

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02011/061944

発行日 平成25年4月4日 (2013.4.4)

(43) 国際公開日 平成23年5月26日 (2011.5.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/533 (2006.01)	GO 1 N 33/533 Z N A	2 G O 5 4
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 A	4 H O 4 5
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/542 A	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	
CO 7 K 16/18 (2006.01)	CO 7 K 16/18	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 48 頁)

出願番号	特願2011-541820 (P2011-541820)	(71) 出願人	500546994 株式会社プロテイン・エクスプレス 千葉県千葉市中央区亥鼻一丁目8番15号
(21) 国際出願番号	PCT/JP2010/006809	(74) 代理人	100107984 弁理士 廣田 雅紀
(22) 国際出願日	平成22年11月19日 (2010.11.19)	(72) 発明者	上田 宏 東京都文京区本郷7-3-1 東京大学大学院工学系研究科化学生命工学専攻内
(11) 特許番号	特許第5043237号 (P5043237)	(72) 発明者	阿部 亮二 千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番15号 株式会社プロテイン・エクスプレス内
(45) 特許公報発行日	平成24年10月10日 (2012.10.10)	(72) 発明者	伊原 正喜 長野県上伊那郡南箕輪村8304 信州大学農学部応用生命科学科内
(31) 優先権主張番号	特願2009-264420 (P2009-264420)		
(32) 優先日	平成21年11月19日 (2009.11.19)		
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		

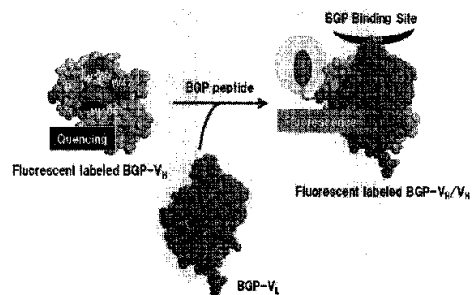
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光免疫測定方法

(57) 【要約】

固相化工程と洗浄工程とを必要としない、液相において迅速かつ簡便に目的の物質の定量的な測定を可能とし、かつ、抗原を可視化することが可能な免疫測定法を提供することを課題とした。かかる課題を、(a) 液相中で、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを、被検物質中の抗原に接触させる工程；又は液相中で、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを、被検物質中の抗原に接触させる工程；(b) 前記蛍光色素の蛍光強度を測定する工程；(c) 液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、被検物質に含まれる抗原量を算出する工程；を順次行い、被検物質中に存在する目的とする抗原の濃度を測定することにより解決した。

【図12】



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを備え、前記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素により標識されたキットであって、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 2】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとが結合した一本鎖抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の抗原濃度測定・検出用キット。

10

【請求項 3】

蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素又はオキサジン系蛍光色素であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 4】

蛍光色素が、CR110、TAMRA、又はATTO655であることを特徴とする請求項 3 記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 5】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出用キット。

20

【請求項 6】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 7】

以下の工程 (a) ~ (c) を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定・検出方法。

(a) 抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを、

30

(a1) 液相中で、被検物質中の抗原に接触させる工程；又は

(a2) 抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを投与した被検非ヒト動物対象中の抗原に接触させる工程；又は

(a3) インピトロで、被検対象中の抗原に接触させる工程；

(b) 前記 (a1) の場合には、蛍光色素の蛍光強度を測定し、

前記 (a2) 及び (a3) の場合には、前記蛍光色素の蛍光を検出する工程；

(c) 液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、前記 (a1) の場合には、被検物質に含まれる抗原量を算出し、前記 (a2) 及び (a3) の場合には、被検対象に含まれる抗原を可視化する工程；

40

【請求項 8】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとが結合した一本鎖抗体であることを特徴とする請求項 7 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 9】

蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素又はオキサジン系蛍光色素であることを特徴とする請求項 7 又は 8 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 10】

蛍光色素が、CR110、TAMRA、又はATTO655であることを特徴とする請求項 9 記載の抗原濃度測定・検出方法。

50

【請求項 1 1】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 1 2】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、固相化工程及び洗浄工程を必要としない新規の抗原濃度測定方法や、かかる抗原濃度測定方法を行うためのキット等に関する。

【背景技術】

【0002】

抗原や抗体の濃度を測定する方法のうち、臨床診断、基礎研究や環境調査などに最も広く用いられている測定方法は、同一の抗原の異なるエピトープを認識する 2 種類のモノクローナル抗体、あるいはモノクローナル抗体とポリクローナル抗体を使用する、サンドイッチ E L I S A 法（あるいはサンドイッチ R I A 法）と呼ばれる免疫測定法である。サンドイッチ法の詳細は以下に述べる通りである。第一段階として一次抗体と呼ばれるモノ/ポリクローナル抗体を測定用プレートに固定化し、そこに抗原を含む検体を注ぎ、一定時間反応させて抗体と抗原を結合させる。次に、第二段階として、抗体に結合した夾雑物や、プレートに非特異的に結合した抗原を洗浄液で洗浄して取り除く。第三段階として、予め酵素、蛍光色素あるいはラジオアイソトープなどのレポーター分子を結合させた標識二次抗体溶液を注ぎ、一定時間反応させ、一次抗体によって補足された抗原にさらに標識二次抗体を結合させる。反応後に、洗浄液で余分の標識抗体を取り除き、測定用プレートに結合したレポーター分子の量を酵素活性、蛍光あるいはラジオアイソトープなどで測定することにより検体中の抗原量を測定する。

20

30

【0003】

前述のように、通常のスンドイッチ E L I S A 法では、エピトープの異なる 2 種類の抗体が必要となるが、例えば、低分子化合物などを抗原とする場合には、異なるエピトープを認識する複数の抗体を作製することは困難である。このため、上田らは、1 種類の抗体の重鎖可変領域 (V H) と軽鎖可変領域 (V L) とを用いた、オープンサンドイッチ法と呼ばれる、精度の高い低分子化合物の免疫測定法を確立した (特許文献 1 及び 2、非特許文献 1 及び 2)。この方法は、抗原を特異的に認識する抗体の V H 領域ポリペプチド及び V L 領域ポリペプチドを調製し、一方のポリペプチドをレポーター分子で標識して標識化ポリペプチドとし、他方のポリペプチドを固相に固定して固定化ポリペプチドとし、抗原含有試料及び標識化ポリペプチドを固定化ポリペプチドに接触させ、固定化ポリペプチドに結合した標識化ポリペプチドのレポーター分子の量を測定する抗原濃度測定方法である。また、低分子化合物を測定するための測定法としては、免疫測定法の他にも液体クロマトグラフ法等があるが、高精度な測定機器が必要な上、被検体の必要量も多く、測定時間もかかり、しかも汎用性が低い。

40

【0004】

また、蛍光色素標識した抗体を用いて抗原の濃度を測定する免疫測定方法としては、抗体と抗原とをそれぞれ異なる蛍光色素により標識し、蛍光色素間で起こる蛍光共鳴エネルギー転移 (F R E T) の効率の変化を指標とした免疫測定法や (非特許文献 3 及び 4)、蛍光標識した抗体にあらかじめ消光物質を混合することにより消光されていた抗体の蛍光が、目的検出物質の導入により増大する現象を用いるクエンチングによる効率の変化を指

50

標とした免疫測定法や、蛍光色素で標識した抗体を用いて、標識抗体と測定対象物が凝集することにより起こる蛍光強度の減少を測定する蛍光免疫測定方法（特許文献3）が知られている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】特開平10-78436号公報

【特許文献2】特許第3784111号公報

【特許文献3】特開平10-282098号公報

【非特許文献】

【0006】

【非特許文献1】上田宏，薬学雑誌 27：71-80(2007)

【非特許文献2】Lim SL, et al., Anal Chem. 79(16): 6193-200(2007)

【非特許文献3】Iijima I. and Hoshaka T., ChemBiochem. 17;10(6): 999-1006 (2009)

【非特許文献4】Kajihara D, et al., Nat Methods. 3(11): 923(2006)

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

現在までに知られている免疫測定法は、上述したように、いずれも抗体又は抗原を固相化する工程と、非特異的な標識化合物の吸着を除去するための洗浄工程とを必要とするものであった。これらの工程は作業が煩雑で時間が掛かる上に、結果のばらつきの原因となることから、固相化工程や洗浄工程を必要としない液相系免疫測定方法の開発が求められていた。本願発明の課題は、固相化工程と洗浄工程とを必要としない、液相において迅速かつ簡便に目的の物質の定量的な測定を可能とし、かつ、抗原を可視化することが可能な免疫測定法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らはまず、異なる蛍光色素により標識された抗体VH及びVLを用いて、蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)効率を指標とした抗体/抗原結合活性評価系の確立を試みた。FRET測定には、蛍光色素CR110により標識した抗BGP抗体軽鎖領域(CR110-VL)と、蛍光色素TAMRAにより標識した抗BGP抗体重鎖領域(TAMRA-VH)とを用い、抗原が存在しない場合はCR110からTAMRAへFRETが生じないのに対して、抗原が存在する場合には、VHとVLは抗原を介して三者複合体を形成し、CR110からTAMRAへのFRETが引き起こされると予想して、CR110-VLと、TAMRA-VH又は標識していないVHとを、異なる濃度のBGP抗原ペプチドとともにインキュベートし、CR110の蛍光強度の変化を蛍光強度分布解析法(FIDA)により解析した。その結果、CR110-VLとTAMRA-VHとを反応させた場合には、CR110の蛍光強度はBGP抗原ペプチドの濃度依存的に低下したことから、CR110-VL及びTAMRA-VHが、抗原ペプチドを介して結合して複合体を形成し、予想されたようなCR110からTAMRAへのFRETが引き起こされることが確認された。

【0009】

一方、意外なことに、CR110-VLと標識していないVHとを反応させた場合には、CR110の蛍光強度はBGP抗原ペプチドの濃度依存的に増加した。本発明者らは、同様の現象が標識したVHを用いた場合にも認められるかどうかを確認する目的で、TAMRA-VHと、CR110-VL又は標識していないVLとを、異なる濃度のBGP抗原ペプチドとともにインキュベートし、TAMRAの蛍光強度の変化を解析した。その結果、TAMRA-VHと標識していないVLとを反応させた場合にも、TAMRA-VHの蛍光強度はBGP抗原ペプチドの濃度依存的に増加することが明らかとなった。これらの結果は全く予想外のものであり、VL及びVHが蛍光色素(CR110、TAMRA)

10

20

30

40

50

に対してクエンチャーとして作用しており、VH及びVLが抗原ペプチドを介して複合体を形成したときのみ、このクエンチが解消されて蛍光強度が増加するのではないかとの仮説を立てた。

【0010】

上記の仮説を基に、本発明者らは、クエンチング現象を利用した新たな測定方法（以後、「均一系蛍光免疫測定法(homogenous fluorescent based immunoassay)」と称することもある）の確立を試み、TAMRA-VHと異なる濃度のBGPペプチドとを、標識されていないVLの存在又は非存在下で反応させ、蛍光強度を測定した。その結果、VLの存在下では、TAMRA-VHの蛍光強度はBGPペプチドの濃度依存的に増加し、VLの存在/非存在下におけるTAMRA-VHの蛍光強度の比(+VL/-VL)を解析した結果から、高感度の均一系蛍光免疫測定法が構築できることを見出した。さらに、発明者らは、蛍光色素としてATTO655を使用すること、スパーサーを介して蛍光色素をVHに標識することにより、上記「均一系蛍光免疫測定法」の感度が増加することを確認した。

10

【0011】

さらに、本発明者らは、VHに存在する4つのトリプトファン（以下、Trp又はWと表記することもある）をそれぞれフェニルアラニン（以下、Phe又はFと表記することもある）に変異させた変異VHを用いてクエンチ効果を確認する実験を行い、VHのアミノ酸配列における第36番目、第47番目、第106番目（Kabatの番号付け系においては第103番目に対応）のトリプトファンが蛍光色素のクエンチャーとして作用していることを明らかにした。これらのトリプトファンは、マウス抗体VHにおいて高度に保存されていることから、本発明の「均一系蛍光免疫測定法」を適用することにより、様々な抗体を用いた抗原の測定を行うことが可能であることがわかった。

20

本発明は、以上の知見に基づき完成するに至ったものである。

【発明の効果】

【0012】

本発明によると、液相において迅速かつ簡便に目的物質の定量的な測定が可能な免疫測定方法や、該測定方法による抗原の測定を行うためのキットを提供することができる。本発明の測定方法は、抗原と、抗体VL及びVHとの結合を、上記抗体VL又はVHに標識した蛍光色素の蛍光強度を指標として検出/測定する方法であって、上記抗体VLとVHとが結合していない時、上記蛍光色素はクエンチされた状態にあり、上記抗体VL及びVHが抗原を介して結合した時、上記蛍光色素のクエンチが解消される、という新たな知見に基づいたものであって、従来免疫測定法では不可欠であった固相化工程と洗浄工程とを必要としないため、ばらつきが少なく精度の高い測定結果を短時間で得ることができる。

30

【0013】

すなわち本発明は、(1)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを備え、前記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素により標識されたキットであって、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キットや、(2)抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとが結合した一本鎖抗体であることを特徴とする上記(1)記載の抗原濃度測定・検出用キットに関する。

40

【0014】

また本発明は、(3)蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素又はオキサジン系蛍光色素であることを特徴とする上記(1)又は(2)記載の抗原濃度測定・検出用キットや、(4)蛍光色素が、CR110、TAMRA、又はATTO655であることを特徴とする上記(3)記載の抗原濃度測定・検出用キットや、(5)抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴と

50

する上記(1)~(4)のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出用キットや、(6)抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号7に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする上記(1)~(4)のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出用キットに関する。

【0015】

さらに本発明は、(7)(a)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを、(a1)液相中で、被検物質中の抗原に接触させる工程；又は、(a2)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを投与した被検非ヒト動物対象中の抗原に接触させる工程；又は(a3)インビトロで、被検対象中の抗原に接触させる工程；(b)前記(a1)の場合には、蛍光色素の蛍光強度を測定し、前記(a2)及び(a3)の場合には、前記蛍光色素の蛍光を検出する工程；(c)液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、前記(a1)の場合には、被検物質に含まれる抗原量を算出し、前記(a2)及び(a3)の場合には、被検対象に含まれる抗原を可視化する工程；の工程(a)~(c)を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定・検出方法に関する。

10

【0016】

また本発明は、(8)抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとが結合した一本鎖抗体であることを特徴とする上記(7)記載の抗原濃度測定・検出方法や、(9)蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素又はオキサジン系蛍光色素であることを特徴とする上記(7)又は(8)記載の抗原濃度測定・検出方法や、(10)蛍光色素が、CR110、TAMRA、又はATTO655であることを特徴とする上記(9)記載の抗原濃度測定・検出方法や、(11)抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号1に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号2に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする上記(7)~(10)のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出方法や、(12)抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号6に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号7に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする上記(7)~(10)のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出方法に関する。

20

30

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】本発明のCR110標識抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチド(CR110-VL)、TAMRA標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチド(TAMRA-VH)、及び、それらの複合体(CR110-VL/TAMRA-VH)を模式的に示した図である。

【図2】異なる濃度のBGPペプチドの存在下で、CR110-VL及びTAMRA-VHを反応させて、490nmの励起光を用いて蛍光スペクトルを測定した結果を示す図である。

40

【図3】異なる濃度のBGPペプチドの存在下で、CR110-VL及びTAMRA-VHを反応させて、525nm(F525)及び575nm(F575)の蛍光強度の変化を測定した結果を示す図である。

【図4】異なる濃度のBGPペプチドの存在下で、CR110-VL及びTAMRA-VHを反応させて525nm及び575nmの蛍光強度を測定し、蛍光強度の比(F575/F525)の変化を解析した結果を示す図である。

【図5】本発明のCR110標識抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチド、及び、TAMRA標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドを、異なる濃度のBGPペプチド存在下

50

で反応させ、488nmレーザーと510～560nm蛍光フィルターを用いて蛍光強度分布解析法(FIDA)により解析した結果を示す図である。図中、CR110-VLはCR110標識抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを、TAMRA-VHはTAMRA標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドを、w.t.-VHは標識されていない抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドをそれぞれ示す。

【図6】本発明のCR110標識抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチド、及び、TAMRA標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドを、異なる濃度のBGPペプチド存在下で反応させ、543nmレーザーと560～620nm蛍光フィルターを用いて蛍光強度分布解析法(FIDA)により解析した結果を示す図である。図中、CR110-VLはCR110標識抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを、TAMRA-VHはTAMRA標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドを、w.t.-VLは標識されていない抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを示す。

【図7】本発明のTAMRA標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、異なる濃度のBGPペプチドとを、標識されていない抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドの存在又は非存在下で反応させ、543nmのHe-Neレーザーを用いて蛍光強度を測定した結果を示す図である。図中、+VLは標識されていない抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドの存在下で反応させた結果を、-VLは標識されていない抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドの非存在下で反応させ蛍光強度を測定した結果をそれぞれ示す。

【図8】本発明のTAMRA標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、異なる濃度のBGPペプチドとを、標識されていない抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドの存在又は非存在下で反応させ、蛍光強度の比(+VL/-VL)を解析した結果を示す図である。

【図9】本発明の抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチド中に存在するトリプトファン残基について示した図である。抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとの複合体(VH/VL complex)、及び単独の抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチド(VH)の3次元構造予測モデルにおけるトリプトファン残基(W33、W36、W47、W106)の位置を示す図である。なお、これらのトリプトファン残基の位置は、カバット(Kabat)の番号付け系ではそれぞれVHの第33番目、第36番目、第47番目、第103番目のアミノ酸に対応する。

【図10】野生型(WT)又は変異型抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチド(W33F、W36F、W47F、W106F)と抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを、異なる濃度のBGPペプチド存在下で反応させ、543nmのHe-Neレーザーを用いて蛍光強度を測定した結果を示す図である。

【図11】野生型(WT)又は変異型抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチド(W33F、W36F、W47F、W106F)と抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを、異なる濃度のBGPペプチド存在下で反応させ、蛍光相関分光法(Fluorescence Correlation Spectroscopy; FCS)により拡散時間(diffusion time)の変化を解析した結果を示す図である。

【図12】スペーサー付加蛍光標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチド(Fluorescently labeled BGP-VH)と、抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチド(BGP-VL)との複合体(Fluorescently labeled BGP-VH/VL)の3次元構造予測モデルを示す図である。

【図13】スペーサー(GGGSGGG; 配列番号4)を含む又は含まないATTO655標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを、異なる濃度のBGPペプチド存在下で反応させ、蛍光強度を測定した結果を示す図である。

【図14】スペーサー(GGGSGGG; 配列番号4)を含む又は含まないATTO655標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを、異なる濃度のBGPペプチド存在下で反応させ、測定した蛍光強度の比を示す図である。

10

20

30

40

50

【図15】本発明の蛍光標識抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを結合させた蛍光標識一本鎖抗体の3次元構造予測モデルを示す図である。

【図16】本発明の蛍光標識抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを結合させた蛍光標識一本鎖抗体の1次元構造の模式図を示す図である。

【図17】スパーサーを含む又は含まないA T T O 6 5 5 標識抗 B G P 一本鎖抗体と異なる濃度の B G P ペプチドとを反応させ、蛍光強度を測定した結果を示す図である。

【図18】スパーサーを含む又は含まないA T T O 6 5 5 標識抗 B G P 一本鎖抗体と異なる濃度の B G P ペプチドとを反応させ、測定した蛍光強度の比を示す図である。

【図19】本発明のA T T O 6 5 5 標識抗 B G P 一本鎖抗体と異なる濃度の B G P ペプチドとを反応させ、蛍光イメージアナライザー (F M B I O - I I I ; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製) を用いて蛍光を検出した結果を示す図である。図中、F L 9 2 は配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるスパーサー配列を、2 T A G は M X (X は蛍光標識アミノ酸) からなるスパーサー配列をそれぞれ示す。

