(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4357113号
(P4357113)

(45)発行日　平成21年11月4日(2009.11.4)　(24)登録日　平成21年8月14日(2009.8.14)

(51)Int.Cl.　F I
G01N 33/542 (2006.01)　G01N 33/542 A
G01N 33/544 (2006.01)　G01N 33/544 A

請求項の数 24　(全 42 頁)

(21)出願番号　特願2000-528866 (P2000-528866)
(86)(22)出願日　平成11年1月21日 (1999.1.21)
(65)公表番号　特表2003-513225 (P2003-513225A)
(43)公表日　平成15年4月8日 (2003.4.8)
(86)国際出願番号　PCT/GB1999/000208
(87)国際公開番号　WO1999/038009
(87)国際公開日　平成11年7月29日 (1999.7.29)
審査請求日　平成18年1月11日 (2006.1.11)
(31)優先権主張番号　9801120.8
(32)優先日　平成10年1月21日 (1998.1.21)
(33)優先権主張国　英国 (GB)

(73)特許権者　390040604
イギリス国
THE SECRETARY OF STATE FOR DEFENCE IN HER BRITANNIC MAJESTY'S GOVERNMENT OF THE UNETED KINGDOM OF GREAT BRITAIN AND NORTHERN IRELAND
イギリス国　ウィルシャー　エスピー4　0ジェイキュー　ソールズベリー　ポートンダウン　ディーエスティーエル
(74)代理人　100059959
弁理士　中村　稔

最終頁に続く

(54)【発明の名称】リポソームおよびシグナル改変を用いる検出系

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
以下の（ａ）および（ｂ）を含む分析物の検出方法：
（ａ）シグナル発生試薬をサンプルから分離させる脂質膜を含む収納手段と前記分析物を含むと思われるサンプルを、特異的に前記分析物と反応してシグナル発生試薬を活性化させるために分子を収納手段中に選択的または特異的に輸送することができるが、シグナル発生試薬が収納手段を出ることは妨げる成分の存在下で接触させること、および、
（ｂ）収納手段内に保持されている一切の発生シグナルを前記脂質膜のサンプル側から検出すること。
【請求項２】
前記成分が、前記分析物との相互反応の前に前記収納手段の表面に存在する請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記成分と前記分析物の相互反応が、担体分子を前記成分から移動させ、脂質膜を貫通して分子を輸送しまたは脂質膜にチャンネルを形成することができ、前記脂質膜を透過性にする請求項１に記載の方法。
【請求項４】
前記収納手段が三次元形状をもち、三次元形状のいずれの寸法も他のいずれの寸法の４倍よりも大きくなく、さらにシグナル発生試薬が前記形状の内部に収納される請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。

【請求項５】
前記収納手段がリポソームまたはナノスフェアを含む、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
前記収納手段がビオチン付加リポソームを含む請求項５に記載の方法。
【請求項７】
前記収納手段の直径が１ｎｍから１００μｍの間である請求項１～６のいずれか１項に記載の方法。
【請求項８】
脂質膜を介したシグナル発生手段の輸送が特異的結合成分の存在により抑制され、かつ、分析物と前記成分との間の相互反応によって、前記脂質膜が、シグナル発生試薬を活性化させる部分の進入または退出を許容するが収納手段からシグナルの退出を許さないために必要な範囲に限定して破壊されるかまたは透過性を付与される、請求項１～７のいずれか１項に記載の方法。
【請求項９】
前記部分がイオンを含む請求項８に記載の方法。
【請求項１０】
特異的に前記分析物と相互反応する前記成分が、抗体またはその結合フラグメントを含む請求項１～９のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１１】
前記シグナルが蛍光シグナルを含む請求項１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１２】
前記蛍光シグナルがコバルトイオンと色素との相互反応によって改変される請求項１１に記載の方法。
【請求項１３】
前記シグナルが酵素反応の結果として生成される請求項１～１２のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１４】
前記酵素反応が補助因子によって触媒される請求項１３に記載の方法。
【請求項１５】
前記サンプルが、サンプルの非特異的シグナルを消光することができる消光試薬を含む請求項１～１４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１６】
前記シグナルが表面プラスモン共鳴を用いて検出される請求項１～１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１７】
前記シグナルが単粒子検出法を用いて検出される請求項１から１５のいずれか１項に記載の方法。
【請求項１８】
前記方法がフローサイトメトリー法である請求項１７に記載の方法。
【請求項１９】
シグナル発生手段の活性化が一連の２つ以上の事象によって始動される請求項１～１８のいずれか１項に記載の方法。
【請求項２０】
前記一連の事象が、輸送メカニズムの一成分であるペプチドの活性化を含み、分析物相互反応がその後に続く請求項１９に記載の方法。
【請求項２１】
前記ペプチドがｐＨの調節または光活性化によって活性化される請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】

前記収納手段が、シグナル検出前にアッセイ媒体から濃縮または分離される請求項１～２１のいずれか１項に記載の方法。

【請求項２３】

脂質膜および前記脂質膜の一方の側に封入されたシグナル発生試薬を含む収納手段であって、前記脂質膜が、シグナル発生試薬を活性化させる部分の進入または退出を許容するが収納手段からシグナルの退出を許さないように、分析物と特異的に相互作用する成分と前記分析物との間の相互作用に伴って開口し得る輸送メカニズムを有する、前記収納手段。

