網リンパ系組織、骨等が挙げられる。これらの由来動物としては、ヒト、ウシ、ヒツジ、ハムスター、マウス等が挙げられる。

40

#### 【0101】

本発明に係るプリオン病の判定方法としては、例えばカットオフ値を設定して行う方法がある。以下にその一例としてBSEを判定する場合の例を示す。

#### 【0102】

(1)すなわち、先ずPrP(正常型)を試料として用いて上記のPrPの検出方法を行い、標識抗PrP抗体の標識量(例えば吸光度。以下同じ)を測定し、この平均値と標準偏差(SD)をだす。この平均値+ $X$ SDをカットオフ値とする。ここで、 $X$ は通常2~5の整数から適宜選択されるものであり、 $X$ が小さくなればなるほど、検体がBSEと判定される率は高く

50

なるが、測定精度等を考慮に入れると、その値をより小さくすると偽陽性率も上昇すると思われる。そのため、実際の検体を測定する場合には、Xは5程度に設定するのが望ましい。

別に、同様の方法でBSEを判定すべき被検試料を用いて同様の方法で標識抗PrP抗体の標識量を測定し、検体値とする。

検体値がカットオフ値よりも低い場合には検体はプリオン病陰性と判定し、反対に検体値がカットオフ値と同じかそれよりも高い場合にはプリオン病陽性と判定するという方法である。

(2) また、まずPrP (正常型) を試料として用いて上記のPrPの検出方法を行い、標識抗PrP抗体の標識量を測定し、この平均値と標準偏差 (SD) をだし、この平均値 + X SDを求め (式中、Xは前記と同じ。) 10

別に、同様の方法でPrPを含まない溶液を試料として用いて (陰性対照) 同様の方法で標識抗PrP抗体の標識量を測定し、平均値を求める。この陰性対照の標識量の平均値を先に求めた値に加えた値 = [ (正常型PrPを試料とした場合の平均値) + X SD] + [陰性対照の平均値] を求め、これをカットオフ値とする。

更に、同様の方法でBSEを判定すべき被検試料を用いて同様の方法で標識抗PrP抗体の標識量を測定し、検体値とする。

検体値がカットオフ値よりも低い場合には検体はプリオン病陰性と判定し、反対に検体値がカットオフ値と同じかそれよりも高い場合にはプリオン病陽性と判定するという方法もある。 20

#### 【0103】

カットオフ値を得るために用いられるPrPは、動物組織から精製したのもので、遺伝学的法で調製したりコンビナントPrPであってもよい。

#### 【0104】

本発明のプリオン病の判定方法によって判定し得るプリオン病としては、特にBSEが挙げられる。

#### 【0105】

本発明に係る蛋白質固定化用試液としては、本発明に係る低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び/又は長鎖アルキル硫酸塩とを含有していればよく、その具体例は前記した通りである。 30

#### 【0106】

また、蛋白質固定化用試液中の低級アルコールの濃度は、蛋白質を固相に固定化する際に30~50V/V%になるような濃度、ハロゲノカルボン酸の濃度は0.1~10W/V%になるような濃度、長鎖アルキル硫酸塩の濃度は、0.1~1W/V%になるような濃度であればよい。より好ましくは、低級アルコールは35~50V/V%、ハロゲノカルボン酸は0.5~5W/V%、長鎖アルキル硫酸塩は0.1~0.4W/V%である。

#### 【0107】

更に、本発明に係る蛋白質固定化用試液には、蛋白質の固相への固定化、またそれに続く蛋白質の定量に影響を及ぼさないものであれば、その他に塩類、キレート等を含有していてもよい。 40

#### 【0108】

本発明に係る異常型PrP検出用キットとしては、(1)低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び/又は長鎖アルキル硫酸とを含有する固定化用試液1、(2)低級アルコール、ハロゲノカルボン酸及び界面活性剤を含有する固定化用試液2、及び(3)異常型プリオン蛋白質と結合し得る標識抗体、を構成試薬として含有してなるものであり、その具体的な実施態様は前記した通りである。

#### 【0109】

尚、上記キットを構成する標識抗体が酵素標識抗体である場合には、更に当該酵素の反応により検出可能なシグナルを発生し得る当該酵素の基質を構成試薬として含有して成る。その好ましい態様及び具体例は前記した通りである。 50

## 【0110】

以下に実施例を挙げて、本発明を更に具体的に説明するが、本発明はこれらにより何等限定されるものではない。

## 【実施例】

## 【0111】

実施例1.

## 【試料及び試液の調製】

## (1)蛋白質試料

卵白アルブミン（以下、OVAと略記する。ニワトリ卵白由来、和光純薬工業(株)製）、ヘモグロビン（ウシ血液由来、和光純薬工業(株)製）、IgG（ウシ由来、和光純薬工業(株)製）、チトクロームc（ウマ心筋由来、和光純薬工業(株)製）、リゾチーム（ニワトリ卵白由来、和光純薬工業(株)製）、を夫々秤量し、精製水に溶解して250 $\mu$ g/mL溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

## 【0112】

## (2)固定化用試液

各試薬を精製水に溶解して、下記の固定化用試液を調製した。この中で固定化用試液3～5が、本発明に係る固定化用試液である。

尚、各試薬は、エタノール（和光純薬工業(株)製、特級）、トリクロロ酢酸（以下、TCAと略記する。和光純薬工業(株)製、化学用）、ドデシル硫酸ナトリウム（以下SDSと略記する。和光純薬工業(株)製、化学用）を用いた。

対照 : 精製水

固定化用試液1 : 0.2 W/V % SDS、

固定化用試液2 : 0.2 W/V % SDS、2.5W/V% TCA

固定化用試液3 : 0.2 W/V % SDS、45V/V% エタノール

固定化用試液4 : 0.2 W/V % SDS、2.5W/V% TCA、45V/V% エタノール

固定化用試液5 : 2.5W/V% TCA、45V/V% エタノール

## 【0113】

## (3)固定化用試料

蛋白質試料20 $\mu$ L（蛋白質5 $\mu$ g）と、所定の固定化用試液300 $\mu$ Lとを混合したものを調製し、固定化用試料とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度（PVDF膜と接触させる際の濃度。以下同じ。）は、夫々下記の通りである。

固定化用試料1 : 0.19 W/V % SDS、

固定化用試料2 : 0.19 W/V % SDS、2.34W/V% TCA

固定化用試料3 : 0.19 W/V%SDS、42.2V/V%エタノール

固定化用試料4 : 0.19 W/V % SDS、2.34W/V% TCA、42.2V/V% エタノール

固定化用試料5 : 2.34W/V% TCA、42.2V/V% エタノール

## 【0114】

## 【蛋白質の固定化及び測定】

ドットプロッター ADVANTEC DP-96（アドバンテック製）に親水化処理したポリビニリデンジフロライド膜（PVDF膜、ミリポア製、イモビロンP<sup>50</sup> 0.1 $\mu$ m）をセットした。次にPVDF膜に固定化用試料320 $\mu$ Lをアプライし、真空ポンプ（バイオクラフト社製）にて、15KPa（10cmHg）で10分間吸引濾過した。次いでpH7.4 リン酸緩衝食塩水（PBS）300 $\mu$ Lをアプライし、同様に吸引濾過して、PVDF膜を洗浄した。PVDF膜を取り出し真空乾燥させた後、Pyromolx試液（Protein Assay Rapid Kit wako、和光純薬工業(株)製）で発色させ、次いでデンストメーター SHIMADZU CS-9000（(株)島津製作所 製）で600nmの吸光度（シグナル強度）を測定した。

## 【0115】

## 【結果】

結果を図1に示す。図1に於いて、各バーは下記固定化用試料を用いた場合の結果を夫々示す。

	精製水
	固定化用試料 1
	固定化用試料 2
	固定化用試料 3
	固定化用試料 4
	固定化用試料 5

### 【0116】

図1から明らかなように、試薬としてSDSのみを含有する固定化用試料1を膜に固定化させた場合は、シグナル強度が全く測定できなかった（固定化用試料1）。また、SDSとTCAを含有する固定化用試料2を用いた場合は、少しシグナル強度が強くなった（測定できた）が、対照（精製水を用いた場合、従来の固定化法）ほど高いシグナル強度は得られなかった。

これに対し、SDSとエタノールを含有する固定化用試料3を用いた場合は、対照と同等若しくはそれ以上のシグナル強度が得られた。

また、TCAとエタノールを含有する固定化用試料5を用いた場合は、チトクロームcを固定化した場合以外は、すべて対照と比較して遙かに高いシグナル強度が得られた。

更に、TCAとエタノールとSDSを含有する固定化用試料4を用いた場合には、チトクロームcを固定化した場合も含めて、全ての場合で対照と比較して遙かに高いシグナル強度が得られた。

以上のことより、低級アルコールとハロゲンカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で行う本発明に係る固定化法によれば、従来の水や緩衝液だけを用いていた固定化法と比較して、膜への蛋白質の固定化率を飛躍的に向上させることができることが判る。

また、固定化用試料3及び4で、対照と同程度又はそれより高いシグナル強度が測定できたことから、本発明の固定化法によれば、予めSDS等を含有する試料を用いても、蛋白質を固定化することができることが判る。

### 【0117】

実施例2.

【試料及び試液の調製】

(1)蛋白質試料

リゾチーム、チトクロームc、IgG、フィブリノーゲン（ヒト血漿由来、和光純薬工業（株）製）、BSA（牛血清アルブミン、和光純薬工業（株）製）、OVA、トリプシンインヒビター（大豆由来、和光純薬工業（株）製）、ヘモグロビンを夫々秤量し、精製水に溶解して250 $\mu$ g/mL溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

尚、これらの蛋白質は等電点pIが4.0-11.4の幅広い範囲にあり、分子量は12,000-150,000と広範囲のものである（久保ら,蛋白質 生化学ハンドブック,丸善株式会社,54-73 (1984)参照）。

(2)固定化用試液

2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノール、及び所定濃度（0~0.4W/V%）のSDSを含有するように、精製水に溶解して調製したものを固定化用試液として用いた。

(3)固定化用試料

所定の蛋白質試料20 $\mu$ L（蛋白質量5 $\mu$ g）と固定化用試液300 $\mu$ Lとを混合したものを調製し、固定化用試料とした（TCA終濃度2.34W/V%、エタノール終濃度42.2V/V%）。

【蛋白質の固定化及び測定】

実施例1と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンストメーターで600nmの吸光度（シグナル強度）を測定した。

### 【0118】

【結果】

結果を図2に示す。

図2に於いて、 $\triangle$ はリゾチーム、 $---$ はチトクロームc、 $\circ$ はIgG、 $\square$ はフィブリノーゲン、 $\bullet$ はBSA、 $\blacklozenge$ はOVA、 $\diamond$ はトリプシンインヒビターを含有する蛋白質試料を用いた場合の結果を夫々示す。また、横軸は固定化用試液中のSDS濃度を示す。更に、図2中の、各ポイントのバーは、 $\pm$ SDを示す。

図2から明らかな如く、殆どの蛋白質でSDS共存下にPVDF膜に固定化させると、一旦シグナル強度が増加するが、SDS濃度が0.1W/V%以上になるとシグナル強度がある一定の値を示す傾向を示した。このことから、固定化用試液中のSDS濃度を0.1W/V%以上（固定化用試料中の終濃度0.09W/V%以上）とすることにより、試料中の蛋白質のPVDF膜への固定化率が一定となると考えられる。

10

また、データのバラツキを示すCV値（CV値＝標準偏差／平均値（%））についてみると、どの蛋白質も固定化用試液中のSDS濃度が0.1 W/V%より低い濃度では、CV値が大きく、シグナル強度が安定していないことが分かる。それに対し、固定化用試液中のSDS濃度が0.1W/V%以上の場合には、CV値が比較的小さく、上述したようにこの濃度範囲でシグナル強度の値が安定であることが示されている。この結果は、試料中の蛋白質の固相膜に固定化される量を示していると考えられる。また、データは示していないが、この結果は再現性があることを確認している。

#### 【0119】

一般に、SDS等の長鎖アルキル硫酸塩は、0.0025 W/V%といったかなりの低濃度でも蛋白質の構造崩壊作用を示し、構造崩壊の程度により蛋白質結合（染色）色素に対する反応性に違いを生ずるといわれている（Orsonneau, J-L et al., Clin.Chem., 35, 2233-2236 (1989)）。従って、ここでも、それが要因となって、SDS濃度が0.1 W/V%より低い固定化溶液を用いた場合で、シグナル強度が上昇する等の急激な変化を示し、且つ、それが変化の途中過程にあるため、CV値（<15%）が大きくなったと推察される。また、このことは、0.1 W/V%より低いSDS濃度条件下では、試料中の蛋白質のPVDF膜への固定化率が変動している（一定でない）可能性をも示唆している。

20

以上のことより、図2に於いて、SDSの濃度変化の影響を受けずに吸光度（シグナル強度）が安定した時、始めて蛋白質のPVDF膜への固定化率が一定になっているのではないかと推察された。

#### 【0120】

30

そこで、図2の結果を基に、蛋白質試料としてBSAを用い、0.1 W/V% SDSを含有する固定化用試液で固定化した後測定を行った場合のシグナル強度を100（基準値）とした。そして、基準値に対する、その他の各蛋白質を蛋白質試料として用い、0.1W/V%SDS、0.2 W/V%SDS、0.3 W/V%SDS又は0.4 W/V%のSDS固定化用試液を用いて同様に固定化及び測定を行って得られたシグナル強度の相対値を夫々算出した。

#### 【0121】

表1に、SDS濃度が0.2W/V%~0.4W/V%まで変化するまで、表2にはSDS濃度が0.1W/V%~0.4W/V%まで変化するまでの、各ポイントのCV値を平均化した値（平均CV値（%））、各ポイントの相対値の平均値、そのポイント間の絶対偏差を平均化した値（平均絶対偏差）、平均絶対偏差をその平均値で割りパーセント表示した値（ポイント間変動率（%））を夫々示す。ポイント間変動率とは、SDS濃度変化に伴うシグナル強度の変化を変動率として算出した値のことで、この数字が小さいほど、SDS濃度に影響されずにシグナル強度（測定結果）が一定であることを示している。

40

#### 【0122】

【表 1】

蛋白質	平均 CV 値(%)	平均値	平均絶対偏差	ポイント間変動率(%)
BSA	4.9	65.6	7.0	10.7
トリプシンインヒビター	2.6	53.1	4.0	7.5
フィブリノーゲン	1.8	58.5	0.8	1.4
OVA	1.5	68.3	1.4	2.0
ヘモグロビン	1.7	71.9	4.6	6.4
IgG	0.8	96.5	1.9	1.9
チトクローム c	1.9	127.1	3.5	2.7
リゾチーム	1.8	87.4	6.4	7.4
	CV 値の平均 2.1			ポイント間変動率の平均 5.0

10

【0 1 2 3】

【表 2】

蛋白質	平均 CV 値(%)	平均値	平均絶対偏差	ポイント間変動率(%)
BSA	3.9	74.2	13.87	18.7
トリプシンインヒビター	2.5	54.4	4.62	8.5
フィブリノーゲン	1.5	62.7	6.38	10.2
OVA	1.3	69.6	2.32	3.3
ヘモグロビン	1.7	68.6	5.94	8.7
IgG	0.8	98.3	3.17	3.2
チトクローム c	2.1	127.4	2.93	2.3
リゾチーム	1.8	92.0	9.48	10.3
	CV 値の平均 2.0			ポイント間変動率の平均 8.1