【図20】スパーサーを含む又は含まない蛍光標識抗 B G P 一本鎖抗体と異なる濃度の B G P ペプチドとを反応させ、蛍光イメージアナライザー (F M B I O - I I I ; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製) を用いて蛍光を定量した結果を示す図である。図中、F L 9 2 は配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるスパーサー配列を、2 T A G は M X (X は蛍光標識アミノ酸) からなるスパーサー配列をそれぞれ示す。

【図21】スパーサーを含む又は含まない蛍光標識抗 B G P 一本鎖抗体と異なる濃度の B G P ペプチドとを反応させ、蛍光イメージアナライザー (F M B I O - I I I ; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製) を用いて蛍光を検出した結果を示す図である。図中、F L 9 2 は配列番号3に示されるアミノ酸配列からなるスパーサー配列を、2 T A G は M X (X は蛍光標識アミノ酸) からなるスパーサー配列をそれぞれ示す。

【図22】F L 9 2 スパーサー (配列番号3) を含む蛍光標識抗 B G P 一本鎖抗体と異なる濃度の B G P ペプチドとを反応させ、蛍光イメージアナライザー (F M B I O - I I I ; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製) 及び M F 2 0 / F l u o r o P o i n t - L i g h t (オリンパス社製) を用いて測定した蛍光強度の比を示す図である。

【図23】スパーサーを含む又は含まない T A M R A 標識抗 B G P 一本鎖抗体と異なる濃度の B G P ペプチドとを反応させ、蛍光を検出した結果を示す図である。G 3 S (1) は G G G S を、G 3 S (2) は G G G S G G G S (配列番号4) を、G 3 S (3) は G G G S G G G S G G G S (配列番号10) のスパーサー (リンカー) の配列をそれぞれ含むことを示す。

【図24】T A M R A 標識抗 B G P 一本鎖抗体タンパク質と、異なる濃度の B G P とを、P B S T 緩衝液および終濃度 5 0 % ヒト血漿存在下で反応させ、蛍光強度を測定した結果を示す図である。

【図25】本発明の A T T O 6 5 5 標識抗ビスフェノール A (B P A) 抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び異なる濃度の B P A を、標識されていない抗 B P A 抗体軽鎖可変領域ポリペプチドの存在又は非存在下で反応させ、蛍光強度を測定した結果を示す図である。

【図26】A T T O 6 5 5 標識抗 B P A 抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び異なる濃度の B P A を、標識されていない抗 B P A 抗体軽鎖可変領域ポリペプチドの存在又は非存在下で反応させ、測定した蛍光強度の比を示す図である。

【図27】スパーサーを含む又は含まない T A M R A 標識抗 B P A 一本鎖抗体と異なる濃度の B P A ペプチドとを反応させ、蛍光を検出した結果を示す図である。G 3 S (2) は G G G S G G G S (配列番号4) を、G 3 S (3) は G G G S G G G S G G G S (配列番号10) を、G 3 S (5) は G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S (配列番号11) のスパーサー (リンカー) の配列をそれぞれ含むことを示す。

【図28】T A M R A 標識抗 H E L 一本鎖抗体と異なる濃度の H E L タンパク質とを反応させ、蛍光を検出した結果を示す図である。

【図29】T A M R A 標識抗エストラジオール一本鎖抗体と異なる濃度のエストラジオールとを反応させ、蛍光を検出した結果を示す図である。

10

20

30

40

50

【図30】TAMRA標識抗SA一本鎖抗体と、異なる濃度のBSA又はHSAとを反応させ、蛍光を検出した結果を示す図である。

【図31】マウス抗体重鎖可変領域のアミノ酸配列において、カバット(Kabat)の番号付け系で第36番目、第47番目、又は第103番目のトリプトファンが保存されていることを示す図である。A)抗BGPマウス抗体重鎖可変領域の3次元構造予測モデル、及び、該抗BGPマウス抗体重鎖可変領域に含まれるトリプトファン残基のうちW36、W47、W106が特にクエンチングに関与している可能性を示す図である。

【図32】多くの種類のマウス抗体重鎖可変領域において、W33が高度に保存されていることを示す図である。

【図33】多くの種類のマウス抗体重鎖可変領域において、W36が高度に保存されていることを示す図である。

【図34】多くの種類のマウス抗体重鎖可変領域において、W47が高度に保存されていることを示す図である。

【図35】多くの種類のマウス抗体重鎖可変領域において、W106が高度に保存されていることを示す図である。なお、上記のVHのアミノ酸配列におけるTrp106は、カバット(Kabat)の番号付け系においては第103番目の位置に対応するものである。

【発明を実施するための形態】

【0018】

本発明の抗原濃度測定・検出用キットとしては、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを備え、前記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素により標識されたキットであって、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キット、すなわち、(1)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを備えたキットであって、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として抗原濃度を測定することができる抗原濃度測定用キットや、(2)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを備えたキットであって、被検対象中の抗原量と上記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として抗原を可視化することができる抗原検出用キットや、(3)抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを備えたキットであって、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として抗原濃度を測定することができる抗原濃度測定用キットや、(4)抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを備えたキットであって、被検対象中の抗原量と上記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として抗原を可視化することができる抗原検出用キットであれば特に制限されず、上記抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び上記抗体重鎖可変領域ポリペプチドは、同一の抗原分子を介して複合体を形成することが可能であれば、それぞれ独立した2つポリペプチド断片として調製されたものであってもよいし、リンカー等を介して融合した一本鎖抗体として調製されたものであってもよい。また、上記抗原としては、上記抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び上記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドにより特異的に認識される抗原であれば特に制限されず、例えば、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質、糖脂質、低分子化合物等を挙げることができる。

【0019】

本発明の抗原濃度測定・検出方法としては、(a)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを、(a1)液相中で、被検物質中の抗原に接触させる工程；又は(a2)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを投与した被検非ヒト

10

20

30

40

50

動物対象中の抗原に接触させる工程；又は（a3）インビトロで、被検対象中の抗原に接触させる工程；（b）前記（a1）の場合には、蛍光色素の蛍光強度を測定し、前記（a2）及び（a3）の場合には、前記蛍光色素の蛍光を検出する工程；（c）液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、前記（a1）の場合には、被検物質に含まれる抗原量を算出し、前記（a2）及び（a3）の場合には、被検対象に含まれる抗原を可視化する工程；の（a）～（c）を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定・検出方法、すなわち、液相中で、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを、被検物質中の抗原に接触させる工程（a1-1）；前記蛍光色素の蛍光強度を測定する工程（b）；被検物質に含まれる抗原量を算出する工程、すなわち液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、被検物質に含まれる抗原量を算出する工程（c）；を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定方法（以下、「測定方法[I]」ということがある）や、液相中で、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを、被検物質中の抗原に接触させる工程（a1-2）；前記蛍光色素の蛍光強度を測定する工程（b）；被検物質に含まれる抗原量を算出する工程、すなわち液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、被検物質に含まれる抗原量を算出する工程（c）；を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定方法（以下、「測定方法[II]」ということがある）や、抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドを投与した被検非ヒト動物対象中の抗原に接触させる工程（a2-1）；（b）前記蛍光色素の蛍光を検出する工程；（c）被検非ヒト動物対象中の抗原量と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、被検対象に含まれる抗原を可視化する工程；を順次備えることを特徴とする抗原検出方法（以下、「非ヒト動物検出方法[I]」ということがある）や、抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを投与した被検非ヒト動物対象中の抗原に接触させる工程（a2-2）；前記蛍光色素の蛍光を検出する工程（b）；被検非ヒト動物対象中の抗原量と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、被検対象に含まれる抗原を可視化する工程（c）；を順次備えることを特徴とする抗原検出方法（以下、「非ヒト動物検出方法[II]」ということがある）や、インビトロで、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを、被検対象中の抗原に接触させる工程（a3-1）；前記蛍光色素の蛍光を検出する工程（b）；被検対象中の抗原量と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、被検対象に含まれる抗原を可視化する工程（c）；を順次備えることを特徴とする抗原検出方法（以下、「インビトロ検出方法[I]」ということがある）や、インビトロで、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを、被検対象中の抗原に接触させる工程（a3-2）；前記蛍光色素の蛍光を検出する工程（b）；被検対象中の抗原量と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、被検対象に含まれる抗原を可視化する工程（c）；を順次備えることを特徴とする抗原検出方法（以下、「インビトロ検出方法[II]」ということがある）であれば特に制限されず、上記抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び上記抗体重鎖可変領域ポリペプチドは、同一の抗原分子を介して複合体を形成することが可能であれば、それぞれ独立した2つポリペプチド断片として調製されたものであってもよいし、リンカー等を介して融合した一本鎖抗体として調製されたものであってもよい。また、上記抗原としては、上記抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び上記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドにより特異的に認識される抗原であれば特に制限されず、例えば、タンパク質、ペプチド、糖質、脂質、糖脂質、低分子化合物等を挙げることができる。

【0020】

上記抗体重鎖可変領域ポリペプチドとしては、抗体重鎖遺伝子のV領域、D領域、及びJ領域のエクソンによりコードされる抗体重鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列を含むものであれば特に制限されるものではなく、上記抗体重鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列

10

20

30

40

50

のN末端及び/又はC末端側に、さらに任意のアミノ酸配列が付加されたものであってもよい。また、上記抗体重鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列としては、カバット (Kabat) の番号付け系で第36番目、第47番目、又は第103番目のアミノ酸がトリプトファンであるアミノ酸配列であることが好ましく、具体的には、配列番号1に示されるアミノ酸配列や、配列番号6に示されるアミノ酸配列を好適に例示することができる。

【0021】

上記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとしては、抗体軽鎖遺伝子のV領域及びJ領域のエクソンによりコードされる抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列を含むものであれば特に制限されるものではなく、上記抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列のN末端及び/又はC末端側に、さらに任意のアミノ酸配列が付加されたものであってもよい。また、上記抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列としては、カバット (Kabat) の番号付け系で第35番目のアミノ酸がトリプトファンであるアミノ酸配列であることが好ましく、具体的には、配列番号2に示されるアミノ酸配列や、配列番号7に示されるアミノ酸配列を好適に例示することができる。

10

【0022】

抗体軽鎖可変領域ポリペプチド、抗体軽鎖可変領域ポリペプチド、及び、抗体軽鎖可変領域と抗体軽鎖可変領域の両方を含む一本鎖抗体ポリペプチドは、公知の化学合成法、遺伝子組換え技術、抗体分子のタンパク質分解酵素による分解方法等を用いて調製することができるが、中でも、比較的容易な操作でかつ大量に調製することが可能な遺伝子組換え技術により調製することが好ましい。遺伝子組換え技術により上記ポリペプチドを調製する場合には、抗体軽鎖可変領域又は抗体軽鎖可変領域に特異的なアミノ酸配列をコードする塩基配列を含むDNAを好適なベクターに導入して発現ベクターを作製し、バクテリア、酵母、昆虫、動植物細胞などを宿主として用いた発現系や、無細胞翻訳系により目的のポリペプチドを発現させることができる。無細胞翻訳系においてポリペプチドの発現を行う場合は、例えば、大腸菌、小麦胚芽、ウサギ網状赤血球等の無細胞抽出液に、ヌクレオチド3リン酸や各種アミノ酸を加えた反応液中で、ポリペプチドを発現させることができる。

20

【0023】

上記蛍光色素としては、抗体重鎖可変領域ポリペプチド又は抗体軽鎖可変領域ポリペプチドに標識された状態でクエンチ (消光) されるものであれば特に制限されず、ローダミン、クマリン、Cy、EvoBlue、オキサジン、Carbopyronin、naphthalene、biphenyl、anthracene、phenanthrene、pyrene、carbazole等を基本骨格として有する蛍光色素やその蛍光色素の誘導体を例示することができ、具体的には、CR110: carboxyrhodamine 110: Rhodamine Green (商標名)、TAMRA: carbocytetremethylrhodamine: TMR、ATTO655 (商標名)、BODIPY FL (商標名): 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 493/503 (商標名): 4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-8-propionic acid、BODIPY R6G (商標名): 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 558/568 (商標名): 4,4-difluoro-5-(2-thienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 564/570 (商標名): 4,4-difluoro-5-styryl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 576/589 (商標名): 4,4-difluoro-5-(2-pyrrolyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、BODIPY 581/591 (商標名): 4,4-difluoro-5-(4-phenyl-1,3-butadienyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indancene-3-propionic acid、Cy3 (商標名)、Cy3B (商標名)、Cy3.5 (商標名)、Cy5 (商標名)、Cy5.5 (商標名)、EvoBlue 10 (商標名)、EvoBlue 30 (商標名)、MR121、ATTO 390 (商標名)、ATTO 425 (商標名)、ATTO 465 (商標名)、ATTO 488 (商標名)、ATTO 495 (商標名)、ATTO 520 (商標名)、ATTO 532 (商標名)、ATTO Rhod6G (商標名)、ATTO 550 (商標名)、ATTO 565 (商標名)、A

30

40

50

TTO Rho3B (商標名)、ATTO Rho11 (商標名)、ATTO Rho12 (商標名)、ATTO Thio12 (商標名)、ATTO 610 (商標名)、ATTO 611X (商標名)、ATTO 620 (商標名)、ATTO Rho14 (商標名)、ATTO 633 (商標名)、ATTO 647 (商標名)、ATTO 647N (商標名)、ATTO 655 (商標名)、ATTO Oxa12 (商標名)、ATTO 700 (商標名)、ATTO 725 (商標名)、ATTO 740 (商標名)、Alexa Fluor 350 (商標名)、Alexa Fluor 405 (商標名)、Alexa Fluor 430 (商標名)、Alexa Fluor 488 (商標名)、Alexa Fluor 532 (商標名)、Alexa Fluor 546 (商標名)、Alexa Fluor 555 (商標名)、Alexa Fluor 568 (商標名)、Alexa Fluor 594 (商標名)、Alexa Fluor 633 (商標名)、Alexa Fluor 647 (商標名)、Alexa Fluor 680 (商標名)、Alexa Fluor 700 (商標名)、Alexa Fluor 750 (商標名)、Alexa Fluor 790 (商標名)、Rhodamine Red-X (商標名)、Texas Red-X (商標名)、5(6)-TAMRA-X (商標名)、5TAMRA (商標名)、SFx (商標名)を挙げることができるが、中でも、ローダミン系蛍光色素であるCR110やTAMRA、及びオキサジン系蛍光色素であるATTO655を特に好適に挙げることができる。

10

【0024】

蛍光色素により、抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び抗体重鎖可変領域ポリペプチドを標識する方法としては特に制限されず、ポリペプチドの両端又は側鎖の官能基を利用して直接又は架橋剤を介して間接的に標識する方法や、*in vitro*転写・翻訳系を利用してポリペプチドを合成しながら部位特異的に標識する手法等を用いることができる。*in vitro*転写・翻訳系を利用して標識する方法としては、アンバーサプレッション法(Elman J et al.(1991)Methods Enzymol.202:301-36)、C末端標識法(特開2000-139468号公報)、N末端標識法(米国特許第5,643,722号公報、Olejnik et al.(2005)Methods 36:252-260)等が知られており、アンバーサプレッション法では、標識のターゲット部位のアミノ酸をコードするコドン、終止コドンの一つであるアンバーコドンに置き換えたDNA又はmRNAを作製し、*in vitro*転写・翻訳系を用いて該DNA又はmRNAからタンパク質を合成する。その際、タンパク質合成反応液に標識された非天然アミノ酸を結合させたサブレッサー-tRNAを添加することで、アンバーコドンに置換した部位に標識アミノ酸が導入されたタンパク質を合成することができる。また、C末端標識法では、標識したピューロマイシンを最適濃度で添加した*in vitro*転写・翻訳系において、DNA又はmRNAからタンパク質への翻訳を行うことにより、C末端特異的に標識が導入されたタンパク質を合成することができる。

20

30

【0025】

上記本発明の抗原濃度測定・検出用キットは、緩衝液、測定用のチューブ又はプレート、標準物質として使用できる抗原等、通常この種の免疫測定キットに用いられる試薬や器具を含んでいてもよい。かかる本発明の抗原濃度測定・検出用キットは、本発明の抗原濃度測定・検出方法に好適に用いることができる。

40

【0026】

上記本発明の測定方法[I]における工程(a1-1)においては、緩衝液や生理食塩水等の溶液に、抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドをそれぞれ加えた後に、被検物質を加えてインキュベートし、溶液中で抗体軽鎖可変領域ポリペプチド/蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド/抗体により特異的に認識される抗原からなる三者複合体を形成させる。また、上記測定方法[II]における工程(a1-2)においては、緩衝液や生理食塩水等の溶液に、抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを、それぞれ加えた後に、被検物質を加えてインキュベートし、溶液中で抗体重鎖可変領域ポリペプチド/蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチド/抗体に

50

より特異的に認識される抗原からなる三者複合体を形成させる。上記被検物質としては、測定対象となるターゲット抗原を含む可能性がある血清、血漿、唾液、尿等の体液、培養上清、細胞抽出液、菌体抽出液、工業廃水を挙げることができる。また、上記インキュベート条件としては、抗体抗原反応に一般的に用いることのできる条件であれば特に制限されず、温度条件は、例えば1～30、好ましくは18～25、反応時間は、例えば、5～180分、好ましくは60～120分とすることができる。インキュベート終了後の溶液は、洗浄などの工程を経ることなく、そのまま以下の工程(b)に供することができる。このことが本発明の抗原濃度測定・検出方法の大きな特徴の一つである。

【0027】

上記本発明の測定方法[I]や測定方法[II]における工程(b)においては、上記工程(a1-1)又は(a1-2)により調製された溶液に励起光を照射して溶液中の蛍光色素の蛍光強度を測定することができる。測定に用いる蛍光測定装置は特に制限されないが、例えば、MF20/Fluoropoint-Light(オリンパス社製)やFMBIO-III(日立ソフトウェアエンジニアリング社製)等を好適に挙げることができる。また、測定の際には、上記工程(a1-1)により調製された溶液のネガティブコントロールとして、1)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを含まない、蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドのみを含む溶液、2)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを含まない、蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドと被検物質のみを含む溶液、3)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドを含み、被検物質を含まない溶液、4)抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと標識されていない抗体重鎖可変領域ポリペプチドと被検物質を含む溶液、等を測定することが好ましく、上記工程(a1-2)により調製された溶液のネガティブコントロールとして、1)抗体重鎖可変領域ポリペプチドを含まない、蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドのみを含む溶液、2)抗体重鎖可変領域ポリペプチドを含まない、蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと被検物質のみを含む溶液、3)抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを含み、被検物質を含まない溶液、4)抗体重鎖可変領域ポリペプチドと標識されていない抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと被検物質を含む溶液、等を測定することが好ましい。

【0028】

上記本発明の測定方法[I]や測定方法[II]における工程(c)においては、上記工程(b)により得られた蛍光強度の測定値から、被検物質に含まれる抗原量を算出することができる。すなわち、上記工程(a1-1)又は(a1-2)により調製された溶液中の抗原濃度と、工程(b)により測定された蛍光強度とは正の相関関係にあるので、濃度既知の抗原を含む被検物質を用いたときの蛍光強度を測定して抗原濃度と蛍光強度との関係を示す標準曲線を作成し、この標準曲線から濃度未知の抗原を含む被検物質を用いたときの蛍光強度の測定値に対応する抗原濃度を算出することにより、被検物質に含まれる抗原量を求めることができる。また、工程(c)における「抗原量を算出する」には、標準曲線に基づいてあらかじめ設定された変換式等により自動的に抗原量が算出される場合も含まれる。

【0029】

上記本発明の非ヒト動物検出方法[I]における工程(a2-1)においては、抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドを、被検非ヒト動物対象に投与し、被検非ヒト動物対象中で抗体軽鎖可変領域ポリペプチド/蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド/抗体により特異的に認識される抗原からなる三者複合体を形成させる。また、上記非ヒト動物検出方法[II]における工程(a2-2)においては、抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを、全身又は局所的に被検非ヒト動物対象に投与し、被検非ヒト動物対象中で抗体重鎖可変領域ポリペプチド/蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチド/抗体により特異的に認識される抗原からなる三者複合体を

