

(19) 日本国特許庁(JP)

再 公 表 特 許(A1)

(11) 国際公開番号

WO2007/032266

発行日 平成21年3月19日(2009.3.19)

(43) 国際公開日 平成19年3月22日(2007.3.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	2 G O 5 4
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 D	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

出願番号	特願2007-535440 (P2007-535440)	(71) 出願人	503360115
(21) 国際出願番号	PCT/JP2006/317832		独立行政法人科学技術振興機構
(22) 国際出願日	平成18年9月8日(2006.9.8)		埼玉県川口市本町4丁目1番8号
(31) 優先権主張番号	特願2005-264394 (P2005-264394)	(71) 出願人	504173471
(32) 優先日	平成17年9月12日(2005.9.12)		国立大学法人 北海道大学
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)		北海道札幌市北区北8条西5丁目8番地
		(74) 代理人	100107984
			弁理士 廣田 雅紀
		(72) 発明者	齋藤 健太
			日本国北海道札幌市北区北12条西6丁目
			国立大学法人北海道大学電子科学研究所内
		(72) 発明者	坂田 啓司
			日本国北海道札幌市東区北14条東1丁目
			5-10-602

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法を用いた抗原の迅速検出法

(57) 【要約】

蛍光相関分光法(FCS)又は蛍光相互相関分光法(FCCS)を用いた抗原の検出法において、特に、試料中の抗原の濃度が不明な場合において、抗原試料中の任意の濃度の抗原を、検出試薬と検出抗原の濃度比を多段階に検討することなく、迅速に検出する方法を提供するものである。検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを検出試薬として用いたFCS又はFCCSによる抗原の検出法において、(1) 検出試薬のみを加える系列と、(2) 3量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を調製して、蛍光分光分析を行い、該(1)及び(2)の場合における検出器からの3量体検出信号の有無により、検出試料中の抗原の有無を迅速に検出する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを検出試薬として用いた蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の検出法において、(1) 検出試薬のみを加える系列と、(2) 3 量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を調製して、蛍光分光分析を行い、該(1)及び(2)の場合における検出器からの3 量体検出信号の有無により、検出試料中の抗原の有無を検出することを特徴とする蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の迅速検出法。

10

【請求項 2】

3 量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬の添加が、予め、蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、検出する抗原、及び、非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片との解離定数 K_d を求め、3 量体の濃度が最大になる検出試薬と抗原の濃度比を設定し、該濃度比に基づいて、設定された抗原と検出試薬の添加量によって行われることを特徴とする請求項 1 記載の抗原の迅速検出法。

【請求項 3】

抗原の検出法が、検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体を用いた蛍光相関分光法であることを特徴とする請求項 1 記載の抗原の迅速検出法。

20

【請求項 4】

抗原の検出法が、検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを用いた蛍光相互相関分光法であることを特徴とする請求項 1 記載の抗原の迅速検出法。

【請求項 5】

検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片が、該抗原を免疫原として作製されたモノクローナル抗体から調製されたものであり、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片が、検出する抗原を免疫原として作製されたモノクローナル抗体或いは該抗体から調製されたものであることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか記載の抗原の迅速検出法。

30

【請求項 6】

(1) 被検試料に、検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを検出試薬として添加して、抗原抗体反応を行わせ、形成された抗原抗体 3 量体を、蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法により検出する工程、及び、(2) 被検試料に、予め 3 量体の濃度が最大になる前記検出試薬と抗原の濃度比から求めた、3 量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加え、抗原抗体反応を行わせ、形成された抗原抗体 3 量体を、蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法により検出する工程とを含み、両工程における 3 量体検出信号の有無を組合わせて、被検試料中の抗原の有無を判定することを特徴とする蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の迅速検出法。

40

【請求項 7】

被検試料が、生体タンパク質試料であり、検出する抗原が病原性タンパク質抗原であることを特徴とする請求項 6 記載の抗原の迅速検出法。

【請求項 8】

病原性タンパク質抗原が、異常型プリオンであることを特徴とする請求項 7 記載の抗原の迅速検出法。

【請求項 9】

50

被検試料が、食品素材であり、検出する抗原が食品素材中に含まれる有害タンパク質抗原であることを特徴とする請求項6記載の抗原の迅速検出法。

【請求項10】

蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の検出が、被検試料に含まれる抗原の物理的な分離過程を経ることなく行われることを特徴とする請求項6～9のいずれか記載の抗原の迅速検出法。

【請求項11】

(1) 検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とからなる検出試薬、及び、(2) 3量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬とを装備した、蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の迅速検出用キット。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光相関分光法(FCS)又は蛍光相互相関分光法(FCCS)を用いた抗原の迅速検出法、特に、試料中の任意の濃度の抗原を、検出試薬と検出抗原の濃度比を多段階に検討することなく、蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法を用いて、迅速に検出する方法に関する。

【背景技術】

20

【0002】

近年、天然物由来の食品素材や飼料素材の利用に際して、それらの素材中に含まれる有害タンパク質や、病原性タンパク質等の存在が問題となっている。有害タンパク質としては、例えば、ソバ、小麦、米等の食品素材に含有され問題となっているアレルゲンタンパク質等が挙げられ、病原性タンパク質としては、例えば、食肉、肉骨粉の原料に含まれ問題となっている異常型プリオン(感染型)のような病原性タンパク質等が挙げられる。例示して説明すれば、近年問題となっている病原性タンパク質の代表的な例として挙げられる異常型プリオンは、牛海綿状脳症(BSE)に代表されるプリオン病の原因となるタンパク質である。動物の脳や神経細胞膜表面に通常存在する正常型のプリオンタンパク質は分子量約3.3～3.5万(33～35kDa)の糖タンパク質であり、感染型プリオン蛋白として脳内の細胞内に蓄積されているものである(Lait, 76:571-578, 1996)。異常型プリオンは、動物体内に侵入すると、体内の特定部位で生産される正常型プリオンを異常型プリオンに変換し、その結果、それらの特定部位において異常型プリオンが蓄積する。脳に異常型プリオンが蓄積すると、脳がスポンジ状になり、動物は死に至る。

