

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5660035号
(P5660035)

(45) 発行日 平成27年1月28日(2015.1.28)

(24) 登録日 平成26年12月12日(2014.12.12)

(51) Int.Cl.	F I	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 8 1 G
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536	C
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/536	D
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/53	U
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/542	A

請求項の数 15 (全 42 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2011-511368 (P2011-511368)
 (86) (22) 出願日 平成22年4月16日(2010.4.16)
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2010/056843
 (87) 国際公開番号 W02010/125932
 (87) 国際公開日 平成22年11月4日(2010.11.4)
 審査請求日 平成24年10月15日(2012.10.15)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-109313 (P2009-109313)
 (32) 優先日 平成21年4月28日(2009.4.28)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)
 (31) 優先権主張番号 特願2009-119902 (P2009-119902)
 (32) 優先日 平成21年5月18日(2009.5.18)
 (33) 優先権主張国 日本国(JP)

(73) 特許権者 000001270
 コニカミノルタ株式会社
 東京都千代田区丸の内二丁目7番2号
 (74) 代理人 110001070
 特許業務法人 S S I N P A T
 (72) 発明者 山本 法明
 日本国東京都日野市さくら町1番地コニカ
 ミノルタテクノロジーセンター株式会社内
 審査官 草川 貴史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 融合タンパク質含有集合体、その製造方法及び該集合体を用いたアッセイ法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位 と特異的に会合するタンパク質(A)及び該部位 を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位 と特異的に会合するタンパク質(B)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質を少なくとも含有するか、又は、

標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位 と特異的に会合するタンパク質(A)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質と、該部位 を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位 と特異的に会合するタンパク質(B)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質とを少なくとも含有し、

上記タンパク質(A)及び(B)それぞれにビオチンが固定化され、蛍光色素又は酵素が、該タンパク質(A)、タンパク質(B)、ビオチン及びアビジンのうち少なくとも1つに固定化され、上記融合タンパク質が、該タンパク質(A)及び(B)のうち少なくとも一方を合計4個とアビジン1個とを含むことを特徴とする融合タンパク質含有集合体。

【請求項2】

上記タンパク質(A)及び(B)それぞれが、抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント又はF(ab')₂フラグメントであることを特徴とする請求項1に記載の融合タンパク質含有集合体。

【請求項3】

標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)及び該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質を少なくとも含有するか、又は、

標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質と、該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質とを少なくとも含有し、

上記タンパク質(A)及び(B)が、ともに抗体であり、蛍光色素又は酵素が、該抗体のみに固定化されるか、プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gのみに固定化されるか、あるいは該抗体とプロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gとに固定化され、上記融合タンパク質が、該タンパク質(A)及び(B)のうち少なくとも一方を合計2~5個と、プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gとを含む
ことを特徴とする融合タンパク質含有集合体。

【請求項4】

上記部位及びが、同一であることを特徴とする請求項1から請求項3までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体。

【請求項5】

上記酵素が、アルカリフォスファターゼ、 -ガラクトシダーゼ、 -グルコシダーゼ又はグルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項1から請求項4までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体。

【請求項6】

下記工程(a)、(b)及び(c)を含むことを特徴とする融合タンパク質含有集合体の製造方法；

工程(a)：標的物質、標的ウイルス又は標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)及び該部位を有する標的物質、標的ウイルス又は標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)からなるタンパク質、ビオチンならびにアビジンのうち少なくとも1つに蛍光色素又は酵素を固定化する工程、

工程(b)：蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよい該タンパク質(A)及び(B)それぞれに、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいビオチンを固定化することによって、ビオチン化タンパク質(A)及び(B)を得る工程及び

工程(c)：蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいビオチン化タンパク質(A)及び(B)を、それぞれ1個以上含むように混合し、

該ビオチン化タンパク質(A)及び(B)の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいアビジンを、そのモル比で4：1以上となるようにさらに混合することによって、融合タンパク質含有集合体を得る工程。

【請求項7】

上記タンパク質(A)及び(B)それぞれが、抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント又はF(ab')₂フラグメントであることを特徴とする請求項6に記載の融合タンパク質含有集合体の製造方法。

【請求項8】

下記工程(d)及び工程(e)のうち少なくとも一方と工程(f)とを含むことを特徴とする融合タンパク質含有集合体の製造方法。

工程(d)：標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合する抗体(A)及び該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合する抗体(B)それぞれに蛍光色素又は酵素を固定化する工程、

工程(e)：プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gに蛍光色素又は酵素を固定化する工程、及び

10

20

30

40

50

工程 (f) : 蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよい抗体 (A) 及び (B) を、それぞれ 1 個以上含むように混合し、該抗体 (A) 及び (B) の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいプロテイン A、プロテイン G 又はプロテイン A / G (ただし、抗体 (A) 及び (B) に蛍光色素又は酵素が固定化されていない場合、用いるプロテイン A、プロテイン G 又はプロテイン A / G には蛍光色素又は酵素が固定化されている。) を、そのモル比で 2 : 1 以上となるようにさらに混合することによって、集合体を得る工程。

【請求項 9】

上記部位 及び が、同一であることを特徴とする請求項 6 から請求項 8 までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体の製造方法。

10

【請求項 10】

上記酵素が、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ又はグルコースオキシダーゼであることを特徴とする請求項 6 から請求項 9 までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体の製造方法。

【請求項 11】

下記工程 (g) ~ (l) を含むことを特徴とするアッセイ法；

工程 (g) : 請求項 1 から請求項 5 までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体と検体とを接触させることによって、該検体に含有される標的物質、標的ウイルス又は標的細胞を介して凝集体を形成する工程、

工程 (h) : 該工程 (g) を経て得られた反応物をフィルタに通すことによって、該凝集体のみを単離する工程、

20

工程 (i) : 該工程 (h) を経て得られた凝集体に、蛍光基質又は消光剤基質を反応させ、それぞれ蛍光色素 (E) 又は消光剤を生成する工程 (ただし、上記工程 (g) において、請求項 1 から請求項 5 までのいずれか一項に記載の酵素を含む融合タンパク質含有集合体を用いた場合のみ。)、

工程 (j) : 透明平面基板と、該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と、該金属薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された誘電体からなるスペーサ層、又は該金属薄膜とは接していないもう一方の表面に形成された蛍光色素 (F) 層とを少なくとも有するプラズモン励起センサの、該スペーサ層表面又は該蛍光色素 (F) 層表面に、上記工程 (h) を経て得られた凝集体又は上記工程 (i) を経て得られた蛍光色素 (E) 又は消光剤を接触させる工程、

30

工程 (k) : 該工程 (j) で得られたプラズモン励起センサに、該基板の、該薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズムを経由してレーザー光を照射し、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、及び

工程 (l) : 該工程 (k) で得られた測定結果から、該標的物質質量、該標的ウイルス量又は該標的細胞量を算出する工程。

【請求項 12】

上記工程 (g) 及び (h) の免疫反応場、及び上記工程 (j) 及び (k) の S P F S 検出場が、それぞれ独立していることを特徴とする請求項 11 に記載のアッセイ法。

【請求項 13】

上記金属薄膜が、金、銀、アルミニウム、銅及び白金からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属から形成されることを特徴とする請求項 11 又は請求項 12 に記載のアッセイ法。

40

【請求項 14】

上記金属が、金からなることを特徴とする請求項 13 に記載のアッセイ法。

【請求項 15】

上記誘電体が、二酸化ケイ素 ($S i O_2$) 又は二酸化チタン ($T i O_2$) を含むことを特徴とする請求項 11 から請求項 14 までのいずれか一項に記載のアッセイ法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明は、主にタンパク質から構成される集合体、その製造方法及び該集合体を用いたアッセイ法に関する。さらに詳しくは、本発明は、アナライトと特異的に会合する2種類のタンパク質と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質含有集合体、その製造方法、及び表面プラズモン励起増強蛍光分光法(SPFS; Surface Plasmon-field enhanced Fluorescence Spectroscopy)の原理に基づき該集合体を用いたアッセイ法に関する。

【背景技術】

【0002】

表面プラズモン励起増強蛍光分光法(SPFS)とは、照射したレーザー光が金薄膜表面で全反射減衰(ATR)する条件において、金属薄膜表面に粗密波(表面プラズモン)を発生させることによって、照射したレーザー光が有するフォトン量を数十倍~数百倍に増やし(表面プラズモンの電場増強効果)、これにより金薄膜近傍の蛍光色素を効率良く励起させることによって、極微量及び/又は極低濃度のアナライトを検出することができる方法である。

10

【0003】

このようなSPFSの原理に基づいたバイオセンサ又はバイオチップに関する例として、特許文献1には、金属基板表面にカルボキシメチルデキストランを用いたリガンド(1次抗体)固定化膜を配し、表面プラズモンにより増強された電場で、抗原に関係付けられた蛍光色素を検出する方法が示されている。

20

【0004】

しかしながら、特許文献1に記載の方法は、基板に固定化された抗体を利用する、いわゆるヘテロジニアスな反応系であるため、抗体の固定化量と自由度に制限があり、抗原抗体反応の効率が低いという問題があった。

【0005】

なお、反応効率を向上させる方法として、遊離の抗体を使用する、いわゆるホモジニアスな反応系が考えられるが、SPFSバイオセンサと組み合わせたとき、いかに検出部分へ抗原抗体反応物を回収するかが問題となっていた。

【0006】

他方、特許文献2には、血球などが保持する抗原に対する抗体を用いて、該血球を凝集し、フィルタでトラップさせ、検出する方法が示されている。

30

【0007】

しかしながら、特許文献2に記載の方法は、標的物質が同一エピトープを複数保持している血球など比較的大きな細胞などを凝集する方法であって、タンパク質や核酸などの分子に対する汎用性はなかった。さらに、凝集物をフィルタでトラップした後、蛍光物質、化学発光物質をさらに反応させる必要があり、感度が低い割に、操作も煩雑であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0008】

【特許文献1】特許第3294605号

40

【特許文献2】特開2008-256457号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、上記問題・状況にかんがみてなされたものであり、その解決課題は、高感度かつ高精度であり、迅速性が飛躍的に向上したアッセイ法、該アッセイ法に用いる融合タンパク質含有集合体及び該集合体の製造方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明者らは、上記の問題を解決すべく鋭意検討した結果、アナライトが有する部位

50

に特異的なタンパク質 (A) 及び該部位 を有するアナライトの部位 に特異的なタンパク質 (B) と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質含有集合体を、S P F S を利用したサンドイッチイムノアッセイ法に用いると、迅速性と感度が飛躍的に向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 1 】

すなわち、本発明に係る上記課題は、下記的手段により解決される。

【 0 0 1 2 】

1 . 標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する 1 以上の部位 と特異的に会合するタンパク質 (A) 及び該部位 を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の 1 以上の部位 と特異的に会合するタンパク質 (B) を合計 2 個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質を少なくとも含有するか、又は、

10

標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する 1 以上の部位 と特異的に会合するタンパク質 (A) を合計 2 個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質と、該部位 を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の 1 以上の部位 と特異的に会合するタンパク質 (B) を合計 2 個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質とを少なくとも含有することを特徴とする融合タンパク質含有集合体。

【 0 0 1 3 】

2 . 上記タンパク質 (A) 及び (B) それぞれにビオチンが固定化され、蛍光色素又は酵素が、該タンパク質 (A)、タンパク質 (B)、ビオチン及びアビジンのうち少なくとも 1 つに固定化され、上記融合タンパク質が、該タンパク質 (A) 及び (B) の合計 4 個とアビジン 1 個とを含むことを特徴とする前記第 1 項に記載の融合タンパク質含有集合体。

20

【 0 0 1 4 】

3 . 上記タンパク質 (A) 及び (B) それぞれが、抗体、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント又は F (a b ')₂ フラグメントであることを特徴とする前記第 1 項又は第 2 項に記載の融合タンパク質含有集合体。

【 0 0 1 5 】

4 . 上記タンパク質 (A) 及び (B) が、ともに抗体であり、蛍光色素又は酵素が、該抗体のみに固定化されるか、プロテイン A、プロテイン G 又はプロテイン A / G のみに固定化されるか、あるいは該抗体とプロテイン A、プロテイン G 又はプロテイン A / G とに固定化され、上記融合タンパク質が、該タンパク質 (A) 及び (B) の合計 2 ~ 5 個と、プロテイン A、プロテイン G 又はプロテイン A / G とを含むことを特徴とする前記第 1 項から第 3 項までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体。

30

【 0 0 1 6 】

5 . 上記部位 及び が、同一であることを特徴とする前記第 1 項から第 4 項までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体。

【 0 0 1 7 】

6 . 上記酵素が、アルカリフォスファターゼ、 - ガラクトシダーゼ、 - グルコシダーゼ又はグルコースオキシダーゼであることを特徴とする前記第 1 項から第 5 項までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体。

40

【 0 0 1 8 】

7 . 下記工程 (a)、(b) 及び (c) を含むことを特徴とする融合タンパク質含有集合体の製造方法；

工程 (a) : 標的物質、標的ウイルス又は標的細胞が有する 1 以上の部位 と特異的に会合するタンパク質 (A) 及び該部位 を有する標的物質、標的ウイルス又は標的細胞の 1 以上の部位 と特異的に会合するタンパク質 (B) からなるタンパク質、ビオチンならびにアビジンのうち少なくとも 1 つに蛍光色素又は酵素を固定化する工程、

工程 (b) : 蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよい該タンパク質 (A) 及び (B) それぞれに、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいビオチンを固定化することによって、ビオチン化タンパク質 (A) 及び (B) を得る工程及び

50

工程(c)：蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいビオチン化タンパク質(A)及び(B)を、それぞれ1個以上含むように混合し、

該ビオチン化タンパク質(A)及び(B)の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいアビジンを、そのモル比で4：1以上となるようにさらに混合することによって、融合タンパク質含有集合体を得る工程。

【0019】

8．上記タンパク質(A)及び(B)それぞれが、抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント又はF(ab')₂フラグメントであることを特徴とする前記第7項に記載の融合タンパク質含有集合体の製造方法。

【0020】

9．下記工程(d)及び(e)のうち少なくとも一方と(f)とを含むことを特徴とする前記第7項又は第8項に記載の融合タンパク質含有集合体の製造方法。

【0021】

工程(d)：標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合する抗体(A)及び該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合する抗体(B)それぞれに蛍光色素又は酵素を固定化する工程、

工程(e)：プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gに蛍光色素又は酵素を固定化する工程、及び

工程(f)：蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよい抗体(A)及び(B)を、それぞれ1個以上含むように混合し、該抗体(A)及び(B)の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいプロテインA、プロテインG又はプロテインA/G(ただし、抗体(A)及び(B)に蛍光色素又は酵素が固定化されていない場合、用いるプロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gには蛍光色素又は酵素が固定化されている。)を、そのモル比で2：1以上となるようにさらに混合することによって、集合体を得る工程。

【0022】

10．上記部位及びが、同一であることを特徴とする前記第7項から第9項までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体の製造方法。

【0023】

11．上記酵素が、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ又はグルコースオキシダーゼであることを特徴とする前記第7項から第1項0までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体の製造方法。