10

20

30

40

50

形成させる。上記被検非ヒト動物対象としては、ヒト以外の動物であれば特に制限されず、例えば、マウス、ラット、ハムスター、サル、ブタ等を好適に挙げることができる。また、上記「投与」方法としては筋肉内注射、腹腔内注射、静脈内注射、皮下注射、埋込み、塗布等の非経口的な局所投与方法や、経口的な投与方法の中から適宜選択することができる。

【0030】

上記本発明の非ヒト動物検出方法 [I] や非ヒト動物検出方法 [II] における工程 (b) においては、上記工程 (a 2 - 1) 又は (a 2 - 2) において、いずれか一方が蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び抗体重鎖可変領域ポリペプチドを投与された被検非ヒト動物対象中の蛍光色素の蛍光を個体のまま非侵襲的に検出したり、上記被検非ヒト動物対象から採取した組織又は細胞中の蛍光色素の蛍光を検出する。上記「検出する」方法としては、被検非ヒト動物対象の個体、組織、又は細胞に励起光を照射して、蛍光色素の蛍光を2次元又は3次元的に検出できる方法であれば特に制限されるものではない。また、検出の際には、内視鏡、X線、CT、MRI、超音波、顕微鏡等を用いて、被検非ヒト動物対象の個体、組織、又は細胞の構造を示す画像を同時に作成することが好ましい。

10

【0031】

上記本発明の非ヒト動物検出方法 [I] や非ヒト動物検出方法 [II] における工程 (c) においては、上記工程 (b) により得られた蛍光色素の蛍光を検出した結果から、被検非ヒト動物対象における抗原を可視化する。すなわち、被検非ヒト動物対象における抗原量と、工程 (b) により検出された蛍光の蛍光強度とは正の相関関係にあるので、被検非ヒト動物対象の個体、組織、又は細胞の構造を示す画像データと、工程 (b) により検出された蛍光の2次元又は3次元的画像とを比較することにより、抗原の局在 (位置) を知ることができる。例えば、内視鏡を用いて検出する場合には、被検非ヒト動物対象の組織に可視光線を照射して観察可能な可視光画像を作成するとともに、該組織にどちらか一方が標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び抗体重鎖可変領域ポリペプチドを塗布等により接触させた後に、標識された蛍光色素に対する励起光を照射して蛍光画像を作成し、上記可視光画像と蛍光画像とを比較することにより、組織中の抗原の局在を知ることができる。

20

【0032】

上記本発明のインビトロ検出方法 [I] における工程 (a 3 - 1) においては、インビトロで、抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチドと、被検対象中の抗原とをインキュベートし、抗体軽鎖可変領域ポリペプチド/蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド/抗体により特異的に認識される抗原からなる三者複合体を形成させる。また、上記インビトロ検出方法 [II] における工程 (a 3 - 2) においては、インビトロで、抗体重鎖可変領域ポリペプチド及び蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと、被検対象中の抗原とをインキュベートし、抗体重鎖可変領域ポリペプチド/蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチド/抗体により特異的に認識される抗原からなる三者複合体を形成させる。上記被検対象としては、測定対象となるターゲット抗原を含む可能性がある培養細胞、組織切片、生体より採取された組織又は細胞等の他、ニトロセルロース膜やPVD膜等にプロットされた細胞抽出液等を挙げることができる。また、上記インキュベート条件としては、抗体抗原反応に一般的に用いるこのとのできる条件であれば特に制限されず、温度条件は、例えば1~30、好ましくは18~25、反応時間は、例えば、5~180分、好ましくは60~120分とすることができる。インキュベート終了後の溶液は、洗浄などの工程を経ることなく、そのまま以下の工程 (b) に供することができる。このことが本発明の抗原濃度測定・検出方法の大きな特徴の一つである。

30

40

【0033】

上記インビトロ検出方法 [I] やインビトロ検出方法 [II] における工程 (b) においては、上記工程 (a 3 - 1) 又は (a 3 - 2) において、いずれか一方が蛍光色素により

50

標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチド及び抗体重鎖可変領域ポリペプチドとインキュベートさせた被検対象における蛍光色素の蛍光を2次元又は3次的に検出する。上記「検出する」方法としては、蛍光顕微鏡や蛍光イメージアナライザー等を挙げる事ができる。

【0034】

上記インビトロ検出方法 [I] やインビトロ検出方法 [II] における工程 (c) においては、上記工程 (b) により得られた蛍光色素の蛍光を検出した結果から、被検対象における抗原を可視化することができる。すなわち、被検対象における抗原量と、工程 (b) により検出された蛍光の蛍光強度とは正の相関関係にあるので、工程 (b) により検出された蛍光の2次元又は3次的画像に基づいて、抗原の局在 (位置) を知ることができる。

10

【0035】

以下に示す実施例において、本発明を具体的且つ更に詳細に説明する。下記実施例は本発明の説明のためのものであり、これらの実施例により本発明の技術的範囲が限定されるものではない。

【実施例1】

【0036】

1. 抗BGP抗体由来のVH及びVLを用いた均一系蛍光免疫測定法の確立
(抗BGP抗体V領域遺伝子発現ベクターの構築)

ヒトオステオカルシン (human Bone Gla Protein ; BGP) に対する抗体の重鎖可変領域 (VH ; 配列番号 1) 又は軽鎖可変領域 (VL : 配列番号 2) 領域をコードするDNA配列に、N末端にamberコドンを含むProX^{T M}tag (MSKQIEVNXSNET (Xは蛍光標識アミノ酸) ; 配列番号 3) のDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクター (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) のNcoIとHindIIIサイトへ組み込んだ。この構築した発現ベクターは、挿入したVH又はVLのN末端にProX^{T M}tag (MSKQIEVNXSNET (Xは蛍光標識アミノ酸) ; 配列番号 3) が、C末端にHis-tagが、それぞれ付加されるよう設計されている。図1に、CR110標識抗BGP抗体軽鎖可変領域ポリペプチド (CR110-VL) 、TAMRA標識抗BGP抗体重鎖可変領域ポリペプチド (TAMRA-VH) 、及び、それらの複合体 (CR110-VL / TAMRA-VH) を模式的に示す。同様に、TAGコドンをTTTコドンに置換し、蛍光標識アミノ酸残基をフェニルアラニン残基に置換した野生型VH及びVL発現ベクターを作製した。

20

30

【0037】

さらに、上記VH遺伝子に含まれる4つのトリプトファンコドン (TGG ; Trp33 , Trp36 , Trp47 , Trp106) をそれぞれフェニルアラニンコドン (TTT) に置換した変異VL (W33F、W36F、W47F、W106F) 発現ベクター、ProX^{T M}tagとVH遺伝子のN末端との間にスペーサー (GGGSGGG ; 配列番号 4) を付加したスペーサー付加VH発現ベクター、VH遺伝子とVL遺伝子とをリンカー (LVTVSSGGGGSGGGGGSGGGGG ; 配列番号 5、又はGGGGSGGGGGSGGGGG ; 配列番号 9) により結合させた一本鎖抗体 (scFv) 発現ベクター、ProX^{T M}tagとscFvのN末端との間にスペーサー (GGGSGGGSGGGGG ; 配列番号 4 又はGGGSGGGSGGGGG ; 配列番号 10) 配列を有する一本鎖抗体 (scFv) 発現ベクター、MX (Xは蛍光標識アミノ酸) をN末端に有するscFvの発現ベクターもあわせて作製した。

40

【0038】

(標識抗BGP抗体V領域タンパク質の作製)

RTS100 E.coli Disulfide Kit (ロシュ・ダイアグノスティクス社製) を用いて、無細胞翻訳系によるV領域タンパク質N末端領域への蛍光標識アミノ酸の導入を行った。反応液 (50 μL) は、7 μLのamino acid mix、1 μLのMethionine、7 μLのReaction mix、25 μLのactivated E-coli Lysate、5 μLのplasmid DNA (500 ng)、5 μ

50

Lの蛍光標識アミノアシル-tRNA^{amber} (0.8 nmol)を加えた。蛍光標識タンパク質を作製するための蛍光標識アミノアシル-tRNA (TAMRA-X-AF-tRNA^{amber}, CR110-X-AF-tRNA^{amber}, 及びATTO655-X-AF-tRNA^{amber})は、CloverDirect™ tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization (プロテインエクスプレス社製)を用いた。反応液は、20℃、600 rpm、2 hで反応させた後、さらに、4℃、16 hの反応を行った。反応終了後、反応液1 μLを用いてSDS-PAGE (15%)を行い、蛍光イメージアナライザー (FMBIO-III; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製)でタンパク質発現を観察した。さらに、His-tag抗体を用いてウエスタンブロットを行い、目的のタンパク質が合成されていることを確認した。

10

【0039】

合成したV領域タンパク質は、His-Spin Trap Column (GEヘルスケア社製)により精製を行った。上記反応液 (50 μL)に、Wash buffer (20 mM Phosphate buffer (pH 7.4) / 0.5 M NaCl / 60 mM imidazole / 0.1% Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)を加えて400 μLとし、His-Spin Trap Columnへアプライした。室温で15分間インキュベートした後にWash bufferで3回洗浄を行った。次に200 μLのElute buffer (20 mM Phosphate buffer (pH 7.4) / 0.5 M NaCl / 0.5 M imidazole / 0.1% Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)で2回溶出させた。さらに溶出液は、UltraFree-0.5 centrifugal devices (ミリポア社製)を使用し、PBS (+0.05% Tween 20)でバッファ交換、濃縮を行った。精製後のサンプルの濃度は、SDS-PAGE及びFCS (MF20; オリンパス社製)を用いて測定した。

20

【実施例2】

【0040】

(蛍光スペクトル測定)

実施例1で作製したTAMRA標識抗BGP抗体VHタンパク質及びCR110標識抗BGP抗体VLタンパク質 (それぞれ1 μg/mL、30 μL)と、抗原となる7残基のBGPのC末端ペプチド (RRFYGPV; 配列番号8)とを、PBS (+0.05% tween 20)で計200 μLになるように調製した。25℃、90分間放置した後に、蛍光分光光度計 (Fluoromax-4; ホリバ・ジョバンイボン社製)を用いて蛍光スペクトル測定を行った。励起波長は、CR110-VLとTAMRA-VHの混合物に対しては490 nm、TAMRA-VHに対しては550 nmにセットした。CR110-VLとTAMRA-VHの混合物に対しては蛍光強度比 I_A / I_D を算出した。 I_A と I_D は、それぞれ575 nmと525 nmでの蛍光強度とした。解離定数 (Kd)値は、蛍光強度比 (I_A / I_D) もしくは最大蛍光波長の蛍光強度のカーブフィッティングにて算出した。その際、統計解析ソフトとしてGraphpad Prism (Graphpad社製)のsigmoidal dose-response modelを使用した。異なる濃度のBGPペプチドの存在下で、CR110-VL及びTAMRA-VHを反応させて、490 nmの励起光を用いて蛍光スペクトルを測定した結果を図2に、525 nm及び575 nmの蛍光強度の変化を測定した結果を図3に、525 nm及び575 nmの蛍光強度の比 (F_{575} / F_{525}) の変化を解析した結果を図4にそれぞれ示す。スパーサーを含む又は含まないTAMRA標識抗BGP抗体scFvタンパク質 (2 μg/mL、25 μL)と、抗原であるBGPペプチドとを、計200 μLのPBS (+0.05% Tween 20、0.2% BSA)となるようにサンプルを調製した。その後、サンプルを25℃、70分間放置した後に、蛍光分光光度計 (Fluoromax-4; ホリバ・ジョバンイボン社製)を用いて蛍光スペクトル測定を行い、蛍光強度をカーブフィッティングにて算出した。その際、統計解析ソフトとしてImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)のsigmoidal dose-response modelを使用した。励起波長は550 nm、測定波長は580 nmで測定を行った。

30

40

【0041】

50

(蛍光強度分布解析法)

実施例 1 で作製した蛍光標識 V H タンパク質及び蛍光標識 V L タンパク質 (それぞれ 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7.5 μL)、又は、蛍光標識 s c F v (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、7.5 μL) を、B G P ペプチドとともに P B S (+ 0.05% T w e e n 2 0) で 50 μL になるように調製し、384-well Glass Bottom Microplate (オリンパス社製) に加え、25 で 90 間インキュベートした。蛍光強度分布解析法 (Fluorescence Intensity Multiple Distribution Analysis ; F I D A) による測定は、25 で M F 2 0 / F l u o r o P o i n t - L i g h t (オリンパス社製) を用いて測定した。T A M R A と A T T O 6 5 5 は、それぞれ 543 nm と 633 nm のレーザーで励起した。1 測定で 10 秒間データを取得し、1 サンプルに対して 10 回測定を行った。この測定値より平均値及び標準偏差を算出した。

10

【実施例 3】

【0042】

(T A M R A - V H 及び C R 1 1 0 - V L の B G P ペプチドへの結合活性評価)

まず、蛍光共鳴エネルギー転移法 (F R E T) を利用した抗体 / 抗原結合活性評価系の確立を試みた。F R E T 測定には、C R 1 1 0 と T A M R A をそれぞれドナー、アクセプターとして使用した。ドナー (C R 1 1 0) の蛍光とアクセプター (T A M R A) の吸収は、十分な重なりを持っており F R E T ペアとして用いることができる。配向因子 (κ^2) を 2 / 3 とした際フェルスター距離 (R_0) は 62 と計算され、この値はタンパク質の分子間相互作用を検出するのに適している。抗原が存在しない場合、V L と V H 間の相互作用は弱いため、C R 1 1 0 から T A M R A へ F R E T は起きないのに対して、抗原が存在する場合には、V H と V L は抗原と三者複合体を形成し、その結果、C R 1 1 0 から T A M R A への F R E T が引き起こされると予測される。

20

【0043】

抗原を介して C R 1 1 0 - V L と T A M R A - V H とが結合することにより、C R 1 1 0 から T A M R A への F R E T が検出されるかどうかを確認する目的で、以下の実験を行った。C R 1 1 0 - V L と、T A M R A - V H 又は標識されていない V H とを、異なる濃度の B G P 抗原ペプチド (1 ~ 10, 000 ng) とともにインキュベートし、C R 1 1 0 の蛍光強度の変化を蛍光強度分布解析法 (F I D A) により解析した。測定は、励起光として 488 nm レーザーを用い、510 ~ 560 nm 蛍光フィルターを用いて検出を行った。結果を図 5 に示す。C R 1 1 0 - V L と T A M R A - V H とを反応させた場合には、C R 1 1 0 の蛍光強度は B G P 抗原ペプチドの濃度依存的に低下した。この結果から、C R 1 1 0 - V L 及び T A M R A - V H が、抗原ペプチドを介して結合して複合体を形成することにより、予想されたような C R 1 1 0 から T A M R A への F R E T が引き起こされることが確認された。一方、意外なことに、C R 1 1 0 - V L と標識していない V H とを反応させた場合には、C R 1 1 0 の蛍光強度は B G P 抗原ペプチドの濃度依存的に増加した。この結果から、V L が C R 1 1 0 に対してクエンチャーとして作用しており、C R 1 1 0 - V L が単独で存在する場合には C R 1 1 0 の蛍光は V L によりクエンチされているが、C R 1 1 0 - V L と V H 及び抗原ペプチドが三者複合体を形成した場合にはこのクエンチ効果が解消される可能性が推測された。

30

40

【0044】

このような V L によるクエンチ効果が、V H においても認められるかどうかを確認する目的で以下の実験を行った。T A M R A - V H と、C R 1 1 0 - V L 又は標識していない V L とを、異なる濃度の B G P 抗原ペプチド (1 ~ 10, 000 ng) とともにインキュベートし、T A M R A の蛍光強度の変化を蛍光強度分布解析法 (F I D A) により解析した。測定は、励起光として 543 nm レーザーを用い、560 ~ 620 nm 蛍光フィルターを用いて検出を行った。結果を図 6 に示す。T A M R A - V H と C R 1 1 0 - V L とを反応させた場合には、T A M R A の蛍光強度は B G P 抗原ペプチドの濃度依存的に増加した。また同様に、T A M R A - V H と標識していない V L とを反応させた場合にも、T A M R A - V H の蛍光強度は B G P 抗原ペプチドの濃度依存的に増加した。これらの結果が

50

ら、V Lと同様に、V HもT A M R Aに対してクエンチャーとして作用しており、T A M R A - V Hが単独で存在する場合にはT A M R Aの蛍光はクエンチされているが、T A M R A - V HとV L及び抗原ペプチドが三者複合体を形成した場合にはこのクエンチ効果が解消される可能性が推測された。以上の結果から、V H及びV Lが蛍光色素に対してクエンチ効果を有すること、さらに、その効果はV H / V L / 抗原の三者複合体の形成に伴い解消されることが示唆された(図9)。

【実施例4】

【0045】

(クエンチング現象を利用した抗原濃度の均一系蛍光免疫測定法の確立)

発明者らは、実施例3で明らかとなったクエンチ現象を利用することにより、新たな免疫測定法を確立することができるのではないかと考え、以下の実験を行った。T A M R A - V Hと異なる濃度のB G Pペプチドとを、標識されていないV Lの存在又は非存在下で反応させ、543nmのHe - Neレーザーを用いて蛍光強度を測定した結果を図7に示す。V Lの存在下では、T A M R A - V Hの蛍光強度はB G Pペプチドの濃度依存的に増加した。一方、V Lの非存在下では、T A M R A - V Hの蛍光強度はいずれの濃度のB G Pペプチドを反応させた場合にも低いままであった。また、V Lの存在/非存在下におけるT A M R A - V Hの蛍光強度の比(+V L / -V L)を解析した結果、解離定数 $K_d = 1.2 \times 10^{-7}$ [M]であった(図8)。以上の結果から、V H及びV Lタンパク質によるクエンチ現象を利用した、全く新しい均一系蛍光免疫測定法が確立できたことが示された。

【実施例5】

【0046】

(V H中のTrpによるクエンチ効果の検討)

実施例3の結果から、抗原の滴定に対してC R 1 1 0の蛍光減少量よりもT A M R Aの蛍光増加量が高いことが明らかとなった。T A M R Aはローダミン(Rhodamine)系色素であり、これまでの研究によりローダミン系色素はトリプトファン(Trp)等のアミノ酸によりクエンチ(消光)されることが報告されている。そこで、発明者らは、V H中に存在するTrp残基がT A M R Aのクエンチングに関与していると推測し、T A M R A - V Hが単独で存在する場合には、T A M R Aの蛍光はその近傍に存在するTrp残基によりクエンチされているが、T A M R A - V HがV L及び抗原と複合体を形成することにより、T A M R A / Trp間の相互位置を変化させてクエンチを解消しているとの仮説を立てた。図9に示すように、V Hは4つのTrp残基(Trp33、Trp36、Trp47、Trp106)を持つ。予想分子モデルによる解析では、Trp33、Trp36及びTrp106はV Lとの疎水相互作用に関与しており、Trp33はB G Pペプチドとの相互作用に関与していると予想された。これらのTrp残基がクエンチに影響を及ぼすかを検討する目的で、TrpをPheに置換した4種の変異型V Hを用いて以下の実験を行った。

【0047】

野生型又は変異型抗B G P抗体重鎖可変領域ポリペプチド(W33F、W36F、W47F、W106F)とV Lとを、異なる濃度のB G Pペプチド存在下で反応させ、543nmのHe - Neレーザーを用いて蛍光強度を測定した。結果を図10及び表1に示す。変異体の蛍光標識V H単独の蛍光強度を測定した結果、野生型(WT)に比べW106FとW36Fはそれぞれ31%と29%の蛍光の増加を示した。W47Fは11%の蛍光の増加を示した。一方でW33Fは9%の減少を示した。これらの結果より、T A M R Aの蛍光クエンチングに、主にTrp36、Trp47、及びTrp106が関与していることが明らかとなった。また、W33F、W36F、W106Fは、V L及びB G Pペプチドとともに反応させることにより、1.5倍、1.3倍、1.5倍の抗原濃度依存的な蛍光の増加をそれぞれ示した。TrpからPheへの変異により、抗原依存的なクエンチの解消が減少したというこれらの結果は、Trp33、Trp36、及びTrp106が部分的にクエンチに関与していることを示唆している。一方、W47FはB G Pペプチド及

びV Lと反応させた場合にも全く蛍光の増加が認められなかった。F C S測定による拡散時間 (diffusion time) の解析結果 (図 1 1) は、T r p 4 7の変異により抗体の結合活性が消失することを示していることから、V HのT r p 4 7は抗体と抗原の結合に必須であることが示された。

【 0 0 4 8 】

以上の結果から、T r p 3 3及びT r p 1 0 6は、蛍光標識V H単独の蛍光の増加及び抗原濃度依存的な蛍光の増加量の減少の2つの点から、クエンチに重要なT r pであることが確認できた。また、T r p 4 7は抗原濃度依存的なクエンチへの関与は不明であるが、抗原を介したV H及びV Lの複合体形成には非常に重要な部位であることが明らかとなった。なお、上記のV Hのアミノ酸配列におけるT r p 1 0 6は、カバット (Kabat) の番号付け系においては第 1 0 3 番目の位置に対応するものである。(Kabat, E. et al., "Sequences of proteins of immunological interest, 5th edn.," U. S. Department of Health and Human Service, Public Service, National Institute of Health, Washington, DC, 1991.)

