

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2025年1月2日(02.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/004524 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/543 (2006.01) C12Q 1/42 (2006.01)
C12Q 1/32 (2006.01) C12Q 1/6816 (2018.01)
C12Q 1/34 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/016641

(22) 国際出願日: 2024年4月30日(30.04.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

特願 2023-108447 2023年6月30日(30.06.2023) JP

(71) 出願人: 学校法人早稲田大学 (WASEDA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1698050 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 伊藤悦朗(ITO Etsuro); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP). 伊波伽奈子(IHA

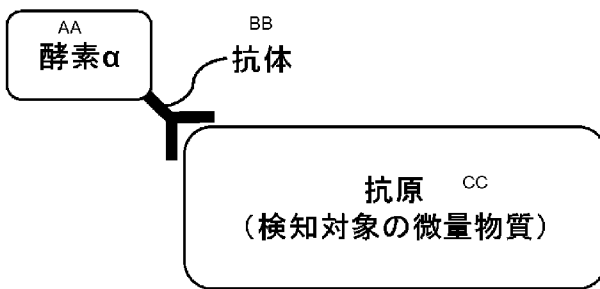
Kanako); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP). 佐藤朱音(SATO Akane); 〒1698050 東京都新宿区戸塚町1丁目104番地 学校法人早稲田大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 速水進治(HAYAMI Shinji); 〒1410031 東京都品川区西五反田7丁目9番2号 KDX五反田ビル9階 Tokyo (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK,

(54) Title: METHOD FOR ANALYZING TRACE SUBSTANCE, AND TRACE SUBSTANCE ANALYSIS KIT

(54) 発明の名称: 微量物質の分析方法および微量物質分析用キット



AA Enzyme α
BB Antibody
CC Antigen (trace substance being detected)

(57) Abstract: A method for analyzing a trace substance, the method comprising: a step A for binding, to the trace substance, an enzyme-labeled antibody comprising an antibody specific to the trace substance and an enzyme α, or an enzyme-labeled nucleic acid probe comprising a nucleic acid probe specific to the trace substance and the enzyme α; a step B for allowing the enzyme α in the enzyme-labeled antibody or the enzyme α in the enzyme-labeled nucleic acid probe to act on a compound β that is a substrate for the enzyme α to produce a compound γ that is a substrate for a dehydrogenase; a step C for producing a polymerized thio-NAD(P)H through an enzymatic cycling reaction using the produced compound γ, a dehydrogenase, NAD(P)H, and the polymerized thio-NAD(P); and a step D for detecting the trace substance with the polymerized thio-NAD(P)H generated.

SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA,
UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(57) 要約: 微量物質の分析方法であって、前記微量物質に、前記微量物質に特異的な抗体と酵素 α とからなる酵素標識抗体、または、前記微量物質に特異的な核酸プローブと酵素 α とからなる酵素標識核酸プローブを結合させる工程Aと、前記酵素標識抗体の前記酵素 α 、または、前記酵素標識核酸プローブの前記酵素 α を、前記酵素 α の基質である化合物 β に作用させ、デヒドロゲナーゼの基質である化合物 γ を生成させる工程Bと、生成した前記化合物 γ と、デヒドロゲナーゼと、NAD(P)Hと、ポリマー化チオNAD(P)と、を用いて、酵素サイクリング反応により、ポリマー化チオNAD(P)Hを生成させる工程Cと、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hにより、前記微量物質を検知する工程Dと、を含む、微量物質の分析方法。

明 細 書

発明の名称： 微量物質の分析方法および微量物質分析用キット

技術分野

[0001] 本発明は、微量物質の分析方法および微量物質分析用キットに関する。

背景技術

[0002] タンパク質や核酸などの生体高分子を高感度に分析する方法として、酵素免疫測定法、ならびに、サザンブロット法、ノーザンブロット法およびウエスタンブロット法などの核酸プローブ測定法などが挙げられる。これらの分析方法においては、検出感度の向上が求められており、様々な検討がおこなわれてきた。

[0003] 特許文献1では、酵素免疫測定法または核酸プローブ測定法と酵素サイクリング法を組み合わせ、シグナル物質としてのチオNAD(P)Hを幾何級数的に増幅することで、検出感度を向上させることが検討された。

[0004] 特許文献1には、抗体酵素複合体を用いる酵素測定方法であって、抗体酵素複合体の酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび／またはNADPH、チオNADおよび／またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび／またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび／またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオNADHおよび／またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う、前記方法が開示されている。

また、特許文献1には、酵素標識核酸プローブを用いる核酸プローブ測定方法であって、酵素標識核酸プローブの酵素による反応生成物の定量は、NADHおよび／またはNADPH、チオNADおよび／またはチオNADP、並びにデヒドロゲナーゼ(DH)を用いて、酵素サイクリング反応によりチオNADHおよび／またはチオNADPHを生成させ、生成したチオNADHおよび／またはチオNADPHの量を測定するか、または生成したチオ

NADHおよび／またはチオNADPHによる色の変化を計測することで行う、前記方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：国際公開第2008／117816号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Lindberg M, Larsson PO, Mosbach K. A new immobilized NAD + analogue, its application in affinity chromatography and as a functioning coenzyme. Eur J Biochem. 1973 Dec 3;40(1):187-93.

非特許文献2：Muramatsu M, Urabe I, Yamada Y, Okada H. Synthesis and kinetic properties of a new NAD⁺ derivative carrying a vinyl group. Eur J Biochem. 1977 Oct 17;80(1):111-7.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1に記載された測定方法においては、酵素サイクリング反応で生成したチオNAD(P)Hが検知されるまでに要する時間の短縮が求められている。

[0008] 本発明は、酵素サイクリング反応で生成したチオNAD(P)Hが検知されるまでに要する時間を短縮することが可能な分析方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0009] すなわち、本発明によれば、以下に示す微量物質の分析方法および微量物質分析用キットが提供される。

1. 微量物質の分析方法であって、

前記微量物質に、前記微量物質に特異的な抗体と酵素 α とからなる酵素標識抗体、または、前記微量物質に特異的な核酸プローブと酵素 α とからなる酵素標識核酸プローブを結合させる工程Aと、

前記酵素標識抗体の前記酵素 α 、または、前記酵素標識核酸プローブの前

記酵素 α を、前記酵素 α の基質である化合物 β に作用させ、デヒドロゲナーゼの基質である化合物 γ を生成させる工程Bと、

生成した前記化合物 γ と、デヒドロゲナーゼと、NAD(P)Hと、ポリマー化チオNAD(P)と、を用いて、酵素サイクリング反応により、ポリマー化チオNAD(P)Hを生成させる工程Cと、

生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hにより、前記微量物質を検知する工程Dと、

を含む、微量物質の分析方法。

2. 前記微量物質が抗原であり、

前記工程Aにおいて、前記抗原に、前記酵素標識抗体を結合させる、1.に記載の微量物質の分析方法。

3. 前記抗原に特異的な抗体を担持させた担体上でおこなわれる、2.に記載の微量物質の分析方法。

4. 前記抗原が存在する生体組織切片上でおこなわれる、2.に記載の微量物質の分析方法。

5. 前記抗原が存在する膜上でおこなわれる、2.に記載の微量物質の分析方法。

6. 前記抗原がタンパク質抗原である、2.～5.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

7. 前記微量物質が核酸であり、

前記工程Aにおいて、前記核酸に、前記酵素標識核酸プローブを結合させる、1.に記載の微量物質の分析方法。

8. 前記工程Dにおいて、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hを定量分析する、1.～7.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

9. 前記工程Dにおいて、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hを吸光度により定量分析する、8.に記載の微量物質の分析方法。

10. 前記工程Dにおいて、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hを定性分析する、1.～7.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

11. 前記工程Dにおいて、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hを目視により定性分析する、10.に記載の微量物質の分析方法。

12. 前記ポリマー化チオNAD(P)が、N⁶-カルボキシメチルーチオNAD由来の構造を含む、1.～11.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

13. 前記ポリマー化チオNAD(P)が、アクリルアミド由来の構造を含む、1.～12.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

14. 前記酵素 α が、EC番号2.-で表される転移酵素群、EC番号3.-で表される加水分解酵素群、EC番号4.-で表される除去付加酵素群およびEC番号5.-で表される異性化酵素群からなる群から選択される一種又は二種以上を含む、1.～13.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

15. 前記酵素 α がアルカリホスファターゼを含む、14.に記載の微量物質の分析方法。

16. 前記化合物 β がアンドロステロン骨格を有する化合物を含む、1.～15.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

17. 前記デヒドロゲナーゼがヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを含む、1.～16.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

18. 前記化合物 γ がアンドロステロン骨格を有する化合物を含む、1.～17.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

19. 前記ポリマー化チオNAD(P)の数平均分子量が 1.0×10^4 以上 1.0×10^9 以下である、1.～18.のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

20. 測定対象の微量物質に特異的な抗体と酵素 α とからなる酵素標識抗体、または、前記微量物質に特異的な核酸プローブと酵素 α とからなる酵素標識核酸プローブと、