30

【0003】

このような食品素材や飼料素材の利用に際して、それらの素材中に含まれるアレルゲンタンパク質のような有害タンパク質や、病原性タンパク質を、ヒトや動物が摂取することを防止するためには、該食品素材や飼料素材に含まれるアレルゲンタンパク質のような有害タンパク質や、病原性タンパク質を検知、測定し、それらの有害タンパク質や、病原性タンパク質を含むものの利用を防止する必要がある。

40

【0004】

従来より、プリオン(異常型)のような天然の生体タンパク質の測定には、ELISA(固相酵素免疫検定法)やウェスタンブロット法(イムノブロット法)のような免疫測定法が用いられている。しかし、例えば、ELISAやウェスタンブロット法のような従来法でプリオンの検出、測定を行うには、従来法では正常型プリオンと異常型プリオンを区別して検出するために、まず、被検試料から予め正常型プリオンをプロテインアーゼKで処理し、分解、除去しておくような処理を行っておく必要がある。また、ウェスタンブロット法は、電気泳動を行う必要があり、煩雑で時間がかかるので、多数の試料を短時間に検査しようとするためには適していないという問題がある。更に、ELISAは、必要な感度を達成するために、例えば、プロテインアーゼK処理後の試料をグアニジンチオシア

50

ン酸で変性処理し、プリオンタンパク質の凝集状態を解除する前に、SDSによる一次変性処理及びメタノール処理によるタンパク質濃縮操作を行う必要があり、該メタノール処理の前及びグアニジンチオシアン酸処理の前にはそれぞれ遠心分離を行う必要があり、そして、該遠心分離操作は時間がかかり、該方法はこのような煩雑な処理を行わなければならないことから、多数の試料を短時間に検査しようとするためには適していないという問題がある。

【0005】

そこで、これらのプリオンの検出、測定に用いられているELISAやウェスタンブロット法の問題を改善するために、最近、いくつかの方法が提案されている。例えば、特開平10-267928号公報には、異常プリオンタンパク質を高感度に検出するために、抗プリオンタンパク質抗体を用い、該抗体を任意のDNA断片で標識して、該DNA断片をPCRにより検出するイムノPCR法が開示されている。また、特開2003-130880号公報には、従来法のELISAやウェスタンブロット法の時間のかかる電気泳動操作や遠心分離操作を行うことなく高感度に異常型プリオンを免疫測定する方法として、磁性粒子に、変性剤処理した異常型プリオンと抗原抗体反応する第1抗体又はその抗原結合性フラグメントを不動化して異常型プリオン免疫測定試薬として用いる方法が開示されている。

【0006】

しかし、これらの方法は、従来法のELISAやウェスタンブロット法を改良するものであるが、依然として、各種の処理を経なければならず、プリオンのような抗原タンパク質を、簡便かつ迅速に検出、測定するには必ずしも十分なものではない。また、これらの検出、測定方法は、該検出、測定のための処理工程を、自動或いは半自動的にを行い、大量の試料の測定を行うには適した方法とはいえない。

【0007】

一方、近年、特に生物由来の分子の解析等に多く用いられ、例えば、タンパク質分子の数や、大きさ、或いは形等の物理量を、試料の物理的な分離過程を経ずに、しかも、ほぼ実時間で検出、測定できる分析法として蛍光相関分光法(FCS: Fluorescence Correlation Spectroscopy)が知られている(Chem. Phys., 4, 390-401, 1974; Biopolymers, 13, 1-27, 1974; Physical Rev. A, 10: 1938-1945, 1974; in Topics in Fluorescence Spectroscopy, 1, pp. 337-378, Plenum Press, New York and London, 1991; R. Rigler, E. S. Elson (Eds.), Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and Applications, Springer, Berlin, 2001)。FCSは、蛍光で標識した標的分子の媒質中におけるブラウン運動をレーザー共焦点顕微鏡系により微小領域で捉えることによって、蛍光強度のゆらぎから拡散時間を解析し、標的分子の物理量(分子の数、大きさ)を測定することにより実行されるもので、このような微小な領域で分子ゆらぎを捕えるFCSによる解析は、高感度、特異的に分子間相互作用を検出する上で有効な手段となっている。

【0008】

すなわち、FCSによる測定では、共焦点光学系を用いることにより、試料中の微小領域(直径 約400 nm, 軸長 約2 μ m, 体積 $\sim 10^{-16}$ L)の蛍光強度を検出することが出来る。この領域は開放系であるため、分子が領域内を出入りし、分子数に応じた蛍光強度のゆらぎが生じる。このゆらぎは、分子数の増加に伴い平均化されて小さくなり、分子の拡散速度の増加に伴い速くなる。これを相関関数を使って解析し、分子の数と大きさに関する情報を得ることが出来る。FCSによる測定では、分子に関する情報を実時間で分離精製を経ずに分析することが可能であるため、膨大な試料からの微量な標的分子のスクリーニングが可能である。FCS測定を、生体試料中に含まれるタンパク質等の検出、測定に用いた場合の特徴としては、溶液に含まれる蛍光で標識した標的分子の濃度や分子間相互作用を物理的な分離過程を経ずにほぼ実時間でモニタできることにある。そのため、FCSを用いた検出系では、これまで生体分子の検出系の主流として用いられてきたELISAなどの分析手段で必要であった煩雑なBound/Free分離過程を省くことができ、したがって、短時間に多量のサンプルを高感度で測定することが可能であり、自動化

測定にも向いている。

【0009】

ところで、FCSを用いて、抗原タンパク質等の検出を行うには、蛍光標識化した抗体分子を用い、該蛍光標識化抗体と抗原タンパク質との抗原抗体反応を利用して、該蛍光標識化抗体と、該蛍光標識化抗体と抗原タンパク質との抗原抗体反応によって形成された抗原抗体複合体分子の有する形状及びその分子量に依存する拡散速度の差を利用して、分析が行われる。ここで、拡散速度（拡散定数又はD）とは、単位時間に分子が自由拡散する面積のことをいう。他方、拡散時間（Diffusion Time: (DT) または τ_D ）とは、装置によって決まる焦点領域内を分子が通過するのに要する時間のことをいう。

