

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4487049号
(P4487049)

(45) 発行日 平成22年6月23日(2010.6.23)

(24) 登録日 平成22年4月9日(2010.4.9)

(51) Int.Cl.	F 1		
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 9 5	
GO 1 N 21/27 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 5 S	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 6 5 U	
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 21/27	C	
	GO 1 N 33/53	D	
請求項の数 7 (全 8 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願2005-67857 (P2005-67857)	(73) 特許権者	301021533
(22) 出願日	平成17年3月10日(2005.3.10)		独立行政法人産業技術総合研究所
(65) 公開番号	特開2006-250720 (P2006-250720A)		東京都千代田区霞が関1-3-1
(43) 公開日	平成18年9月21日(2006.9.21)	(72) 発明者	栗田 僚二
審査請求日	平成19年8月7日(2007.8.7)		茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
(出願人による申告)平成16年度独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構委託研究「健康安心プログラム 早期診断・短期回復のための高度診断・治療システム 心疾患治療システム機器の開発」、産業活力再生特別措置法第30条の適用を受ける特許出願		(72) 発明者	丹羽 修
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	佐藤 縁
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
		(72) 発明者	水谷 文雄
			茨城県つくば市東1-1-1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 表面プラズモン共鳴法による免疫測定

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の測定対象分子を定量する方法であって、測定対象分子に対する抗体とコリンエステラーゼとが結合した酵素標識抗体を試料と混合して抗原抗体反応を生じさせた後、測定対象分子と結合した酵素標識抗体又は結合していない酵素標識抗体のコリンエステラーゼ活性を、コリンエステラーゼ活性によりアシルチオコリンからチオコリンを生成させ、チオコリンを、銀塩化銀参照電極に対する電位が - 0.3 ~ - 0.8 V に保持されるように印加された金属薄膜基板表面上に吸着させ、表面プラズモン共鳴法により吸着速度を検出することにより、測定することを含む前記方法。

【請求項2】

コリンエステラーゼ活性によりアシルチオコリンからチオコリンを生成させる反応を行いながら、当該反応で生成したチオコリンの前記金属薄膜基板表面上への吸着速度を表面プラズモン共鳴法により検出することを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記金属薄膜基板が、銀薄膜基板であることを特徴とする、請求項1又は2に記載の方法。

【請求項4】

前記金属薄膜の厚さが200nm以下である請求項1~3の何れか1項に記載の方法。

【請求項5】

アシルチオコリンがアセチルチオコリンである請求項1~4の何れか1項に記載の方法

【請求項 6】

測定対象分子が脳性ナトリウム利尿ペプチドである請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

コリンエステラーゼがアセチルチオコリンエステラーゼ (E C 3 . 1 . 1 . 7) である請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液や尿中に存在するペプチド等を高感度に測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

従来、生体中のペプチド類を高感度かつ選択的に測定することが盛んに行われている。これまでは、これらペプチドに対する抗体の分子認識能力を利用した免疫測定法が行われてきた。しかしながら、生体試料中には脳性ナトリウム利尿ペプチド (血液中でpg/mL程度) など極めて低濃度でのみ存在する重要なペプチド類があり、これまで汎用的に用いられてきた酵素イムノアッセイ法を用いてこれら極低濃度ペプチドを定量することは感度的に困難である。サンドイッチイムノアッセイ法では、前述の酵素イムノアッセイ法にくらべ、高感度測定が可能であることが知られている。しかしながら、測定対象分子が小さい場合、二次抗体と結合し難く、応用範囲は限られていた。一方、ラジオイムノアッセイ法は極めて高感度な定量が可能であるものの、放射性同位元素を用いるため安全性に問題があり、ベッドサイド或いは在宅での測定は困難であった。このため、例えば心疾患患者などの一刻を争う臨床現場においては、心疾患のマーカー分子をベッドサイドなどで迅速に測定する新規な手法が必要とされている。

