

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-58208

(P2008-58208A)

(43) 公開日 平成20年3月13日(2008.3.13)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543	5 O 1 D 4 B O 2 4
C 1 2 N 15/09 (2006.01)	C 1 2 N 15/00	Z N A A 4 B O 6 4
C O 7 K 16/00 (2006.01)	C O 7 K 16/00	4 H O 4 5
C 1 2 P 19/34 (2006.01)	C 1 2 P 19/34	A
C 4 O B 40/08 (2006.01)	C 4 O B 40/08	
審査請求 未請求 請求項の数 17 O L (全 31 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2006-237181 (P2006-237181)
 (22) 出願日 平成18年9月1日(2006.9.1)

特許法第30条第1項適用申請有り 平成18年3月13日 社団法人 日本化学会発行の「日本化学会第86春季年会(2006)講演予稿集CD-ROM」に発表

特許法第30条第1項適用申請有り 平成18年3月27日 社団法人 日本農芸化学会主催の「日本農芸化学会2006年度(平成18年度)大会」において文書をもって発表

(71) 出願人 590002389
 静岡県
 静岡県静岡市葵区追手町9番6号
 (71) 出願人 593025712
 株式会社ビーエル
 静岡県沼津市神田町6番26号
 (74) 代理人 100091502
 弁理士 井出 正威
 (74) 代理人 100125933
 弁理士 野上 晃
 (72) 発明者 太田 俊也
 静岡県沼津市大岡3981-1 静岡県沼津工業技術センター内

最終頁に続く

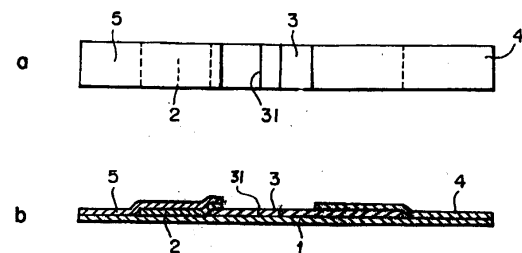
(54) 【発明の名称】 単鎖可変部抗体を用いたイムノクロマト法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 抗原に対する結合性を有する組換え蛋白を用いたサンドイッチ式免疫測定法、とりわけイムノクロマトグラフィー測定法、並びに、これに用いるに好適な組換え蛋白を提供する。

【解決手段】 測定対象である抗原に対する第一の結合物と第二の結合物とを用いたサンドイッチ式免疫測定法であって、第一の結合物と第二の結合物の少なくとも一つが、該抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えた組換え蛋白からなる。組換え蛋白はファージディスプレイ法で得られた一本鎖(単鎖)可変部断片型抗体(scFv抗体)であることが好ましい。

【選択図】 図8



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

測定対象である抗原に対する第一の結合物と第二の結合物とを用いたサンドイッチ式免疫測定法であって、第一の結合物と第二の結合物の少なくとも一つが、該抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えた組換え蛋白からなることを特徴とするサンドイッチ式免疫測定法。

【請求項 2】

第一の結合物と第二の結合物の少なくとも一つが、配列番号 1 または配列番号 2 の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列を備える組換え蛋白である請求項 1 に記載の免疫測定法。

10

【請求項 3】

第一の結合物と第二の結合物の両者が、配列番号 1 の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列を備える組換え蛋白である請求項 1 に記載の免疫測定法。

【請求項 4】

前記第一の抗体および第二の抗体の何れか一方を担体に固定しておく請求項 1 乃至 3 の何れか 1 項に記載の免疫測定法。

【請求項 5】

測定対象である抗原に対する第一の結合物を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、前記抗原に対する第二の結合物と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる抗原と前記第二の結合物との複合体を前記捕捉部位に捕捉させるイムノクロマトグラフィー測定法において、前記第一の結合物と前記第二の結合物の少なくとも一つが、該抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えた組換え蛋白からなることを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定法。

20

【請求項 6】

第一の結合物と第二の結合物の少なくとも一つが、配列番号 1 または配列番号 2 の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列を備える組換え蛋白である請求項 5 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 7】

第一の結合物と第二の結合物の両者が、配列番号 1 の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列を備える組換え蛋白である請求項 6 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

30

【請求項 8】

前記第二の結合物は金属コロイドまたはラテックスで標識されている請求項 5 乃至 7 の何れか 1 項に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 9】

前記膜担体がニトロセルロース膜である請求項 5 乃至 8 の何れか 1 項に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 10】

測定対象である抗原に対する第一の結合物と第二の結合物と膜担体とを少なくとも備え、前記第一の結合物は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の結合物は適当な標識物質で標識され、かつ、前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なよう配置されてなるイムノクロマト法テストストリップにおいて、前記第一の結合物と前記第二の結合物の少なくとも一つが、該抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えた組換え蛋白からなることを特徴とするイムノクロマト法テストストリップ。

40

【請求項 11】

第一の結合物と第二の結合物の少なくとも一つが、配列番号 1 または配列番号 2 の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列を備える組換え蛋白である請求項 10 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

50

【請求項 1 2】

第一の結合物と第二の結合物の両者が、配列番号 1 の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列を備える組換え蛋白である請求項 1 0 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 1 3】

前記第二の結合物は金属コロイドまたはラテックスで標識されている請求項 1 0 乃至 1 2 の何れか 1 項に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 1 4】

前記膜担体がニトロセルロース膜である請求項 1 0 乃至 1 3 の何れか 1 項に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 1 5】

配列番号 1 または配列番号 2 の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列を備える組換え蛋白。

【請求項 1 6】

抗体遺伝子群を T ベクターにライゲーションして増殖させる工程と、この増殖された T ベクターを分離する工程と、この分離された T ベクターから抗体遺伝子群を切り出してファージミドベクターにライゲーションして宿主に導入する工程とを備えることを特徴する抗体遺伝子ライブラリーの作製方法。

【請求項 1 7】

抗体遺伝子群を T ベクターにライゲーションして増幅させる工程と、この増殖された T ベクターを制限酵素処理するとともに、予めコントロールインサートが挿入されたファージミドベクターを前記制限酵素と同様の制限酵素で処理して前記制限酵素処理された T ベクターと混合した後ライゲーションする工程と、このライゲーションに付された混合物に前記コントロールインサート及び T ベクターを消化する制限酵素を作用させた後、抗体遺伝子群がライゲーションされたファージミドベクターを選択的に宿主に導入する工程とを備えることを特徴する抗体遺伝子ライブラリーの作製方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本発明は、抗原に対する結合性を有する組換え蛋白、特に、一本鎖（単鎖）可変部断片型抗体（s c F v 抗体）を用いたサンドイッチ式免疫測定法、特に、イムノクロマトグラフィ測定法及びイムノクロマト法テストストリップ、並びに、これに用いるに好適な組換え蛋白に関する。

【背景技術】**【0 0 0 2】**

抗原を 2 つの抗体でサンドイッチすることにより検出するサンドイッチ式免疫測定法では、現在、モノクローナル抗体が広く使用されている。

【0 0 0 3】

モノクローナル抗体は、精製した抗原でマウスを免疫し、数ヶ月後に抗原に対する抗体価が十分に上昇していることを確認した後、脾臓を取り出し、マウスミエローマー細胞と融合させ、ハイブリドーマを作製する。その後、抗原を認識する抗体を産生している融合細胞をクローニングする。次に、その細胞を培養するか、マウス腹腔内に移植することで、同一な性能を持った抗原を認識する抗体を作製することができる。しかしながら、上記方法により抗体を作製するためには、多くの労力、時間、費用がかかる。

【0 0 0 4】

一方、抗体を取得する他の方法として、最近、ファージ提示法が研究されている。

【0 0 0 5】

ファージ提示法に関する技術的経緯は、伊庭、抗体作製の新技术、癌の臨床、4 8 巻、2 号、p 5 5 - 6 6、2 0 0 2、特許 W O 0 1 / 6 2 9 0 7、堀内ら、蛋白質・核酸・酵

10

20

30

40

50

素, Vol 34, No 14, p. 2589 - 2598、(1992)などに記載されており、これを整理すると次のようになる。

【0006】

ファージディスプレイ法はSmithにより1985年(Smith GP Science 1985 228:4075 1315-1317)に考案された。

【0007】

Parmley, S.F., Smith, G.P.は1988年(Science, 1988, 240, 1038-1041)にg3p蛋白のシグナルペプチド直後の2番目と3番目のアミノ酸の間に異種蛋白の遺伝子を組み込み雑種蛋白としてg3pを発現させ、本来のg3pの機能も損なわれないことを示した。

10

【0008】

Better et al (1988) (Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH Science 1988, 240:4855 1041-3)とSkerraとPlukthun (1988) (Skerra A, Plukthun A Science 1988, 240:4855 1038-41)は、Fab型とFv型抗体を大腸菌中で分泌シグナル発現で活性型抗体の作製法を示した。

【0009】

Huse, W.D., Lernerらは、(Science 1989, 246, 1275-1281) λ-ファージを用いてハプテン(NPN)に対する抗体を単離できることを報告した。

20

【0010】

Orlandi R et al. (Proc Natl Acad Sci USA 1989 86:103833-7, Sastry L et al. Proc Natl Acad Sci USA 1989 86:155728-32)は、1988年に発表されたPCR法を用い、抗体可変領域をコードするVH DJH、VL JL遺伝子を増幅するためのプライマー配列を考案した。

【0011】

Huse WD et al. (Science 1989 246:4935 1275-81, Ward GE et al. J Clin Microbiol 1989 27:122717-23)は、これらのプライマーによって増幅した抗体遺伝子を利用して、大腸菌中で抗体を産生させるためのベクターが構築された。

30

【0012】

McCafferty J, Winter et al. (Nature 348 1990, 552-554)は、繊維上ファージに活性を持った形でscFv抗体を提示する方法を示した。この時点では、抗体遺伝子はファージDNAに組み込んでいた。この技術は、目的抗原に結合するファージを単離すればその抗体遺伝子を単離できたことになる。

【0013】

Nissim A, Winter G et al. (EMBO J 1994 13:3692-8)は、親和性向上試みの一つとして、人為的に遺伝子に変異を導入する方法を報告している。これは、単離した全てのVH、VL遺伝子と、JH、JL遺伝子の間にランダムな配列を挿入する半人工的配列を持つ抗体ライブラリーを作製することにより、親和性に優れた抗体の取得を可能とする抗体ライブラリーを得るというものである。

40

【0014】

De Kruijf J, Boel E, Logtenberg T (J Mol Biol 1995 248:197-105)も同様のライブラリー作製法を報告している。

【0015】

Vaughan TJ et al. (Nat Biotechnol 1996 1

50

4 : 3 3 0 9 - 1 4) は、ライブラリーの大きさを拡充し十分な大きさの抗体レパートリーを確保したとしている。

【 0 0 1 6 】

ファージ提示法の利点として次のことが考えられる。

(1) 短期間で作製可能である。すなわち、ファージ抗体はハイブリドーマ法から作製するモノクローナル抗体に比較して、開発期間を大幅に短縮できる可能性が高い。また、大腸菌での培養により抗体を作製できるため安価に短期で作製できる。

(2) 遺伝子配列が解かるので、改変が容易であるため、特異性・反応性を容易に向上させることが期待でき、また、修飾が容易であるため、His - Tagなどの精製用タグやGFPなど蛍光タンパクを導入することが容易になり、精製や検出も容易となる。

(3) プラスミドDNAとしておけば、- 2 0 で半永久的に、また、常温でも数日間保てるので、保存が容易である。

(4) 抗体価の上昇が十分ならば、脾臓の一部すなわち10%以下、場合によっては1%でも作製が可能であるので、ハイブリドーマ法との併用も可能である。理論的には、血液のみから作製できる。

(5) マウス以外の動物でもモノクローナル抗体が作製できる。

(6) ハイブリドーマ法に比べスクリーニング時の抗原量が少なくてよい。

(7) 抗体価が必ずしも十分上昇していなくても作製可能である。

(8) 免疫は必ずしも必須ではないので、通常マウス等で免疫出来ない毒性のある物質に対しても抗体を作製できる。

【 0 0 1 7 】

以上が一般的に言われている極めて優れた利点であるが、実際に実用的に利用できている例は稀である。原因の一つは、ライブラリー作製が極めて高度な技術蓄積なくてはできないことにあった。