【請求項２４】

分析物の存在を検出するためのキットであって、

（ａ）請求項２３記載の収納手段、および、

（ｂ）前記障壁中の輸送メカニズムを開口するように相互作用する、輸送分析物と特異的に相互作用する成分、

を含む前記キット。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

本発明は、分析物、特に極少量しか存在しない分析物の検出方法とともにこの検出方法で使用するキットおよび試薬に関する。

【０００２】

【従来技術】

反応は、化学的、生化学的および生物学的分析物のアッセイ、検査並びに測定で広く利用される（例えば免疫アッセイ）。分析物と個々の試薬との間の反応は通常そのようなアッセイの特異性の基礎となる。化学的試薬はいくつかのアッセイについて特異性の基礎となるが、一方、分析物と生物学的分子（例えば酵素、抗体、核酸）間のより高い親和性をもつ反応によってより高い特異性および感度がアッセイ工程に導入される。最高の特異性および感度をもつアッセイを提供する反応（例えば化学的または生化学的酵素反応）はしばしば分析物の共有結合改変を伴わず、その代わりに特異的試薬（例えば抗体）への分析物の結合に依拠する。これらの共有結合反応の多くは溶液中で実施され、それによって反応生成物および分析物は同じ相に存在する。反応は種々の方法、分析物または主題混合物の例えば光学的特性の変化（例えば色、蛍光、化学発光、光散乱）、または電気化学的特性の変化（例えば電流測定、電圧測定、コンダクタンス測定）のような種々の方法によって検出される。

【０００３】

最近の改良には、アッセイ試薬の例えば固形支持体（例えばビーズまたは他の表面）への固定化が含まれる。これによって発生したシグナルを同じ平面上に局在させることができる。したがって、この場所でより濃縮され、その結果検出がいっそう容易になる。さらに、分析物塊で発生するバックグラウンドのいわゆる”ノイズ”シグナルに関する問題は最小限に留められる。上記の表面の例には脂質フィルムまたは脂質膜が含まれる。可視シグナルは、例えばＷＯ９８／００７１４およびＷＯ９６／２５６６５に記載されたような系で検出できる。また別には、例えばＷＯ９０／０８７８３またはＷＯ８９／０１１５９に開示されたようにイオンゲート開閉を用いる結果としてコンダクタンスの変化によって分析物が検出される。

【０００４】

リポソームは、シグナル分子の弾頭を輸送するため、およびアッセイ媒体中の分析物のレベルに比例してシグナル分子を放出するための標識として免疫アッセイで用いられた。そのような方法の１つでは（W.J. Litchfield et al., Clin. Chem., 30(9):1441-1445(1984)）、リポソームは、シグナルを発生させるために溶解され、シグナル生成手段（例えば蛍光色素または酵素）をアッセイ反応混合物中に放出させた。しかしながら、シグナルは反応混合物中で希釈される。

【０００５】

出願人らは分析物検出の改良方法を発見した。さらに、マーカーに対する力または場を適用することによってマーカーのエネルギー状態を変化させる手段によりマーカーの放出シグナルパラメーターを変化させる複数の方法が存在することが知られている。多くの事例で、力／場は第二（またはそれ以上）の存在物の局在によって利用できる。当技術分野で知られている例は、カルセイン蛍光発光団の高濃度での自己消光である。第二の例は、イオン付加によるカルセインおよび同様な蛍光色素の消光である。当技術分野では、コバルトイオンは多くの蛍光発光団類を消光することが知られている。しかしながら、本発明者らは、コバルトイオンおよび他の化学物質（これらは本発明の方法およびより普遍的な方法でのシグナル発生を助ける）の使用に伴う新規な作用を発見した。

【０００６】

本発明は、以下の工程を含む分析物の検出方法を提供する：

（ａ）分析物を含むと思われるサンプルを、当該分析物と特異的に反応する成分の存在下で、当該サンプルからシグナル発生試薬を分離させる障壁を含む収納手段と、分析物と当該成分間の反応がサンプルと反対側の障壁側で収納手段内のシグナル発生試薬の活性化をもたらす条件下で接触させ、さらに

（ｂ）障壁のサンプル側から収納手段内で発生し保持されている一切のシグナルを検出する。

この方法では分析物は収納手段と直接または間接的に自由に反応できるが、シグナルは生成されて収納手段内の障壁によって保持される。この方法によってシグナルの濃縮が提供され、したがって検出はいっそう容易である。

【０００７】

収納手段内でのシグナルの増幅が可能である。極めて少数の分析物分子またはただ１分子の分析物でさえも検出可能なシグナルを収納手段内で発生させることが可能で、極少量しか存在しない分析物の検出についてこの系の感度は非常に高められる。

本発明の実施態様の１つでは、当該成分は当該分析物との反応の前に当該収納手段の障壁の表面に存在する。一般に、分析物との反応はこの成分の除去をもたらし、これは順を追ってシグナル活性化試薬表面を貫通する輸送を可能にする。

【０００８】

また別には成分はサンプルに添加してもよい。この場合には、成分は、浸透性を付与する試薬と結合させるか、またはシグナル活性化試薬に収納手段の表面を貫通させる試薬と結合させてそれによって当該試薬の活性を封じるかもしくは競合させてもよい。分析物と当該成分との反応によってこの試薬が遊離され、これは続いて収納手段と自由に反応してシグナル発生試薬の活性化を許す。