前記酵素 α の基質である化合物 β と、

デヒドロゲナーゼと、

- NAD (P) Hと、
ポリマー化チオNAD (P) と、
を含む微量物質分析用キット。
21. 前記微量物質が抗原であり、
前記酵素標識抗体を含む、20. に記載の微量物質分析用キット。
22. 前記抗原に特異的な抗体を担持させた担体上で用いられる、21. に記載の微量物質分析用キット。
23. 前記抗原が存在する生体組織切片上で用いられる、21. に記載の微量物質分析用キット。
24. 前記抗原が存在する膜上で用いられる、21. に記載の微量物質分析用キット。
25. 前記抗原がタンパク質抗原である、21. ～24. のいずれかに記載の微量物質分析用キット。
26. 前記微量物質が核酸であり、
前記酵素標識核酸プローブを含む、20. に記載の微量物質分析用キット。
27. 前記ポリマー化チオNAD (P) が、N⁶-カルボキシメチルーチオNAD由来の構造を含む、20. ～26. のいずれかに記載の微量物質分析用キット。
28. 前記ポリマー化チオNAD (P) が、アクリルアミド由来の構造を含む、20. ～27. のいずれかに記載の微量物質分析用キット。
29. 前記酵素 α が、EC番号2. -で表される転移酵素群、EC番号3. -で表される加水分解酵素群、EC番号4. -で表される除去付加酵素群およびEC番号5. -で表される異性化酵素群からなる群から選択される一種又は二種以上を含む、20. ～28. のいずれかに記載の微量物質分析用キット。
30. 前記酵素 α がアルカリホスファターゼを含む、29. に記載の微量物質分析用キット。

31. 前記化合物βがアンドロステロン骨格を有する化合物を含む、20.～30.のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

32. 前記デヒドロゲナーゼがヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを含む、20.～31.のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

33. 前記ポリマー化チオNAD(P)の数平均分子量が 1.0×10^4 以上 1.0×10^9 以下である、20.～32.のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

発明の効果

[0010] 本発明によれば、酵素サイクリング反応で生成したチオNAD(P)Hが検知されるまでに要する時間を短縮することが可能な分析方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]分析対象の微量物質が抗原である場合の工程Aを示す模式図である。

[図2]分析対象の微量物質が核酸である場合の工程Aを示す模式図である。

[図3]工程Bを示す模式図である。

[図4]工程Cを示す模式図である。

[図5]実施例1と比較例1の経時の吸光度変化を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明を実施形態に基づいて説明する。

[0013] 本実施形態において、数値範囲が段階的に記載されている場合、各数値範囲の上限及び下限は任意に組み合わせることができる。

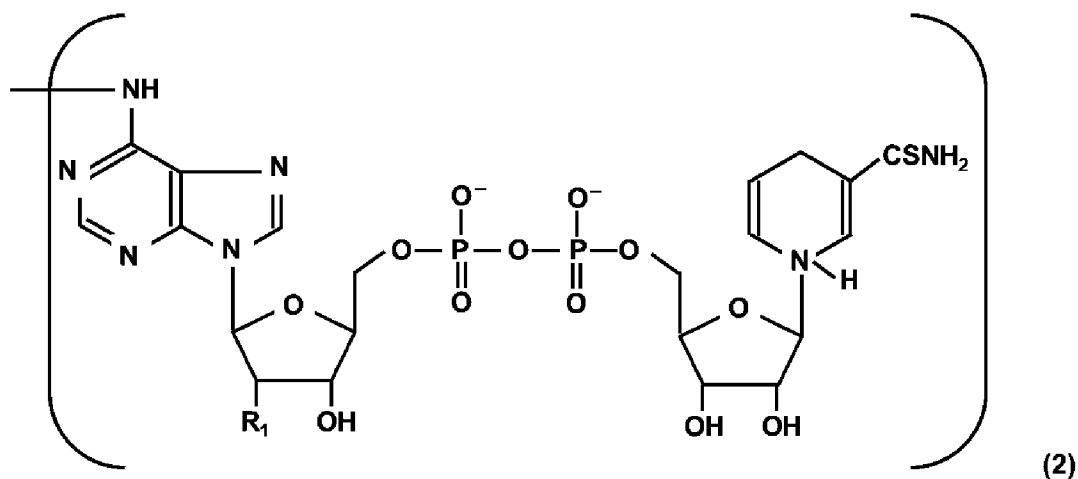
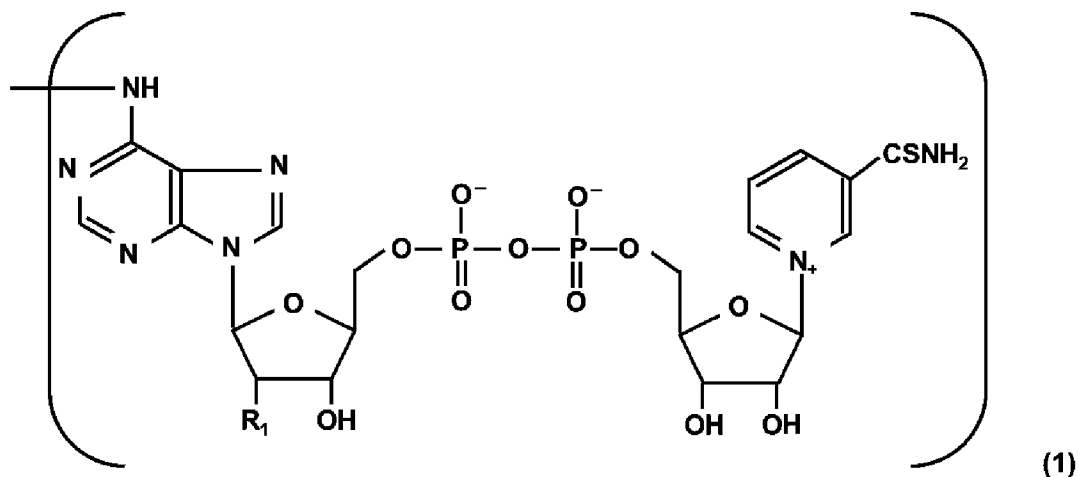
[0014] 本実施形態において、NAD(P)はNADおよび／またはNADPを意味し、NAD(P)HはNADHおよび／またはNADPHを意味する。

[0015] 本実施形態において、チオNAD(P)はチオNADおよび／またはチオNADPを意味し、チオNAD(P)HはチオNADHおよび／またはチオNADPHを意味する。

[0016] 本実施形態において、ポリマー化チオNAD(P)は、下記の一般式(1)で表されるチオNAD(P)由来のユニット(以下、チオNAD(P)ユ

ニットと呼ぶ)を含むポリマーを意味し、ポリマー化チオNAD(P)Hは、下記の一般式(2)で表されるチオNAD(P)H由来のユニット(以下、チオNAD(P)Hユニットと呼ぶ)を含むポリマーを意味する。

[0017] [化1]



[0018] 一般式(1)および(2)において、 R_1 はヒドロキシ基またはリン酸基である。

一般式(1)において R_1 がヒドロキシ基である場合、一般式(1)はチオNADユニットを表す。

一般式(1)において R_1 がリン酸基である場合、一般式(1)はチオNADPユニットを表す。

一般式(2)において R_1 がヒドロキシ基である場合、一般式(2)はチオNADHユニットを表す。

一般式（２）において R_1 がリン酸基である場合、一般式（２）はチオ $NAD(P)H$ ユニットを表す。

[0019] [微量物質の分析方法]

以下、本実施形態の微量物質の分析方法について説明する。

[0020] 本実施形態の微量物質の分析方法は、前記微量物質に、前記微量物質に特異的な抗体と酵素 α とからなる酵素標識抗体、または、前記微量物質に特異的な核酸プローブと酵素 α とからなる酵素標識核酸プローブを結合させる工程Aと、前記酵素標識抗体の前記酵素 α 、または、前記酵素標識核酸プローブの前記酵素 α を、前記酵素 α の基質である化合物 β に作用させ、デヒドロゲナーゼの基質である化合物 γ を生成させる工程Bと、生成した前記化合物 γ と、デヒドロゲナーゼと、 $NAD(P)H$ と、ポリマー化チオ $NAD(P)H$ と、を用いて、酵素サイクリング反応により、ポリマー化チオ $NAD(P)H$ を生成させる工程Cと、生成した前記ポリマー化チオ $NAD(P)H$ により、前記微量物質を検知する工程Dと、を含む。

[0021] まず、本実施形態の微量物質の分析方法の各工程について説明する。

[0022] 工程Aについて、分析対象の微量物質が抗原である場合と分析対象の微量物質が核酸である場合に分けて説明する。

分析対象の微量物質が抗原である場合、分析対象である抗原に特異的に結合する抗体と酵素 α からなる酵素標識抗体を用意し、図1に示すように、当該酵素標識抗体の抗体を分析対象である抗原に結合させる。

分析対象の微量物質が核酸である場合、分析対象である核酸に特異的に結合する核酸プローブと酵素 α からなる酵素標識核酸プローブを用意し、図2に示すように、当該酵素標識核酸プローブの核酸プローブを分析対象である核酸に結合させる。

[0023] 工程Bでは、図3に示すように、酵素標識抗体の酵素 α 、または、酵素標識核酸プローブの酵素 α を酵素 α の基質である化合物 β に作用させ、デヒドロゲナーゼの基質である化合物 γ を生成させる。