【 0 0 1 8 】

【特許文献1】国際公開第WO 0 1 / 6 2 9 0 7号パンフレット

【非特許文献1】伊庭、抗体作製の新技術、癌の臨床、48巻、2号、p 5 5 - 6 6、2002

【非特許文献2】堀内ら、蛋白質・核酸・酵素, Vol 3 4, No 1 4, p. 2 5 8 9 - 2 5 9 8、(1 9 9 2)

【非特許文献3】Smith G. P., Science 1 9 8 5 2 2 8 : 4 0 7 5 1 3 1 5 - 1 3 1 7

【非特許文献4】Parmley, S. F., Smith, G. P., Science, 1 9 8 8, 2 4 0, 1 0 3 8 - 1 0 4 1

【非特許文献5】Better M, Chang CP, Robinson RR, Horwitz AH, Science 1 9 8 8, 2 4 0 : 4 8 5 5 1 0 4 1 - 3

【非特許文献6】Skerra A, Plukthun A, Science 1 9 8 8, 2 4 0 : 4 8 5 5 1 0 3 8 - 4 1

【非特許文献7】Huse. W. D., Lerner et al., Science 1 9 8 9, 2 4 6, 1 2 7 5 - 1 2 8 1

【非特許文献8】Orlandi R et al., Proc Natl Acad Sci USA 1 9 8 9 8 6 : 1 0 3 8 3 3 - 7

【非特許文献9】Sastriy L et al. Proc Natl Acad Sci USA 1 9 8 9 8 6 : 1 5 5 7 2 8 - 3 2

【非特許文献10】Huse WD et al., Science 1 9 8 9 2 4 6 : 4 9 3 5 1 2 7 5 - 8 1

【非特許文献11】Ward GE et al., J Clin Microbiol 1 9 8 9 2 7 : 1 2 2 7 1 7 - 2 3

【非特許文献12】McCafferty J, Winter et al., Nature 3 4 8 1 9 9 0, 5 5 2 - 5 5 4

【非特許文献 13】Nissim A, Winter G et al., EMBO J 1994 13: 3692-8

【非特許文献 14】De Kruif J, Boel E, Logtenberg T, J Mol Biol 1995 248: 197-105

【非特許文献 15】Vaughan TJ et al., Nat Biotechnol 1996 14: 3309-14

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0019】

以上のように、目的とするモノクローナル抗体を産生するモノクローナル抗体産生株を選抜、維持するためには、かなりの時間、労力、費用および設備を必要とする。とりわけ、ハイブリドーマ法におけるスクリーニングは多大な労力の上に成り立つ。その上、この方法での最大の欠点は、細胞融合されたものしか扱っていない点である。

10

【0020】

一方、ファージ提示法に基づく作製方法は、抗体遺伝子を直接扱うため抗体遺伝子群を網羅するいわゆる抗体遺伝子ライブラリーの作製ができれば、原理的には抗体の抗原認識部位すなわち scFv 抗体及び抗体の可変領域の DNA 及びアミノ酸配列を解明することができる。したがって、大腸菌などの異種生物での生産やその配列情報を基に人工的に抗原認識分子の合成が可能になる。しかしながら、非免疫ライブラリーから親和性または特異性の高い抗体を得ることは容易ではなく、変異導入などの親和性等の機能向上を経て利用できるレベルになるのが通例である。また、ライブラリー作製技術をもつ一部の限られた研究機関のみが利用できているに過ぎない。

20

【0021】

ライブラリー作製では、抗体遺伝子群にその切断部位を持たないであろう 8 塩基認識制限酵素が良く使われる。

本発明者らは、ライブラリー作製の失敗の多くは制限酵素処理がうまくいっているかどうか確かめる手段がなく次の工程へ行くことにあることに着目した。

【課題を解決するための手段】

【0022】

そこで、本発明者らは、DNA 断片を一旦 TA クローニングでベクターに組入れ、DNA 量を増やすとともに、制限酵素切断を確実にする方法を発明した。このことにより、ファージ抗体遺伝子ライブラリーの作製を確実なものとした。その実証として CRP を認識するマウス scFv 抗体をファージ表面に提示させたファージディスプレイライブラリーから単離し、その可変領域のアミノ酸配列を決定することに成功した。そして、このライブラリーから選択した組換え蛋白が、サンドイッチ式免疫測定法、とりわけイムノクロマトグラフィー測定法において使用でき、高感度な免疫測定を可能にすることを見出し、本発明を完成するに至った。

30

【0023】

本発明の一面によれば、測定対象である抗原に対する第一の結合物と第二の結合物とを用いたサンドイッチ式免疫測定法であって、第一の結合物と第二の結合物の少なくとも一つが、該抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えた組換え蛋白からなることを特徴とするサンドイッチ式免疫測定法が提供される。

40

【0024】

また、本発明の他の局面によれば、測定対象である抗原に対する第一の結合物を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、前記抗原に対する第二の結合物と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる抗原と前記第二の結合物との複合体を前記捕捉部位に捕捉させるイムノクロマトグラフィー測定法において、前記第一の結合物と前記第二の結合物の少なくとも一つが、該抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えた組換え蛋白からなることを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定法が提供される

50

。

【 0 0 2 5 】

また、本発明の更に他の局面によれば、測定対象である抗原に対する第一の結合物と第二の結合物と膜担体とを少なくとも備え、前記第一の結合物は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の結合物は適当な標識物質で標識され、かつ、前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なよう配置されてなるイムノクロマト法テストストリップにおいて、前記第一の結合物と前記第二の結合物の少なくとも一つが、該抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えた組換え蛋白からなることを特徴とするイムノクロマト法テストストリップが提供される。

【 0 0 2 6 】

また、本発明によれば、C反応性タンパク(CRP)を測定する本発明の免疫測定法で第一の結合物及び/または第二の結合物として使用するに好適な組換え蛋白として、配列番号1または配列番号2の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列を備える組換え蛋白が提供される。配列番号1または配列番号2の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列とは、リンカー部のアミノ酸配列を除いた部分を意味する。リンカー部のアミノ酸配列は当業者が適宜選択できる。これらの組換え蛋白は、本発明においては、その均等物、すなわち、配列番号1または配列番号2の重鎖可変部及び軽鎖可変部に対応するアミノ酸配列において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなり、かつCRPに対する結合性を有するタンパク質をも包含するものとして定義される。

また、本発明によれば、本発明の組換え蛋白を作製するために有用な抗体遺伝子ライブラリーの作製方法として、抗体遺伝子群をTベクターにライゲーションして増殖させる工程と、この増殖されたTベクターを分離する工程と、この分離されたTベクターから抗体遺伝子群を切り出してファージミドベクターにライゲーションして宿主に導入する工程とを備えることを特徴する抗体遺伝子ライブラリーの作製方法が提供される。

また、本発明によれば、かかる抗体遺伝子ライブラリーの好ましい作製方法として、抗体遺伝子群をTベクターにライゲーションして増幅させる工程と、この増殖されたTベクターを制限酵素処理するとともに、予めコントロールインサートが挿入されたファージミドベクターを前記制限酵素と同様の制限酵素で処理して前記制限酵素処理されたTベクターと混合した後ライゲーションする工程と、このライゲーションに付された混合物に前記コントロールインサート及びTベクターを消化する制限酵素を作用させた後、抗体遺伝子群がライゲーションされたファージミドベクターを選択的に宿主に導入する工程とを備えることを特徴する抗体遺伝子ライブラリーの作製方法が提供される。

【発明の効果】

【 0 0 2 7 】

本発明によれば、一本鎖(単鎖)可変部断片型抗体(scfv抗体)などの組換え蛋白を用いることとしたので、イムノクロマトグラフィー測定法などのサンドイッチ式免疫測定法に適する小型化抗体が得られる。scfv抗体作製のためにファージ提示(ディスプレイ)法を用いることができるが、このファージ提示法により、抗体遺伝子ライブラリーを少なくとも 5×10^7 の7乗以上の多様性を保ったライブラリーとして作製することを容易に行えるようになったので、上記免疫測定法において抗原との反応特異性に優れた所望の組換え蛋白が得られる。また、最終的に抗体の重鎖及び軽鎖の可変領域のDNA及びアミノ酸配列を明らかにすることができるので、当該組換え蛋白の特性を向上させるための改変も容易に行える。

【 0 0 2 8 】

また、この組換え蛋白は、分子量が小さいため、標識物質である金コロイド等への固相化量を上げることができるので、免疫測定法において有利である。

また、この組換え蛋白は抗体の可変部のみを備え、Fc部分を有さないため、免疫測定時、細菌が産生するプロテインAやGによる非特異反応を抑制することができる。例えば、プロテインAは、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、

10

20

30

40

50

プロテイン G は、連鎖球菌 (Streptococci) に由来するため、臨床検体等ではこれらが混在する可能性が高く、測定値に影響を与えることが懸念されるがこれを排除できる。

【0029】

加えて、いわゆる開放型サンドイッチ免疫アッセイ法は、低分子化合物のハプテンの検出のために開発されたものである (Suzuki et al., 2000; Suzuki et al., 1999; Yokozeki et al., 2002)。これらは、いくつかの抗体の別々の VH および VL 鎖の会合が、抗原の存在下で起こる現象を利用した非競合的なアッセイ法である (Ueda et al., 1996)。このためには、VH 及び VL を調整する必要があるが、方法では遺伝子配列が解かるので調整が容易となる。

10

【発明を実施するための最良の形態】

【0030】

以下、本発明の実施の形態を詳細に説明する。

本明細書で用いる、いくつかの技術用語を次に定義する。

「PCR」：ポリメラーゼ連鎖反応を意味する。

「scFv」：抗体フラグメントである単鎖 Fv を意味する。

「VL」：軽鎖可変部を意味する。

「VH」：重鎖可変部を意味する。

「PBS」：リン酸緩衝生理食塩水を意味する。

20

「amp」：アンピシリンナトリウムを意味する。

「2×LATAq mix」は、タカラバイオ社製の LA Taq ポリメラーゼ 0.5 U, 10×LATAq (+Mg) buffer 5 µl, を加え 25 µl となるよう精製水を加えたもの。通常 PCR 時には鋳型 DNA とプライマーが加えられ、精製水で 50 µl にして用いる。

「2×YT」：2×YT 培地を意味し、Bacto tryptone 16 g、Yeast Extract 10 g、NaCl 5 g を精製水で混合し、pH 7.5 付近にあわせ、1 リットルとしたもの。

「2×YT a」：「2×YT」に終濃度 100 µg となるように「amp」を加えたものを意味する。

30

「2×YT G a」：「2×YT a」に終濃度 1% となるように「グルコース」を加えたものを意味する。

【0031】

本発明で第一の結合物または第二の結合物として使用される組換え蛋白は、抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えたものであれば特に限定されないが、通常、ファージ提示法によって得ることができる。

【0032】

ファージ提示型抗体は、公知の方法により作製することができる。当該作製方法は、Marks JD ほか、J. Mol. Biol. 222, p. 581 - 597、1991 年; Nissim A ほか、EMBO J. 13, p. 692 - 698、1994 年等、いくつかの文献より知ることができる。特に、A. R. Pope ら (Antibody Engineering - A Practical Approach, IRL Press, Oxford, 1996) には、より具体的なプロトコールとして記載されている。そこで、本明細書記載の方法もこれを基本にして改良を加えて行なった。

40

【0033】

実験の概略を次に示す。なお、以下の記述は、抗体作製法確立のためのモデル抗原物質として、乳幼児の感染症の診断に重要視されている炎症マーカーの C - 反応性タンパク (CRP) を用いて行う。しかし、本発明における抗原物質を、これに限定するものではない。

【0034】

50

[1] 抗体遺伝子ライブラリーの作成

(1) C R P で免疫したマウス脾臓を試料とし、脾臓細胞を用いた。なお、リンパ球を分画し用いてもよい。

(2) (1) から I S O G E N (ニッポンジーン) を用いて、t o t a l R N A を抽出する。

(3) t o t a l R N A から m R N A を抽出してもよいがここでは省略できる。

(4) R N A から S u p e r S c r i p t T M P r e a m p l i f i c a t i o n K i t (インビロジェン社) を用いて、ランダムヘキサマーで c D N A を作製する。抗体特異的なプライマーも既に公知でありこれらを用いてもよい。

(5) c D N A を鋳型に、各種プライマーと、D N A ポリメラーゼを用いて P C R を行い、抗体遺伝子を増幅する。

(6) 増幅した抗体遺伝子を制限酵素 S f i I と N o t I で消化し、同じ制限酵素でファージミドベクター p C A N T A B 5 E (アマシャム) を消化し、リガーゼを用いて結合し組み込む。なお、p C A N T A B 5 E、p H E N 1 (M R C 製)、p H E N 1 - G T などのファージミドベクターを用いても良い。