【0024】

12．下記工程(g)～(l)を含むことを特徴とするアッセイ法；

工程(g)：前記第1項から第6項までのいずれか一項に記載の融合タンパク質含有集合体と検体とを接触させることによって、該検体に含有される標的物質、標的ウイルス又は標的細胞を介して凝集体を形成する工程、

工程(h)：該工程(g)を経て得られた反応物をフィルタに通すことによって、該凝集体のみを単離する工程、

工程(i)：該工程(h)を経て得られた凝集体に、蛍光基質又は消光剤基質を反応させ、それぞれ蛍光色素(E)又は消光剤を生成する工程(ただし、上記工程(g)において、請求項1から請求項6までのいずれか一項に記載の酵素を含む融合タンパク質含有集合体を用いた場合のみ。)、

工程(j)：透明平面基板と、該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と、該金属薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された誘電体からなるスペーサ層、又は該金属薄膜とは接していないもう一方の表面に形成された蛍光色素(F)層とを少なくとも有するプラズモン励起センサの、該スペーサ層表面又は該蛍光色素(F)層表面に、上記工程(h)を経て得られた凝集体又は上記工程(i)を経て得られた蛍光色素(E)又は消光剤を接触させる工程、

10

20

30

40

50

工程 (k) : 該工程 (j) で得られたプラズモン励起センサに、該基板の、該薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズムを経由してレーザー光を照射し、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程、及び

工程 (l) : 該工程 (k) で得られた測定結果から、該標的物質質量、該標的ウイルス量又は該標的細胞量を算出する工程。

【 0 0 2 5 】

1 3 . 上記工程 (g) 及び (h) の免疫反応場、及び上記工程 (j) 及び (k) の S P F S 検出場が、それぞれ独立していることを特徴とする前記第 1 2 項に記載のアッセイ法。

【 0 0 2 6 】

1 4 . 上記金属薄膜が、金、銀、アルミニウム、銅及び白金からなる群から選ばれる少なくとも 1 種の金属から形成されることを特徴とする前記第 1 2 項又は第 1 3 項に記載のアッセイ法。

【 0 0 2 7 】

1 5 . 上記金属が、金からなることを特徴とする前記 1 4 項に記載のアッセイ法。

【 0 0 2 8 】

1 6 . 上記誘電体が、二酸化ケイ素 (S i O ₂) 又は二酸化チタン (T i O ₂) を含むことを特徴とする前記第 1 2 項から第 1 5 項までのいずれか一項に記載のアッセイ法。

【 発明の効果 】

【 0 0 2 9 】

本発明の集合体をアッセイ法に用いると、(1) S P F S 測定用センサ基盤に抗体等を固定化する必要がないことから、抗体等の固定化量に係る問題及び該センサ基盤への非特異的吸着を考慮する必要もなく、(2) 免疫反応場が液液系であることから反応効率が向上し、(3) 免疫反応場と S P F S 検出場との完全分離が可能であることから、免疫反応条件及び検出条件を最適化することができ、さらに散乱ノイズの影響を受けづらく、(4) ホモジニアスかつ極めて高効率な抗体抗原反応を実現することができ、さらに、蛍光シグナルが凝集体として濃縮されるので、通常の S P F S よりも迅速性と感度が飛躍的に向上し、又は(5) 融合タンパク質に固定化されている酵素(この酵素は、蛍光基質を蛍光色素(E) に変換する反応を触媒するか、又は消光剤基質を消光剤に変換する反応を触媒する。)によって、シグナルを増幅することができる。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 0 】

【 図 1 】 蛍光色素を含む融合タンパク質 (I) の一態様の模式図

【 図 2 】 酵素を含む融合タンパク質 (I) の一態様の模式図

【 図 3 】 蛍光色素を含む融合タンパク質 (II) の一態様の模式図

【 図 4 】 酵素を含む融合タンパク質 (II) の一態様の模式図であって、該融合タンパク質 (II) 1 1 に固定化されている酵素 3 b によって蛍光基質 1 3 が加水分解され、蛍光色素 (E) 1 4 に変換される反応を模式的に示す

【 図 5 】 蛍光色素を含む融合タンパク質 (I) 含有集合体の一態様の模式図

【 図 6 】 酵素を含む融合タンパク質 (I) 含有集合体の一態様の模式図

【 図 7 】 標的物質、標的ウイルス又は標的細胞 7 を介して蛍光色素を含む融合タンパク質 (II) 1 2 が互いに会合して形成された凝集体 2 1 の模式図

【 図 8 】 標的物質、標的ウイルス又は標的細胞 7 を介して酵素を含む融合タンパク質 (II) 1 2 が互いに会合して形成された凝集体 2 1 の模式図

【 図 9 】 本発明の蛍光色素を含む融合タンパク質含有集合体に係るアッセイ法を模式的に示した図

【 図 1 0 】 本発明の酵素を含む融合タンパク質含有集合体に係るアッセイ法を模式的に示した図

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 1 】

本発明の融合タンパク質含有集合体は、標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)及び該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質を少なくとも含有するか、又は、

標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質と、該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質とを少なくとも含有することを特徴とする。換言すると、本発明の融合タンパク質含有集合体は、
10 標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)及び該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)のうち少なくとも一方を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質からなる集合体であって、該タンパク質(A)及び(B)を、それぞれ1個以上有することを特徴とする。

【0032】

この特徴は、請求項1から請求項16までの請求項に係る発明に共通する技術的特徴である。なお、本発明においては、本発明に係る「酵素」として、後述するように、「蛍光基質」を「蛍光色素」に変換する反応を触媒する酵素、又は「消光剤基質」を「消光剤」
20 に変換する反応を触媒する酵素を用いることを特徴とする。

【0033】

本発明の実施態様としては、本発明の効果発現の観点から、上記タンパク質にビオチンが固定化され、蛍光色素又は酵素が、該タンパク質、ビオチン及びアビジンのうち少なくとも1つに固定化され、上記融合タンパク質は、該タンパク質(A)及び(B)の合計4個とアビジン1個とを含むことが好ましく、特に上記タンパク質(A)及び(B)それぞれは、抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント又はF(ab')₂フラグメントであることが好ましい。

【0034】

また、上記タンパク質(A)及び(B)は、ともに抗体であり、蛍光色素又は酵素は、該抗体のみに固定化されるか、プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gのみに
30 固定化されるか、あるいは該抗体とプロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gに固定化され、上記融合タンパク質は、該タンパク質(A)及び(B)の合計2~5個と、プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gとを含むことも好ましい。

【0035】

上記部位及びは、同一であってもよい。

【0036】

上記酵素は、アルカリフォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ又はグルコースオキシダーゼであることが好ましい。

【0037】

本発明の融合タンパク質含有集合体の製造方法は、前記工程(a)、(b)及び(c)
40 を含むことを特徴とする。

【0038】

該製造方法において、上記タンパク質(A)及び(B)それぞれは、抗体、Fabフラグメント、Fab'フラグメント又はF(ab')₂フラグメントであることが好ましい。

【0039】

また、本発明の融合タンパク質含有集合体の製造方法は、前記工程(d)及び(e)のうち少なくとも一方と(f)とを含むことを特徴とする。

【0040】

該製造方法において、上記部位及びは、同一であってもよい。

10

20

30

40

50

【0041】

上記酵素は、アルカリフォスファターゼ、 α -ガラクトシダーゼ、 β -グルコシダーゼ又はグルコースオキシダーゼであることが好ましい。

【0042】

本発明のアッセイ法は、下記工程(g)~(l)を含むことを特徴とする。

【0043】

上記工程(g)、(h)の免疫反応場、及び上記工程(j)、(k)のSPFS検出場は、それぞれ独立していることが好ましい。

【0044】

上記金属薄膜は、金、銀、アルミニウム、銅及び白金からなる群から選ばれる少なくとも1種の金属から形成されることが好ましく、該金属は、金からなることがより好ましい。

10

【0045】

上記誘電体は、二酸化ケイ素(SiO_2)又は二酸化チタン(TiO_2)を含むことが好ましい。

【0046】

以下、本発明とその構成要素、及び本発明を実施するための形態・態様について詳細な説明をする。

【0047】

<集合体>

20

本発明の融合タンパク質含有集合体は、標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)及び該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質を少なくとも含有するか、又は、

標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質と、該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含む融合タンパク質とを少なくとも含有することを特徴とする。

30

【0048】

換言すると、本発明の集合体は、「標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)」及び「該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)」のうち少なくとも一方を合計2個以上と「蛍光色素」又は「酵素」とを含む「融合タンパク質」を含有する「集合体」であって、該タンパク質(A)及び(B)を、それぞれ1個以上有することを特徴とするものである。

【0049】

すなわち、本発明の集合体は、このような融合タンパク質を複数個含むものであって、複数個の融合タンパク質が標的物質、標的ウイルス又は標的細胞を介して形成される「凝集体」(後述する。)とは異なる。

40

【0050】

なお、本発明の効果発現を阻害しない限りにおいて、本発明の集合体には、上記の標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する部位とタンパク質との特異的会合を阻害しない何らかの有用物質等を含有させても良い。

【0051】

本発明の集合体に含まれる上記融合タンパク質の濃度は、高い方が望ましく、少なくとも10nM以上が好ましく、100nM以上がより好ましく、1 μ M以上が特に好ましい。

【0052】

50

本発明の集合体に含まれる上記タンパク質(A)及び上記タンパク質(B)は、それぞれ少なくとも1個、好ましくは9:1~1:9、より好ましくは8:2~2:8、さらに好ましくは7:3~3:7、特に好ましくは6:4~4:6、もっとも好ましくは5:5の比で表される。上記タンパク質(A)及び(B)の集合体に含まれる個数が5:5の比に近いほど(同数に近いほど)、凝集体を効率良く安定に形成できることから好ましい。なお、このような態様において、上記タンパク質(A)及び上記タンパク質(B)の集合体に含まれる合計個数は一定とする。

【0053】

(標的物質, 標的ウイルス, 標的細胞)

本発明において、「標的物質」、「標的ウイルス」及び「標的細胞」(以下、これらをまとめて単に「アナライト」ともいう。)それぞれは、タンパク質が特異的に会合(結合)し得る部位を独立して2以上有すれば、物質(単体又は化合物である化学物質)もしくはウイルスである非生物であっても、又は単細胞もしくは多細胞からなる生物であってもよく、特に限定されるものではない。

10

【0054】

「標的物質」としては、例えば、核酸(一本鎖であっても二本鎖であってもよいDNA、RNA、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、PNA(ペプチド核酸)等、又はヌクレオシド、ヌクレオチド及びそれらの修飾分子)、タンパク質(ポリペプチド、オリゴペプチド等)、アミノ酸(修飾アミノ酸も含む。)、糖質(オリゴ糖、多糖類、糖鎖等)、脂質、又はこれらの修飾分子、複合体などが挙げられ、これらの分子は分子断片であつてもよい。さらに具体的には、AFP(フェトプロテイン)等のがん胎児性抗原や腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモンなどであってもよく、特に限定されるものではない。

20

【0055】

「標的ウイルス」としては、例えば、インフルエンザウイルス、肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)など動物に感染するウイルスであっても、植物に感染するウイルスであっても、又は細菌に感染するバクテリオファージであってもよく、特に限定されるものではない。

【0056】

「標的細胞」としては、例えば、ヒトなどの哺乳動物を含む脊椎動物及び無脊椎動物、植物、藻類、菌類、バクテリアなどに由来する細胞をいい、バクテリアとしては、具体的に、細胞壁に多量のミコール酸を含有する結核菌などが挙げられる。

30

【0057】

標的物質、標的ウイルス又は標的細胞が有する、タンパク質が特異的に会合(結合)し得る最小の部位は、2以上あり、かつ完全に独立している(すなわち、1以上の部位、及び該部位とはまったく異なる1以上の部位である。)か、又は該部位と該部位とが同一である。なお、「同一である」とは、完全同一以外にも、部分同一(一部重複)も包含する。

【0058】

ただし、上記部位及びが同一である場合、下記タンパク質(A)及び(B)は同一のものを用いることはできない。

40

【0059】

(タンパク質(A)及び(B))

本発明において、「標的物質、標的ウイルス又は標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)」(以下、単に「タンパク質(A)」ともいう。)は、上述したような標的物質、標的ウイルス又は標的細胞に、それが有する1以上の部位を介して、特異的に会合(結合)するタンパク質であれば特に限定されるものではなく、例えば、種々のモノクローナル抗体(Fabフラグメント、Fab'フラグメント及びF(ab')₂フラグメントも含む。)、MDP1(Myco bacterial DNA-binding protein 1)などが挙げられる。なお、「タンパク質」は、本

50

発明において、ポリペプチドやオリゴペプチドも包含するものとする。

【0060】

また、本発明において、「上記部位 を有する標的物質、標的ウイルス又は標的細胞の1以上の部位 と特異的に会合するタンパク質(B)」(以下、単に「タンパク質(B)」ともいう。)は、上述したような標的物質、標的ウイルス又は標的細胞が1以上の部位及び1以上の部位 を有し、該部位 を介して特異的に会合(結合)するタンパク質であれば特に限定されるものではなく、具体例として、タンパク質(A)と同様の種類のものが挙げられる。

【0061】

(蛍光色素)

本発明において、「蛍光色素」は、所定の励起光を照射して、又は電界効果を利用して、励起することによって蛍光を発光する物質の総称であり、該「蛍光」は、燐光など各種の発光も包含する。

【0062】

本発明で用いられる蛍光色素は、後述する金属薄膜による吸光に起因する消光を受けない限りにおいて、その種類に特に制限はなく、公知の蛍光色素のいずれであってもよい。一般に、単色比色計(monochromometer)よりむしろフィルタを備えた蛍光計の使用をも可能にし、かつ検出の効率を高める大きなストークス・シフトを有する蛍光色素が好ましい。

【0063】

このような蛍光色素としては、例えば、フルオレセイン・ファミリーの蛍光色素(Integrated DNA Technologies社製)、ポリハロフルオレセイン・ファミリーの蛍光色素(アプライドバイオシステムズジャパン(株)製)、ヘキサクロロフルオレセイン・ファミリーの蛍光色素(アプライドバイオシステムズジャパン(株)製)、クマリン・ファミリーの蛍光色素(インビトロジェン(株)製)、ローダミン・ファミリーの蛍光色素(GEヘルスケア バイオサイエンス(株)製)、シアニン・ファミリーの蛍光色素、インドカルボシアニン・ファミリーの蛍光色素、オキサジン・ファミリーの蛍光色素、チアジン・ファミリーの蛍光色素、スクアライン・ファミリーの蛍光色素、キレート化ランタニド・ファミリーの蛍光色素、BODIPY(登録商標)・ファミリーの蛍光色素(インビトロジェン(株)製)、ナフタレンスルホン酸・ファミリーの蛍光色素、ピレン・ファミリーの蛍光色素、トリフェニルメタン・ファミリーの蛍光色素、Alexa Fluor(登録商標)色素シリーズ(インビトロジェン(株)製)などが挙げられ、さらに米国特許番号第6,406,297号、同第6,221,604号、同第5,994,063号、同第5,808,044号、同第5,880,287号、同第5,556,959号及び同第5,135,717号に記載の蛍光色素も本発明で用いることができる。

