

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/129357

発行日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)

(43) 国際公開日 平成23年10月20日 (2011. 10. 20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 G	4 H 0 4 5
GO 1 N 33/53 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 E	
GO 1 N 33/548 (2006. 01)	GO 1 N 33/53 U	
CO 7 K 19/00 (2006. 01)	GO 1 N 33/548 A	
CO 7 K 16/00 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 5 0 1 D	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く

出願番号 特願2012-510666 (P2012-510666)	(71) 出願人 000120456 栄研化学株式会社 東京都台東区台東4丁目19番9号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2011/059150	
(22) 国際出願日 平成23年4月13日 (2011. 4. 13)	
(31) 優先権主張番号 特願2010-92953 (P2010-92953)	(71) 出願人 399115851 株式会社先端生命科学研究所 埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号
(32) 優先日 平成22年4月14日 (2010. 4. 14)	
(33) 優先権主張国 日本国 (JP)	(74) 代理人 110001173 特許業務法人川口国際特許事務所
	(72) 発明者 大廣 義幸 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社 野木事業所内
	(72) 発明者 高安 進 栃木県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社 野木事業所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 標識化プローブ-水溶性担体複合体

(57) 【要約】

【課題】被験物質を高感度かつ安定的に検出・測定を行うために用いる標識化プローブ-担体複合体を高い再現性において作製する。

【解決手段】標識物とプローブ-水溶性担体の結合に、アビジン、ストレプトアビジン等のアビジン類とビオチンの特異的な結合を利用し、かつ、当該アビジン類とプローブとの結合を、担体との結合に先立って行う。すなわち、被験物質と結合する物質とアビジン類を結合させた後に、この結合体と高分子の水溶性担体を結合させてアビジン化プローブ-水溶性担体複合体を作製し、このアビジン化プローブ-水溶性担体複合体にビオチン化標識物を混合することにより、アビジン類とビオチンの特異的な結合を介して、被験物質を高感度に検出・測定出来る、安定な標識化プローブ-水溶性担体複合体を再現性良く得る。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

以下の工程を含む、標識化プローブ - 水溶性担体複合体の作製方法。

工程 1 . チオール基を有し被験物質に対して結合可能なプローブと、マレイミド基を有するアビジン類を結合させてプローブ結合体とし、

工程 2 . 次にチオール基を有する前記プローブ結合体と、マレイミド基を有する高分子の水溶性担体を結合させてプローブ結合体 - 水溶性担体複合体とし、

工程 3 . さらに前記プローブ結合体 - 水溶性担体複合体とビオチン化標識物を混合して、プローブ結合体 - 水溶性担体複合体のアビジン類とビオチン化標識物のビオチンを結合させる。

10

【請求項 2】

アビジン類がアビジンまたはストレプトアビジンである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

水溶性担体の分子量が 50 万以上である請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

水溶性担体が、デキストラン、アミノデキストラン、デキストリン、クラスターデキストリン、フィコールまたはプルランから選ばれる請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

被験物質に対して結合可能なプローブが抗体または抗体断片である請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

20

【請求項 6】

二種類以上の抗体または抗体断片を用いることを特徴とする請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

抗体または抗体断片が Fab'、F(ab')₂、Fab または IgG から選ばれる請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

被験物質に対して結合可能なプローブがプロテイン G、プロテイン A、プロテイン L、レクチンまたは受容体から選ばれる請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 9】

ビオチン化標識物がビオチン化ルシフェラーゼ、ビオチン化アルカリホスファターゼ、ビオチン化 POD、ビオチン化 GOD、ビオチン化 FITC、ビオチン化アクリジニウム、ビオチン化アクリジニウム誘導体またはビオチン化トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II) から選ばれる請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

ビオチン化ルシフェラーゼが遺伝子組換えにより作製されたものである、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法により作製した標識化プローブ - 水溶性担体複合体。

40

【請求項 12】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法により作製した標識化プローブ - 水溶性担体複合体を用いる測定法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 7 または 9 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法により作製した標識化プローブ - 水溶性担体複合体を用いる免疫測定法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の方法により作製した標識化プローブ - 水溶性担体複合体を用いる高感度測定法。

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、水溶性担体に複数のプローブを結合させ、さらに標識物を結合させた標識化プローブ - 水溶性担体複合体の作製方法、当該方法によって作製される標識化プローブ - 水溶性担体複合体、およびその使用方法に関するものである。この標識化プローブ - 水溶性担体複合体を用いることにより、高感度で安定な検出・測定を行うことが可能となる。

【背景技術】

【0002】

被験物質と特異的に結合するプローブと標識物との結合物を用いて、プローブを介した被験物質と標識物の結合量を指標として被験物質を検出・測定する方法において、その感度は一般にプローブおよび標識物の分子数により定まる。すなわち、1分子のプローブに対して結合する標識物の分子数は限られ、その比率が感度を定める。

10

【0003】

そこで、プローブ自体を重合化させて重合体を作製することにより分子量を大きくし、その重合体に結合する標識物の分子数を多くすることにより反応性を向上させた高感度化がなされた（特許文献1）。しかしながら、プローブの重合化を制御することが容易ではなく、実用化には至っていない。

【0004】

また、ポリリジン、アミノデキストラン等の担体に酵素標識物およびプローブを別個に共有結合させて分子量が大きく、標識物の結合数が多い標識物プローブ複合体が提案された（特許文献2）。しかしながら、本技術により反応性は増加したものの、ブランク値での反応も増加し、検出・測定を行うときの高感度化には至っていない。

20

【0005】

さらに、ポリリジン等の担体に酵素標識物を結合させ、担体上の標識物を介してプローブを結合させた標識物 - プローブ複合体（特許文献3）、デキストラン等の担体にプローブを結合させ、担体上のプローブを介して標識物を結合させた水溶性担体 - プローブ複合体（特許文献4）、担体に親水性の仲介物質を結合させ、仲介物質にプローブおよび検出マーカの標識物を結合させたプローブ複合体（特許文献5）、酵素標識物を介して2分子以上の担体を結合させた複合体にプローブを結合させたブロック化標識物プローブ（特許文献6）が提案された。

30

【0006】

しかし、上記先行技術も、反応性の増加とともにブランク値での反応も増加するという技術的課題を内包しており、シグナル/ノイズ比として反応性を評価する場合、高感度かつ安定な複合体を得ることは困難であった。また、複合体形成において、担体とプローブまたは標識物の結合を最初に行うと、担体の多官能性に起因して、所望の複合体を再現性良く作製することは困難であった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0007】

40

【特許文献1】特開平11-295313号公報

【特許文献2】特開2000-88850号公報

【特許文献3】特開2001-181299号公報

【特許文献4】特開2003-194821号公報

【特許文献5】国際公開2006/011543

【特許文献6】国際公開2006/070732

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

被験物質と特異的に結合するプローブと標識物の結合物を用いて、プローブを介した被

50

験物質と標識物の結合量を指標として、高感度に被験物質を検出・測定するためには、1分子のプロープと標識物の結合物に多量の標識物が含まれなければならない。そのために、大分子のプロープと標識物の結合物を作製する必要がある。

【0009】

しかしながら、大分子の結合物を形成すべく担体を使用した場合、反応性は増加するものの、ブランク値での反応も増加し、結果として高感度かつ安定な複合体を得ることは困難である。また、担体とプロープまたは標識物の結合を複合体形成の最初の段階として行うと、担体の多官能性に起因して、所望の複合体を再現性良く作製することは困難である。そこで、上記課題を解決する結合物および当該結合物を安定的に作製する方法が期待される。

10

【課題を解決するための手段】

【0010】

発明者等は、標識化プロープ - 担体複合体の作製におけるプロープと標識物の結合において、アビジン類とビオチンとの特異的な結合を利用することに思い至り、また、アビジン類とプロープとの結合を、担体との結合に先立って行うことで、極めて高感度かつ安定な複合体を再現性良く作製し得ることを見出した。加えて、化学結合のためにプロープの化学修飾を行うときに、プロープにチオール基を導入することが、プロープの結合能に影響を与えないことを見出し、さらに、担体として水溶性担体を用いることで、高感度で安定な検出・測定に有用な標識化プロープ - 水溶性担体複合体を構築した。