【０００９】

さらに別の実施態様では、シグナル発生試薬の活性化は分析物と成分との複合体形成に依存するであろう。このようにして形成された複合体は、例えば収納手段の障壁と反応してシグナル活性化を惹起させることによってシグナル発生手段を活性化できる。

【００１０】

収納手段は、適切には固体または半固体構造を含み、一方、サンプルは固体、半固体、液体、または気体試薬を含むことができる。適切には、収納手段はサンプルとは異なる物理相に存在する。

収納手段は適切には粒子化形状で、各粒子の３次元形状のいずれの寸法もいずれの他の寸法の４倍より大きくはない。換言すれば、ｘ：ｙまたはｙ：ｚまたはｘ：ｚまたはそれらの逆の比は１：４より大きくはない。そのような粒子の例はほぼ球形の、例えばナノスフェアー、ナノパーティクル微粒子のようなポリマービーズ、または小胞およびリポソームのような膜構造である。この場合には、シグナル発生試薬は粒子の内側に含まれる。それらは適切には粒子状収納手段の製造工程時に導入される。

【００１１】

粒子状収納手段は通常の方法を用いて製造できる。例えば、ポリマー粒子は、混相エマルジョン系での相分離、凝集反応、重合ビーズまたは凝結ビーズとして一連の押出成形工程

およびエアロゾルから製造できる。リポソームおよび小胞は当技術分野で既知の種々の被包化技術、例えば超音波処理、押出成形および洗剤透析によって製造できる。

【００１２】

適切なリポソーム組成物は、以下で説明するように例えばホスファチジルコリン、コレステロールおよびジヘキサデシルホスフェートを含むが、しかし他のリポソーム組成物も当業者には明白であろう。安定性のために、リポソームがビオチノイルジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（ビオチン－ＤＰＰＥ）のようなビオチン試薬を取り込んでいるという意味でリポソームをビオチン化するのが好ましい。

【００１３】

また別には、収納手段は不連続性、例えば固体またはコロイド表面にポア構造を含んでいてもよく、これはサンプルに対して完全な障壁を形成するために閉じることができる。適切な固体にはガラスのような磁器物質、酸化金属またはシリコンが含まれる。不連続性は、相分離またはエッチング処理によって、または石版印刷もしくはアノディセーションによりパターンを付加することによって上記の物質に導入できる。シグナル発生剤は上記のように形成した不連続性に適切に導入される。不連続性への開口部は続いて反応性閉鎖手段（例えば脂質膜または脂質層）の適用によって閉じられる。この反応性閉鎖手段は検査サンプルの進入を防ぐ障壁として作用する。反応性閉鎖手段は、しかしながら当該手段に適用されるサンプル中に存在するいずれの分析物とも直接または間接的に反応することができる。結果として、不連続性と反応性閉鎖手段の中でシグナルが発生し、このシグナルはサンプル側から反応性閉鎖手段を観察することによって検出できる。

【００１４】

一般に、収納手段のサイズが小さければ小さいほど、収納手段の表面と相互反応しそこでシグナルを発生させるために必要な分析物分子の数は少なくなる。したがって、高レベルの感度が要求される場合は、収納手段は可能なかぎり小さくされる。しかしながら、収納手段の容積が小さければ小さいほど、その中に含まれるシグナル発生剤は少なくなり、したがってシグナルの検出または収納手段自体の検出は困難になる。

【００１５】

適切には、本発明の収納手段はさし渡しが１ｎｍから１００μｍの間である。収納手段の横断面がほぼ円形である場合は、例えば直径が１ｎｍから１００μｍである。例えば、収納手段は大きさが10～500nmであってよい。直径が約１００ｎｍの寸法をもつ粒子が、実際には数分子の反応事象をシグナル（これは単粒子検出技術によって容易に検出できる）に変換するに際して妥当である。１００ｎｍ粒子または不連続物内の容積は10^{-18}Ｌのオーダーであろう。このサイズの容積は複数の蛋白質分子（例えば２０蛋白質分子まで）から多数の小分子（例えば10^{5}までの小分子、例えば蛍光色素）を収納できる。

【００１６】

好ましい実施態様では収納手段は脂質膜を含み、この膜全体は、シグナル活性化手段または試薬の輸送が、例えば特異的結合成分（例えば抗体またはその結合フラグメント）が存在するために抑制されている。収納手段がリポソームを含む場合は、その全表面が脂質膜を含んでいる。また別には、脂質膜は別の粒子（例えばナノスフェア、ナノパーティクルまたはマイクロパーティクル）を被包化またはこれと結合しているか、または固体表面（例えば上記で概略した磁器物質）の不連続の間に通常の方法を用いて導入することができる。

【００１７】

脂質膜は、水または脂質膜構造を破壊することが分かっている特定の分子以外の全ての分子の輸送を顕著に防止することができる。したがって、本発明の方法にしたがって用いる場合、この膜は、シグナル発生試薬を活性化させるためにイオン、分析物または酵素基質のような分子を収納手段中に選択的または特異的に輸送することができるが、シグナル発生剤が収納手段を出ることは妨げる。