【0064】

これらファミリーに含まれる代表的な蛍光色素の吸収波長(nm)及び発光波長(nm)を表1に示す。

【0065】

10

20

30

40

【表 1】

蛍光色素	ファミリー	吸収波長 (nm)	発光波長 (nm)
Aminomethylcoumarin ; AMCA	クマリン	350	450
Cy 2 (登録商標)	シアニン	492	510
Fluorescein Isothiocyanate ; FITC	フルオレセイン	492	520
Cy 3 (登録商標)	インドカルボシアニン	550	570
Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate ; TRITC	ローダミン	550	570
Rhodamine Red-X ; RRX	ローダミン	570	590
Texas Red ; TR	ローダミン	596	620
Cy 5 (登録商標)	シアニン	650	670
Alexa Fluor (登録商標) 647	シアニン	650	665

10

【 0 0 6 6 】

また、蛍光色素は、上記有機蛍光色素に限られない。例えば、Eu、Tb等の希土類錯体系の蛍光色素も、本発明に用いられる蛍光色素となりうる。希土類錯体は、一般的に励起波長(310~340nm程度)と発光波長(Eu錯体で615nm付近、Tb錯体で545nm付近)との波長差が大きく、蛍光寿命が数百マイクロ秒以上と長い特徴がある。市販されている希土類錯体系の蛍光色素の一例としては、ATBTA-Eu³⁺が挙げられる。さらに、青色蛍光タンパク質(BFP)、シアン蛍光タンパク質(CFP)、緑色蛍光タンパク質(GFP)、黄色蛍光タンパク質(YFP)、赤色蛍光タンパク質(DsRed)又はAlliophycocyanin(APC; LyoFluogen(登録商標))などに代表される蛍光タンパク質、ラテックスやシリカなどの蛍光微粒子なども、本発明に用いられる蛍光色素となりうる。

20

【 0 0 6 7 】

本発明においては、後述する蛍光測定を行う際に、金属薄膜を形成する金属種による吸光の少ない波長領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用いることが望ましい。例えば、金属薄膜として金を用いる場合には、金による吸光による影響を最小限に抑えるため、最大蛍光波長が600nm以上である蛍光色素を使用することが望ましい。したがって、この場合には、Cy5、Alexa Fluor(登録商標)647等近赤外領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用いることが特に望ましい。このような近赤外領域に最大蛍光波長を有する蛍光色素を用いることは、血液中の血球成分由来の鉄による吸光の影響を最小限に抑えることができる点で、検体として血液を用いる場合においても有用である。一方、金属薄膜として銀を用いる場合には、最大蛍光波長が400nm以上である蛍光色素を使用することが望ましい。

30

【 0 0 6 8 】

これら蛍光色素は1種単独でも、2種以上併用してもよい。

40

【 0 0 6 9 】

(酵素)

本発明においては、本発明に係る「酵素」として、「蛍光基質」を「蛍光色素(E)」に変換する反応を触媒する酵素(C)、又は「消光剤基質」を「消光剤」に変換する反応を触媒する酵素(D)を用いることを特徴とする。

【 0 0 7 0 】

このような酵素(C)としては、例えば、アルカリフォスファターゼ(ALP)、ペルオキシダーゼ(POD)、ガラクトシダーゼ(GAL)などが挙げられる。

【 0 0 7 1 】

また、酵素(D)は、酵素反応(D-1)として、保護基によってブロックされている

50

「消光剤基質」を、酵素反応によって消光剤を活性化したり、酵素反応(D-2)として、特定の「消光剤基質」を用いた酵素反応によって活性化した消光剤によりpHを低下させたりする。

【0072】

酵素(D)のうち、酵素反応(D-1)に用いられるものとしては、例えば、 α -ガラクトシダーゼ(GAL)、 α -グルコシダーゼ(Glu)、アルカリフォスファターゼ(ALP)などが挙げられ、酵素反応(D-2)に用いられるものとしては、例えば、グルコースオキシダーゼ(GOD)などが挙げられる。

【0073】

これら酵素は、1種単独でも、また2種以上併用することもできる。

10

【0074】

なお、「蛍光基質」、「蛍光色素(E)」、「消光剤基質」及び「消光剤」については後述する。

【0075】

〔融合タンパク質〕

本発明の集合体を構成する融合タンパク質は、タンパク質(A)及びタンパク質(B)のうち少なくとも一方を合計2個以上と蛍光色素又は酵素とを含むものであり、以下の融合タンパク質(I)及び(II)が好ましい態様として挙げられる。

【0076】

(融合タンパク質(I))

20

図1及び図2に例示するように、融合タンパク質(I)10は、タンパク質(A)1及びタンパク質(B)2が、ともに抗体であってもよく、該抗体に蛍光色素3a又は酵素3b、及びビオチン4が固定化され(図示していないが、蛍光色素又は酵素は、抗体以外にもビオチン及びノ又はアビジンに固定化することができ、例えば、蛍光色素又は酵素は、抗体、ビオチン及びアビジンに同時に固定化されていてもよい。)、このようなタンパク質(A)1及びタンパク質(B)2の合計4個とアビジン5の1個とを含むものである。

【0077】

なお、図1及び図2に示す融合タンパク質(I)10が有する抗体は、タンパク質(A)1が2個及びタンパク質(B)2が2個であるが、本発明は、この態様に限定されず、タンパク質(A)のみを4個有する態様なども包含される。

30

【0078】

本発明において、アビジンは、ストレプトアビジン、ニュートラアビジンも包含するものとする。

【0079】

(融合タンパク質(II))

図3及び図4に例示するように、融合タンパク質(II)11は、タンパク質(A)1及びタンパク質(B)2が、ともに抗体であり、蛍光色素3a又は酵素3bが、該抗体のFcフラグメントに固定化され(図示していないが、蛍光色素又は酵素は、抗体のFcフラグメント以外にプロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gに固定化することができ、例えば、蛍光色素又は酵素は、抗体のFcフラグメントと、プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gとに同時に固定化されていてもよい。)、タンパク質(A)1及びタンパク質(B)2の合計2個とプロテインA6(図示していないが、プロテインA以外にプロテインG又はプロテインA/Gであってもよい。プロテインG又はプロテインA/Gを用いる場合、会合(結合)し得るタンパク質(A)及びタンパク質(B)は、合計2~5個である。))とを含むものである。

40

【0080】

なお、図3及び図4に示す融合タンパク質(II)11が有する抗体は、それぞれ1個のタンパク質(A)1及びタンパク質(B)2であるが、本発明は、この態様に限定されず、タンパク質(A)1のみからなる態様なども包含される。

【0081】

50

本発明において、プロテイン A 及びプロテイン G は天然型であっても組換え型であってもよい。

【0082】

これら融合タンパク質のうち、後述する凝集体を効率良く安定に形成できることから、融合タンパク質が有するタンパク質 (A) 及びタンパク質 (B) の合計個数が多い (すなわち、濃度が高い) ものほど好ましい。

【0083】

<集合体の製造方法>

本発明の集合体の製造方法は、以下の製造方法 (i) ~ (iv) のいずれかの態様を有し、製造方法 (i) は、下記工程 (a)、(b) 及び (c) を含み；製造方法 (ii) は、下記工程 (d)、(e) 及び (f) を含み；製造方法 (iii) は、下記工程 (d) 及び (f) を含み；製造方法 (iv) は、下記工程 (e) 及び (f) を含むことを特徴とするものである。

10

【0084】

工程 (a)：標的物質、標的ウイルス又は標的細胞が有する 1 以上の部位 と特異的に会合するタンパク質 (A) 及び該部位 を有する標的物質、標的ウイルス又は標的細胞の 1 以上の部位 と特異的に会合するタンパク質 (B) からなるタンパク質、ビオチンならびにアビジンのうち少なくとも 1 つに蛍光色素又は酵素を固定化する工程。

【0085】

工程 (b)：蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよい上記タンパク質 (A) 及び (B) それぞれに、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいビオチンを固定化することによって、ビオチン化タンパク質 (A) 及び (B) を得る工程。

20

【0086】

工程 (c)：蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいビオチン化タンパク質 (A) 及び (B) を、それぞれ 1 個以上含むように混合し、該ビオチン化タンパク質 (A) 及び (B) の合計に対して、蛍光色素又は酵素に固定化されていてもよいアビジンを、そのモル比で 4 : 1 以上となるようにさらに混合することによって、集合体を得る工程。

【0087】

工程 (d)：標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する 1 以上の部位 と特異的に会合する抗体 (A) 及び該部位 を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の 1 以上の部位 と特異的に会合する抗体 (B) それぞれに蛍光色素又は酵素を固定化する工程。

30

【0088】

工程 (e)：プロテイン A、プロテイン G 又はプロテイン A / G に蛍光色素又は酵素を固定化する工程。

【0089】

工程 (f)：蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよい抗体 (A) 及び (B) を、それぞれ 1 個以上含むように混合し、該抗体 (A) 及び (B) の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいプロテイン A、プロテイン G 又はプロテイン A / G を、そのモル比で 2 : 1 以上となるようにさらに混合することによって、融合タンパク質含有集合体を得る工程。

40

【0090】

〔製造方法 (i)〕

製造方法 (i) は、上記工程 (a)、(b) 及び (c) を含むものであって、タンパク質 ((A), (B))、ビオチン及びアビジンのうち少なくとも 1 つに蛍光色素又は酵素が固定化されている融合タンパク質 (I) 含有集合体を製造する方法である。

【0091】

該タンパク質 (A) 及び (B) それぞれは、抗体 (免疫グロブリン)、F a b フラグメント、F a b ' フラグメント及び F (a b ') フラグメントのいずれかであることが好ましい。

50

【0092】

(工程(a))

工程(a)とは、「標的物質、標的ウイルス又は標的細胞が有する1以上の部位」と特異的に会合するタンパク質(A)」(タンパク質(A))、及び「該部位を有する標的物質、標的ウイルス又は標的細胞の1以上の部位」と特異的に会合するタンパク質(B)」(タンパク質(B))からなるタンパク質、ビオチンならびにアビジンのうち少なくとも1つに「蛍光色素」又は「酵素」を固定化する工程である。

【0093】

タンパク質(A)及び(B)、ならびに「蛍光色素」及び「酵素」は、上記<集合体>の項目内で記載したものと同様である。なお、上記工程(b)、(d)及び(e)に記載のこれらの用語についても同様である。

10

【0094】

タンパク質((A)及び(B))、ビオチン及び/又はアビジンに酵素を固定化する方法として、例えば、アミンカップリングする方法、チオールカップリングする方法、アルデヒドカップリングする方法などが挙げられるが、本発明はこれらの方法に限定されない。

【0095】

タンパク質(A)、(B)に蛍光色素又は酵素を固定化する際、タンパク質(A)、(B)が、抗体である場合、蛍光色素又は酵素は、好ましくは定常領域(C_H1 及び C_L)、より好ましくはFcフラグメントに固定化し、タンパク質(A)、(B)が、Fabフラグメント、Fab'フラグメント又は $F(ab')_2$ フラグメントである場合、蛍光色素又は酵素は、定常領域(C_H1 及び C_L)に固定化することが好ましい。

20

【0096】

このようにしてタンパク質(A)、タンパク質(B)、ビオチン及びアビジンに蛍光色素又は酵素を固定化したものを、それぞれ「蛍光色素又は酵素標識タンパク質(A)」、「蛍光色素又は酵素標識タンパク質(B)」、「蛍光色素又は酵素標識ビオチン」及び「蛍光色素又は酵素標識アビジン」ともいう。

【0097】

(工程(b))

工程(b)とは、「蛍光色素」又は「酵素」が固定化されていてもよい「標的物質、標的ウイルス又は標的細胞が有する1以上の部位」と特異的に会合するタンパク質(A)」及び「該部位を有する標的物質、標的ウイルス又は標的細胞の1以上の部位」と特異的に会合するタンパク質(B)」それぞれに、「蛍光色素」又は「酵素」が固定化されていてもよいビオチンを固定化することによって、「ビオチン化タンパク質(A)」及び「ビオチン化タンパク質(B)」を得る工程である。なお、「蛍光色素」又は「酵素」は、タンパク質(A)、(B)及びビオチンに同時に固定化されていてもよい。

30

【0098】

すなわち、工程(b)とは、(1)蛍光色素又は酵素標識タンパク質(A)、(B)にビオチンを固定化する工程；(2)タンパク質(A)、(B)に蛍光色素又は酵素標識ビオチンを固定化する工程；(3)タンパク質(A)、(B)にビオチンを固定化する工程；(4)蛍光色素又は酵素標識抗体(A)、(B)に蛍光色素又は酵素標識ビオチンを固定化する工程のいずれかである。

40

【0099】

タンパク質にビオチンを固定化する方法として、例えば、アミンカップリングする方法、チオールカップリングする方法、アルデヒドカップリングする方法などが挙げられるが、タンパク質及びビオチンのいずれかに酵素が固定化されている場合であっても、本発明はこれらの方法に限定するものではない。

【0100】

タンパク質(A)、(B)が、抗体である場合、ビオチンは、好ましくは定常領域(C_H1 及び C_L)、より好ましくはFcフラグメントに固定化し、タンパク質(A)、(B)

50

）が、Fabフラグメント、F(ab')フラグメント又はF(ab')₂フラグメントである場合、ビオチンは、定常領域(C_H1及びC_L)に固定化することが好ましい。

【0101】

このようにしてタンパク質(A)及びタンパク質(B)それぞれにビオチンを固定化したものを、それぞれ「ビオチン化タンパク質(A)」及び「ビオチン化タンパク質(B)」ともいう。

【0102】

(工程(c))

工程(c)とは、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいビオチン化タンパク質(A)及び(B)を、それぞれ1個以上含むように混合し、該ビオチン化タンパク質(A)及び(B)の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいアビジンを、そのモル比で4:1以上となるようにさらに混合することによって、集合体を得る工程である。

10

【0103】

すなわち、工程(c)は、上記工程(b)を経て得られた、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいビオチン化タンパク質(A)及び(B)を、それぞれ少なくとも1個、好ましくは9:1~1:9、より好ましくは8:2~2:8、さらに好ましくは7:3~3:7、特に好ましくは6:4~4:6、もっとも好ましくは5:5の比で含むように混合し、該ビオチン化タンパク質(A)及び(B)の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいアビジンを、そのモル比で4:1以上、好ましくは4:1となるようにさらに混合することによって、図1及び図2に示すような融合タンパク質(I)含有集合体を得る工程である。

20

【0104】

該ビオチン化タンパク質(A)と(B)との個数の比、及び該ビオチン化タンパク質(A)、(B)と該アビジンとのモル比が上記範囲内であると、凝集体を効率良く安定に形成できることから好ましい。

【0105】

(製造方法(ii))

製造方法(ii)は、上記工程(d)、(e)及び(f)を含むものであって、抗体(好ましくは抗体の定常領域(C_H1及びC_L)、より好ましくは抗体のFcフラグメント)と、プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gとに蛍光色素又は酵素が固定化されている融合タンパク質(II)含有集合体を製造する方法である。

30

【0106】

(工程(d))

工程(d)とは、「標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合する抗体(A)」及び「該部位を有する標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞の1以上の部位と特異的に会合する抗体(B)」それぞれに「蛍光色素」又は「酵素」を固定化する工程である。