【0003】

一方、近年、表面プラズモン共鳴センサが注目されている。これは金属表面に全反射するように光を当てることにより生じるエバネッセント波と溶液表面での表面プラズモン波の波数が一致する際に共鳴し、反射光が減衰する現象を利用したものであり、最も反射光が減衰する角度 (表面プラズモン共鳴角) は金属表面の誘電率、すなわち屈折率に大きく依存する。このため表面プラズモン共鳴センサは、電極表面の屈折率変化を非常に高感度に測定可能な手法として数社から装置化されている。上述したように電極近傍の屈折率変化を高感度に読み取れることを利用し、電極表面に目的とする分子の抗体を固定化した電極基板を用いることにより、電極上の抗体と抗原が結合する様子をラベル化することなく、安全かつ簡便で迅速に観測することができる。しかしながら、抗体に対して抗原の分子量が小さい場合、屈折率変化すなわち表面プラズモン共鳴角の角度変化が小さいため、極微量の抗原抗体反応を観測することは非常に難しい。

【0004】

なお特許文献 1 には増幅された電流信号を用いてペプチド類を検出する方法が開示されているが、特許文献 1 に開示された発明は表面プラズモン共鳴法を用いる本発明とは全く異なる発明である。

【0005】

【特許文献 1】特開 2004 - 257996 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

本発明は、ラジオイムノアッセイ法の迅速性、簡便性、安全面での問題点及び抗原分子が小さい場合の表面プラズモン共鳴センサの感度の問題点に鑑み、従来行われてきた酵素イムノアッセイ法をさらに改良し、生体内に極微量で存在する分子においても、高感度かつ簡便、迅速に定量する手法を提供しようとするものである。

10

20

30

40

50

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は以下の発明を包含する。

(1) 試料中の測定対象分子を定量する方法であって、測定対象分子に対する抗体とコリンエステラーゼとが結合した酵素標識抗体を試料と混合して抗原抗体反応を生じさせた後、測定対象分子と結合した酵素標識抗体又は結合していない酵素標識抗体のコリンエステラーゼ活性を表面プラズモン共鳴法を用いて測定することを含む前記方法。

(2) コリンエステラーゼ活性の測定を、コリンエステラーゼ活性によりアシルチオコリンからチオコリンを生成させ、チオコリンを金属膜表面上に吸着させ、表面プラズモン共鳴法により吸着量又は吸着速度を検出することにより行う(1)に記載の方法。

(3) アシルチオコリンがアセチルチオコリンである(2)に記載の方法。

(4) 金属膜に負電位が印加されている(2)又は(3)に記載の方法。

(5) 前記負電位が銀塩化銀参照電極に対して $-0.3 \sim -0.8$ Vである(4)に記載の方法。

(6) 測定対象分子が脳性ナトリウム利尿ペプチドである(1)～(5)の何れかに記載の方法。

(7) コリンエステラーゼがアセチルチオコリンエステラーゼ(EC 3.1.1.7)である(1)～(6)の何れかに記載の方法。

【発明の効果】

【0008】

本発明に係る方法は、酵素イムノアッセイ法の1つであり、現在、極低濃度の生体分子を測定する際に汎用されているラジオイムノアッセイ法と比較すると安全で簡便な測定法である。これは、ラジオイムノアッセイ法では放射線物質を用いるため特別な環境と装置を必要とするためである。また酵素イムノアッセイ法はラジオイムノアッセイ法に比べ感度の面で劣ることが多いが、本発明に係る方法では標識酵素の酵素活性を表面プラズモン共鳴法を用いて測定することにより、高感度の観測が可能である。これにより、生体中に極低濃度でしか存在しない分子を、簡便かつ安全に測定することを可能にする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0009】

本発明において標識酵素として使用するコリンエステラーゼとしてはアセチルチオコリンエステラーゼ(EC 3.1.1.7)及びアシルコリンエステラーゼ(EC 3.1.1.18)があげられる。これらの酵素は基質としてアセチルチオコリン等のアシルチオコリンを分解できる。これらの酵素による標識抗体の作製方法には特に制限がなく、酵素イムノアッセイにおいて汎用される化学結合法やアビジン-ビオチン法等が利用できる。