(7) エレクトロポレーション装置を用いて、X L 1 - b l u e 大腸菌細胞に導入する。なお、J M 1 0 9、T G 1 などその他の A m b e r S u p p r e s s o r 要求性 λ ファージ増殖用宿主大腸菌でも良い。

(8) エレクトロポレーション後、2 × Y T G a に懸濁し、O / N、3 0 で振とう培養する。

(9) 培養菌体を遠心・集菌し、グリセロールストックとして - 8 0 に保存する。一部は 2 × Y T G a (D I F C O の 2 × Y T をベースに 1 % グルコース、+ a m p) 培地に再懸濁し 3 7 で振とう培養する。

(1 0) 濁度 (O D 6 0 0) が約 0 . 5 になったとき集菌し、2 × Y T a (2 × Y T + a m p) に懸濁後、M 1 3 K 0 7 を加え 3 7 で 1 時間振とう培養する。

(1 1) 2 × Y T a を 3 倍量追加し、カナマイシンを 7 0 μ g / m l になるように加えて 3 7 で一晩振とう培養する。

(1 2) 遠心して培養上清を回収し、P E G - N a C l でファージを沈殿後、P B S で溶解させ、も一度 P E G - N a C l で沈殿後、P B S で溶解させ、不要物を遠心で除いてファージ抗体ライブラリーを得る。

(1 3) ファージの一部を希釈し、2 × Y T 培地中で濁度約 0 . 5 まで生育させた X L 1 - b l u e に加えて、3 7 1 時間振とう培養して感染させ、L B G a (L B + 1 % グルコース、+ a m p) プレートに捲き、コロニーの数をカウントし、ファージの濃度 (c o l o n y - f o r m i n g u n i t (c f u)) を測定する。このコロニー数から換算したファージ数をファージ抗体ライブラリーの大きさとする。

【 0 0 3 5 】

このようにして抗体遺伝子ライブラリーを作製することができるが、P o p e らの方法に基づく上記方法 (概念図を図 1 に示す) では、コロニーの数をカウントすることで算出したファージ抗体遺伝子ライブラリーの規模は 1 × 1 0 の 5 乗個かせいぜい 1 × 1 0 の 6 乗個の規模である。この原因は、上記 (5) s c F v 遺伝子の非特異的増幅と (6) の制限処理時とその後のライゲーション効率の悪さに起因するもの推測された。

そこで、本発明者らは、次ぎに示す 2 つの方法により、ライブラリーサイズを少なくとも 5 × 1 0 の 7 乗容易に構築できる方法へと改良した。

【 0 0 3 6 】

方法 1 : 抗体遺伝子群 (s c F v 断片) をいわゆる T - ベクターに挿入して T A クローニングした後、制限酵素処理して挿入 D N A 断片を切り出し、この制限酵素で確実に切断されていることをアガロースゲル電気泳動で確認し、ゲルから目的のバンドを切り出して、抗体遺伝子群を含む D N A 断片を精製する方法を用いる (概念図を図 2 に示す) 。T A クローニングベクターは、望ましくは p T 7 B l u e T - v e c t o r (ストラタジーン社) が良い。このことにより、P C R 産物では、制限酵素処理できているかどうか不明瞭

10

20

30

40

50

であったが、確実に制限酵素処理が完了しているかどうか分かるようになった。そして、上記の精製された抗体遺伝子群を含むDNA断片と、上記と同様の制限酵素で処理されたファージミドベクター（pCANTAB5E等）とのライゲーション反応を行い、これを大腸菌などの宿主に導入させることによって抗体遺伝子ライブラリーを作製する。

【0037】

方法2：抗体遺伝子群（scFv断片）をいわゆるT-ベクターに挿入してTAクローニングした後、制限酵素処理して挿入DNA断片を切り出し、この制限酵素で確実に切断されていることをアガロースゲル電気泳動で確認する。一方、ファージミドベクター（pCANTAB5E等）として予めコントロールインサートDNAが挿入されたものを用意し、上記と同様の制限酵素で処理する。これら2つの制限酵素消化溶液から回収されたDNAを混合して、抗体遺伝子群を含むDNA断片をファージミドベクター（pCANTAB5E等）にライゲーションする。そして、この混合物をT-ベクター及びコントロールインサートDNAの両者を切断する制限酵素で処理し、抗体遺伝子群がライゲーションされたファージミドベクターのみを選択的に消化せずに残し、かくして選択的に宿主に導入させることによって抗体遺伝子ライブラリーを作製する。TAクローニングベクターとしては、上記と同様のものを使用できる。T-ベクター及びコントロールインサートDNAの両者を切断する制限酵素としては、抗体遺伝子に影響のない、つまり切断することのないまたは少ないScaI、PstI等の制限酵素を使用できる。上記2つの制限酵素消化溶液は、ゲルから目的のバンドを切り出すことなく、フェノール/クロロホルム、エタノール沈殿によりDNAを回収濃縮し、上記ライゲーション反応に供することができる（概念を図3に示す。）

【0038】

〔2〕scFv抗体のスクリーニング（パンニング）

（1）イムノチューブ（イムノプレートを用いても良い）に抗原であるCRPを適量PBS緩衝液に溶解し、添加し、一昼夜、低温（4℃程度）で静置する。ただし、抗原が固相に吸着できる時間と抗原の構造に影響の無い温度であればよい。

パンニング方法としては、ビオチンラベル化抗原、ストレプトアビジンマグネチックビーズを使用する方法などいくつかの方法が考案されておりこれに限定されるものではない。

（2）イムノチューブを洗浄後、2%スキムミルク・PBSで、室温1時間ブロッキングを行う。ブロッキング剤もスキムミルク以外のBSAやゼラチンなど夾雑蛋白質として反応に影響しないものであれば良い。

（3）2%スキムミルク・PBS・0.05%Tween20中に溶解させたファージ抗体ライブラリー（ 1×10^{14} CFU程度）をイムノプレートに加え、ゆっくり回転（又は振とう）させて、室温で2時間攪拌する。

（4）チューブをPBS・0.05%Tween20及びPBSでそれぞれ5回ずつ合計10回洗浄（専用のマグネット台を用いて注意深く行う。）後、終濃度0.1Mトリエチルアミン（または、グリシン）となるように加えゆっくり回転（又は振とう）させて、室温で20分攪拌する。

（5）チューブを換えて1MTris-HCl（pH6.8）（グリシンの中和には2MTris-HCl）を加えて中和する。

（6）中和したファージ溶液を、 $2 \times Y T$ 培地中で濁度約0.5まで生育させてXL1-blueに加えて、37℃1時間振とう培養して感染させる。

（7）培養液の一部を適宜に希釈し $2 \times Y T G a$ プレートに撒いた後、残りの培養液を $2 \times Y T G a$ に懸濁し、37℃で浸透培養し濁度が約0.5になるまで生育させる。

（8）集菌し、菌の一部はグリスロールストックとして-80℃で保存し、残りを利用してファージ抗体を調整し2ndスクリーニングに用いた。

（9）この操作を数回繰り返す。4から30回の洗浄で回収率が $10^{-5} \sim 10^{-4}$ 程度になったらELISAで確認する。（抗原反応陽性の組換えファージの検出は、アマシャムファルマシア製のRPAS Detection Module中のHRP/Anti-M13 Conjugate（HRP標識抗M13抗体を用いて行う。）

(10) ELISA がポジティブなら、Output の測定のために使用したプレートからコロニーを拾い、ファージ抗体をスクリーニングする。

(11) 抗体遺伝子の DNA 配列分析を行う。

(12) HB2151 へ宿主変換する。このことにより Amber Suppressor 要求性 λ ファージ増殖用宿主ではない大腸菌株にすることで、IPTG 誘導により scFv 抗体として発現させることができる。

【0039】

本発明で用いられる上記第一の結合物および第二の結合物は、少なくとも何れか一方が上記の組換え蛋白であればよく、その他は、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよい。

10

【0040】

通常、第一の結合物と第二の結合物を用いるサンドイッチ式免疫測定法においては、第一の結合物と第二の結合物とは抗原決定基（エピトープ）が相互に異なるものが使用され、所謂「ヘテロ」の組み合わせで用いられる。本発明において、「ヘテロ」の組み合わせで第一の結合物および第二の結合物を構成することは何ら妨げられるものではない。しかしながら、測定対象である抗原の種類によっては、所謂「ホモ」の組み合わせ（すなわち、第一の結合物と第二の結合物が同じ組換え蛋白）でもよい。

【0041】

本発明において、前記第一の結合物および第二の結合物の何れか一方を担体に固定しておくことも可能であり、これにより、例えば、ELISA またはイムノクロマトグラフィー測定法を容易に実施できる。

20

イムノクロマトグラフィー測定法は、公知のイムノクロマト法テストストリップの構成に準拠して容易に実施できる。

一般に、イムノクロマト法テストストリップは、抗原の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の結合物と、前記抗原の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の結合物と、膜担体とを少なくとも備え、前記第一の結合物は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の結合物は前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されて構成される。第一の結合物および第二の結合物は、上述のように、それぞれ上記組換え蛋白であってもモノクローナルまたはポリクローナル抗体であっても良いが、少なくとも何れか一つが上記組換え蛋白である。なお、第一の抗原決定基と第二の抗原決定基は抗原上の位置が異なっていれば構造的に同一であってもよく、その場合、第一の結合物および第二の結合物は上記「ホモ」の組み合わせの組換え蛋白であってもよく、例えば、第一の結合物および第二の結合物の両方に上記の好ましい組換え蛋白を使用できる。

30

【0042】

イムノクロマト法テストストリップの具体例としては、例えば、図8に示されるテストストリップが挙げられる。図8において、数字1は粘着シート、2は含浸部材、3は膜担体、31は捕捉部位、4は吸収用部材、5は試料添加用部材を示している。

図示の例では、膜担体3は、幅5mm、長さ36mmの細長い帯状のニトロセルロース製メンブレンフィルターで作成されている。

40

該膜担体3には、そのクロマト展開始点側の末端から7.5mmの位置に、第一の抗体が固定され、検体の捕捉部位31が形成される。

図示の例では、膜担体3は、ニトロセルロース製メンブレンフィルターを用いているが、被験試料に含まれる検体をクロマト展開可能で、かつ、上記捕捉部位31を形成する抗体を固定可能なものであれば、いかなるものであってもよく、他のセルロース類膜、ナイロン膜、ガラス繊維膜なども使用できる。

【0043】

含浸部材2は、前記第一の結合物が結合する第一の抗原決定基と異なる部位に位置する第二の抗原決定基にて前記抗原と抗体抗原反応する第二の結合物を含浸せしめた部材からなる。当該第二の結合物は、適当な標識物質で予め標識される。

50

図示の例では、含浸部材 2 として、5 mm × 15 mm の帯状のガラス繊維不織布を用いているが、これに限定されるものではなく、例えば、セルロース類布（濾紙、ニトロセルロース膜等）、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック布類なども使用できる。

【0044】

第二の結合物の標識物質としては、使用可能なものであればいかなる物質であってもよく、呈色標識物質、酵素標識物質、放射線標識物質などが挙げられる。

このうち、捕捉部位 31 での色の变化を肉眼で観察することにより迅速かつ簡便に判定できる点から、呈色標識物質を用いることが好ましい。

呈色標識物質としては、金コロイド、白金コロイド等の金属コロイドの他、赤色および青色などのそれぞれの顔料で着色されたポリスチレンラテックスなどの合成ラテックスや、天然ゴムラテックスなどのラテックスが挙げられ、このうち、金コロイドなどの金属コロイドが特に好ましい。

当該含浸部材 2 は、標識された第二の抗体の懸濁液を前記ガラス繊維不織布等の部材に含浸せしめ、これを乾燥させることなどによって作製できる。

【0045】

図 8 に示されるように、膜担体 3 を粘着シート 1 の中程に貼着し、該膜担体 3 のクロマト展開の開始点側（すなわち図 8 の左側、以下「上流側」と記す、また、その逆の側、すなわち図 8 の右側を、以下「下流側」と記す）の末端の上に、含浸部材 2 の下流側末端を重ね合わせて接続するとともに、この含浸部材 2 の上流側部分を粘着シート 1 に貼着して本発明のイムノクロマト法テストストリップを作成できる。