【0107】

該抗体(A)及び(B)のそれぞれに蛍光色素又は酵素を固定化する方法は、上記工程(a)に記載のタンパク質への固定化方法と同様である。

40

【0108】

該抗体(A)及び(B)に蛍光色素又は酵素を固定化したものを、それぞれ「蛍光色素又は酵素標識抗体(A)」及び「蛍光色素又は酵素標識抗体(B)」ともいう。

【0109】

(工程(e))

工程(e)とは、「プロテインA、プロテインG又はプロテインA/G」に「蛍光色素」又は「酵素」を固定化する工程である。

【0110】

「プロテインA、プロテインG又はプロテインA/G」は上述した通りである。

50

【0111】

プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gに蛍光色素又は酵素を固定化する方法として、例えば、アミンカップリングする方法、チオールカップリングする方法、アルデヒドカップリングする方法などが挙げられるが、本発明はこれらの方法に限定するものではない。

【0112】

このようにプロテインA、プロテインG及びプロテインA/Gそれぞれに蛍光色素又は酵素を固定化したものを、「蛍光色素又は酵素標識プロテインA」、「蛍光色素又は酵素標識プロテインG」及び「蛍光色素又は酵素標識プロテインA/G」ともいう。

【0113】

(工程(f))

工程(f)とは、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよい抗体(A)及び(B)を、それぞれ1個以上含むように混合し、該抗体(A)及び(B)の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいプロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gを、そのモル比で2:1以上となるようにさらに混合することによって、集合体を得る工程である。

【0114】

すなわち、工程(f)とは、該抗体(A)及び(B)を、それぞれ少なくとも1個、好ましくは9:1~1:9、より好ましくは8:2~2:8、さらに好ましくは7:3~3:7、特に好ましくは6:4~4:6、もっとも好ましくは5:5の比で含むように混合し、該抗体(A)及び(B)の合計に対して、蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいプロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gを、そのモル比で2:1以上、好ましくは2:1となるようにさらに混合することによって、図3及び図4に示すような融合タンパク質(II)含有集合体を得る工程である。

【0115】

蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよい抗体(A)と(B)との個数の比、及び該抗体(A)、(B)と蛍光色素又は酵素が固定化されていてもよいプロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gとのモル比が上記範囲内であると、凝集体を効率良く安定に形成できることから好ましい。

【0116】

[製造方法(iii)]

製造方法(iii)は、上記工程(d)及び(f)を含むものであって、抗体(好ましくは抗体の定常領域(C_H1及びC_L)、より好ましくは抗体のFcフラグメント)のみに蛍光色素又は酵素が固定化されている融合タンパク質(II)含有集合体を製造する方法である。

【0117】

[製造方法(iv)]

製造方法(iv)は、上記工程(e)及び(f)を含むものであって、プロテインA、プロテインG又はプロテインA/Gのみに蛍光色素又は酵素が固定化されている融合タンパク質(II)含有集合体を製造する方法である。

【0118】

<アッセイ法>

本発明のアッセイ法は、下記工程(g)~(l)を含むことを特徴とするものである。

【0119】

工程(g):本発明の集合体と検体とを接触させることによって、該検体に含有される標的物質、標的ウイルス又は標的細胞を介して凝集体を形成する工程。

【0120】

工程(h):上記工程(g)を経て得られた反応物をフィルタに通すことによって、該凝集体のみを単離する工程。

【0121】

10

20

30

40

50

工程 (i) : 上記工程 (h) を経て得られた凝集体に、蛍光基質又は消光剤基質を反応させ、それぞれ蛍光色素 (E) 又は消光剤を生成する工程 (ただし、上記工程 (g) において酵素を含む融合タンパク質含有集合体を用いた場合のみ。) 。

【 0 1 2 2 】

工程 (j) : 透明平面基板と、該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と、該金属薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された誘電体からなるスペーサ層、又は該金属薄膜とは接していないもう一方の表面に形成された蛍光色素 (F) 層とを少なくとも有するプラズモン励起センサの、該スペーサ層表面又は該蛍光色素 (F) 層表面に、上記工程 (h) を経て得られた凝集体又は上記工程 (i) を経て得られた蛍光色素 (E) 又は消光剤を接触させる工程。

10

【 0 1 2 3 】

工程 (k) : 上記工程 (j) で得られたプラズモン励起センサに、該基板の、該薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズムを経由してレーザー光を照射し、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程。及び、

工程 (l) : 上記工程 (k) で得られた測定結果から、上記標的物質質量、上記標的ウイルス量又は上記標的細胞量を算出する工程。

【 0 1 2 4 】

本発明のアッセイ法は、上記工程 (g) , (h) の免疫反応場、及び上記工程 (j) , (k) の S P F S 検出場をそれぞれ独立することができ、免疫反応条件及び検出条件の最適化をすることができることから好適である。

20

【 0 1 2 5 】

〔 工程 (g) 〕

工程 (g) とは、本発明の「集合体」と「検体」とを「接触」させることによって、該検体に含有される標的物質、標的ウイルス又は標的細胞を介して「凝集体」を形成する工程である。

【 0 1 2 6 】

本発明の「集合体」は上述した通りであって、例えば、図 5 及び図 6 に示す集合体 2 0 のように、融合タンパク質 (I) 1 0 が複数個存在するものを言う。

【 0 1 2 7 】

(検体)

「検体」としては、例えば、血液 (血清・血漿)、尿、鼻孔液、唾液、便、体腔液 (髄液、腹水、胸水等) などが挙げられ、所望の溶媒、緩衝液等に適宜希釈して用いてもよい。これら検体のうち、血液、血清、血漿、尿、鼻孔液及び唾液が好ましい。

30

【 0 1 2 8 】

(接触)

集合体と検体とを接触させる条件として、温度は、通常 4 ~ 5 0 、好ましくは 1 0 ~ 4 0 、時間としては、通常 0 . 5 ~ 1 8 0 分間、好ましくは 5 ~ 6 0 分間である。

【 0 1 2 9 】

(凝集体)

本発明において、「凝集体」とは、例えば、図 7 及び図 8 に示すように、融合タンパク質 (II) 1 2 同士が、標的物質、標的ウイルス又は標的細胞 7 に会合 (結合) して形成された高分子量体であり、図 7 及び図 8 に示すように、融合タンパク質 (I) 1 0 含有集合体 2 0 と検体とを免疫反応場において接触させることによって凝集体 2 1 を製造することができる。

40

【 0 1 3 0 】

〔 工程 (h) 〕

工程 (h) とは、上記工程 (g) を経て得られた「反応物」を「フィルタ」に通すことによって、上記凝集体のみを単離する工程である。

【 0 1 3 1 】

(反応物)

50

「反応物」とは、上記工程（g）を経て得られたものであり、図9及び図10に示すように、標的物質、標的ウイルス又は標的細胞7のうち、例えば、検体が標的細胞を含む血液である場合、「反応物」とは、凝集体21と、未反応の融合タンパク質（II）12と、標的細胞が除かれた検体（これは、検体に含まれる標的細胞が、融合タンパク質（II）12と会合し、凝集体21を形成したため、検体から標的細胞のみが特異的に除かれた。）とを含む。

【0132】

（フィルタ）

本発明で用いるフィルタは、本発明の融合タンパク質、標的物質、標的ウイルス又は標的細胞それぞれ単体ではトラップしないが、凝集体をトラップするものであれば特に限定するものではなく、標的物質1個を介して融合タンパク質が2個以上連なった凝集体をトラップするものが好ましい。市販品としては、例えば、ワットマン（株）製の「アノポア、孔径：0.02（ μm ）」などが好適である。

10

【0133】

〔工程（i）〕

工程（i）とは、上記工程（g）において酵素を含む融合タンパク質含有集合体を用いた場合、上記工程（h）を経て得られた凝集体に、「蛍光基質」又は「消光剤基質」を反応させ、それぞれ「蛍光色素（E）」又は「消光剤」を生成する工程である。

【0134】

さらに該工程（i）は、蛍光色素（E）又は消光剤が生成した後に、該凝集体と蛍光色素（E）又は消光剤との混合物から、上記フィルタによって蛍光色素（E）のみ又は消光剤のみを単離することが好ましい。

20

【0135】

（蛍光基質）

本発明で用いられる「蛍光基質」とは、それ自体は蛍光を発することはなく、上記融合タンパク質に固定化されている酵素（C）によって加水分解され蛍光色素（E）に変換されるものであれば、本発明は特に限定するものではなく、例えば、表2に記載のNo. 1～8などを用いることができる。

【0136】

これら蛍光基質のうち、下記「プラズモン励起センサ」が含む金属薄膜が、金を含む金属から形成されている場合、金の透過率や励起波長の観点から、表2中No. 7の1, 3-dichloro-9, 9-dimethyl-acridine-2-one-7-yl phosphate (DDAO phosphate) (Molecular Probes社製) が好ましい。

30

【0137】

蛍光基質の自家蛍光波長は、自家蛍光波長と蛍光色素（E）の蛍光波長との差が大きいほどバックグラウンドシグナルの影響を回避しやすく高精度な測定が可能となるが、特に制限されるものではない。

【0138】

（蛍光色素（E））

本発明において、「蛍光色素（E）」は、所定の励起光を照射する、又は電界効果を利用して励起することによって蛍光を発光する物質の総称であり、該「蛍光」は、燐光など各種の発光も包含する。

40

【0139】

本発明で用いられる蛍光色素（E）は、上記融合タンパク質に固定化されている酵素（C）によって前述の蛍光基質が加水分解されたものであり、後述する金属薄膜による吸光に起因する消光を受けない限りにおいて、その種類に特に制限はなく、公知の蛍光色素のいずれであってもよい。一般に、単色比色計（monochromometer）よりむしろフィルタを備えた蛍光計の使用をも可能にし、かつ検出の効率を高める大きなストークス・シフトを有する蛍光色素が好ましい。

50

【 0 1 4 0 】

表 2 に、本発明に用いられる蛍光基質の例を示す。

【 0 1 4 1 】

【表 2】

No.	蛍光基質	酵素 (C)	得られる蛍光色素(E)			製造会社
			種類	最大吸収波長 (nm)	最大蛍光波長 (nm)	
1	QuantaBlu(登録商標)Fluorogenic Peroxidase Substrate	POD	QuantaBlu	325	420	Pierce社
2	Amplex(登録商標)Red (10-acetyl-3,7-dihydroxyphenoxazine)	POD	Resorufine	563	587	Molecular Probes社
3	3-p-Hydroxyphenyl propionic acid(HPPA)	POD	HPPAのダイマー	323	410	-
4	TokyoGreen(登録商標)-β Gl	β Glu	TG(TokyoGreen)	492	510	積水メデイカル(株)社
5	4-Methylumbelliperyl-β-D-galactoside	β GAL	4-MU (4-methylumbelliferon)	330	453	-
6	4-Methylumbelliperylphosphate	ALP	4-MU	330	453	-
7	1,3-dichloro-9,9-dimethyl-acridine-2-one-7-yl phosphate(DDAO Phosphate)	ALP	DDAO	647	656	Molecular Probes社
8	AttoPhos(登録商標)	ALP	BET	482	560	Boehringer Mannheim社

10

20

30

40

【 0 1 4 2 】

(消光剤基質 / 消光剤)

上記「酵素反応(D-1)」に用いられ得る - ガラクトシダーゼ (GAL) は、 「 50

消光剤基質」であるTG - GalからGalを脱離させ、「消光剤」であるTokyo Green (TG)を生成する反応を触媒する。

【0143】

また、 α -グルコシダーゼ (Glu)は、「消光剤基質」であるTG - GluからGluを脱離させ、「消光剤」であるTGを生成する反応を触媒する。

【0144】

なお、遊離のTGは励起波長が490nmであり、蛍光波長が475~495nmである蛍光色素(F)とFluorescence Resonance Energy Transfer (FRET; 蛍光共鳴エネルギー移動)を起すので、蛍光色素(F)であるテルビウム(Tb)キレート(蛍光波長:495nm)又は強化シアン蛍光タンパク質(Enhanced Cyan Fluorescence Protein; ECFP)(蛍光波長:475nm)などの蛍光を消光することができる。

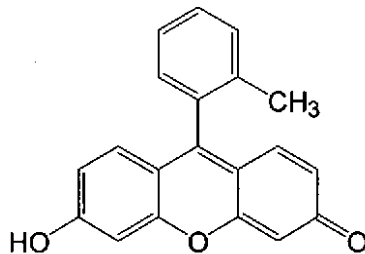
10

【0145】

また、TGは、本発明において、下記式で表される2-Me TGや、

【0146】

【化1】



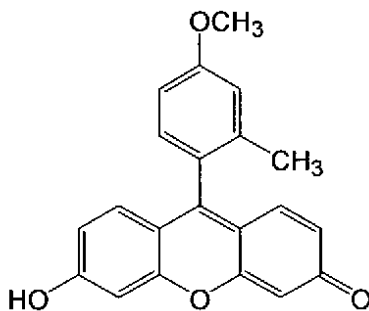
20

【0147】

下記式で表される2-Me-4-OMe TGなども包含する。

【0148】

【化2】



30

【0149】

アルカリフォスファターゼ(ALP)は、「消光剤基質」であるAttoPhos(登録商標)基質を加水分解する反応を触媒し、「消光剤」であるBBT(2-[2-benzthiazoyl]-6-hydroxyl-benzthiazole)を生成させる。ここで、蛍光色素(F)でもあるBBT(励起波長482nm)は、上述のTGと同様、テルビウム(Tb)キレート又はECFPとFRETを起し、それぞれ消光することができる。

40

【0150】

上記「酵素反応(D-2)」に用いられ得るグルコースオキシダーゼ(GOD)は、グルコースを「消光剤基質」とする酵素反応により、「消光剤」であるグルコノラクトンと過酸化水素とを生成する。生成した過酸化水素は、過酸化水素が溶解した水系溶液のpHを低下させ、蛍光色素(F)として用いている2-Me-4-OMe TG、2-OMe-5-Me TG又は2-OMe TGなどの蛍光強度が小さくする(すなわち消光する)ことができる。

50

【 0 1 5 1 】

本発明において、消光剤基質、酵素、消光剤及び蛍光色素（F）の好ましい組み合わせとして、下表3に示すものが挙げられる。

【 0 1 5 2 】

【表3】

No.	消光剤基質	酵素(D)	消光剤	蛍光色素(F)
1	TG-βGal	βGAL	TG	テルビウム(Tb)キレート、ECFPなど
2	TG-βGlu	βGlu	TG	テルビウム(Tb)キレート、ECFPなど
3	AttoPhos(登録商標)基質	ALP	BBT	テルビウム(Tb)キレート、ECFPなど
4	グルコース、酸素	GOD	過酸化水素	2-Me-4-OMe TGなど

10

【 0 1 5 3 】

このような消光剤基質の送液中の濃度は、0.001~10,000 μg/mLが好ましく、1~1,000 μg/mLがより好ましい。

【 0 1 5 4 】

送液を循環させる温度、時間及び流速は、それぞれ上記工程（g）の場合と同様である。

【 0 1 5 5 】

〔工程（j）〕

工程（j）とは、「透明平面基板」と、該基板の一方の表面に形成された「金属薄膜」と、該金属薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された「誘電体からなるスペーサ層」、又は該金属薄膜とは接していないもう一方の表面に形成された「蛍光色素（F）層」とを少なくとも有するプラズモン励起センサの、該スペーサ層表面又は該蛍光色素（F）層表面に、上記工程（h）を経て得られた凝集体又は上記工程（i）を経て得られた蛍光色素（E）又は消光剤を「接触」させる工程である。