【００１８】

この作用を達成させるために用いることができる的確な分子は、収納手段の性質および使

用されるシグナル発生試薬のサイズのような種々の要因によって左右される。例えば、シグナル発生試薬が大きな酵素を含む場合、分析物との反応に際して酵素基質のような活性誘発剤を通過させるために必要な範囲に限定して膜が破壊されるか、または透過性が付与されることを担保することが必要である。

【００１９】

したがって、好ましい実施態様では、分析物と成分との間の反応は収納手段の表面に輸送メカニズムを出現させることになる。このメカニズムは、典型的にはチャンネルの開口部のような表面の透過性の変化または揺れ動きによってもたらされ、その結果、シグナル発生試薬の活性化を生じる部分の進入および退出は許容するが、収納手段からシグナルが出るのは許さない。

適切には、当該成分は、分析物と特異的に結合する抗体またはその結合部分である。また別には、当該成分は他のリガンド結合蛋白質（例えばレセプター、レクチン、アビジンまたはストレプトアビジン）を含むことができる。

【００２０】

シグナル発生手段を活性化させるために必要な部分の性質は、シグナル発生手段自体の性質に左右されるであろう。しかしながら、それらは以下で詳述するように単にイオンを含んでいるだけでもよい。

適切な界面活性および洗剤様分子は当業者には極めて明白であろう。それらの例には、以下で詳述するようにスイッチを切り換えるイオン担体、酵素基質チャンネルまたは挿入触媒もしくは補助因子が含まれる。

【００２１】

一連の担体分子（例えばクラウンエーテルまたはペプチド構造物）は、脂質膜を貫通してイオンを輸送し（例えばバリノマイシン、モネンシン）、または膜にチャンネルを形成することができる（例えばアラメチシン、グラミシジン）。しかしながら、大きくて典型的な親水性分子（例えば蛋白質または核酸）に結合するとき、この分子の輸送能力は抑制される。

【００２２】

これらの特性が利用される。例えば、大型分子が親水性分子との結合について担体分子と競合するか、または親水性分子を担体分子から移し変えることができるように、分析物との相互反応を大型分子との結合反応と連係させてもよい。膜通過イオン輸送の変化は、例えばトランスメンブレン電気化学勾配に対するイオンの影響（膜電位、蓄積されるかおよび／またはそれらの光学的特性を変化させる色素のような試薬（例えば蛍光性膜プローブ）を用いるｐＨグラジエント）、シグナル発生試薬中に含まれる色素団とイオンとの相互反応、または輸送イオンによる酵素の活性化を測定することによって検出できる。

【００２３】

別の種類の分子（典型的にはペプチド）は、酵素基質のような小さな分子に対して膜に選択的透過性を許容する。このタイプの典型的なペプチドは以下のペプチドである：LAEALAEALEALAAの構造をもつ”ミニ－ＧＡＬＡ”、WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAAの構造をもつ”ＧＡＬＡ”、WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEAの構造をもつ”ＫＡＬＡ”およびミリスチル－ミニ－ＧＡＬＡ。その他の例には、膜透過性付与特性を有するメリチンペプチド並びにその誘導体および変種（以下で詳述するようなもの）が含まれる。これらのペプチドは小型分子に対して膜を透過性にするが、酵素発生試薬およびそれによって生成されたシグナル剤のような大型分子の通過は妨げる。このペプチドの活性は、抗体のような検出試薬（sensing reagent)の存在下で阻害されるであろう。しかしながら、抗体が特定の分析物に対して特異的である場合は、それは当該分析物によって除去され、したがってこのペプチドにその透過性付与作用を発揮させ、シグナル活性化剤（例えば酵素基質）の収納手段への進入を許す。ペプチドと検出剤との複合体は、検出剤の除去が脂質層表面に対して直接作用をもつことができるように脂質層に存在していてもよい。また別には、ペプチド－検出剤複合体は周囲の溶液に検出剤とともに存在してペプチドの効能を阻害することができる。分析物との相互反応による検出剤の除去はしたがってペプチドを遊離させ、リ

ポソームに対する浸透性付与作用をペプチドに発揮させるであろう（ペプチドは続いてリポソームと接触する）。

【００２４】

このアプローチを改変して以下のようなシグナル発生ペプチドが利用される：(FITC)-MLSLRQSIRFFKPATRTLCSSRYLL（Ｐ２５）および(FITC)-MLSLRQSIRFFKPSTRTLCSSRYLLQQKPVVKTA－アミド（Ｐ３４）、これらは自身を膜に挿入し、その収容部位に出現する。これは蛍光プローブ法を用いて示すことができる。そのようなペプチドは、検出剤または封鎖剤が分析物との反応によって除去されると、シグナル活性化剤（例えば酵素補助因子、触媒活性をもつ金属イオン複合体（例えばポルフィリン）または膜通過可溶性酵素のようなさらに大きい親水性構造物）を輸送するために利用される。当該封鎖剤は分析物との反応によって放逐されるか、または分析物は封鎖剤との結合について競合するであろう。いずれの場合においても、粒子表面を通過する輸送量は分析物と相関関係（典型的には比例関係）をもつ。