10

【 0 0 4 9 】

【表 1】

Table 1. Relative Fluorescence Quenching of TAMRA-labeled VH proteins.

V _H proteins	蛍光強度 (I ₀) *1	蛍光強度 (I _V) *2	蛍光強度 (I _{VP}) *3	蛍光増加量*4 (I ₀ /I _{WT})	蛍光変化量*5 (I _{VP} /I _V)	K _d *6
WT	24.7	25.6	47.1	1.00	1.84	1.2×10 ⁻⁷
W33F	21.8	23.7	34.8	0.88	1.47	1.6×10 ⁻⁷
W36F	31.8	31.5	41.4	1.29	1.31	7.2×10 ⁻⁸
W47F	26.7	27.4	27.6	1.08	1.01	ND
W106F	30.8	31.9	46.7	1.25	1.46	1.4×10 ⁻⁶

20

- *1 (I₀) =VLとBGP pep.の添加なしの場合の蛍光強度 (蛍光標識VH単独の蛍光強度)
- *2 (I_V) =VLの添加あり、BGP pep.の添加なしの場合の蛍光強度
- *3 (I_{VP}) =VLとBGP pep.の添加ありの場合の蛍光強度 (この時BGP pep.濃度は10,000 ng/mL)
- *4 蛍光増加量=WTのI₀の蛍光強度 (=I_{WT}と表記) に対する各I₀の蛍光強度の割合
- *5 蛍光変化量=抗原濃度依存的な蛍光の増加量
- *6 解離定数

30

【実施例 6】

【 0 0 5 0 】

(オキサジン系蛍光色素及びスペーサー付加によるクエンチング効果の検討)

均一系蛍光免疫測定法の感度に及ぼす蛍光色素及びスペーサーの影響について検討した。クエンチングの効率は蛍光色素の種類に依存して大きく変化し、ローダミン系の色素よりも、オキサジン (O x a z i n) 系の色素は効果的にクエンチされることが報告されている。そこで、発明者らは、オキサジン系蛍光色素であるA T T O 6 5 5を標識物質として使用したA T T O 6 5 5 - V Hを作製して実施例 4と同様の実験を行った。さらに、A T T O 6 5 5とV Hとの間にG G G S G G G S (配列番号 4) をスペーサーとして付加したA T T O 6 5 5 - V H (+ s p a c e r) を作製し、スペーサーの有無がクエンチ効果に及ぼす影響について検討した。図 1 2 にスペーサー付加蛍光標識抗 B G P 抗体重鎖可変領域ポリペプチド (Fluorescent labeled B G P - V H) と、抗 B G P 抗体軽鎖可変領域ポリペプチド (B G P - V L) との複合体 (Fluorescent labeled B G P - V H / V L) の 3 次元構造予測モデルを示す。

40

【 0 0 5 1 】

スペーサーを付加又は付加していないA T T O 6 5 5 - V Hを用いて、実施例 4と同様の実験を行った結果 (図 1 3)、いずれの場合でもA T T O 6 5 5 - V Hの蛍光強度はB G P ペプチドの濃度依存的に増加した。また、スペーサーを付加していないA T T O 6 5 5 - V Hにより得られた蛍光強度は、T A M R A - V Hを使用した時と比較して3倍であった。さらに、スペーサーの付加することにより、スペーサーを付加しないものと比較し

50

て蛍光強度が2倍程度増加することが明らかとなった。GGGSスパーサーを付加することによりクエンチャーであるTrpと蛍光色素間の距離が近づいたことが、このような蛍光強度の増加に影響したと考えられる。

また、VLの存在/非存在下におけるATTO655-VHの蛍光強度の比(+VL/-VL)を解析した結果(図14)、スパーサーを付加しない場合は解離定数 $K_d = 8.4 \times 10^{-8}$ [M]、スパーサーを付加した場合は解離定数 $K_d = 1.8 \times 10^{-7}$ [M]であった。解離定数が高いほど測定系の感度は高いと考えられるので、以上の結果は、蛍光色素とVHの間にスパーサーを設けることにより、より感度の高い測定系が確立できたことを意味している。

【実施例7】

10

【0052】

(一本鎖抗体を用いた均一系蛍光免疫測定法の確立)

VHとVLとを配列番号5又は配列番号9に示されるアミノ酸配列からなるリンカーにより結合させた一本鎖抗体(scfv)を用いた均一系蛍光免疫測定法を確立する目的で以下の実験を行った。本発明の蛍光標識抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとを結合させた蛍光標識一本鎖抗体の3次元構造予測モデルを図15に、1次元構造を図16に示す。VH及びVLのそれぞれのペプチド断片を用いた場合と同様に、蛍光標識scfvを用いた場合にも、BGPペプチドの濃度依存的な蛍光強度の増加が認められた。配列番号5のリンカーにより結合させたATTO655標識抗BGP抗体scfvの結果を図17~22に、配列番号9のリンカーにより結合させたTAMRA標識抗BGP抗体scfvの結果を図23に示す。

20

【実施例8】

【0053】

(ヒト血漿中での蛍光免疫測定)

TAMRA標識抗BGP抗体scfvタンパク質(2 μ g/mL、6.25 μ L)と、抗原であるBGPペプチドを、50%ヒト血漿を含むサンプルとなるよう、PBS(+0.05%Tween20、0.2%BSA)で計50 μ Lに調製した。その後、25、90分間放置した後に、蛍光イメージアナライザー(FMbio-III;日立ソフトウェアエンジニアリング社製)で観察した。励起波長は532nm、測定波長は580nmで測定を行った。結果を図24に示す。50%のヒト血漿を含むサンプル中でもBGPペプチドの濃度依存的な蛍光強度の増加が認められた。

30

【実施例9】

【0054】

2. 抗BPA抗体由来のVH及びVLを用いた均一系蛍光免疫測定法の確立

(抗BPA抗体由来のV領域遺伝子発現ベクターの構築)

抗ビスフェノールA(BPA)抗体のVH(配列番号6)をコードする遺伝子に、N末端にamberコドンを含むProX^TMtag(MSKQIEVNXSNET(Xは蛍光標識アミノ酸);配列番号3)のDNA配列を付与した遺伝子を、pIVEX2.3dベクター(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)のNcoIとHindIIIサイトへ組み込んだ。この構築した発現ベクターは、挿入したVHのN末端にamberコドンを含むProX^TMtag(MSKQIEVNXSNET(Xは蛍光標識アミノ酸);配列番号3)が、C末端にHis-tagが、それぞれ付加されるよう設計されている。また、同様にして抗BPA抗体のVL(配列番号7)をコードする遺伝子に、N末端ProX^TMtagのアミノ酸XがFに置換されたDNA配列を付与し、pIVEX2.3dベクター(ロシュ・ダイアグノスティクス社製)のNcoIとHindIIIサイトへ組み込まれた。この構築した発現ベクターは、挿入したVLのN末端ProX^TMtagのアミノ酸XがFに置換された配列が、C末端にHis-tagが、付加されるよう設計されている。さらに、VH遺伝子とVL遺伝子とをリンカー(GGGGSGGGGSGGGGS;配列番号9)により結合させた一本鎖抗体(scfv)発現ベクター、ProX^TMtagとscfvのN末端との間にスパーサー(GGGS;配列番号4、GGSG

40

50

GGSGGGS ; 配列番号10又はGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS ; 配列番号11)を有する3種類の一本鎖抗体(scFv)発現ベクターもあわせて作製した。

【0055】

(無細胞翻訳系による蛍光標識タンパク質の作製)

RTS100 E.coli Disulfide Kit (ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて、無細胞翻訳系によるV領域タンパク質のN末端領域への蛍光標識アミノ酸の導入を行った。反応液(50 μ L)は、7 μ Lのamino acid mix、1 μ LのMethionine、7 μ LのReaction mix、25 μ Lのactivated E-coli Lysate、5 μ Lのplasmid DNA(500ng)、5 μ LのATTO655-X-AF-tRNAamber(0.8nmol)を加えた。蛍光標識タンパク質を作製するためのATTO655-X-AF-tRNAamberは、CloverDirectTM tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization (プロテインエクスプレス社製)を用いた。反応液は、20、600rpm、2hで反応を行い、その後4、16h反応を行った。反応終了後、反応液1 μ Lを用いて、SDS-PAGE(15%)を行い、蛍光イメージアナライザー(FM BIO-III; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製)でタンパク質発現を観察した。さらにHis-tag抗体を用いてウエスタンブロットを行い、目的のタンパク質が合成されていることを確認した。

10

【0056】

次に、His Spin Trap Column (GEヘルスケア社製)を用いて、合成したV領域タンパク質の精製を行った。上記反応液(50 μ L)に、Wash buffer(20mM Phosphate buffer(pH7.4)/0.5M NaCl/60mM imidazole/0.1% Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)を加えて400 μ Lにし、His-Spin Trap Columnへアプライした。室温で15分間インキュベートした後、Wash bufferで3回洗浄を行った。続いて、200 μ LのElute buffer(20mM Phosphate buffer(pH7.4)/0.5M NaCl/0.5M imidazole/0.1% Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)で2回溶出させた。さらに、UltraFree-0.5 centrifugal devices (ミリポア社製)を使用して、溶出液のバッファーをPBS(+0.05% Tween 20)に交換するとともに濃縮を行った。サンプルは、SDS-PAGE及びFCS(MF20; オリンパス社製)を用いて濃度測定を行った。

20

【実施例10】

【0057】

(蛍光スペクトル測定)

実施例9で作製したATTO655標識抗BPA抗体VHタンパク質及び標識されていない抗BPA抗体VLタンパク質(それぞれ1 μ g/mL、7.5 μ L)と、抗原であるBPAとを、Total 50 μ Lの10% MeOH in PBS(+0.05% Tween 20)となるように調製し、25、90分間放置した後に、蛍光イメージアナライザー(FM BIO-III; 日立ソフトウェアエンジニアリング社製)で観察した。励起波長は635nm、測定波長は670nmで測定を行った。解離定数(Kd)値は、蛍光測定値のカーブフィッティングにて算出した。その際、統計解析ソフトとしてGraphpad Prism(Graphpad社製)のsigmoidal dose-response modelを使用した。

40

スペーサーを含む又は含まないTAMRA標識抗BPA抗体scFvタンパク質(2 μ g/mL、25 μ L)と、抗原であるBPAとを、計200 μ LのPBS(+0.05% Tween 20、0.2% BSA、1% MeOH)となるようにサンプルを調製した。その後、サンプルを25、10分間放置した後に、蛍光分光光度計(Fluoromax-4; ホリバ・ジョバンイボン社製)を用いて蛍光スペクトル測定を行い、蛍光強度をカーブフィッティングにて算出した。その際、統計解析ソフトとしてImageJ software(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)のsigmoidal dose-response modelを使用した。励起波長は550nm、測定波長は580nmで測定を行った。

【実施例11】

【0058】

50

(標識抗BPA抗体由V領域タンパク質を用いた均一系蛍光免疫測定法の確立)

A T T O 6 5 5 - V H及び蛍光標識されていないV Lを用いた均一系蛍光免疫測定法の確立を目的として以下の実験を行った。A T T O 6 5 5 - V Hと異なる濃度のB P Aとを、標識されていないV Lの存在下又は非存在下で反応させ、蛍光強度を測定した(図25)。V Lの存在下では、A T T O 6 5 5 - V Hの蛍光強度はB P Aの濃度依存的に増加した。一方、V Lの非存在下では、A T T O 6 5 5 - V Hの蛍光強度はいずれの濃度のB P Aを反応させた場合にも低いままであった。また、V Lの存在/非存在下におけるA T T O 6 5 5 - V Hの蛍光強度の比(+ V L / - V L)を解析した結果、解離定数(K d)は 2.4×10^{-8} [M]であった(図26)。また、実施例7と同様に、一本鎖抗体(s c F v)を用いた蛍光免疫測定法の確立を目的として以下の実験を行った。T A M R A 標識抗BPA抗体s c F vを用いた場合も、V H及びV Lのそれぞれのペプチド断片を用いた場合と同様に、B P Aの濃度依存的な蛍光強度の増加が認められた(図27)。

10

【実施例12】

【0059】

3. 様々な抗体由来の一本鎖抗体を用いた均一系蛍光免疫測定法の確立

(抗HEL抗体、抗エストラジオール抗体、抗SA抗体由のV領域遺伝子発現ベクターの構築)

一本鎖抗体(s c F v)のDNA配列のN末端にamberコドンを含むPro X^{T M} tag (M S K Q I E V N X S N E T (Xは蛍光標識アミノ酸);配列番号3)を、C末端にHis-tagを有し、Pro X^{T M} tagとs c F vのN末端との間にスペーサー(G G G S G G G S;配列番号4)を有するDNA配列を、p I V E X 2.3 dベクター(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)のNco IとHind IIIサイトへ組み込み、発現ベクターを構築した。各一本鎖抗体(s c F v)のDNA配列は、以下のとおりである;抗鶏卵リゾチーム(HEL)抗体s c F vは、抗HEL抗体のV H(配列番号12)とV L(配列番号13)を順次リンカー配列(G G G G S G G G G S G G G G S;配列番号9)で結合した配列;エストラジオール(estradiol)抗体s c F vは、抗エストラジオール抗体のV H(配列番号14)とV L(配列番号15)を順次リンカー配列(G G G S G G G G S G G G G S;配列番号9)で結合した配列;SA(Serum Albumin)抗体s c F vは、抗SA抗体のV H(配列番号16)とV L(配列番号17)を順次リンカー配列(G G G G S G G G G S G G G G S;配列番号9)で結合した配列。

20

30

【0060】

(蛍光標識抗HEL抗体、抗エストラジオール抗体、抗SA抗体V領域タンパク質の作製)

RTS100 E.coli Disulfide Kit(ロシュ・ダイアグノスティックス社製)を用いて、無細胞翻訳系によるV領域タンパク質N末端領域への蛍光標識アミノ酸の導入を行った。反応液(50 µL)は、7 µLのamino acid mix、1 µLのMethionine、7 µLのReaction mix、25 µLのactivated E.coli Lysate、5 µLのplasmid DNA(500 ng)、5 µLの蛍光標識アミノアシル-tRNA amber(0.8 nmol)を加えた。蛍光標識タンパク質を作製するための蛍光標識アミノアシル-tRNA(T A M R A - X - A F - tRNA amber)は、CloverDirectTM tRNA Reagents for Site-Directed Protein Functionalization(プロテインエクスプレス社製)を用いた。反応液は、20 , 600 rpm, 2 hで反応させた後、さらに、4 , 16 hの反応を行った。反応終了後、反応液1 µLを用いてSDS-PAGE(15%)を行い、蛍光イメージアナライザー(F M B I O - III;日立ソフトウェアエンジニアリング社製)でタンパク質発現を観察した。さらに、His-tag抗体を用いてウエスタンブロットを行い、目的のタンパク質が合成されていることを確認した。

40

【0061】

合成したV領域タンパク質は、His-Spin Trap Column(GEヘルスケア社製)により精製を行った。上記反応液(50 µL)に、Wash buffer(20 mM Phosphate buffer(pH 7.4)/0.5 M NaCl/60 mM imidazole/0.1%Po

50

lyoxyethylene(23)Lauryl Ether)を加えて400 μ Lとし、His-Spin Trap Columnへアプライした。室温で15分間インキュベートした後にWash bufferで3回洗浄を行った。次に200 μ LのElute buffer(20mM Phosphate buffer(pH7.4)/0.5M NaCl/0.5M imidazole/0.1%Polyoxyethylene(23)Lauryl Ether)で2回溶出させた。さらに溶出液は、UltraFree-0.5 centrifugal devices(ミリポア社製)を使用し、PBS(+0.05%Tween20)でバッファ交換、濃縮を行った。精製後のサンプルの濃度は、SDS-PAGE及びFCS(MF20;オリパス社製)を用いて測定した。

【実施例13】

【0062】

10

(蛍光スペクトル測定)

TAMRA標識抗HEL抗体scFvタンパク質(2 μ g/mL、25 μ L)と、抗原であるHELタンパク質とを、計200 μ LのPBS(+0.05%Tween20、1%BSA)となるようにサンプルを調製した。TAMRA標識抗エストラジオール抗体scFvタンパク質(2 μ g/mL、25 μ L)と、抗原であるエストラジオールとを、計200 μ LのPBS(+0.05%Tween20、1%BSA)となるようにサンプルを調製した。TAMRA標識抗SA抗体scFvタンパク質(2 μ g/mL、25 μ L)と、抗原であるBSA(ウシ血清アルブミン)又はHSA(ヒト血清アルブミン)とを、計200 μ LのPBS(+0.05%Tween20、0.2%ゼラチン)となるようにサンプルを調製した。その後、サンプルを25、5分間放置した後に、蛍光分光光度計(Fluoromax-4;ホリバ・ジョバンイボン社製)を用いて蛍光スペクトル測定を行い、蛍光強度をカーブフィッティングにて算出した。その際、統計解析ソフトとしてImageJ software(<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)のsigmoidal dose-response modelを使用した。励起波長は550nm、測定波長は580nmで測定を行ったところ、抗原の濃度依存的な蛍光強度の増加が認められた(図28~30)。以上のように、様々な種類の抗体の蛍光標識一本鎖抗体(scFv)を用いて、蛍光免疫測定法を行うことができることが示された。

20

【実施例14】

【0063】

30

4. マウス抗体VHにおけるTrp残基の保存

実施例4、図9、及び表1に示すように、抗BGP抗体において標識された蛍光色素のクエンチングには、VHのアミノ酸配列においカバット(Kabat)の番号付け系で第33番目、第36番目及び第106番目のTrpが重要な役割を果たしていること、また、第47番目のTrpは抗体(VH及びVL)と抗原の結合に必須であることが明らかとなった(なお、上記のVHのアミノ酸配列におけるTrp106は、カバット(Kabat)の番号付け系においては第103番目の位置に対応するものである)。そこで、抗BGP抗体以外のマウス抗体VH領域においても、これらのトリプトファン残基が保存されているかどうかを確認した。マウス抗体のアミノ酸残基分布の解析にはAbysisデータベース(Dr. Andrew C.R. Martin's Group; <http://www.bioinf.org.uk/abs/index.html>)を用いた。また、上記データベースにおける、各抗体残基のKabat配列表記による残基番号についても、Abcheck(Dr. Andrew C.R. Martin's Group; Martin, A.C.R. Accessing the Kabat Antibody Sequence Database by Computer PROTEINS: Structure, Function and Genetics, 25 (1996), 130-133; <http://www.bioinf.org.uk/abs/seqtest.html>)により調べた。図31~35に結果を示すように、マウス抗体のVH領域における4つのTrp残基の保存率は、Trp33は40%、Trp36は98%、Trp47は94%、Trp103は95%であった。これらの結果は、均一系蛍光免疫測定法を行う際に重要なVHの4つのTrp残基が多くマウス抗体VHで保存されていることを示している。