20

30

【0 1 2 4】

その結果、表 1 より、SDS濃度が0.2 W/V%–0.4W/V%間で、例えばフィブリノーゲン、OVA、IgG、チトクローム cは、そのポイント間変動率が最も安定し、1.4–2.7%を示した。また、これら蛋白質の平均CV値 (0.8–1.9%) と比較しても遜色ない結果であり、SDS濃度が変化してもシグナル強度の変動が非常に少ないことを示している。

また、表 2 より、フィブリノーゲンを除く3つの蛋白質は、SDS濃度が0.1–0.4 W/V%の間でもポイント間変動率が2.3–3.3%であり、SDS濃度の影響によるシグナル強度の変動が少ないことがわかる。

また、SDS濃度が0.1–0.4 W/V%の間でポイント間変動率が10%を超えるフィブリノーゲン、リゾチーム、BSAについても、SDS濃度を0.2–0.4W/V%に限定すると安定した結果が得られることが判る。

40

以上のことより、SDS濃度が0.1W/V%以上でポイント間変動率が安定してくることから、この濃度範囲のSDSを含有する固定化用試液を用いて、蛋白質を固定化すると、試料中の蛋白質量の正確な定量が行えることが判る。

【0 1 2 5】

実施例 3. 低級アルコールの検討

低級アルコールとしてエタノールの代わりにメタノールを用いた場合の蛋白質試料の固定化及び測定を行った。

【試料及び試液の調製】

50

## (1)蛋白質試料

BSA、OVA、ヘモグロビン、IgG、チトクロームc、リゾチームを夫々秤量し、精製水に溶解して250 $\mu$ g/mL溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

## (2)固定化用試液

精製水を用いて下記固定化用試液を調製した。

固定化用試液1：0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA

固定化用試液2：0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45% エタノール

固定化用試液3：0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45% メタノール（和光純薬工業(株)製、特級）

## (3)固定化用試料

10

蛋白質試料20 $\mu$ L（蛋白質量5 $\mu$ g）と、所定の固定化用試液300mLとを混合したものを調製し、固定化用試料1, 2, 3とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.19 W/V%、TCA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%、メタノール 42.2V/V%である。

## [蛋白質の固定化及び測定]

実施例1と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンストメーターで600nmの吸光度（シグナル強度）を測定した。

【0126】

## [結果]

結果を図3に示す。図3に於いて、各バーは夫々下記固定化用試料を用いた場合の結果を示す。

20

	固定化用試料 1
	固定化用試料 2
	固定化用試料 3

【0127】

図3から明らかな如く、メタノールを含有する固定化用試液を用いて調製した固定化用試料を用いた場合も、エタノールを用いた場合と同程度のシグナル強度が得られ、蛋白質をPVDF膜に固定化することができたことが判る。

【0128】

## 実施例4. ハロゲノカルボン酸の検討

30

ハロゲノカルボン酸として、TCAの代わりにトリフルオロ酢酸（以下、TFAと略記する。）を用いた場合の蛋白質試料の固定化及び測定を行った。

## [試料及び試液の調製]

## (1)蛋白質試料

BSA、IgG、リゾチームを夫々秤量し、精製水に溶解して250 $\mu$ g/mL溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

## (2)固定化用試液

精製水を用いて、下記固定化用試液を調製した。

固定化用試液1：0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール

固定化用試液2：0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール、2.5 W/V% TCA

40

固定化用試液3：0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール、2.5 W/V% TFA（和光純薬工業(株)製）

## (3)固定化用試料

蛋白質試料20 $\mu$ L（蛋白質量5 $\mu$ g）と、所定の固定化用試液300mLとを混合したものを調製し、固定化用試料1, 2, 3とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.19 W/V%、TCA 2.34W/V%、TFA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%である。

## [蛋白質の固定化および測定]

実施例1と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンストメーターで600nmの吸光度（シグナル強度）を測定した。

【0129】

50

## 【結果】

結果を図4に示す。図4に於いて、各バーは夫々下記固定化用試料を用いた場合の結果を示す。

	固定化用試料 1
■	固定化用試料 2
■	固定化用試料 3

## 【0130】

図4から明らかな如く、TFAを含有する固定化用試液を用いて調製した固定化用試料を用いた場合も、TCAを用いた場合と同程度又はそれ以上のシグナル強度が得られ、蛋白質を有効に膜に固定化することができたことが判る。 10

## 【0131】

実施例5. 検量線の作成

【試料及び試液の調製】

(1)蛋白質試料

OVAを0~20 $\mu$ g/20 $\mu$ Lとなるように精製水に溶解して蛋白質試料とした。

(2)固定化用試液

0.2 V/V% SDS、2.5 V/V% TCA、45 V/V% エタノールとなるように精製水に溶解して調製したものを固定化用試液として用いた。 20

(3)固定化用試料

蛋白質試料20 $\mu$ L (蛋白質量5 $\mu$ g) と、固定化用試液300 $\mu$ Lとを混合したものを調製し、固定化用試料とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%である。

【蛋白質の固定化及び測定】

実施例1と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンストメーターで600nmの吸光度 (シグナル強度) を測定した。

## 【0132】

【結果】

その結果を基に、蛋白質量 ( $\mu$ g) とシグナル強度との関係を示す検量線を作成した。 30

結果を図5に示す。図5に於いて、各プロットのバーは、 $\pm 2SD$ を示す。

検量線から得られた結果は、測定範囲0.2~20 $\mu$ g/蛋白質試料、一致係数0.99以上、平均CV1.9%であった。

また、蛋白質濃度0.2~5 $\mu$ g/蛋白質試料の範囲で、直線性が得られた。測定結果を統計処理して得られた、この範囲での回帰直線式及び相関係数は下記の通りである。

回帰直線式:  $y=0.12x+0.01$

相関係数 ( $R^2$ ): 0.99

x: 蛋白質量

y: シグナル強度

図5から明らかな如く、本発明の方法によりOVAをPVDF膜に固定化し、蛋白質量の測定を行ったところ、良好な直線性を示す検量線が得られたので、本発明の固定化方法によれば、高精度のOVA (蛋白質) 濃度の定量測定が行えることが判った。 40

尚、データは示していないが、実施例2で測定した他の蛋白質についても同様に測定を行った結果、OVAと同様に直線性のある検量線が得られ、これらの蛋白質についても定量測定が行えることが判った。

## 【0133】

実施例6.

【試料及び試液の調製】

(1)蛋白質試料

精製水を用いて、BSA、トリプシンインヒビター、フィブリノーゲン、OVA、ヘモグロビ 50

ン、IgG、チトクロームc、リゾチーム夫々の5 $\mu$ g/20 $\mu$ L溶液を調製し、蛋白質試料とした。

#### 【0134】

##### [固相化法による蛋白質の測定]

精製水を用いて0.2W/V%SDS、2.5W/V%TCA、45V/V% エタノールを含有する固定化用試液を調製した。次いで、調製した蛋白質試料20 $\mu$ Lと固定化用試液300 $\mu$ Lを混合し、得られた固定化用試料320 $\mu$ Lを用いて実施例1と同様の方法で固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化、洗浄、染色処理し、次いで、デンシトメーターで600nmの吸光度（シグナル強度）を測定した。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%である。

10

##### [液相法による蛋白質の測定]

上記で調製した蛋白質試料20 $\mu$ Lに、1mL Pyromollex液を添加して、室温で20分間インキュベーションし、600nmの吸光度を測定した。

##### [結果]

蛋白質試料としてBSAを用い、0.2 W/V%SDSを含有する固定化用試料を調製して、BSAを固定化、測定を行った場合の吸光度（シグナル強度）を1（基準値）とした時の、基準値に対する各蛋白質について同様に固定化、測定を行って得られた吸光度の相対値を求めた結果を図6に示す。また、同様に蛋白質試料としてBSAを用い、液相法による測定を行った場合の吸光度を1（基準値）とした時の、基準値に対する各蛋白質について同様に液相法による測定を行って得られた吸光度の相対値を求めた結果も、図6に併せて示す。

20

#### 【0135】

尚、図6に於いて、各バーは夫々下記の方法により各蛋白質を測定した結果に基づいて得られた、上記相対値を示す。

	固相法
	液相法

#### 【0136】

図6より明らかな如く、液相法による測定では、蛋白質濃度は同じでも、蛋白質の種類によって、BSAに対する吸光度の相対値が大きく異なり、例えばフィブリノーゲンでは、0.46程度であった。

30

これに対し、本発明の固相法によって測定を行った場合のBSAに対するフィブリノーゲンの吸光度（シグナル強度）の相対値は0.75になり、BSAの場合との吸光度の差が少なくなっていることが判る。これは、測定した殆どの蛋白質についても言える。

また、測定した全蛋白質の平均吸光度の、BSAの場合のそれを1とした場合に対する相対値は、液相法の場合は0.65であるのに対して本発明の固相法の場合は0.94となり、蛋白質種による定量誤差が改善されたことが判る。これはタンパク質が変性状態で膜にトラップされることにより、液相法では反応できなかった、例えばチトクロームc、リゾチーム等の塩基性アミノ酸が、染色液と結合できる状態となり、本発明に係る固定化液で蛋白質が効率良く固定化され、より正確な測定結果を得られるようになったと考えられる。

40

#### 【0137】

##### 実施例7.

##### [試料の調製と固定化]

精製水を用いて、IgG試料（蛋白質量0~4 $\mu$ g/20 $\mu$ L）、及び2%SDS含有IgG試料（蛋白質量0~4 $\mu$ g/20 $\mu$ L）を調製した。別に精製水を用いて0.25W/V%SDS、2.5W/V%TCA及び45V/V%エタノールを含有する固定化用試液を調製した。次いで、蛋白質試料20 $\mu$ Lと固定化用試液300 $\mu$ Lを混合し、得られた固定化用試料320 $\mu$ Lを用いて実施例1と同様の方法で固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化、洗浄、染色処理し、次いでデンシトメーターで600nmの吸光度（シグナル強度）を測定した。

#### 【0138】

50

尚、SDSを含有しないIgG試料を用いて得られた固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.23W/V%、TCA 2.34 W/V%、エタノール 42.2V/V%である。また、2%SDS含有IgG試料を用いて得られた固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.36 W/V%、TCA 2.34 W/V%、エタノール 42.2 V/V%である。

【0139】

[結果]

得られた結果を基に、SDSを含有しないIgG試料を用いた場合と、2%SDS含有IgG試料を用いた場合夫々について、蛋白質量 ( $\mu\text{g}$ ) とシグナル強度との関係を示す検量線を作成した。

結果を図7に示す。図7に於いて、—◆—はSDSを含有しないIgG試料を用いた場合、—△—はSDSを含有するIgG試料を用いた場合の結果を夫々示す。また、各プロットのバーは、±SDを示す。

図7より明らかな如く、両方の検量線は、ほぼ一致した。

この結果から、本発明の固定化方法により蛋白質を固定化させれば、SDSが蛋白質試料中に存在していても、それに影響されることなく、目的の蛋白質を固相に固定化させ、蛋白質の定量を行うことができることが判る。

【0140】

実施例8.

SDSを含有する種々の蛋白質試料を用いて本発明に係る蛋白質の固定化及び測定を行い、当該測定に及ぼすSDSの影響を、液相法による測定の場合と比較した。

[試料及び試液の調製]

(1)蛋白質試料

精製水を用いて、0.0W/V%SDS (対照)、0.2W/V%SDS又は2W/V%SDSを含有する蛋白質試料 (BSA、トリプシンインヒビター、フィブリノーゲン、ヘモグロビン、OVA、チトクロームc、リゾチーム、IgG、トリプシン (和光純薬工業(株)製) 夫々250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を調製した。

[固定化法による蛋白質の測定]

精製水を用いて0.1W/V%SDS、2.5W/V%TCA、45V/V%エタノールを含有する固定化用試液を調製した。次いで調製した蛋白質試料20 $\mu\text{L}$ と固定化用試液300 $\mu\text{L}$ を混合し、得られた固定化用試料320 $\mu\text{L}$ を実施例1と同様の方法で固定化、洗浄、染色処理し、デンストメーターで、600nmの吸光度 (シグナル強度) を測定した。

[液相法による測定]

上記で調製した蛋白質試料20 $\mu\text{L}$ に、1mL Pyromollex液 (Protein Assay Rapid Kit wako、和光純薬工業(株)製) を添加して、20分室温でインキュベーションし、600nmに於ける吸光度を測定した。

【0141】

[結果]

得られた結果を、夫々の対照 (SDS含有していない試料) を用いて得られた結果を100とした相対値で表し、表3にまとめた。

【0142】

【表 3】

	固相法			液相法		
	対照	0.2W/V% SDS 含有	2W/V% SDS 含有	対照	0.2W/V% SDS 含有	2W/V% SDS 含有
BSA	100	95	83	100	0	0
トリプシンインヒビター	100	106	101	100	0	0
フィブリンノーゲン	100	107	91	100	35	0
ヘモグロビン	100	119	104	100	0	0
OVA	100	105	104	100	2	0
チトクローム c	100	120	128	100	2	0
リゾチーム	100	111	97	100	3	0
IgG	100	107	104	100	34	0
トリプシン	100	87	103	100	0	0

10

## 【0143】

表 3 から明らかな如く、本発明に係る固相法による蛋白質の測定を行った場合には、2W/V% SDS 含有試料でも殆どの蛋白質で、対照に対し ±20% 以内の測定結果が得られ、蛋白質試料中の SDS が蛋白質測定に及ぼす影響を回避できたことが判る。

20

これに対して、2W/V% SDS 含有試料を用いて液相法によって測定を行った場合には、全く測定ができなかった。

以上の結果から、本発明の蛋白質の固定化法及び定量方法は、あらゆる蛋白質に適用することができることが判る。また、これまで知られていたタンパク定量阻害剤、特に蛋白質可溶化剤として汎用される SDS 含有試料中の蛋白質定量が可能になった点で、非常に有用であることが明らかとなった。

## 【0144】

## 実施例 9.

試料中に含まれる界面活性剤が、本発明の固定化用試液を用いた固定化方法及び蛋白質の測定に及ぼす影響を調べた。

30

## 【固相法による固定化及び蛋白質の測定】

## (1) BSA 又は IgG 含有蛋白質試料中の蛋白質の測定

精製水で、表 4 記載の濃度となるように、各界面活性剤を含有する BSA 試料又は IgG 試料 (蛋白質量  $4 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ ) を調製し、蛋白質試料とした。

別に、精製水で 0.1W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液を調製した。

次いで蛋白質試料  $20 \mu\text{L}$  と固定化用試液  $300 \mu\text{L}$  を混合して固定化用試料を調製し、その  $30 \mu\text{L}$  を用いて、実施例 1 と同様の方法で固定化用試料中の蛋白質を PVDF 膜に固定化、洗浄、染色処理し、600nm の吸光度 (シグナル強度) を測定した。

固定化用試料中の各試薬の終濃度は、SDS を含有しない蛋白質試料を用いた場合は、SDS 0.094W/V%、TCA 23.4W/V%、エタノール 42.2V/V% である。また、SDS 含有蛋白質試料を用いた場合の各試薬の終濃度は、TCA 及びエタノールの終濃度は SDS を含有しない蛋白質試料を用いた場合と同じであるが、SDS の終濃度は、1% SDS 含有蛋白質試料を用いた場合は 0.16W/V%、2% SDS 含有試料を用いた場合は 0.21W/V%、4% SDS 含有試料を用いた場合は、0.34 W/V% となる。