【００２５】

シグナルペプチドの化学的改変形態（例えばＰ２５）をリポソーム収納プロテアーゼ（例えばトリプシン）に挿入し、収納反応を発生させることができる。プロテアーゼに対する特異的な蛍光発生基質が知られているし（例えばペプチド切断時のウンベリフェロン蛍光発生）、またｐＨ感受性蛍光発光団の同時収納によって簡単に検出できる。そのような形態は本発明で使用できる。

【００２６】

例えば、リーダー配列Ｐ－２５は、エステル結合により残存ペプチドに新しいＮ末アミノ酸を連結させて合成できる。このＮ末端基の挿入（例えばカルジオリピンのような試薬によって誘導される）は、エステルの加水分解および個々のリポソーム（当該ペプチドが相互反応する）の蛍光の変化をもたらす。アミノ酸の性質を選択することによって、当該アミノ酸に特異的な多様なプロテアーゼの使用が可能になる。

【００２７】

適切なシグナル発生手段には当業者に周知のものが含まれ、例えば免疫アッセイの分野で知られているシグナルまたは標識発生試薬のいずれも包含されるであろう。例えば、シグナルは酵素反応（補助因子によって触媒してもよい）の結果として発生させることができる。

シグナル発生薬剤には、光シグナルを発生させることができる薬剤または試薬（例えば蛍光色素またはルシフェリン／ルシフェラーゼ系のような化学発光酵素系）を含むことができる。また別には、アルカリフォスファターゼ反応のようなその他の酵素検出系のいずれも用いることができる。非酵素触媒シグナル反応の例は、有機過酸化物から脂質過酸化を検出するものであろう（これはポルフリンによって触媒される）。

【００２８】

活性酵素よりむしろ不活性酵素（その再活性化はペプチドが引き金になる）を収納するナノスフェアを製造してもよい。不活性酵素は酵素と抑制物質を同時収納することによって製造できる。ほとんどの酵素競合抑制および多くの非競合抑制は、抑制物質の除去または希釈によって逆行させることができる。基質の進入を開始させるための上記の手段もまた抑制物質をナノスフェアから脱出させるために用いることができる。多くの酵素（オキシドレダクターゼが含まれるが、ただしこれに限定されない）は作動するために補助因子を必要とする。そのような補助因子は、チャンネルまたはポア形成ペプチド（他の同様な分子の進入または退出を可能にする）によるか、または上記のペプチドと結合させたときにそれらの特異的な挿入（他の同様な分子の輸送を許容しない）により導入できる。いくつかの補助因子は通常は酵素と堅固に結合している。そのような補助因子の除去はアポ酵素を生じる。酵素が必要とするリポソーム収納アポ酵素補助因子は、それらが酵素とともに再構成されるようにそのようなペプチドと結合させることができる。典型的な例は、アポ－グルコースオキシダーゼを生成するためにグルコースオキシダーゼからフラビンアデニンジヌクレオチド（ＦＡＤ）補助因子を除去するものである（Methods in Enzymology, V

ol.92, PartE, Page413-417)。ＦＡＤ補助因子は、例えばN^6(２－アミノエチル）－ＦＡＤへのカルボジイミド共役によってそのようなペプチドに結合させることができる。グルコースオキシダーゼは、アルカリフォスファターゼについて本明細書で述べる方法によってリポソームに取り込ませることができる。

【００２９】

また別には、触媒活性は収納手段中に輸送することができる。例えば、シグナルペプチドの生物学的機能は、ポリペプチドまたは蛋白質を膜を貫通して輸送することができる。実際のところ、上記のＰ２５／３４シグナルペプチド構造物はチトクロームオキシダーゼの膜貫通挿入に関与する。そのようなペプチドはまた他の非酵素性触媒活性の膜貫通挿入に用いることができる。無機および有機触媒構造物をペプチドに結合させて、ナノスフェアおよびリポソームに活性を導入および収納させることができる。触媒される反応はエネルギーを必要としてもよい。このエネルギーは、触媒中心によって吸収された光の形態として（光触媒）または熱の形態として提供できるが、後者はまた、光放射、他の電磁放射または超音波放射の吸収によって当該収納反応に局在して提供される。外部から適用されるエネルギーはこの収納反応を開始させるまた別の手段を提供する。他の触媒中心はエネルギーを必要としない。ヘムによって触媒されるラジカル反応は典型的な例である。例えば、脂質のヘム触媒過酸化が達成できる。

【００３０】

ヘム基は、脂質の過酸化をもたらすラジカル仲介連鎖反応を触媒する。関与する連鎖反応のために、非常に低濃度のヘムが顕著な過酸化を惹起する。脂質の過酸化は、蛍光色素を用いて脂質膜の透過性の変化を（上記のように）モニターすることによって簡便に示すことができるが、ラジカルはまた他の反応で捕捉できるであろう。

【００３１】

出願人らは、本発明で特に有用な新規なシグナル発生系を発見した。多くの色素は金属イオンと着色複合体を形成するが、一方、そのような複合体のわずかしか蛍光性ではない。そのような色素は反応を始動した後保持されず、有用な濃度で自己消光するであろう。さらに金属イオンは蛍光を消光する周知の手段である。

【００３２】

しかしながら、ある種の色素、例えばELF-97（Molecular Probes Inc. USA: "Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals"（Richard Haugland著、第６版）を参照されたい）とコバルトイオンとの相互反応は蛍光を誘発し、色素の蛍光をスペクトルの赤色端にシフトさせることが見出された。これは、相互反応が分析物の相互反応の結果として許容される本発明において有用である。