20

【0011】

すなわち、本発明は、以下の工程を含む、標識化プロープ - 水溶性担体複合体の作製方法に関するものである。

工程1．チオール基を有し被験物質に対して結合可能なプロープと、マレイミド基を有するアビジン類を結合させてプロープ結合体とし、

工程2．次にチオール基を有する前記プロープ結合体と、マレイミド基を有する高分子の水溶性担体を結合させてプロープ結合体 - 水溶性担体複合体とし、

工程3．さらに前記プロープ結合体 - 水溶性担体複合体とビオチン化標識物を混合して、プロープ結合体 - 水溶性担体複合体のアビジン類とビオチン化標識物のビオチンを結合させる。

30

【0012】

また、本発明は、当該工程により作製する標識化プロープ - 水溶性担体複合体に関するものである。

【0013】

さらに、本発明は、上記工程により作製した標識化プロープ - 水溶性担体複合体を用いる測定法、免疫測定法または高感度測定法に関するものである。

【0014】

本発明において、「プロープ」とは、被験物質と相互作用する結合パートナーを意味し、非限定的な例として、抗体もしくは抗体断片、プロテインG、プロテインA、プロテインL、レクチンまたは受容体等を挙げることが出来る。また、抗体または抗体断片の非限定な例として、Fab'、F(ab')₂、FabまたはIgG等を挙げることが出来る。

40

【0015】

また、当該抗体または抗体断片として、二種類以上の抗体または抗体断片を用いることが出来る。

【0016】

本発明において、「アビジン類」とは、低分子の塩基性糖タンパク質のアビジン、それに類似するタンパク質またはその断片等、ビオチン化合物と安定した複合体を形成するものを意味し、当該「アビジン類」の非限定な例として、アビジンまたはストレプトアビジン等を挙げることが出来る。

【0017】

50

本発明において、「水溶性担体」は、分子量が50万以上であることが好ましい。本発明の水溶性担体の非限定な例として、デキストラン、アミノデキストラン、デキストリン、クラスターデキストリン、フィコールまたはプルラン等を挙げる事が出来る。

【0018】

本発明では「ビオチン化標識物」を使用する。ここで「ビオチン」は、ビタミンB複体の一つであり、アビジンと非常に強く結合することが知られているものである。本発明における「ビオチン化標識物」の非限定な例として、ビオチン化ルシフェラーゼ、ビオチン化アルカリホスファターゼ、ビオチン化POD(peroxidase)、ビオチン化GOD(glucose oxidase)、ビオチン化FITC(fluorescein isothiocyanate)、ビオチン化アクリジニウム、ビオチン化アクリジニウム誘導体またはビオチン化トリス(2,2'-ビピリジル)ルテニウム(II)等を挙げる事が出来る。当該「ビオチン化標識物」におけるビオチンと標識物の結合には、化学修飾等を含む既知の何れの方法を利用することが出来るが、特に遺伝子組換えを利用することが好ましい。なぜなら、化学結合のための化学修飾をしないことから、その標識物の活性を低下させないからである。

10

【0019】

本発明に係る工程1においては、まず被験物質に対して結合可能なプローブが十分なチオール基を有していない場合、当該プローブにチオール基を導入する。チオール基の導入には既知の何れの方法を用いることが出来るが、プローブが抗体または抗体断片である場合、2-メルカプトエタノール等の還元剤を使用し、内在するジスルフィド結合を還元することによりチオール基を導入することは、プローブの結合能に対する影響を最小限化出来るので、特に有利である。

20

【0020】

次に、アビジン類へマレイミド基を導入する。マレイミド基の導入には、既知の何れの方法を用いることが出来る。例えば、Sulf-KMUS(同仁化学社製)といった既知のマレイミド試薬を使用することが出来る。

【0021】

チオール基を有し被験物質に対して結合可能なプローブと、マレイミド基を有するアビジン類との結合には、既知の何れの方法を用いることが出来る。例えば、プローブおよびアビジン類をそれぞれ適切な濃度において緩衝液に溶解し、当該溶解液を反応させることで結合反応を行うことが出来る。また、以降の工程における非特異反応を回避すべく、上記結合反応完了後、2-メルカプトエタノール等のチオール試薬を用いて未反応のマレイミド基をブロックすることが出来る。ブロック後のプローブ-アビジン類結合体は、ゲル濾過等既知の方法によって精製することが出来る。

30

【0022】

本発明に係る工程2においては、まず工程1において作製したプローブ-アビジン類結合体にチオール基を導入する。チオール基の導入には、例えば、2-イミノチオランを使用するといった、既知の何れの方法を用いることが出来る。

【0023】

水溶性担体へのマレイミド基の導入は、既知の何れの方法を用いることが出来る。例えば、水溶性担体を酸と反応させることにより、カルボキシル基を導入し、当該酸を透析等により除去した後、エチレンジアミン等の既知のアミノ基導入試薬を用いて、カルボキシル基をアミノ基に置換する。置換後、透析等により未反応のアミノ基導入試薬を除去し、既知のマレイミド試薬を加え反応させることにより、マレイミド基を有する水溶性担体を得ることが出来る。

40

【0024】

チオール基を有するプローブ-アビジン類結合体と、マレイミド基を有する水溶性担体との結合には、既知の何れの方法を用いることが出来る。また、以降の工程における非特異反応を回避すべく、結合反応完了後、2-メルカプトエタノール等のチオール試薬を用いて水溶性担体に導入した未反応のマレイミド基をブロックすることが好ましい。プロッ

50

ク後のプローブ結合体 - 水溶性担体複合体は、ゲル濾過等既知の方法によって精製することが出来る。

【0025】

本発明に係る工程3においては、上記プローブ結合体 - 水溶性担体複合体をビオチン化標識物と混合することにより、プローブ結合体 - 水溶性担体複合体のアビジン類とビオチン化標識物のビオチンを結合させる。上記の通り、アビジン類とビオチンとの親和性は非常に強いため、例えば、プローブ結合体 - 水溶性担体複合体およびビオチン化標識物をそれぞれ適切な濃度に調製し、当該調製液を混合することによって、当該アビジン類とビオチンとの結合反応を行うことが出来る。

【0026】

本発明に係る工程により作製した標識化プローブ - 水溶性担体複合体は、当該プローブが標的とする被験物質と高感度、かつ安定的に反応するため、既知の何れの測定法において利用することが出来る。また、当該プローブが抗体または抗体断片である場合、本発明に係る標識化プローブ - 水溶性担体複合体は、既知の何れの免疫測定法において利用することが出来る。

【0027】

さらに、本発明に係る工程により作製した標識化プローブ - 水溶性担体複合体は長期間保存後においても極めて安定である。37 で1週間の加速安定性試験下においても、その経時的な安定性を保持していた。

【0028】

本発明を、一例としてビオチン化標識物にビオチン化ルシフェラーゼを、プローブとしてFab'を、アビジン類としてストレプトアビジンを、水溶性担体としてデキストラン(T2000)を各々用いて説明するが、本例に限定されることはない。

【0029】

IgG抗体をペプシン消化して得たF(ab')₂に2-メルカプトエタノールを加えて還元処理した後にゲルろ過により精製し、チオール基を有するFab'を得る。

【0030】

一方、ストレプトアビジンにマレイミド基を導入する試薬を加えて処理した後にゲルろ過により精製し、マレイミド基を導入したストレプトアビジンを得る。

【0031】

上記した方法で得られたチオール基を導入したFab'およびマレイミド基を導入したストレプトアビジンを混合して反応させた後に2-メルカプトエタノールを添加して未反応のマレイミド基をブロックし、ゲルろ過により精製してFab' - ストレプトアビジン結合体を得る。

【0032】

得られたFab' - ストレプトアビジン結合体に2-イミノチオランを加えて反応させた後にゲルろ過により精製し、チオール基を導入したFab' - ストレプトアビジン結合体を得る。

【0033】

デキストラン(T2000)にアミノ基を導入したアミノデキストランを作製し、さらにマレイミド試薬を加えて反応させた後にゲルろ過により精製し、マレイミド基を導入したデキストラン(T2000)を得る。

【0034】

上記した方法で得られたチオール基を導入したFab' - ストレプトアビジン結合体およびマレイミド基を導入したデキストラン(T2000)を混合して反応させた後に2-メルカプトエタノールを添加して未反応のマレイミド基をブロックし、ゲルろ過により精製してFab' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン複合体を得る。