さらに、必要に応じて、含浸部材 2 の上面に試料添加用部材 5 の下流側部分を載置するとともに、該試料添加用部材 5 の上流側部分を粘着シート 1 に貼着してもよく、また、膜担体 3 の下流側部分の上面に吸収用部材 4 の上流側部分を載置するとともに、該吸収用部材 4 の下流側部分を粘着シート 1 に貼着せしめることもできる。

【0046】

試料添加用部材 5 としては、例えば、多孔質ポリエチレンおよび多孔質ポリプロピレンなどのような多孔質合成樹脂のシートまたはフィルム、ならびに、濾紙および綿布などのようなセルロース製の紙または織布もしくは不織布を用いることができる。

吸収用部材 4 は、液体をすみやかに吸収、保持できる材質のものであればよく、綿布、濾紙、およびポリエチレン、ポリプロピレン等からなる多孔質プラスチック不織布等を挙げることができるが、特に濾紙が最適である。

【0047】

さらに、市販品の場合、図 8 のイムノクロマト法テストストリップは、試料添加用部材 5 と捕捉部位 31 の上方にそれぞれ被験試料注入部と判定部が開口された適当なプラスチック製ケース内に収容されて提供される。

【0048】

かくして、生体試料などからなる被験試料を必要に応じて適当な展開溶媒と混合してクロマト展開可能な混合液を得た後、当該混合液を図 8 に示されるイムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材 5 上に注入すると、該混合液は、該試料添加用部材 5 を通過して含浸部材 2 において、標識された第二の結合物と混合する。

その際、該混合液中に検体が存在すれば、抗原抗体反応により検体と第二の結合物との複合体が形成される。

この複合体は、膜担体 3 中をクロマト展開されて捕捉部位 31 に到達し、そこに固定された第一の結合物と抗原抗体反応して捕捉される。

このとき、標識物質として金コロイドなどの呈色標識物質が使用されていれば、当該呈色標識物質の集積により発色するので、直ちに、検体の有無を判定することができる。

【0049】

被験試料としては、特に制限はなく、例えば、血液、（全血でも、血清でも、血漿でもよい）、唾液、尿等の体外に採取された体液が挙げられる。被験試料は、展開溶媒などの

適当な希釈液で希釈して膜担体に注入してもよい。

【0050】

なお、全血を被験試料として用いるときで、特に標識結合物の標識物質として金コロイドなどの呈色標識物質が用いられる場合、前記試料添加用部材に血球捕捉膜部材を配置しておくことが好ましい。血球捕捉膜部材は、前記含浸部材と前記試料添加用部材との間に積層することが好ましい。これにより、赤血球が膜担体に展開されるのが阻止されるので、膜担体の捕捉部位における呈色標識の集積の確認が容易になる。血球捕捉膜部材としては、カルボキシメチルセルロース膜が用いられ、具体的には、アドバンテック東洋株式会社から販売されているイオン交換濾紙CM（商品名）や、ワットマンジャパン株式会社から販売されているイオン交換セルロースペーパーなどを用いることができる。

10

【実施例】

【0051】

以下、本発明をさらに詳細に説明するために実施例を示すが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0052】

実施例1 RNA抽出

抗原で免疫し、抗体価の上昇したマウス脾臓を試料とした。

RNA Extraction 試薬 ISOGEN（ニッポンジーン）を用いて、total RNAを抽出した。

なお、精製度の高いtotal RNAまたは、mRNAを抽出できれば、この方法に限定されるものではない。

20

1. 10ml ビーカーに、ISOGEN溶液1mlを加え、脾臓1個分（100mg以内）を入れ、すばやくハサミで細かくきり刻んだ。

2. 細かくなったら、さらにISOGEN1ml（3ml）を加えた。

3. テルモ注射針18 Gを付けたテルモシリンジ10 mlロック式を用いて、脾臓断片を壊しながら、液を吸引および排出する操作を数回繰り返し、ISOGEN中に脾臓を溶解させた。シリンジを通らない場合が多いので、ホモジナイザーまたは、メッシュビーカーを用いて細かくしてから用いた。

4. 脾臓断片がほぼなくなったら、再度液の吸引と排出の操作を、なるべく泡立てないように10回繰り返した。

30

5. ニードルを21G針に変えて、さらにせん断（shearing）を10回繰り返した。

6. 次に、1.5mlチューブ2本に約1000μlずつ分注し、室温5分静置した。

7. 10,000rpm（7.5kg）以上で5分間遠心し、不溶性画分（沈殿物）を除く上清を別のチューブに取った。

8. これに、0.2mlのクロロホルムを加え、ボルテックスでよく混合し、室温で3分置いた。

9. 12,000rpm（12kg）以上で、4、10分間遠心すると、青系色の下層と透明な上層に分かれるので、上層（水層）のみをチューブに移した。

40

10. これに0.5ml（等量）のイソプロパノールを加え、混合後、0、5分～10分静置、15,000rpm（12kg）以上、15分間以上、4で遠心しRNAを沈殿させた。

11. 慎重にイソプロパノールを除き、RNAペレットに75%（70%可）エタノール1ml（リンスなので適量）を加え、混合後10,000rpm（7.5kg）以上、5分、4で遠心した。

12. ペレットを軽く風乾した後、適量（50μl～100μl）滅菌水にRNAを溶解させた。

13. RNAを一つのチューブにまとめ、そこからRNA溶液2μlを別のチューブに採り、滅菌水8μlを加え、5倍に希釈した。

50

14. マイクロキャピラリーセルを用いて、260と280nmの吸光度、及び200～340nmのスペクトルグラムを描き、定法によりRNA量の定量と純度を検定した。
15. さらに、0.8%アガロースゲル電気泳動で、分解の程度など質を検査した。

【0053】

実施例2 cDNA合成 (DNA 200ngスケール)

(ランダムヘキサマーを用いたcDNA合成)

1. キット (SuperscriptTM Preamplification Kit (インビロジェン社)) の試薬を混ぜ軽く遠心しておいた。
2. 0.2mlチューブに次ぎの試薬を混ぜた。

【表1】

10

表1

サンプル No.	(1)
total RNA (5μg)	<u>2</u>
random hexamers (50ng/μl)	(5μl)
10mM dNTP mix	1μl
DEPC-water で10μlにup	2μl

20

3. 2. のサンプルを65 (～70)、5分(～10分)間保温後に、1分間以上氷冷した。

4. 加える本数分の次ぎの試薬を作製した。

- 1) 10xRT buffer 2μl
- 2) 25mM MgCl₂ 4μl
- 3) 0.1M DTT 2μl
- 4) RNase OUT (Inhibitor) 1μl

5. 4. の混合試薬を2. に加え、ゆるやかに混合し、スピンドウンした(合計20μl)。

30

6. 25 (室温可)で2分間保温した。

7. 50unit SSII (SuperScript II RT) を1μl加え、サーマルサイクラーで25で10分間保温——42 50分間保温——70で15分間保温し、すみやかに氷冷した。

8. RNase Hを1μl加え、37で20分保温した。

9. Micro Spin S-300HR (アムシャムバイオサイエンス社)を用いてプライマーの除去を次の手順で行った。

- 1) チューブにS-300HRのふたを少し緩め、管を折って入れ、3000rpm (735g)で1分遠心した。

40

- 2) チューブを替え作成したcDNA (計100μlまで)を添加し3000rpm (735g)で2分遠心した。

【0054】

(cDNAからのH鎖L鎖PCR増幅)

1. PCRチューブに次ぎの試薬を混ぜ、氷冷しておいた。

【表 2】

表2

	(1)	(2)
	H鎖	L鎖
cDNA	2 μ l	2 μ l
Sense primer A	(1) 1 μ l	(3) 1 μ l
Antisense primer B	(2) 1 μ l	(4) 1 μ l
10 $\times$ PCR Buffer	5 μ l	5 μ l
2.5mM dNTP	8 μ l	8 μ l
25mM MgCl ₂	5 μ l	5 μ l
5U/ μ l (LA) Taq	0.5 μ l	0.5 μ l
Water (total 50 μ l)	27.5 μ l	27.5 μ l

10

20

各 100 pmol

(1) V H 1 F O R : 5' - TGA GGA GAC GGT GAC CGT GGT CCC TTG GCC CC 32mer (配列番号 5)

(2) V H 1 B A C K : 5' -AGG TSM ARC TGC AGS AGT CWG G 22mer (配列番号 6)

(3) M J K 1 m i x F O N X : 5' -CCG TTT BAT TTC CAR CTT KGT SCC 24mer (配列番号 7)

(4) V K 2 B A C K : 5' -GAC ATT GAG CTC ACC CAG TCT CCA 24mer (配列番号 8)

2. 1. を混ぜスピンドウンした。

3. 次条件でPCRを行った。

95 2分 [(95 30秒 - 65 30秒 - 72 1分) $\times$ 21*] 72 7分 - 4 ∞ 。

30

4. PCR産物の5 μ l程度を(1.2%)アガロースゲル電気泳動でチェックした。なお、スミアバンドとなるので、予備実験でサイクル数を決めてから行った。

【0055】

実施例3 s c F v 遺伝子作製

実施例2でH鎖(340bp)、L鎖(325bp)が電気泳動で確認されたので、Micro Spin S-300HRを用い、次の操作でプライマーを除去した。

1) チューブにS-300HRのふたを少し緩め、管を折って入れ、3000rpm(735g)で1分遠心した。

2) チューブを替え作成したPCR産物(約50 μ l)を添加し3000rpm(735g)で2分遠心した。

40

【0056】

[1st PCR: Assembly and fill-in]

1. 次の試薬を用意した。

H鎖 PCR product (50 ng)	1 μ l
L鎖 PCR product (50 ng)	1 μ l
Linker-primer mix	4 μ l
2 $\times$ LA Taq mix	25 μ l
Water	up 50 μ l (19 μ l)

2. 1. を混ぜスピンドウンした。

50

3. 次の条件でPCRを行った。

94 1分〔(94 1分 - 63 4分) × 7〕63 1分—4 ∞。

【0057】

〔2nd PCR〕

1. 次の試薬を用意した。

H + l i n k e r + L	p r o d u c t (5 0 n g)	5 0 μ l
V H 1 B A C K S f i		2 μ l
J K 1 - 5 N o t I m i x		2 μ l
2 x L A T a q m i x		2 5 μ l
W a t e r		u p 1 0 0 μ l

10

2. 1. を混ぜスピンドウする。チューブは氷冷。90 付近で入れた。

3. 次の条件でPCRを行った。

例えば、94 1分〔(94 30秒 - 65 、45秒 - 72 1分) × 21〕72 1分—4 ∞。

4. PCR産物の5 μ lを(1.2 ~ 1.5%)アガロースゲル電気泳動でチェックした。

【0058】

* R S O l i g o s

(1) V H 1 B A C K S f i : GTC CTC GCA ACT GCG GCC CAG CCG GCC ATG GCC CAG GTS
MAR CTG CAG SAG TCW GG 56mer・・・・100p mol (配列番号9)

20

(2) J K 1 N O T 1 0 : GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT GAT TTC CAG CTT GGT GCC
42mer (配列番号10)

(3) J K 2 N O T 1 0 : GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT TAT TTC CAG CTT GGT CCC
42mer (配列番号11)

(4) J K 4 N O T 1 0 : GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT TAT TTC CAA CTT TGT CCC
42mer (配列番号12)

(5) J K 5 N O T 1 0 : GAG TCA TTC TGC GGC CGC CCG TTT CAG CTC CAG CTT GGT CCC
42mer (配列番号13)

(2) ~ (5) 400 p m o l を等量混ぜ平均100 p m o l に混合したものを(6)
J K 1 - 5 N o t I m i x とする。

30

L i n k e r - p r i m e r m i x : リンカーは、次のグリシン、グリシン、グリシン、
グリシン、セリンが3回繰り返したフレキリブルリンカーを用いた。

l i n k e r 配列 5- ' GGCACCACGGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCG
GTGGCGGATCGGACATCGAGCTCACTCAGTCTCCA-3 ' (配列番号14)

【0059】

〔DNAの精製〕

次に全量をエタ沈濃縮後、ゲルから切り出し精製した。

1. 酢酸Naを1/10量(10 μ l)加え、エタノールを2.5倍量(250 μ l)加え、よく攪拌後、-20 に30分以上(-80 、10分)置き、15000 r p m、15分遠心、上清を丁寧に除き、70%エタノールを200 μ l程度入れ、15000 r p m 5分、上清を丁寧に除き、乾燥させた。そして、適等量のTE(20 μ l)に溶解させた。