40

## 【0145】

## (2) OVA 含有蛋白質試料中の蛋白質の測定

表 4 記載の濃度となるように、各界面活性剤を含有する OVA 試料 (蛋白質量  $5 \mu\text{g}/20 \mu\text{L}$ ) を調製し、蛋白質試料とした。

別に、精製水で 0.2W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試

50

液を調製し、上記(1)と同様の方法で固定化用試料を調製し、実施例1と同様の方法でP  
VDF膜に固定化、洗浄、染色処理し、600nmの吸光度(シグナル強度)を測定した。

尚、固定化用試料中の各試薬の終濃度は、SDSを含有しない蛋白質試料を用いた場合は  
、SDS 0.19W/V%、TCA 23.4W/V%、エタノール 42.2V/V%である。また、2% SDS含有蛋白質  
試料を用いた場合の各試薬の終濃度は、SDS 0.31W/V%、TCA 23.4%、エタノール 42.2W/V%  
となる。

また、界面活性剤(阻害物質)を含有しない以外は上記と同様に調製したBSA試料、IgG  
試料、OVA試料を用いて同様に固定化、測定を行い、対照とした。

#### [液相法による蛋白質の測定]

表4記載の濃度となるように各界面活性剤を含有するBSA試料(10 $\mu$ g/20 $\mu$ L)を調製 10  
したものを用い、1mL Pyromolex溶液を使って、実施例6と同様の方法で測定した。

また、界面活性剤(阻害物質)を含有しない以外は上記と同様に調製したBSA試料を用  
いて同様に液相法による測定を行い、対照とした。

#### 【0146】

#### [結果]

夫々の測定は3回ずつ行い、得られた吸光度の平均値を求めた。対照を用いて得られ  
た平均値を100として、それに対する界面活性剤を含有する試料を用いて得られた吸光度  
の平均値の相対値(%)を求め、その相関変位(CV)と併せて表4に示す。

表4に於いて、界面活性剤(阻害物質)の濃度は、蛋白質試料中の濃度を示す。また、  
液相法のデータ中、左側の値は界面活性剤の濃度を、右側の値は対照に対する、界面活性 20  
剤を含有する試料を用いた場合の平均測定値の相対値(%) $\pm$ CVを示す。

尚、表4に示したデータは、界面活性剤の最大許容濃度時のデータ、すなわち、添加剤  
として界面活性剤を用いた場合に、対照(添加剤なし)と比較して平均値が $\pm$ 20%となる  
結果が得られた時のデータを示している。

#### 【0147】

#### [表4]

界面活性剤 濃度	固相化法			液相法
	BSA(4 $\mu$ g) mean(%) $\pm$ CV	IgG(4 $\mu$ g) mean(%) $\pm$ CV	OVA(5 $\mu$ g) mean(%) $\pm$ CV	BSA(10 $\mu$ g) mean(%) $\pm$ CV
SDS	1% (W/v)	87 $\pm$ 7.1		(0.01%(W/v), 92 $\pm$ 6.0)
	2% (W/v)	82 $\pm$ 6.2	117 $\pm$ 2.2	
	4% (W/v)		103 $\pm$ 4.3	
SLS	2%(W/v)		101 $\pm$ 1.9	(0.1%(W/v), 109 $\pm$ 7.3)
	3% (W/v)	94 $\pm$ 3.7		
Triton X-100	1% (W/v)		112 $\pm$ 0.2	(0.1%(W/v), 107 $\pm$ 3.9)
	2% (W/v)	98 $\pm$ 1.9	115 $\pm$ 1.5	
NP-40	1% (W/v)	96 $\pm$ 4.5	115 $\pm$ 3.0	(0.1%(W/v), 116 $\pm$ 4.7)
	2% (W/v)	90 $\pm$ 1.2	115 $\pm$ 2.4	
Tween 20	0.05%(W/v)		110 $\pm$ 4.4	115 $\pm$ 1.0
	0.1% (W/v)	97 $\pm$ 4.5	116 $\pm$ 2.8	
	0.2% (W/v)	89 $\pm$ 2.6	109 $\pm$ 1.6	
Tween 80	0.05%(W/v)	105 $\pm$ 2.7		112 $\pm$ 1.4
	0.1%(W/v)	82 $\pm$ 2.0	111 $\pm$ 0.7	
Brij 35	1% (W/v)		107 $\pm$ 3.4	(0.1%(W/v), 108 $\pm$ 3.2)
	2%(W/v)	93 $\pm$ 3.9	112 $\pm$ 2.9	
CHAPS	1% (W/v)	96 $\pm$ 2.6	111 $\pm$ 2.2	(0.1%(W/v), 104 $\pm$ 0.0)
	2% (W/v)	91 $\pm$ 1.3	116 $\pm$ 1.3	
CTAB	0.05%(W/v)		112 $\pm$ 0.2	123 $\pm$ 1.0
	0.1%(W/v)		123 $\pm$ 1.0	

#### 【0148】

SLS: N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム

Triton X-100 (ローム アンド ハース社商品名) : ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル

NP-40 (日本エマルジョン(株)商品名) : ポリオキシエチレン(9)オクチルフェニルエーテル

Tween 20 (花王(株)商品名) : ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート

Tween 80 (花王(株)商品名) : ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート

Brij 35 (ICI社商品名) : ポリオキシエチレンラウリルエーテル

CHAPS : 3-[(3-コラミドプロピル)ジメチルアンモニオプロパンスルホン酸]

CTAB : セチルトリメチルアンモニウムブロマイド

表4から明らかな如く、本発明の方法により蛋白質を固定化し測定した場合、蛋白質試料の調製時に一般に用いられる界面活性剤が高濃度共存していても、それに影響を受けずに蛋白質の測定が可能であることが判る。特に液相法と比較すると、液相法の10倍又はそれ以上の濃度の界面活性剤が蛋白質試料中に添加剤として共存していても、測定可能であることが判る。

#### 【0149】

以上のことより、本発明の蛋白質の固定化方法は、従来より添加剤として汎用されている界面活性剤に起因する問題、即ち蛋白質の定量を阻害するという問題を解決し得るものであることが判る。

#### 【0150】

実施例10. イムノブロットイング

[試料及び試液の調製]

(1)蛋白質試料

マウスIgG (和光純薬工業(株)製) を秤量し、精製水に溶解して0~200 $\mu$ g/mL溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

(2)固定化用試液

精製水で、0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液を調製した。

(3)固定化用試料

上記で調製した各濃度の蛋白質試料夫々20 $\mu$ Lと、固定化用試液300 $\mu$ Lを混合したもの(SDS終濃度0.19W/V%、TCA終濃度2.34W/V%、エタノール終濃度42.2V/V%)を調製し、固定化用試料とした。

(4)ブロッキング溶液

ブロッカー (雪印乳業(株)製) を終濃度25%となるようにPBS (pH7.4) で希釈したものをを用いた。

(5)抗体溶液

発光検出用抗体溶液: 西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG抗体 (アマシャムバイオサイエンス製) をブロッキング溶液で1/10000希釈したものをを用いた。

#### 【0151】

発色検出用抗体溶液: アルカリフォスファターゼ標識抗マウスIgG抗体 (和光純薬工業(株)製) をブロッキング溶液で1/1000希釈したものをを用いた。

(6)洗浄液

Tween 20を、終濃度0.05%となるようにPBS (pH7.4) で希釈したものをを用いた。

(7)検出試薬

発光検出用: ECL Plus Western Blotting Starter Kit (アマシャムバイオサイエンス(株)製)

発色検出用: 0.033% ニトロブルーテトラゾリウム (NBT,和光純薬工業(株)製)、0.0165% 5-ブromo-4-クロロ-3-インドリルリン酸 (BCIP,和光純薬工業(株)製) / 100mM Tris-HCl pH9.5 (100mM NaCl、5mM MgCl<sub>2</sub> 含有)

#### 【0152】

[蛋白質の固定化および測定]

実施例 1 と同様の方法で、上記した如く調製した固定化用試料を PVDF 膜にアプライし、吸引濾過後、PBS (pH7.4) 300 $\mu$ L をアプライし、同様に吸引濾過を行った。PVDF 膜を取り出し、ブロッキング溶液に浸し、ローテーションさせながら室温で 1 時間インキュベーションした (ブロッキング操作)。その後、発光検出用抗体溶液又は発色検出用抗体溶液に浸し、ローテーションさせながら室温 1 時間インキュベーションした (抗体反応)。抗体反応後の膜を洗浄液で 5 回洗浄した後、発光検出試薬又は発色検出試薬に浸し、検出反応を行った。発光検出は、PVDF 膜を発光検出処理後、X 線フィルム (アマシャムバイオサイエンス製) に感光させて検出を行った。

【0153】

[結果]

10

結果を図 8 に示す。図 8 に於いて、A は PVDF 膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発光反応により行い、X 線フィルムに感光させ検出したものである。B は、PVDF 膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発色反応により行い、検出したものである。また、各ドットは、蛋白質試料を各蛋白質量として固定化後に検出した場合の結果を夫々示す。

図 8 より明らかな如く、イムノプロットイングにより発光検出、発色検出した場合の何れも、膜に固定化したマウス IgG を検出することができた。発光検出での検出限界は 0.0625 $\mu$ g、発色検出での検出限界は 0.5 $\mu$ g であった。従って、本発明の蛋白質の固定化方法により固定化したものは、イムノプロットイングによる免疫学的検出を行い得ることが判った。

【0154】

20

実施例 1 1

[異常型 PrP を含有する被検試料の調製]

(1) 試液の調製：下記試液を調製した

(i) ホモジナイズ用溶液

50mM Tris-HCl pH7.4 (150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、1W/V% デオキシコール酸ナトリウム、1W/V% Triton X-100 含有)

(ii) プロテアーゼ溶液

プロテイナーゼ K (Tritirachium album 由来、和光純薬工業(株)製) 200 $\mu$ g を 10mM Tris-HCl pH7.4 (150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、20W/V% SDS、10W/V% Triton X-100 含有) 1.0 mL に溶解したもの。

30

(iii) 蛋白質沈降剤

2-ブタノール：メタノールの 5 : 1 (W/W) 混合溶媒

(iv) 沈殿物溶解液

50mM Tris-HCl pH7.4 (150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.005W/V% BSA、2W/V% SDS 含有)

【0155】

(2) 異常型 PrP を含有する被検試料の調製

BSE 感染牛小脳 (凍結融解を繰り返したもの) 組織小片 320mg (湿重量) をホモジナイズ用溶液 1.3mL 中でマルチビーズショッカー (安井器械(株)製) を用いてホモジナイズ後、20 $^{\circ}$ C、5000g で 5 分間遠心分離を行い、上清を得た。

40

得られた上清 500 $\mu$ L にプロテアーゼ溶液 500 $\mu$ L を加え、よく混和後、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた後、蛋白質沈降剤 500 $\mu$ L を添加し混合させた。

次いで、この液を 20000 $\times$ g で 5 分間遠心分離を行い、上清を廃棄して沈殿物を得た。

得られた沈殿物に沈殿物溶解液 60 $\mu$ L を加えて溶解後、100 $^{\circ}$ C で 5 分間処理し、プロテイナーゼ K の失活及び異常型 PrP の病原性の不活性化処理を行った。

得られた溶液を異常型 PrP を含有する被検試料として用いた。

【0156】

[異常型 PrP の固定化および検出]

(1) 試液の調製

(i) 固定化用試液 1

50

精製水で、0.1 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液 1 を調製した。

(ii)固定化用試液 2

精製水で、0.1 W/V% Tween 20、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液 2 を調製した。

(iii)異常型PrP固定化用試料

上記で調製した異常型PrPを含有する被検試料20 $\mu$ Lと、固定化用試液 1 200 $\mu$ Lを混合したもの (SDS終濃度 0.27 W/V%、TCA終濃度2.3 W/V%、エタノール終濃度41 V/V%) を調製し、異常型PrP固定化用試料とした。

(iv)洗浄液

Tween 20を、終濃度0.05%となるようにPBS[pH7.4、0.02V/V% スラオフ(日本エンバイロケミカルズ(株)商品名)含有]で希釈したものを用いた。

(v)抗体溶液

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗BSEモノクロナール抗体(独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所製)をPBS(pH7.4、20W/V% グリセロール、0.1W/V% BSA含有)で1/500希釈したものを用いた。

(vi)発色液

TMB Solution(和光純薬工業(株)製、マイクロウェル用)を用いた。

(vii)停止液 0.1M HCl水溶液を停止液として用いた。

【0157】

(2) 異常型PrPの固定化および検出

上記で調製した異常型PrP固定化用試料を、PVDF膜をセットしてあるマルチプレート(ミリポア社製)のウェルにアプライし、5分間静置後、吸引濾過した。次いで固定化用試液 2 100 $\mu$ Lをアプライし、同様に吸引濾過を行い、PVDF膜を洗浄し、この洗浄操作を再度行った。

その後、抗体溶液 50  $\mu$ Lをウェルにアプライし、20分間反応させた。反応後、洗浄液300 $\mu$ Lをアプライし吸引濾過する操作を5回を行い、PVDF膜を洗浄した。

次いで、発色液50 $\mu$ Lをアプライし、暗所・室温で30分間反応させた。

反応後、マルチプレートのウェルの反応液を、吸引濾過によって96穴のELISAプレートのウェルに移した。その後、再度異常型PrPを固定化してあるマルチプレートのウェルに発色液を50 $\mu$ Lずつアプライし、吸引濾過によって96穴のELISAプレートの同じウェルに移し、反応液でウェルを共洗いした。その後、96穴ELISAプレートの各ウェルに反応停止液100 $\mu$ Lをアプライして、反応を停止させた。

反応停止後30分以内に、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices製)にて、反応液の吸光度(主波長450nm、副波長620nm)を測定した。

別に陰性対照陰性対照[0.01W/V% BSA、0.02%スラオフを含有する50mM Tris-HCl pH7.4]と陽性対照[50mM Tris-HCl pH7.4、50 $\mu$ g/mL リコンビナントPrP (rPrP、広島大学から供与された)、150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.01W/V% BSA、2W/V% SDS 含有]を用いて同様に固定化、及び吸光度の測定を行った。結果を表5に示す。

【0158】

比較例 1 (従来のELISA法)

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製のプラテリア<sup>T M</sup> BSEキットを用い、以下の通り、異常型PrPの検出を行った。

[異常型PrPを含有する被検試料の調製]

実施例 1 で用いたのと同じBSE感染牛小脳(凍結融解を繰り返したもの)の組織小片350mg(湿重量)をホモジナイズ液(グルコース50mg/mL)1.4mL中でマルチビーズショッカーを用いてホモジナイズした。

得られたホモジネート500 $\mu$ Lに、キットに添付のプロティナーゼK (Tritirachium album 由来)をReagent A液(尿素0.12g/mL)で希釈したもの500 $\mu$ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。

10

20

30

40

50

次いで反応液にReagent B液（3-ブタノール）500 $\mu$ Lを添加し、よく混和後、20000gで5分間遠心分離を行い、沈殿物を得た。

沈殿物にReagent C1液（尿素0.36g/mL）を添加して溶解し、100 $^{\circ}$ Cで5分間処理し、プロテイナーゼKの失活及び異常型PrPの病原性不活性化処理を行った。