20

【 0 1 5 6 】

より詳細には、工程（j）とは、「透明平面基板」と、該基板の一方の表面に形成された「金属薄膜」と、該金属薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された「誘電体からなるスペーサ層」とを少なくとも有するプラズモン励起センサの、該スペーサ層表面に、上記工程（h）を経て得られた凝集体又は上記工程（i）を経て得られた蛍光色素（E）を「接触」させる工程、又は

30

工程（j）とは、「透明平面基板」と、該基板の一方の表面に形成された「金属薄膜」と、該金属薄膜とは接していないもう一方の表面に形成された「蛍光色素（F）層」とを少なくとも有するプラズモン励起センサの、該蛍光色素（F）層表面に、上記工程（i）を経て得られた消光剤を「接触」させる工程である。

【 0 1 5 7 】

なお、後者の工程（j）において、プラズモン励起センサは、「金属薄膜」と「蛍光色素（F）層」との間に、前者の工程（j）に含まれる「誘電体からなるスペーサ層」を有していてもよい。

40

【 0 1 5 8 】

（透明平面基板）

本発明で用いられる「透明平面基板」としては、石英製やガラス製であっても、ポリカーボネート（PC）、シクロオレフィンポリマー（COP）などのプラスチック製であってもよく、屈折率〔nd〕が好ましくは1.40~2.20であり、厚さが好ましくは0.01~10mm、より好ましくは0.5~5mmであれば、大きさ（縦×横）は特に限定されない。

【 0 1 5 9 】

なお、ガラス製の透明平面基板は、市販品として、ショット日本（株）製の「BK7」（屈折率〔nd〕1.52）及び「LaSFN9」（屈折率〔nd〕1.85）、（株）

50

住田光学ガラス製の「K - P S F n 3」(屈折率〔nd〕1.84)、「K - L a S F n 17」(屈折率〔nd〕1.88)及び「K - L a S F n 22」(屈折率〔nd〕1.90)、(株)オハラ製の「S - L A L 10」(屈折率〔nd〕1.72)などが光学的特性と洗浄性との観点から好ましい。

【0160】

透明平面基板は、その表面に金属突起を形成する前に、その表面を酸及び/又はプラズマにより洗浄することが好ましい。

【0161】

酸による洗浄処理としては、0.001~1Nの塩酸中に、1~3時間浸漬することが好ましい。

10

【0162】

プラズマによる洗浄処理としては、例えば、プラズマドライクリーナー(ヤマト科学(株)製の「P D C 200」)中に、0.1~30分間浸漬させる方法が挙げられる。

【0163】

(金属薄膜)

上記透明平面基板の一方の表面に形成された「金属薄膜」としては、好ましくは、金、銀、アルミニウム、銅、及び白金からなる群から選ばれる少なくとも1種の金属からなり、より好ましくは金からなることが望ましく、これら金属の合金であってもよい。このような金属種は、酸化に対して安定であり、かつ表面プラズモンによる電場増強が大きくなることから好適である。

20

【0164】

なお、透明平面基板としてガラス製平面基板を用いる場合に限り、ガラスと金属薄膜とをより強固に接着することができることから、あらかじめクロム、ニッケルクロム合金又はチタンの薄膜を形成することが好ましい。

【0165】

透明平面基板上に金属薄膜を形成する方法としては、例えば、スパッタリング法、蒸着法(抵抗加熱蒸着法、電子線蒸着法等)、電解メッキ、無電解メッキ法などが挙げられる。薄膜形成条件の調整が容易なことから、スパッタリング法又は蒸着法によりクロムの薄膜及び/又は金属薄膜を形成することが好ましい。

【0166】

金属薄膜の厚さとしては、金:5~500nm、銀:5~500nm、アルミニウム:5~500nm、銅:5~500nm、白金:5~500nm、及びそれらの合金:5~500nmが好ましく、クロムの薄膜の厚さとしては、1~20nmが好ましい。

30

【0167】

電場増強効果の観点から、金:20~70nm、銀:20~70nm、アルミニウム:10~50nm、銅:20~70nm、白金:20~70nm、及びそれらの合金:10~70nmがより好ましく、クロムの薄膜の厚さとしては、1~3nmがより好ましい。

【0168】

金属薄膜の厚さが上記範囲内であると、表面プラズモンが発生し易いので好適である。また、このような厚さを有する金属薄膜であれば、大きさ(縦×横)は特に限定されない。

40

【0169】

(誘電体からなるスペーサ層)

「誘電体からなるスペーサ層」の形成に用いられる誘電体としては、光学的に透明な各種無機物、天然又は合成ポリマーを用いることもできる。その中で、化学的安定性、製造安定性及び光学的透明性に優れていることから、二酸化ケイ素(SiO_2)又は二酸化チタン(TiO_2)を含むことが好ましい。

【0170】

誘電体からなるスペーサ層の厚さは、通常10nm~1mmであり、共鳴角安定性の観点からは、好ましくは30nm以下、より好ましくは10~20nmである。一方、電場

50

増強の観点から、好ましくは200nm～1mmであり、さらに電場増強の効果の安定性から、400nm～1,600nmがより好ましい。

【0171】

誘電体からなるスペーサ層の形成方法としては、例えば、スパッタリング法、電子線蒸着法、熱蒸着法、ポリシラザン等の材料を用いた化学反応による形成方法、又はスピノータによる塗布などが挙げられる。

【0172】

(蛍光色素(F)層)

「蛍光色素(F)層」とは、上記金属薄膜の、上記透明平面基板とは接していないもう一方の表面に、蛍光色素(F)を固定化した層であって、(1)蛍光色素(F)とポリマーとを含有する組成物を該金属薄膜上に塗工することによって形成することもでき、(2)アルカンチオールなどからなるSAM(自己組織化単分子膜; Self-Assembled Monolayer)を介して、蛍光色素(F)を該金属薄膜上に結合することによって形成することもできる。

10

【0173】

(1)の場合、蛍光色素(F)とポリマーとは化学的結合をしても、していなくてもよく、また重合性基を有するアルカンチオールなどからなるSAMを金属薄膜に結合させて、他の重合性モノマー、蛍光色素(F)及び重合開始剤を加えて共重合させることにより蛍光色素(F)とポリマーとを含有する組成物を形成することもできる。

【0174】

(2)の場合、アミノ基又はカルボキシル基を有するアルカンチオールと、それらの基と反応して共有結合する基を有する蛍光色素(F)とを結合することによって、蛍光色素(F)を金属薄膜に固定化することができる。なお、蛍光色素(F)層と金属薄膜との間に誘電体からなるスペーサ層を設ける場合、従来公知のシランカップリング剤を介して該スペーサ層と蛍光色素(F)とを結合することができる。

20

【0175】

このように、蛍光色素(F)とポリマーとを含有してなる層を形成する(1)の場合は、固定化できる蛍光色素(F)量が多く、得られる層の強度が高いことから好ましい。

【0176】

「蛍光色素(F)」も蛍光色素(E)と同様に、本発明において、所定の励起光を照射する、又は電界効果を利用して励起することによって蛍光を発光する物質の総称であり、該「蛍光」は、燐光など各種の発光も含む。

30

【0177】

本発明で用いられる「蛍光色素(F)」としては、例えば、テルビウム(Tb)キレート(蛍光波長:490nm)、強化シアン蛍光タンパク質(ECFP)(蛍光波長:475nm)、2-Me-4-OMe TG、2-OMe-5-Me TG、2-OMe TGなどが挙げられる。

【0178】

このような蛍光色素(F)は、水溶性が高いものが多く、これら蛍光色素(F)を蛍光色素(F)層としてポリマー中に分子間相互作用で固定化するためには、蛍光色素(F)が有するカルボキシル基に、疎水性の芳香族環が有するアミノ基やアルコールを反応させて水に不溶性の構造にするか、又は疎水性ポリマーと蛍光色素(F)の活性エステルとの反応によって化学的に結合する必要がある。ポリマーと蛍光色素(F)とが化学的な結合を有しない場合、ポリマーの溶解パラメータ(Solubility Parameter; SP)に近い構造となるように蛍光色素(F)を修飾することが好ましい。

40

【0179】

これら蛍光色素(F)は1種単独でも、2種以上併用してもよい。

【0180】

(接触)

プラズモン励起センサの、誘電体からなるスペーサ層表面又は蛍光色素(F)層表面に

50

、上記工程 (h) を経て得られた凝集体又は上記工程 (i) を経て得られた蛍光色素 (E) 又は消光剤を「接触」させる方法としては、例えば、単離した蛍光色素 (E) 又は消光剤を含有した溶液の滴下、吹付、塗布などの方法が挙げられる。また、プラズモン励起センサに後述する流路を形成し、蛍光色素 (E) 又は消光剤を含有した溶液をプラズモン励起センサ表面に接触させるような方法も挙げられる。

【 0 1 8 1 】

「流路」とは、微量な薬液の送達を効率的に行うことができ、反応促進を行うために送液速度を変化させたり、循環させたりすることができる角筒状又は円筒 (管) 状のものであって、プラズモン励起センサを設置する個所近傍は角筒状構造を有することが好ましく、薬液を送達する個所近傍は円筒 (管) 状を有することが好ましい。

10

【 0 1 8 2 】

その材料としては、プラズモン励起センサ部ではメチルメタクリレート、スチレン等を原料として含有するホモポリマー又は共重合体；ポリエチレン、ポリオレフィン等からなり、薬液送達部ではシリコンゴム、テフロン (登録商標)、ポリエチレン、ポリプロピレン等のポリマーを用いる。

【 0 1 8 3 】

プラズモン励起センサ部においては、凝集体との接触効率を高め、拡散距離を短くする観点から、プラズモン励起センサ部の流路の断面として、縦 × 横がそれぞれ独立に 1 0 0 n m ~ 1 m m 程度が好ましい。

【 0 1 8 4 】

流路にプラズモン励起センサを固定する方法としては、小規模ロット (実験室レベル) では、まず、該プラズモン励起センサの誘電体からなるスペーサ層が形成されている表面に、流路高さ 0 . 5 m m を有するポリジメチルシロキサン (P D M S) 製シートを該プラズモン励起センサの金属薄膜が形成されている部位を囲むようにして圧着し、次に、該ポリジメチルシロキサン (P D M S) 製シートと該プラズモン励起センサとをビス等の閉め具により固定する方法が好ましい。

20

【 0 1 8 5 】

工業的に製造される大ロット (工場レベル) では、流路にプラズモン励起センサを固定する方法として、プラスチックの一体成形品に金基板を形成、又は別途作製した金基板を固定し、金表面に誘電体層又は蛍光色素 (F) 層形成と、リガンド固定化とを行った後、流路の天板に相当するプラスチックの一体成形品により蓋をすることで製造できる。必要に応じてプリズムを流路に一体化することもできる。

30

【 0 1 8 6 】

「送液」としては、検体を希釈した溶媒又は緩衝液と同じものが好ましく、例えば、リン酸緩衝生理食塩水 (P B S)、トリス緩衝生理食塩水 (T B S) などが挙げられるが、特に限定されるものではない。

【 0 1 8 7 】

送液を循環させる温度及び時間としては、検体の種類などにより異なり、特に限定されるものではないが、通常 2 0 ~ 4 0 ° C × 1 ~ 6 0 分間、好ましくは 3 7 ° C × 5 ~ 1 5 分間である。

40

【 0 1 8 8 】

送液中の凝集体の初期濃度は、1 0 0 µ g / m L ~ 0 . 0 0 1 p g / m L であってもよい。

【 0 1 8 9 】

送液の総量、すなわち流路の容積としては、通常 0 . 0 0 1 ~ 2 0 m L、好ましくは 0 . 1 ~ 1 m L である。

【 0 1 9 0 】

送液の流速は、通常 1 ~ 2 , 0 0 0 µ L / m i n、好ましくは 5 ~ 5 0 0 µ L / m i n である。

【 0 1 9 1 】

50

〔工程（k）〕

工程（k）とは、上記工程（j）で得られたプラズモン励起センサに、該基板の、該薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズムを経由してレーザ光を照射し、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を測定する工程である。

【0192】

（光学系）

本発明のアッセイ法で用いる光源は、金属薄膜にプラズモン励起を生じさせることができるものであれば、特に制限がないものの、波長分布の単一性及び光エネルギーの強さの点で、レーザ光を光源として用いることが好ましい。レーザ光は、光学フィルタを通して、プリズムに入射する直前のエネルギー及びフォトン量を調節することが望ましい。

10

【0193】

レーザ光の照射により、全反射減衰条件（ATR）において、金属薄膜の表面に表面プラズモンが発生する。表面プラズモンの電場増強効果により、照射したフォトン量の数十～数百倍に増えたフォトンにより蛍光色素を励起する。なお、該電場増強効果によるフォトン増加量は、透明平面基板の屈折率、金属薄膜の金属種及びその膜厚に依存するが、通常、金では約10～20倍の増加量となる。

【0194】

蛍光色素は、光吸収により分子内の電子が励起され、短時間のうちに第一電子励起状態に移動し、この状態（準位）から基底状態に戻る際、そのエネルギー差に相当する波長の蛍光を発する。

20

【0195】

「レーザ光」としては、例えば、波長200～900nm、0.001～1,000mWのLD、波長230～800nm（金属薄膜に用いる金属種によって共鳴波長が決まる。）、0.01～100mWの半導体レーザなどが挙げられる。

【0196】

「プリズム」は、各種フィルタを介したレーザ光が、プラズモン励起センサに効率よく入射することを目的としており、屈折率が透明平面基板1と同じであることが好ましい。本発明は、全反射条件を設定できる各種プリズムを適宜選択することができることから、角度、形状に特に制限はなく、例えば、60度分散プリズムなどであってもよい。このようなプリズムの市販品としては、上述した「ガラス製の透明平面基板」の市販品と同様のものが挙げられる。

30

【0197】

「光学フィルタ」としては、例えば、減光（ND）フィルタ、ダイアフラムレンズなどが挙げられる。「減光（ND）フィルタ」（又は、中性濃度フィルタ）は、入射レーザ光量を調節することを目的とするものである。特に、ダイナミックレンジの狭い検出器を使用するときには精度の高い測定を実施する上で用いることが好ましい。

【0198】

「偏光フィルタ」は、レーザ光を、表面プラズモンを効率よく発生させるP偏光とするために用いられるものである。

【0199】

「カットフィルタ」は、外光（装置外の照明光）、励起光（励起光の透過成分）、迷光（各所での励起光の散乱成分）、プラズモンの散乱光（励起光を起源とし、プラズモン励起センサ表面上の構造体又は付着物などの影響で発生する散乱光）などの光学ノイズ、及び蛍光色素（E）又は（F）の自家蛍光を除去するフィルタであって、例えば、干渉フィルタ、色フィルタなどが挙げられる。

40

【0200】

「集光レンズ」は、検出器に蛍光シグナルを効率よく集光することを目的とするものであり、任意の集光系でよい。簡易な集光系として、顕微鏡などで使用されている、市販の対物レンズ（例えば、（株）ニコン製又はオリンパス（株）製等）を転用してもよい。対物レンズの倍率としては、10～100倍が好ましい。