【0010】

本発明に係る方法により定量され得る測定対象分子は、抗原性を有するものであれば特に限定されない。具体的な測定対象分子としては、例えばペプチド、タンパク質、多糖類、ポリヌクレオチド等が挙げられ、中でも利尿ペプチド類、特に脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)が好ましい。生体産生ペプチドの中でも利尿ペプチド類の生体試料中の濃度は通常、pptオーダーと極めて低い。利尿ペプチドの一つである脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)は健常人の血液中においては 20 pg/mL 以下であるが、急性心不全、慢性心不全、狭心症、急性心筋梗塞、腎不全、高血圧症等においてその濃度が上昇し、特に心不全ではその病状に従って濃度が上昇することが知られている等、医療分野における重要なマーカー分子である。

以下に、本発明に係る測定方法を順を追って説明する。

【0011】

(1) ある測定対象分子の濃度を測定しようとする場合、予め、測定対象分子が固定化された基材を作成しておく。基材としては金属、炭素、ガラス、高分子等の固体材料が広く利用される。例えば金を基材とする場合にはシステアミン等で金を処理することにより、表面に結合性のアミノ基を導入することができる。また、ガラスや金属酸化物を基材と

10

20

30

40

50

する場合には適当なシランカプラーを用いることで、表面に反応性のアミノ基、カルボキシル基などを導入できる。例えばアミノ基を導入した基材を水溶性カルボジイミドとBNPとを含む水溶液中に浸漬することにより、BNPが基材に固定化され、BNP固定化基材が形成される。基材はいかなる形状のものであってもよく、例えば、棒状、板状、粉末状等の形状であってよい。

【0012】

(2) 一方、測定対象分子を含有する試料をコリンエステラーゼ標識抗体(標識抗体)と混合し、適当な時間インキュベートして抗原(測定対象分子)と酵素標識抗体とを結合させる。こうして得られた反応液中には測定対象分子と結合した酵素標識抗体と、測定対象分子と結合していない酵素標識抗体とが含まれる。なお、当業者には自明であるが、標識抗体は、試料中の測定対象分子に対して過剰量、通常は大過剰量使用される。試料中の測定対象分子の量がある程度の範囲にあることが予想される場合(血液等の生体試料中の成分の測定においては多くがこの場合である)にはその範囲を明らかに超える量の標識抗体を使用すればよい。例えば、測定対象分子が試料中に $\text{pg/mL} \sim \text{ng/mL}$ のオーダーで含まれていると予測される場合には、標識抗体は数 $\mu\text{g/mL}$ (例えば $1\mu\text{g/mL}$)となる量だけ使用すればよい。また、試料中の測定対象分子量の範囲が全く予想できないような場合であっても、まず種々の量の標識抗体を用い、標識抗体の量と測定結果とを比較検討すれば「過剰量」は容易に決定できる。

10

【0013】

(3) 次いで、(2)で得られた反応液を(1)で作成した測定対象分子固定化基材と接触させ、適当な時間インキュベートする。(2)のインキュベーションにおいて測定対象分子と結合していない酵素標識抗体は、この過程で、該基材上の測定対象分子と抗原抗体反応により結合する。

20

【0014】

標識抗体の該基材への結合量あるいは結合速度は、上記反応液中に(2)の終了時に存在する未反応の標識抗原の濃度と正の相関がある。言い換えれば、試料中の測定対象分子濃度と負の相関を有する。基材に結合した標識抗体の量はコリンエステラーゼ活性に比例するから、コリンエステラーゼ活性の測定から測定対象分子の濃度が求められることになる。あるいは逆に基材に結合することなく液中に残った標識抗体の量、すなわち、液中のコリンエステラーゼ活性は試料中の測定対象分子の濃度と正の相関を有するから、溶液中のコリンエステラーゼ活性測定結果から測定対象分子の濃度を求めることも可能である。

30

【0015】

(4) コリンエステラーゼ活性の測定は表面プラズモン共鳴法により行う。具体的にはコリンエステラーゼ活性の基質にコリンエステラーゼ標識抗体を作用させ、生じる生成物の濃度又は濃度変化を表面プラズモン共鳴法により測定する。表面プラズモン共鳴法を用いた測定は市販の測定装置を用いて行うことができる。この測定は典型的には以下の手順で行う。