40

【0064】

上記実施例において用いた抗BGP抗体のVH(配列番号1)及びVL(配列番号2)、抗BPA抗体のVH(配列番号6)及びVL(配列番号7)に含まれるトリプトファン

50

残基の位置を、カバット (Kabat) 配列表記法により番号付けした結果を表 2 に、抗 B G P 抗体 s c F v、抗 B P A 抗体 s c F v、抗 H E L 抗体 s c F v、抗 S A 抗体 s c F v、抗エストラジオール抗体 s c F v に含まれるトリプトファン残基の位置を、カバット (Kabat) 配列表記法により番号付けした結果を表 3 に示す。

【 0 0 6 5 】

【 表 2 】

V_H	Kabatの配列表記法	Trp33	Trp36	Trp47	Trp103
	BGP	Trp33	Trp36	Trp47	Trp106
	BPA	Trp35	Trp37	Trp48	Trp109

10

V_L	Kabatの配列表記法	Trp35
	BGP	Trp40
	BPA	Trp39

【 0 0 6 6 】

【 表 3 】

20

	Residue number*											
	CDRH1				CDRH3				CDRL3			
	... H33	H34	H35	H36 ...	H47 ...	H95 ...	H103 ...	L35 ...	L47 ...	L91 ...	L92 ...	L94 ...
α BGP	<u>W</u>	I	H	<u>W</u>	<u>W</u>	S	<u>W</u>	<u>W</u>	L	T	T	V
α Bisphenol A	Y	Y	<u>W</u>	<u>W</u>	<u>W</u>	V	<u>W</u>	<u>W</u>	I	S	<u>W</u>	I
α HEL	Y	<u>W</u>	S	<u>W</u>	Y	<u>W</u>	<u>W</u>	<u>W</u>	L	S	N	<u>W</u>
α BSA	A	M	S	<u>W</u>	<u>W</u>	S	<u>W</u>	<u>W</u>	L	A	D	S
α Estradiol	T	I	H	<u>W</u>	<u>W</u>	Y	<u>W</u>	<u>W</u>	<u>W</u>	<u>W</u>	S	Y

30

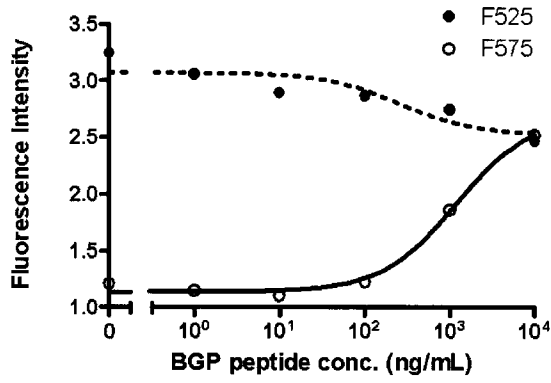
【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 6 7 】

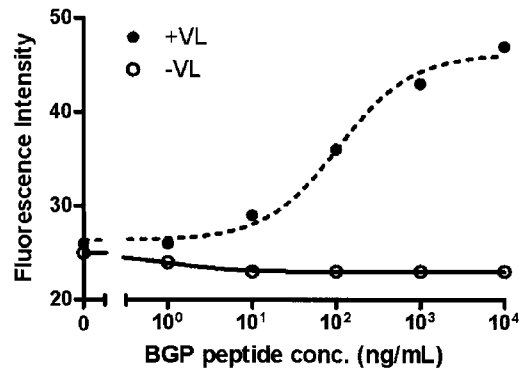
本発明によれば、蛍光色素により標識された抗体 (断片) を用いて、該蛍光色素のクエンチの解消を指標とした均一系蛍光免疫測定法を提供することができる。本発明の均一系蛍光免疫測定法は、抗体又は抗原の固定化や洗浄の必要がなく、抗体と被検物質とを混合させた混合液の蛍光強度を直接モニターすることにより目的の物質の濃度を測定することができるため、より簡便で迅速な低分子化合物の検出が可能になると予想される。また、クエンチに影響している抗体 V H 領域の T r p 残基は多くの種類の抗体において保存されていることから、本発明の均一系蛍光免疫測定法は様々の抗原濃度の測定に利用できる。