50

【0201】

「SPFS検出部」としては、超高感度の観点からは光電子増倍管（浜松ホトニクス（株）製のフォトマルチプライヤー）が好ましい。また、これらに比べると感度は下がるが、画像として見ることができ、かつノイズ光の除去が容易なことから、多点計測が可能なCCDイメージセンサも好適である。

【0202】

〔工程（1）〕

工程（1）とは、上記工程（k）で得られた測定結果から、上記標的物質濃度、上記標的ウイルス量又は上記標的細胞量を算出する工程である。

【0203】

より具体的には、工程（1）は、既知濃度のアナライトでの測定を実施することで検量線を作成し、作成された検量線に基づいて被測定検体中のアナライト量を測定シグナルから算出する工程である。

【0204】

（アッセイシグナル）

アッセイシグナルは、上記工程（k）の前に測定したシグナルを“ブランクシグナル”、としたとき、下記式で算出することができる。

アッセイシグナル = |（アッセイ測定シグナル） - （ブランクシグナル）|

【実施例】

【0205】

次に、本発明について実施例を示してさらに詳細に説明するが、本発明はこれらによって限定されるものではない。

（I）蛍光色素を含む融合タンパク質含有集合体の場合

〔実施例1〕

（蛍光色素を含む融合タンパク質（I）含有集合体の製造方法（i）の実施）

工程（a）として、抗フェトプロテイン（AFP）モノクローナル抗体1D5及び抗AFPモノクローナル抗体6D2（2.5mg/mL、（株）日本医学臨床検査研究所製）に、「Monoclonal Antibody Labeling Kit」（Molecular Probe社製）を用いて、それぞれAlexa Fluor（登録商標）647を固定化した。

【0206】

工程（b）として、上記工程（a）で得られた蛍光標識抗体1D5及び6D2に、「EZ-Link Maleimide-PEO Solid Phase Biotinylation Kit」（PIERCE社製）を用いてビオチン化した。

【0207】

工程（c）として、上記工程（b）で得られた蛍光標識ビオチン化抗体1D5及び6D2とアビジンとを、該1D5：該6D2：アビジンのモル比が、2：2：1になるように混合することによって、融合タンパク質（I）含有集合体を製造した。

【0208】

〔実施例2〕

（融合タンパク質（II）含有集合体の製造方法（iv））

工程（d）として、抗AFPモノクローナル抗体1D5及び抗AFPモノクローナル抗体6D2それぞれに、「Monoclonal Antibody Labeling Kit」（Molecular Probe社）を用いて、Alexa Fluor（登録商標）647を固定化した。

【0209】

工程（f）として、上記工程（d）で得られた蛍光標識抗体1D5と蛍光標識抗体6D2とプロテインA/Gとを、該1D5：該6D2：プロテインA/Gのモル比が1：1：1になるように混合することで、融合タンパク質（I）含有集合体を製造した。

【0210】

10

20

30

40

50

[作製例 1]

(Alexa Fluor (登録商標) 647 標識 2 次抗体の作製)

抗 AFP モノクローナル抗体 6D2 に、「Monoclonal Antibody Labeling Kit」(Molecular Probe 社製) を用いて、Alexa Fluor (登録商標) 647 を固定化した。

【 0 2 1 1 】

[実施例 3]

(プラズモン励起センサの作製)

屈折率 [n_d] 1.72、厚さ 1 mm のガラス製の透明平面基板 ((株) オハラ製の「S-LAL 10」) をプラズマ洗浄し、該基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法により形成した後、その表面にさらに金薄膜をスパッタリング法により形成した。クロム薄膜の厚さは 1 ~ 3 nm、金薄膜の厚さは 44 ~ 52 nm であった。

10

【 0 2 1 2 】

金薄膜の、クロム薄膜とは接していない片面に対して、誘電体として二酸化ケイ素 (SiO_2) からなるスペーサ層をスパッタリング法により形成した。該スペーサ層の厚さは、15 nm であった。

【 0 2 1 3 】

(アッセイ法の実施)

工程 (g) として、まず実施例 1 で製造した融合タンパク質 (I) 含有集合体の溶液 (1 mg / mL) 100 μ L に、標的抗原として AFP (1 ng / mL の TBS 溶液に調製) 800 μ L を含有する検体を 25 分間接触させた。

20

【 0 2 1 4 】

工程 (h) として、上記工程 (g) を経て得られた反応物を、フィルタとしてワットマン (株) 製の「ベクタスピン ミクロ (孔径: 0.02 μ m)」に添加し、フィルタ上の溶液がなくなるまで遠心分離することによって、凝集体を単離した。その後、洗浄工程として、該フィルタに、Tween 20 を 0.05 質量% 含む TBS 1,000 μ L を添加し、再度、フィルタ上の溶液がなくなるまで遠心分離することによって、凝集体を洗浄した。

【 0 2 1 5 】

工程 (i) として、上記工程 (h) を経てフィルタ上にトラップされた凝集体を、50 μ L の PBS で再懸濁し、得られた溶液を、上記 (プラズモン励起センサの作製) で得られたプラズモン励起センサの表面に送液することで接触させた。

30

【 0 2 1 6 】

工程 (j) として、上記工程 (i) で得られたプラズモン励起センサに、ガラス製の透明平面基板の、金薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズム (シグマ光機 (株) 製) を経由してレーザー光 (633 nm、10 μ W) を照射し、励起された蛍光色素から発光された蛍光量を CCD から観察したときのシグナル値を計測し「アッセイ測定シグナル」とした。

【 0 2 1 7 】

なお、AFP が 0 ng / mL 時の SPFS 測定シグナルを「ブランクシグナル」とした。

40

【 0 2 1 8 】

工程 (k) として、上記工程 (j) で得られた測定結果から、アッセイシグナルを以下の式で評価した。

アッセイシグナル = | (アッセイ測定シグナル) - (ブランクシグナル) |

得られた結果を表 4 に示す。

【 0 2 1 9 】

[実施例 4]

(プラズモン励起センサの作製)

実施例 3 と同様にしてプラズモン励起センサを作製した。

50

【0220】

(アッセイ法の実施)

実施例2で得られた融合タンパク質(II)含有集合体の溶液(1mg/mL)100 μ Lを用いた以外は、実施例3と同様にしてアッセイ法を実施した。得られた結果を表4に示す。

【0221】

[比較例1]

(プラズモン励起センサの作製)

屈折率〔nd〕1.72、厚さ1mmのガラス製の透明平面基板((株)オハラ製のS-LAL10)をプラズマ洗浄し、該基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法により形成した後、その表面にさらに金薄膜をスパッタリング法により形成した。クロム薄膜の厚さは1~3nm、金薄膜の厚さは44~52nmであった。

10

【0222】

このようにして得られた基板を、10-カルボキシ-1-デカンチオールを1mM含むエタノール溶液に24時間以上浸漬し、金薄膜の片面にSAM(Self Assembled Monolayer;自己組織化単分子膜)を形成した。基板を該溶液から取り出し、エタノール及びイソプロパノールで洗浄した後、エアガンで乾燥させた。

【0223】

SAMの表面に、流路高さ0.5mmを有するポリジメチルシロキサン(PDMS)製シートを設け、SAM表面が流路の内側となるように基板を配置し(ただし、該シリコンゴムスペーサは送液に触れない状態とする。)、流路の外側から圧着し、ピスで流路シートと該プラズモン励起センサとを固定した。

20

【0224】

(アッセイ法の実施)

得られたプラズモン励起センサを流路に固定し、送液として超純水を10分間、その後MES(25、pH5.0)を20分間、ペリスタポンプにより、室温(25)、流速500 μ L/minで循環させ、その表面を平衡化した。

【0225】

続いて、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)を25mg/mLと、水溶性カルボジイミド(WSC)を25mg/mLとを含むMES(25、pH5.0)を5mL送液し、20分間循環送液させた後に、抗フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体(1D5、2.5mg/mL、(株)日本医学臨床検査研究所製)を含むAcetate溶液(25、pH6.0)2.5mLを30分間循環送液することで、SAM上に1次抗体を固相化した。次いで、50mMTris(25、pH7.4)5mLを15分間循環送液することで、未反応の活性化エステル基をブロッキングし、1質量%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS緩衝生理食塩水にて30分間循環送液することで、非特異的吸着防止処理を行った。

30

【0226】

送液をPBSに代え、AFPを1ng/mL含むPBS溶液を0.8mL添加し、25分間循環させた。

40

【0227】

Tween20を0.05質量%含むTBSを送液として5分間循環させることによって洗浄した。

【0228】

作製例1で得られたAlexa Fluor(登録商標)647を標識した2次抗体(1,000ng/mLとなるように調製したPBS溶液)を2.5mL添加し、20分間循環させた。

【0229】

その後、Tween20を0.05質量%含むTBSを送液として10分間循環させることによって洗浄した。

50

【0230】

CCDから観察したときのシグナル値を計測しアッセイ測定シグナルとした。なお、AFPを0 ng/mL時のSPFS測定シグナルをブランクシグナルとした。アッセイ評価としては実施例1と同様のアッセイシグナルを算出することで評価した。

【0231】

本発明のアッセイ法による測定結果を表4に示す。

【0232】

【表4】

		アッセイ法の実施(任意単位: au)		
		ブランクシグナル	アッセイ測定シグナル	アッセイシグナル
実施例	3	100,000	5,000,000	4,900,000
	4	100,000	5,000,000	4,900,000
比較例	1	100,000	900,000	800,000

10

【0233】

表4から、本発明のアッセイ法は、本発明の集合体を用いたホモジニアスアッセイ系をSPFS測定に応用することで、比較例1の従来へのヘテロジニアスSPFS測定と比べて、桁違いの極めて高感度な測定が可能であることがわかった。

(II) 酵素を含む融合タンパク質含有集合体の場合

20

[実施例1]

(酵素を含む融合タンパク質(I)含有集合体の製造方法(i)の実施)

工程(a)として、抗フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体1D5及び抗AFPモノクローナル抗体6D2(2.5 mg/mL、(株)日本医学臨床検査研究所製)に、「Alkaline Phosphatase Labeling Kit」((株)同仁化学研究所製)を用いて、アルカリフォスファターゼを固定化することによって、酵素標識抗体1D5及び6D2を製造した。

【0234】

工程(b)として、上記工程(a)で得られた酵素標識抗体1D5及び6D2に、「EZ-Link Maleimide-PEO Solid Phase Biotinylation Kit」(PIERCE社製)を用いてビオチン化することによって、酵素標識ビオチン化抗体1D5及び6D2を製造した。

30

【0235】

工程(c)として、上記工程(b)で得られた酵素標識ビオチン化抗体1D5及び6D2とアビジンとを、該1D5:該6D2:アビジンのモル比が、2:2:1になるように混合することによって、融合タンパク質(I)含有集合体を製造した。

【0236】

[実施例2]

(融合タンパク質(II)含有集合体の製造方法(iv))

工程(d)として、抗AFPモノクローナル抗体1D5及び抗AFPモノクローナル抗体6D2それぞれに、「Alkaline Phosphatase Labeling Kit」((株)同仁化学研究所製)を用いて、アルカリフォスファターゼを固定化することによって、酵素標識抗体1D5及び6D2を製造した。

40

【0237】

工程(f)として、上記工程(d)で得られた酵素標識抗体1D5と酵素標識抗体6D2とプロテインA/Gとを、該1D5:該6D2:プロテインA/Gのモル比が1:1:1になるように混合することで、融合タンパク質(II)含有集合体を製造した。

【0238】

[作製例1]

(Alexa Fluor(登録商標)647標識2次抗体の作製)

50

抗AFPモノクローナル抗体6D2に、「Monoclonal Antibody Labeling Kit」(Molecular Probe社製)を用いて、Alexa Fluor(登録商標)647を固定化した。

【0239】

[実施例3]

(プラズモン励起センサの作製)

屈折率〔nd〕1.72、厚さ1mmのガラス製の透明平面基板((株)オハラ製の「S-LAL 10」)をプラズマ洗浄し、該基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法により形成した後、その表面にさらに金薄膜をスパッタリング法により形成した。クロム薄膜の厚さは1~3nm、金薄膜の厚さは44~52nmであった。

10

【0240】

金薄膜の、クロム薄膜とは接していない片面に対して、誘電体として二酸化ケイ素(SiO₂)からなるスペーサ層をスパッタリング法により形成した。該スペーサ層の厚さは、15nmであった。

【0241】

(アッセイ法の実施)

工程(g)として、まず実施例1で製造した融合タンパク質(I)含有集合体の溶液(1mg/mL)100μLに、標的抗原としてAFP(1ng/mLのTBS溶液に調製)800μLを含有する検体を25分間接触させた。

【0242】

工程(h)として、上記工程(g)を経て得られた反応物を、フィルタとしてワットマン(株)製の「ベクタスピン ミクロ(孔径:0.02μm)」に添加し、フィルタ上の溶液がなくなるまで遠心分離することによって、凝集体を単離した。その後、

20

洗浄工程として、該フィルタに、Tween20を0.05質量%含むTBS 1,000μLを添加し、再度、フィルタ上の溶液がなくなるまで遠心分離することによって、凝集体を洗浄した。

【0243】

工程(i)として、上記(h)を経てフィルタ上にトラップされた凝集体に、蛍光基質として(1,3-dichloro-9,9-dimethyl-acridine-2-one-7-yl phosphate(DDAO phosphate)溶液(Molecular Probes社製))50μLを反応させることによって、蛍光色素(E)であるDDAOがフィルタ上に生成した。

30

【0244】

工程(j)として、上記工程(i)を経てフィルタ上に得られた溶液を、上記(プラズマ励起センサの作製)で得られたプラズマ励起センサの表面に送液することで接触させた。

【0245】

工程(k)として、上記工程(j)で得られたプラズモン励起センサに、ガラス製の透明平面基板の、金薄膜を形成していないもう一方の表面から、プリズム(シグマ光機(株)製)を経由してレーザー光(633nm、10μW)を照射し、励起された蛍光色素(E)から発光された蛍光量をCCDから観察したときのシグナル値を計測し「アッセイ測定シグナル」とした。

40

【0246】

なお、AFPが0ng/mL時のSPFS測定シグナルを「ブランクシグナル」とした。

【0247】

工程(l)として、上記工程(k)で得られた測定結果から、アッセイシグナルを以下の式で評価した。

アッセイシグナル = |(アッセイ測定シグナル) - (ブランクシグナル)|

得られた結果を表5に示す。

50

【0248】

[実施例4]

(プラズモン励起センサの作製)

実施例3と同様にしてプラズモン励起センサを作製した。

【0249】

(アッセイ法の実施)

実施例2で得られた融合タンパク質(II)含有集合体の溶液(1mg/mL)100 μ Lを用いた以外は、実施例3と同様にしてアッセイ法を実施した。得られた結果を表5に示す。

【0250】

[比較例1]

(プラズモン励起センサの作製)

屈折率〔nd〕1.72、厚さ1mmのガラス製の透明平面基板((株)オハラ製のS-LAL10)をプラズマ洗浄し、該基板の片面にクロム薄膜をスパッタリング法により形成した後、その表面にさらに金薄膜をスパッタリング法により形成した。クロム薄膜の厚さは1~3nm、金薄膜の厚さは44~52nmであった。