【0010】

従って、FCSによって、試料中の抗原タンパク質等の正確な測定を行うためには、標識化抗体の拡散速度と、該標識化抗体と抗原タンパク質との抗原抗体反応によって形成される抗原抗体複合体の拡散速度との間に有意な差を生じさせるような抗原と抗体の組み合わせを用いる必要がある。したがって、従来、この必要性のため、FCSにより検出できる抗原タンパク質等の種類は非常に限られていた。この問題を解決する手段として、従来、抗原と抗体との形状及び分子量を考慮して抗原抗体複合体に対して種々の修飾を施し、拡散速度に有意な差を設けるといことが行われていた（特開2001-272404号公報、特許第3517241号公報）。しかし、これらの方法を用いても、FCSの検出方法を適用検出対象には限度があった。

【0011】

近年、蛍光分光法を用いた物質の検出測定法として、FCSとともに蛍光相互相関分光法(Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy: FCCS)が知られている(Biophysical Journal, 72:1878-1886, 1997; Current Pharmaceutical Biotechnology, 5:199-204, 2004)。FCCS測定では、2種類のレーザーと2個の検出器を用いることにより、試料中の微小領域の2種類の蛍光強度を検出することが出来る。この信号を相互相関関数を使って解析し、2種類の信号の相関性をみる事が出来る。FCCS測定では、相互に相関がある信号のみの解析を行うため、FCS測定よりも約一桁高感度であることが実証されている。FCCSを用いた抗原の検出においては、抗原の分子量に関係なく(1) 蛍光標識抗体と(2) 異なるエピトープ部位を認識する蛍光標識抗体を用いることが必要である。

【0012】

ところで、FCSやFCCS測定を用いて、物質の検出、測定を行う場合に、通常は、試料中の被検出物質の濃度が不明の場合が多い。しかし、FCSやFCCS測定を用いて、蛍光標識化物質と被検出物質との結合を検出し、被検出物質の測定を行う場合には、蛍光標識化物質と被検出物質との適正濃度割合が設定されないと、正確な被検出物質の検出、測定が行えないという問題がある。したがって、試料中の被検出物質の濃度が不明の場合には、多段階希釈を行い、被検出物質の有無を検討する必要があった（特開2005-43317号公報；特開2005-98876号公報）。その結果、測定に時間を要することとなり、したがって、従来、このような場合には、FCSやFCCS測定を用いても、迅速な検出、測定が難しいという問題があった。しかし、これまで有効な対策は成されていないのが現状であった。

【0013】

【特許文献1】 特開平10-267928号公報。

【特許文献2】 特開2001-272404号公報。

【特許文献3】 特開2003-130880号公報。

【特許文献4】 特開2005-43317号公報。

【特許文献5】 特開2005-98876号公報。

【特許文献6】 特許第3517241号公報。

【非特許文献1】 Lait, 76:571-578, 1996

【非特許文献2】 Chem. Phys., 4, 390-401, 1974。

10

20

30

40

50

【非特許文献 3】 Biopolymers, 13, 1-27, 1974。

【非特許文献 4】 Physical Rev. A, 10: 1938-1945, 1974。

【非特許文献 5】 in Topics in Fluorescence Spectroscopy, 1, pp. 337-378, Plenum Press, New York and London, 1991。

【非特許文献 6】 R. Rigler, E. S. Elson (Eds.), Fluorescence Correlation Spectroscopy. Theory and Applications, Springer, Berlin, 2001。

【非特許文献 7】 Biophysical Journal, 72: 1878-1886, 1997。

【非特許文献 8】 Current Pharmaceutical Biotechnology, 5: 199-204, 2004。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

10

【0014】

本発明の課題は、蛍光相関分光法 (FCS) 又は蛍光相互相関分光法 (FCCS) を用いた抗原の検出法において、特に、試料中の抗原の濃度が不明な場合において、抗原試料中の任意の濃度の抗原を、検出試薬と検出抗原の濃度比を多段階に検討することなく、FCS 又は FCCS を用いて、迅速に検出する方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明者は、生体タンパク質試料中における病原性タンパク質抗原や、食品素材に含まれる有害タンパク質抗原を、抗原抗体反応を利用して、FCS 又は FCCS を用いて、迅速に検出する方法を鋭意検討する中で、(1) 蛍光標識した抗体等の検出試薬のみを加える系列と、(2) 抗原及び抗体からなる 3 量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を調製して、蛍光分光分析を行い、該 (1) 及び (2) の場合における検出器からの 3 量体検出信号の有無により、検出試料中の抗原の有無を検出することにより、試料中の抗原の濃度が不明な場合において、抗原試料中の任意の濃度の抗原を、検出試薬と検出抗原の濃度比を多段階に検討することなく、FCS 又は FCCS を用いて、迅速に検出することが可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

20

【0016】

すなわち、本発明は、検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを検出試薬として用いた FCS 又は FCCS による抗原の検出法において、(1) 検出試薬のみを加える系列と、(2) 3 量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を調製して、蛍光分光分析を行い、該 (1) 及び (2) の場合における検出器からの 3 量体検出信号の有無により、検出試料中の抗原の有無を迅速に検出することからなる。

30

【0017】

本発明において、上記 (2) の「3 量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列」を調製するには、予め、蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、検出する抗原、及び、非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片との解離定数 K_d を求め、3 量体の濃度が最大になる検出試薬と抗原の濃度比を設定し、該濃度比に基づいて、「3 量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列」を調製する。

40

【0018】

本発明の抗原の迅速検出法は、本発明者が先に開発して、特許出願した「FCS による抗原の迅速検出及び／又は測定法。」、すなわち、抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体を用いて、試料中の抗原を、簡便な操作で、迅速かつ正確に検出及び／又は測定する蛍光相関分光法 (FCS) による抗原の迅速検出及び／又は測定法 (特願 2004-166440 号) に、有利に適用することができる。また、本発明の抗原の迅速検出法は、抗原の異なるエピトープをそれぞれ標的とする蛍光標識化された蛍光標識抗体或いは蛍光標識抗体断片を用いた蛍光相互相関分光法 (FCCS) による抗原の検出にも適用するこ