【0016】

まず、上記基材上に結合した標識抗体と結合していない標識抗体を分離する。次に、上記基材上に結合した標識抗体或いは結合していない標識抗体を含む溶液中に、コリンエステラーゼ活性の基質であるアシルチオコリンを添加する。添加されたアシルチオコリンは標識抗体のコリンエステラーゼにより分解され、反応溶液中にチオコリンが生成する。この反応溶液を金属膜表面に接触させると、チオコリンが金属-硫黄結合を介して金属膜表面に吸着される。そして、金属膜表面へのチオコリンの吸着量又は吸着速度を、表面プラズモン共鳴法により検出する。チオコリンが金属膜表面上に吸着すると金属表面の屈折率が変化し、表面プラズモン共鳴角が変化する。金属膜表面へのチオコリンの吸着量は表面プラズモン共鳴角の大きさとして検出することができ、吸着速度は表面プラズモン共鳴角の角度変化として検出することができる。チオコリン濃度と金属膜表面への吸着量は低濃度領域において正の相関を示すが、ある濃度を超えると、金属膜表面への吸着量が飽和に達するため、表面プラズモン共鳴角の大きさの測定だけでは生じたチオコリンの濃度を適

40

50

切に評価できない場合がある。そのような場合であっても、吸着開始直後から吸着量が飽和に近づく前までの間の吸着速度はチオコリン濃度と比例することから、この期間において表面プラズモン共鳴角の角度変化を観察すれば、生じたチオコリンの濃度を適切に評価することが可能である。このように、チオコリンの金属膜表面への吸着量又は吸着速度を測定することにより、測定対象分子固定化基材に結合した標識抗体のコリンエステラーゼ活性、或いは該基材に結合していない標識抗体のコリンエステラーゼ活性を測定できる。

【0017】

チオコリンが吸着され、さらには表面プラズモン共鳴角の測定に用いられる金属膜としては、チオコリンのチオール基がその表面に金属-硫黄結合を介して化学吸着され得る金属の薄膜、例えば銀、金、銅、アルミニウムの薄膜が好適に使用される。チオコリンの吸着には金属膜の厚さは影響しないが、表面プラズモン共鳴法においては、エバネッセント波の染みだしが必要なため、本発明に用いられる金属膜の厚さは好ましくは200nm以下である。

【0018】

上記金属膜は表面プラズモン共鳴測定装置により表面プラズモン共鳴角が測定できるものであれば如何なる形態であってもよいが、通常は、表面プラズモン共鳴角の測定に用いられるプリズムの一面或いはガラスの一面に蒸着等の常法により形成されたものである。金属膜は負の電位が印加されたものであってよい。チオコリンは酵素反応を行う中性溶液中では正に荷電していることから、金属膜の電位が負電位、特に銀塩化銀参照電極に対して-0.3~-0.8Vである場合、チオコリンの金属膜への吸着が促進されるため好ましい。

【0019】

以下、本発明を実施例に基づいて説明する。ただし本発明は以下の実施例にのみ限定されるものではない。

【実施例1】

【0020】

まず、アセチルチオコリンエステラーゼを標識酵素とする脳性ナトリウム利尿ペプチド(BNP)抗体(Anti-BNP-AchE)を以下のように作製した。10mg/mLのS-アセチルカプトサクシニルアンヒドリド溶液を1mg/mLのアセチルチオコリンエステラーゼと反応させてアセチルチオコリンエステラーゼにチオール基を導入した。一方、0.1mg/mLのスルホサクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレートと400µg/mLの抗ヒトBNP抗体と反応させて、抗ヒトBNP抗体にマレイミド基を導入する。その後、チオール修飾したアセチルチオコリンエステラーゼとマレイミド基を導入した抗ヒトBNP抗体を反応させてAnti-BNP-AchEを作製した。