【0035】

得られたFab' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン(T2000)複合体とビオチン化ルシフェラーゼを混合して反応させて、ルシフェラーゼ標識Fab' - デキス

10

20

30

40

50

トラン (T 2 0 0 0) 複合体を得る。

【 0 0 3 6 】

得られたルシフェラーゼ標識 F a b ' - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体を標識抗体として用い、別に用意した抗体を固定化した固相と組み合わせてサンドイッチイムノアッセイを行うと、高感度の検出・測定法が完成する。

【 0 0 3 7 】

理論に拘束されることを意図するものではないが、本発明によって、従来と比較して、極めて高感度かつ安定な標識化プローブ - 水溶性担体複合体が再現性良く得られることは、プローブと標識物の結合を、アビジン類とビオチンとの高い親和性を介して行ったこと、かつ、当該プローブとアビジン類との結合を、担体との結合に先立って行ったことに主に起因するものであると考えられる。プローブとアビジン類との結合、およびアビジン類とビオチンとの結合は、その結合に関する分子数比等を制御し易く、従って、同等の構造を有する標識化プローブ - 水溶性担体複合体を再現性良く安定的に作製できるのであろう。また、このように安定的に作製された標識化プローブ - 水溶性担体複合体は、ノイズを構成する非特異的反応を相対的に抑制しつつ、シグナルを構成する特異的反応のみを増加させるのに極めて適した構造を有するものと考えられる。

10

【 発明の 効果 】

【 0 0 3 8 】

本発明を実施することにより、被験物質と特異的に結合する高感度かつ安定な標識化プローブ - 水溶性担体複合体が再現性良く得られ、この標識化プローブ - 水溶性担体複合体を用いることにより、高感度かつ安定な検出・測定が可能となる。

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 3 9 】

【 図 1 】 I g G - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体の溶出パターン

【 図 2 】 F a b ' (c 1 1 - 9 + c 1 1 - 1 4) - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体の溶出パターン

【 図 3 】 F a b ' (c 1 1 - 9) - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体の溶出パターン

【 図 4 】 F a b ' (c 1 1 - 1 4) - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体の溶出パターン

30

【 図 5 】 F a b ' (c 1 1 - 9 + c 1 1 - 1 4) - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T 5 0 0) 複合体の溶出パターン

【 図 6 】 F I T C 標識 F a b ' と F I T C 標識 F a b ' - デキストラン複合体の反応性の比較

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 4 0 】

被験物質と特異的に結合するプローブを固定化した不溶性担体と検体を反応させた後に検体を除去洗浄し、その後に標識化プローブ - 水溶性担体複合体を加えて反応させ、再度除去洗浄した後に不溶性担体上の標識物の活性を測定することにより、検体中の被験物質の検出・測定を行う。

40

【 実施例 1 】

【 0 0 4 1 】

還元処理によるチオール基を有する I g G の調製

抗 H C V コア抗原マウスモノクローナル I g G 抗体 c 1 1 - 9 および c 1 1 - 1 4 を 0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 2) に溶解して、各々 5 m g / m L の溶液を調製した。これらの I g G 溶液 3 0 0 μ L に 0 . 2 M の 2 - メルカプトエタノール (和光純薬社製) 3 0 μ L を添加し、37 で 1 . 5 時間反応させた。反応後、P D - 1 0 (G E ヘルスケア社製) でゲル濾過精製し、抗体に内在するジスルフィド結合を還元して得られるチオール基を有する I g G を得た。各々のチオール基の数を定量した結果、I g G 1 分子あたり 8

50

． 0 個のチオール基の存在が確認された。

【実施例 2】

【0042】

還元処理によるチオール基を有する Fab' の調製

抗 H C V コア 抗原 マウスモノクローナル I g G 抗体 c 1 1 - 9 および c 1 1 - 1 4 を 0 . 1 M 酢酸ソーダ緩衝液 (p H 4 . 5) にて 1 0 m g / m L と なる よう に 調 製 し た 。 次 に 、 こ れ ら の I g G 溶 液 1 m L に 対 し て ペ プ シ ン 0 . 2 m g を 添 加 し 、 3 7 ° C で 6 時 間 攪 拌 す る こ と に よ り I g G を ペ プ シ ン 消 化 し た 。 ペ プ シ ン 消 化 後 、 2 N N a O H に て 中 和 し 、 さ ら に S u p e r d e x 2 0 0 カ ラ ム (G E ヘ ル ス ケ ア 社 製) で 精 製 す る こ と に よ り F (a b ') ₂ を 得 た 。

10

【0043】

各々 3 . 0 m g / m L の F (a b ') ₂ 1 3 0 0 μ L に 0 . 2 M の 2 - メ ル カ プ ト エ タ ノ ー ル (和 光 純 薬 社 製) 1 3 0 μ L を 添 加 し 、 3 7 ° C で 1 . 5 時 間 反 応 さ せ た 。 反 応 後 、 P D - 1 0 (G E ヘ ル ス ケ ア 社 製) で ゲ ル 濾 過 精 製 し 、 抗 体 に 内 在 す る ジ ス ル フ ィ ド 結 合 を 還 元 し て 得 ら れ る チ オ ー ル 基 を 有 す る F a b ' を 得 た 。 各 々 の チ オ ー ル 基 の 数 を 定 量 し た 結 果 、 c 1 1 - 9 で は F a b ' 1 分 子 あ た り 3 . 3 個 、 c 1 1 - 1 4 で は F a b ' 1 分 子 あ た り 3 . 4 個 の チ オ ー ル 基 の 存 在 が 確 認 さ れ た 。

【実施例 3】

【0044】

ストレプトアビジンへのマレイミド基の導入

2 0 m g の ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン (M P B i o 社 製) を 0 . 1 M リ ン 酸 緩 衝 液 (p H 7 . 2) 2 m L に 溶 解 し 、 ジ メ チ ル ホ ル ム ア ミ ド に 6 m g / m L と なる よう に 溶 解 し た マ レ イ ミ ド 試 薬 S u l f o - K M U S (同 仁 化 学 社 製) 1 3 3 μ L を 加 え た 。 3 0 ° C で 1 時 間 反 応 さ せ た 後 、 P D - 1 0 (G E ヘ ル ス ケ ア 社 製) に て ゲ ル 濾 過 精 製 し 、 マ レ イ ミ ド 基 を 導 入 し た ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン を 得 た 。 マ レ イ ミ ド 基 の 数 を 定 量 し た 結 果 、 ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン 1 分 子 あ た り 3 . 7 個 の マ レ イ ミ ド 基 の 存 在 が 確 認 さ れ た 。

20

【実施例 4】

【0045】

I g G - ストレプトアビジン結合体の作製

実 施 例 1 で 作 製 し た c 1 1 - 9 お よ び c 1 1 - 1 4 の チ オ ー ル 基 を 導 入 し た I g G を 0 . 1 M リ ン 酸 緩 衝 液 (p H 7 . 2) に 溶 解 し 、 各 々 2 . 5 m g / m L の チ オ ー ル 基 を 導 入 し た I g G 溶 液 を 調 製 し た 。 一 方 、 実 施 例 3 で 作 製 し た マ レ イ ミ ド 基 を 導 入 し た ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン を 0 . 1 M リ ン 酸 緩 衝 液 (p H 7 . 2) に 溶 解 し 、 1 3 . 0 m g / m L の マ レ イ ミ ド 基 を 導 入 し た ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン 溶 液 を 調 製 し た 。

30

【0046】

次 に 、 各 々 の チ オ ー ル 基 を 導 入 し た I g G 溶 液 5 0 0 μ L に 対 し て 、 マ レ イ ミ ド 基 を 導 入 し た ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン 溶 液 3 8 μ L を 添 加 し 、 3 0 ° C で 1 時 間 反 応 さ せ た 。 反 応 後 、 0 . 2 M の 2 - メ ル カ プ ト エ タ ノ ー ル (和 光 純 薬 社 製) 5 4 μ L を 添 加 し 、 4 ° C で 一 晩 反 応 さ せ 、 未 反 応 の マ レ イ ミ ド 基 を ブ ロ ッ ク し た 。 反 応 後 、 S u p e r d e x 2 0 0 カ ラ ム (G E ヘ ル ス ケ ア 社 製) で ゲ ル 濾 過 精 製 し 、 I g G - ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン 結 合 体 を 得 た 。