50

とができる。

【0019】

以下に、本発明のFCS又はFCCSによる抗原の迅速検出法の原理について説明する：

【0020】

(FCSによる測定)

FCS測定では、共焦点光学系を用いることにより、試料中の微小領域（直径 約400 nm，軸長 約2 μ m、体積 $\sim 10^{-16}$ L）の蛍光強度を検出することが出来る。この領域は開放系であるため、分子が領域内を出入りし、分子数に応じた蛍光強度のゆらぎが生じる。このゆらぎは、分子数の増加に伴い平均化されて小さくなり、分子の拡散速度の増加に伴い速くなる。これを相関関数を使って解析し、分子の数と大きさに関する情報を得ることが出来る。FCS測定では、分子に関する情報を実時間で分離精製を経ずに分析することが可能であるため、膨大な試料からの微量な標的分子のスクリーニングが可能である。

【0021】

FCSを用いた抗原検出は、蛍光標識した抗体が抗原を捕捉することによって分子量が増し、その結果共焦点領域を通過する速度が遅延することを利用している。任意の分子量の抗原を対象にした場合、抗原に対して異なるエピトープ部位を認識する（1）蛍光標識抗体断片と（2）抗体を用いることが必要である（図1）。この場合、後記（抗原検出法とその問題点）の項で説明するように、抗原の濃度が極めて高い場合もまた抗原なしと同様の結果を生じ、その3量体の濃度が低くなって、その検出に問題を生じる。

【0022】

(FCCSによる測定)

FCCS測定では、2種類のレーザーと2個の検出器を用いることにより、試料中の微小領域の2種類の蛍光強度を検出することが出来る。この信号を相互相関関数を使って解析し、2種類の信号の相関性をみることが出来る。FCCS測定では、相互に相関がある信号のみの解析を行うため、FCS測定よりも約一桁高感度であることが実証されている。FCCSを用いた抗原検出は、抗原の分子量に関係なく（1）蛍光標識抗体と（2）異なるエピトープ部位を認識する蛍光標識抗体を用いることが必要である（図2）。この場合、後記（抗原検出法とその問題点）の項で説明するように、FCS測定と同様、抗原の濃度が極めて高い場合もまた抗原なしと同様の結果を生じ、その3量体の濃度が低くなって、その検出に問題を生じる。

【0023】

(FCS及びFCCSを用いた抗原検出法における問題点)

試料からFCSを用いて分子量の制限なく抗原を検出する場合、抗原に対して異なるエピトープ部位を認識する（1）蛍光標識抗体断片と（2）抗体を用いる。また、FCSよりも高感度化が期待されるFCCSを用いて抗原を検出する場合は、（1）蛍光標識抗体と（2）異なるエピトープ部位を認識する蛍光標識抗体を用いる。どちらの場合も、抗体および抗体断片を用いて試料中の抗原をサンドイッチ状に捕捉し、その3量体を検出することになる（図1、2）。

【0024】

これらの方法を用いた場合、抗原の濃度が低い場合は3量体の濃度が低くなるが、抗原の濃度が極めて高い場合もまた3量体の濃度が低くなる（図3）。したがって、抗原の濃度が不明である場合、擬陰性を避けるために各試料に対して多段階希釈を行い抗原の有無を検討する必要が生じる。その結果、測定の迅速性は大幅に減少する。

【0025】

(抗原の迅速検出法の原理)

FCS及びFCCSを用いた抗原検出法における上記問題点を解決するために本発明では次のような方法を採用する。すなわち、予め抗原と抗体断片等の解離定数 K_d 値が分かれば、3量体の濃度が最大になる検出試薬と抗原の濃度比を導出することが可能である。そ

れに基づき、各試料に対して（１）検出試薬のみを加える系列と、（２）３量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を調製する。

【００２６】

検出結果に対しては、＜（１）：信号なし、（２）：信号あり＞の場合は陰性に、＜（１）：信号あり、（２）：信号あり＞或いは＜（１）：信号あり、（２）：信号なし＞の場合は陽性に、＜（１）：信号なし、（２）：信号なし＞の場合は陽性と判定される。本発明の方法の使用により、試料中の任意の濃度の抗原に対して、検査に供する試料中の抗原の濃度を適切な濃度に調整する必要、或いは、多段階的な濃度に調製する必要がなくなり、試料中の任意の濃度の抗原に対する迅速な検出が可能になる。

【００２７】

本発明の抗原の迅速検出法は、生体タンパク質試料における病原性タンパク質抗原、特に、異常型プリオンの検出に、或いは、食品素材中に含まれる有害タンパク質抗原の検出等に有効に使用することができる。

【００２８】

すなわち具体的には本発明は、[１]検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを検出試薬として用いた蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の検出法において、（１）検出試薬のみを加える系列と、（２）３量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を調製して、蛍光分光分析を行い、該（１）及び（２）の場合における検出器からの３量体検出信号の有無により、検出試料中の抗原の有無を検出することを特徴とする蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の迅速検出法や、[２]３量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬の添加が、予め、蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、検出する抗原、及び、非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片との解離定数 K_d を求め、３量体の濃度が最大になる検出試薬と抗原の濃度比を設定し、該濃度比に基づいて、設定された抗原と検出試薬の添加量によって行われることを特徴とする上記[１]記載の抗原の迅速検出法や、[３]抗原の検出法が、検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体を用いた蛍光相関分光法であることを特徴とする上記[１]記載の抗原の迅速検出法からなる。

【００２９】

また本発明は、[４]抗原の検出法が、検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを用いた蛍光相互相関分光法であることを特徴とする上記[１]記載の抗原の迅速検出法や、[５]検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片が、該抗原を免疫原として作製されたモノクローナル抗体から調製されたものであり、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片が、検出する抗原を免疫原として作製されたモノクローナル抗体或いは該抗体から調製されたものであることを特徴とする上記[１]～[４]のいずれか記載の抗原の迅速検出法や、[６]（１）被検試料に、検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを検出試薬として添加して、抗原抗体反応を行わせ、形成された抗原抗体３量体を、蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法により検出する工程、及び、（２）被検試料に、予め３量体の濃度が最大になる前記検出試薬と抗原の濃度比から求めた、３量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加え、抗原抗体反応を行わせ、形成された抗原抗体３量体を、蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法により検出する工程とを含み、両工程における３量体検出信号の有無を組合わせて、被検試料中の抗原の有無を判定することを特徴とする蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の迅速検出法からなる。