得られた溶液を異常型PrPを含有する被検試料として用いた。

【0159】

[異常型PrPの検出]

上記で調製した異常型PrPを含有する被検試料17 $\mu$ Lを、希釈液83 $\mu$ Lに溶解し、抗ヒトPrPマウスモノクローナル抗体を結合した96穴ELISA用プラスチックプレートのウェルに滴下した後、37 $^{\circ}$ Cで75分間静置した。次いで洗浄液350 $\mu$ Lで、ウェルを洗浄する操作を6回 10

行った。各ウェルにPOD標識抗ヒトPrPマウスモノクローナル抗体溶液100 $\mu$ Lを加え、4 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた。

各ウェルを洗浄液（トリス緩衝液）で10回洗浄した。洗浄後、各ウェルに基質発色液（TM B溶液）100 $\mu$ Lをアプライし、30分間反応させた。反応後各ウェルに反応停止液（0.5M 硫酸）100 $\mu$ Lを加えて反応を停止させた。

マイクロプレートリーダー（Molecular Devices製）にて、主波長450nm、副波長620nmで吸光度を測定した。

別にキットに添付の陰性対照（0.1W/V% BSAを含有するPBS）とキットに添付の陽性対照（ヒトプリオン蛋白合成ペプチド）を用いて同様に固定化及び吸光度の測定を行った。 20

以上の結果を表5に併せて示す。

【0160】

【表5】

	吸光度		
	陰性対照	陽性対照	被検試料
実施例11	0.082	3.258	3.099
比較例1	0.072	1.500	0.385

30

【0161】

以上のことより、実施例11においては固定化から検出までの工程を60分以内に行うことが出来たが、比較例1に於いては、蛋白質の固定化の段階のみで75分を要し、本発明の方法の方が、迅速にBSE感染の判定を行うことが出来ることがわかる。

また、表5から明らかな如く、BSE検体を用いた場合（被検試料）、比較例1ではBSE検体の吸光度は陽性対照よりもかなり低くなってしまい、凍結融解を繰り返したBSE感染牛小脳を試料として用いた場合には、信頼度の高いBSEの判定が行えないことがわかった。 40  
これに対し、実施例11では陽性対照と同等の吸光度が測定され、検体の状態に関わらずBSEの判定が行えることがわかった。

【0162】

実施例12. カットオフ値の設定

[被検試料の調製]

(1) 試液の調製：下記試液を調製した

(i) ホモジナイズ用溶液

50mM Tris-HCl pH7.4 [150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、1W/V% デオキシコール酸ナトリウム、1W/V% サンライトSL-50（非イオン性界面活性剤、サンライト(株)商品名）含有]

50

## (ii) プロテアーゼ溶液

プロテイナーゼ K (Tritirachium album 由来、和光純薬工業(株)製) 100 $\mu$ g を 10mM Tris-HCl pH7.4 (150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、20W/V% SLS、10W/V% サンライト SL-50 含有) 500 $\mu$ L に溶解したもの (プロテイナーゼ K 終濃度 200 $\mu$ g/mL)。

## (iii) 蛋白質沈降剤

2-ブタノール：メタノールの 5：1 (W/W) 混合溶媒

## (iv) 沈殿物溶解液

50mM Tris-HCl pH7.4 (150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.005W/V% BSA、2W/V% SDS 含有)

## 【0163】

10

## (2) 被検試料の調製

BSE に感染していないことを確認した牛 48 頭の延髄のオベックス部 (陰性検体とする。48 検体) の組織小片 夫々 320~350mg (湿重量) を採取し、これらを夫々ホモジナイズ用溶液 1.3mL 中でマルチビーズショッカー (安井器械(株)製) を用いて 2000rpm で 30 秒ホモジナイズ後、室温、5000 $\times$ g で 5 分間遠心分離を行い、上清を得た。

得られた上清 500 $\mu$ L にプロテアーゼ溶液 500 $\mu$ L を加え (プロテイナーゼ K 100 $\mu$ g)、よく混和後、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた後、蛋白質沈降剤 500 $\mu$ L を添加し混合させた。

次いで、この液を 20000 $\times$ g で 5 分間遠心分離を行い、上清を廃棄して沈殿物を得た。

得られた沈殿物に沈殿物溶解液 60 $\mu$ L を加えて溶解後、100 $^{\circ}$ C で 5 分間処理し、プロテイナーゼ K の失活及び異常型 PrP の病原性不活性化処理を行った。

20

得られた溶液を被検試料として用いた。

## 【0164】

## [PrP の固定化および検出]

## (1) 試液の調製

## (i) 固定化用試液 1

精製水で、0.1 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液 1 を調製した。

## (ii) 固定化用試液 2

精製水で、0.1 W/V% Tween 20、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液 2 を調製した。

30

## (iii) PrP 固定化用試料

上記で調製した被検試料 60 $\mu$ L をマイクロチューブに採り、固定化用試液 1 の 600 $\mu$ L を混合したもの (SDS 終濃度 0.27 W/V%、TCA 終濃度 2.3 W/V%、エタノール終濃度 41 V/V%) を調製し、PrP 固定化用試料とした。

## (iv) 洗浄液

Tween 20 を、終濃度 0.05% となるように PBS [pH7.4、0.02V/V% スラオフ (日本エンバイロケミカルズ(株)商品名) 含有] で希釈したものを用了。

## (v) 抗体溶液

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 BSE モノクロナール抗体 (独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所製) を PBS (pH7.4、20W/V% グリセロール、0.1W/V% BSA 含有) で 1/500 希釈したものを用了。

40

## (vi) 発色液

TMB Solution (和光純薬工業(株)製、マイクロウエル用) を用了。

## (vii) 停止液 0.1M HCl 水溶液を停止液として用了。

## 【0165】

## (2) PrP の固定化および検出

上記で調製した PrP 固定化用試料につき、一試料毎に各 600 $\mu$ L を、PVDF 膜をセットしてあるマルチプレート (ミリポア社製) の 3 ウェルに 200 $\mu$ L ずつ (トリプリケート)、アブライした。

マルチプレートを室温で 5 分間静置後、各ウェル内の液を吸引濾過した。次いで固定化

50

用試液 2 を  $100\mu\text{L}$  ずつ各ウェルにアプライし、同様に吸引濾過した。更に洗浄液  $300\mu\text{L}$  を各ウェルにアプライし、同様に吸引濾過を行い、各ウェルの PVDF 膜を洗浄した。この洗浄操作を計 3 回行った。その後、抗体溶液  $50\mu\text{L}$  を各ウェルにアプライし、室温で 20 分間反応させた。反応後、洗浄液  $300\mu\text{L}$  を各ウェルにアプライし吸引濾過する操作を 5 回行った、PVDF 膜を洗浄した。

次いで、発色液  $50\mu\text{L}$  を各ウェルにアプライし、暗所、室温で 30 分間反応させた。

反応後、マルチプレートのウェルの反応液を、吸引濾過によって 96 穴の ELISA プレートのウェルに移した。その後、再度 PrP を固定化してあるマルチプレートのウェルに発色液を  $50\mu\text{L}$  ずつアプライし、吸引濾過によって、96 穴の ELISA プレートの同じウェルに移し、反応液でウェルを共洗した。その後、96 穴 ELISA プレートの各ウェルに反応停止液を  $100\mu\text{L}$  ずつアプライして、反応を停止させた。

反応停止後 30 分以内に、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 製) にて、反応液の吸光度 (主波長  $450\text{nm}$ 、副波長  $620\text{nm}$ ) を測定した。一検体毎に測定した、トリプリケートの吸光度の平均値、SD 及び CV (%) を表 6 に示す。

別に陰性対照 [0.01W/V% BSA、0.02% スラオフを含有する 50mM Tris-HCl pH7.4] と陽性対照 [50mM Tris-HCl pH7.4、 $50\mu\text{g/mL}$  リコンビナント PrP (rPrP、広島大学から供与された)、150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.01W/V% BSA、2W/V% SDS 含有] を用いて同様に固定化、吸光度の測定を行った。尚、陰性対照は 3 検体、陽性対照は 2 検体用意し、各一検体毎にトリプリケートで測定を行った。夫々の検体について得られた吸光度の平均値を表 7 に示す。

20

#### 【0166】

比較例 2 (従来の ELISA 法)

比較例 1 で用いたのと同じ日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ (株) 製のプラテリア<sup>TM</sup> BSE キットを用い、以下の通り、PrP の検出を行った。

[被検試料の調製]

実施例 1 2 で用いたのと同じ陰性検体 4 8 検体の組織小片 夫々  $320\sim 350\text{mg}$  (湿重量) を採取し、ホモジナイズ液 (グルコース  $50\text{mg/mL}$ )  $1.4\text{mL}$  中でマルチビーズショッカーを用いてホモジナイズした。

得られたホモジネート  $500\mu\text{L}$  に、キットに添付のプロティナーゼ K (Tritirachium album 由来) を Reagent A 液 (尿素  $0.12\text{g/mL}$ ) で希釈したもの  $500\mu\text{L}$  を加え、 $37^\circ\text{C}$  で 10 分間反応させた。

次いで反応液に Reagent B 液 (3-ブタノール)  $500\mu\text{L}$  を添加し、よく混和後、 $20000\text{g}$  で 5 分間遠心分離を行い、沈殿物を得た。

沈殿物に Reagent C1 液 (尿素  $0.36\text{g/mL}$ ) を添加して溶解し、 $100^\circ\text{C}$  で 5 分間処理し、プロティナーゼ K の失活及び異常型 PrP の病原性不活性化処理を行った。

得られた溶液を被検試料として用いた。

#### 【0167】

[PrP の検出]

上記で調製した被検試料  $17\mu\text{L}$  を、希釈液  $83\mu\text{L}$  に溶解し、抗ヒト PrP マウスモノクローナル抗体を結合した 96 穴 ELISA 用プラスチックプレートのウェルに滴下した後、 $37^\circ\text{C}$  で 75 分間静置した。次いで洗浄液  $350\mu\text{L}$  で、ウェルを洗浄する操作を 6 回行った。

各ウェルに POD 標識抗ヒト PrP マウスモノクローナル抗体溶液  $100\mu\text{L}$  を加え、 $4^\circ\text{C}$  で 60 分間反応させた。

各ウェルを洗浄液 (トリス緩衝液) で 10 回洗浄した。洗浄後、各ウェルに基質発色液 (TM B 溶液)  $100\mu\text{L}$  をアプライし、30 分間反応させた。反応後各ウェルに反応停止液 (0.5M 硫酸)  $100\mu\text{L}$  を加えて反応を停止させた。

マイクロプレートリーダー (Molecular Devices 製) にて、主波長  $450\text{nm}$ 、副波長  $620\text{nm}$  の吸光度を測定した。結果を表 6 に併せて示す。

別にキットに添付の陰性対照 (0.1W/V% BSA を含有する PBS) 2 検体とキットに添付の陽性対照 (ヒトプリオン蛋白合成ペプチド) 2 検体を用いて同様に固定化及び吸光度の測定

50

を行った。結果を表7に併せて示す。

【0168】

【表 6】

試料No.	実施例12			比較例2
	mean	SD	CV%	
No.1	0.029	0.025	87%	0.073
No.2	0.040	0.006	15%	0.110
No.3	0.025	0.008	33%	0.065
No.4	0.032	0.015	45%	0.070
No.5	0.036	0.032	87%	0.054
No.6	0.065	0.014	22%	0.046
No.7	0.055	0.005	8%	0.079
No.8	0.032	0.028	89%	0.048
No.9	0.040	0.017	41%	0.054
No.10	0.050	0.002	5%	0.035
No.11	0.066	0.017	25%	0.040
No.12	0.065	0.007	10%	0.043
No.13	0.053	0.016	30%	0.026
No.14	0.060	0.020	33%	0.026
No.15	0.054	0.010	18%	0.036
No.16	0.061	0.026	42%	0.026
No.17	0.056	0.021	37%	0.056
No.18	0.041	0.001	2%	0.033
No.19	0.044	0.005	12%	0.038
No.20	0.042	0.006	14%	0.025
No.21	0.058	0.040	69%	0.034
No.22	0.066	0.007	11%	0.027
No.23	0.048	0.002	5%	0.027
No.24	0.051	0.023	46%	0.037
No.25	0.019	0.020	104%	0.056
No.26	0.040	0.005	11%	0.046
No.27	0.024	0.009	35%	0.055
No.28	0.034	0.019	56%	0.036
No.29	0.041	0.040	96%	0.050
No.30	0.068	0.007	10%	0.050
No.31	0.079	0.010	12%	0.058
No.32	0.034	0.028	84%	0.053
No.33	0.064	0.053	83%	0.137
No.34	0.054	0.003	5%	0.064
No.35	0.071	0.017	24%	0.064
No.36	0.093	0.027	29%	0.066
No.37	0.055	0.016	30%	0.066
No.38	0.062	0.020	32%	0.077
No.39	0.057	0.010	17%	0.081
No.40	0.063	0.026	41%	0.051
No.41	0.088	0.002	2%	0.059
No.42	0.044	0.002	4%	0.054
No.43	0.046	0.006	12%	0.066
No.44	0.044	0.008	17%	0.032
No.45	0.074	0.047	64%	0.033
No.46	0.083	0.010	11%	0.028
No.47	0.052	0.002	3%	0.040
No.48	0.052	0.025	49%	0.051

10

20

30

40

【表 7】

hyou	試料No	実施例12	比較例2
陰性対照	1	0.049	0.014
	2	0.065	0.016
	3	0.075	0.012
陽性対照	1	1.262	1.989
	2	1.323	2.07

10

## 【0170】

まず、比較例2で用いたBSEキットの取扱説明書によると、陰性対照の吸光度が0.15以下で、且つ陽性対照の吸光度が1.0以上であった場合には、その検出系が信用できると判定している。上記表7から明らかな如く、本発明に係るPrPの検出方法による測定を行った場合（実施例12）も、従来のBSEキットを用いたPrP検出方法による測定を行った場合（比較例2）も、陰性対照の吸光度は0.15以下で、陽性対照の吸光度は1.0以上であった。

このことから、本発明のPrP検出方法の検出系は、従来のELISA法による検出方法と同様に、信用できると判断される。

20

## 【0171】

次に、得られた上記表6の結果を基に陰性検体の吸光度の平均値を計算したところ、平均値は $0.052 \pm 0.017$ 、CV値(%)は32%であった。

これに対し、従来のELISA法によるBSEキットを用いて同様にPrPの検出を行った場合の（比較例2）、陰性検体（48検体）の吸光度の平均値は $0.052 \pm 0.022$ 、CV値(%)は42%であった。すなわち、本願発明に係るPrPの検出方法の方が、従来のBSEキットを用いた方法よりも、陰性検体毎の測定値のばらつきが少ないことが分かった。

## 【0172】

更に、BSE感染を判定するためのカットオフ値を決定した。PrPのBSEの判定には主として脳が検体として用いられるが、脳組織のPrP以外の成分が抗PrP抗体の非特異的反応を引き起こす恐れがある。また、測定操作時の測定誤差を引き起こす可能性を考慮して、実施例12の場合、陰性検体の吸光度の平均値( $0.052$ ) +  $5SD(5 \times 0.017) \div 0.14$ に、上記表7で得られた、実施例12の方法で行った陰性対照の吸光度の平均値( $0.063$ )を加えた値、すなわち $0.203$ を、BSE感染を判定するカットオフ値として仮に設定した。比較例2の場合、キットの取扱説明書に従い、上記表7で得られた、比較例2の方法で行った陰性対照の吸光度の平均値( $0.014$ )に、当該取扱説明書に記載されているように $0.21$ を加えた値、すなわち $0.224$ を、BSE感染を判定するカットオフ値として仮に設定した。