【0251】

このようにして得られた基板を、10-カルボキシ-1-デカンチオールを1mM含むエタノール溶液に24時間以上浸漬し、金薄膜の片面にSAM(Self Assembled Monolayer;自己組織化単分子膜)を形成した。基板を該溶液から取り出し、エタノール及びイソプロパノールで洗浄した後、エアガンで乾燥させた。

【0252】

SAMの表面に、流路高さ0.5mmを有するポリジメチルシロキサン(PDMS)製シートを設け、SAM表面が流路の内側となるように基板を配置し(ただし、該シリコンゴムスペーサは送液に触れない状態とする。)、流路の外側から圧着し、ビスで流路シートと該プラズモン励起センサとを固定した。

【0253】

(アッセイ法の実施)

得られたプラズモン励起センサを流路に固定し、送液として超純水を10分間、その後MES(25、pH5.0)を20分間、ペリスタポンプにより、室温(25)、流速500 μ L/minで循環させ、その表面を平衡化した。

【0254】

続いて、N-ヒドロキシコハク酸イミド(NHS)を25mg/mLと、水溶性カルボジイミド(WSC)を25mg/mLとを含むMES(25、pH5.0)を5mL送液し、20分間循環送液させた後に、抗フェトプロテイン(AFP)モノクローナル抗体(1D5、2.5mg/mL、(株)日本医学臨床検査研究所製)を含むAcetate溶液(25、pH6.0)2.5mLを30分間循環送液することで、SAM上に1次抗体を固相化した。次いで、50mMTris(25、pH7.4)5mLを15分間循環送液することで、未反応の活性化エステル基をブロッキングし、1質量%牛血清アルブミン(BSA)を含むPBS緩衝生理食塩水にて30分間循環送液することで、非特異的吸着防止処理を行った。

【0255】

送液をPBSに代え、AFPを1ng/mL含むPBS溶液を0.8mL添加し、25分間循環させた。

【0256】

Tween20を0.05質量%含むTBSを送液として5分間循環させることによって洗浄した。

【0257】

作製例1で得られたAlexaFluor(登録商標)647を標識した2次抗体(1,000ng/mLとなるように調製したPBS溶液)を0.8mL添加し、20分間

10

20

30

40

50

循環させた。

【0258】

その後、Tween 20を0.05質量%含むTBSを送液として10分間循環させることによって洗浄した。

【0259】

CCDから観察したときのシグナル値を計測しアッセイ測定シグナルとした。なお、AFPを0ng/mL時のSPFS測定シグナルをブランクシグナルとした。アッセイ評価としては実施例1と同様のアッセイシグナルを算出することで評価した。

【0260】

本発明のアッセイ法による測定結果を表5に示す。

10

【0261】

【表5】

		アッセイ法の実施(任意単位: au)		
		ブランクシグナル	アッセイ測定シグナル	アッセイシグナル
実施例	3	100,000	5,000,000	4,900,000
	4	100,000	5,000,000	4,900,000
比較例	1	100,000	900,000	800,000

【0262】

20

表5から、本発明のアッセイ法は、本発明の集合体を用いたホモジニアスアッセイ系をSPFS測定に応用することで、比較例1の従来のヘテロジニアスSPFS測定と比べて、桁違いの極めて高感度な測定が可能であることがわかった。

【産業上の利用可能性】

【0263】

本発明の融合タンパク質含有集合体は、本発明のアッセイ法に用いた際、高感度かつ高精度であり、迅速性が飛躍的に向上した方法であるから、例えば、血液中に含まれる極微量の腫瘍マーカーであっても検出することができ、この結果から、触診などによって検出することができない前臨床期の非浸潤癌(上皮内癌)の存在も高精度で予測することができる。

30

【符号の説明】

【0264】

1 標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(A)

2 標的物質、標的ウイルスもしくは標的細胞が有する1以上の部位と特異的に会合するタンパク質(B)

3 a 蛍光色素

3 b 酵素

4 ビオチン

5 アビジン

40

6 プロテインA/G

7 標的物質、標的ウイルス又は標的細胞

8 フィルタ

9 透明平面基板と、該基板の一方の表面に形成された金属薄膜と、該金属薄膜の、該基板とは接していないもう一方の表面に形成された誘電体からなるスペーサ層とを少なくとも有するプラズモン励起センサ

10 融合タンパク質(I)

11 融合タンパク質(II)

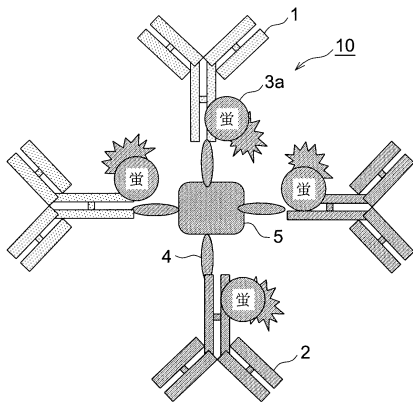
12 融合タンパク質(III)

13 蛍光基質

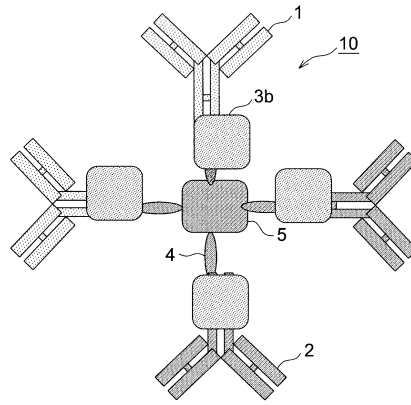
50

- 1 4 荧光色素 (E)
- 2 0 集合体
- 2 1 凝集体

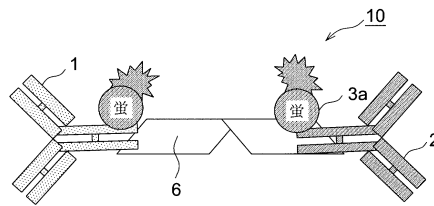
【 图 1 】



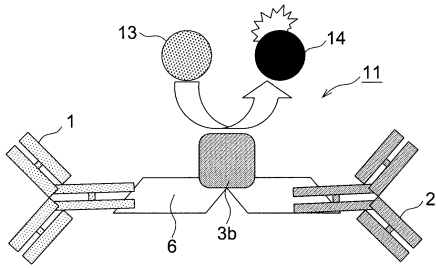
【 图 2 】




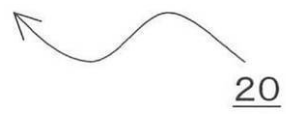
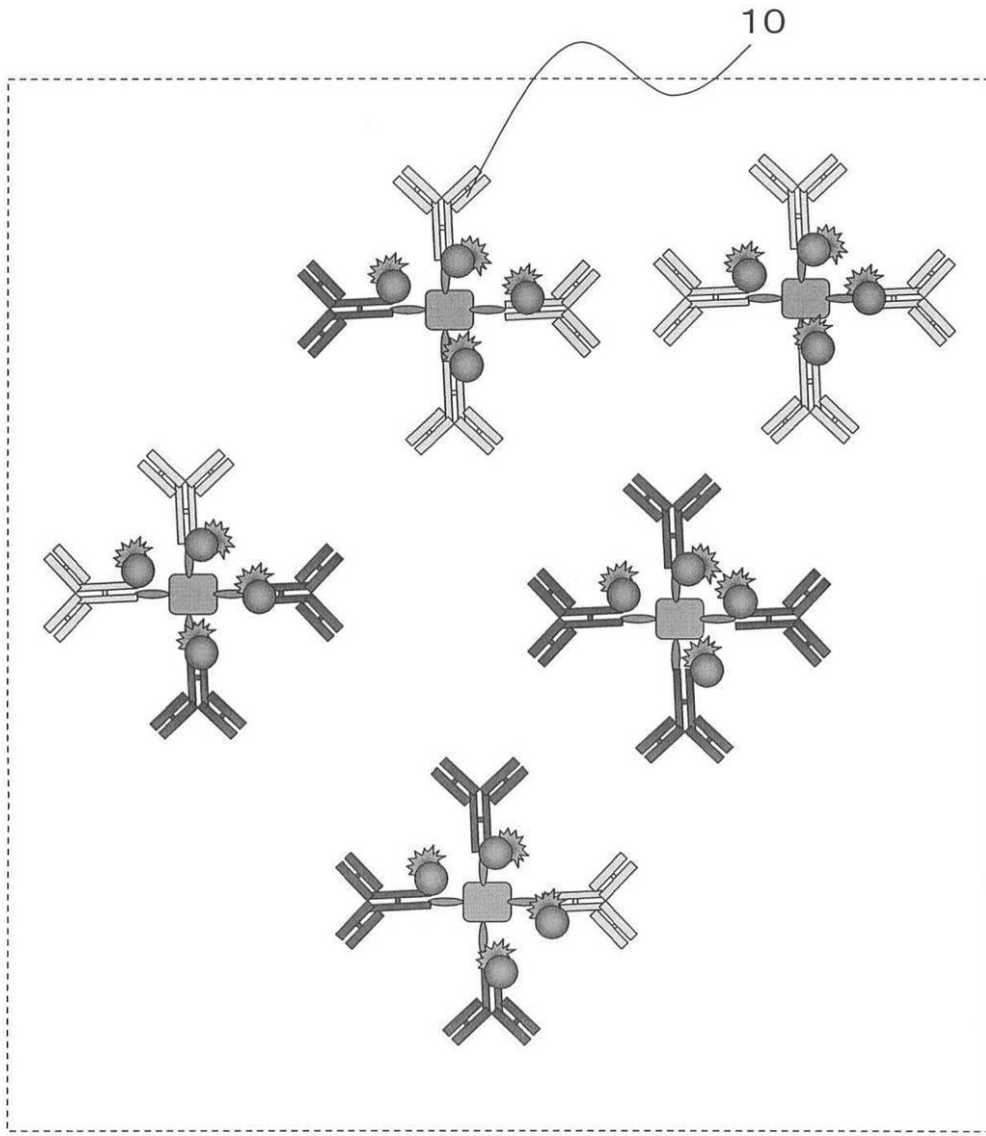
【 图 3 】