【0030】

さらに本発明は、[7]被検試料が、生体タンパク質試料であり、検出する抗原が病原性タンパク質抗原であることを特徴とする上記[6]記載の抗原の迅速検出法や、[8]病原性タンパク質抗原が、異常型プリオンであることを特徴とする上記[7]記載の抗原の迅速検出法や、[9]被検試料が、食品素材であり、検出する抗原が食品素材中に含まれる有害タンパク質抗原であることを特徴とする上記[6]記載の抗原の迅速検出法や、[10]蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の検出が、被検試料に含まれる抗原の物理的な分離過程を経ることなく行われることを特徴とする上記[6]～[9]のいずれか記載の抗原の迅速検出法や、[11](1)検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とからなる検出試薬、及び、(2)3量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬とを装備した、蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の迅速検出用キットからなる。

10

【図面の簡単な説明】

【0031】

【図1】本発明のFCSを用いた抗原の迅速検出法の説明において、蛍光標識抗体断片と非蛍光標識化完全型抗体と抗原とで、3量体を形成した場合の模式図である。

【図2】本発明のFCCSを用いた抗原の迅速検出法の説明において、蛍光標識抗体と蛍光標識抗体と抗原とで、3量体を形成した場合の模式図である。

【図3】本発明のFCS及びFCCSを用いた抗原の迅速検出法の説明において、抗原の濃度が低い場合、或いは、抗原の濃度が極めて高い場合に、抗体と抗原とで、3量体を形成する状況について説明した模式図である。

20

【図4】本発明の実施例において、各濃度の抗原に対して(1)検出試薬のみを加えた系列と、(2)検出試薬と適量の抗原を加えた系列を調製して、抗体と抗原との3量体を検出し、抗原に対しての陰性又は陽性を判定した結果を示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0032】

本発明の蛍光相関分光法(FCS)又は蛍光相互相関分光法(FCCS)による抗原の迅速検出法は、検出する抗原のエピトープを標的とする蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、該抗原の他のエピトープを標的とする非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識化された蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片とを検出試薬として用いた蛍光相関分光法又は蛍光相互相関分光法による抗原の検出法において、(1)検出試薬のみを加える系列と、(2)3量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を調製して、蛍光分光分析を行い、該(1)及び(2)の場合における検出器からの3量体検出信号の有無により、検出試料中の抗原の有無を検出することからなる。

30

【0033】

本発明において、3量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬の添加は、予め、蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、検出する抗原、及び、非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片との解離定数 K_d を求め、3量体の濃度が最大になる検出試薬と抗原の濃度比を設定し、該濃度比に基づいて、設定された抗原と検出試薬の添加量によって行うことができる。

40

【0034】

すなわち、本発明を実施するには、予め、蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片と、検出する抗原、及び、非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識完全型抗体或いは蛍光標識抗体断片との解離定数 K_d を求め、3量体の濃度が最大になる検出試薬と抗原の濃度比を設定し、該濃度比に基づいて、設定された抗原と検出試薬の添加量によって、(1)検出試薬のみを加える系列と、(2)3量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を調製して、蛍光分光分析を行い、該(1)及び(2)の場合における検出器からの3量体検出信号の有無により、検出試料中の抗原の有無を検出することによって行うことができる。

50

【0035】

(3量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列の調製)

予め、濃度既知の抗原、例えば、組換え牛プリオンタンパク質を用いた滴定曲線から、3量体の濃度が最大となる抗原の濃度を求め、この濃度の抗原を加えた(2)検出試薬と抗原を加えた系列と、抗原を加えない(1)検出試薬のみを加えた系列を調製し、濃度未知の試料中の抗原の有無を検出する。

【0036】

(抗タンパク質抗体の調製)

本発明においては、検出試薬として用いる蛍光標識抗体、蛍光標識抗体断片及び非蛍光標識化完全型抗体を調製するために、抗原に特異的に結合する抗体を調製する。本発明において用いられる、抗原に特異的に結合する抗体としては、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体等を挙げることができるが、その中でもモノクローナル抗体がその特異性の点でより好ましい。かかる抗原に対する抗体を調製するには、まず、検出する抗原を精製し、取得する。該抗原は、公知の精製手段を用いて供与源から単離・精製して調製することができ、また、抗原が抗原タンパク質で該抗原タンパク質のアミノ酸配列が公知であれば、遺伝子工学的的手法により、微生物や動物細胞等を用いて該抗原タンパク質を産生させ、精製して取得することもできる。可能な場合は、該抗原タンパク質を、ペプチドの化学合成法により調製することができる。ペプチドの化学合成は公知の合成手段を採用することができる。例えば、アジド法、酸クロライド法、酸無水物法、混合酸無水物法、DCC法、活性エステル法、カルボイミダゾール法、酸化還元法等が挙げられる。

【0037】

該抗原に対する抗体を調製するには、該抗原を用い、慣用のプロトコルを用いて、動物又は植物に感作させ、調製する。例えばモノクローナル抗体の調製には、連続細胞系の培養物により産生される抗体をもたらす、ハイブリドーマ法 (Nature 256, 495-497, 1975)、トリオーマ法、ヒトB細胞ハイブリドーマ法 (Immunology Today 4, 72, 1983) 及びEBV-ハイブリドーマ法 (MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, pp.77-96, Alan R.Liss, Inc., 1985) など任意の方法を用いることができる。