40

【実施例 5】

【0047】

ルシフェラーゼ標識 I g G の作製

実 施 例 4 で 作 製 し た 1 0 μ M の c 1 1 - 9 お よ び c 1 1 - 1 4 の I g G - ス ト レ プ ト ア ビ ジ ン 結 合 体 5 0 μ L に 対 し て 、 6 1 μ M の ビ オ チ ン 化 ル シ フ ェ ラ ー ゼ (キ ッ コ ー マ ン 社 製) 8 . 2 μ L 加 え て 、 2 5 ° C で 1 時 間 反 応 さ せ る こ と に よ り ル シ フ ェ ラ ー ゼ 標 識 I g G を 作 製 し た 。

【実施例 6】

【0048】

Fab' - ストレプトアビジン結合体の作製

50

実施例2で作製したc11-9およびc11-14のチオール基を導入したFab'を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解し、各々2.6mg/mLのチオール基を導入したFab'溶液を調製した。一方、実施例3で作製したマレイミド基を導入したストレプトアビジンを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)に溶解し、13.0mg/mLのマレイミド基を導入したストレプトアビジン溶液を調製した。

【0049】

次に、各々のチオール基を導入したFab'溶液1400μLに対して、マレイミド基を導入したストレプトアビジン溶液365μLを添加し、30℃で1時間反応させた。反応後、0.2Mの2-メルカプトエタノール(和光純薬社製)177μLを添加し、4℃で一晩反応させ、未反応のマレイミド基をブロックした。反応後、Superdex200カラム(GEヘルスケア社製)でゲル濾過精製し、Fab'-ストレプトアビジン結合体を得た。

【実施例7】

【0050】

ルシフェラーゼ標識Fab'の作製

実施例6で作製した26.4μMのc11-9およびc11-14のFab'-ストレプトアビジン結合体10μLに対して、61μMのビオチン化ルシフェラーゼ(キッコマン社製)4.3μL加えて、25℃で1時間反応させることにより、ルシフェラーゼ標識Fab'を作製した。

【実施例8】

【0051】

アミノ基を導入したデキストランへのマレイミド基の導入

デキストラン(T2000)およびデキストラン(T500)各々2gとモノクロロ酢酸4.7gを50mLの3N NaOH溶液に溶解し、室温で70分間攪拌することによってデキストラン(T2000)およびデキストラン(T500)にカルボキシル基を導入した。次に、リン酸2水素ナトリウム0.2gを添加し、6N HClで混合液を中和することにより反応を停止させ、透析により未反応のモノクロロ酢酸を除去した。

【0052】

透析後、16.4gのエチレンジアミンと1.2gの1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドを添加し、室温で4時間攪拌することによりデキストラン(T2000)およびデキストラン(T500)に導入したカルボキシル基をアミノ基に変換した。次に、透析により未反応のエチレンジアミンとカルボジイミドを除去し、凍結乾燥することによってアミノデキストラン(T2000)およびアミノデキストラン(T500)を回収した。

【0053】

アミノデキストラン(T2000)およびアミノデキストラン(T500)各々1.5mgを0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)3mLに溶解し、ジメチルホルムアミド中に12mg/mLに溶解したマレイミド試薬Sulfo-KMUS(同仁化学社製)を30μL加え、37℃で30分間反応させた。反応後、PD-10(GEヘルスケア社製)でゲル濾過精製し、マレイミド基を導入したアミノデキストラン(T2000)およびアミノデキストラン(T500)を得た。マレイミド基の数を定量した結果、デキストラン(T2000)1分子あたり294個、デキストラン(T500)1分子あたり65個のマレイミド基の存在が確認された。

【実施例9】

【0054】

IgG-ストレプトアビジン結合体-デキストラン複合体の作製

実施例4で作製したc11-9およびc11-14のIgG-ストレプトアビジン結合体の各々を0.1Mリン酸緩衝液(pH7.2)で溶解して2.5mg/mLの溶液とし、等量混合してIgG-ストレプトアビジン結合体溶液を調製した。

【0055】

10

20

30

40

50

このIgG - ストレプトアビジン結合体溶液264 μ Lに対して、ジメチルホルムアミドに1mg/mLとなるように溶解した2 - イミノチオラン (PIERCE社製) を2 μ L添加し、30 で30分間反応させた。反応後、PD - 10 (GEヘルスケア社製) にてゲルろ過精製し、チオール基を導入したIgG - ストレプトアビジン結合体を得た。チオール基の数を定量した結果、IgG - ストレプトアビジン結合体1分子あたり4.8個のチオール基の存在が確認された。

【0056】

次に、実施例8で作製した0.625 μ Mのマレイミド基を導入したアミノデキストラン (T2000) 溶液40 μ Lに8.6 μ Mのチオール基を導入したIgG - ストレプトアビジン結合体290 μ Lを混合し、30 で1時間静置した。その後、0.2Mの2 - メルカプトエタノール (和光純薬社製) 33 μ Lを添加し、4 で一晩反応させ、未反応のマレイミド基をブロックした。反応後、Superdex 200カラム (GEヘルスケア社製) でゲル濾過精製し、図1に示すポイドピーク画分よりIgG - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T2000) 複合体を得た。

【実施例10】

【0057】

IgG - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン複合体へのビオチン化ルシフェラーゼの導入

実施例9で作製したIgG - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T2000) 複合体を、IgG - ストレプトアビジン結合体濃度として570 nMになるように0.1Mリン酸緩衝液 (pH7.2) を用いて調製した。このIgG - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T2000) 複合体溶液300 μ Lに対して、61 μ Mのビオチン化ルシフェラーゼ (キッコマン社製) 溶液3.0 μ Lを加え、25 で1時間反応させることにより、ルシフェラーゼ標識IgG - デキストラン (T2000) 複合体を得た。

【実施例11】

【0058】

Fab' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン複合体の作製

実施例6で作製した4.0mg/mLのc11 - 9Fab' - ストレプトアビジン結合体420 μ Lおよび2.6mg/mLのc11 - 14Fab' - ストレプトアビジン結合体646 μ Lに対して、ジメチルホルムアミドに1mg/mLとなるように溶解した2 - イミノチオラン (PIERCE社製) を2 μ L添加し、30 で30分間反応させた。

【0059】

反応後、PD - 10 (GEヘルスケア社製) にてゲルろ過精製し、チオール基を導入した各々のFab' - ストレプトアビジン結合体を得た。チオール基の数を定量した結果、c11 - 9Fab' - ストレプトアビジン結合体1分子あたり4.6個、c11 - 14Fab' - ストレプトアビジン結合体1分子あたり3.0個のチオール基の存在が確認された。

【0060】

次に、実施例8で作製したマレイミド基を導入したアミノデキストラン (T2000) および (T500) とチオール基を導入したFab' - ストレプトアビジン結合体を混合し、30 で1時間静置した。なお、マレイミド基を導入した各々のアミノデキストランとチオール基を導入した各々のFab' - ストレプトアビジン結合体は以下に示すとおり濃度、液量で組み合わせ、合計4種類の重合体を作製した。

【0061】

1) c11 - 9およびc11 - 14を混合したFab' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T2000) 複合体

21 μ Mのチオール基を導入したc11 - 9Fab' - ストレプトアビジン結合体200 μ L、18 μ Mのチオール基を導入したc11 - 14Fab' - ストレプトアビジン結合体240 μ L、および0.625 μ Mのマレイミド基を導入したアミノデキストラン (T2000) 142 μ Lを混合した。

10

20

30

40

50

2) c 1 1 - 9 F a b ' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体

2 1 μ M のチオール基を導入した c 1 1 - 9 F a b ' - ストレプトアビジン結合体 2 0 0 μ L および 0 . 6 2 5 μ M のマレイミド基を導入したアミノデキストラン (T 2 0 0 0) 7 1 μ L を混合した。

【 0 0 6 2 】

3) c 1 1 - 1 4 F a b ' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体

1 8 μ M のチオール基を導入した c 1 1 - 1 4 F a b ' - ストレプトアビジン結合体 2 4 0 μ L および 0 . 6 2 5 μ M のマレイミド基を導入したアミノデキストラン (T 2 0 0 0) 7 1 μ L を混合した。