40

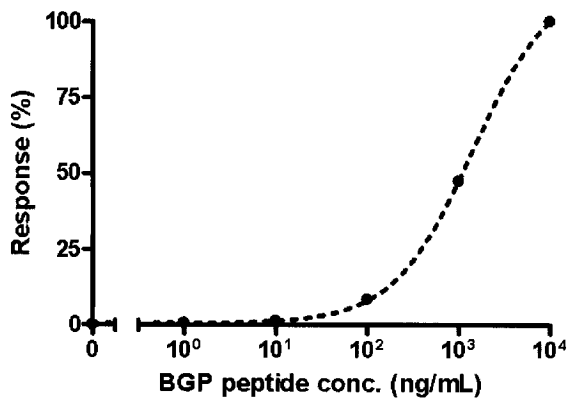
【 3 】



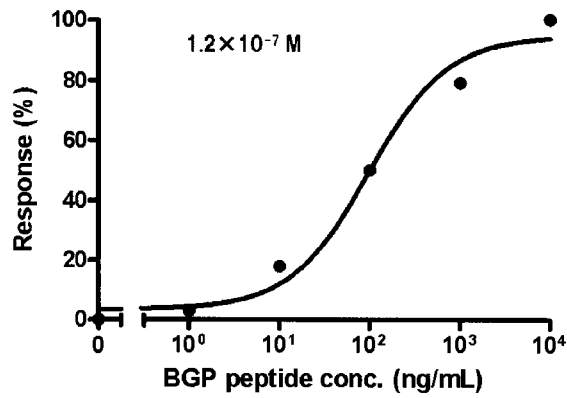
【 7 】



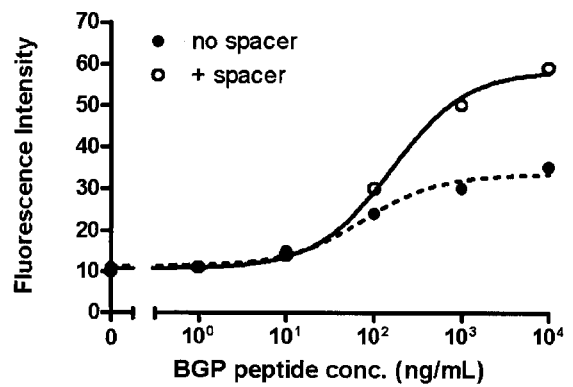
【 4 】



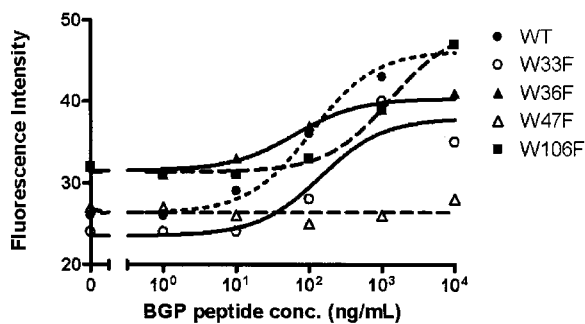
【 8 】



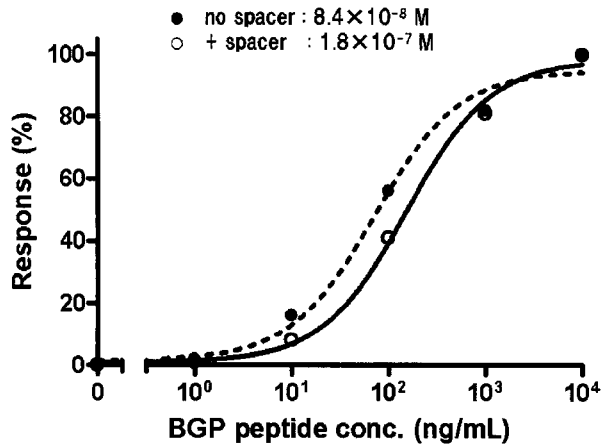
【 1 3 】



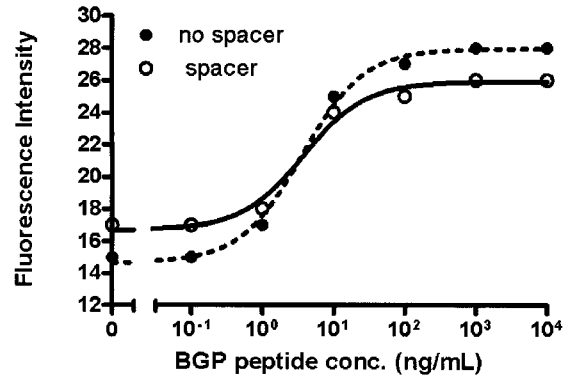
【 1 0 】



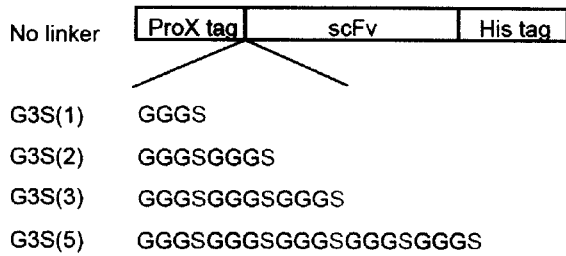
【 図 1 4 】



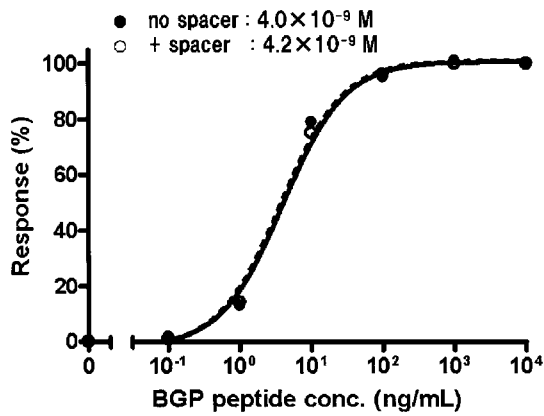
【 図 1 7 】



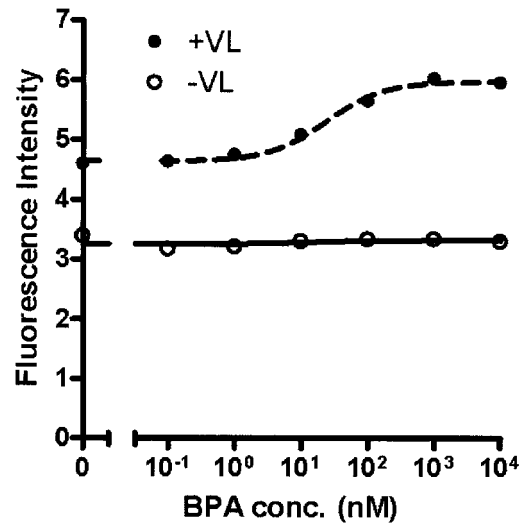
【 図 1 6 】



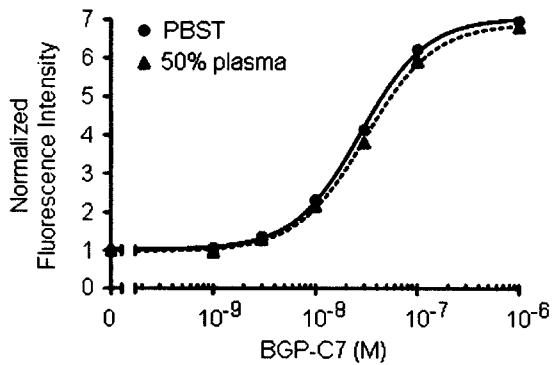
【 図 1 8 】



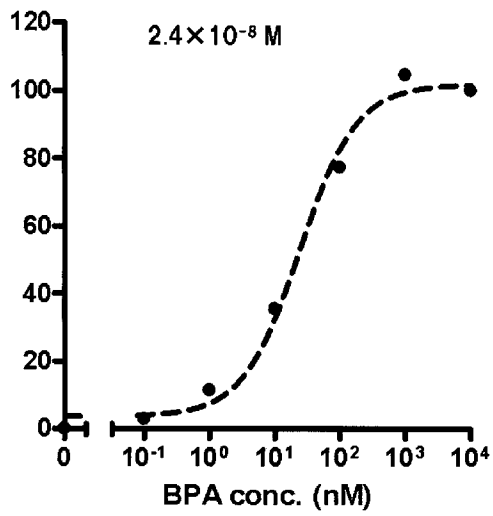
【 図 2 5 】



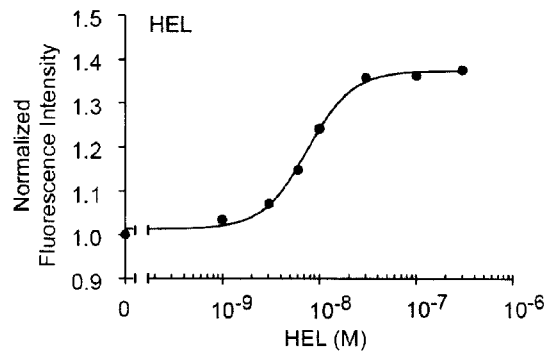
【 図 2 4 】



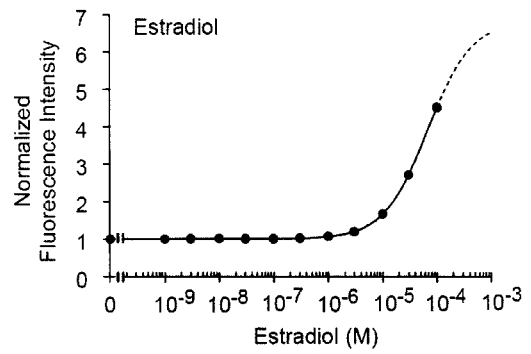
【 図 2 6 】



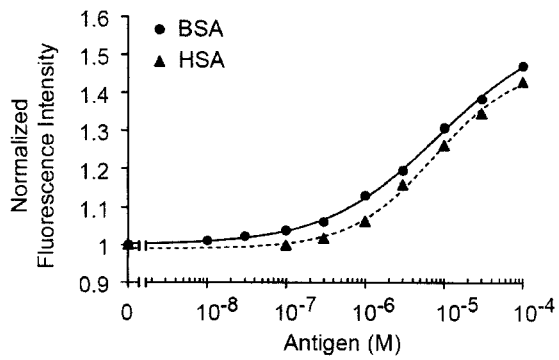
【 図 2 8 】



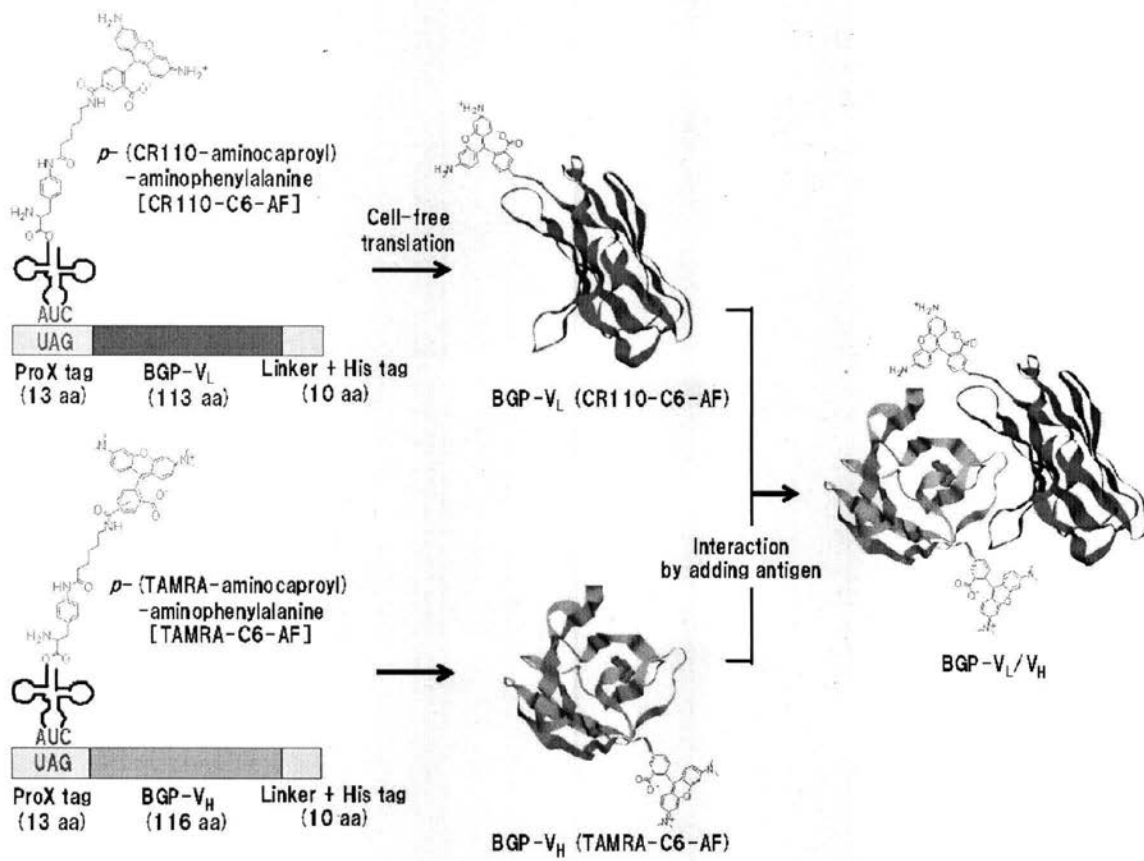
【 図 2 9 】



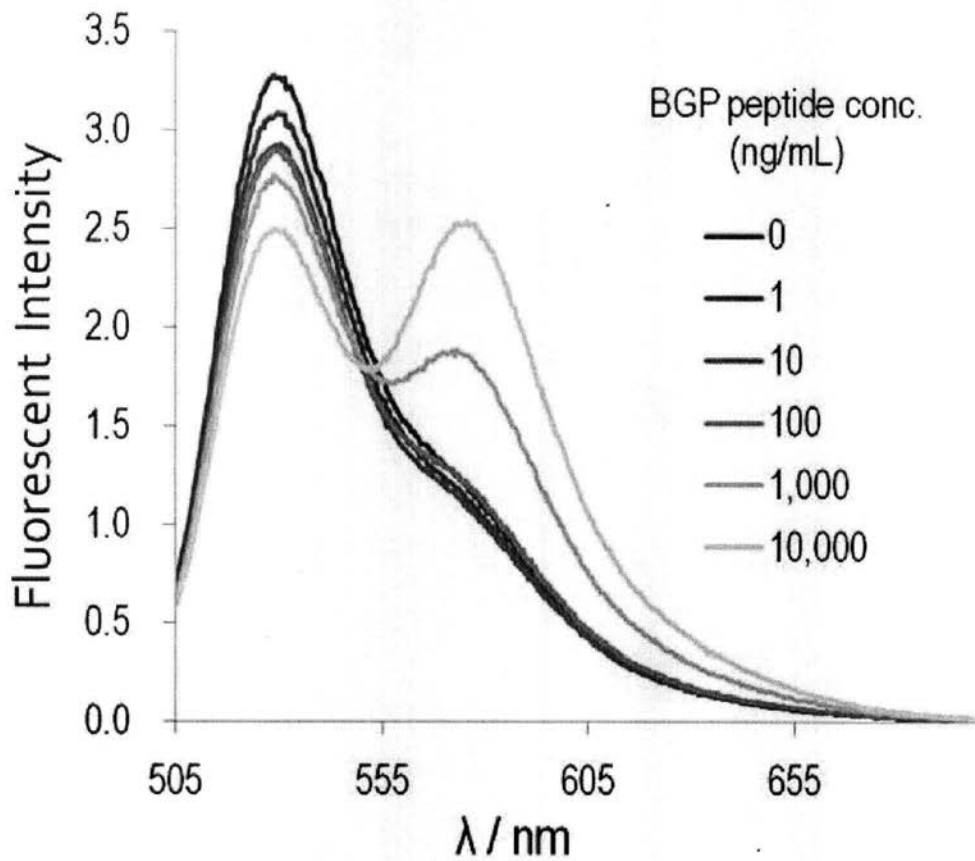
【 図 3 0 】



【 図 1 】

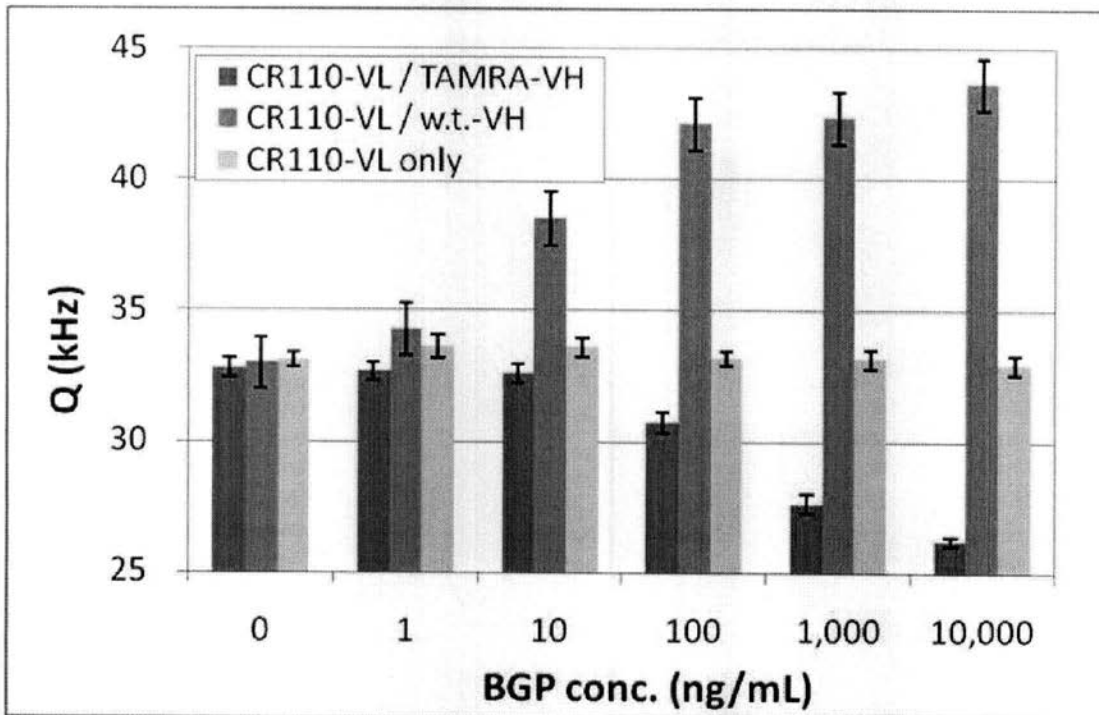


【 図 2 】

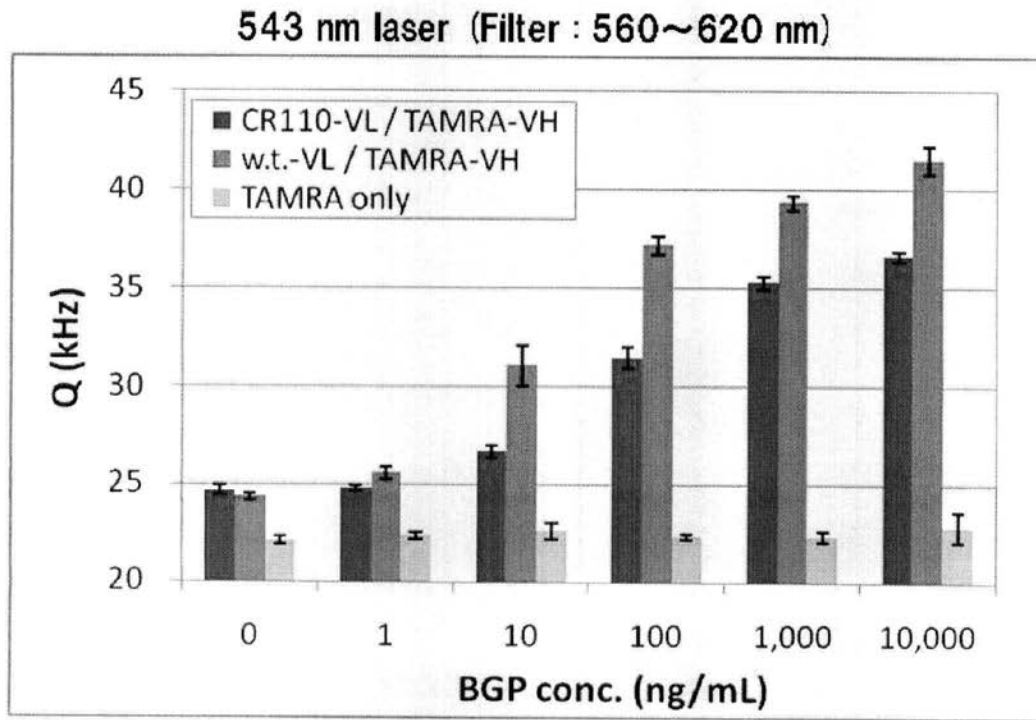


【 図 5 】

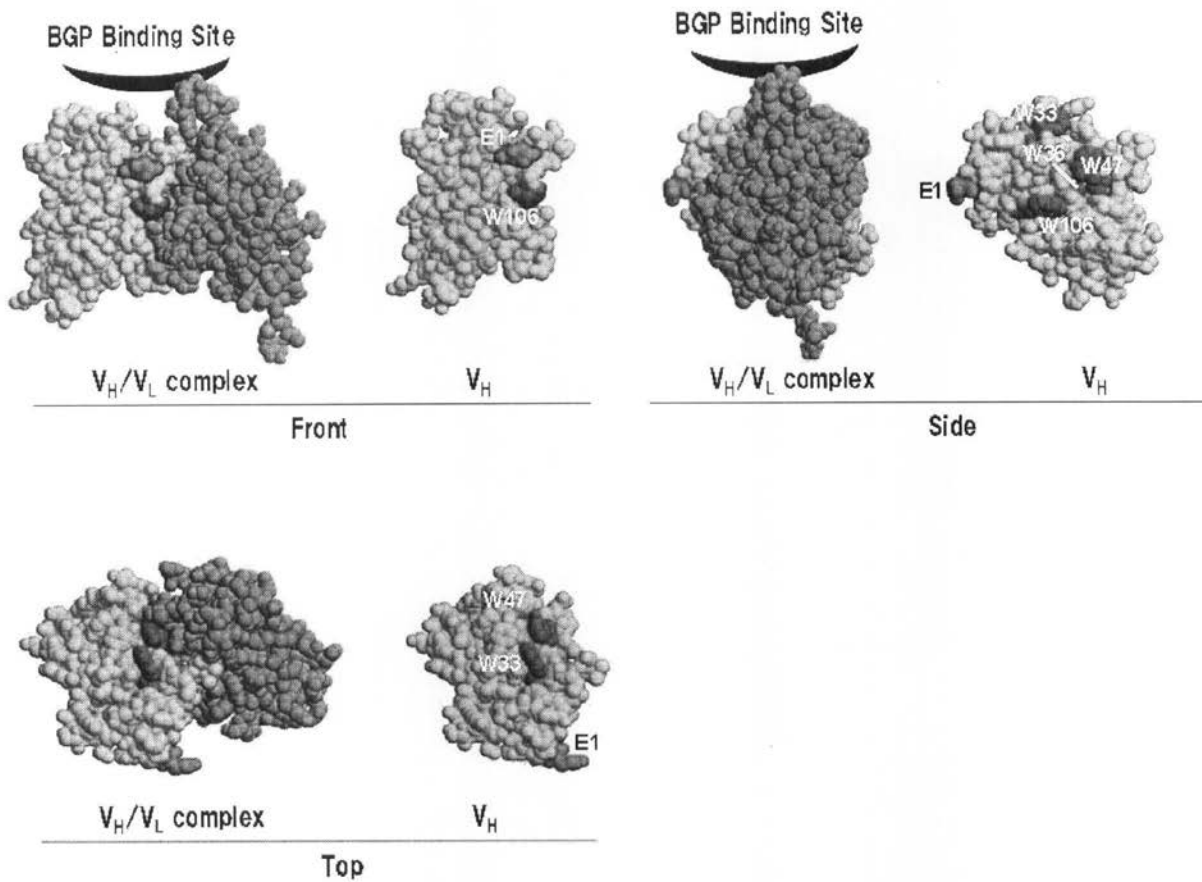
488 nm laser (Filter : 510~560 nm)