【0038】

抗原タンパク質のような抗原のモノクローナル抗体を調製するには、例えば、該抗原タンパク質を抗原として、ラット、マウス、ウサギなどの哺乳動物に投与し、感作する。必要に応じてフロイント完全アジュバント(FCA)、フロイント不完全アジュバント(FIA)等のアジュバントを用いることもできる。免疫は、主として静脈内、皮下、腹腔内に注入することにより行われる。また、免疫の間隔は特に限定されず、数日から数週間間隔で、1~10回の免疫を行う。そして、最終の免疫日から1~60日後に抗体産生細胞を採集する。抗体産生細胞としては、脾臓細胞、リンパ節細胞、末梢血細胞等が挙げられる。ハイブリドーマを得るため、抗体産生細胞とミエローマ細胞との細胞融合を行う。抗体産生細胞と融合させるミエローマ細胞として、一般に入手可能な株化細胞を使用することができる。使用する細胞株としては、薬剤選択性を有し、未融合の状態ではHAT選択培地(ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジンを含む)で生存できず、抗体産生細胞と融合した状態でのみ生存できる性質を有するものが用いられる。

【0039】

細胞融合処理後の細胞から目的とするハイブリドーマを選別する。樹立したハイブリドーマからモノクローナル抗体を採取する方法として、通常の細胞培養法又は腹水形成法等を採用することができる。上記抗体の採取方法において抗体の精製が必要とされる場合は、硫酸塩析法、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過、アフィニティークロマトグラフィーなどの公知の方法を適宜選択して、又はこれらを組み合わせることにより精製することができる。

本発明においては、本発明において用いる抗原タンパク質の抗体としては、上記のようにして調製されるものの他、既に調製されている市販の抗体がある場合には、該抗体を用いることができる。

【0040】

(蛍光標識抗体及び蛍光標識抗体断片の調製)

本発明の抗原の迅速検出法においては、抗原と抗原抗体反応を行い検出するための検出試薬として、該抗原から調製された蛍光標識抗体及び蛍光標識抗体断片が用いられる。本発明において、蛍光標識抗体及び蛍光標識抗体断片の調製に用いられる抗体は、同じく本発明において用いられる非蛍光標識化完全型抗体又は蛍光標識抗体或いは蛍光標識抗体断片とはその結合する抗原のエピトープが異なる抗体が選択される。該蛍光標識抗体又は蛍光標識抗体断片の調製には、抗原の完全型抗体或いは完全型抗体をペプシンやババインのような酵素で断片化し、これを2-メルカプトメチルアミン或いは2-メルカプトエタノール等で還元して単量体とした後、標識化して調製する。該標識化には、蛍光色素が用いられ、例えばフルオレセインイソチオシアネート(FITC)、Alexa532のような蛍光色素が用いられる。 10

【0041】

(FCSによる検出、測定)

本発明の抗原の迅速検出及び／又は測定法においては、被検試料に、検出試薬として蛍光標識抗体断片及び非蛍光標識化完全型抗体を添加し、混合して、抗原抗体反応を行った被検試料を、FCSにより抗原の検出及び／又は測定を行う。FCSは、溶液中の蛍光分子のブラウン運動を利用し、分子の「大きさ」や「数」といった物理量を得る方法である。FCSの特徴は、溶液に含まれる蛍光分子の濃度や分子間相互作用を物理的な分離過程を経ずにほぼ実時間でモニタできることにある。そのため、FCSを用いた検出系では、これまで主流となっていた生体分子検出系(例えばELISAなど)で必要であった煩雑なBound/Free分離過程を省くことができる。従って、短時間に多量のサンプルを高感度に、かつ自動的に測定することが可能となる。FCSは、各種のものが知られているが、本発明においては、本発明の検出、測定対象の検出、測定のために障害となることがない限り、いずれの方法も用いることができる(蛋白質 核酸 酵素、Vol. 44, No. 9, 1431-1438, 1999; バイオインダストリー 4月号、p. 52-59, 2003; 特開2001-272404号公報; 特許第3517241号公報)。 20

【0042】

(FCCSによる検出、測定)

FCCSは、各種のものが知られているが、本発明においては、本発明の検出、測定対象の検出、測定のために障害となることがない限り、いずれの方法も用いることができる(Biophysical Journal, 72,1878-1886,1997; Current Pharmaceutical Biotechnology, 5, 199-204,2004; Biochem. Biophys. Res. Comm., 329, 1200-1207, 2005; 特表2001-517800号公報)。 30

【0043】

以下、実施例により本発明をより具体的に説明するが、本発明の技術的範囲はこれらの例示に限定されるものではない。

【実施例1】

【0044】

(材料と方法)

FCS及びFCCS測定用装置として、MF20(オリンパス社製)を用いた。測定用のプレートは、N101(日本油脂)でブロッキング処理した384穴プレート(オリンパス社製)を用いた。検出用試薬は、Alexa488-抗プリオン抗体(1.0E-10M)、Alexa633-抗プリオン抗体(1.0E-10M)を用いた。抗原は、組換え牛プリオン蛋白質を用いた。各濃度の抗原に対して(1)検出試薬のみを加えた系列と、(2)検出試薬と適量の抗原を加えた系列を調製した。 40

【0045】

(検出試薬と適量の抗原を加えた系列の調製)

「(1) 検出試薬のみを加えた系列」から、3量体の濃度が最大となる抗原の濃度が約4.8 nMと求められ、この濃度になるように抗原と検出試薬を試料に加え、「(2) 検出 50

試薬と抗原を加えた系列」として調製した。

【0046】

(抗原の検出)

各濃度の抗原に対して(1)検出試薬のみを加えた系列と、(2)検出試薬と適量の抗原を加えた系列を調製した。検出試薬と抗原を所定の濃度になるようにプレートに入れた後、ピペットで攪拌した。37℃で1時間放置した後、レーザーパワーを488nmは100μW、633nmは100μWとして、60秒間の3回測定を行った。解析は、MF20付属のソフトウェアを用いて、分子数をはじめとする各種パラメータを導いた。

【0047】

(結果)