【0021】

抗原抗体反応は以下のように行った。各濃度のBNP含む水溶液に終濃度が1µg/mLになるようにAnti-BNP-AchEを加え、スターラー攪拌を行いながら30分間抗原抗体反応を行わせた。その後、上記反応溶液中にBNPを固定化した金微粒子を5mg加え、スターラーで攪拌することにより、抗原抗体反応していないAnti-BNP-AchE(未反応抗体)を金微粒子に吸着させ、静置して金微粒子を沈殿させた。次に、上記金微粒子を加えた溶液の上澄み溶液100µLを、5mMのアセチルチオコリンを含む0.1Mのリン酸緩衝溶液(pH8)900µLと混合し、10分間酵素反応させることにより、チオコリンを生成させた。その後、限外濾過し、Anti-BNP-AchEを取り除いた。なお、上記のBNPを固定化した金微粒子は次の手順で調製したものである。まず、濃硫酸で洗浄した金微粒子を0.1mMシスタミン溶液に12時間浸すことにより金表面にアミノ基を導入した。その後、上記金微粒子を2.5mg/mLのBNP及び0.1g/Lの水溶性カルボジイミドを含む溶液中で1時間反応させることにより、金微粒子表面にBNPを固定化した。その後、未反応のBNP及び水溶性カルボジイミドを除くため0.1Mリン酸バッファで洗浄し、BNP固定化金微粒子を得た。

【0022】

表面プラズモン共鳴 (Surface Plasmon resonance: SPR) 角の測定は、市販されている Handy-SPR (NTT-AT社製) を用いて行った。銀薄膜を備えた基板を、ガラス基板 (16mm x 16mm、厚さ0.15mm、松浪硝子社製) 上にマグネトロンスパッタ装置 (日本シード社製) を用いてチタンを 5 nm 堆積させた後、さらに銀薄膜を 100 nm 堆積させることにより形成した。上記金属膜を備えたガラス基板をマッチングオイルを介して SPR 装置に取り付けた。その後、5 mM のアセチルチオコリンを含む 0.1 M のリン酸緩衝溶液 (pH 8) を 50 μ L 滴下し、SPR 角を観察した。安定した SPR 角を得た後、前述した、酵素反応によりチオコリンを含む溶液 50 μ L を加えることにより、徐々に SPR 角が大きくなる様子を観測することができた。これは、溶液中に含まれるチオコリンが徐々に銀薄膜表面に吸着されていく様子を示している。

10

【0023】

図1は各BNP濃度に対するSPR角の上昇する様子を示している。試料中に多くのBNPが含まれる場合には、アセチルチオコリンエステラーゼ活性が高いために多くのチオコリンが生成し、SPR角度の変化速度が速いことを示している。

【0024】

図2は各BNP濃度に対する図1におけるSPR角変化の傾きを示している。試料中のBNP濃度の増加に伴いSPR角の変化速度が大きくなる。すなわち本発明の方法によりBNPが定量可能であることを示している。

【実施例2】

20

【0025】

アセチルチオコリンエステラーゼを標識酵素とする脳性ナトリウム利尿ペプチド (BNP) 抗体 (Anti-BNP-AchE) を実施例1と同様に作製し、実施例1と同様に測定試料溶液に混合し、抗原抗体反応を起こさせた。その後、直径1.6 mmの金基板表面にBNPを固定化したものを測定試料溶液中に30分間浸すことにより、抗原抗体反応していないAnti-BNP-AchE (未反応抗体) を金基板表面に吸着回収した。BNPを固定化した金基板は以下のように作製した。まず金基板をダイヤモンドスラリーにより研磨した後、0.1 mM シスタミン溶液中で12時間反応させて金表面にアミノ基を導入した後、2.5 mg/mL のBNP及び0.1 g/Lの水溶性カルボジイミドを含む溶液中で1時間反応させることにより、金基板表面にBNPを固定化した。

30

【0026】

SPR角の測定は特に説明しない事項については実施例1と同様に行った。SPR装置に取り付けた銀薄膜基板に5 mM のアセチルチオコリンを含む0.1 M のリン酸バッファ溶液を50 μ L 滴下した。さらに、このバッファ溶液に銀塩化銀参照電極及び白金対向電極を銀薄膜基板と接触しないように浸し、ポテンシオスタットを用いて銀薄膜基板に -0.3 ~ -0.8 V の電位を印加した。