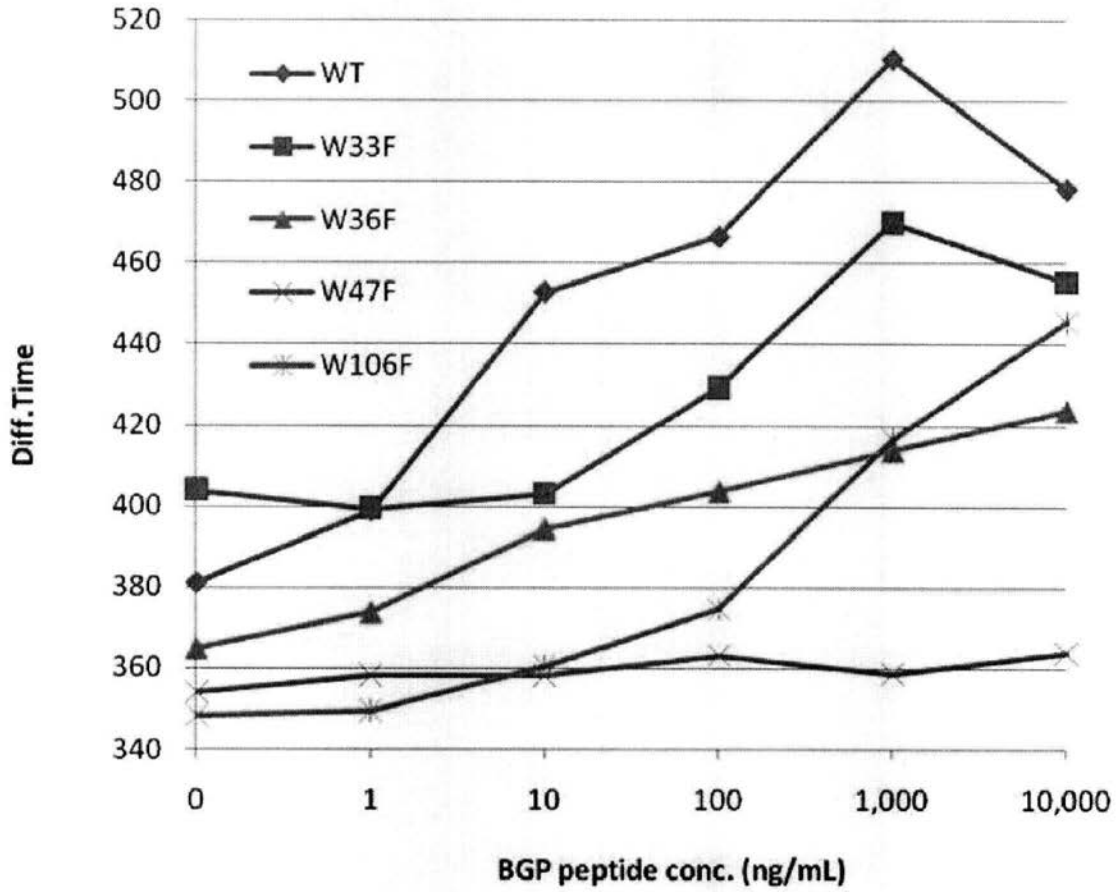
【 図 6 】



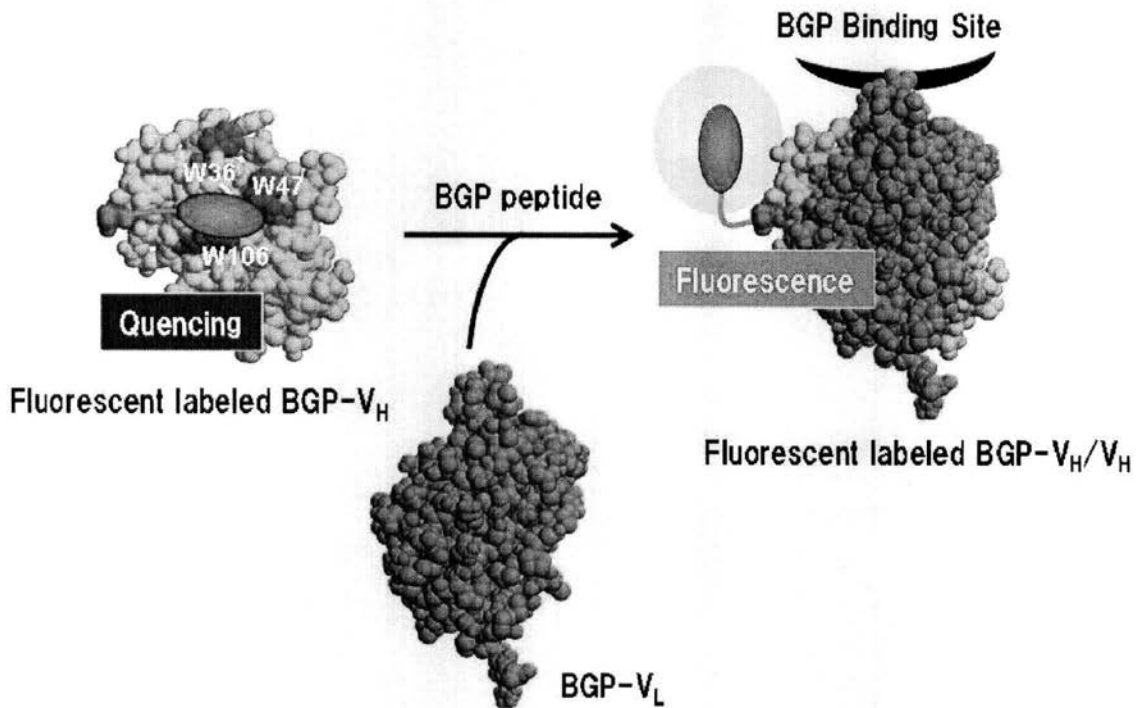
【 図 9 】



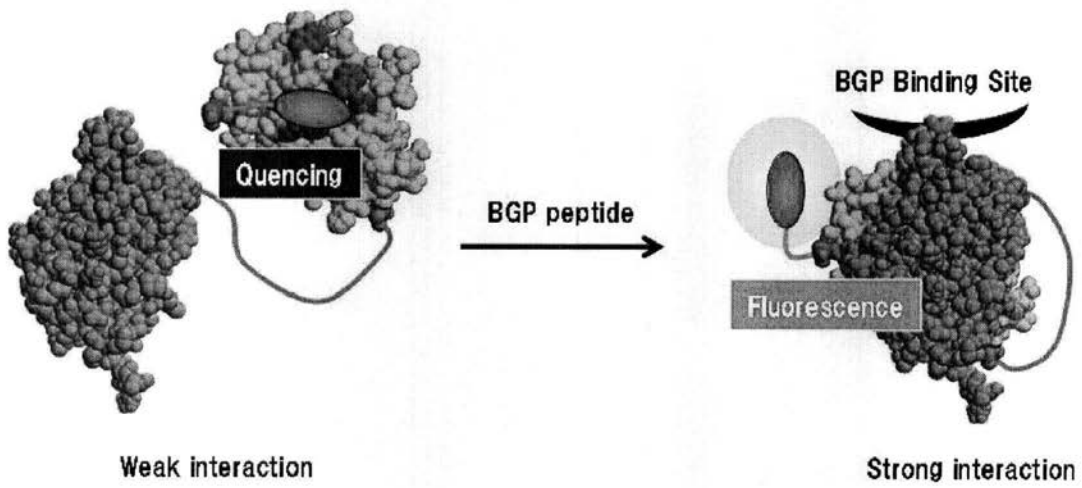
【 図 1 1 】



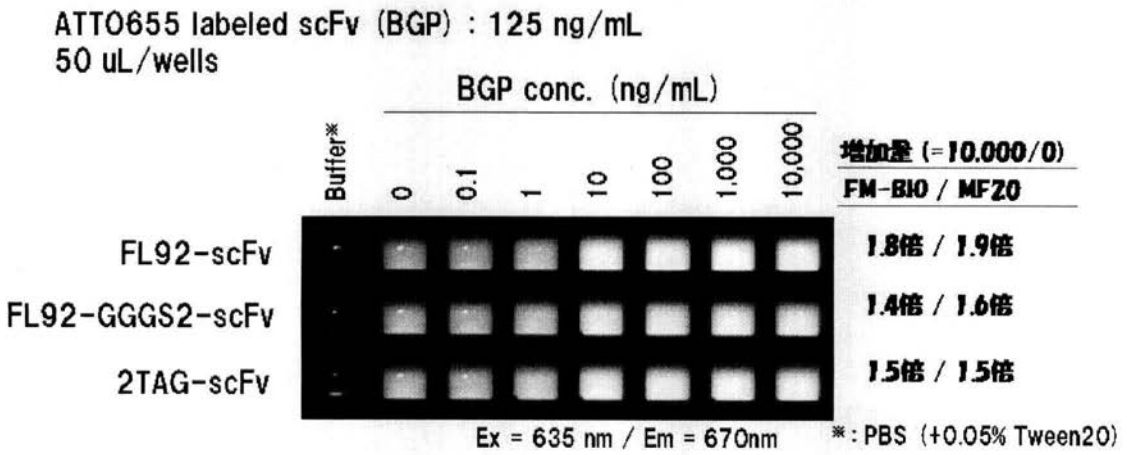
【 図 1 2 】



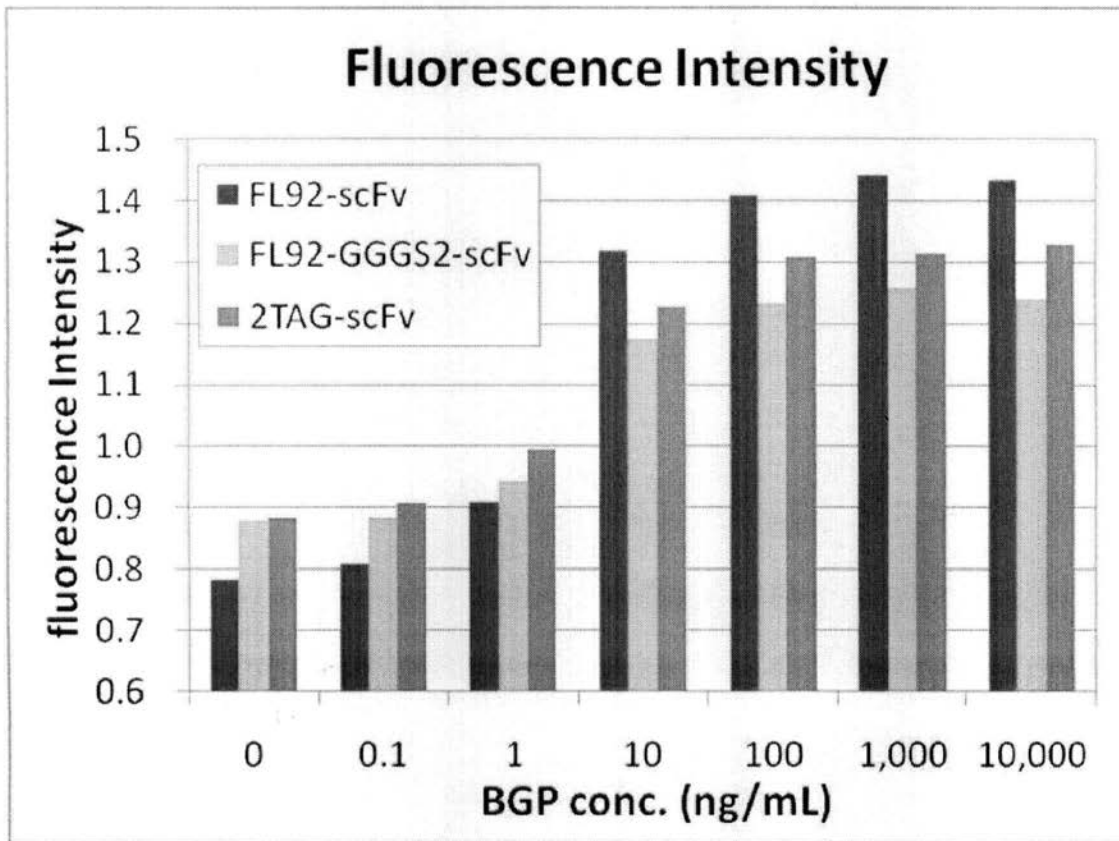
【 図 1 5 】



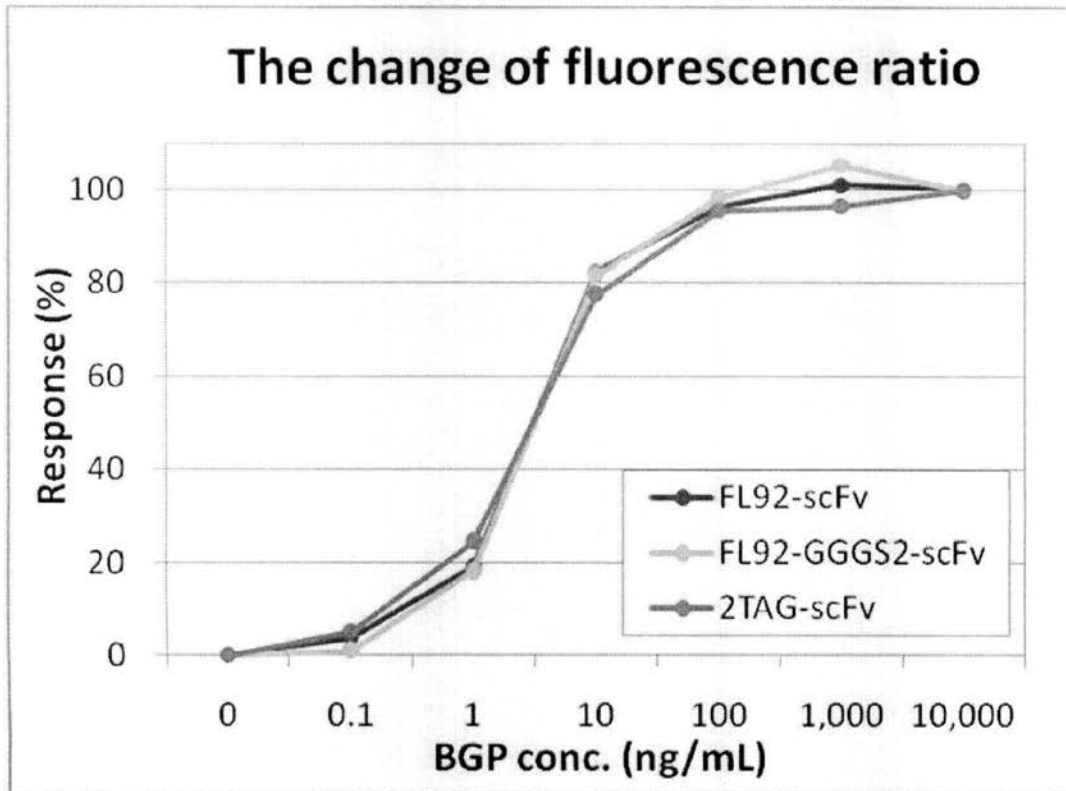
【 図 1 9 】



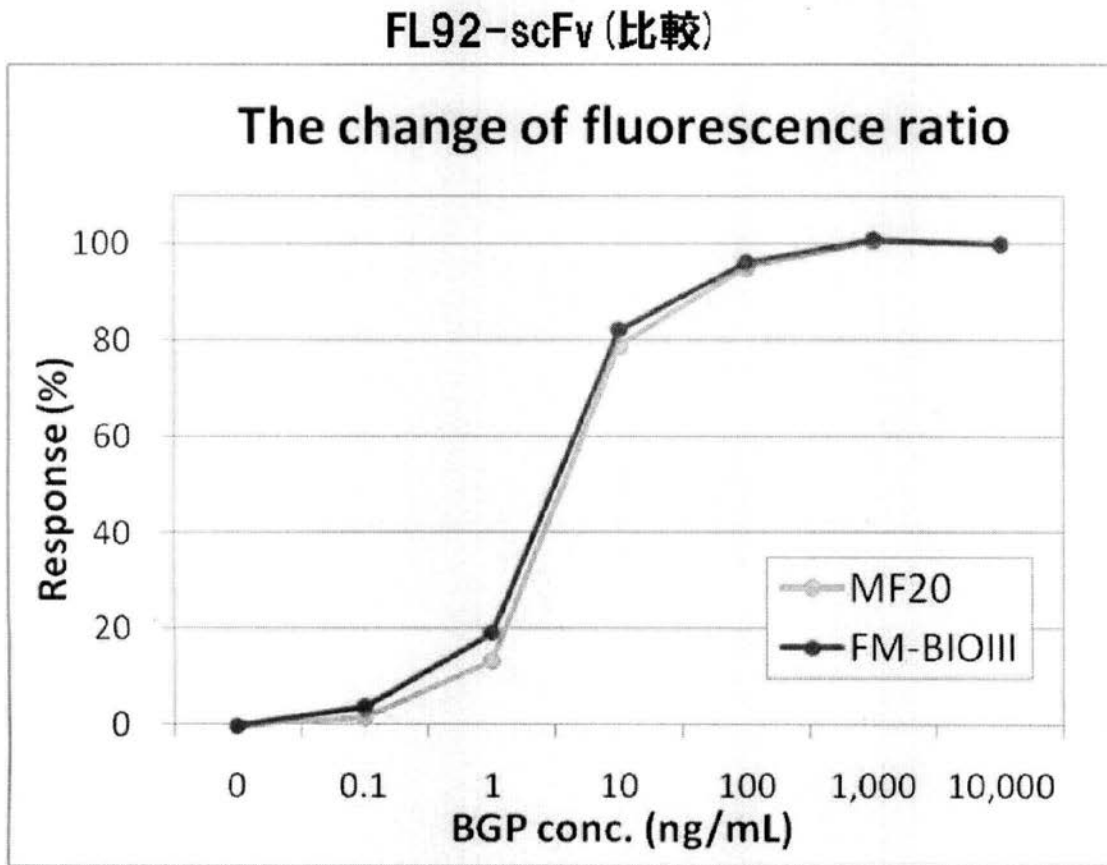
【 図 2 0 】



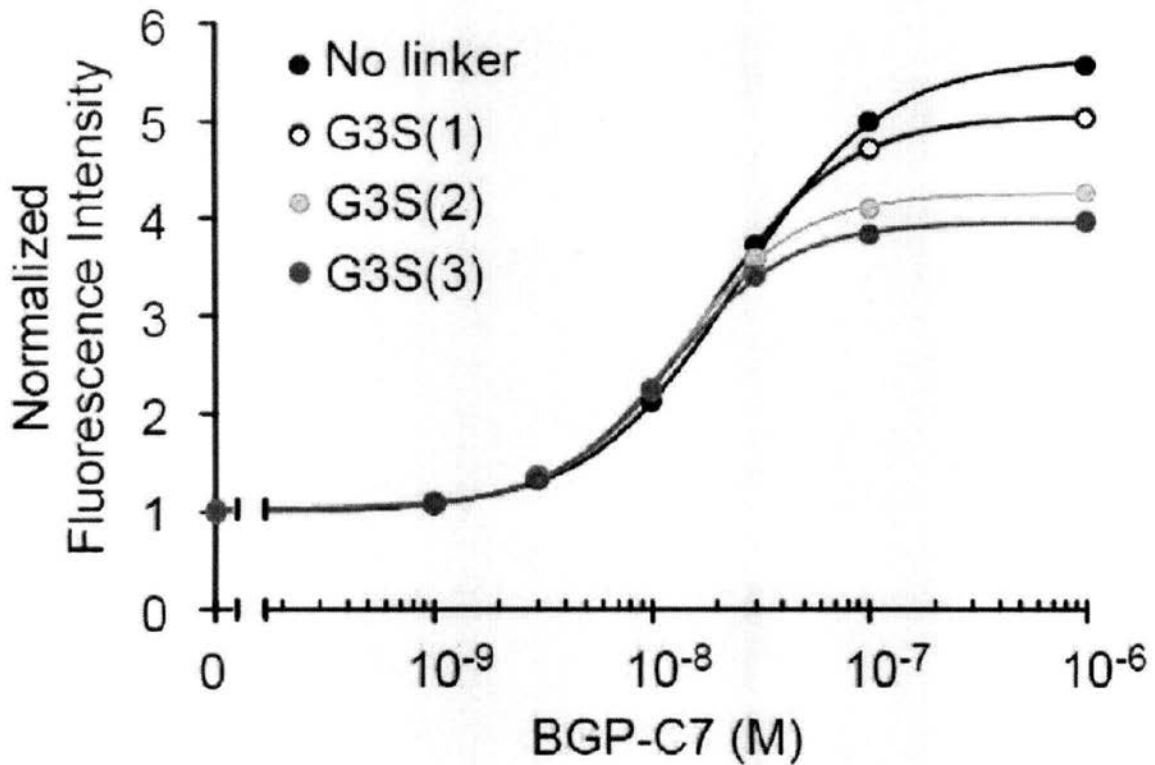
【 図 2 1 】



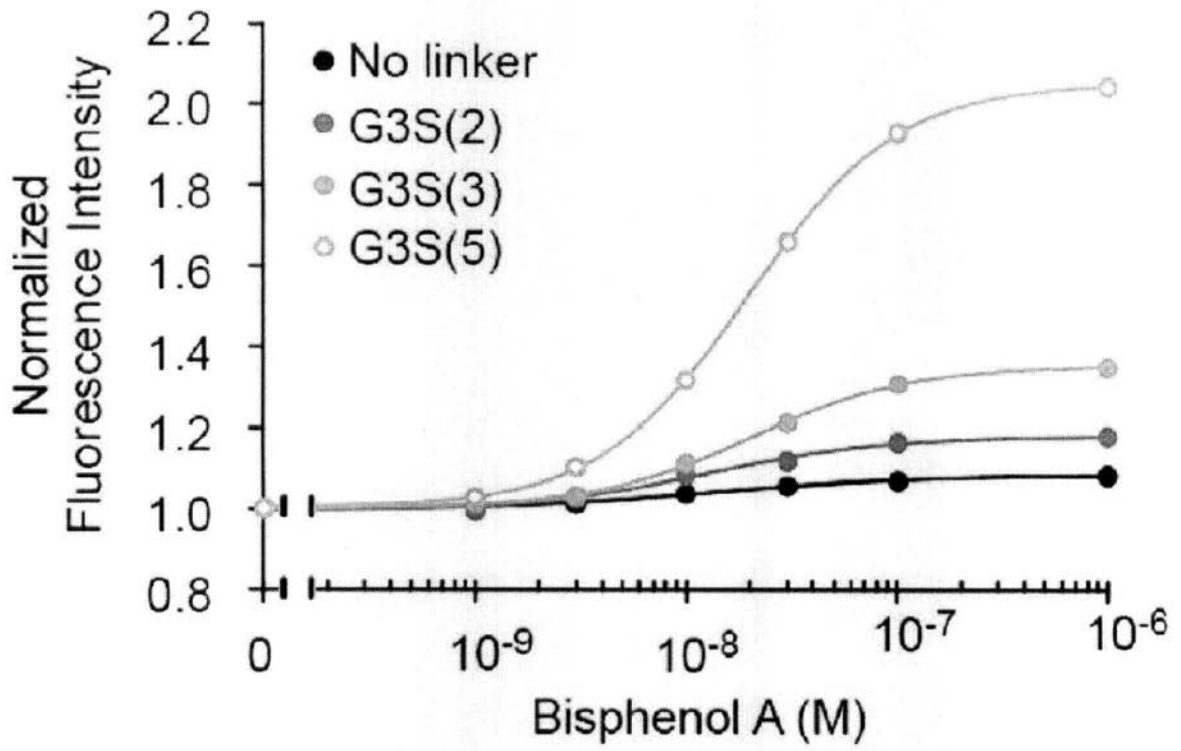
【 図 2 2 】



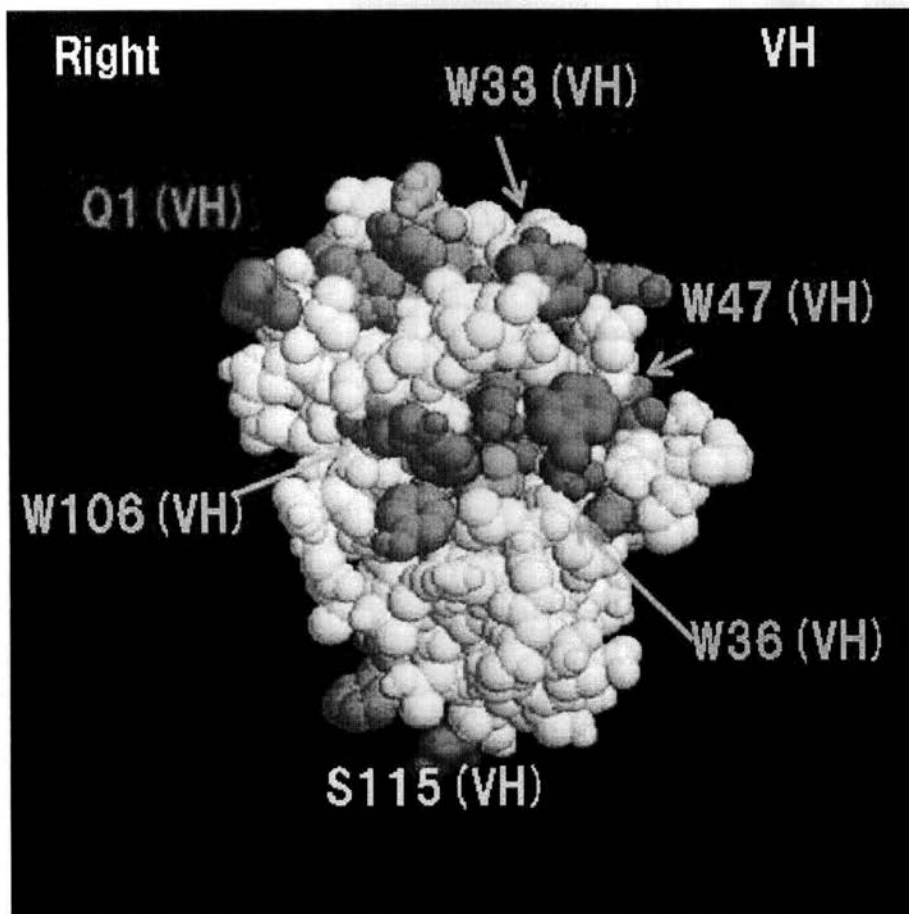
【 図 2 3 】



【 図 2 7 】

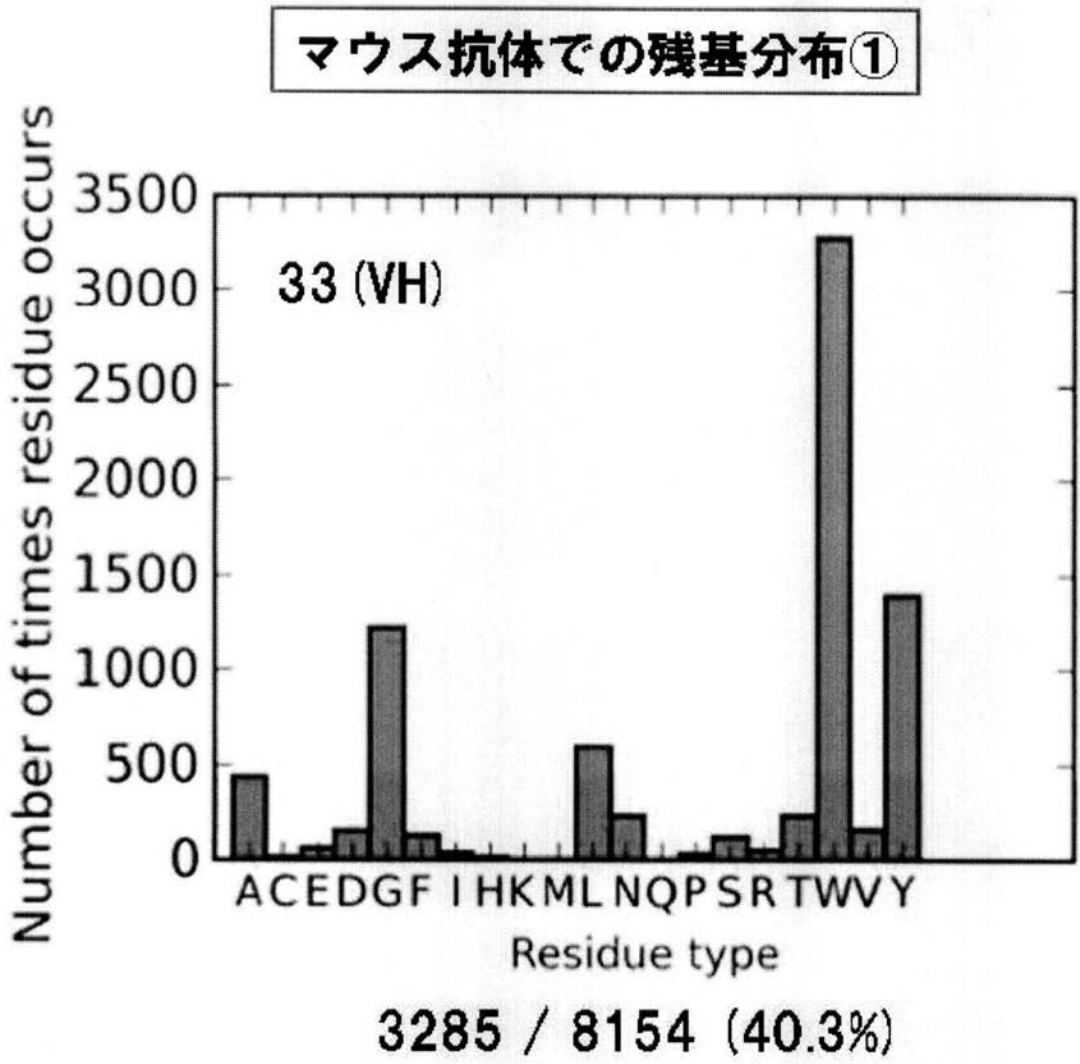


【 図 3 1 】

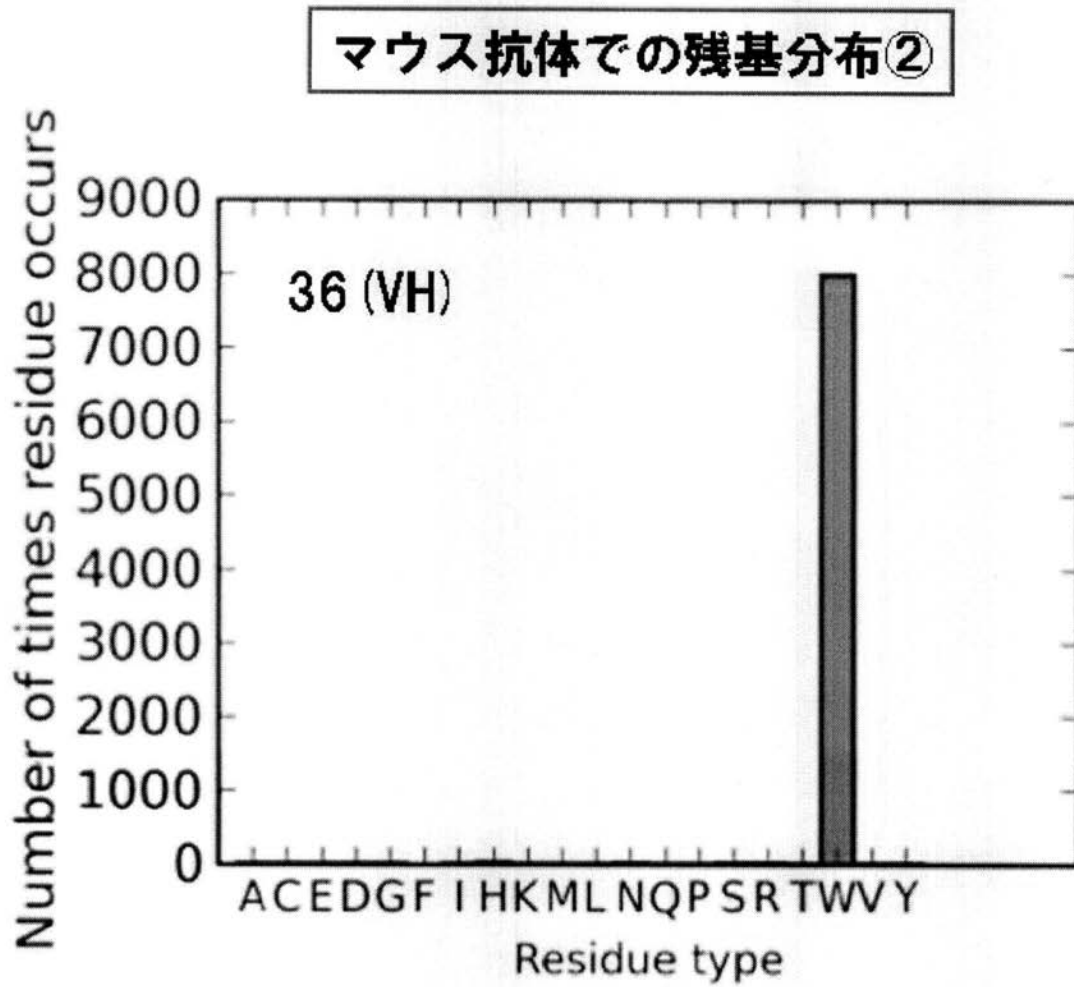


	クエンチ (CPP)	結合力 (Diff.Time)	相互作用 分子
WT	-	◎	-
W33F	-5.8	○	BGP
W36F	23.5	△	-
W47F	11.7	×	VL
W106F	32.9	△	VL