10

結果を、図4に示す。図4中のグラフの横軸は抗原濃度を示し、縦軸は全蛍光分子に対する3量体の割合を示している。現在、FCCSでの検出限界値は約 5×10^{-10} Mであるため、プリオン蛋白質の濃度が 5×10^{-10} M以下の試料を陰性と仮定している。また、陰性コントロールの信号強度に基づき、本データでは約2%以下を信号なしとしている。新たに所定量の抗原を加えてない場合は[図中の(-) PrP]、抗原濃度が1~10 nMのときは、抗原と2種類の標識抗体の分子数が等しいため、3量体の割合が高くなっている(図4、黒色点)。しかし、抗原の濃度が低い場合は3量体の割合が低くなり、抗原の濃度が高い場合もまた3量体の割合が低くなる(図4、黒色点)。したがって、抗原の濃度が高い場合も、陰性と判定される。

【0048】

20

一方、3量体の割合が最大となる濃度の抗原をあらかじめ加えておいた場合は[図中の(+) PrP]、抗原の濃度が低い場合は3量体の割合が高くなり、抗原の濃度が高い場合は3量体の割合が低くなる(図4、灰色点)。この場合には、抗原の濃度が高い場合を真の陰性と区別できる。したがって、各試料に対して(1)検出試薬のみを加える系列と、(2)3量体の濃度が最大になる抗原と検出試薬を加える系列を組み合わせれば、陰陽を分別可能である。つまり、<(1):信号なし、(2):信号あり>の場合は陰性、<(1):信号あり、(2):信号あり>あるいは<(1):信号あり、(2):信号なし>の場合は陽性、<(1):信号なし、(2):信号なし>の場合は陽性、と判定可能である。

。

【産業上の利用分野】

30

【0049】

最近、異常型プリオンタンパク質等の病原性タンパク質や有害タンパク質などの検出が、社会的に要請されている。変性剤処理した異常型プリオン蛋白質を検出する方法として、現在、ウェスタンブロット法やELISA法などが使用されているが、ウェスタンブロット法では煩雑で時間のかかる電気泳動を行わなければならない、また、ELISA法ではシグナル増幅や洗浄操作を必要とする。そこで、FCS及びFCCSによる抗原検出は、関連する分野で行われている抗原検出方法と比べてステップ数が少ないため迅速であり、自動化に適している。また、測定のための試料体積は数μl~数十μlであることから、検出試薬が少なく経済的である。したがって、FCS及びFCCSによる抗原検出法を、病原性タンパク質抗原や有害タンパク質の検出に用いることは極めて効果的である。

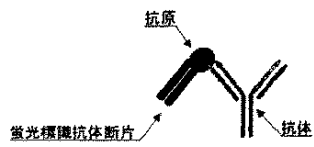
40

【0050】

しかしながら、FCS及びFCCSによる抗原検出法を用いて濃度不明の試料から抗原を検出する場合、擬陰性を避けるために、検査に供する試料中の抗原の濃度を適切な濃度にするか、或いは、各試料に対して多段階的な濃度に調整する必要がある、多段階希釈を行う必要があった。その結果として、測定の迅速性は大幅に減少した。そこで、本発明の検出法は、この問題を解決し、濃度不明の試料に対し、多段階希釈法を行うことなく、FCS及びFCCSによる迅速検出法を可能とした。本発明の検出法は、ステップ数が少なく、迅速、簡便な検査法であり、全自動化システムへの適用が可能であり、現在、社会問題化している牛海綿状脳症(BSE)の検査をはじめ、抗原抗体反応に基づく食品、医薬品、化粧品などの検査への適用が期待できるものである。

50

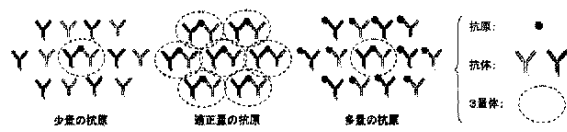
【图 1】



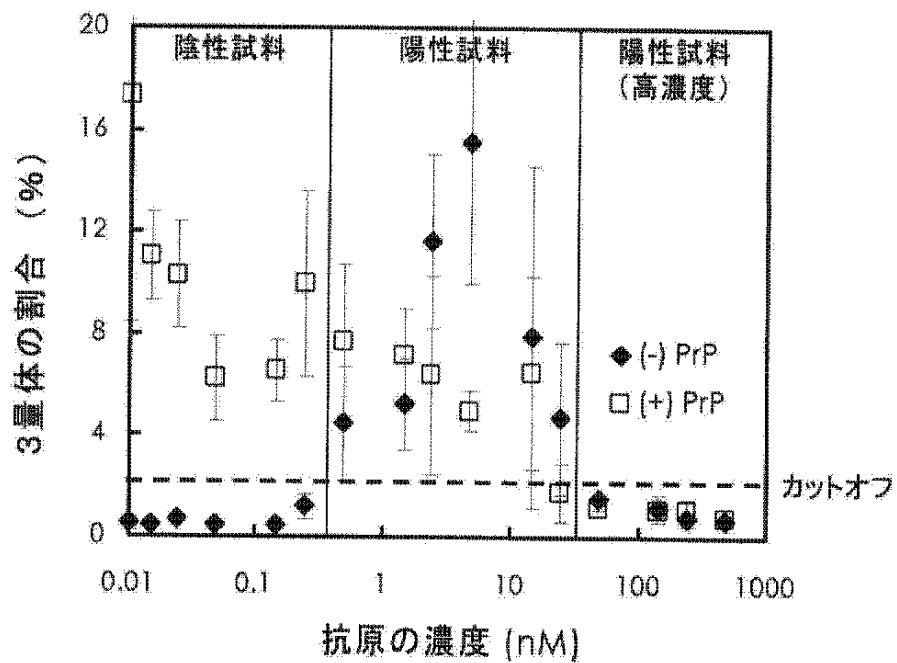
【图 2】



【図 3】



【图 4】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2006/317832
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/536(2006.01)i, G01N21/78(2006.01)i, G01N33/558(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/536, G01N21/78, G01N33/558 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 1996-2006 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2006 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2006 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JMEDPlus (JDream2)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Keiji SAKATA, "Shinkei Hensei Shikkan Kenkyu no Saizensen Keiko Soka Bunkoho (FCS) o Mochiita Kogen Kotai Hanno Kaiseki Oyobi Kentai Kenshutsu", BIO INDUSTRY, Vol.21, No.4, 2004, pages 52 to 59	1-11
A	Etsuko KOGUN, "BSE no Zen Jido Kensa Sochi Ikita Ushi kara Prions o Toraeru", JST News, Vol.1, No.5, 2005.02, pages 10 to 11	1-11
A	FOELDES-PAPP Z, Ultrasensitive detection and identification of fluorescent molecules by FCS: Impact for immunobiology, PNAS, Vol.98, No.20, 2001, Page.11509-11514	1-11
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ 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 04 October, 2006 (04.10.06)		Date of mailing of the international search report 17 October, 2006 (17.10.06)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2006/317832