40

2. 全量20 μ lに10 × d y eを2 μ l加え、1.2%ゲルに12 μ l程度づつアブラし、50 vで電気泳動した。

3. ゲルをハンディUV335 nmで照射し、目的の780 b p付近を切り出し、M i n E l u t e G e l E x t r a c t i o n K i t (キアゲン)を用い、下記の手順で精製した。

(1) 100 m gに3倍量のQGを入れる(最大400 m g)。

(2) 50 、20分(時々ボルテックスかける)。

(3) 色が黄色であることを確認する。ゲルと等量のイソプロパノールを入れ反転。

50

(4) 付属の2mlチューブにカラムのせ、サンプルをアプライし、10,000g(13,000rpm)で1分遠心。

(5) フロースルー溶液を捨て、カラムにQGを500μl添加し、遠心1分。

(6) PEを750μl添加遠心1分。

(7) フロースルーを捨て、さらに遠心1分。

(8) 1.5mlチューブに乘せ換え、適等量(10μl)のEBまたは精製水をカラム中央に添加し、1分以上放置後、1分遠心する。

4. PCR産物の5μl程度を(1.2%)アガロースゲル電気泳動でチェックした。

【0060】

実施例4 T-vectorを用いた抗体遺伝子ライブラリーの作成 (Tg法)

10

[1] scFv遺伝子の増幅

実施例3で得たscFv遺伝子を必要量増幅した。

【0061】

[2] T-vectorへのscFv遺伝子の組み込み

(1) [1]により増幅したscFv遺伝子を以下の組成で16 / over nightライゲーションした。

pT7Blue T-vector 10μl (500ng, 0.3pmol)

scFv遺伝子 Xμl (950ng, 2.0pmol)

I液 10 + Xμl (TaKaRa Ligation kit Ver. 2.1)

Total 2 (10 + X) μl

20

(2) エタノール沈殿後、5μlの滅菌水に溶解させた。

【0062】

[3] scFv遺伝子ライブラリーT-vector (プラスミド)の調整

(1) 市販のエレクトロポレーション用コンピテントセルE.coli XL1-Blueチューブ1本と[2]のDNA溶液5μlを混合し、0.1cmキューベットに注入した。

(2) 以下の条件でエレクトロポレーションを行った。

200Ω、25μF、1.5kV

(3) エレクトロポレーションした大腸菌に氷冷したSOC培地1mlを加えた。

(4) 37 で1時間振盪した(160~225rpm)。

30

(5) 37 1時間振盪培養後の菌体懸濁液からサンプリングして、トランスフォーメーションされた大腸菌数の計測に使用した。なお、計測する培地はX-gal、IPTGの入った培地を使用し、blue/whiteの比を確認し、さらに数十個体PCRによってインサートが入っている確認した。

(6) 合計で10⁸程度になったら、プラスミドを大量回収し、scFvライブラリー(T-vector)とした。

【0063】

[4] pCANTAB5EのSfiI/NotI消化

(1) pCANTAB5E(100μg)を以下の組成で消化した。なお、ベクター量はライゲーション時に3.6μgのベクターを確保できればよいので、ゲル抽出キットの能力に合わせて適宜調整してもよい。

40

pCANTAB5E Xμl (100μg)

M buffer 10μl

SfiI 8μl

滅菌水 Yμl

合計 100μl

反応は、50 / over night行った。そして、0.5μlを0.8%アガロースゲルで電気泳動し消化されていることを確認した。

(2) 続いてNotIで[4]-(1)を以下の組成で消化した。

(1)の溶液 99.5μl

50

M b u f f e r	5 μ l
1 M T r i s - H C l p H 7 . 5	6 μ l
T r i t o n	1 6 μ l
B S A	1 6 μ l
H b u f f e r	1 μ l
滅菌水	5 μ l
N o t I	4 μ l
合計	1 5 0 μ l

反応は、37 / 2 h 行った。そして、0.5 μ l を 0.8 % アガロースゲルで電気泳動し消化されていることを確認した（約 4500 bp と約 720 bp の位置にバンドが確認できる）。

10

消化が確認できたならば、全量を電気泳動して 4500 bp のバンドを回収した。

【0064】

[5] s c F v ライブラリー (T - v e c t o r) の S f i I / N o t I 消化
(1) s c F v ライブラリー (T - v e c t o r) (30 μ g) を以下の組成で消化した。なお、ベクター量はライゲーション時に 1.8 μ g の s c F v 鎖を確保できればよいため、ゲル抽出キットの能力に合わせて適宜調整してもよい。

T - v e c t o r : : s c F v	X μ l (30 μ g)
M b u f f e r	10 μ l
S f i I	5 μ l
滅菌水	Y μ l
合計	100 μ l

20

反応は、50 / o v e r n i g h t 行った。そして、0.5 μ l を 0.8 % アガロースゲルで電気泳動し消化されているかを確認した。

(2) 続いて N o t I で [5] - (1) を以下の組成で消化した。

(1) の溶液	99.5 μ l
M b u f f e r	5 μ l
1 M T r i s - H C l p H 7 . 5	6 μ l
T r i t o n	1 6 μ l
B S A	1 6 μ l
H b u f f e r	1 μ l
滅菌水	5 μ l
N o t I	4 μ l
合計	150 μ l

30

反応は、37 / 2 h 行った。そして、0.5 μ l を 0.8 % アガロースゲルで電気泳動し消化されているかを確認した（約 2800 bp と約 720 bp の位置にバンドが確認できる）。

消化されていることが確認できたら、全量を電気泳動して 720 bp のバンドを回収した。

【0065】

40

[6] p C A N T A B 5 E への s c F v 遺伝子の組み込み

(1) [4] - (2) 及び [5] - (2) で得られた産物を用いて以下の組成で 16 / o v e r n i g h t ライゲーションした。

[4] - (2) 溶液	X μ l	(3 . 6 μ g)
[5] - (2) 溶液	Y μ l	(1 . 8 μ g)
T 4 L i g a s e	6 μ l	
10 $\times$ T 4 b u f f e r	Z μ l	
合計	(X + Y + Z + 6) μ l	

(2) エタノール沈殿後、5 μ l の滅菌水に溶解させた。

【0066】

50

[7] s c F v 遺伝子ライブラリー p C A N T A B 5 E (プラスミド) の調整

(1) 市販の E . c o l i J M 1 0 9 E l e c t r o - c e l l s チューブ 1 本と [6] - (2) の D N A 溶液 5 μ l を混合し、 0 . 1 c m キュベットに注入した。

(2) 以下の条件でエレクトロポレーションを行った。

2 0 0 Ω 、 2 5 μ F、 1 . 5 k V

(3) エレクトロポレーションした大腸菌を氷冷した S O C 培地 1 m l を加えた。

(4) 3 7 で 1 時間振とうした (1 6 0 ~ 2 2 5 r p m) 。

(5) 3 7 1 時間振盪培養後の菌体懸濁液から 1 5 μ l サンプルングして、トランスフォーメーションされた大腸菌の数の計測に使用した。

(6) 予め 3 7 で保温 (または室温放置) しておいた以下の組成の培地 2 0 m l、 2 本 (大試験管) に (3) の各大腸菌懸濁液の残りを 2 等分して (約 0 . 5 m l) 加え、 3 7 で O / N 振盪培養した。

2 $\times$ Y T 培地	1 9 m l	
2 0 % グルコース	1 m l	(f i n a l 1 %)
1 0 0 m g / m l a m p	2 0 μ l	(f i n a l 1 0 0 μ g / m l)
T o t a l	2 0 m l	

(7) (6) の 2 0 m l $\times$ 2 = 4 0 m l を次の様にした。

(i) 培養液を 2 0 ~ 3 0 m l は、そのままファルコンチューブに移し (または遠心濃縮し) - 2 0 以下に保存し、結果が良好であれば後日、プラスミドを抽出する (マウス抗体 s c F v ライブラリーの大元として保存する。) 。

(i i) 2 m l 程度を残しておいた。そして (8) で使用する。

(i i i) 残り (約 8 m l ~ 1 8 m l) は、 1 . 2 m l 程度に小分けしグリストする (グリセロール f i n a l 2 0 % 程度入れ - 8 0 保存する) 。

(8) (7) - (i i) は、 2 $\times$ Y T G a 培地 1 0 m l に、 O D 0 . 1 程度 (0 . 5 m l 程度) 再懸濁し (中試験管使用) 3 7 で振とう培養し、濁度 (O D 6 0 0) が約 0 . D 0 . 7 程度になったとき遠心 (ファルコン 5 0 m l) 集菌し、 5 m l の 2 $\times$ Y T a (2 $\times$ Y T + a m p、 o r L B a ; グルコース抜く) に懸濁した。

(9) ヘルパーファージ M 1 3 K 0 7 (5 $\times$ 1 0 ¹¹ c f u / m l 程度) を 0 . 1 m l 加え (f i n a l 1 ~ 4 $\times$ 1 0 ¹⁰) 3 7 (o r 3 0) で 1 時間振とう培養した。

(1 0) 2 $\times$ Y T a を 3 倍量 (1 5 m l) 追加し、 T c 2 0 μ g / m l 及び K m 5 0 μ g / m l になるように加えて 3 0 で一晩振とう培養した。

(1 1) 遠心して菌体を沈殿させ (ファルコンチューブ 5 0 m l、 3 8 5 0 r p m で可 ; もし沈殿がしっかり形成されていないときは、さらに高速回転で再度行う。)、培養上清を回収 (約 2 0 m l) し、滅菌したベックマン専用遠心管 3 7 m l 用に入れ、 4 . 8 m l の P E G - N a C l (f i n a l 2 0 %) を加え、よく混ぜてから、氷中に 3 0 分以上おき、 1 0 , 0 0 0 g (ベックマン高速遠心機で 9 , 5 0 0 r p m)、 2 0 分遠心した。

(1 2) ファージは沈殿にあるので、上清を除き、 2 0 m l 1 $\times$ P B S で溶解させ、もう一度 4 . 8 m l P E G - N a C l で氷中に 3 0 分以上置き沈殿させ、 1 0 , 0 0 0 g (ベックマン高速遠心機 S V - 2 0 ローター、 9 , 5 0 0 r p m)、 2 0 分遠心し、上清を丁寧に除いた。

(1 3) 沈殿したファージを適量 (5 m l) P B S で溶解させファージ抗体ライブラリー (P h A b L i b .) を得た。

(1 4) 対数増殖期大腸菌 (X L I - B l u e (T c r)) 培養液に、回収したファージ溶液 (P h A b L i b .) 適量を添加し、 3 7、 1 時間、ゆるやかに振とう培養して感染させた。

感染後の培養液の一部 (1 0 μ l) を適宜に希釈 (希釈無し、 1 0 ²、 1 0 ³、 1 0 ⁴) し 1 0 0 μ l を、 L B G a (L B + 0 . 5 % グルコース + a m p) プレートに撒き、 3 0 で O / N 培養し、コロニー数からファージの濃度 (c o l o n y - f o r m i n g u n i t (c f u) を測定した。

【 0 0 6 7 】

10

20

30

40

50

実施例 5 抗体のスクリーニング (バイオパンニング)

〔 1 〕 抗原吸着条件の検討

抗原 (C R P) が十分に吸着する抗原濃度、抗原溶解液濃度、プレート・チューブの材質などの条件を予備検討した。そして、イムノチューブに $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗原 (O V A) を $100 \mu\text{l}$ づつに入れ、4 で O / N 吸着させたタンパク量を測定した。

【 0 0 6 8 】

〔 2 〕 パンニング (イムノチューブを用いる方法、なお、〔 〕内は、イムノプレートを用いる場合でありこれでも可能。)

(1) 抗原 (C R P) のコーティング :

P B S に溶解した $1 \sim 10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の抗原 (C R P) を 1ml づつ、イムノチューブに入れた。4 で O / N (吸着性の良いものは 2 時間室温、15 4 時間程度でも良い場合がある。) 。〔イムノプレートに $100 \mu\text{l}$ づつ。〕

(2) 洗浄 1 :

P B S を 3ml 入れ、捨て、 3ml 入れ、捨て、 3ml 入れ、捨て、を 2 回行なう。〔 $300 \mu\text{l}$ 〕

(3) ブロッキング :