[0024] 工程Cでは、図4に示すように、生成した化合物 γ と、デヒドロゲナーゼ

と、NAD(P)Hと、ポリマー化チオNAD(P)と、を用いて、酵素サイクリング反応により、ポリマー化チオNAD(P)Hを生成させる。

具体的には、還元型の化合物 γ が酵素サイクリング反応の起点となる場合、まず、還元型の化合物 γ が酸化され酸化型の化合物 γ が生成する。この際、ポリマー化チオNAD(P)からポリマー化チオNAD(P)Hが生成される。そして、酸化型の化合物 γ がデヒドロゲナーゼにより還元され還元型の化合物 γ が生成する。この際、NAD(P)HからNAD(P)が生成される。これで酵素サイクリングの1サイクルが完結する。ポリマー化チオNAD(P)とNAD(P)Hが供給される限り、このサイクルが繰り返され、ポリマー化チオNAD(P)Hが増幅される。

[0025] 工程Dでは、工程Cで増幅されたポリマー化チオNAD(P)Hにより分析対象の微量物質を検知する。工程Cでポリマー化チオNAD(P)Hが増幅されるため、分析対象が微量であっても高感度の分析をおこなうことができる。

[0026] 本実施形態の微量物質の分析方法によると、酵素サイクリング反応で生成したチオNAD(P)Hが検知されるまでに要する時間を短縮できる。時間短縮のメカニズムは明らかではないが、以下のメカニズムにより時間短縮が可能になると推測される。

まず、チオNAD(P)Hによる微量物質の検知について説明すると、チオNAD(P)Hにより微量物質を検知する場合、チオNAD(P)Hが一定以上の濃度にならないと検知をおこなうことができない。そのため、チオNAD(P)Hがプレート上や生体組織上で拡散しやすいと、検知をおこなう地点においてチオNAD(P)Hの濃度が一定以上になるまでに時間がかかってしまう。

本実施形態の微量物質の分析方法においては、ポリマー化したチオNAD(P)を用いる。そのため、プレート上や生体組織上における拡散が抑制されると考えられ、チオNAD(P)Hの濃度が一定以上になるまでに要する時間が短縮されることが考えられる。これにより、微量物質が検知されるまでに

要する時間が短縮され则认为られる。

[0027] 以下、本実施形態の微量物質の分析方法のうち、酵素標識抗体を用いる場合について説明する。

[0028] 酵素標識抗体を用いる場合、図1に示すように、酵素標識抗体の抗体を分析対象の微量物質である抗原に結合させる。

[0029] 微量物質の分析をおこなう場所は特に限定されず、例えば、抗原に特異的な抗体を担持させた担体上でおこなわれる。

抗原に特異的な抗体を担持させた担体上でおこなわれる分析方法としては、例えば、酵素免疫測定法（ELISA法）を挙げることができる。ELISA法は、抗体を担持させた担体に試料溶液をアッセイし、試料溶液中の抗原を抗体で捕捉することにより、抗原の検出および定量をおこなう手法である。

抗体を担持させる担体は特に限定されず、例えば、マイクロプレート、プラスチックチューブまたは磁気ビーズ等を用いることができる。

[0030] 微量物質の分析をおこなう場所は特に限定されず、例えば、抗原が存在する生体組織切片上でおこなわれる。

抗原が存在する生体組織切片上でおこなわれる分析方法としては、例えば、免疫組織化学染色法（IHC法）を挙げることができる。IHC法は、生体切片上で生体内原位置（*in situ*）の抗原を視覚化する手法である。IHC法には、生体組織の解剖学的、構造的情報を保持したまま解析できるという特長があり、生体組織のどの区画に抗原が局在するかを解析できる。

[0031] 微量物質の分析をおこなう場所は特に限定されず、例えば、抗原が存在する膜上でおこなわれる。

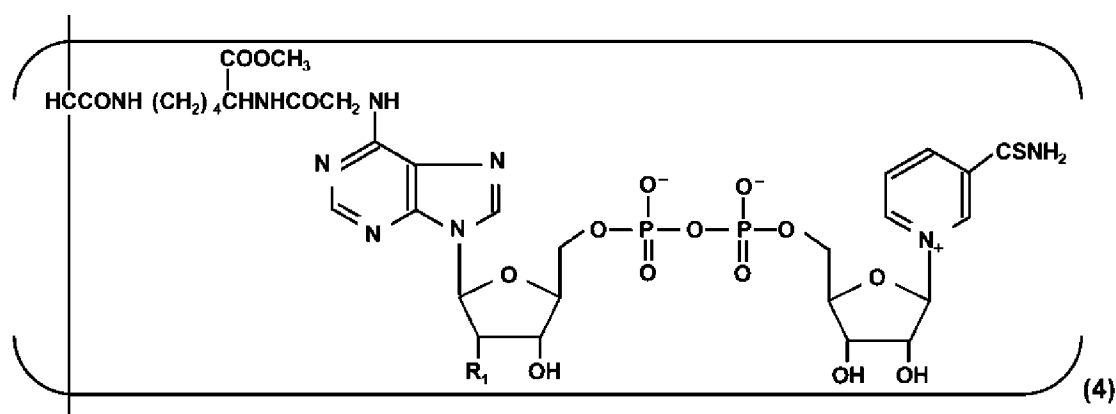
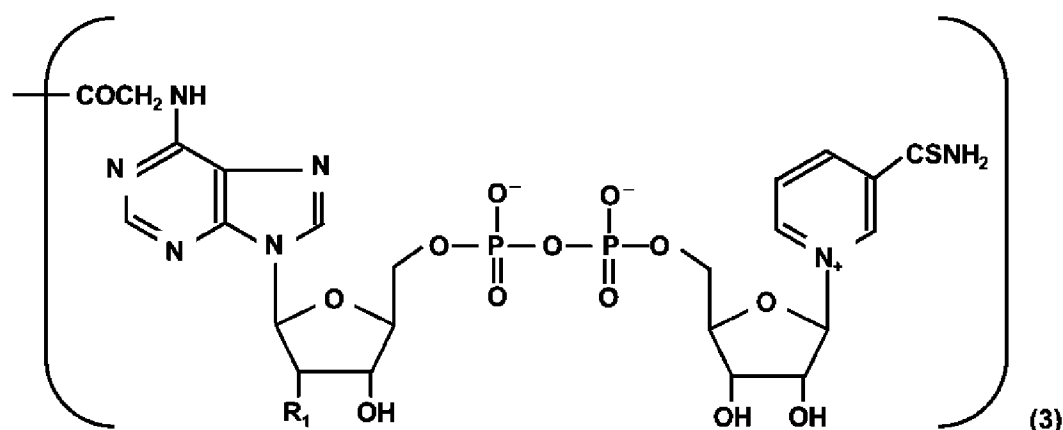
抗原が存在する膜上でおこなわれる分析方法としては、例えば、ウェスタンブロット法を挙げることができる。ウェスタンブロット法は、電気泳動によって分離したタンパク質を膜に転写し、分析対象のタンパク質に特異的な抗体によりそのタンパク質の検出および定量をおこなう手法である。

- [0032] 抗原の種類は特に限定されず、酵素標識抗体と結合できるものであればよく、例えば、タンパク質、糖、脂質、ペプチドまたは生体に免疫応答を引き起こす低分子化合物であり、好ましくはタンパク質である。ここで、タンパク質および糖には、脂質および／または核酸が結合した、タンパク質および糖も含まれる。
- [0033] 以下、本実施形態の微量物質の分析方法のうち、酵素標識核酸プローブを用いる場合について説明する。
- [0034] 酵素標識核酸プローブを用いる場合、図2に示すように、酵素標識核酸プローブの核酸プローブを分析対象の微量物質である核酸に結合させる。
- [0035] 分析対象の微量物質である核酸に酵素標識核酸プローブの核酸プローブが結合する分析方法としては、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法を挙げることができる。サザンブロット法およびノーザンブロット法は、電気泳動によって分離した核酸を膜に転写し、分析対象の核酸に特異的な核酸プローブによりその核酸の検出および定量をおこなう手法である。サザンブロット法の分析対象はDNAであり、ノーザンブロット法の分析対象はRNAである。
- [0036] 工程Dでは生成したポリマー化チオNAD(P)Hを検知する。検知方法は特に限定されず、例えば、生成したポリマー化チオNAD(P)Hを定量分析してもよい。
- [0037] ポリマー化チオNAD(P)Hの定量分析の方法は特に限定されず、例えば、吸光度により定量分析することができる。なお、ポリマー化チオNAD(P)Hは可視域に吸収を示すため（極大吸収波長：400nm、モル吸光係数＝11,900）、例えば、普及型の吸光光度計や比色測定用マイクロプレートリーダーを用いて測定できる。
- [0038] 工程Dでは生成したポリマー化チオNAD(P)Hを検知する。検知方法は特に限定されず、例えば、生成したポリマー化チオNAD(P)Hを定性分析してもよい。
- [0039] ポリマー化チオNAD(P)Hの定性分析の方法は特に限定されず、例え

ば、生成したポリマー化チオNAD（P）Hを目視により定性分析することができる。前述の通り、ポリマー化チオNAD（P）Hは可視域に吸収を示すため、目視による定性分析が可能である。

[0040] ポリマー化チオNAD（P）の構造は特に限定されないが、ポリマー化チオNAD（P）が下記的一般式（3）で表されるN⁶-カルボキシメチルーチオNAD由来の構造を含むことが好ましく、下記的一般式（4）で表されるチオNAD-N⁶-[N-（N-アクリロイル-1-メトシキカルボニル-5-アミノペンチル）-プロピオアミド]由来の構造を含むことがより好ましい。

[0041] [化2]