4) c 1 1 - 9 および c 1 1 - 1 4 を混合した F a b ' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T 5 0 0) 複合体

【 0 0 6 3 】

2 1 μ M のチオール基を導入した c 1 1 - 9 F a b ' - ストレプトアビジン結合体 2 0 0 μ L 、 1 8 μ M のチオール基を導入した c 1 1 - 1 4 F a b ' - ストレプトアビジン結合体 2 4 0 μ L 、 および 2 . 5 μ M のマレイミド基を導入したアミノデキストラン (T 5 0 0) 1 1 6 μ L を混合した。

【 0 0 6 4 】

反応後、0 . 2 M の 2 - メルカプトエタノール (和光純薬社製) を各々の複合体溶液の 1 / 1 0 量添加し、4 で一晩反応させ、未反応のマレイミド基をブロックした。翌日、Superdex 200 カラム (G E ヘルスケア社製) でゲル濾過精製し、図 2 ~ 5 に示す各サンプルのポイドピーク画分より F a b ' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン複合体を得た。

【 実施例 1 2 】

【 0 0 6 5 】

F a b ' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン複合体へのビオチン化ルシフェラーゼの導入

実施例 1 1 で作製した 4 種類の F a b ' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン複合体を、F a b ' - ストレプトアビジン結合体濃度として 1 . 8 μ M になるように 0 . 1 M リン酸緩衝液 (p H 7 . 2) にて調製した。これらの F a b ' - ストレプトアビジン結合体 - デキストラン複合体溶液 1 0 0 μ L に対して、6 1 μ M のビオチン化ルシフェラーゼ (キッコーマン社製) 3 . 0 μ L を加え、2 5 で 1 時間反応させることにより、以下に示す 4 種類のルシフェラーゼ標識 F a b ' - デキストラン複合体を作製した。

【 0 0 6 6 】

1) ルシフェラーゼ標識 c 1 1 - 9 ・ c 1 1 - 1 4 F a b ' - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体

2) ルシフェラーゼ標識 c 1 1 - 9 F a b ' - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体

3) ルシフェラーゼ標識 c 1 1 - 1 4 F a b ' - デキストラン (T 2 0 0 0) 複合体

4) ルシフェラーゼ標識 c 1 1 - 9 ・ c 1 1 - 1 4 F a b ' - デキストラン (T 5 0 0) 複合体

【 実施例 1 3 】

【 0 0 6 7 】

ルシフェラーゼ標識抗体を用いた酵素免疫測定

W S C を用いたカルボジイミド法により、抗 H C V コア抗原マウスモノクローナル抗体 c 1 1 - 3 、 c 1 1 - 7 、 および A O T 3 を磁性粒子に固定化し、0 . 2 % 抗体固相化磁性粒子を作製した。一方、正常ヒト血清および P C R で確認された 2 種類の H C V 陽性血清 1 0 0 μ L と検体処理液 (6 M 塩酸グアニジン、0 . 5 N H C l 、 1 2 . 5 % T r i t o n X 1 0 0 、 0 . 7 5 % T w e e n 2 0) 1 0 0 μ L を混合し、3 7 で 1 5 分間置くことによって検体の前処理を行った後、反応液 (0 . 1 M リン酸ナトリウム、0 . 1 5 M

10

20

30

40

50

NaCl、1% BSA、0.5% カゼイン、0.05% Tween 20、pH 7.3) 140 μ L と 1M トリス緩衝液 20 μ L を混合し、この混合液 160 μ L に前処理検体 80 μ L を加えることにより、前処理検体を中和した。

【0068】

次に、中和した前処理検体 240 μ L に 0.2% 抗体固相化磁性粒子を 20 μ L 加え、37 で 15 分間置くことにより 1 次反応をおこなった。反応後、磁性粒子を洗浄液にて 3 回洗浄し、実施例 5 で作製したルシフェラーゼ標識 IgG および実施例 10 で作製したルシフェラーゼ標識 IgG - デキストラン (T2000) 複合体を添加した。標識抗体の量は、ルシフェラーゼ濃度として 18 nM に希釈したものを 120 μ L 加え、攪拌後さらに 37 で 15 分間反応させた。反応後、磁性粒子を洗浄液にて 3 回洗浄し、50 mM トリス緩衝液 (pH 8.5) 100 μ L に再懸濁させた。

10

【0069】

磁性粒子を再懸濁したチューブに基質溶液 (ルシフェリン) 100 μ L を加え、ルーマット LB9507 (ベルトールド社製) を使ってルシフェラーゼの発光を測定した。発光測定は、ルシフェリン添加 0.5 秒後から 5 秒間の発光を積算した。その結果、表 1 に示すとおり、ルシフェラーゼ標識 IgG よりもルシフェラーゼ標識 IgG - デキストラン (T2000) 複合体のほうが高い発光値を示した。パネル検体 M の S/N 比から見積もると、およそ 50 ~ 100 倍程度、反応性が向上していると推察された。

【0070】

【表 1】

20

標識抗体	正常ヒト血清	陽性血清L	陽性血清M	L/正	M/正
c11-9 IgG抗体	218	216	314	1.0	1.4
c11-14 IgG抗体	901	869	3453	1.0	3.8
c11-9+c11-14 IgG-T2000	1611	10817	252624	6.7	156.8

(発光値)

(発光比)

30

【実施例 14】

【0071】

ルシフェラーゼ標識抗体断片を用いた酵素免疫測定

標識抗体として実施例 7 および実施例 12 で作製したものを使用した以外は、実施例 13 と同じ方法で実施した。その結果、表 2 に示すとおり、ルシフェラーゼ Fab' 標識よりも、ルシフェラーゼ標識 Fab' - デキストラン (T2000) 複合体またはルシフェラーゼ標識 Fab' - デキストラン (T500) 複合体のほうが高い発光値を示し、IgG の場合と同様に重合化することにより 50 ~ 100 倍程度反応性が向上していることが確認された。また、c11-9 または c11-14 抗体断片を個別に重合化した場合も反応性の向上は見られるが、両者を組み合わせることによりさらに反応性が向上することが確認された。

40

【0072】

【表 2】

標識抗体	正常ヒト血清	陽性血清L	陽性血清M	L/正	M/正
c11-9 Fab'抗体	144	140	208	1.0	1.4
c11-14 Fab'抗体	160	181	1407	1.1	8.8
c11-9 Fab'-T2000	235	483	2232	2.1	9.5
c11-14 Fab'-T2000	287	414	14642	1.4	51.0
c11-9+c11-14 Fab'-T2000	284	2435	211410	8.6	744.4
c11-9+c11-14 Fab'-T500	206	1436	115355	7.0	560.0

(発光値)

(発光比)