ブロッキング溶液 (B l o c k i n g s o l u t i o n (例 : 2 % スキムミルク - P B S)) を 3ml 加え室温 (または 30) で 1 時間放置し、ブロッキングを行なった。〔 $1 / 10$ 量 ; $300 \mu\text{l}$ 〕

(4) 洗浄 2 :

P B S を 3ml 以上入れ、捨て、 3ml 入れ、捨て、を計 3 回行なった。

(5) バインディング :

終濃度 2 % スキムミルク - P B S - 0 . 1 % T w e e n 2 0 中に溶解させた実施例 4 で調整したファージ抗体ライブラリー (1×10^{12} C f u) 1ml をイムノチューブに加え、パラフィルムをし、ゆっくり振とう (又は回転) させて、室温 [または 30] で 1 時間撹拌した。〔 $1 / 10$ 量 ; $300 \mu\text{l}$ 、シールする。〕

(6) 洗浄 3 , 4 :

チューブを 3ml の P B S - 0 . 1 % T w e e n 2 0 で 5 回洗浄、 3ml P B S で 5 回ずつ合計 3 回 (2 ~ 5 回) 洗浄した。〔 $1 / 10$ 量 ; $300 \mu\text{l}$ 〕

(7) 溶出 :

0 . 1 M G l y c i n e (p H 2 . 2 , $1 . 2 \text{ml}$ [$120 \mu\text{l}$]) を加え、ゆっくり振とうさせて、室温で 20 分静置した。次にファージの溶出液を別のチューブに移し 2 M T r i s - H C l を入れ、中和した。 (この条件で中和になっているか p H 試験紙で確認した。)

(8) 再感染 :

中和したファージ溶液 $1 . 5 \text{ml}$ を、大腸菌溶液 $20 \text{mg} / \text{ml}$ T c $10 \mu\text{l}$ (f i n a l $20 \mu\text{g} / \text{ml}$) 入りの $2 \times \text{YT}$ 培地、 10ml に再感染させた。

【 0 0 6 9 】

〔 3 〕 回収ファージの再調整法

(1) 対数期大腸菌 :

L B G T c (または $2 \times \text{YTGTc}$) で培養した対数期大腸菌を必要量用意した。
大腸菌 X L I - B l u e (T c r) の前培養液 ($0 . 3 \text{ml}$ 程度 (O D 0 . 1 程度)) を $20 \text{mg} / \text{ml}$ T c $10 \mu\text{l}$ (f i n a l $20 \mu\text{g} / \text{ml}$) 入りの 10ml $2 \times \text{YT}$ G に添加し、濁度約 O D 0 . 7 程度になるまで 37 で生育させた。

(2) 再感染 :

対数増殖期大腸菌 (X L I - B l u e (T c r)) 培養液に、回収したファージ溶液 (P h A b L i b .) $1 . 5 \text{ml}$ を添加し、37、1 時間、ゆるやかに振とう培養して感染させた。

(3) 感染数から回収率推定 :

ファージのみ感染後の培養液の一部 ($10 \mu\text{l}$) を適宜に希釈 (希釈無し、 10^2 、1

10

20

30

40

50

10^3 、 10^4) し $100 \mu\text{l}$ を、LBGa (LB + 0.5% グルコース + amp) プレートに撒き、 30°C で O/N 培養し、コロニー数からファージの濃度 (cfu) を推定し、回収率を推定した。

(4) 増殖 1st :

残りの大半の培養液 (9.9 ml) に $2 \times \text{YTGa}$ (or LBGa) を 20 ml を加え、 37°C で振とう培養し濁度が 0.5 程度になるまで生育させた。

(5) ファージ増殖 2nd :

グリスト用に使用した残りの (5) の菌液は、 6000 rpm 、5 分、遠心し、上清を除去した。

沈殿物は、除去した上清と等量の $2 \times \text{YT a}$ (or L B a) に懸濁し、ヘルパーファージ M13K07 ($5 \times 10^{11} \text{ cfu/ml}$ 程度) を 0.2 ml (final 5×10^{10}) 加え、 1 hr ゆっくり 37°C で培養した。

(6) 適量の $2 \times \text{YT a}$ (または L B a) と最終 $50 \mu\text{g/ml}$ となるよう Km を加え、 30°C で一晩振とう培養した。

(7) ファージ量の推定 :

O/N 後 (3) のコロニー数をカウントし、Output / Input を算出した。

(8) ファージ回収、PEG 沈 :

(i) 6000 rpm 10 分遠心して菌体を沈殿させた。

(ii) 培養上清を回収 (約 20 ml) し、滅菌したベックマン専用遠心管 37 ml 用に入れ、 4.8 ml の PEG - NaCl (final 15 ~ 20%) を加え、よく混ぜてから、氷中に 30 分程度おき、 $10,000 \text{ g}$ (ベックマン高速遠心機で $9,500 \text{ rpm}$)、20 分遠心した。

(iii) ファージは沈殿にあるので、上清を除き、(8) (ii) の培養量の $1/10$ 量の $1 \times \text{PBS}$ で溶解させ、もう一度 PEG - NaCl (final 15 ~ 20%) で氷中に 15 分程度置き沈殿させ、 $10,000 \text{ g}$ (ベックマン高速遠心機 SV - 20 ローター、 $9,500 \text{ rpm}$)、20 分遠心し、上清を丁寧に除いた。

(iv) 沈殿したファージを、 2 ml PBS で溶解させファージの増幅物を得た。必要に応じ、遠心後 $0.22 \mu\text{m}$ フィルターを通した。

(v) 4°C 保存、0.05% となるよう NaN_3 (または 2000 分の 1 容量の Proc 1 in 300) を入れた。

(vi) 回収ファージを定量した。

【0070】

〔4〕パンニング第 2 回以降

(1) パンニングは 5 回を目安に回数を繰り返す毎に厳しい洗浄条件にして第 1 回と同様の操作を 5 回繰り返した。

(2) 培養液の一部を適宜に希釈 (例 ; 希釈無し、 10^3 、 10^4 、 10^5) し L B G a プレートに撒き、 37°C (または 30°C) で O/N 培養し、コロニー数から回収率を推定算出した (Output / Input)。

(3) この感染・洗浄の操作を繰り返して回収率の変動が少なくなったら ELISA 検定で確認した。

(4) ELISA がポジティブなら、Output の測定のために使用したプレートからコロニーを拾い、ファージ抗体をスクリーニングした。

【0071】

〔5〕ファージ抗体の準備 (作製)

(1) コロニーを 10 個 ~ (数十) 程度爪楊枝で取り、 1 ml $2 \times \text{YTGaTc}$ 培地と同プレートに植菌し 30°C O/N 培養した。

(2) (1) の一部 (0.5 ml 程度 OD 0.1 目安) を 10 ml $2 \times \text{YTGaTc}$ に加え、濁度約 0.5 ~ 0.7 ~ 0.8 になるまで 37°C で生育させた。

(3) (2) の一部 1.5 ml をエッペンチューブで 6000 rpm 、10 分、遠心し、上清を除去した。

10

20

30

40

50

(4) 沈殿物は、除去した上清と等量 (or 1.2 ml) の 2 × Y T a に懸濁し、ヘルパーファージ M 1 3 K 0 7 (5×10^{11} c f u / m l 程度) を 0.01 ml (final 5×10^{10}) 加え、1 hr ゆっくり 37 ° で培養した。

(5) 5 ml の 2 × Y T a と最終 50 μ g / m l となるよう K m を加え、30 ° で一晩振とう培養した。

(6) ファージ回収、P E G 沈 :

(i) 6000 rpm 10 分遠心して菌体を沈殿させた。

(ii) 培養上清を回収しエッペンチューブに移し 240 μ l P E G - N a C l (final 15 ~ 20 %) を加え、よく混ぜてから、氷中に 30 分程度おき、10,000 g (12000 rpm)、10 分遠心した。

(iii) 上清を除き、(6) (ii) の培養量の 1 / 2 量の 1 × P B S で溶解させた。これを、ファージ E L I S A のサンプルとした。

【0072】

〔6〕E L I S A 法による抗体価チェック

D e t e c t i o n M o d u l e R e c o m b i n a n t P h a g e A n t i d o d y S y s t e m ; A m e r s h a m 27-9402-01 をベースとして下記の方法で行った。

方法 :

(1) E L I S A 用の 96 穴プレートに 10 μ g、5 μ g、1 μ g、500 ng、100 ng の様に P B S で希釈系をつくり抗原 C R P を 100 μ l 添加した。

(2) 4 h O / N 静置した。

(3) ポジコンに、ポジコン用 M 1 3 ファージ抗原を用いた。

(4) B l o c k i n g B u f f e r (例 : 2 % スキムミルク - P B S - 0.05 % T w e e n 20) で 2 回 w a s h し、P B S をきれいに除いた。

(5) B l o c k i n g B u f f e r を 200 μ l / w e l l 加え室温で 1 h ~ 2 h 間放置した。

(6) プレートを逆さにして B l o c k i n g B u f f e r をきれいに除き、さらに W a s h b u f f e r (P B S) で 2 回 w a s h し、プレートを逆さにして P B S をきれいに除いた。

(7) ファージ抗体 (一次抗体) は B l o c k i n g B u f f e r で (例えば、) 2 倍の希釈系列をつくり、室温 15 分 ~ 30 分間放置した。

(8) ファージ抗体 (一次抗体) 希釈液を各 w e l l に 100 μ l 加え、室温 1 h 間放置する。プレートを逆さにしてペーパータオルに押し付けるようにして除いた。

(9) 300 μ l 程度の P B S で 2 回 w a s h した。

(10) プレートを逆さにして P B S をきれいに除いた。

(11) 2 次抗体を B l o c k i n g B u f f e r で 5000 倍に希釈した (4 μ l - H R P / A n t i - M 1 3 に 21 ml の B l o c k i n g B u f f e r を入れる)。

(12) 各 w e l l に希釈二次抗体を 100 μ l / w e l l 加えた。

(13) 室温で 1 時間放置した。

(14) P B S で 6 回 w a s h し、プレートを逆さにして P B S をきれいに除いた。

(15) 21 ml の 1 × A B T S 溶液に 30 % 過酸化水素水を 36 μ l 加えた A B T S 溶液 (用時調製) をすばやく 100 μ l / w e l l 加えた。

(16) 37 ° 20 分 (~ 60 分 ; 目視で発色を判断し決める) 放置し、すぐにマイクロプレートリーダーで 405 nm で定量した。

(17) すぐに測定できない時は、S D S / D M F を 100 μ l / w e l l 加えて、反応を止めてから、405 nm で定量した。

次に陽性クローン株、No. 20 と No. 40 の株からファージミドを抽出し、定法により C 末端に 6 × ヒスタジンのタグを導入した。

【0073】

実施例 6 抗 C R P ファージが提示している s c F v 抗体のアミノ酸配列の決定

10

20

30

40

50

実施例 5 で吸光度の上昇が確認されたファージを選び、定法に従い、これらのファージが感染している大腸菌からファージミド DNA を抽出した。抽出した DNA の塩基配列を決定することにより、ファージが提示している s c F v 抗体の重鎖および軽鎖のアミノ酸配列を決定した。チェーンターミネーター法に基づく Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステム社製) を用いてサイクルシーケンス反応に供し、自動 DNA シーケンサー ABI Prism 310 DNA Analyzer (アプライドバイオシステム社製) にて解析することにより決定した。最終結果より特に性能の良いと思われた抗 CRP s c F v 抗体 No. 20, No. 40 の重鎖及び軽鎖の DNA の塩基配列とアミノ酸配列を配列表に示す。配列表の配列番号 1 及び 3 はそれぞれ抗体 No. 20 のアミノ酸配列及び DNA 配列であり、配列番号 2 及び 4 はそれぞれ抗体 No. 40 のアミノ酸配列及び DNA 配列である。

10

【0074】

実施例 7 s c F v 抗体発現と精製

〔1〕ファージミド導入大腸菌 (pCANTAB5E - CRP / XLI - Blue) の宿主変換 (プラスミド法)

- (1) CRP 抗体産生クローンよりファージミドを抽出精製した。
- (2) HB2151 のケミカルコンピテントセルを用意した。
- (3) (1) の 100 ng 程度を (2) のセルに定法にて導入した。
- (4) 大腸菌をまいた 2 × YT Ga プレートより単一コロニーを取って、2 ml の 2 × YT Ga 培地に植え継ぎ、30 で一晩振とう培養した。
- (5) 20 ml 2 × YT Ga 培地に 0.2 ml ずつ前培養した大腸菌を植え継ぎ、30 で OD₆₀₀ が 0.7 (3 ~ 4 h) になるまで振とう培養した。
- (6) 〔2〕以下により ELISA 試験などで発現の確認をした。