[0042] 一般式（3）および（4）において、R₁はヒドロキシ基またはリン酸基である。

[0043] ポリマー化チオNAD（P）の構造は特に限定されないが、ポリマー化チ

オ N A D (P) がアクリルアミド由来の構造を含むことが好ましい。

[0044] ポリマー化チオ N A D (P) の調製方法は特に限定されないが、非特許文献 1 および 2 に記載の方法を参考に調製することができる。

[0045] 酵素標識抗体または酵素標識核酸プローブの酵素 α は特に限定されないが、E C 番号 2. - で表される転移酵素群、E C 番号 3. - で表される加水分解酵素群、E C 番号 4. - で表される除去付加酵素群および E C 番号 5. - で表される異性化酵素群からなる群から選択される一種又は二種以上を含むことが好ましく、アルカリホスファターゼ (A L P) を含むことがより好ましい。

[0046] 化合物 β は酵素 α の基質となり得るものであれば特に限定されないが、後述するデヒドロゲナーゼとの組み合わせの観点から、アンドロステロン骨格を有する化合物を含むことが好ましく、A n d r o s t e r o n e 3 - p h o s p h a t e (A 3 P) を含むことがより好ましい。

[0047] 工程 C の酵素サイクリング反応で用いるデヒドロゲナーゼは特に限定されず、例えば、マレートデヒドロゲナーゼ、ラクテートデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、ガラクトースデヒドロゲナーゼ、 3α -ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼ (3α -H y d r o x y s t e r o i d d e h y d r o g e n a s e 、略称： 3α -H S D) 、ガラクトースデヒドロゲナーゼ、グルコースデヒドロゲナーゼ、テストステロン- 17β -デヒドロゲナーゼおよびグリセロール-3-ホスフェートデヒドロゲナーゼからなる群 X から選択される一種または二種以上を含み、反応速度向上の観点から、ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを含むことが好ましく、 3α -H S D を含むことがより好ましい。

[0048] デヒドロゲナーゼと化合物 β の組み合わせは特に限定されないが、反応速度向上の観点から、 3α -H S D とその基質となるアンドロステロン骨格を有する化合物の組み合わせが好ましい。

反応速度向上について具体例を挙げて説明すると、多くの脱水素酵素では、補酵素としてチオ N A D を用いた場合の反応速度が N A D を用いた場合の

数%以内であるのに対し、 3α -HSDによるアンドロステロンの脱水素反応では、チオNADでの反応速度がNADでの反応速度の約59%もあり、本実施形態に係るサイクリング反応の酵素として好ましい性質を有している。

アンドロステロン骨格を有する化合物の具体例としては、例えば、Androstosterone 3-phosphate (A3P)、アンドロステロン、 11β -ヒドロキシアンドロステロン、 11α -ヒドロキシアンドロステロン、エチオコラノロン、テトラヒドロコルチゾール、プレグナンジオール、リトコール酸、デオキシコレート、ケノデオキシコール酸およびコール酸などが挙げられる。

3α -HSDとアンドロステロン骨格を有する化合物の組み合わせの中でも、酵素標識抗体または酵素標識核酸プローブの酵素として汎用的なALPとの組み合わせが可能であるという観点から、A3Pと 3α -HSDの組み合わせが好ましい。

[0049] 化合物 γ はデヒドロゲナーゼを用いた酵素サイクリング反応の基質となり得るものであれば特に限定されない。そのため、還元型基質でも酸化型基質でもよい。

[0050] 本実施形態の微量物質の分析方法において、酵素 α 、化合物 β 、デヒドロゲナーゼの性質は特に限定されないが、以下の性質を持つことが好ましい。

標識酵素のターンオーバー数大きい。

市販および汎用されている標識酵素が使用できる。

酵素サイクリングのターンオーバー数大きい。

酵素サイクリング反応に使用する脱水素酵素に標識酵素のコンタミや標識酵素と同様の活性がない。

標識酵素の基質が市販の化合物であるか、または容易に合成ができ、かつ安定性が高い。

[0051] 本実施形態の微量物質の分析方法において、反応系中における酵素標識抗体または酵素標識核酸プローブの濃度は特に限定されないが、例えば1 nM

以上、好ましくは10 nM以上、より好ましくは20 nM以上であり、そして、例えば100 nM以下、好ましくは50 nM以下、より好ましくは40 nM以下である。

[0052] 本実施形態の微量物質の分析方法において、反応系中における化合物 β の濃度は特に限定されないが、例えば0.001 mM以上、好ましくは0.01 mM以上、より好ましくは0.05 mM以上、さらに好ましくは0.1 mM以上であり、そして、例えば500 mM以下、好ましくは100 mM以下、より好ましくは50 mM以下、さらに好ましくは10 mM以下、さらに好ましくは5 mM以下、さらに好ましくは1 mM以下、さらに好ましくは0.5 mM以下である。

[0053] 本実施形態の微量物質の分析方法において、反応系中におけるNAD(P)Hの濃度は特に限定されないが、例えば0.001 mM以上、好ましくは0.01 mM以上、より好ましくは0.05 mM以上、さらに好ましくは0.1 mM以上、さらに好ましくは0.5 mM以上、さらに好ましくは1.0 mM以上であり、そして、例えば500 mM以下、好ましくは100 mM以下、より好ましくは50 mM以下、さらに好ましくは10 mM以下、さらに好ましくは5 mM以下である。

[0054] 本実施形態の微量物質の分析方法において、反応系中におけるデヒドロゲナーゼの濃度は特に限定されないが、例えば0.01 U/mL以上5000 U/mL以下であり、S/N比（シグナル／ノイズ比）向上の観点から、好ましくは0.1 U/mL以上500 U/mL以下、より好ましくは1 U/mL以上100 U/mL以下、さらに好ましくは2 U/mL以上80 U/mL以下、さらに好ましくは5 U/mL以上60 U/mL以下、さらに好ましくは10 U/mL以上50 U/mL以下、さらに好ましくは20 U/mL以上40 U/mL以下である。

[0055] 本実施形態の微量物質の分析方法において、反応系中におけるチオNAD(P)ユニットの量は特に限定されないが、S/N比（シグナル／ノイズ比）向上の観点から、30 U/mLのデヒドロゲナーゼ溶液100 μ L、つま

り3 Uのデヒドロゲナーゼに対して、例えば $1.00 \times 10^3 \text{ mer}$ 以上 $1.00 \times 10^5 \text{ mer}$ 以下、好ましくは $2.00 \times 10^3 \text{ mer}$ 以上 $8.00 \times 10^4 \text{ mer}$ 以下、より好ましくは $5.00 \times 10^3 \text{ mer}$ 以上 $5.00 \times 10^4 \text{ mer}$ 以下、さらに好ましくは $7.00 \times 10^3 \text{ mer}$ 以上 $3.00 \times 10^4 \text{ mer}$ 以下、さらに好ましくは $1.50 \times 10^4 \text{ mer}$ 以上 $2.80 \times 10^4 \text{ mer}$ 以下、さらに好ましくは $2.00 \times 10^4 \text{ mer}$ 以上 $2.40 \times 10^4 \text{ mer}$ 以下である。

なお、本実施形態において、反応系中におけるチオNAD (P) ユニットの量は mer で表す。 mer は反応系中におけるチオNAD (P) ユニットの個数を表す単位であり、例えば、反応系中におけるチオNAD (P) ユニットの量が 100 mer であるということは、反応系中におけるチオNAD (P) ユニットの個数が100であることを意味する。

[0056] 本実施形態の微量物質の分析方法において、反応温度は特に限定されないが、例えば 0°C 以上、好ましくは 10°C 以上、より好ましくは 20°C 以上であり、そして、例えば 100°C 以下、好ましくは 80°C 以下、より好ましくは 60°C 以下、さらに好ましくは 40°C 以下である。

[0057] 本実施形態の微量物質の分析方法において、ポリマー化チオNAD (P) の数平均分子量は特に限定されないが、酵素サイクリング反応で生成したチオNAD (P) Hが検知されるまでに要する時間をより一層短縮できる観点から、好ましくは 1.0×10^4 以上 1.0×10^9 以下、より好ましくは 5.0×10^4 以上 5.0×10^8 以下、さらに好ましくは 1.0×10^5 以上 1.0×10^8 以下、さらに好ましくは 6.5×10^5 以上 7.0×10^7 以下、さらに好ましくは 1.0×10^6 以上 5.0×10^7 以下、さらに好ましくは 5.0×10^6 以上 3.0×10^7 以下、さらに好ましくは 1.0×10^7 以上 2.0×10^7 以下である。

ポリマー化チオNAD (P) の数平均分子量は、例えば、ゲル浸透クロマトグラフィー (GPC) により分析することができる。

[0058] [微量物質分析用キット]

以下、本実施形態の微量物質の分析用キットについて説明する。

[0059] 本実施形態の微量物質分析用キットは、測定対象の微量物質に特異的な抗体と酵素 α とからなる酵素標識抗体、または、前記微量物質に特異的な核酸プローブと酵素 α とからなる酵素標識核酸プローブと、前記酵素 α の基質である化合物 β と、デヒドロゲナーゼと、NAD(P)Hと、ポリマー化チオNAD(P)と、を含む。

[0060] 以下、本実施形態の微量物質分析用キットが酵素標識抗体を含む場合について説明する。

[0061] 本実施形態の微量物質分析用キットが酵素標識抗体を含む場合、分析対象の微量物質は抗原である。

[0062] 本実施形態の微量物質分析用キットの用途は特に限定されず、例えば、抗原に特異的な抗体を担持させた担体上で用いられる。具体的には、ELISA法などに用いられる。ELISA法については前述の通りである。