【 図 3 2 】

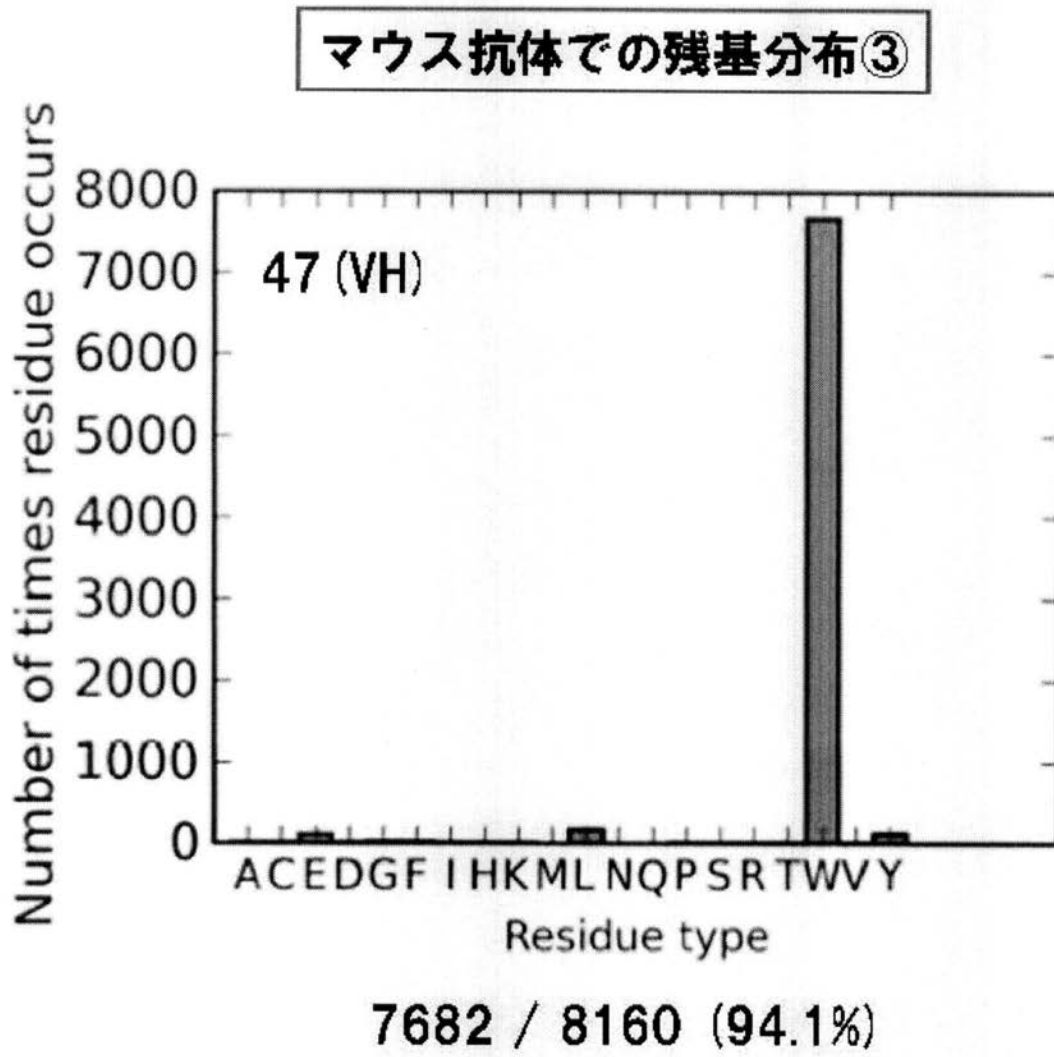


【 図 3 3 】

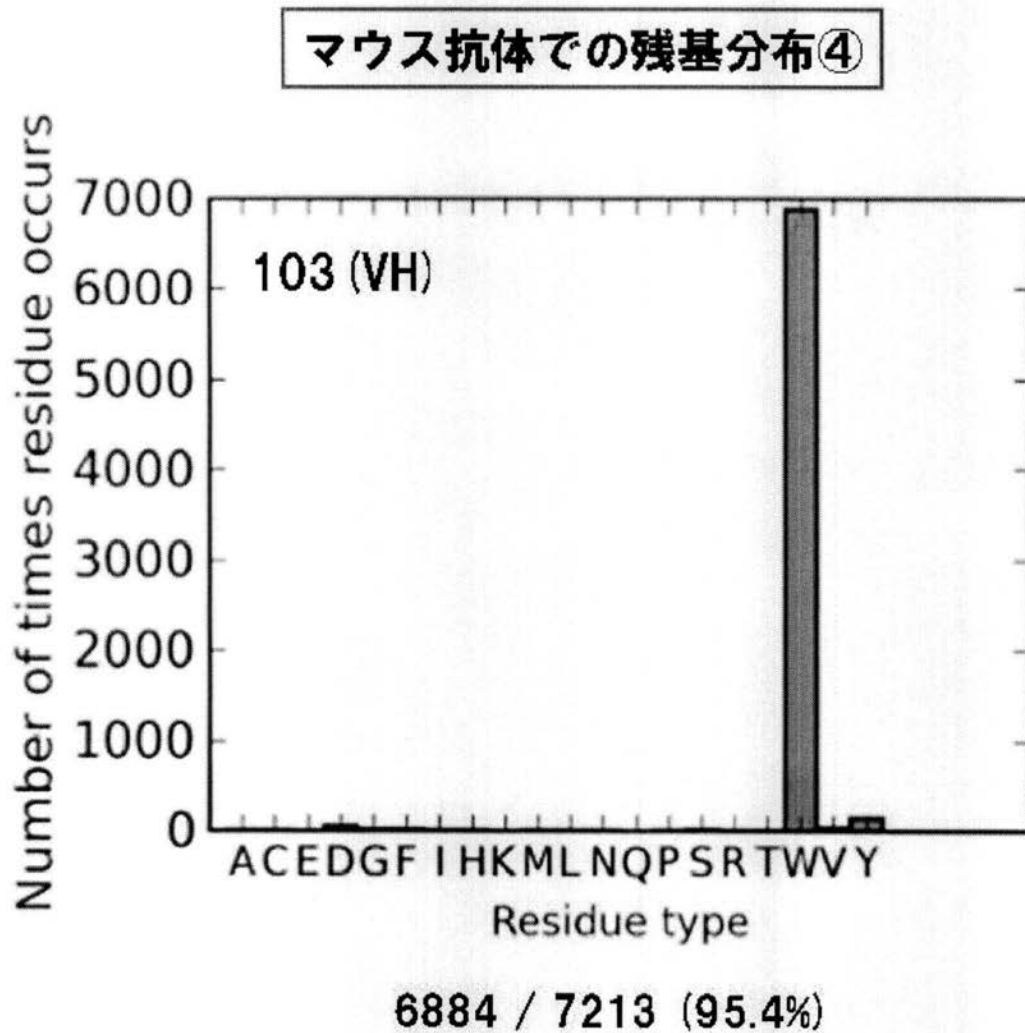


8006 / 8157 (98.1%)

【 図 3 4 】



【図 3 5】



【配列表】

[2011061944000001.app](#)

【手続補正書】

【提出日】平成24年6月14日(2012.6.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドとを備え、前記抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと抗体重鎖可変領域ポリペプチドのいずれか一方が蛍光色素により標識されたキットであって、液相中の抗原濃度と上記蛍光色素の蛍光強度とが正の相関関係にあることを指標として、抗原濃度の測定又は抗原の可視化を可能とすることを特徴とする抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項2】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとが結合した一本鎖抗体であることを特徴とする請求項1記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 3】

蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素又はオキサジン系蛍光色素であることを特徴とする請求項 1 又は 2 記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 4】

蛍光色素が、カルボキシローダミン 110、カルボキシテトラメチルローダミン、又は A T T O 6 5 5 (商標名)であることを特徴とする請求項 3 記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 5】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 6】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出用キット。

【請求項 7】

以下の工程 (a) ~ (c) を順次備えることを特徴とする抗原濃度測定・検出方法。

(a) 抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを、

(a1) 液相中で、被検物質中の抗原に接触させる工程；又は

(a2) 抗体軽鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体重鎖可変領域ポリペプチド、又は、抗体重鎖可変領域ポリペプチドと蛍光色素により標識された抗体軽鎖可変領域ポリペプチドを投与した被検非ヒト動物対象中の抗原に接触させる工程；又は

(a3) インビトロで、被検対象中の抗原に接触させる工程；

(b) 前記 (a1) の場合には、蛍光色素の蛍光強度を測定し、

前記 (a2) 及び (a3) の場合には、前記蛍光色素の蛍光を検出する工程；

(c) 液相中の抗原濃度と前記蛍光色素の蛍光強度とが、正の相関関係にあることを指標として、前記 (a1) の場合には、被検物質に含まれる抗原量を算出し、前記 (a2) 及び (a3) の場合には、被検対象に含まれる抗原を可視化する工程；

【請求項 8】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとが結合した一本鎖抗体であることを特徴とする請求項 7 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 9】

蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素又はオキサジン系蛍光色素であることを特徴とする請求項 7 又は 8 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 10】

蛍光色素が、カルボキシローダミン 110、カルボキシテトラメチルローダミン、又は A T T O 6 5 5 (商標名)であることを特徴とする請求項 9 記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 11】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出方法。

【請求項 12】

抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からな

るポリペプチドを含むことを特徴とする請求項 7 ~ 10 のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出方法。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0014

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0014】

また本発明は、(3) 蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素又はオキサジン系蛍光色素であることを特徴とする上記(1)又は(2)記載の抗原濃度測定・検出用キットや、(4) 蛍光色素が、カルボキシローダミン 110、カルボキシテトラメチルローダミン、又は ATTO 655 (商標名)であることを特徴とする上記(3)記載の抗原濃度測定・検出用キットや、(5) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする上記(1)~(4)のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出用キットや、(6) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする上記(1)~(4)のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出用キットに関する。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0016

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0016】

また本発明は、(8) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドと抗体軽鎖可変領域ポリペプチドとが結合した一本鎖抗体であることを特徴とする上記(7)記載の抗原濃度測定・検出方法や、(9) 蛍光色素が、ローダミン系蛍光色素又はオキサジン系蛍光色素であることを特徴とする上記(7)又は(8)記載の抗原濃度測定・検出方法や、(10) 蛍光色素が、カルボキシローダミン 110、カルボキシテトラメチルローダミン、又は ATTO 655 (商標名)であることを特徴とする上記(9)記載の抗原濃度測定・検出方法や、(11) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 1 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 2 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする上記(7)~(10)のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出方法や、(12) 抗体重鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 6 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含み、抗体軽鎖可変領域ポリペプチドが配列番号 7 に示されるアミノ酸配列からなるポリペプチドを含むことを特徴とする上記(7)~(10)のいずれかに記載の抗原濃度測定・検出方法に関する。

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2010/006809
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/533(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n 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) G01N33/533, G01N21/78, G01N33/531, C07K16/18 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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Shean-Lee Lim, et al., Noncompetitive Detection of Low Molecular Weight Peptides by Open Sandwich Immunoassay, Analytical Chemistry, 2007, Vol. 79, No. 16, 6193-6200	1-12
A	Tomoichi Yokozeki, et al., A Homogeneous Noncompetitive Immunoassay for the Detection of Small Haptens, Analytical Chemistry, 2002, Vol. 74, No. 11, 2500-2504	1-12
A	JP 10-319017 A (Toyobo Co., Ltd.), 04 December 1998 (04.12.1998), entire text (Family: none)	1-12
<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 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "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) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "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 "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 "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 "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 15 February, 2011 (15.02.11)		Date of mailing of the international search report 01 March, 2011 (01.03.11)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/006809

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 2006-506634 A (Valtion Teknillinen Tutkimuskeskus), 23 February 2006 (23.02.2006), entire text & US 2006/0246506 A1 & EP 1579222 A & WO 2004/046733 A1 & DE 60323538 D & CA 2503509 A & CN 1711476 A & FI 20022048 D0	1-12
A	WO 2008/051762 A2 (ABBOTT LABORATORIES), 02 May 2008 (02.05.2008), entire text & JP 2010-508516 A & EP 2097750 A & CA 2667012 A	1-12
A	JP 10-78436 A (Boehringer Mannheim Corp.), 24 March 1998 (24.03.1998), entire text (Family: none)	1-12
A	JP 2007-526750 A (Bayer Schering Pharma AG.), 20 September 2007 (20.09.2007), entire text & US 2005/0064512 A1 & EP 1641829 A & EP 1641830 A & WO 2005/005483 A1 & WO 2005/005482 A1 & DE 10331054 A & DE 502004011269 D & CA 2531962 A & KR 10-2006-0067949 A & CN 1820027 A	1-12
A	JP 2008-187936 A (Fujifilm Corp.), 21 August 2008 (21.08.2008), paragraphs [0059] to [0062] & US 2008/0187941 A1	1-12

国際調査報告		国際出願番号 PCT/JP2010/006809									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/533(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, C07K16/18(2006.01)n											
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. G01N33/533, G01N21/78, G01N33/531, C07K16/18											
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) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)											
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	Shean-Lee Lim, et al., Noncompetitive Detection of Low Molecular Weight Peptides by Open Sandwich Immunoassay, Analytical Chemistry, 2007, Vol. 79, No. 16, 6193-6200	1-12									
A	Tomoichi Yokozeki, et al., A Homogeneous Noncompetitive Immunoassay for the Detection of Small Haptens, Analytical Chemistry, 2002, Vol. 74, No. 11, 2500-2504	1-12									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。											
* 引用文献のカテゴリー 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願		の日後に公表された文献 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」同一パテントファミリー文献									
国際調査を完了した日 15.02.2011		国際調査報告の発送日 01.03.2011									
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) 浅野 美奈	2J 9312								
		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 0 / 0 0 6 8 0 9
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 10-319017 A (東洋紡績株式会社) 1998.12.04, 全文 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2006-506634 A (ヴァルシオン テクニリネン ツッキムスケ クス) 2006.02.23, 全文 & US 2006/0246506 A1 & EP 1579222 A & WO 2004/046733 A1 & DE 60323538 D & CA 2503509 A & CN 1711476 A & FI 20022048 D0	1-12
A	WO 2008/051762 A2 (ABBOTT LABORATORIES) 2008.05.02, 全文 & JP 2010-508516 A & EP 2097750 A & CA 2667012 A	1-12
A	JP 10-78436 A (パーリンガー マンハイム コーポレーション) 1998.03.24, 全文 (ファミリーなし)	1-12
A	JP 2007-526750 A (バイエル・シエーリング・ファーマ アクチエ ンゲゼルシャフト) 2007.09.20, 全文 & US 2005/0064512 A1 & EP 1641829 A & EP 1641830 A & WO 2005/005483 A1 & WO 2005/005482 A1 & DE 10331054 A & DE 502004011269 D & CA 2531962 A & KR 10-2006-0067949 A & CN 1820027 A	1-12
A	JP 2008-187936 A (富士フイルム株式会社) 2008.08.21, 【0059】～【0062】 & US 2008/0187941 A1	1-12

フロントページの続き

(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

(72)発明者 高木 広明

千葉県千葉市中央区亥鼻1丁目8番15号 株式会社プロテイン・エクスプレス内

Fターム(参考) 2G054 AA02 AA07 AA08 AB02 AB04 BB13 CA23 CB02 CB03 CE02

EA03 EB01 EB02 GA03 GA04 GA05 GB02 JA06

4H045 AA30 BA10 DA76 EA50 FA74

(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)	荧光免疫分析		
公开(公告)号	JPWO2011061944A1	公开(公告)日	2013-04-04
申请号	JP2011541820	申请日	2010-11-19
申请(专利权)人(译)	有限公司蛋白的表达		
[标]发明人	上田宏 阿部亮二 伊原正喜 高木広明		
发明人	上田 宏 阿部 亮二 伊原 正喜 高木 広明		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/531 G01N33/542 G01N21/78 C07K16/18		
CPC分类号	G01N33/582 A61K49/0058 C07K16/18 C07K16/44 C07K2317/56 C07K2317/622 C07K2317/92 G01N21/6428 G01N33/6857 G01N2021/6439		
FI分类号	G01N33/533.ZNA G01N33/531.A G01N33/542.A G01N21/78.C C07K16/18		
F-TERM分类号	2G054/AA02 2G054/AA07 2G054/AA08 2G054/AB02 2G054/AB04 2G054/BB13 2G054/CA23 2G054/CB02 2G054/CB03 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EB01 2G054/EB02 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GA05 2G054/GB02 2G054/JA06 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/DA76 4H045/EA50 4H045/FA74		
优先权	2009264420 2009-11-19 JP		
其他公开文献	JP5043237B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

它并不需要固定化步骤和洗涤步骤，以快速和简单地目的在液相使物质的定量测量，并且提供一种能够显现抗原的免疫测定这是一个问题。

(A) 使用荧光染料标记的抗体轻链可变区多肽和抗体重链可变区多肽与液相中的受试物中的抗原接触;或者在相介质中，抗体重链可变区多肽，和标记有荧光染料的抗体轻链可变区多肽，在被检物质的抗原接触;

(b) 该荧光染料的荧光强度步骤中测量;和 (c) 在液相和荧光染料的荧光强度的抗原浓度，作为指示，它是在正相关关系，计算包含在被检物质的抗原的量;依次进行，并测量测试物质中存在的靶抗原的浓度。

【图12】