【実施例 15】

【0073】

既存のプローブ複合体作製方法を応用して作製した重合化標識抗体との性能比較

【0074】

既存のプローブ複合体作製方法を応用した重合化標識抗体の作製

国際公開 2006/011543 に記載の方法を応用してプローブ複合体を作製した。まず、デキストラン (T2000) 44 mg を秤量し、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) 0.8 mL に溶解し、過ヨウ素酸ナトリウム溶液を 0.4 mL 添加混合した。室温で 2 時間反応させた後、ゲルろ過 (PD-10; GEヘルスケア社製) により余剰の過ヨウ素酸ナトリウムを除去し、ストレプトアビジン (SA) 溶液と CAPS 溶液 (10%) を添加して室温で 5 時間反応させることにより、デキストランにストレプトアビジンを導入した。さらに、反応産物の安定化のため、Dimethylamine Borate (DMBA; 生化学工業社製) 1 mg と 1 M トリス溶液 0.4 mL を添加混合して室温で一晩反応させた。その後、ゲルろ過 (Sephacryl S-300HR 1.6 x 30; GEヘルスケア社製) により反応産物を精製し、デキストラン-SA 結合物を得た。次に、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) を用いてデキストラン-SA 結合物を 2 mg/mL になるように調製し、このデキストラン-SA 結合物溶液 0.5 mL に対して、ジメチルホルムアミドにて 10 mg/mL になるように溶解したマレイミド試薬 EMCS (同仁化学社製) 5 μ L を加え、室温で 1.5 時間反応させた。この反応産物を PD-10 (GEヘルスケア社製) にてゲルろ過精製し、未反応の EMCS を除去することによりマレイミド基を導入したデキストラン-SA 結合物を得た。一方、実施例 2 に記載した方法により c11-9 と c11-14 の Fab' を作製し、各 Fab' を等量混合することにより 0.5 mg/mL の Fab' 溶液を調製した。次に、2 mg/mL のマレイミド基を導入したデキストラン-SA 結合物 0.5 mL に対して、0.5 mg/mL Fab' 溶液を 1 mL 添加して 4 で一晩反応させた。その後、終濃度が 15 mM になるように 2-メルカプトエチルアミンを添加し、室温で 1 時間反応させることにより未反応のマレイミド基をブロックした。反応後、Sephacryl S-300HR カラム (GEヘルスケア社製) にてゲルろ過精製し、デキストラン-SA-Fab' 複合体を得た。精製したデキストラン-SA-Fab' 複合体に含まれる SA は、濃度既知の SA 溶液を標準として、HABA 試薬による発色を指標として定量した。作製したデキストラン T2000-SA-Fab' 重合体を、SA 濃度として 570 nM になるように 0.1 M リン酸緩衝液にて調製した。このデキストラン T2000-SA-Fab' 重合体溶液 300 μ L に対して、ビオチン化ルシフェラーゼ (キッコマン社製) 61 μ M を 3.0 μ L 添加し、25

10

20

30

40

50

で1時間反応させることにより、既存の方法を応用した重合化標識抗体を作製した。

【0075】

ルシフェラーゼ標識抗体を用いた酵素免疫測定

WSCを用いたカルボジイミド法により、抗HCVコア抗原マウスモノクローナル抗体c11-3、c11-7、およびAOT3を磁性粒子に固定化し、0.2%抗体固相化磁性粒子を作製した。一方、正常ヒト血清および2種類のHCVコア抗原陽性血清100 μ Lと検体処理液(6M塩酸グアニジン、0.5NHCl、12.5%TritonX100、0.75%Tween20)100 μ Lを混合し、37 $^{\circ}$ Cで15分間置くことにより検体の前処理を行った後、反応液(0.1Mリン酸ナトリウム、0.15MNaCl、1%BSA、0.5%カゼイン、0.05%Tween20、pH7.3)140 μ Lと1Mトリス緩衝液20 μ Lを混合し、この混合液160 μ Lに前処理検体80 μ Lを加えることにより、前処理検体を中和した。

次に、中和した前処理検体240 μ Lに0.2%抗体固相化磁性粒子を20 μ L加え、37 $^{\circ}$ Cで15分間置くことにより1次反応をおこなった。反応後、磁性粒子を洗浄液にて3回洗浄し、実施例5で作製したルシフェラーゼ標識IgG、実施例10で作製したルシフェラーゼ標識IgG-デキストラン(T2000)複合体、既存の方法を応用して作製した重合化標識抗体を添加した。標識抗体の量は、ルシフェラーゼ濃度として18nMに希釈したものを120 μ L加え、攪拌後さらに37 $^{\circ}$ Cで15分間反応させた。反応後、磁性粒子を洗浄液にて3回洗浄し、50mMトリス緩衝液(pH8.5)100 μ Lに再懸濁させた。

磁性粒子を再懸濁したチューブに基質溶液(ルシフェリン)100 μ Lを加え、ルーマットLB9507(ベルトールド社製)を使ってルシフェラーゼの発光を測定した。発光測定は、ルシフェリン添加0.5秒後から5秒間の発光を積算した。その結果、表3に示すとおりルシフェラーゼ標識IgG-デキストラン(T2000)複合体は既存の方法を応用して作製した重合化標識抗体よりも高い反応性を示した。パネル検体LおよびMのS/N比から見積もると、ルシフェラーゼ標識IgG-デキストラン(T2000)複合体は、既存の方法を応用して作製した重合化標識抗体よりも、およそ3~5倍程度、反応性が向上していた。なお、既存の方法を応用して作製した重合化標識抗体の場合、使用する抗体量を多くしても、そのS/N比に大きな改善は見られなかった。

【0076】

【表3】

標識抗体	正常ヒト血清	陽性血清L	陽性血清M	L/正	M/正
c11-9 IgG抗体	218	216	314	1.0	1.4
c11-14 IgG抗体	901	869	3,453	1.0	3.8
c11-9+c11-14 IgG-T2000	1,611	10,817	252,624	6.7	156.8
既存の方法 を応用した 重合化標識 抗体	1,242	1,792	72,601	1.4	58.4

(発光値)

(発光値比)

【実施例16】

【0077】

ビオチン化PODへの応用

【0078】

POD標識Fab'の作製

実施例6で作製した $15.4\mu\text{M}$ のc11-9およびc11-14のFab'-ストレプトアビジン結合体 $30\mu\text{L}$ に対して、 $56.8\mu\text{M}$ のビオチン化POD(インビトロジェン社製) $8.1\mu\text{L}$ を加えて、4で一晚置くことによりPOD標識Fab'を作製した。

【0079】

Fab'-ストレプトアビジン結合体-デキストラン(T2000)複合体へのビオチン化PODの導入

実施例11で作製したc11-9およびc11-14を混合したFab'-ストレプトアビジン結合体-デキストラン(T2000)複合体を、Fab'-ストレプトアビジン結合体濃度として $1.4\mu\text{M}$ になるように 0.1M リン酸緩衝液(pH7.2)にて調製した。この複合体溶液 $50\mu\text{L}$ に対して、 $56.8\mu\text{M}$ のビオチン化POD(インビトロジェン社製) $1.2\mu\text{L}$ を加えて、4で一晚置くことによりPOD標識Fab'-デキストラン(T2000)複合体を作製した。

10

【0080】

POD標識抗体を用いた酵素免疫測定

WSCを用いたカルボジイミド法により、抗HCVコア抗原マウスモノクローナル抗体c11-3、c11-7、およびAOT3を磁性粒子に固定化し、 0.2% 抗体固相化磁性粒子を作製した。一方、組み換え体HCVコア抗原(c11)を 0nM 、 0.12nM 、 1.2nM になるように正常ヒト血清で希釈し、これらのサンプル $100\mu\text{L}$ と検体処理液(6M 塩酸グアニジン、 0.5NHCl 、 12.5% TritonX100、 0.75% Tween20) $100\mu\text{L}$ を混合し、37で15分間置くことによってサンプルの前処理を行った。さらに、反応液(0.1M リン酸ナトリウム、 0.15MNaCl 、 1% BSA、 0.5% カゼイン、 0.05% Tween20、pH7.3) $140\mu\text{L}$ と 1M トリス緩衝液 $20\mu\text{L}$ を混合し、この混合液 $160\mu\text{L}$ に前処理検体 $80\mu\text{L}$ を加えることにより、前処理検体を中和した。

20

次に、中和した前処理検体 $240\mu\text{L}$ に 0.2% 抗体固相化磁性粒子を $20\mu\text{L}$ 加え、37で15分間置くことにより1次反応をおこなった。反応後、磁性粒子を洗浄液にて3回洗浄し、上記方法により作製したPOD標識Fab'およびPOD標識Fab'-デキストラン(T2000)複合体を添加した。標識抗体の量は、POD濃度として 18nM に希釈したものを $120\mu\text{L}$ 加え、攪拌後さらに37で15分間反応させた。反応後、磁性粒子を洗浄液にて3回洗浄した。

30

次に、磁性粒子のチューブに基質溶液(ルミノール) $200\mu\text{L}$ を加え、ルーマットLB9507(ベルトールド社製)を使ってPODの発光を測定した。発光測定は、ルミノール添加12秒後から3秒間の発光を積算した。その結果、表4に示すとおりPOD標識Fab'よりもPOD標識Fab'-デキストラン(T2000)複合体のほうが高い発光値を示し、ルシフェラーゼの場合と同様に本発明によるシグナルの増幅が確認された。以上の結果から本発明はルシフェラーゼ以外の酵素を用いて実施可能であることが示された。