[0063] 本実施形態の微量物質分析用キットの用途は特に限定されず、例えば、抗原が存在する生体組織切片上で用いられる。具体的には、IHC法などに用いられる。IHC法については前述の通りである。

[0064] 本実施形態の微量物質分析用キットの用途は特に限定されず、例えば、抗原が存在する膜上で用いられる。具体的には、ウェスタンブロット法などに用いられる。ウェスタンブロット法については前述の通りである。

[0065] 抗原の種類は特に限定されず、酵素標識抗体と結合できるものであればよく、例えば、タンパク質、糖、脂質、ペプチドまたは生体に免疫応答を引き起こす低分子化合物であり、好ましくはタンパク質である。ここで、タンパク質および糖には、脂質および／または核酸が結合した、タンパク質および糖も含まれる。

[0066] 以下、本実施形態の微量物質分析用キットが酵素標識核酸プローブを含む場合について説明する。

[0067] 本実施形態の微量物質分析用キットが酵素標識核酸プローブを含む場合、分析対象の微量物質は核酸である。微量物質分析用キットの用途は特に限定

されず、例えば、サザンブロット法およびノーザンブロット法などに用いられる。サザンブロット法およびノーザンブロット法については前述の通りである。

[0068] ポリマー化チオNAD (P) の構造は特に限定されないが、ポリマー化チオNAD (P) が上記の一般式 (3) で表されるN⁶-カルボキシメチルチオNAD由来の構造を含むことが好ましく、上記の一般式 (4) で表されるチオNAD-N⁶-[N-(N-アクリロイル-1-メトシキカルボニル-5-アミノペンチル)-プロピオアミド] 由来の構造を含むことがより好ましい。

[0069] ポリマー化チオNAD (P) の構造は特に限定されないが、ポリマー化チオNAD (P) がアクリルアミド由来の構造を含むことが好ましい。

[0070] 酵素標識抗体または酵素標識核酸プローブの酵素 α は特に限定されないが、EC番号2.-で表される転移酵素群、EC番号3.-で表される加水分解酵素群、EC番号4.-で表される除去付加酵素群およびEC番号5.-で表される異性化酵素群からなる群から選択される一種又は二種以上を含むことが好ましく、アルカリホスファターゼ (ALP) を含むことがより好ましい。

[0071] 化合物 β は酵素 α の基質となり得るものであれば特に限定されないが、前述したデヒドロゲナーゼとの組み合わせの観点から、アンドロステロン骨格を有する化合物を含むことが好ましく、Androsterone 3-phosphate (A3P) を含むことがより好ましい。

[0072] 本実施形態の微量物質分析用キットが含むデヒドロゲナーゼは特に限定されず、例えば、前述した群Xから選択される一種または二種以上を含み、前述した反応速度向上の観点から、ヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを含むことが好ましく、3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase (3 α -HSD) を含むことがより好ましい。

[0073] 以上、本発明の実施形態について述べたが、これらは本発明の例示であり、上記以外の様々な構成を採用することもできる。また、本発明は前述の実

施形態に限定されるものではなく、本発明の目的を達成できる範囲での変形、改良等は本発明に含まれるものである。

実施例

[0074] 以下、実施例により本発明の有用性を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0075] [ポリマー化チオNADの調製]

以下の手順によりポリマー化チオNADを得た。

[0076] <N⁶-カルボキシメチルーチオNADの調製>

(1) 2MのLiOHで中和したヨード酢酸(2.0g)水溶液にオリエンタル酵母工業株式会社製のチオNAD(2.0 μ g、 1.8×10^{15} mer)を加え、pHを6.5に調整した。なお、本実施例において、チオNADおよびチオNADから合成される化合物の量はmerで表す。merはチオNADおよびチオNADから合成される化合物の個数を表す単位であり、つまり、ヨード酢酸水溶液に 1.8×10^{15} merのチオNADを加えたということは、ヨード酢酸水溶液に加えたチオNADの個数が 1.8×10^{15} であるということを意味する。

(2) 上記(1)で得られた溶液を上記のヨード酢酸水溶液で希釈し、溶液中のチオNADの量が 2.16×10^4 merになるようにした。 2.16×10^4 merとする場合、1000倍希釈を2回、100倍希釈を1回、833倍希釈を1回おこなった。

(3) 得られた溶液を暗所・室温で10日間静置した。溶液のpHは適宜確認し、2MのLiOHで調整した。

(4) 3MのHClで溶液のpHを3.5に調節し、氷上で冷却した。

(5) 冷却した溶液を10倍量のアセトン(温度：-5℃)に注いだ。

(6) 沈殿物を回収し、エーテルで洗浄し、50mLの水に溶解した。

(7) 得られた溶液を亜ジチオン酸ナトリウム溶液(1g/100mL、1%NaHCO₃)と混合し、100℃で5分間静置した。

(8) 溶液を室温まで冷まし、15分間酸素を供給した。

(9) 1 MのNaOHで溶液のpHを11.3に調節し、75℃で1時間静置した。

(10) 得られた溶液をアルコール脱水素酵素と反応させるため、まず、溶液の温度を室温まで下げ、Trisの濃度が0.1 MとなるようにTris緩衝液を加えた。

(11) 3 MのHClで溶液のpHを7.5に調整し、1 mLのアセトアルデヒドと1000 Uのアルコール脱水素酵素を添加した。

(12) 340 nmの吸光度の変動がなくなったとき、脱水素（酸化）が完了したとみなし、得られた溶液を、溶液の10倍過剰の冷エーテル（-5℃）に注いだ。

(13) 3℃で一晩静置した後、油状沈殿物を回収し、アセトンとエーテルを用いて洗浄し、1 Lの水に溶解させ、0.1 MのNaOHでpH 7.5に調整した。

(14) 得られた溶液をカラムで洗浄し、N⁶-カルボキシメチルーチオNADの溶液を得た。なお、上記したN⁶-カルボキシメチルーチオNADの調製においては未反応物、副反応物および精製によるロスが殆ど残存しなかった。このことから、チオNADの仕込み量（ 2.16×10^4 mer）と同量のN⁶-カルボキシメチルーチオNADが得られたとみなした。

[0077] <N(ε)-アクリロイル-ラーリジンメチルエステル塩酸塩の調製>

(15) ラーリジン-塩酸塩（27.6 g）を熱水（70 mL）に溶解させ、CuCO₃・Cu(OH)₂（15 g）を添加した。

(16) 得られた溶液に4 MのNaOH（37.5 mL）を加え、さらにジブチルヒドロキシルエン（50 mg）を加え、-5℃に冷却した。

(17) 得られた溶液と塩化アクリロイル（13.7 g）、4 MのNaOH（37.5 mL）を-5℃条件下で1.5時間かけて攪拌しながら混合した。

(18) 混合後、5 MのHClを用いて溶液のpHを6.0に調整した。

(19) 得られた沈殿物をろ過により回収し、超純水を用いて洗浄した。

(20) 洗浄した沈殿物を超純水 (150 mL) に懸濁させ、pH を 1.5 まで下げ沈殿物を溶解させた。

(21) 溶け残った沈殿物をろ過によって取り除き、 Na_2CO_3 で溶液の pH を 6.0 に戻し再度沈殿させた。

(22) 沈殿物を回収し、超純水 (150 mL) で懸濁し、5 M の HCl を添加し溶解させた。

(23) 硫化水素を溶液に導入し、生成した硫化銅をろ過除去した。

(24) ろ液を減圧下 30°C で蒸発させた後、得られた残渣にエタノールを加え、蒸発させ、結晶を得た。

(25) 得られた結晶を 21% メタノール塩化水素 (200 mL) により、室温、48 時間処理し、 $N(\epsilon)$ -アクリロイル- L -リジンメチルエステル塩酸塩を得た。

[0078] <チオ NAD-N^6 -[N -(N -アクリロイル-1-メトシカルボニル-5-アミノペンチル)-プロピオアミド] の調製>

(26) 上記 (25) で得られた $N(\epsilon)$ -アクリロイル- L -リジンメチルエステル塩酸塩 (5.0 g) を超純水 (10 mL) に溶解し、5 M の NaOH を用いて、pH を 4.5 に調整し、さらに、上記 (14) で得られた N^6 -カルボキシメチル-チオ NAD の溶液の全量 ($2.16 \times 10^4 \text{ mer}$) と、ヒドロキノン (10 mg) と、 N -(3-ジメチルアミノプロピル)- N' -エチルカルボジイミド塩酸塩 1.34 g を溶解させた水溶液 (1 mL) と、を加え、混合した。

(27) 1 M の HCl を用いて溶液の pH を保ちながら、室温で 20 時間攪拌を続けた後、溶液を冷アセトン・エタノール (1:1) 中に注いだ。

(28) 遠心分離により沈殿物を集め、集めた沈殿物をアセトンで洗浄し、水 (5 mL) に溶解し、カラムを通して脱塩し、チオ NAD-N^6 -[N -(N -アクリロイル-1-メトシカルボニル-5-アミノペンチル)-プロピオアミド] を得た。なお、上記したチオ NAD-N^6 -[N -(N -アクリロイル-1-メトシカルボニル-5-アミノペンチル)-プロピオアミド