さらにまた、アルカリホスファターゼは、ある種のｐＨ値である種の色素基質反応（特にELF-97基質反応）のための触媒として作用できることが判明した。このｐＨ値は、ＧＡＬＡペプチドが活性を有するｐＨと同じオーダーであるので、これは本発明で使用可能な好ましい系を構成できる。

【００３３】

本発明にしたがえば、シグナル発生は被包化収納手段内で生じるので、サンプルにシグナル消光試薬を添加することによって、サンプルの非特異的シグナルは最小限に留めることができる。適切な消光試薬は、サンプルに存在する全てのシグナル発生手段の性質によって異なるであろう。しかしながら、本発明者らの発見では、パラ－ニトロフェニルホスフェート（ＰＮＰ）（比色アッセイで用いられる基質）が、蛍光色素ELF-97から発生するシグナルを消光することが認められた。

【００３４】

好ましい実施態様では、シグナル発生手段の活性化は１つ以上の一連の事象によって惹起される。特に、分析物と成分（検出成分）との間の相互反応は、適切には相互反応が生じる前の別々の”補強（arming)"事象または反応によって左右される。例えば、相互反応が担体または透過性ペプチド（例えばアラメチシンまたはＧＡＬＡ）を含む場合、”補強”事象または反応は、ペプチドが活性を有することを担保するためにアッセイ媒体のｐＨの

調節を含むことができる。ＧＡＬＡペプチド（WEAALAEALAEALAEHLAEALAEALEALAA）は中性／アルカリ性ｐＨでわずかな反応始動しか示さず、さらにより低いｐＨで反応を始動させる。また別のＫＡＬＡペプチド（WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACEA）は、酸性ｐＨで始動を開始させず、中性／アルカリ性で始動させることが示された。この活性は、ハプテンがペプチドのＮ末端に結合しているときでも保持される。

【００３５】

補強反応のまた別の方法は通常の方法によるペプチドの光活性化によって達成できる。例えば、光誘発構造変化をペプチド構造に導入し（例えばスチルベンのシスまたはトランス構造）、ペプチドを活性にしたり、または保護基を光切断したりできる。

【００３６】

別々の補強事象また反応を使用することによって、非特異的反応レベルを最小限に留め、したがって分析物を含まない反応よりバックグラウンドシグナルレベルを減少させることができる。これによってアッセイの感度レベルを高めることができる。なぜならば、一般に分析物が存在する結果としてのシグナルはバックグラウンドシグナルの割合よりもより大きな割合で増加するが、バックグラウンドシグナルレベルはアッセイ感度の下方限界を決定する制限要因となるからである。

【００３７】

ある実施態様では、ナノスフェア内の触媒活性の始動（図３）は本発明にしたがって実施できる。不活性酵素を特異的に再活性化させるか、収納手段に基質または触媒活性を挿入するためにペプチドの使用をこれまで研究してきたが、以下で報告する。

適切には収納手段は、シグナル検出の前に濃縮されるか、またはアッセイ媒体から分離される。例えば、収納手段は、適切な凝集蛋白質（例えばアビジン）を用いて沈降または凝集させるような技術によって濃縮できる。収納手段が適切なサイズをもつ場合は遠心も用いることができる。

【００３８】

本発明の方法にしたがって発生させたシグナルは多様な技術によって検出できる。これらの技術には以下のような物理的手段が含まれる：光学的検出方法（例えば以下を検出する方法：吸収、蛍光、蛍光分極、経時的蛍光、化学発光、生物学的化学発光、屈折率、吸収波、表面プラスモン共鳴、共鳴ミラー、ラマン、光散乱、光音響分光分析、輻射熱分光分析）、電気化学的検出方法（例えば電流測定、電圧測定、導電率測定または誘電検出法）または電気機械的方法（例えば重量法、表面音波法、ラブプレート法、または音波増殖法）。これらのうちで表面プラスモン共鳴検出が特に適切である。

【００３９】

使用できるその他の技術は、単粒子検出法（例えばコールターカウンター法、フローサイトメトリー法）、または走査電子顕微鏡法（例えば共焦点走査顕微鏡法、準視野走査光学顕微鏡法、トンネリング走査顕微鏡法、原子力顕微鏡法、走査電気化学顕微鏡法、走査音響顕微鏡法）によって個々の粒子を検出する技術である。これらのうちではフローサイトメトリー法が本発明では特に有用である。

【００４０】

シグナルは収納手段内で発生するという事実は、単粒子検出法および特に顕微鏡的検出法（例えばコールターカウンター、フローサイトメーター、走査顕微鏡または同様な次元の他の検出器）の使用を助ける。現時点では、検出のために所望される濃度におけるこれらの色素の自己消光のために、これらの単粒子検出装置を用いた多くの一般的蛍光発光団（例えばカルセイン、フルオレセインおよびローダミン）の検出は困難であることが判明した。本発明の方法を用いればこれらの問題は克服できる。特にELF-97生成物による（ただし他のエキサイマー(excimer)およびエキシプレックス(exiplex)蛍光色素でもよい）本発明の収納手段内での強い蛍光の蓄積は、今や検出が可能になったことを示している。