【0081】

【表 4】

標識抗体	正常ヒト血清 (0nM コア抗原)	0.12nM コア抗原	1.2nM コア抗原	0.12nM / 正	1.2nM / 正
c11-9 Fab'-POD	2,757	2,251	4,627	0.8	1.7
c11-14 Fab'-POD	3,049	3,450	8,850	1.1	2.9
c11-9+c11-14 Fab'-T2000 -POD	3,124	24,395	179,264	7.8	57.4

(発光値)

(発光値比)

【実施例 17】

【0082】

ビオチン化 FITC への応用

【0083】

FITC 標識 Fab' の作製

実施例 6 で作製した $15.4 \mu\text{M}$ の c11-9 および c11-14 の Fab'-ストレプトアビジン結合体 $30 \mu\text{L}$ に対して、 $160 \mu\text{M}$ のビオチン化 FITC (インビトロジェン社製) $2.9 \mu\text{L}$ を加えて、4 で一晩置くことにより FITC 標識 Fab' を作製した。

【0084】

Fab'-ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T2000) 複合体へのビオチン化 FITC の導入

実施例 11 で作製した c11-9 および c11-14 を混合した Fab'-ストレプトアビジン結合体 - デキストラン (T2000) 複合体を、Fab'-ストレプトアビジン結合体濃度として $6.3 \mu\text{M}$ になるように 0.1M リン酸緩衝液 (pH 7.2) にて調製した。この複合体溶液 $20 \mu\text{L}$ に対して、 $160 \mu\text{M}$ のビオチン化 FITC (インビトロジェン社製) $1.0 \mu\text{L}$ を加えて、4 で一晩置くことにより FITC 標識 Fab'-デキストラン (T2000) 複合体を作製した。

【0085】

FITC 標識抗体を用いた蛍光免疫測定

WSC を用いたカルボジイミド法により、抗 HCV コア抗原マウスモノクローナル抗体 c11-3、c11-7、および AOT3 を磁性粒子に固定化し、 0.2% 抗体固相化磁性粒子を作製した。一方、組み換え体 HCV コア抗原 (c11) を 0 nM 、 0.12 nM 、 1.2 nM になるように正常ヒト血清で希釈し、これらのサンプル $100 \mu\text{L}$ と検体処理液 (6 M 塩酸グアニジン、 0.5 N HCl、 12.5% Triton X100、 0.75% Tween 20) $100 \mu\text{L}$ を混合し、37 で 15 分間置くことによってサンプルの前処理を行った。さらに、反応液 (0.1 M リン酸ナトリウム、 0.15 M NaCl、 1% BSA、 0.5% カゼイン、 0.05% Tween 20、pH 7.3) $140 \mu\text{L}$ と 1 M トリス緩衝液 $20 \mu\text{L}$ を混合し、この混合液 $160 \mu\text{L}$ に前処理検体 $80 \mu\text{L}$ を加えることにより、前処理検体を中和した。

次に、中和した前処理検体 $240 \mu\text{L}$ に 0.2% 抗体固相化磁性粒子を $20 \mu\text{L}$ 加え、37 で 15 分間置くことによって 1 次反応をおこなった。反応後、磁性粒子を洗浄液にて 3 回洗浄し、上記方法により作製した FITC 標識 Fab' および FITC 標識 Fab'-デキストラン (T2000) 複合体を添加した。標識抗体の量は、FITC 濃度として 65 nM に希釈したものを $200 \mu\text{L}$ 加え、攪拌後さらに 4 で一晩反応させた。反応後、磁性粒子を洗浄液にて 3 回洗浄した。

次に、磁性粒子のチューブに 10 mM PBS (pH 7.4) を $200 \mu\text{L}$ 加え、磁性粒子を懸濁し、懸濁液を 96 穴白色プレート (サーモフィッシャー社製) に分注した。そ

10

20

30

40

50

の後、蛍光プレートリーダー infinite 200 (テカン社製) を使って FITC の蛍光を測定した。蛍光測定の条件は、485 nm の波長で励起し、535 nm の蛍光を測定した。その結果、表 5 及び図 6 に示すとおり FITC 標識 Fab' よりも FITC 標識 Fab' - デキストラン (T2000) 複合体のほうが高い蛍光活性を示し、ルシフェラーゼや POD の場合と同様に本発明によるシグナルの増幅が確認された。以上の結果から本発明は酵素以外の低分子標識物を用いても実施可能であることが示された。

【0086】

【表 5】

標識抗体	正常ヒト血清 (0nM コア抗原)	0.12nM コア抗原	1.2nM コア抗原	0.12nM △蛍光強度	1.2nM △蛍光強度
c11-9 Fab'-FITC	15,688	14,901	15,223	-787	-465
c11-14 Fab'-FITC	14,510	14,533	15,469	23	959
c11-9+c11-14 Fab' - T2000 -FITC	15,066	19,832	26,506	4,765	11,439

(蛍光強度)

10

【実施例 18】

【0087】

標識化プローブ - 水溶性担体複合体の加速安定性

本発明に係る標識化プローブ - 水溶性担体複合体の加速安定性を試験した。詳細には、実施例 12 で作製したルシフェラーゼ標識 c11-9・c11-14 Fab' - デキストラン (T2000) 複合体について、4℃ 保存条件下における活性と、37℃、1 週間での加速条件後の残存活性を測定し、比較検討した。活性の測定は実施例 13 と同じ方法で行った。結果は表 6 に示すとおりであった。

20

【0088】

【表 6】

	正常ヒト血清	陽性血清 L	陽性血清 M	L/正	M/正
4℃ 保存	260	2,573	238,771	9.9	917.2
37℃、1 週間	257	2,346	207,284	9.1	806.6
残存活性 4℃/37℃	99.8%	91.1%	86.9%	92.2%	87.8%

30

【0089】

上記結果より、本発明に係る標識化プローブ - 水溶性担体複合体が優れた加速安定性を示すことが実証された。即ち、本発明に係る標識化プローブ - 水溶性担体複合体は、37℃ で 1 週間保存しても、約 90% 程度乃至それ以上の残存活性を保持したことが観察された。また、当該加速条件に伴うバックグラウンドの上昇は観察されなかった。

【0090】

これらの結果から、本発明により、被験物質と特異的に結合する高感度かつ安定な標識化プローブ - 水溶性担体複合体が得られ、この標識化プローブ - 水溶性担体複合体を用いることにより、従来と比較して、より高感度かつ安定的な検出・測定が可能となることが実証された。また、本願発明が酵素以外の低分子標識物に対しても有効であることが実証された。

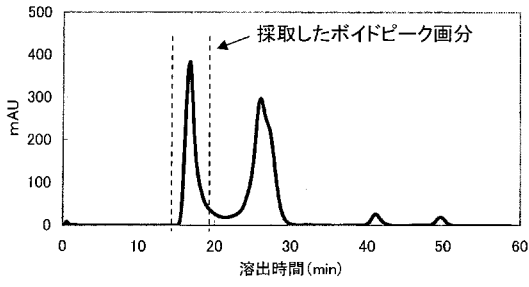
40

【産業上の利用可能性】

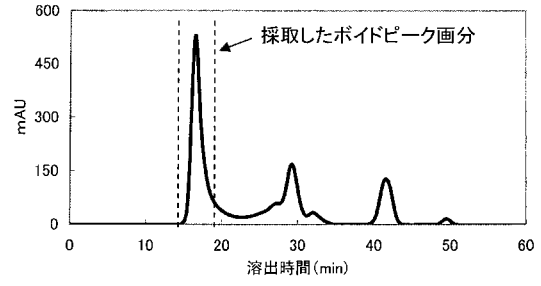
【0091】

被験物質とプローブが特異的に結合する事を利用して、検体中の被験物質を検出・測定する方法において、本発明の標識化プローブ - 水溶性担体複合物を用いることにより、従来と比較して、より高感度かつ安定な検出・測定が可能となる。