」の調製においては未反応物、副反応物および精製によるロスが殆ど残存しなかった。このことから、 N^6 -カルボキシメチルーチオNADの仕込み量 ($2.16 \times 10^4 \text{ me r}$) と同量のチオNAD- N^6 -[N-(N-アクリロイル-1-メトシキカルボニル-5-アミノペンチル)-プロピオアミド] が得られたとみなした。

[0079] <ポリマー化チオNADの調製>

(29) 上記(28)で得られたチオNAD- N^6 -[N-(N-アクリロイル-1-メトシキカルボニル-5-アミノペンチル)-プロピオアミド]の全量 ($2.16 \times 10^4 \text{ me r}$) と、300 mMのアクリルアミドと、50 mMの3-(ジメチルアミノ)プロピオニトリルと、4.4 mMの過硫酸アンモニウムと、を混合した溶液を調製した。

(30) 調製した溶液に窒素ガスを1分間バブリングし、氷中で1時間静置した後、水を用いて透析し、ポリマー化チオNADを得た。なお、上記したポリマー化チオNADの調製においては未反応物、副反応物および精製によるロスが殆ど残存しなかった。このことから、チオNAD- N^6 -[N-(N-アクリロイル-1-メトシキカルボニル-5-アミノペンチル)-プロピオアミド]の仕込み量 ($2.16 \times 10^4 \text{ me r}$) と同量のチオNADを含有するポリマー化チオNADが得られたとみなした。

[0080] <ポリマー化チオNADの分析>

上記の方法により得られたポリマー化チオNADをゲル浸透クロマトグラフィー(GPC)で分析した結果、その数平均分子量は 1.5×10^7 であった。

GPC測定条件は以下のとおりである。

測定装置: 1260 Infinity II Bio-SECシステム
(Agilent社製)

カラム: PLgel 20 μm MIXED-A (サイズ: 300 mm $\times$ 7.5 mm I.D., Agilent社製) $\times$ 4本

カラム温度: 25 $^{\circ}\text{C}$

移動相：ジメチルホルムアミド

流速：1.0 mL/min

検出器：RI（示差屈折率検出器）

標準物質：Polystyrene D-H2-10キット（Agilent社製）

[0081] [酵素免疫測定法（ELISA法）]

<実施例1>

下記の分析対象を、下記の溶液Aを用いて、下記の分析方法により分析した。

[0082]（分析対象）

Glucose-Regulated Protein 78 kDa溶液（以下、GRP78溶液と呼ぶ）（BSA：0.1%、Tween 20：0.02% in PBS）

（溶液A）

以下の成分を含むpH9.0の溶液Aを100 μL得た。

Tris-HCl（100 mM）

ポリマー化チオNAD（上記（30）により得られた全量、チオNADユニットの量： 2.16×10^4 mer）（なお、チオNADユニットの量は下記の予備実験2により決定した。）

NADH（1.0 mM）

Androsterone 3-phosphate（A3P）（0.1 mM）

3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase（3 α -HSD）（30 U/mL）（なお、3 α -HSDの濃度は下記の予備実験1により決定した。）

（分析方法）

抗GRP78抗体を固定化したマイクロプレートにGRP78溶液を加え、37℃で120分間インキュベートした。

次いで、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、アルカリホスファターゼ（ALP）で標識した抗GRP78抗体溶液（BSA：0.1%、Tween 20：0.02% in PBS）を100 μ L加え、37℃で60分間インキュベートした。

次いで、ウェル内の溶液を吸引除去した後、ウェル内を生理食塩水で洗浄してから、ウェルに溶液Aの全量（100 μ L）を加え、37℃で加温しながら、マイクロプレートリーダー（コロナ電気株式会社製、機種名：SH-1000、405 nmのフィルターを装着）を用いて、溶液Aを加えてからの吸光度を5分ごとに測定した。結果を図5に示す。

（予備実験1）

3 α -HSDの濃度を1、10、30、50または100 U/mLにして、上記の測定方法により溶液Aを加えてから5分後の吸光度を測定し、各濃度でのS/N比（シグナル／ノイズ比）を比較した。その結果、30 U/mLのときのS/N比が最も大きかったことから、3 α -HSDの濃度は30 U/mLとした。

（予備実験2）

ポリマー化チオNADのチオNADユニットの量を7.20 $\times 10^3$ 、1.44 $\times 10^4$ 、2.16 $\times 10^4$ または2.88 $\times 10^4$ merにして、上記の測定方法により溶液Aを加えてから5分後の吸光度を測定し、各濃度でのS/N比（シグナル／ノイズ比）を比較した。その結果、2.16 $\times 10^4$ merのときのS/N比が最も大きかったことから、チオNADユニットの量を2.16 $\times 10^4$ merとした。

[0083] <比較例1>

ポリマー化チオNADの代わりに2.16 $\times 10^4$ merのチオNADを用いたこと以外は実施例1と同様にしてELISA法をおこなった。結果を図5に示す。

[0084] 図5に示すように、実施例1は比較例1よりも吸光度の上昇速度が速かった。このことから、本実施形態の分析方法によると、酵素サイクリング反応

で生成したチオNAD(P)Hが検知可能な濃度に到達するまでに要する時間、つまり検知されるまでに要する時間を短縮できることがわかる。

[0085] また、実施例1のS/N比は2.8であり、比較例1のS/N比は2.2であった。このことから、本実施形態の分析方法によると、S/N比を向上できることがわかる。

[0086] [免疫組織化学染色法(IHC法)への適用のための予備実験]

本実施形態に係る分析方法をIHC法へ適用するための予備実験をおこなった。具体的には、本実施形態に係る分析方法と、従来のIHC法において一般的な西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)による分析方法との検出限界を比較した。

[0087] <参考例1>

下記の溶液Bを用いて、下記の方法により検出限界の値を得た。

(溶液B)

以下の成分を含むpH9.0の溶液Bを100 μ L得た。

Tris-HCl (100mM)

ポリマー化チオNAD(上記(30))により得られた全量、チオNADユニットの量: 2.16×10^4 mer)

NADH (1.0mM)

Androsterone 3-phosphate (A3P) (0.1mM)

3α -Hydroxysteroid dehydrogenase (3α -HSD) (30U/mL)

(方法)

マイクロプレートにpH9.0のALP溶液(ALP: 5.0×10^{-17} , 1.0×10^{-17} , 5.0×10^{-18} または 1.0×10^{-18} /100 μ L, Tris-HCl: 100mM)を100 μ L加えた。

次いで、ウェルに溶液Bの全量(100 μ L)を加え、37 $^{\circ}$ Cで加温しながら、マイクロプレートリーダー(コロナ電気株式会社製、機種名: SH-

1000、405 nmのフィルターを装着)を用いて、溶液Bを加えてから5分後の吸光度を測定し、測定値Aを得た。

そして、測定値Aとブランク値Bの間に有意差があった場合、検出可能と判断し、検出可能となった場合のうちALP濃度が最も小さかった場合のALP濃度を検出限界の値とした。

なお、有意差の有無の判断は、以下の方法によりおこなった。まず、ブランク値Bの平均値 B_{AVE} および標準偏差 B_{SD} を求めた。次いで、下記式(1)により基準値 B_X を求めた。次いで、基準値 B_X と測定値Aを比較し、異なる値であれば、有意差があると判断した。

$$B_X = B_{AVE} + B_{SD} \times 3 \quad (1)$$

このようにして得られた検出限界の値は $2.24 \times 10^{-20} \text{ mol} / 100 \mu\text{L}$ であった。

[0088] <参考比較例1>

下記の溶液Cを用いて、下記の方法により検出限界の値を得た。

(溶液C)

TMB基質液(サーモディクス社製)を $100 \mu\text{L}$ 用意した。

(方法)

マイクロプレートにpH9.0のHRP溶液($\text{HRP} : 1.0 \times 10^{-8}$, 0.5×10^{-8} , 1.0×10^{-9} または $0.5 \times 10^{-9} / 100 \mu\text{L}$, $\text{Tris-HCl} : 100 \text{ mM}$)を $100 \mu\text{L}$ 加えた。

次いで、ウェルに溶液Cの全量($100 \mu\text{L}$)を加え、 37°C で加温しながら、マイクロプレートリーダー(コロナ電気株式会社製、機種名:SH-1000、405 nmのフィルターを装着)を用いて、溶液Cを加えてから10分後の吸光度を測定し、測定値Aを得た。

そして、測定値Aとブランク値Bの間に有意差があった場合、検出可能と判断し、検出可能となった場合のうちHRP濃度が最も小さかった場合のHRPを検出限界の値とした。

なお、有意差の有無の判断は、上記の方法によりおこなった。

このようにして得られた検出限界の値は $4.31 \times 10^{-12} \text{ mol} / 100 \mu\text{L}$ であった。

[0089] 参考例1の検出限界の値は、従来のIHC法において一般的なHRPによる分析方法である参考比較例1の検出限界の値の約 10^8 分の1であった。このことから、本実施形態に係る分析方法をIHC法に適用すると、検出感度を向上できると考えられる。

[0090] この出願は、2023年6月30日に出願された日本出願特願2023-108447号を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