【００４１】

ただ１つの存在物（すなわち、シグナル発生試薬が活性化された収納手段）を検出および／または数えることが可能である。、１から10^2のそのような存在物の測定を実施するこ

とができるが、容易に達成できる正確な測定は10^2から10^4の存在物である。これは、極めて微量の分析物分子（例えば１から10^2）の存在に匹敵することは理解されよう（この場合、シグナル発生手段を活性化させるためには当該存在物はただ１つの分析物とのただ１つの反応を必要とする）。

【００４２】

フローサイトメーターとして作動する改造コールターエピクス（Coilter Epics）５細胞分類装置を用いて、以下で詳述するように単粒子検出を実施した。この装置は、サイズが１－１００μｍ（ミクロン）の細胞を処理するために設計された。５０－２５０ｎｍ範囲の処理のために製造された装置が、ノイズを小さくし、さらに水、バックグラウンドおよびテストサンプル間の識別をより良好にするという点で好ましい（下記実施例２４－２６で詳述）。

【００４３】

エピクス系は、可変ゲイン電圧による光量子増幅管（ＰＭＴ）を用い検出後増幅を実施するアナログ検出を基にしている。ＰＭＴは単一ゲイン電圧でノイズに対して最適のシグナルで作動する。エピクス系では、弁別装置は増幅装置の後に続く。アナログシグナルであるがノイズに対してより高いシグナルを用いて作動させるエピクス系は、光量子計測検出装置を用いて達成できるであろう。またＰＭＴが光量子を計測しゲイン電圧が固定されている場合は、コンパレーターはＰＭＴの直ぐ後に配置され、セット値をもつのが好ましい。

【００４４】

エピクス系は空気中を通過するジェット液流を用いる。これは散乱時に強いバックグラウンドノイズを生じるかもしれないが、それによる影響は四角の壁をもつフローセルを使用することによって減少させることができる。ゼロ電圧から作動させたエピクス系のアナログデジタル変換装置（Ａ／Ｄ）（この場合、Ａ／Ｄの最初のチャンネルの分布間隙を大きくするために非常に高いゲインを用いる）は使用されず、装置の感度は低下する。Ａ／Ｄのゼロチャンネルが固有サンプルによって発生するシグナルに等しくなるように設定でき、したがってサイズ分布間でＡ／Ｄチャンネル数が大きく増加する場合、ノイズに対してより高いシグナルが達成できる。

【００４５】

エピクス系の回路よりももっと最近の回路もまた、ノイズに対してより高いシグナル、より広いバンド幅およびより少ない周波数反応で稼働し、したがってこの装置はノイズに対してより高いシグナルおよびより大きな分布間隙を提供できる。

【００４６】

本明細書で用いられるように、全ての測定は蒸留して0.22ミクロンフィルターを２度通した水を用いて実施した（これによってより高い等級のろ過物が得られることが当技術分野で分かっている）。全てのリポソーム懸濁液は標準的緩衝液で製造した（これら緩衝液のいずれも顕著なバックグラウンド蛍光を含み、特殊な緩衝液が蛍光バックグラウンドを低下させることができることが当技術分野で知られている）。緩衝液および貯蔵液は脱気するか、または特別な気体を供給してバックグラウンド蛍光を減少させることができる。緩衝液および貯蔵液は、バックグラウンド蛍光を低下させることが当技術分野で知られている任意の添加物を含んでいても、また含んでなくてもよい。

【００４７】

標準的なエピクス系はわずかな割合の放射光を集めるが、異なるレンズの組み合わせ、鏡および特殊フローセルの使用によって、サンプルからより多くの光を集光し、シグナル：ノイズ比を高めることができる。装置が単一レーザー線を使用し、当該レーザー線が蛍光をポンピングする場合、光の吸収が生じるので散乱シグナルは極めてわずかであろう。サンプルの最大蛍光シグナルは固定され、一方、散乱シグナルは光学力の増加によって増すであろう。

【００４８】

装置は２つまたは３つ以上の励起波長を用いて製造できる。第一の励起波長は蛍光生成物

をポンピングするためにデザインされ、第二の励起波長は蛍光および励起と放射の両方のウィンドウの範囲を越えるようにデザインされて散乱シグナルを発生させるために用いられた。好ましくは、散乱励起は励起ウィンドウよりも短い波長で、したがって散乱を高める。

【００４９】

適切には蛍光励起ビームの強さは最大の蛍光励起を生じる強さよりも直ぐ下の強さを有し、その結果不純物に由来する散乱が減少するであろう。好ましくは、散乱励起ビームは、励起が増加してサンプルの分布を明瞭に見ることができるが、一方不純物による散乱のためにノイズが増加するほど高くないように変動可能であろう。

【００５０】

非常に強いレーザー力が用いられ、これは、Ｑ－スイッチング、モードロッキングおよびキャビティダンピングを含む（ただしこれに限定されない）パルスレーザーによる操作を用いて達成できる。Ｍｈｚが１００ｓの反復速度が達成でき、このレーザーパルスは１００ｘ１０$^{-15}$秒のオーダーであろう。