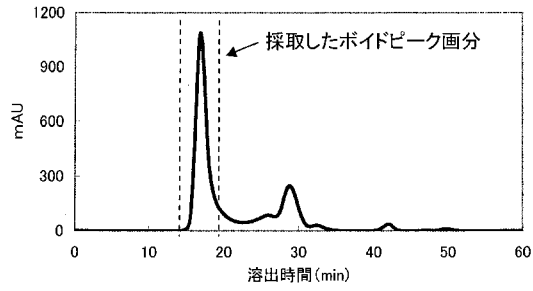
【 図 1 】



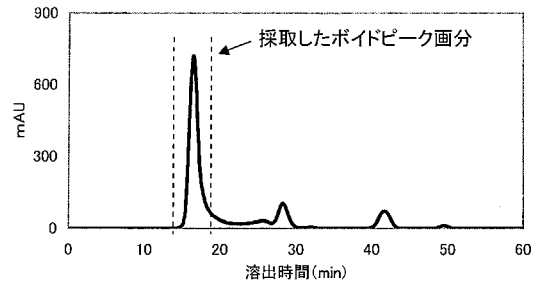
【 図 3 】



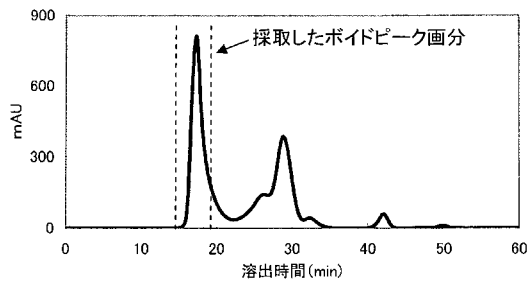
【 図 2 】



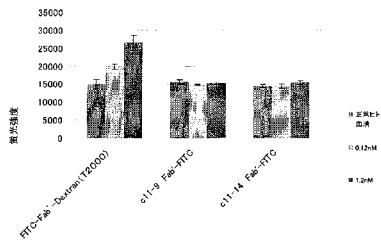
【 図 4 】



【 図 5 】



【 図 6 】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2011/059150
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, G01N33/548(2006.01)i		
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) G01N33/53, G01N33/548		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-122302 A (Kikkoman Corp.), 29 May 2008 (29.05.2008), claims; paragraphs [0007], [0012] (Family: none)	1-14
A	JP 2006-288406 A (Nanosphere, Inc.), 26 October 2006 (26.10.2006), fig. 51 to 54 & JP 2004-515208 A & WO 2001/073123 A2	1-14
A	JP 03-128460 A (Nippon Shoji Kaisha, Ltd.), 31 May 1991 (31.05.1991), & US 5378608 A & EP 620438 A1 & EP 405578 A2 & DE 69021953 C & DE 69021953 D & NO 902899 A & ES 2078923 T & FI 903228 A & DK 405578 T & FI 903228 A0	1-14
<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 30 June, 2011 (30.06.11)		Date of mailing of the international search report 12 July, 2011 (12.07.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/059150

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-244101 A (Canon Inc.), 22 October 2009 (22.10.2009), (Family: none)	1-14
A	JP 2008-520963 A (Sienna Cancer Diagnostics Ltd.), 19 June 2008 (19.06.2008), & US 2009/0208932 A1 & EP 1828405 A & WO 2006/053380 A1 & CA 2595673 A & CN 101115847 A	1-14
A	JP 11-295313 A (Eiken Chemical Co., Ltd.), 29 October 1999 (29.10.1999), (Family: none)	1-14

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2011/059150									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/548(2006.01)i											
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. G01N33/53, G01N33/548											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2011年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2011年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2011年	日本国実用新案登録公報	1996-2011年	日本国登録実用新案公報	1994-2011年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2011年										
日本国実用新案登録公報	1996-2011年										
日本国登録実用新案公報	1994-2011年										
国際調査で使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)											
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 請求項の番号									
A	JP 2008-122302 A (キッコーマン株式会社) 2008.05.29, 【特許請求の範囲】、【0007】、【0012】 (ファミリーなし)	1-14									
A	JP 2006-288406 A (ナノスフェア インコーポレイテッド) 2006.10.26, 【図51】 - 【図54】 & JP 2004-515208 A & WO 2001/073123 A2	1-14									
<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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 30.06.2011		国際調査報告の発送日 12.07.2011									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 白形 由美子	2J 3496								
		電話番号 03-3581-1101	内線 3252								

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 1 / 0 5 9 1 5 0

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 請求項の番号
A	JP 03-128460 A (日本商事株式会社) 1991.05.31, & US 5378608 A & EP 620438 A1 & EP 405578 A2 & DE 69021953 C & DE 69021953 D & NO 902899 A & ES 2078923 T & FI 903228 A & DK 405578 T & FI 903228 A0	1-14
A	JP 2009-244101 A (キヤノン株式会社) 2009.10.22, (ファミリーなし)	1-14
A	JP 2008-520963 A (シーナ・キャンサー・ダイアグノスティクス・リミテッド) 2008.06.19, & US 2009/0208932 A1 & EP 1828405 A & WO 2006/053380 A1 & CA 2595673 A & CN 101115847 A	1-14
A	JP 11-295313 A (栄研化学株式会社) 1999.10.29, (ファミリーなし)	1-14

フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I テーマコード(参考)
 G 0 1 N 33/543 5 4 1 Z
 C 0 7 K 19/00
 C 0 7 K 16/00

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

Fターム(参考) 4H045 AA10 BA42 BA70 CA40 DA76 EA50 FA50

(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。

专利名称(译)	标记探针 - 水溶性载体复合物		
公开(公告)号	JPWO2011129357A1	公开(公告)日	2013-07-18
申请号	JP2012510666	申请日	2011-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社 株式会社先端生命科学研究所		
申请(专利权)人(译)	荣研化学株式会社 株式会社先端生命科学研究所		
[标]发明人	大廣義幸 高安進		
发明人	大廣 義幸 高安 進		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/548 C07K19/00 C07K16/00		
CPC分类号	G01N33/581 G01N33/532 G01N33/54353 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/543.525.G G01N33/543.525.E G01N33/53.U G01N33/548.A G01N33/543.501.D G01N33/543.541.Z C07K19/00 C07K16/00		
F-TERM分类号	4H045/AA10 4H045/BA42 4H045/BA70 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA50		
优先权	2010092953 2010-04-14 JP		
其他公开文献	JP5675782B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

测试物质敏感，用于执行稳定的检测和测量标记的探针 - 使得在高重现性载体复合物。 标记探针 - 通过利用特异性结合抗生物素蛋白和生物素链霉亲和等水溶性载体，抗生物素蛋白，的结合，以及抗生物素蛋白化合物和探针的结合，与载体之前的结合进行。也就是说，结合该通过结合缀合物和聚合物的水溶性载体结合到待测物质，抗生物素蛋白的探针的物质和抗生物素蛋白后 - 以制备水溶性载体复合物，抗生物素蛋白探针 - 水通过经由特定抗生物素蛋白和生物素结合可以被检测到混合生物素化标签性支持复杂的和具有高灵敏度，稳定的标记探针测量测试物质 - 水溶性载体复合物具有良好的重复性的获得。 系统技术领域

(19) 日本国特許庁 (JP)	再公表特許(A1)	(11) 国際公開番号 WO2011/129357
発行日 平成25年7月18日 (2013. 7. 18)	(43) 国際公開日 平成23年10月20日 (2011. 10. 20)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考) 4H045
G01N 33/543 (2006.01)	G01N 33/543 525G	
G01N 33/53 (2006.01)	G01N 33/543 525E	
G01N 33/548 (2006.01)	G01N 33/53 U	
C07K 19/00 (2006.01)	G01N 33/548 A	
C07K 16/00 (2006.01)	G01N 33/543 501D	
	審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 23 頁) 最終頁に続く	
出願番号 特願2012-510666 (P2012-510666)	(71) 出願人 000120456	
(2) 国際出願番号 PCT/JP2011/059150	栄研化学株式会社	
(2) 国際出願日 平成23年4月13日 (2011. 4. 13)	東京都台東区台東4丁目19番9号	
(3) 優先権主張番号 特願2010-92953 (P2010-92953)	(71) 出願人 399115851	
(3) 優先日 平成22年4月14日 (2010. 4. 14)	株式会社先端生命科学研究所	
(3) 優先権主張国 日本国 (JP)	埼玉県和光市丸山台2丁目10番23号	
	(74) 代理人 110001173	
	特許業務法人川口国際特許事務所	
	(72) 発明者 大廣 義幸	
	埼玉県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社 野木事業所内	
	(72) 発明者 高安 進	
	埼玉県下都賀郡野木町野木143 栄研化学株式会社 野木事業所内	
	最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 標識化プローブ-水溶性担体複合体