30

## 【0173】

実施例13. BSEの判定

[被検試料の調製]

40

(1) 試液の調製

実施例12と同様の方法で、各試液を調製した。

(2) 被検試料の調製

BSE感染牛小脳（陽性検体とする。10検体）の組織小片夫々 $320 \sim 350$ mg（湿重量）を採取し、これらを夫々ホモジナイズ用溶液 $1.3$ mL中でマルチビーズショッカー（安井器械(株)製）を用いて $2000$ rpmで30秒ホモジナイズ後、室温、 $5000 \times g$ で5分間遠心分離を行い、上清を得た。

得られた上清 $500 \mu$ Lにプロテアーゼ溶液 $500 \mu$ L（プロテイナーゼK  $100 \mu$ g）を加え、よく混和後、 $37^\circ\text{C}$ で10分間反応させた後、蛋白質沈降剤 $500 \mu$ Lを添加し混合させた。

次いで、この液を $20000 \times g$ で5分間遠心分離を行い、上清を廃棄して沈殿物を得た。

50

得られた沈殿物に沈殿物溶解液60 $\mu$ Lを加えて溶解後、100 $^{\circ}$ Cで5分間処理し、プロテイナーゼKの失活及び異常型PrPの病原性不活性化処理を行った。

得られた溶液を実施例12と同じ沈殿物溶解液で2倍希釈した被検試料と、10倍希釈した被検試料を用意した。

【0174】

[PrPの固定化および検出]

(1) 試液の調製

実施例12と同じものを調製した。

尚、PrP固定化用試料は、上記で調製したホモジナイズ用溶液で2倍希釈した被検試料、及び10倍希釈した被検試料を夫々用いて、実施例12と同様に調製した。

10

【0175】

(2) PrPの固定化および検出

上記で調製したPrP固定化用試料につき、一試料毎に各600 $\mu$ Lを、PVDF膜をセットしてあるマルチプレート(ミリポア社製)の3ウェルに200 $\mu$ Lずつ(トリプリケート)、アプ  
ライした。

マルチプレートを室温で5分間静置後、各ウェル内の液を吸引濾過した。次いで固定化用試液2を100 $\mu$ Lずつ各ウェルにアプ  
ライし、同様に吸引濾過した。更に洗浄液300 $\mu$ Lを各ウェルにアプ  
ライし、同様に吸引濾過を行い、各ウェルのPVDF膜を洗浄した。この洗浄操作を計3回行った。その後、抗体溶液50 $\mu$ Lを各ウェルにアプ  
ライし、室温で20分間反応させた。反応後、洗浄液300 $\mu$ Lを各ウェルにアプ  
ライし吸引濾過する操作を5回行  
い、PVDF膜を洗浄した。

20

次いで、発色液50 $\mu$ Lを各ウェルにアプ  
ライし、暗所、室温で30分間反応させた。反応後、マルチプレートのウェルの反応液を、吸引濾過によって96穴のELISAプレートのウ  
ェルに移した。その後、再度PrPを固定化してあるマルチプレートのウェルに発色液を50  
 $\mu$ Lずつアプ  
ライし、吸引濾過によって、96穴のELISAプレートの同じウェルに移し、反応  
液でウェルを共洗した。その後、96穴ELISAプレートの各ウェルに反応停止液を100 $\mu$ L  
ずつアプ  
ライして、反応を停止させた。

反応停止後30分以内に、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices製)にて、反  
応液の吸光度(主波長450nm、副波長620nm)を測定した。一検体毎に測定した、トリプリ  
ケートの吸光度の平均値、SD及びCV(%)を表8-1及び表8-2に示す。尚、表8-1は  
ホモジナイズ用溶液で2倍希釈した被検試料を用いた場合、表8-2は、ホモジナイズ用  
液で10倍希釈した被検試料を用いた場合の結果を夫々示す。

30

別に陰性対照[0.01W/V% BSA、0.02%スラオフを含有する50mM Tris-HCl pH7.4]と陽性対  
照[50mM Tris-HCl pH7.4、50 $\mu$ g/mL リコンビナントPrP(rPrP、広島大学から供与された  
)、150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.01W/V% BSA、2W/V% SDS 含有]を用いて同様に固  
定化、吸光度の測定を行った。尚、陰性対照及び陽性対照は夫々3検体用意し、各一検体  
毎にトリプリケートで測定を行った。夫々の検体について得られた吸光度の平均値を表9  
に示す。

【0176】

比較例3(従来のELISA法)

40

比較例1で用いたのと同じ日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製のプラテリア<sup>T</sup>  
M BSEキットを用い、以下の通り、PrPの検出を行った。

[被検試料の調製]

実施例13で用いたのと同じ陽性検体10検体夫々320~350mg(湿重量)を採取し、ホ  
モジナイズ液(グルコース50mg/mL)1.4mL中でマルチビーズショッカーを用いてホモジ  
ナイズした。

得られたホモジネート500 $\mu$ Lに、キットに添付のプロテイナーゼK(Tritirachium albu  
m由来)をReagent A液(尿素0.12g/mL)で希釈したもの500 $\mu$ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間反  
応させた。

次いで反応液にReagent B液(3-ブタノール)500 $\mu$ Lを添加し、よく混和後、20000gで5

50

分間遠心分離を行い、沈殿物を得た。

沈殿物にReagent C1液（尿素0.36g/mL）を添加して溶解し、100℃で5分間処理し、プロテイナーゼKの失活及び異常型PrPの病原性不活性化処理を行った。

得られた溶液をReagent C1液（尿素0.36g/mL）で10倍希釈したものと、希釈しなかったものを用意し、夫々被検試料とした。

【0177】

[PrPの検出]

上記で調製した被検試料17 $\mu$ Lについて、比較例2と同様の方法でPrPの検出を行った。結果を表8-1及び表8-2に併せて示す。尚、表8-1には、希釈しなかった被検試料を用いた場合の結果を、表8-2にはホモジナイズ液で10倍希釈した被検試料を用いた場合の結果を夫々示した。

10

別にキットに添付の陰性対照（0.1W/V% BSAを含有するPBS）2検体とキットに添付の陽性対照（ヒトプリオン蛋白合成ペプチド）2検体を用いて同様に固定化及び吸光度の測定を行った。結果を表9に併せて示す。

尚、表8-2及び表9に於いて、比較例3の結果で「N.D.」と示したものは、測定を行わなかった場合を夫々示す。

【0178】

【表8-1】

試料No.	実施例13			比較例3
	mean	SD	CV%	
No.1	3.271	0.688	21%	2.294
No.2	3.201	0.578	18%	3.052
No.3	2.686	0.283	11%	2.835
No.4	3.330	0.832	25%	2.501
No.5	3.208	0.611	19%	1.619
No.6	3.251	0.694	21%	2.078
No.7	3.234	0.587	18%	2.790
No.8	3.115	0.466	15%	0.935
No.9	3.118	0.504	16%	1.721
No.10	3.178	0.554	17%	0.778

20

30

【0179】

【表 8 - 2】

試料No.	実施例13			比較例3
	mean	SD	CV%	
No.1	2.427	0.167	7%	N.D.
No.2	0.792	0.009	1%	N.D.
No.3	1.684	0.452	27%	N.D.
No.4	2.719	0.134	5%	N.D.
No.5	0.556	0.156	28%	N.D.
No.6	1.854	0.050	3%	N.D.
No.7	2.709	0.147	5%	N.D.
No.8	1.124	0.266	24%	0.091
No.9	1.272	0.243	19%	0.230
No.10	1.350	0.313	23%	0.238

10

【0180】

【表 9】

	試料No.	実施例13	比較例3
陰性対照	1	0.039	0.024
	2	0.031	0.021
	3	0.034	N.D.
陽性対照	1	2.372	1.322
	2	2.614	1.267
	3	2.530	N.D.

20

【0181】

30

まず、比較例3で用いたBSEキットの取扱説明書によると、陰性対照の吸光度が0.15以下で、且つ陽性対照の吸光度が1.0以上であった場合には、その検出系が信用できると判定している。上記表8-1及び8-2から明らかな如く、本発明に係るPrPの検出方法による測定を行った場合（実施例13）も、従来のBSEキットを用いたPrP検出方法による測定を行った場合（比較例3）も、陰性対照の吸光度は0.15以下で、陽性対照の吸光度は1.0以上であった。このことから、本発明のPrP検出方法の検出系は、従来のELISA法による検出方法と同様に、信用できると判断される。

【0182】

次に、BSE感染を判定するためのカットオフ値を決定した。実施例13の場合、実施例12で得られた陰性検体の吸光度の平均値(0.052)+5SD(5×0.017)≒0.15に、上記表9で得られた、実施例13の方法で行った陰性対照の吸光度の平均値(0.035)を加えた値、すなわち0.185を、BSEを判定するカットオフ値として仮に設定した。そしてその値を表8-1及び表8-2の結果に当てはめた場合、実施例13に於ける全ての吸光度の平均値はカットオフ値よりも高く、全ての検体が陽性と判定できた。

40

一方、比較例3の場合、キットの取扱説明書に従い、上記表9で得られた、比較例3の方法で行った陰性対照の吸光度の平均値(0.023)に、当該取扱説明書に記載されているように0.21を加えた値、すなわち0.233を、BSE感染を判定するカットオフ値として仮に設定した。そしてその値を表8-1及び表8-2の結果に当てはめた場合、比較例3に於ける殆どの吸光度の平均値はカットオフ値よりも高く陽性と判定できた。

【0183】

50

しかし、表9の結果から明らかなように、実施例13で得られた陰性対照のデータは比較例3で得られたそれらと同等であったが、実施例13で得られた陽性対照のデータは、比較例3で得られたそれらよりも有意に高くなっており、且つ表8-1及び表8-2から明らかな如く、実施例13に於ける陽性検体についての吸光度の測定値は、比較例3に於ける同検体についての吸光度の測定値よりも高い値になった。

更に、BSEの判定に用いられる動物組織由来の被検試料には、異常型PrP以外の多種の蛋白質を含んでいる。そのため、これらの影響を回避するためには、出来るだけ希釈された被検試料を用いてもBSEの判定が出来ることが望ましい。表8-2から明らかな如く、実施例13では、10倍希釈した被検試料を用いても、比較例3で未希釈検体を用いて得られた値と同等以上の十分な吸光度が得られた。従って、本発明の異常型PrPの検出方法によれば、異常型PrP以外の共存物質の影響をなるべく少なくするために被検試料の希釈倍数を高くすることが出来るので、従来法に比較して、高感度に異常型PrPの検出が行えることが判る。

#### 【0184】

#### 実施例14. 検出感度の比較

##### [被検試料の調製]

(1) 試液の調製：下記試液を調製した

##### (i)ホモジナイズ用溶液

50mM Tris-HCl pH7.4 [150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、1W/V% デオキシコール酸ナトリウム、1W/V% サンライトSL-50 (非イオン性界面活性剤、サンライト(株)商品名) 含有]

##### (ii)プロテアーゼ溶液

プロテイナーゼK (Tritirachium album由来、和光純薬工業(株)製) 100 $\mu$ gを10mM Tris-HCl pH7.4(150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、20W/V% SLS、10W/V% サンライトSL-50含有) 500 $\mu$ Lに溶解したもの(プロテイナーゼK終濃度 200 $\mu$ g/mL)。

##### (iii)蛋白質沈降剤

2-ブタノール：メタノールの5：1(W/W)混合溶媒

##### (iv)沈殿物溶解液

50mM Tris-HCl pH7.4(150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.005W/V% BSA、2W/V% SDS含有)

##### (v)正常検体

BSEに感染していないことを確認した牛の延髄のオベックス部の組織小片を採取し、これらに上記ホモジナイズ用溶液を、ホモジナイズ用溶液に対する組織小片の濃度が20W/V%になるように加え、1.3mL中でマルチビーズショッカー(安井器械(株)製)を用いて2000rpmで30秒ホモジナイズした。これを正常検体とした。

#### 【0185】

(2) 被検試料の調製

BSE感染牛小脳(陽性検体とする。3検体)の組織小片夫々320~350mg(湿重量)を採取し、これらに精製水を、精製水に対する組織小片の濃度が夫々50W/V%となるように加え、マルチビーズショッカー(安井器械(株)製)を用いて2000rpmで30秒ホモジナイズ後、-80 $^{\circ}$ Cで凍結保存したものをを用いた。

被検試料調製時に、凍結保存した試料を溶解し、ホモジナイズ用溶液で2.5倍( $\times 2.5$ )に希釈した(20W/V% 試料となる。)。次いで、この $\times 2.5$ 希釈試料を、上記(1)(v)で調製した正常検体で順次希釈して、 $\times 10$ 、 $\times 100$ 、 $\times 500$ 、 $\times 1000$ 、 $\times 3000$ に希釈した希釈試料を調製した。

次いで調製した希釈試料夫々600 $\mu$ Lを、室温、5000 $\times$ gで5分間遠心分離を行い、上清を得た。

得られた上清500 $\mu$ Lにプロテアーゼ溶液500 $\mu$ L(プロテイナーゼK 100 $\mu$ g)を加え、よく混和後、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた後、蛋白質沈降剤500 $\mu$ Lを添加し混合させた。

次いで、この液を20000 $\times$ gで5分間遠心分離を行い、上清を廃棄して沈殿物を得た。

得られた沈殿物に沈殿物溶解液60 $\mu$ Lを加えて溶解後、100 $^{\circ}$ Cで5分間処理し、プロテイナーゼKの失活及び異常型PrPの病原性不活性化処理を行った。

得られた溶液を被検試料として用いた。

【0186】

[PrPの固定化および検出]

(1) 試液の調製

(i)固定化用試液1

精製水で、0.1 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液1を調製した。

(ii)固定化用試液2

精製水で、0.1 W/V% Tween 20、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液2を調製した。

(iii)PrP固定化用試料

上記で調製した被検試料60 $\mu$ Lをマイクロチューブに採り、固定化用試液1の600 $\mu$ Lを混合したもの(SDS終濃度0.27 W/V%、TCA終濃度2.3 W/V%、エタノール終濃度41 V/V%)を調製し、PrP固定化用試料とした。

(iv)洗浄液

Tween 20を、終濃度0.05%となるようにPBS[pH7.4、0.02V/V% スラオフ(日本エンバイロケミカルズ(株)商品名)含有]で希釈したものをを用いた。

(v)抗体溶液

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗BSEモノクロナール抗体(独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所製)をPBS(pH7.4、20W/V% グリセロール、0.1W/V% BSA含有)で1/500希釈したものをを用いた。

(vi)発色液

TMB Solution(和光純薬工業(株)製、マイクロウエル用)を用いた。

(vii)停止液 0.1M HCl水溶液を停止液として用いた。

(2) PrPの固定化および検出

上記で調製したPrP固定化用試料につき、一試料毎に各600 $\mu$ Lを、PVDF膜をセットしてあるマルチプレート(ミリポア社製)の2ウェルに200 $\mu$ Lずつ(duplicate)、アプライした。