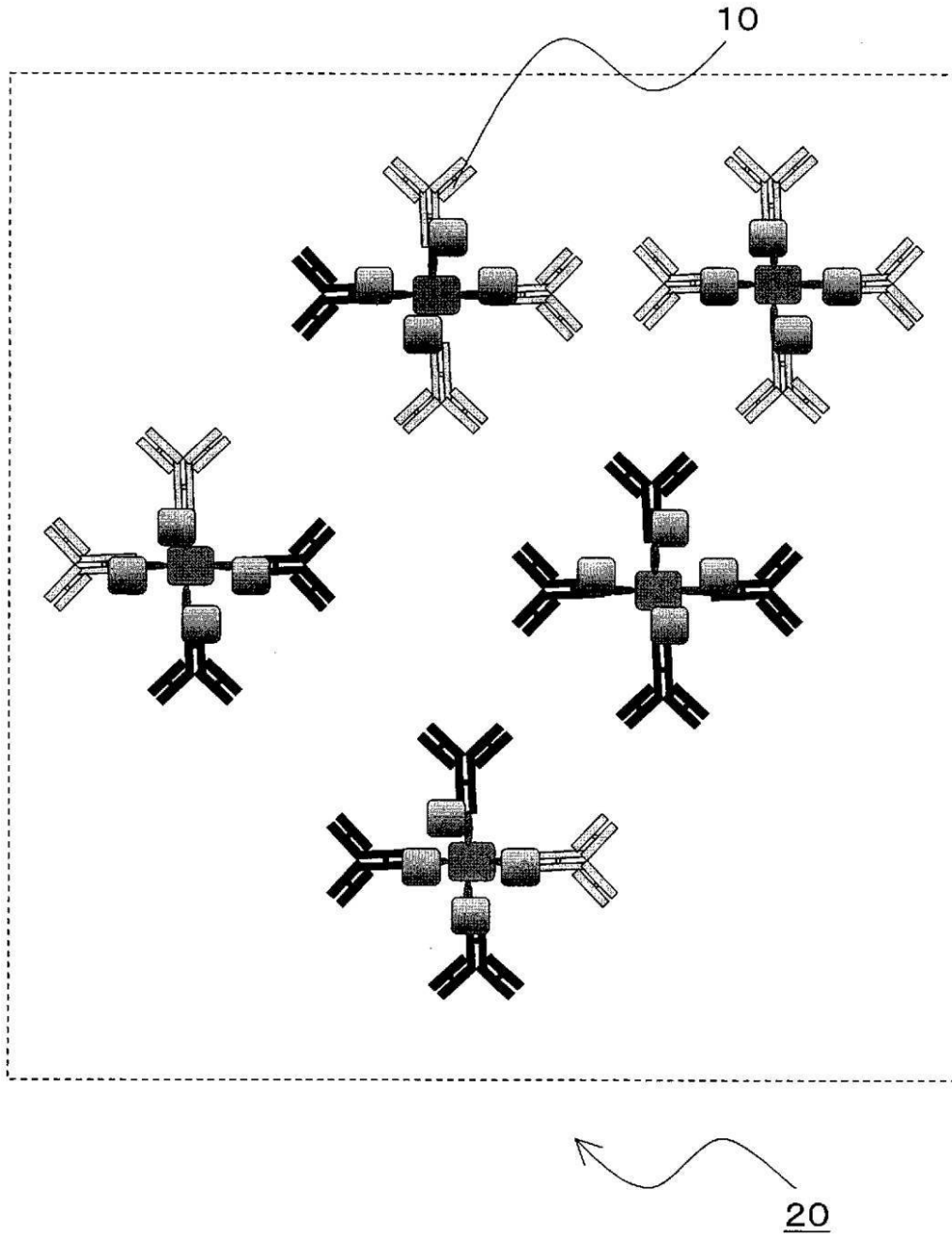
【 図 4 】



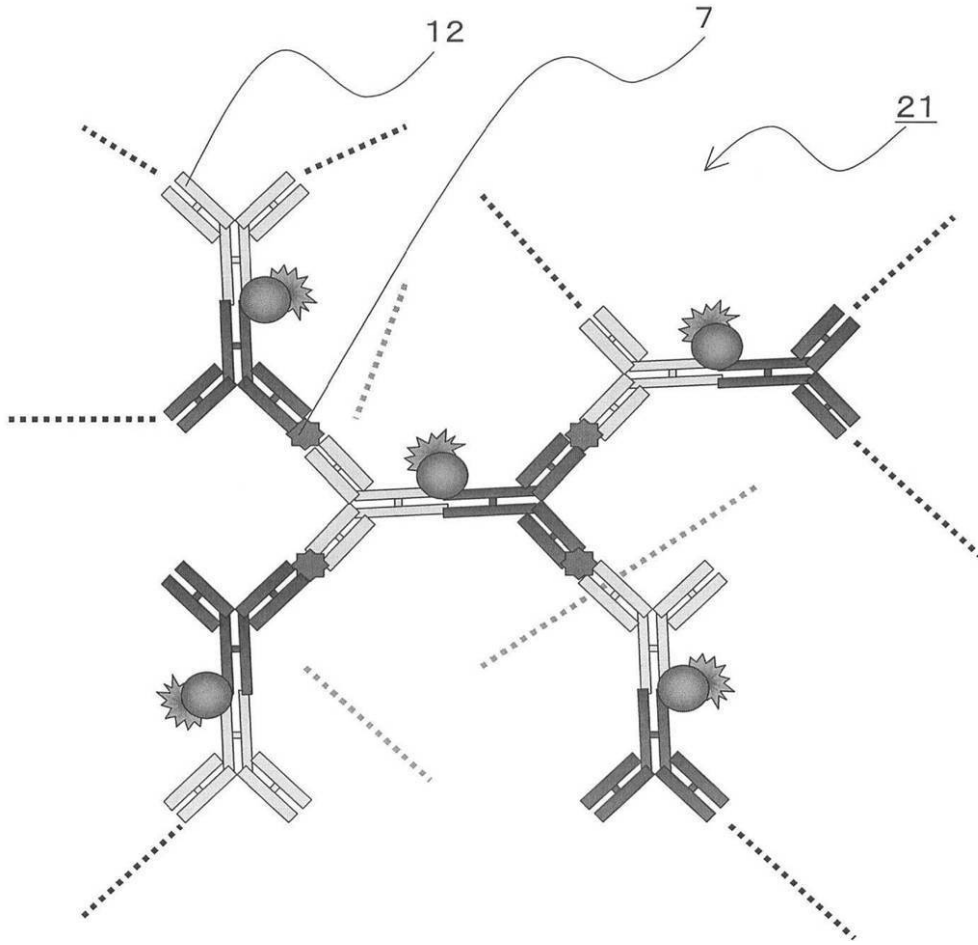
【 5】



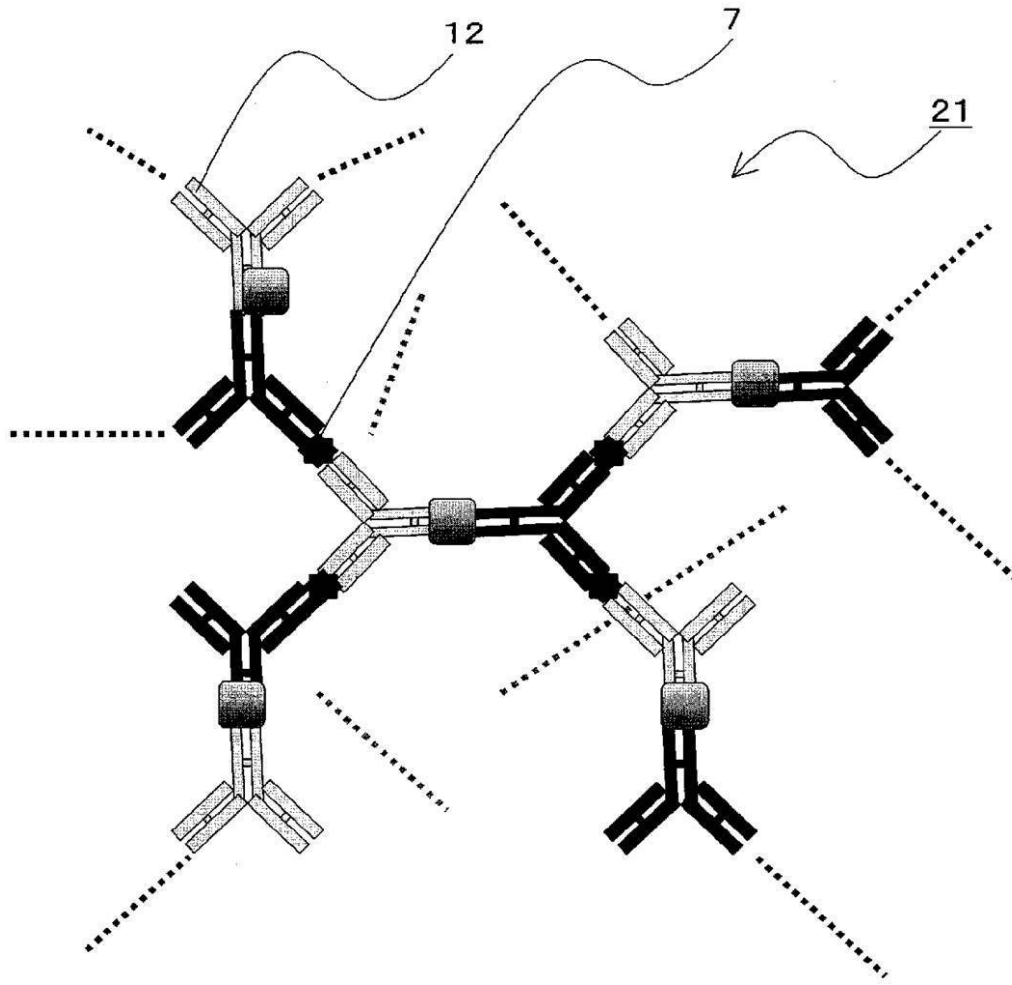
【図 6】



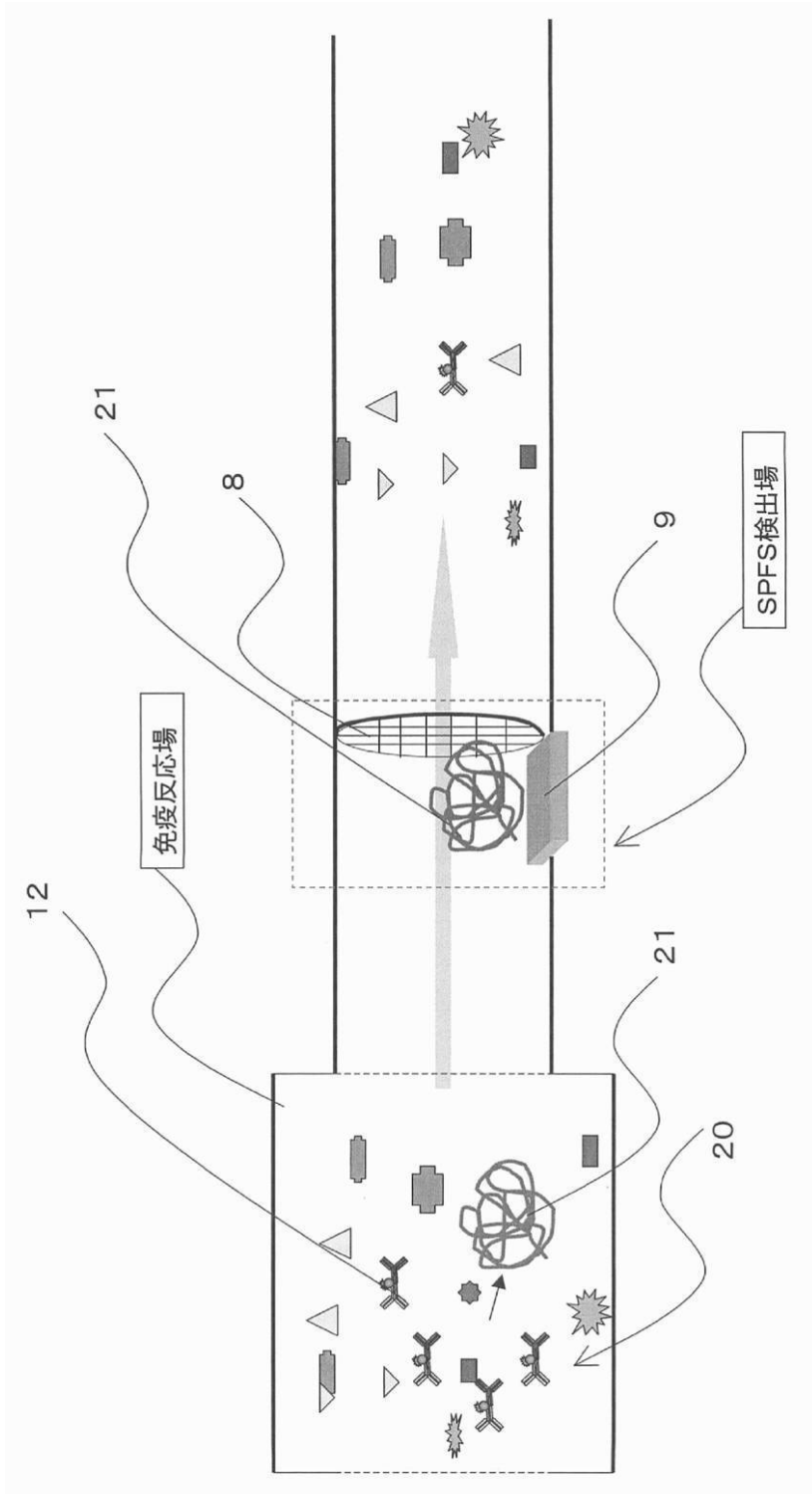
【図7】



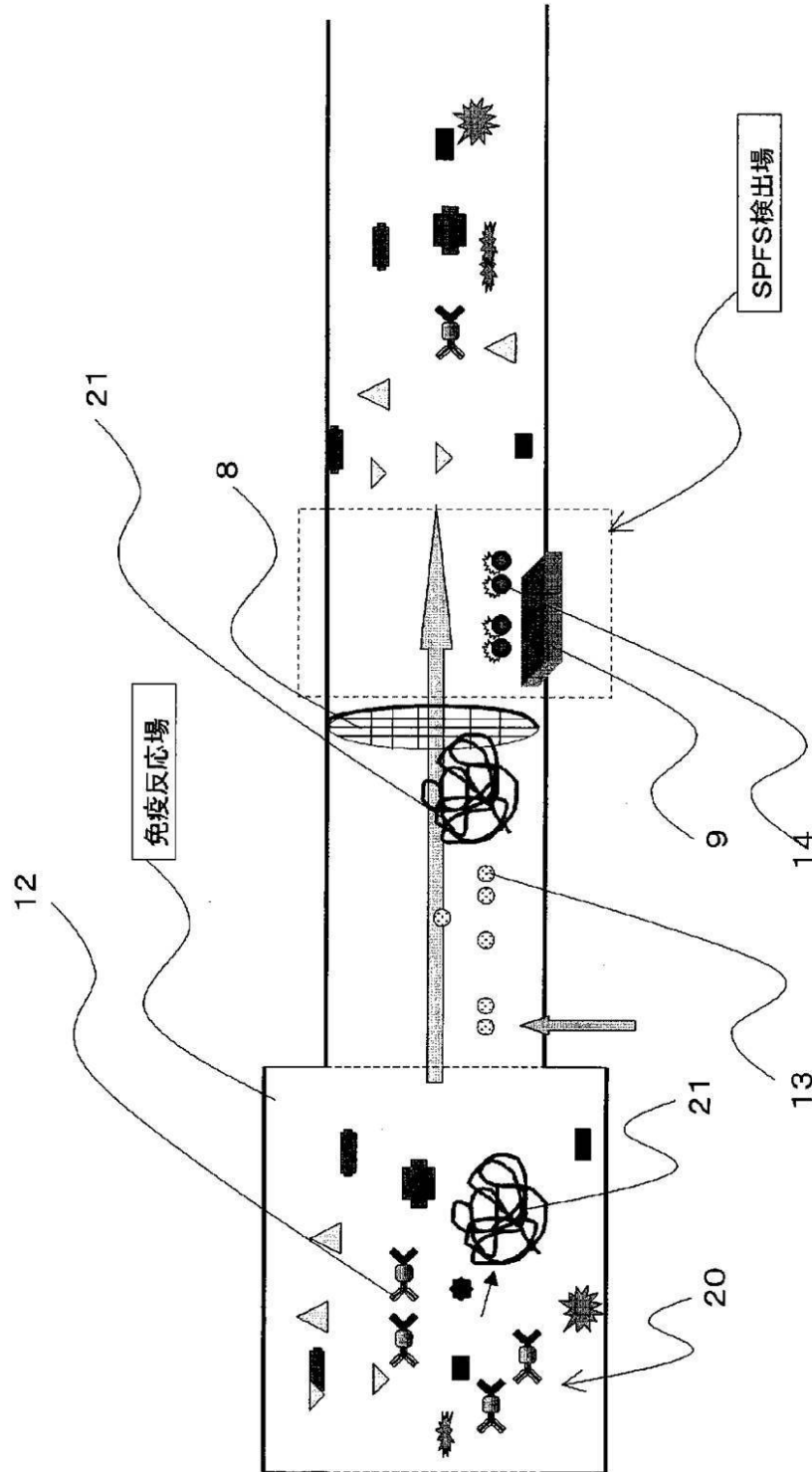
【図 8】



【図9】



【図10】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
G 0 1 N 21/64	(2006.01)	G 0 1 N	33/543	5 9 5
		G 0 1 N	33/553	
		G 0 1 N	33/543	5 8 1 F
		G 0 1 N	21/64	G

(56)参考文献 米国特許第04868109 (US, A)
 特表2003-501629 (JP, A)
 特開平08-211061 (JP, A)
 特開平08-114595 (JP, A)
 特開2008-256457 (JP, A)
 特開2006-208069 (JP, A)
 特開2008-170418 (JP, A)
 特開2002-296281 (JP, A)
 特表2003-524160 (JP, A)
 国際公開第2010/041736 (WO, A1)
 Yu F, Yao D, Knoll W., Surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy studies of the interaction between an antibody and its surface-coupled antigen., Anal Chem., 2003年 6月 1日, Vol.75, No.11, Page.2610-2617

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
 G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8
 G 0 1 N 2 1 / 6 4
 J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

专利名称(译)	含融合蛋白的聚集体，其制备方法和使用该组装的测定方法		
公开(公告)号	JP5660035B2	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	JP2011511368	申请日	2010-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	柯尼卡株式会社		
申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达控股公司		
当前申请(专利权)人(译)	柯尼卡美能达有限公司		
[标]发明人	山本法明		
发明人	山本 法明		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/536 G01N33/53 G01N33/542 G01N33/553 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/543.581.G G01N33/536.C G01N33/536.D G01N33/53.U G01N33/542.A G01N33/543.595 G01N33/553 G01N33/543.581.F G01N21/64.G		
优先权	2009109313 2009-04-28 JP 2009119902 2009-05-18 JP		
其他公开文献	JPWO2010125932A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供一种具有高灵敏度和高准确度的测定方法，其显着提高了快速性，用于测定方法的含有融合蛋白的组件，以及制备该组件的方法。本发明的含有融合蛋白的组件是靶物质，与靶病毒或靶细胞具有的一个或多个位点特异性结合的蛋白质(A)，以及具有该位点 α ，靶病毒或靶细胞的靶物质。其特征在于它至少含有融合蛋白，该融合蛋白含有总共两种或多种与一个或多个位点 β 特异性结合的蛋白质(B)和荧光染料或酶。

荧光色素	ファミリー	吸収波長 (nm)	発光波長 (nm)
Aminomethylcoumarin; AMCA	クマリン	350	450
Cy2(登録商標)	シアニン	492	510
Fluorescein Isothiocyanate; FITC	フルオレセイン	492	520
Cy3(登録商標)	インドカルボシアニン	550	570
Tetramethyl Rhodamine Isothiocyanate; TRITC	ローダミン	550	570
Rhodamine Red-X; RRR	ローダミン	570	590
Texas Red; TR	ローダミン	596	620
Cy5(登録商標)	シアニン	650	670
Alexa Fluor(登録商標)647	シアニン	650	665