請求の範囲

- [請求項1] 微量物質の分析方法であって、
前記微量物質に、前記微量物質に特異的な抗体と酵素 α とからなる酵素標識抗体、または、前記微量物質に特異的な核酸プローブと酵素 α とからなる酵素標識核酸プローブを結合させる工程Aと、
前記酵素標識抗体の前記酵素 α 、または、前記酵素標識核酸プローブの前記酵素 α を、前記酵素 α の基質である化合物 β に作用させ、デヒドロゲナーゼの基質である化合物 γ を生成させる工程Bと、
生成した前記化合物 γ と、デヒドロゲナーゼと、NAD(P)Hと、ポリマー化チオNAD(P)と、を用いて、酵素サイクリング反応により、ポリマー化チオNAD(P)Hを生成させる工程Cと、
生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hにより、前記微量物質を検知する工程Dと、
を含む、微量物質の分析方法。
- [請求項2] 前記微量物質が抗原であり、
前記工程Aにおいて、前記抗原に、前記酵素標識抗体を結合させる、請求項1に記載の微量物質の分析方法。
- [請求項3] 前記抗原に特異的な抗体を担持させた担体上でおこなわれる、請求項2に記載の微量物質の分析方法。
- [請求項4] 前記抗原が存在する生体組織切片上でおこなわれる、請求項2に記載の微量物質の分析方法。
- [請求項5] 前記抗原が存在する膜上でおこなわれる、請求項2に記載の微量物質の分析方法。
- [請求項6] 前記抗原がタンパク質抗原である、請求項2～5のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項7] 前記微量物質が核酸であり、
前記工程Aにおいて、前記核酸に、前記酵素標識核酸プローブを結合させる、請求項1に記載の微量物質の分析方法。

- [請求項8] 前記工程Dにおいて、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hを定量分析する、請求項1～7のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項9] 前記工程Dにおいて、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hを吸光度により定量分析する、請求項8に記載の微量物質の分析方法。
- [請求項10] 前記工程Dにおいて、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hを定性分析する、請求項1～7のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項11] 前記工程Dにおいて、生成した前記ポリマー化チオNAD(P)Hを目視により定性分析する、請求項10に記載の微量物質の分析方法。
- [請求項12] 前記ポリマー化チオNAD(P)が、N⁶-カルボキシメチルーチオNAD由来の構造を含む、請求項1～11のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項13] 前記ポリマー化チオNAD(P)が、アクリルアミド由来の構造を含む、請求項1～12のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項14] 前記酵素 α が、EC番号2. -で表される転移酵素群、EC番号3. -で表される加水分解酵素群、EC番号4. -で表される除去付加酵素群およびEC番号5. -で表される異性化酵素群からなる群から選択される一種又は二種以上を含む、請求項1～13のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項15] 前記酵素 α がアルカリホスファターゼを含む、請求項14に記載の微量物質の分析方法。
- [請求項16] 前記化合物 β がアンドロステロン骨格を有する化合物を含む、請求項1～15のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項17] 前記デヒドロゲナーゼがヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを含む、請求項1～16のいずれかに記載の微量物質の分析方法。

- [請求項18] 前記化合物 γ がアンドロステロン骨格を有する化合物を含む、請求項1～17のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項19] 前記ポリマー化チオNAD(P)の数平均分子量が 1.0×10^4 以上 1.0×10^9 以下である、請求項1～18のいずれかに記載の微量物質の分析方法。
- [請求項20] 測定対象の微量物質に特異的な抗体と酵素 α とからなる酵素標識抗体、または、前記微量物質に特異的な核酸プローブと酵素 α とからなる酵素標識核酸プローブと、
前記酵素 α の基質である化合物 β と、
デヒドロゲナーゼと、
NAD(P)Hと、
ポリマー化チオNAD(P)と、
を含む微量物質分析用キット。
- [請求項21] 前記微量物質が抗原であり、
前記酵素標識抗体を含む、請求項20に記載の微量物質分析用キット。
- [請求項22] 前記抗原に特異的な抗体を担持させた担体上で用いられる、請求項21に記載の微量物質分析用キット。
- [請求項23] 前記抗原が存在する生体組織切片上で用いられる、請求項21に記載の微量物質分析用キット。
- [請求項24] 前記抗原が存在する膜上で用いられる、請求項21に記載の微量物質分析用キット。
- [請求項25] 前記抗原がタンパク質抗原である、請求項21～24のいずれかに記載の微量物質分析用キット。
- [請求項26] 前記微量物質が核酸であり、
前記酵素標識核酸プローブを含む、請求項20に記載の微量物質分析用キット。
- [請求項27] 前記ポリマー化チオNAD(P)が、N⁶-カルボキシメチルーチ

オ N A D 由来の構造を含む、請求項 20～26 のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

[請求項28] 前記ポリマー化チオ N A D (P) が、アクリルアミド由来の構造を含む、請求項 20～27 のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

[請求項29] 前記酵素 α が、E C 番号 2. - で表される転移酵素群、E C 番号 3. - で表される加水分解酵素群、E C 番号 4. - で表される除去付加酵素群および E C 番号 5. - で表される異性化酵素群からなる群から選択される一種又は二種以上を含む、請求項 20～28 のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

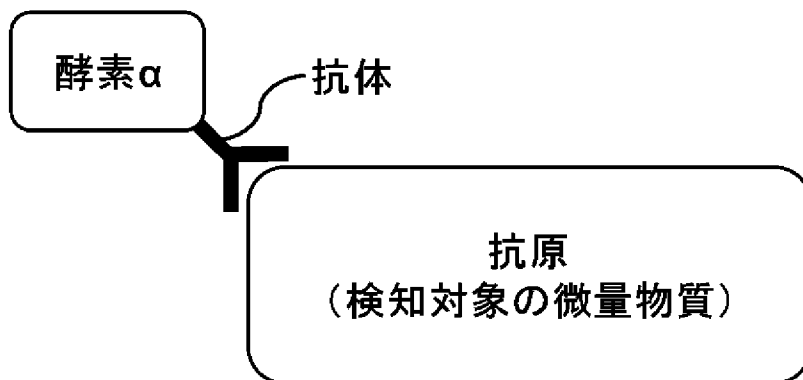
[請求項30] 前記酵素 α がアルカリホスファターゼを含む、請求項 29 に記載の微量物質分析用キット。

[請求項31] 前記化合物 β がアンドロステロン骨格を有する化合物を含む、請求項 20～30 のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

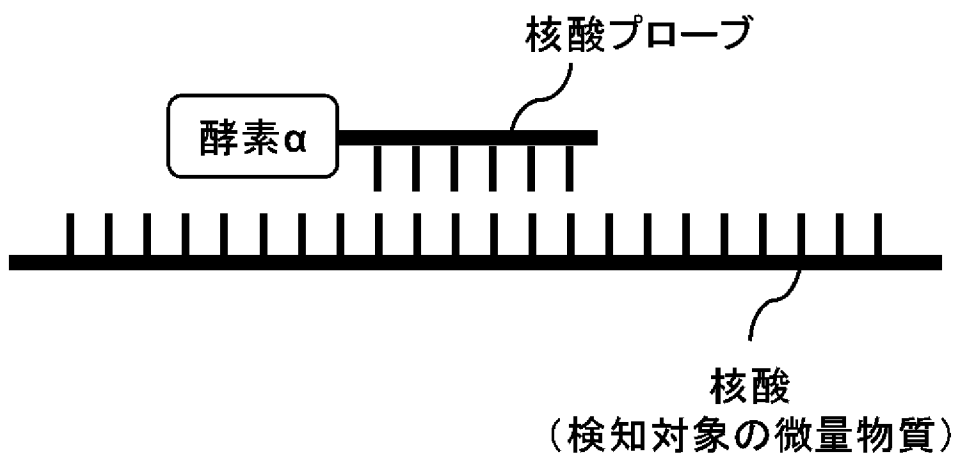
[請求項32] 前記デヒドロゲナーゼがヒドロキシステロイドデヒドロゲナーゼを含む、請求項 20～31 のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

[請求項33] 前記ポリマー化チオ N A D (P) の数平均分子量が 1.0×10^4 以上 1.0×10^9 以下である、請求項 20～32 のいずれかに記載の微量物質分析用キット。

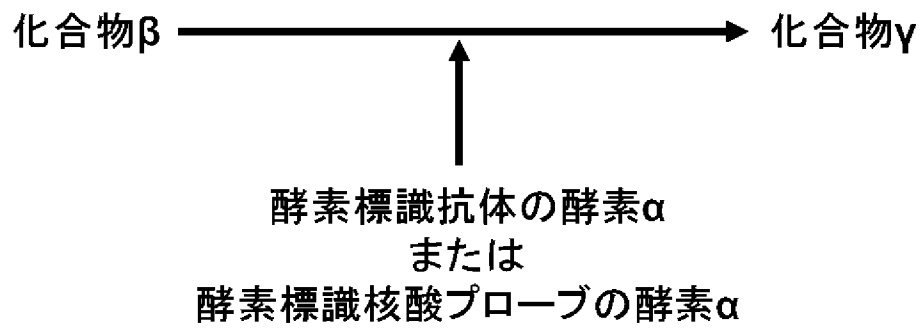
[図1]