20

【0075】

〔2〕s c F v 産生大腸菌 (pCANTAB5E - CRP / HB2151) の IPTG 誘導 (20 ml スケール)

- (1) 単一コロニーを取って、2 ml の 2 × YT Ga (or LB Ga, or SB Ga 以下同様) 培地に植え継ぎ、30 で一晩振とう培養した。
- (2) 20 ml 2 YT a G 培地に 0.3 ml ずつ前培養した大腸菌を植え継ぎ、30 で OD₆₀₀ が 0.7 程度になるまで (3 ~ 4 h) 振とう培養した。
- (3) (2) を 3500 g (3800 rpm) 程度で集菌し、上清は捨て、20 ml 2 × YT a 培地に再懸濁し IPTG を終濃度 0.4 ~ 1.0 mM (200 mM / ml 溶液なら、100 μL) となるように加えた。
- (4) 0 / N、30、240 ~ 350 rpm で培養した。
- (5) 培養液 20 ml を 3500 g (3800 rpm) 程度の遠心で集菌し、(i) ペレットと (ii) 上清に分けた。

30

【0076】

〔3〕ペリプラズムからの s c F v の抽出

- (1) 〔2〕(5) のペレットに元の培養液の 1 / 10 量 (2 ml, 100 ml) の TS (200 mM Tris (pH 8.0) + 0.5 M sucrose) を加え再懸濁しボルテックスでよく攪拌し、30 分間氷冷した。
- (2) 4、10、000 × g で 10 分間遠心して、浸透圧ショックを行った細胞を沈殿させた。上清 (ペリプラズム画分) を別のチューブに移した。
- (3) ペリプラズム画分をスピンろ過型の分子量 10,000 分画 (アミコン) で濃縮した。スピンろ過カラムは、15 ml 用 Amicon Ultra 10,000 cut を用い 10 倍濃縮した。
- (4) ELISA 試験やタンパク定量、SDS - PAGE などに供した。

40

【0077】

〔4〕結果

50

バイオパンニングを繰り返すことによりいずれもC R Pに特異的なファージが濃縮された。結果を図4に示す。また、本明細書に用いたバイオパンニングに供したライブラリーと、そこから得られた抗体について表3及び図4に示した。

【0078】

【表3】

表3 ライブラリーごとの獲得抗体の種類

ライブラリー作製法	ライブラリーサイズ	得られたscFv抗体
Tg法	5×10^7	No. 40、No. 20

10

【0079】

ヒスチジntagで精製したs c F v抗体のE L I S A試験の結果を図5に示す。

E L I S Aでは、抗原濃度に比例し、抗体濃度にも比例した発色が確認された。

N o . 40抗体とN o . 20抗体ではN o . 40の方が発色度の高い傾向にあった。

【0080】

実施例8 イムノクロマト法テストストリップの作製

イムノクロマト法テストストリップの具体例としては、例えば図8に示されるテストストリップが挙げられる。図8において、数字1粘着シート、2は含浸部材、3は膜担体、31は捕捉部位、4は吸収用部材、5は試料添加用部材を示している。

20

図示の例では、膜担体3は、幅5mm、長さ36mmの細長い帯状のニトロセルロース製メンブレンフィルターからなり、同幅の粘着シート1の中程に貼り付けられている。該膜担体3には、そのクロマト展開始点側、すなわち図8の中心（以下「上流側」と記す。なお、その逆の側、すなわち図8におけるクロマト展開方向側は以下「下流側」と記す。）の末端から7.5mmの位置の第一の結合物が固定され、分析対象物質の捕捉部位31が形成されている。さらに、該膜担体3の上流側の末端から15.0mmの位置に所謂コントロールライン（図示せず）が設けられている。このコントロールラインは、分析対象物質の存否に係わらず反応が行われたことを確認するためのものであり、通常、前記第二の結合物と免疫学的に特異的に結合する物質（分析対象物質を除く）を膜担体3に固定化することによって形成することができる。例えば、第二の結合物としてマウス抗体を用いた場合は、該マウス抗体に対する抗体を用いることができる。

30

【0081】

実施例9 抗体のスクリーニング

上記実施例7のs c F v抗体H i s 20およびH i s 40を表4に示すように組み合わせて使用し、サンドイッチ式免疫測定法とりわけイムノクロマトグラフィーにおいて最適のモノクローナル抗体の組み合わせを検討した。抗原としてヒトC R P抗原を用い、イムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材に、当該抗原液100μLを表4に示す濃度に希釈して滴下し、室温で15分放置後、捕捉部位における呈色の度合いを肉眼で、-（着色なし）、±（極めて弱い着色）、+（弱い着色）、++（明確な着色）、+++（顕著な着色）の5段階に区分して判定した。wは反応が弱いことを示す。その結果を表4に示す。

40

【0082】

【表 4】

表4

メンブレン塗布	対照 抗ヤギポリクローナル抗体	His20 0.2mg/mL	His40 0.4mg/mL	His40 0.6mg/mL	
金コロイド標識抗体		His20 2 μ g/mL	His20 2 μ g/mL	His20 1 μ g/mL	His20 2 μ g/mL
Blank	—～±www	—～±www	—	±www	±www
0.5ng/mL	±				
1ng/mL	+				
10ng/mL	3+	+	±	±	+

10

【0083】

表4に示されるように、金コロイド標識抗体にHis40を用いた場合、捕捉部位の抗体としてHis20およびHis40の何れを使用しても感度を得ることはできなかった。これに対し、金コロイド標識抗体および捕捉部位の抗体として共にHis20を用いた場合、最適であることが示された。金コロイド標識抗体としてHis40を用い、捕捉部位の抗体としてHis20を用いた場合も実施可能であると考えられるが、Blankにおける非特異的呈色が生じ、いわゆる非特異的反応を示した。

このことから、His20 scFv抗体が最適であることが示された。CRPは5個のサブユニットが輪状に結合したペンタマー構造のため、1分子中に同一のエピトープが存在するため、金コロイド標識抗体および捕捉部位の抗体として共にHis20を用いることができる。

20

【0084】

実施例10 反応性（抗原）

金コロイド標識抗体および捕捉部位の抗体として共にHis20を用い、実施例8と同じ方法でイムノクロマト法テストストリップを作成した。

ヒトCRP抗原を検体希釈液で希釈して、各濃度に調製し、被験試料とした。この被験試料100 μ Lを上記テストストリップの試料添加用部材にマイクロピペットで滴下してクロマト展開し、室温で15分放置後、捕捉部位で捕捉されたCRPと金コロイド標識抗体との被合体の捕捉量を肉眼で観察した。捕捉量は、その量に比較して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で、-（着色なし）、±（極めて弱い着色）、+（微弱な着色）、++（明確な着色）、+++（強い着色）、++++（非常に強い着色）の6段階に区分して判定した。その結果を表5に示した。表5から、約1ng/mL以上の濃度のCRPを検出可能であることがわかる。

30

【0085】

【表 5】

表5

メンブレン塗布濃度	対照 抗ヤギポリクローナル抗体	His20 0.2mg/mL
金コロイド標識抗体濃度		His20 2 μ g/ml
Blank	—	—
0.5ng/mL	±	±ww
1ng/mL	+	±
10ng/mL	3+	+

40

【0086】

実施例11 検体との反応性および対照試薬との比較

上記実施例10にて作製したテストストリップと同様の方法にて抗CRPヤギポリクローナル抗体を用いて作製したテストストリップの感度比較を行った。CRP抗原を検体希

50

釈液を用いて各種濃度に調製し、被験試料とした。被験試料 100 μ L を上記テストストリップの試料添加用部材にマイクロピペットで滴下してクロマト展開し、室温で 15 分放置後、捕捉部位で捕捉された CRP と金コロイド標識抗体との被合体の捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダー（大塚電子製）にて測定した。捕捉量は、その量に比較して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で、-（着色なし）、+（微弱な着色）、++（明確な着色）、+++（強い着色）の 4 段階に区分して判定した。その結果を表 6 及び図 6 に示した。

【0087】

【表 6】

表 6

	対照 (ポリクローナル抗体)		抗 CRP scFv 抗体	
Blank	—	3.2	—	4.9
0.1ng/mL	±ww	5.1		
0.5ng/mL	±	16.8		
1ng/mL	+	27.6	±w	5.9
5ng/mL	2+	102.7	±	15.3
10ng/mL	2+~3+	178.5	+w	29.8
20ng/mL	3+	201.7	+	59.1
50ng/mL	3+	363.1	+~2+	138.7
100ng/mL	3+~4+	390.3	2+	212.3
200ng/mL	3+	303.5	3+	345.9
500ng/mL	2+	176.5	4+	376.6
1000ng/mL			4+	410.3

10

20

【0088】

表 6 及び図 6 から、本発明によれば、対照に見られたプロゾーン現象は確認されず、低濃度から高濃度まで幅広い測定範囲を有することが明らかとなった。また対照と同様に scFv 抗体を用いた場合でもイムノクロマト法に適用できることが示された。

【0089】

30

実施例 13 ヒト血清中の CRP の検出

上記実施例 10 にて作製したイムノクロマト法テストストリップを用いて、ヒト血清中の CRP 測定値を測定した。各血清は検体希釈液にて 1000 倍希釈し被験試料とした。そして、被験試料 100 μ L を上記テストストリップの試料添加用部材にマイクロピペットで滴下してクロマト展開し、室温で 15 分放置後、捕捉部位で捕捉された CRP 蛋白と金コロイド標識抗体との被合体の捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダー（大塚電子製）にて測定した。それぞれの血清検体は TIA 法（日立製作所製測定機器 Hitachi 7070）にて値を求めた。イムノクロマト法および TIA 法にてそれぞれ求められた CRP 値について比較検討した。その結果を表 7 及び図 7 に示した。

【0090】

40

【表 7】

表 7

	TIA 法 測定値	scFv		TIA 法 測定値	scFv
検体 No.	mg/dL	mg/dL	検体 No.	mg/dL	mg/dL
1	1.9	2.25	27	8.3	6.84
2	1.2	1.38	28	3.1	2.45
3	15.2	14.63	29	1.2	1.56
4	9.7	9.93	30	4.0	3.49
5	1.2	1.43	31	6.6	4.32
6	3.5	3.57	32	4.9	4.49
7	1.4	1.79	33	2.0	1.88
8	7.1	6.68	34	27.1	32.55
9	3.1	3.26	35	10.7	7.30
10	1.5	1.85	36	1.5	1.35
11	1.5	1.78	37	1.3	1.18
12	2.1	2.83	38	1.8	2.01
13	2.0	2.28	39	8.1	7.02
14	1.4	1.84	40	7.2	6.56
15	20.3	18.85	41	16.9	10.98
16	3.6	3.02	42	8.9	7.98
17	1.7	2.07	43	1.6	1.29
18	10.2	12.09	44	1.8	1.53
19	2.6	3.12	45	2.9	2.98
20	9.6	9.83	46	6.1	6.85
21	5.2	6.24	47	10.9	10.86
22	9.2	10.28	48	22.9	19.83
23	4.6	4.91	49	5.6	7.15
24	3.2	4.13	50	1.1	1.05
25	8.5	8.29	51	14.6	13.50
26	4.6	4.87	52	13.4	12.15

【0091】

表 7 及び図 7 から、本発明によれば TIA 法との相関は相関係数 0.97 より有意に相関していることが示された。現行幅広く使用されている TIA 法と同等の性能を有していることが示された。

【0092】

実施例 14 非特異反応性の確認

上記実施例 10 にて作製したイムノクロマト法テストストリップを用いて、*Staphylococcus aureus* KPB39、*Staphylococcus aureus* BCB1038 及び *Staphylococcus aureus* JCM2179 に対する反応性について確認した。各種菌体を PBS にマクファーランド 10 相当 (3×10^9 / mL 相当) に懸濁させた検体を検体希釈液にて適宜希釈し被検試料とした。そして、被検試料 100 μ L を上記テストストリップの試料添加用部材にマイクロピペットで滴下してクロマト展開し、室温で 15 分放置後、捕捉部位で捕捉された金コロイド標識抗体の捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダー（大塚電子製）にて測定した。捕捉量は、その量に比較して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で、-（着色なし）、±（

微弱な着色)、+ (明確な着色) の3段階に区分して判定した。Wは反応が弱いことを示す。その結果を表8に示した。

【0093】

【表8】

表8

		対照 (ポリクローナル抗体)	抗CRP scFv 抗体
<i>Staphylococcus aureus</i> KPB39	原液	—	—
	×10	—	—
	×100	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> BCB1038	原液	±w	—
	×4	—	—
<i>Staphylococcus aureus</i> JCM2179	原液	+	—
	×5	±w	N.T.
	×10	—	N.T.