マルチプレートを室温で5分間静置後、各ウェル内の液を吸引濾過した。次いで固定化用試液2を100 $\mu$ Lずつ各ウェルにアプライし、同様に吸引濾過した。更に洗浄液300 $\mu$ Lを各ウェルにアプライし、同様に吸引濾過を行い、各ウェルのPVDF膜を洗浄した。この洗浄操作を計3回行った。その後、抗体溶液50 $\mu$ Lを各ウェルにアプライし、室温で20分間反応させた。反応後、洗浄液300 $\mu$ Lを各ウェルにアプライし吸引濾過する操作を5回を行い、PVDF膜を洗浄した。

次いで、発色液50 $\mu$ Lを各ウェルにアプライし、暗所、室温で30分間反応させた。反応後、マルチプレートのウェルの反応液を、吸引濾過によって96穴のELISAプレートのウェルに移した。その後、再度PrPを固定化してあるマルチプレートのウェルに発色液を50 $\mu$ Lずつアプライし、吸引濾過によって、96穴のELISAプレートの同じウェルに移し、反応液でウェルを共洗した。その後、96穴ELISAプレートの各ウェルに反応停止液を100 $\mu$ Lずつアプライして、反応を停止させた。

反応停止後30分以内に、マイクロプレートリーダー(Molecular Devices製)にて、反応液の吸光度(主波長450nm、副波長620nm)を測定した。得られたduplicateの吸光度の平均値、SD及びCV(%)を表10に示す。また、陽性検体から得られた被検試料毎の、吸光度(シグナル強度)と希釈倍率との関係を図9に示す。図9に於いて、 $\square$ 、 $\blacksquare$ 、 $\blacksquare$ は、夫々試料No. 1、2及び3について得られた結果を夫々示す。

別に陰性対照[0.01W/V% BSA、0.02%スラオフを含有する50mM Tris-HCl pH7.4]と陽性対照[50mM Tris-HCl pH7.4、50 $\mu$ g/mL リコンビナントPrP(rPrP、広島大学から供与された)、150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.01W/V% BSA、2W/V% SDS 含有]を用いて同様に固

10

20

30

40

50

定化、吸光度の測定を行った。尚、陰性対照と陽性対照はトリプリケートで測定を行った。得られた吸光度の平均値を表12に示す。

【0187】

比較例4 (従来のELISA法)

比較例1で用いたのと同じ日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製のプラテリア<sup>T</sup> M BSEキットを用い、以下の通り、PrPの検出を行った。

[被検試料の調製]

実施例14で用いたのと同じ陽性検体の凍結保存した試料を、溶解し、ホモジナイズ用溶液で2.5倍(×2.5)に希釈した(20W/W% 試料となる。)。次いで、この×2.5希釈試料を、上記で得られた正常検体で順次希釈して、×10、×30、×100、×300、×1000 10に希釈した希釈試料を調製した。

希釈試料夫々500 $\mu$ Lに(実施例14で行った遠心操作は行わない)、添付のプロティナーゼK(Tritirachium album 由来)をReagent A液(尿素0.12g/mL)で希釈したもの500 $\mu$ Lを加え、37 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。

次いで反応液にReagent B液(3-ブタノール)500 $\mu$ Lを添加し、よく混和後、20000gで5分間遠心分離を行い、沈殿物を得た。

沈殿物にReagent C1液(尿素0.36g/mL)を添加して溶解し、100 $^{\circ}$ Cで5分間処理し、プロティナーゼKの失活及び異常型PrPの病原性不活性化処理を行った。

得られた溶液を被検試料として用いた。

[PrPの検出]

20

上記で調製した被検試料17 $\mu$ Lを、希釈液83 $\mu$ Lに溶解したものを、抗ヒトPrPマウスモノクローナル抗体を結合した96穴ELISA用プラスチックプレートのウェルに滴下した後、37 $^{\circ}$ Cで75分間静置した。次いで洗浄液350 $\mu$ Lで、ウェルを洗浄する操作を6回行った。

各ウェルにPOD標識抗ヒトPrPマウスモノクローナル抗体溶液100 $\mu$ Lを加え、4 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた。

各ウェルを洗浄液(トリス緩衝液)で10回洗浄した。洗浄後、各ウェルに基質発色液(TM B溶液)100 $\mu$ Lをアプライし、30分間反応させた。反応後各ウェルに反応停止液(0.5M 硫酸)100 $\mu$ Lを加えて反応を停止させた。

マイクロプレートリーダー(Molecular Devices製)にて、主波長450nm、副波長620nmでの吸光度を測定した。結果を表11に示す。また、陽性検体から得られた試料毎の、シグナル強度と希釈倍率との関係を図9に併せて示す。図9に於いて、—○—、—●—、—●—は、夫々実施例14と同じ試料NO.1、2及び3について得られた結果を夫々示す。 30

別にキットに添付の陰性対照(0.1W/V% BSAを含有するPBS)1検体とキットに添付の陽性対照(ヒトプリオン蛋白合成ペプチド)1検体を用いて同様に固定化及び吸光度の測定を行った。結果を表12に併せて示す。

【0188】

【表10】

試料No.	希釈倍率	実施例14		
		mean	SD	CV%
No.1	× 10	1.226	0.006	1%
	× 100	0.175	0.001	1%
	× 500	0.061	0.001	2%
	× 1000	0.054	0.001	3%
	× 3000	0.064	0.001	1%
No.2	× 10	1.399	0.003	0%
	× 100	0.173	0.007	4%
	× 500	0.07	0.004	6%
	× 1000	0.073	0.002	3%
	× 3000	0.05	0.004	8%
No.3	× 10	1.041	0.009	1%
	× 100	0.153	0.005	3%
	× 500	0.069	0.006	8%
	× 1000	0.056	0.001	1%
	× 3000	0.066	0.020	30%

10

20

【0189】

【表11】

試料No.	希釈倍率	比較例4		
		mean	SD	CV%
No.1	× 10	0.091	0.008	9%
	× 30	0.045	0.002	4%
	× 100	0.038	0.000	0%
	× 300	0.037	0.002	5%
	× 1000	0.034	0.002	6%
No.2	× 10	0.230	0.045	20%
	× 30	0.074	0.011	15%
	× 100	0.045	0.004	9%
	× 300	0.060	0.004	7%
	× 1000	0.041	0.005	12%
No.3	× 10	0.238	0.038	16%
	× 30	0.058	0.002	3%
	× 100	0.046	0.001	2%
	× 300	0.037	0.001	3%
	× 1000	0.213	0.001	0%

30

40

【0190】

【表 1 2】

	実施例14	比較例4
陰性対照	0.038	0.023
陽性対照	2.181	1.295

【0 1 9 1】

まず、実施例 1 3 と同様に、実施例 1 4 も、比較例 4 も、陰性対照の吸光度は0.15以下で、陽性対照の吸光度は1.0以上であった。このことから、実施例 1 4 の結果は信用できると判断される。 10

表 1 0、1 1 及び図 9 の結果から明らかな如く、従来の方法では×10程度の試料についてしか測定が出来なかったが、本発明に係る方法では、×100以上希釈しても十分測定が可能であり、約10倍以上高感度であることが判った。

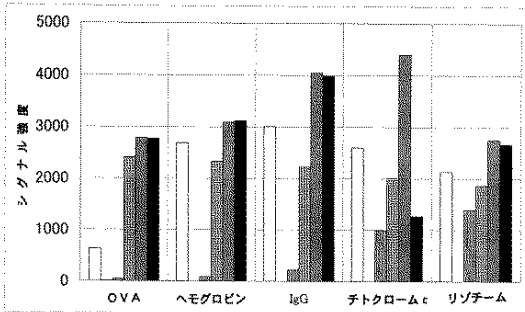
【産業上の利用可能性】

【0 1 9 2】

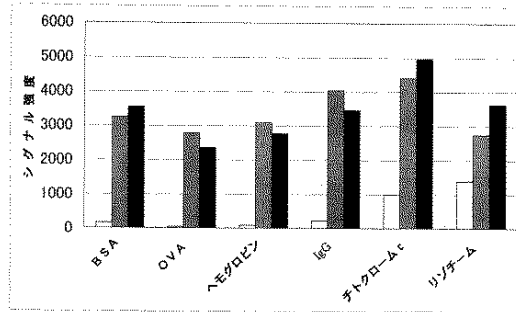
本発明に係る蛋白質固定化方法によれば、従来の固相化法では容易に固定化できなかった試料中の蛋白質を固相に固定化でき、且つ試料中に共存する阻害物質の影響を軽減して蛋白質の定量的測定／検出を行うことができる。また、従来の固定化方法では正確に行えなかった蛋白質の定量も行うことができる。 20

更に、該固定化方法を用いて異常型PrPの検出を行えば、迅速且つ精度の高い検出方法及びプリオン病（特にBSE）の判定を行うことができる。

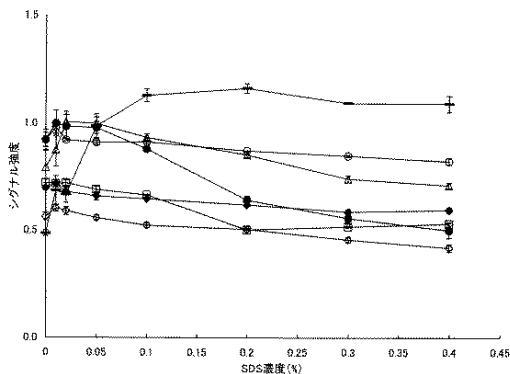
【図 1】



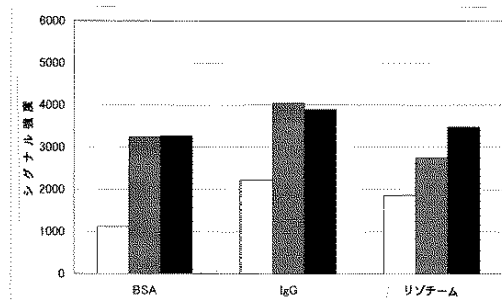
【図 3】



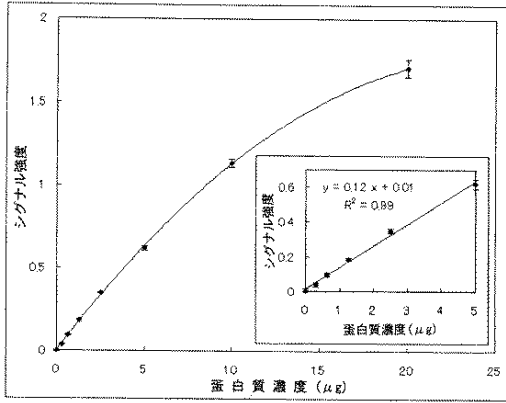
【図 2】



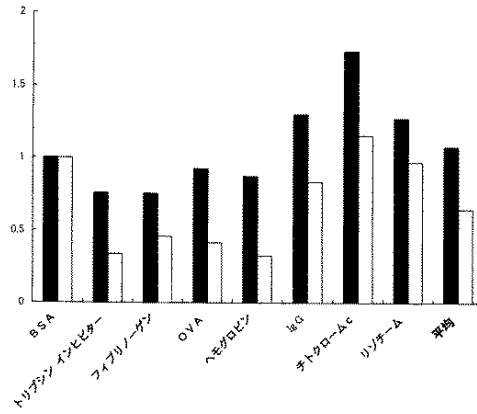
【図 4】



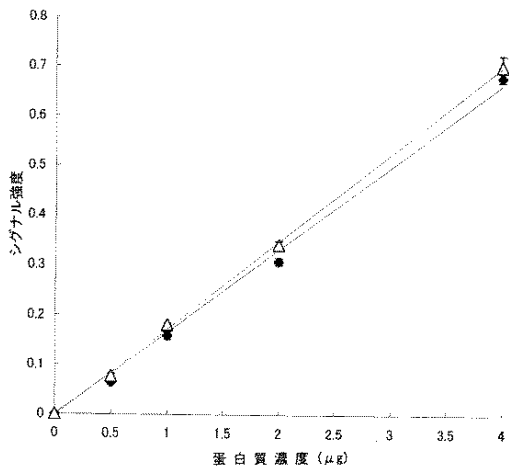
【図 5】



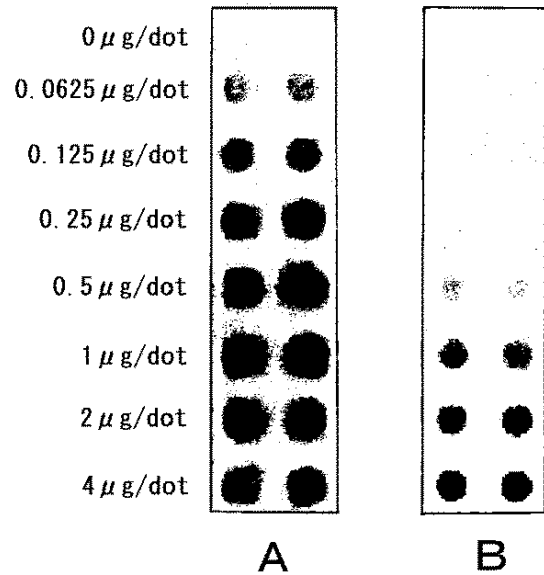
【図 6】



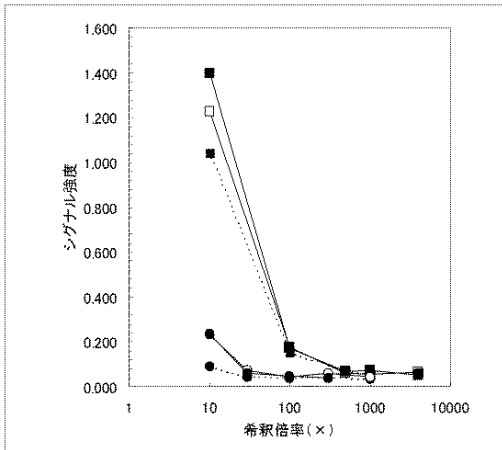
【図 7】



【図 8】



【図 9】



## 【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2005/000737
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl. <sup>7</sup> C07K17/02, G01N33/53		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl. <sup>7</sup> C07K17/02, G01N33/53		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE/CAPLUS/WPIDS/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	Goncalves, C.A. et al., "Electrotransfer of fixed phosphoproteins from pieces of dried polyacrylamide gel to small disks of nitrocellulose, nylon or polyvinylidene difluoride", ELECTROPHORESIS, (1993), Vol.14, No.8, pages 789 to 793, Introduction, Fig. 1, and Results	<u>1-13</u> 14-34
<u>X</u> Y	Jacobson, G. et al., "Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer", ELECTROPHORESIS, (1990), Vol.11, No.1, pages 46 to 52, full text	<u>1-13</u> 14-34
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 04 March, 2005 (04.03.05)	Date of mailing of the international search report 29 March, 2005 (29.03.05)	
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer	
Facsimile No.	Telephone No.	