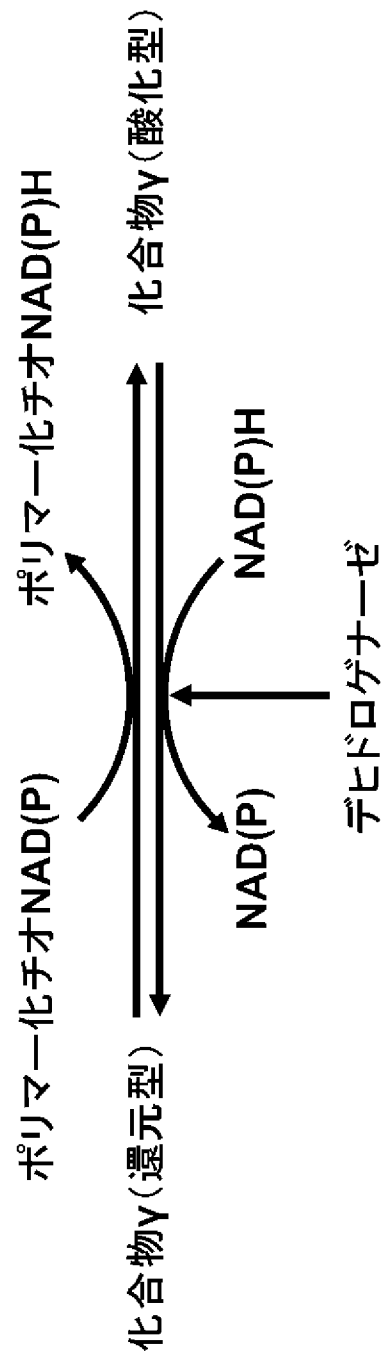
[図2]



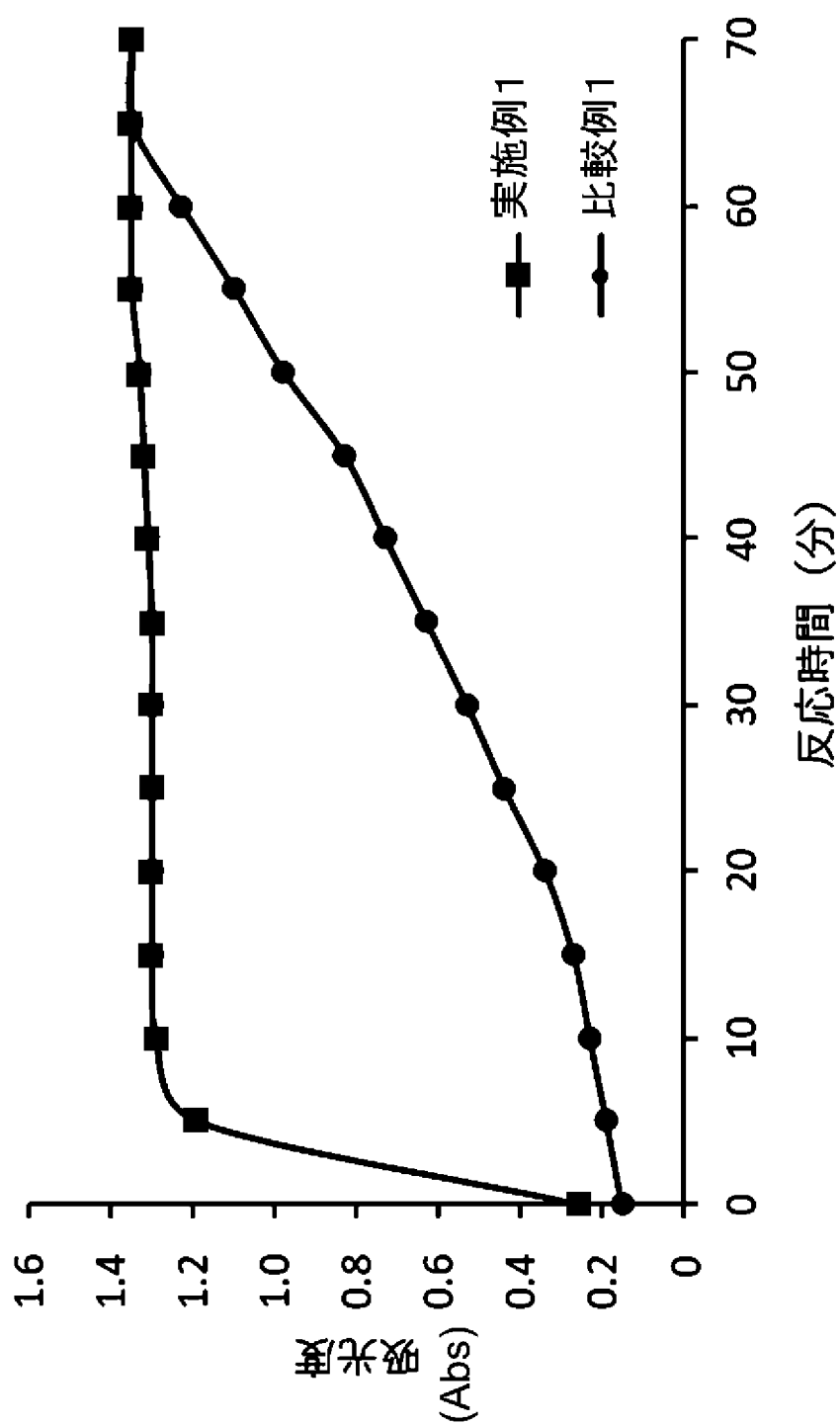
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/016641

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>G01N 33/543</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/32</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/34</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/42</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/6816</i> (2018.01)i FI: G01N33/543 545D; C12Q1/34; C12Q1/6816 Z; C12Q1/42; C12Q1/32 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) G01N33/543; C12Q1/32; C12Q1/34; C12Q1/42; C12Q1/6816 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/128338 A1 (ITO, Etsuro) 27 September 2012 (2012-09-27) paragraphs [0002], [0008], [0010], [0020]-[0025], [0028], [0032]	1-33
A	WO 2017/169565 A1 (ITO, Etsuro) 05 October 2017 (2017-10-05) paragraphs [0001], [0009], [0012], [0014], [0053]-[0055]	1-33
A	SUYE, Shin-ichiro, Assembly of alternating polymerized mediator, polymerized coenzyme, and enzyme modified electrode by layer-by-layer adsorption technique, Sensors and Actuators B, 2005, 108, pp. 671-675 p. 672, left column, lines 6-20, p. 674, left column, line 23 - right column, line 11	1-33
A	WANG, Le, Preparation of ZIF@ADH/NAD-MSN/LDH Core Shell Nanocomposites for the Enhancement of Coenzyme Catalyzed Double Enzyme Cascade, Nanomaterials, 25 August 2021, 11, 2171, pp. 1-16, https://doi.org/10.3390/nano11092171 abstract p. 1, p. 7, lines 1-18, p. 10, line 1 - p. 11, line 8	1-33
☐ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 09 July 2024		Date of mailing of the international search report 23 July 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/016641

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2012/128338	A1	27 September 2012	US 2014/0017675 A1	
				paragraphs [0002], [0008],	
				[0010]-[0024], [0110]-[0116],	
				[0119], [0123]	
				US 2018/0106727 A1	
				EP 2695948 A1	
				EP 3296405 A1	
				EP 2987866 A2	
WO	2017/169565	A1	05 October 2017	US 2019/0106727 A1	
				paragraphs [0001], [0011],	
				[0014], [0017], [0020], [0116]-	
				[0119]	
				EP 3438279 A1	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

G01N 33/543(2006.01)i; C12Q 1/32(2006.01)i; C12Q 1/34(2006.01)i; C12Q 1/42(2006.01)i;
C12Q 1/6816(2018.01)i
FI: G01N33/543 545D; C12Q1/34; C12Q1/6816 Z; C12Q1/42; C12Q1/32

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））

G01N33/543; C12Q1/32; C12Q1/34; C12Q1/42; C12Q1/6816

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

日本国実用新案公報 1922-1996年
日本国公開実用新案公報 1971-2024年
日本国実用新案登録公報 1996-2024年
日本国登録実用新案公報 1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2012/128338 A1 (伊藤 悦朗) 27.09.2012 (2012-09-27) [0002][0008][0010][0020]-[0025][0028][0032]	1-33
A	WO 2017/169565 A1 (伊藤 悦朗) 05.10.2017 (2017-10-05) [0001][0009][0012][0014][0053]-[0055]	1-33
A	SUYE, Shin-ichiro, Assembly of alternating polymerized mediator, polymerized coenzyme, and enzyme modified electrode by layer-by-layer adsorption technique, Sensors and Actuators B, 2005, 108, pp.671-675 第672頁左欄第6-20行、第674頁左欄第23行-右欄第11行	1-33
A	WANG, Le, Preparation of ZIF@ADH/NAD-MSN/LDH Core Shell Nanocomposites for the Enhancement of Coenzyme Catalyzed Double Enzyme Cascade, Nanomaterials, 2021.08.25, 11, 2171, pp.1-16, https://doi.org/10.3390/nano11092171 第1頁の[Abstract]、第7頁第1-18行、第10頁第1行-第11頁第8行	1-33

☐ 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。

* 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
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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の
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抵
触するものではなく、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 09.07.2024

国際調査報告の発送日 23.07.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

北条 弥作子 2J 1168

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/016641

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
WO	2012/128338	A1	27.09.2012	US	2014/0017675	A1	
				[0002][0008][0010]-[0024]			
				[0110]-[0116][0119][0123]			
				US	2018/0106727	A1	
				EP	2695948	A1	
				EP	3296405	A1	

WO	2017/169565	A1	05.10.2017	US	2019/0106727	A1	
				[0001][0011][0014][0017]			
				[0020][0116]-[0119]			