10

【0094】

表8から、対照のポリクローナル抗体を用いた場合、Protein A 及び *Staphylococcus aureus* が産生する Protein A による非特異反応が確認された。本発明によれば抗体のFc部分に結合する Protein A との反応性が無い事が示され、Protein A による非特異反応を抑制できることが示された。

20

【産業上の利用可能性】

【0095】

本発明は、抗原に対する抗体の重鎖可変部と軽鎖可変部とを備えた組換え蛋白を用いたサンドイッチ式免疫測定法、特に、イムノクロマトグラフィー測定法およびイムノクロマト法テストストリップを提供するものであり、病原性ウイルスなどの抗原を簡単な方法で高感度で迅速に検出できるので、疾病の診断や病原体の検出に有用である。

【図面の簡単な説明】

【0096】

【図1】従来のファージ提示法によるscFv遺伝子のクローニング方法を示す概略図である。

30

【図2】改良したファージ提示法によるscFv遺伝子のクローニング方法を示す概略図である。

【図3】改良したファージ提示法によるscFv遺伝子のクローニング方法を示す概略図である。

【図4】実施例7の結果を示すグラフである。

【図5】実施例7の結果を示すグラフである。

【図6】実施例11の結果を示すグラフである。

【図7】実施例13の結果を示すグラフである。

【図8】aはイムノクロマト法テストストリップの平面図、bはaで示されたイムノクロマト法テストストリップの縦断面図。

40

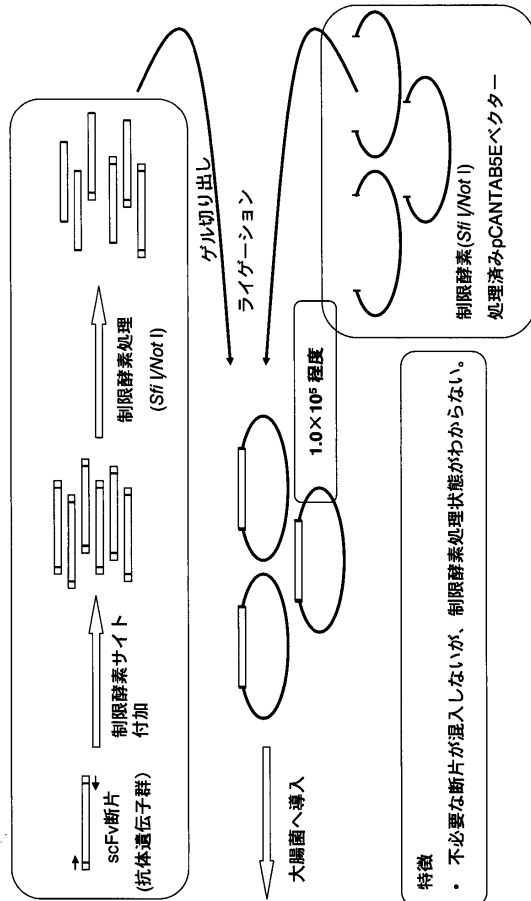
【符号の説明】

【0097】

- 1 粘着シート
- 2 含浸部材
- 3 膜担体
- 31 捕捉部位
- 4 吸収用部材
- 5 試料添加用部材

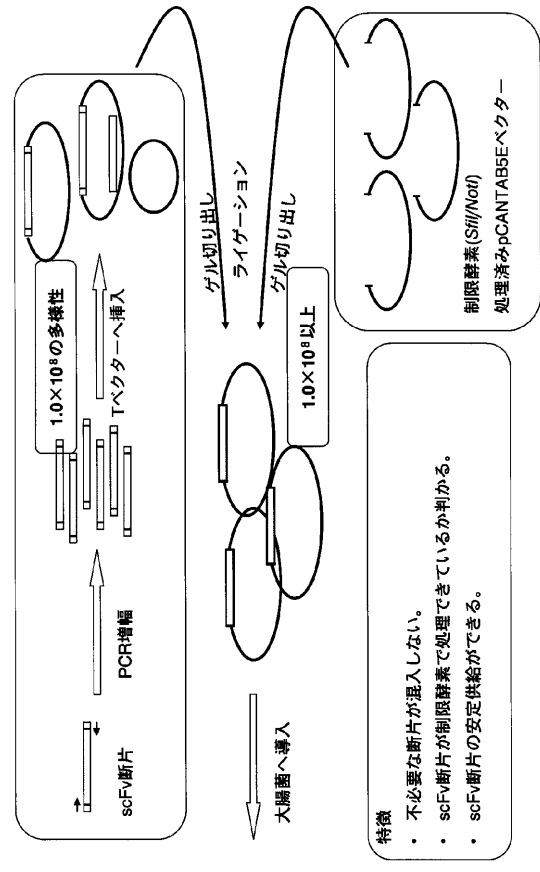
【図 1】

図 1 従来法 (Pg法; Popeらの方法に準じた方法)



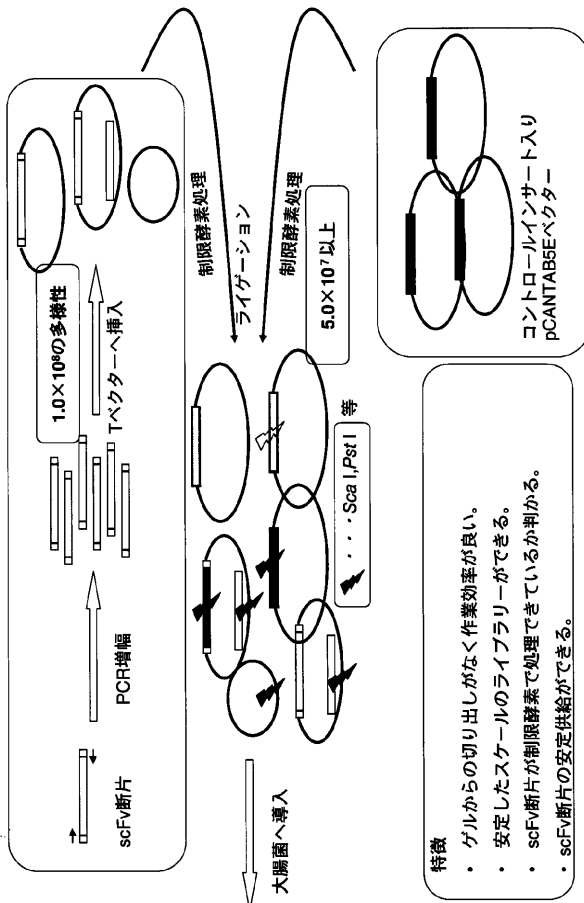
【図 2】

図 2 改良法 1 (Tg法; T-vectorを用いたゲルから切り出し方法)

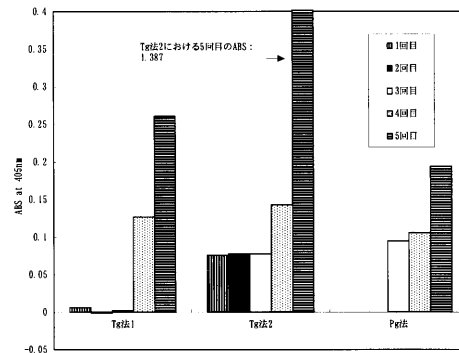


【図 3】

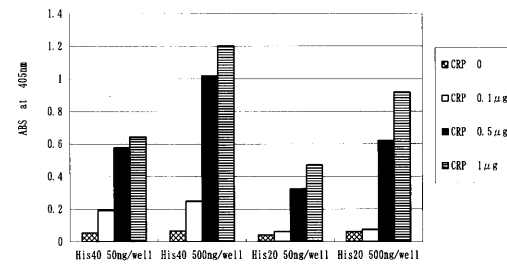
図 3 改良 2 (Tm法; T-vectorを用い、ベクターを混合する方法)



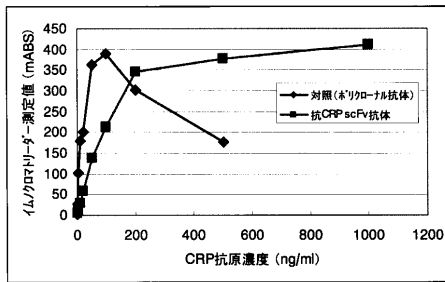
【図 4】



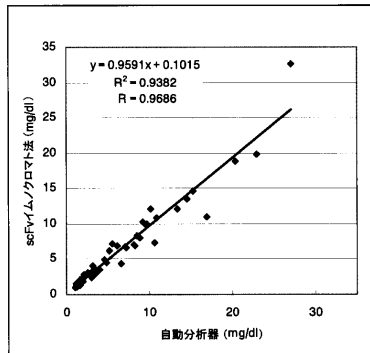
【図 5】



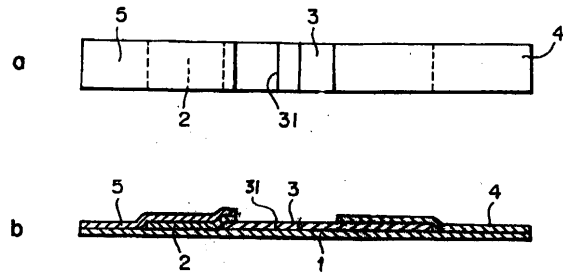
【図 6】



【図 7】



【図 8】



【配列表】

2008058208000001.app

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 33/531 (2006.01)		G 0 1 N 33/543	5 2 1	
		G 0 1 N 33/543	5 4 1	
		G 0 1 N 33/531	A	

(72)発明者 飯塚 千佳世
静岡県沼津市大岡 3 9 8 1 - 1 静岡県沼津工業技術センター内

(72)発明者 山田 晋也
静岡県沼津市大岡 3 9 8 1 - 1 静岡県沼津工業技術センター内

(72)発明者 望月 剛
静岡県沼津市神田町 6 - 2 6 株式会社ビーエル内

(72)発明者 難波 靖治
静岡県沼津市神田町 6 - 2 6 株式会社ビーエル内

F ターム(参考) 4B024 AA11 BA41 CA01 EA03 GA11 HA15
4B064 AF27 CA21 CB30 CC24 DA13
4H045 AA11 BA05 DA76 EA50 FA74

专利名称(译)	使用单链可变区抗体的免疫色谱法		
公开(公告)号	JP2008058208A	公开(公告)日	2008-03-13
申请号	JP2006237181	申请日	2006-09-01
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社比尔生命		
申请(专利权)人(译)	静冈县 株式会社ビーエル		
[标]发明人	太田俊也 飯塚千佳世 山田晋也 望月剛 難波靖治		
发明人	太田 俊也 飯塚 千佳世 山田 晋也 望月 剛 難波 靖治		
IPC分类号	G01N33/543 C12N15/09 C07K16/00 C12P19/34 C40B40/08 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/543.501.D C12N15/00.ZNA.A C07K16/00 C12P19/34.A C40B40/08 G01N33/543.521 G01N33/543.541 G01N33/531.A C12N15/00.A C12N15/00.AZN.A		
F-TERM分类号	4B024/AA11 4B024/BA41 4B024/CA01 4B024/EA03 4B024/GA11 4B024/HA15 4B064/AF27 4B064/CA21 4B064/CB30 4B064/CC24 4B064/DA13 4H045/AA11 4H045/BA05 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	野上彰		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种夹心型免疫测定法，其使用具有与抗原结合能力的重组蛋白，特别是免疫层析测定法，以及适用于其中的重组蛋白。一种使用第一结合物和第二结合物测量待测抗原的夹心免疫分析方法，其中第一结合物和第二结合物中的至少一个包括：它由重组蛋白组成，该重组蛋白具有针对抗原的抗体的重链可变区和轻链可变区。重组蛋白优选是通过噬菌体展示方法获得的单链（单链）可变区片段型抗体（scFv抗体）。[选择图]图8