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	GIESE A, Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases, Archives of Virology, Supplement 16, 2000, Page.161-171	1-11
A	JP 2005-172460 A (Olympus Corp.), 30 June, 2005 (30.06.05), (Family: none)	1-11
A	JP 2001-194305 A (Laboratory of Molecular Biophotonics), 19 July, 2001 (19.07.01), (Family: none)	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 7 8 3 2													
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C)) Int.Cl. G01N33/536 (2006.01)i, G01N21/78 (2006.01)i, G01N33/558 (2006.01)i															
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (I P C)) Int.Cl. G01N33/536, G01N21/78, G01N33/558															
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>1971-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2006年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2006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	1971-2006年	日本国実用新案登録公報	1996-2006年	日本国登録実用新案公報	1994-2006年				
日本国実用新案公報	1922-1996年														
日本国公開実用新案公報	1971-2006年														
日本国実用新案登録公報	1996-2006年														
日本国登録実用新案公報	1994-2006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) JMEDPlus (JDream2)															
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 請求の範囲の番号													
A	坂田啓司, 神経変性疾患研究の最前線 蛍光相関分光法 (F C S) を用いた抗原抗体反応解析および検体検出, BIO INDUSTRY, Vol. 21, No. 4, 2004, Page. 52-59	1-11													
A	古郡悦子, B S E の全自動検査装置 生きた牛からプリオンをとらえる, JST News, Vol. 1, No. 5, 2005.02, Page. 10-11	1-11													
☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。 ☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。															
<table border="0"> <tr> <td>* 引用文献のカテゴリー</td> <td>の日の後に公表された文献</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「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)</td> <td>「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</td> </tr> <tr> <td>「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献</td> <td>「&」同一パテントファミリー文献</td> </tr> <tr> <td>「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願</td> <td></td> </tr> </table>				* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献	「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの	「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの	「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの	「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献	「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	
* 引用文献のカテゴリー	の日の後に公表された文献														
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの	「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの														
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの	「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの														
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)	「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの														
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献														
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願															
国際調査を完了した日 04.10.2006		国際調査報告の発送日 17.10.2006													
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (I S A / J P) 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) 竹中 靖典 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 3312												

様式 PCT / I S A / 2 1 0 (第2ページ) (2005年4月)

国際調査報告

国際出願番号 PCT/J P 2 0 0 6 / 3 1 7 8 3 2

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 請求の範囲の番号
A	FOELDES-PAPP Z, Ultrasensitive detection and identification of fluorescent molecules by FCS: Impact for immunobiology, PNAS, Vol.98, No.20, 2001, Page.11509-11514	1-11
A	GIESE A, Putting prions into focus: application of single molecule detection to the diagnosis of prion diseases, Archives of Virology, Supplement 16, 2000, Page.161-171	1-11
A	J P 2 0 0 5 - 1 7 2 4 6 0 A (オリンパス株式会社) 2 0 0 5 . 0 6 . 3 0 (ファミリーなし)	1-11
A	J P 2 0 0 1 - 1 9 4 3 0 5 A (株式会社分子バイオホトニクス研究所) 2 0 0 1 . 0 7 . 1 9 (ファミリーなし)	1-11

フロントページの続き

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

(72)発明者 藤井 文彦

日本国大阪府豊中市桜の町3-11-2-203

(72)発明者 金城 政孝

日本国北海道札幌市北区北10条西8丁目国立大学法人北海道大学 大学院先端生命科学研究院内

(72)発明者 田村 守

日本国北海道札幌市北区北21条西11丁目国立大学法人北海道大学 大学院先端生命科学研究院
附属ポストゲノム研究センター内

Fターム(参考) 2G054 AA06 AB04 BB10 CA23 CE02 EA01

(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)	利用荧光相关光谱法或荧光互相关光谱法快速检测抗原		
公开(公告)号	JPWO2007032266A1	公开(公告)日	2009-03-19
申请号	JP2007535440	申请日	2006-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 国立大学法人北海道大学		
申请(专利权)人(译)	独立行政法人科学技术振兴机构 北海道大学		
[标]发明人	齋藤健太 坂田啓司 藤井文彦 金城政孝 田村守		
发明人	齋藤 健太 坂田 啓司 藤井 文彦 金城 政孝 田村 守		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/536 G01N33/582 G01N33/6896 G01N2021/6439 G01N2800/2828		
FI分类号	G01N33/543.575 G01N33/53.D G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB04 2G054/BB10 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA01		
优先权	2005264394 2005-09-12 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

在使用荧光相关光谱 (FCS) 或荧光互相关光谱法 (FCCS) 抗原的检测方法，特别是，在的情况下的样品中的抗原的浓度未知时，样品中的抗原的任何浓度的抗原，不考虑所检测到的抗原和在多个阶段中的检测试剂的浓度比，提供了一种用于快速检测的方法。和荧光标记的荧光标记的完整抗体或荧光标记的抗体片段与抗原的表位来检测目标，所述抗原的荧光其它表位是非荧光标记的完整抗体或荧光标记的靶标在标记通过使用荧光标记的抗体片段作为检测试剂或FCS FCCS完整抗体或抗原的检测 (1) 的一系列只添加检测试剂， (2) 二聚物的3抗原浓度被最大化并准备了一系列添加检测试剂，进行荧光光谱法，从所述检测器中的 (1) 和 (2) 中，不存在快速抗原检测的情况下的样品中存在或不存在的三聚体的检测信号的据检测。

【図 4】