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/000737

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Sheffield, J.B. et al., "A solid-phase method for the quantitation of protein in the presence of sodium dodecyl sulfate and other interfering substances", ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, (1987), Vol.166, No.1, pages 49 to 54, full text	1-34
Y	YAMAGUCHI, K. et al., "Immunostaining method of isoferritins separated by isoelectric focusing on cellulose acetate membrane", JAPANESE JOURNAL OF ELECTROPHORESIS, (1991), Vol.35, No.4, pages 275 to 277, Summary	1-34
Y	JP 58-205855 A (Tokyo Biochemical Research Foundation), 30 November, 1983 (30.11.83), Example 1 (Family: none)	1-34
Y	JP 2002-236127 A (Joko Co., Ltd.), 23 August, 2002 (23.08.02), Abstract; examples 1 to 3 (Family: none)	1-34
Y	WO 02/057793 A2 (Baxter International Inc.), 25 July, 2002 (25.07.02), Particularly, page 13, lines 4 to 24; page 14, lines 10 to 17 & US 2002/137114 A1	14-34

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2005/000737
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C07K17/02, G01N33/53		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int. Cl <sup>7</sup> C07K17/02, G01N33/53		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの		
国際調査で利用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) MEDLINE/CAPLUS/WPIDS/BIOSIS (STN)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	Goncalves, C.A. et al., "Electrotransfer of fixed phosphoproteins from pieces of dried polyacrylamide gel to small disks of nitrocellulose, nylon or polyvinylidene difluoride" ELECTROPHORESIS, (1993), Vol. 14, No. 8, pp. 789-793, Introduction, Fig. 1, 及び Results 参照	1-13 14-34
X Y	Jacobson, G. et al., "Important parameters in semi-dry electrophoretic transfer" ELECTROPHORESIS, (1990), Vol. 11, No. 1, pp. 46-52, 全文参照	1-13 14-34
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 04. 03. 2005	国際調査報告の発送日 29. 3. 2005	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 新留 豊	4B 9639
電話番号 03-3581-1101 内線 3448		

国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP2005/000737

C (続き) 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Sheffield, J.B., et al., "A solid-phase method for the quantitation of protein in the presence of sodium dodecyl sulfate and other interfering substances" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, (1987), Vol.166, No.1, pp.49-54, 全文参照	1-34
Y	Yamaguchi, K. et al., "Immunostaining method of isoferritins separated by isoelectric focusing on cellulose acetate membrane" JAPANESE JOURNAL OF ELECTROPHORESIS, (1991), Vol.35, No.4, pp.275-277, Summary 参照	1-34
Y	JP 58-205855 A (Tokyo Biochemical Research Foundation), 1983.11.30, 実施例1参照 (ファミリーなし)	1-34
Y	JP 2002-236127 A (Joko Co., Ltd.), 2002.08.23, 要約, 実施例1-3参照 (ファミリーなし)	1-34
Y	WO 02/057793 A2 (Baxter International Inc.), 2002.07.25, 特に第13頁第4-24行, 第14頁第10-17行参照 & US 2002/137114 A1	14-34

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 西部 隆宏

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社 ゲノム研究所内

(72)発明者 平安 一成

兵庫県尼崎市高田町6番1号 和光純薬工業株式会社 ゲノム研究所内

(72)発明者 小林 義輝

大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番2号 和光純薬工業株式会社内

(72)発明者 横山 隆

茨城県つくば市千現1-13-49

Fターム(参考) 2G045 BB02 BB07 BB29 DA36 FB03 FB07

4H045 AA20 AA30 EA50 FA80

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第3部門第2区分  
 【発行日】平成20年6月5日(2008.6.5)

【国際公開番号】WO2005/070969  
 【年通号数】公開・登録公報2008-002  
 【出願番号】特願2005-517266(P2005-517266)

【国際特許分類】  
 C 0 7 K 17/00 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/68 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/543 (2006.01)

【F I】  
 C 0 7 K 17/00  
 G 0 1 N 33/53 D  
 G 0 1 N 33/68  
 G 0 1 N 33/543 5 2 5 G

【手続補正書】  
 【提出日】平成19年12月27日(2007.12.27)

【手続補正1】  
 【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

異常型プリオン蛋白質を含有する被検試料を、低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、疎水性表面を有する固相と接触させる方法により処理して異常型プリオン蛋白質を当該固相に固定化させた後、異常型プリオン蛋白質に結合し得る抗体を反応させ、それにより生じた抗原抗体複合物の量を測定し、その結果に基づいて行うことを特徴とする、異常型プリオン蛋白質の検出方法。

【請求項2】

低級アルコールとハロゲノカルボン酸と長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、被検試料を疎水性表面を有する固相と接触させることを特徴とする、請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】

低級アルコールがエタノール又はメタノールである、請求項1に記載の検出方法。

【請求項4】

ハロゲノカルボン酸がトリクロロ酢酸（以下、TCAと略記する。）又はトリフルオロ酢酸（以下、TFAと略記する。）である、請求項1に記載の検出方法。

【請求項5】

長鎖アルキル硫酸塩がドデシル硫酸ナトリウム（以下、SDSと略記する。）である、請求項1に記載の検出方法。

【請求項6】

被検試料と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の低級アルコール濃度が、30～50 V/V%である、請求項1に記載の検出方法。

【請求項7】

被検試料と疎水性表面を有する固相とを接触させる際のハロゲノカルボン酸濃度が、0.08～10 W/V%である、請求項1に記載の検出方法。

【請求項8】

被検試料と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の長鎖アルキル硫酸塩濃度が、0.1~1 W/V%である、請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 9】

固相が疎水性膜である、請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 10】

低級アルコールがエタノール又はメタノールであり、ハロゲノカルボン酸がTCA又はTFAであり、長鎖アルキル硫酸塩がSDSである、請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 11】

被検試料と疎水性表面を有する固相とを接触させる際の、低級アルコール濃度が30~50 V/V%であり、ハロゲノカルボン酸濃度が0.08~10 W/V%であり、長鎖アルキル硫酸塩濃度が0.1~1 W/V%であって、固相が疎水性膜である、請求項 10 に記載の検出方法。

【請求項 12】

被検試料中の異常型プリオンを固相に結合させた後、固相に結合しなかった被検試料中の成分を吸引濾過により除去する工程を有する、請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 13】

請求項 12 記載の吸引濾過の工程を行った後、非イオン性界面活性剤を含有する溶液で固相を洗浄する工程を更に追加して行う、請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 14】

非イオン性界面活性剤を含有する溶液が、更に低級アルコール及びハロゲノカルボン酸を含有するものである請求項 13 に記載の検出方法

【請求項 15】

抗体が標識物質で標識されたものである請求項 1 に記載の検出方法。

【請求項 16】

異常型プリオン蛋白質に結合した標識抗体の標識物質の量を測定し、その結果に基づいて抗原抗体複合物の量を測定する請求項 15 に記載の検出方法。

【請求項 17】

標識物質が酵素であり、酵素免疫測定法により抗原抗体複合物の量を測定する、請求項 16 に記載の検出方法。

【請求項 18】

異常型プリオン蛋白質と酵素標識抗体との抗原抗体複合物に、当該酵素に対する基質溶液を反応させて当該酵素の作用により発色反応を起こさせた後、基質溶液を吸引濾過により除去する、請求項 17 に記載の検出方法。

【請求項 19】

下記工程により得られた異常型プリオン蛋白質を含有する動物組織由来試料を被検試料として用いる、請求項 1 に記載の検出方法。

- 1) 異常型プリオン蛋白質を検出すべき動物組織を界面活性剤の存在下に破碎処理する工程、
- 2) 不溶物を除去する工程、
- 3) 上清に分解酵素を加えて正常型PrPを分解する工程、
- 4) 異常型プリオン蛋白質を沈降させる工程、
- 5) 沈降物を回収したのち、沈降物の溶液を得る工程、

【請求項 20】

請求項 1 に記載の方法により異常型プリオン蛋白質を検出し、その結果に基づいて行う、プリオン病の判定方法。

【請求項 21】

(1)低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸とを含有する固定化用試液 1、(2)非イオン性界面活性剤を含有する固定化用試液 2、及び(3)異常型プリオン蛋白質と特異的に結合し得る標識抗体、を構成試薬として含有してなる、異常型プリオン蛋白質検出用キット。

【請求項 22】

固定化用試液 2 が、更に低級アルコール及びハロゲノカルボン酸を含むものである、請求項 2 1 記載のキット。

【請求項 2 3】

標識抗体が酵素標識抗体である場合に、更に当該酵素の反応により検出可能なシグナルを発生し得る当該酵素の基質を構成試薬として含有して成る、請求項 2 1 記載のキット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 1

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 0 1】

本発明は、固相への蛋白質の固定化方法を用いた異常型プリオン蛋白質の検出方法及びプリオン病（特に牛海綿状脳症、Bovine Spongiform Encephalopathy、以下BSEと略記する。）の判定方法等に関するものである。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 1 2

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 0 1 2】

本発明は、上記課題を解決する目的でなされたものであり、以下の構成よりなる。

(1) 異常型PrPを含有する被検試料を、低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸塩の共存下で、疎水性表面を有する固相と接触させる方法により処理して異常型PrPを当該固相に固定化させた後、異常型PrPに結合し得る抗体を反応させ、それにより生じた抗原抗体複合物の量を測定し、その結果に基づいて行うことを特徴とする、異常型PrPの検出方法。

(2) 上記(1)の方法により異常型PrPを検出し、その結果に基づいて行う、プリオン病の判定方法。

(3) (i)低級アルコールと、ハロゲノカルボン酸及び／又は長鎖アルキル硫酸とを含有する固定化用試液 1、(ii)非イオン性界面活性剤を含有する固定化用試液 2、及び(iii)異常型PrPと特異的に結合し得る標識抗体、を構成試薬として含有してなる、異常型PrP検出用キット。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 1 1 8

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0 1 1 8】

【結果】

結果を図 2 に示す。

図 2 に於いて、 $\triangle$  はリゾチーム、 $\square$  はチトクローム c、 $\bigcirc$  は IgG、 $\square$  はフィブリノーゲン、 $\bullet$  は BSA、 $\blacklozenge$  は OVA、 $\diamond$  はトリプシンインヒビターを含有する蛋白質試料を用いた場合の結果を夫々示す。また、横軸は固定化用試液中の SDS 濃度を示す。更に、図 2 中の、各ポイントのバーは、 $\pm$  SD を示す。

図 2 から明らかな如く、殆どの蛋白質で SDS 共存下に PVDF 膜に固定化させると、一旦シグナル強度が増加するが、SDS 濃度が 0.1W/V% 以上になるとシグナル強度がある一定の値を示す傾向を示した。このことから、固定化用試液中の SDS 濃度を 0.1W/V% 以上（固定化用試料中の終濃度 0.09W/V% 以上）とすることにより、試料中の蛋白質の PVDF 膜への固定化率が一定となると考えられる。

また、データのバラツキを示す相関変異値 (Coefficient Variation Value、以下、「C

V値」と記載する。CV値＝標準偏差／平均値（％）についてみると、どの蛋白質も固定化用試液中のSDS濃度が0.1 W/V%より低い濃度では、CV値が大きく、シグナル強度が安定していないことが分かる。それに対し、固定化用試液中のSDS濃度が0.1W/V%以上の場合は、CV値が比較的小さく、上述したようにこの濃度範囲でシグナル強度の値が安定であることが示されている。この結果は、試料中の蛋白質の固相膜に固定化される量を示していると考えられる。また、データは示していないが、この結果は再現性があることを確認している。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0146

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0146】

[結果]

夫々の測定は3回ずつ行い、得られた吸光度の平均値を求めた。対照を用いて得られた平均値を100として、それに対する界面活性剤を含有する試料を用いて得られた吸光度の平均値の相対値（％）を求め、その相関変位（CV）と併せて表4に示す。

表4に於いて、界面活性剤（阻害物質）の濃度は、蛋白質試料中の濃度を示す。また、液相法のデータ中、左側の値は界面活性剤の濃度を、右側の値は対照に対する、界面活性剤を含有する試料を用いた場合の平均測定値の相対値（％）±CVを示す。

尚、表4に示したデータは、界面活性剤の最大許容濃度時のデータ、すなわち、添加剤として界面活性剤を用いた場合に、対照（添加剤なし）と比較して平均値が±20%の範囲内に入るといふ結果が得られた時のデータを示している。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0153

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0153】

[結果]

結果を図8に示す。図8に於いて、AはPVDF膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発光反応により行い、X線フィルムに感光させ検出したものである。Bは、PVDF膜に固定化した蛋白質試料の免疫検出を発色反応により行い、検出したものである。また、各ドットは、各蛋白質量の蛋白質試料を固定化後に検出した場合の結果を夫々示す。

図8より明らかな如く、イムノプロットングにより発光検出、発色検出した場合の何れも、膜に固定化したマウスIgGを検出することができた。発光検出での検出限界は0.0625 $\mu$ g、発色検出での検出限界は0.5 $\mu$ gであった。従って、本発明の蛋白質の固定化方法により固定化したものは、イムノプロットングによる免疫学的検出を行い得ることが判った。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0156

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0156】

[異常型PrPの固定化および検出]

(1) 試液の調製

(i) 固定化用試液1

精製水で、0.1 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液1を調製した。

## (ii)固定化用試液 2

精製水で、0.1 W/V% Tween 20、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液 2 を調製した。

## (iii)異常型PrP固定化用試料

上記で調製した異常型PrPを含有する被検試料20 $\mu$ Lと、固定化用試液 1 200 $\mu$ Lを混合したもの (SDS終濃度 0.27 W/V%、TCA終濃度2.3 W/V%、エタノール終濃度41 V/V%) を調製し、異常型PrP固定化用試料とした。

## (iv)洗浄液

Tween 20を、終濃度0.05%となるようにPBS[pH7.4、0.02V/V% スラオフ(日本エンパイロケミカルズ(株)商品名)含有]で希釈したものを用いた。

## (v)抗体溶液

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗BSEモノクローナル抗体(独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所製)をPBS(pH7.4、20W/V% グリセロール、0.1W/V% BSA含有)で1/500希釈したものを用いた。

## (vi)発色液

TMB Solution(和光純薬工業(株)製、マイクロウエル用)を用いた。

## (vii)反応停止液 0.1M HCl水溶液を反応停止液として用いた。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 5 8

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 5 8】

## 比較例 1 (従来のELISA法)

日本バイオ・ラッド ラボラトリーズ(株)製のプラテリア<sup>T M</sup> BSEキットを用い、以下の通り、異常型PrPの検出を行った。

## [異常型PrPを含有する被検試料の調製]

実施例 1 1 で用いたのと同じBSE感染牛小脳(凍結融解を繰り返したもの)の組織小片350mg(湿重量)をホモジナイズ液(グルコース50mg/mL)1.4mL中でマルチビーズショッカーを用いてホモジナイズした。

得られたホモジネート500 $\mu$ Lに、キットに添付のプロティナーゼK(Tritirachium album 由来)をReagent A液(尿素0.12g/mL)で希釈したもの500 $\mu$ Lを加え、37°Cで10分間反応させた。

次いで反応液にReagent B液(3-ブタノール)500 $\mu$ Lを添加し、よく混和後、20000gで5分間遠心分離を行い、沈殿物を得た。

沈殿物にReagent C1液(尿素0.36g/mL)を添加して溶解し、100°Cで5分間処理し、プロティナーゼKの失活及び異常型PrPの病原性不活性化処理を行った。

得られた溶液を異常型PrPを含有する被検試料として用いた。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0 1 6 4

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0 1 6 4】

## [PrPの固定化および検出]

## (1) 試液の調製

## (i)固定化用試液 1

精製水で、0.1 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液 1 を調製した。

## (ii)固定化用試液 2

精製水で、0.1 W/V% Tween 20、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液 2 を調製した。