【0027】

SPR角を観測しつつ、未反応抗体がその表面に吸着回収された上記金基板をアセチルチオコリンを含むバッファに浸すことにより、徐々にSPR角度が上昇した。これは金基板表面に回収された抗体の標識酵素であるアセチルチオコリンエステラーゼによりバッファ中に含まれるアセチルチオコリンがチオコリンに分解され、さらに銀薄膜表面に吸着したためである。銀薄膜基板の電位を -0.3 ~ -0.8 V の間で保持することにより、電位を印可しない場合に比べてSPR角度の変化が早くなった。これは上記電位範囲において銀薄膜表面の酸化膜が還元されることによりチオコリンの吸着が促進され、またカチオンであるチオコリンが静電的に引き寄せられるためである。なお -0.8 V 以下での電位ではチオコリンの脱離反応が起こるため上記電位範囲が適切であった。このように金属膜表面の電位を制御することによって、より迅速な測定が可能である。

40

【図面の簡単な説明】

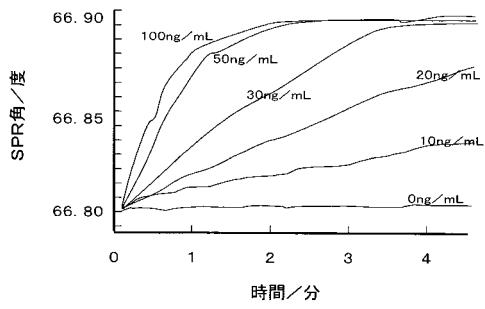
【0028】

【図1】図1は各BNP濃度におけるSPR角の経時的な変化を示す。

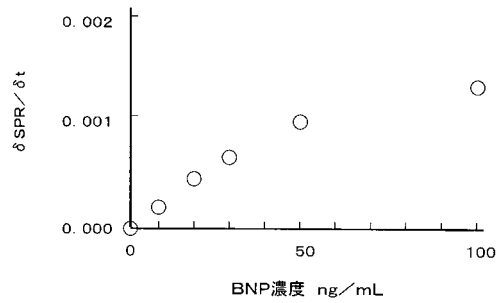
50

【図2】 図2は各BNP濃度に対するSPR角の変化速度を示す。

【図1】



【図2】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/553

(72)発明者 松浦 宏昭
茨城県つくば市東1 - 1 - 1 独立行政法人産業技術総合研究所つくばセンター内

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特開平03 - 164195 (J P , A)
特開2004 - 257996 (J P , A)
特開2005 - 054101 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3
G 0 1 N 2 1 / 2 7
G 0 1 N 3 3 / 5 3
G 0 1 N 3 3 / 5 5 3

专利名称(译)	表面等离子共振法免疫分析		
公开(公告)号	JP4487049B2	公开(公告)日	2010-06-23
申请号	JP2005067857	申请日	2005-03-10
申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
当前申请(专利权)人(译)	先进工业科学和技术研究院		
[标]发明人	栗田 僚二 丹羽 修 佐藤 縁 水谷 文雄 松浦 宏昭		
发明人	栗田 僚二 丹羽 修 佐藤 縁 水谷 文雄 松浦 宏昭		
IPC分类号	G01N33/543 G01N21/27 G01N33/53 G01N33/553		
FI分类号	G01N33/543.595 G01N33/543.545.S G01N33/543.565.U G01N21/27.C G01N33/53.D G01N33/553 G01N21/41.101		
F-TERM分类号	2G059/AA01 2G059/BB12 2G059/CC16 2G059/DD01 2G059/EE12		
其他公开文献	JP2006250720A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种方法，可以方便，快速，高度灵敏地测量生物体中存在的极其微量的分子。解决方案：在量化样品中测量分子的方法中，通过将针对测量分子的抗体与胆碱酯酶偶联产生的酶标记抗体与样品混合以引起抗原-抗体反应，然后将酶标记抗体的胆碱酯酶活性混合。使用表面等离子体共振方法测量与测量的分子偶联的酶或未与其偶联的酶标记的抗体。Z

【图 2】