(iii) PrP 固定化用試料

上記で調製した被検試料 60 $\mu$ L をマイクロチューブに採り、固定化用試液 1 の 600 $\mu$ L を混合したもの (SDS 終濃度 0.27 W/V%、TCA 終濃度 2.3 W/V%、エタノール終濃度 41 V/V%) を調製し、PrP 固定化用試料とした。

(iv) 洗浄液

Tween 20 を、終濃度 0.05% となるように PBS [pH7.4、0.02 V/V% スラオフ (日本エンバイロケミカルズ (株) 商品名) 含有] で希釈したものを用いた。

(v) 抗体溶液

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗 BSE モノクロナール抗体 (独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所製) を PBS (pH7.4、20 W/V% グリセロール、0.1 W/V% BSA 含有) で 1/500 希釈したものを用いた。

(vi) 発色液

TMB Solution (和光純薬工業 (株) 製、マイクロウェル用) を用いた。

(vii) 反応停止液 0.1M HCl 水溶液を反応停止液として用いた。

【手続補正 10】

【補正対象書類名】 明細書

【補正対象項目名】 0192

【補正方法】 変更

【補正の内容】

【0192】

本発明に係る蛋白質固定化方法によれば、従来の固相化法では容易に固定化できなかった試料中の蛋白質を固相に固定化でき、且つ試料中に共存する阻害物質の影響を軽減して蛋白質の定量的測定/検出を行うことができる。また、従来の固定化方法では正確に行えなかった蛋白質の定量も行うことができる。

更に、該固定化方法を用いて異常型 PrP の検出を行えば、迅速且つ精度の高い検出及びプリオン病 (特に BSE) の判定を行うことができる。

【公報種別】 特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】 第3部門第2区分  
 【発行日】 平成20年6月19日(2008.6.19)

【国際公開番号】 WO2005/070969  
 【年通号数】 公開・登録公報2008-002  
 【出願番号】 特願2005-517266(P2005-517266)

【国際特許分類】  
 C 0 7 K 17/00 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/68 (2006.01)  
 G 0 1 N 33/543 (2006.01)

【F I】  
 C 0 7 K 17/00  
 G 0 1 N 33/53 D  
 G 0 1 N 33/68  
 G 0 1 N 33/543 5 2 5 G

【手続補正書】  
 【提出日】 平成19年12月28日(2007.12.28)

【手続補正1】  
 【補正対象書類名】 明細書  
 【補正対象項目名】 0 1 2 5  
 【補正方法】 変更  
 【補正の内容】

【0 1 2 5】

#### 実施例3. 低級アルコールの検討

低級アルコールとしてエタノールの代わりにメタノールを用いた場合の蛋白質試料の固定化及び測定を行った。

##### 【試料及び試液の調製】

##### (1)蛋白質試料

BSA、OVA、ヘモグロビン、IgG、チトクロームc、リゾチームを夫々秤量し、精製水に溶解して250 $\mu$ g/mL溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

##### (2)固定化用試液

精製水を用いて下記固定化用試液を調製した。

固定化用試液1: 0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA

固定化用試液2: 0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノール

固定化用試液3: 0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% メタノール (和光純薬工業(株)製、特級)

##### (3)固定化用試料

蛋白質試料20 $\mu$ L (蛋白質量5 $\mu$ g) と、所定の固定化用試液300 $\mu$ Lとを混合したものを調製し、固定化用試料1, 2, 3とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%、メタノール 42.2V/V%である。

##### 【蛋白質の固定化及び測定】

実施例1と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンスitomーターで600nmの吸光度 (シグナル強度) を測定した。

【手続補正2】  
 【補正対象書類名】 明細書  
 【補正対象項目名】 0 1 2 8  
 【補正方法】 変更

## 【補正の内容】

【0128】

## 実施例4. ハロゲノカルボン酸の検討

ハロゲノカルボン酸として、TCAの代わりにトリフルオロ酢酸（以下、TFAと略記する。）を用いた場合の蛋白質試料の固定化及び測定を行った。

## 【試料及び試液の調製】

## (1)蛋白質試料

BSA、IgG、リゾチームを夫々秤量し、精製水に溶解して250 $\mu$ g/mL溶液としたものを蛋白質試料として用いた。

## (2)固定化用試液

精製水を用いて、下記固定化用試液を調製した。

固定化用試液1：0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール

固定化用試液2：0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール、2.5 W/V% TCA

固定化用試液3：0.2 W/V% SDS、45 V/V% エタノール、2.5 W/V% TFA（和光純薬工業(株)製）

## (3)固定化用試料

蛋白質試料20 $\mu$ L（蛋白質量5 $\mu$ g）と、所定の固定化用試液300 $\mu$ Lとを混合したものを調製し、固定化用試料1, 2, 3とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、TFA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%である。

## 【蛋白質の固定化および測定】

実施例1と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンストメーターで600nmの吸光度（シグナル強度）を測定した。

## 【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0131

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0131】

## 実施例5. 検量線の作成

## 【試料及び試液の調製】

## (1)蛋白質試料

OVAを0~20 $\mu$ g/20 $\mu$ Lとなるように精製水に溶解して蛋白質試料とした。

## (2)固定化用試液

0.2 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールとなるように精製水に溶解して調製したものを固定化用試液として用いた。

## (3)固定化用試料

蛋白質試料20 $\mu$ L（蛋白質量5 $\mu$ g）と、固定化用試液300 $\mu$ Lとを混合したものを調製し、固定化用試料とした。固定化用試料中の各試薬の終濃度は、夫々SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%である。

## 【蛋白質の固定化及び測定】

実施例1と同様の方法で、各固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化し、洗浄、染色処理し、次いでデンストメーターで600nmの吸光度（シグナル強度）を測定した。

## 【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0144

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0144】

## 実施例9.

試料中に含まれる界面活性剤が、本発明の固定化用試液を用いた固定化方法及び蛋白質

の測定に及ぼす影響を調べた。

【固相法による固定化及び蛋白質の測定】

(1) BSA又はIgG含有蛋白質試料中の蛋白質の測定

精製水で、表4記載の濃度となるように、各界面活性剤を含有するBSA試料又はIgG試料(蛋白質量  $4\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ )を調製し、蛋白質試料とした。

別に、精製水で0.1W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液を調製した。

次いで蛋白質試料 $20\mu\text{L}$ と固定化用試液 $300\mu\text{L}$ を混合して固定化用試料を調製し、その $30\mu\text{L}$ を用いて、実施例1と同様の方法で固定化用試料中の蛋白質をPVDF膜に固定化、洗浄、染色処理し、600nmの吸光度(シグナル強度)を測定した。

固定化用試料中の各試薬の終濃度は、SDSを含有しない蛋白質試料を用いた場合は、SDS 0.094W/V%、TCA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%である。また、SDS含有蛋白質試料を用いた場合の各試薬の終濃度は、TCA及びエタノールの終濃度はSDSを含有しない蛋白質試料を用いた場合と同じであるが、SDSの終濃度は、1% SDS含有蛋白質試料を用いた場合は0.16W/V%、2% SDS含有試料を用いた場合は0.21W/V%、4% SDS含有試料を用いた場合は、0.34 W/V%となる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0145

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0145】

(2) OVA含有蛋白質試料中の蛋白質の測定

表4記載の濃度となるように、各界面活性剤を含有するOVA試料(蛋白質量  $5\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ )を調製し、蛋白質試料とした。

別に、精製水で0.2W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液を調製し、上記(1)と同様の方法で固定化用試料を調製し、実施例1と同様の方法でPVDF膜に固定化、洗浄、染色処理し、600nmの吸光度(シグナル強度)を測定した。

尚、固定化用試料中の各試薬の終濃度は、SDSを含有しない蛋白質試料を用いた場合は、SDS 0.19W/V%、TCA 2.34W/V%、エタノール 42.2V/V%である。また、2% SDS含有蛋白質試料を用いた場合の各試薬の終濃度は、SDS 0.31W/V%、TCA 23.4%、エタノール 42.2W/V%となる。

また、界面活性剤(阻害物質)を含有しない以外は上記と同様に調製したBSA試料、IgG試料、OVA試料を用いて同様に固定化、測定を行い、対照とした。

【液相法による蛋白質の測定】

表4記載の濃度となるように各界面活性剤を含有するBSA試料( $10\mu\text{g}/20\mu\text{L}$ )を調製したものを用い、1mL Pyromolex溶液を使って、実施例6と同様の方法で測定した。

また、界面活性剤(阻害物質)を含有しない以外は上記と同様に調製したBSA試料を用いて同様に液相法による測定を行い、対照とした。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0182

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0182】

次に、BSE感染を判定するためのカットオフ値を決定した。実施例13の場合、実施例12で得られた陰性検体の吸光度の平均値(0.052)+5SD( $5\times 0.017$ ) $\div$ 0.14に、上記表9で得られた、実施例13の方法で行った陰性対照の吸光度の平均値(0.035)を加えた値、すなわち0.175を、BSEを判定するカットオフ値として仮に設定した。そしてその値を表8-1及び表8-2の結果に当てはめた場合、実施例13に於ける全ての吸光度の平均値はカットオ

フ値よりも高く、全ての検体が陽性と判定できた。

一方、比較例3の場合、キットの取扱説明書に従い、上記表9で得られた、比較例3の方法で行った陰性対照の吸光度の平均値(0.023)に、当該取扱説明書に記載されているように0.21を加えた値、すなわち0.233を、BSE感染を判定するカットオフ値として仮に設定した。そしてその値を表8-1及び表8-2の結果に当てはめた場合、比較例3に於ける殆どの吸光度の平均値はカットオフ値よりも高く陽性と判定できた。

【手続補正7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0186

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0186】

[PrPの固定化および検出]

(1) 試液の調製

(i)固定化用試液1

精製水で、0.1 W/V% SDS、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液1を調製した。

(ii)固定化用試液2

精製水で、0.1 W/V% Tween 20、2.5 W/V% TCA、45 V/V% エタノールを含有する固定化用試液2を調製した。

(iii)PrP固定化用試料

上記で調製した被検試料60 $\mu$ Lをマイクロチューブに採り、固定化用試液1の600 $\mu$ Lを混合したもの(SDS終濃度0.27 W/V%、TCA終濃度2.3 W/V%、エタノール終濃度41 V/V%)を調製し、PrP固定化用試料とした。

(iv)洗浄液

Tween 20を、終濃度0.05%となるようにPBS[pH7.4、0.02V/V% スラオフ(日本エンバイロケミカルズ(株)商品名)含有]で希釈したものをを用いた。

(v)抗体溶液

西洋ワサビペルオキシダーゼ標識抗BSEモノクロナール抗体(独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構 動物衛生研究所製)をPBS(pH7.4、20W/V% グリセロール、0.1W/V% BSA含有)で1/500希釈したものをを用いた。

(vi)発色液

TMB Solution(和光純薬工業(株)製、マイクロウエル用)を用いた。

(vii)反応停止液 0.1M HCl水溶液を反応停止液として用いた。

(2) PrPの固定化および検出

上記で調製したPrP固定化用試料につき、一試料毎に各400 $\mu$ Lを、PVDF膜をセットしてあるマルチプレート(ミリポア社製)の2ウェルに200 $\mu$ Lずつ(duplicate)、アプライした。

マルチプレートを室温で5分間静置後、各ウェル内の液を吸引濾過した。次いで固定化用試液2を100 $\mu$ Lずつ各ウェルにアプライし、同様に吸引濾過した。更に洗浄液300 $\mu$ Lを各ウェルにアプライし、同様に吸引濾過を行い、各ウェルのPVDF膜を洗浄した。この洗浄操作を計3回行った。その後、抗体溶液50 $\mu$ Lを各ウェルにアプライし、室温で20分間反応させた。反応後、洗浄液300 $\mu$ Lを各ウェルにアプライし吸引濾過する操作を5回を行い、PVDF膜を洗浄した。

次いで、発色液50 $\mu$ Lを各ウェルにアプライし、暗所、室温で30分間反応させた。反応後、マルチプレートのウェルの反応液を、吸引濾過によって96穴のELISAプレートのウェルに移した。その後、再度PrPを固定化してあるマルチプレートのウェルに発色液を50 $\mu$ Lずつアプライし、吸引濾過によって、96穴のELISAプレートの同じウェルに移し、反応液でウェルを共洗した。その後、96穴ELISAプレートの各ウェルに反応停止液を100 $\mu$ Lずつアプライして、反応を停止させた。

反応停止後30分以内に、マイクロプレートリーダー (Molecular Devices製)にて、反応液の吸光度 (主波長450nm、副波長620nm) を測定した。得られたduplicateの吸光度の平均値、SD及びCV(%)を表10に示す。また、陽性検体から得られた被検試料毎の、吸光度 (シグナル強度) と希釈倍率との関係を図9に示す。図9に於いて、 $\square$ 、 $\blacksquare$ 、 $\blacksquare$ は、夫々試料No. 1、2及び3について得られた結果を夫々示す。

別に陰性対照 [0.01W/V% BSA、0.02%スラオフを含有する50mM Tris-HCl pH7.4] と陽性対照 [50mM Tris-HCl pH7.4、50 $\mu$ g/mL リコンビナントPrP (rPrP、広島大学から供与された)、150mM NaCl、1mM KCl、1mM EDTA、0.01W/V% BSA、2W/V% SDS 含有] を用いて同様に固定化、吸光度の測定を行った。尚、陰性対照と陽性対照はトリPLICATEで測定を行った。得られた吸光度の平均値を表12に示す。

专利名称(译)	固定蛋白质的方法和定量蛋白质的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2005070969A1</a>	公开(公告)日	2008-01-17
申请号	JP2005517266	申请日	2005-01-21
申请(专利权)人(译)	和光纯薬工业株式会社 独立行政法人农业·食品产业技术総合研究机构		
[标]发明人	河野直幸 上森仁志 西部隆宏 平安一成 小林義輝 横山隆		
发明人	河野 直幸 上森 仁志 西部 隆宏 平安 一成 小林 義輝 横山 隆		
IPC分类号	C07K17/00 G01N33/53 G01N33/68 G01N33/543 C07K17/02		
CPC分类号	C07K17/02 G01N33/543 G01N33/6896 G01N2800/2828		
FI分类号	C07K17/00 G01N33/53.D G01N33/68 G01N33/543.525.G		
F-TERM分类号	2G045/BB02 2G045/BB07 2G045/BB29 2G045/DA36 2G045/FB03 2G045/FB07 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/EA50 4H045/FA80		
优先权	PCT/JP2004/000504 2004-01-21 WO		
其他公开文献	JPWO2005070969A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种将样品中的蛋白质固定在固相中的方法，该方法不能通过常规的固定方法固定。用于定量测定蛋白质的方法，其中可以减少使用固定化方法制备的样品中共存的抑制物质的作用；与常规方法相比，使用固定化方法检测异常PrP的快速且高度精确的方法和确定BSE的方法。本发明提供：“将蛋白质固定在固相上的方法，包括使蛋白质与在低级醇存在下具有疏水性表面的固相接触，和卤代羧酸和/或长链烷基硫酸盐，用于定量测定蛋白质的方法；包括通过固定化方法使蛋白质染色溶液与固定有蛋白质的固相接触，并确定由此产生的显色程度；免疫印迹；和用于其的固定试剂溶液；使用通过固定化方法固定有蛋白质的固相的方法；以及检测异常PrP的方法，使用固定化方法测定BSE的方法。

	精製水
	固定化用試料 1
	固定化用試料 2
	固定化用試料 3
	固定化用試料 4
	固定化用試料 5