【００５１】

時間相関単光量子計測法を用いて、蛍光測定のノイズに対してさらにシグナルを増加させることができる。好ましくは、蛍光と散乱検出装置の両方の光量子計測数は各々が、活性種／粒子によって生成されたシグナル（２種の小シグナルか２種の大シグナルのいずれかである）が無視できるように２種の識別レベルに対して区別されるであろう。好ましくは検出装置は、ノイズをさらに減少させる論理ＡＮＤ組み合わせとして機能するであろう。好ましくは、蛍光発光団は、サンプルによる励起ビームのラマン散乱が蛍光発光団の放射領域でシグナルを発生させないように選択される。

【００５２】

さらにまた、本発明のような方法は、いくつかの分析物を同時に検出するために用いることができる。異なるシグナル発生薬剤を含み、さらに異なる分析物によって始動するリポソームのような収納手段の混合物を提供することによって、２つ以上の分析物の存在を検出できる。

【００５３】

たった１つまたは極めて少数の分析物分子の反応が、眼に見えるシグナル（上記で概略した技術を用いて１つずつ数えることができる）を生じることができるということは、本発明のいくつかの実施態様の重要な利点である。そのわけは、シグナル発生薬剤は小さな粒子内に濃縮されていてサンプル容積全体に拡散されないからである。さらにまた、明瞭なシグナル（粒子の反応は始動するかまたは始動しないかのどちらか）は、１つまたは極めて少数の分析物分子の存在によって生じうる。

【００５４】

このことは、本発明の方法を用いて達成可能な検出のレベルは、これまでに利用可能であった方法で検出できるレベルより低いことを意味している。そのような高レベルの感度を達成するためには、活性化されたわずかのものが検出されたことを担保すべく、多数の収納手段（例えば１０^{6}またはそれ以上）による分析を実施することができる。

【００５５】

そのように感度の高い検出方法は、例えば微量の基質、サンプル中または空気中の化学物質もしくは生物学的物質の検出に用いることができる。この方法で検出できる化学物質の例には、爆発物、微生物およびそれらの生成物（例えば毒素）、化学兵器、殺虫剤、ホルモンまたは薬物が含まれる。

【００５６】

本発明のいくつかの実施態様は、特にバックグラウンドを越える特異的シグナルレベルのみを用いて反応物質と非反応物質を識別する場合は、多様なバックグラウンドシグナルレベルに対してより許容性が高いと考えることができる。実際、本発明の方法を用いれば、反応物質の計測とアッセイ手段としての各反応粒子におけるシグナルの量の分析を結合させることが可能である。反応物質のシグナルの量を用いて、特異的反応と非特異的反応を

識別することができる。非特異的反応物質は種々のそれらの特性（例えば光学的特性）および／または単純に各物質で検出されるシグナルの量によって区別できる。非特異的反応物質はそれによって計測シグナルから排除できる。したがって、計測シグナルは、分析対象の各反応物質において予め定めた閾値を越えるものであるか、または固有の特性（例えば光学的特性）内にあるものであろう。

【００５７】

上記で述べた方法で用いられる収納手段は本発明のまた別の特徴を構成する。　本発明のまた別の特徴は、分析物の存在を検出するキットを含む。このキットは、シグナル発生試薬および前述の分析物と特異的に反応する成分を封入し、それによって収納手段内でシグナル発生試薬を活性化させることができる収納手段を含む。

【００５８】

上記で述べたように（さらに下記で具体化される）、出願人らは、コバルトイオンを含む一連の物質とともに基質を保温することによって、生成物の蛍光発生が増加し、さらに発生波長が変化することを見出した（これは当技術分野では以前には予知されなかったことである）。さらに、使用される従来の生成物および保温生成物の相対量によって、特に上記の反応過程における生成物の反応の速度（それ自体シグナル発生メカニズムを提供する）に影響を及ぼすことができる。　さらにまた、保温作用は、生成物形成速度を高め、さらに通常では酵素が基質に対して活性を示さないｐＨ範囲で基質を酵素に残留させるように基質を改変することが示された。

蛍光物質がコバルトイオンの添加によってそのエネルギーレベルを増加させることは当技術分野では全く予期されなかった。さらにまた驚くべきことには、コバルトイオンの添加によって、蛍光物質はそのエネルギーレベルをシフトさせ、したがって放射の強さを増加させる。

【００５９】

蛍光発生の強さおよび／または生成物の波長は、生成物形成前に基質とともに金属イオンのような物質と保温することによって増加することは予期されなかった。これらの物質が基質に添加され保温される場合にのみ上記の変化が実質的に生じるという点で、これらの変化は可逆的ではないということは驚くべきことである。このシフトは、安定化のために十分な時間を与えられた生成物に同じ物質が添加される場合には生じない。

【００６０】

ＥＬＦ反応は、その最大蛍光強度に達するや直ちに安定になるのではなく、不可逆的になるために”保温反応”の時間として１０時間必要であることが分かった。保温作用は生成物形成速度を増加させることができる。さらに、酵素を可能なｐＨ範囲外で非保温基質と反応させるために用いることができる。

シグナル（蛍光を含むがただしこれに限定されない）が特徴的な寿命をもつ場合、保温作用はおそらくシグナルの寿命に影響を与えるであろう。

これらの特色のいずれもアッセイの可能な応用をもたらすであろう。

【００６１】

したがってまた別の特徴で、本発明は、化学的アクティベーターとの反応に際してシグナルを発生させるシグナル発生試薬から発生するシグナルを改変する方法を提供する。本方法は、化学的アクティベーターに暴露する前に当該シグナル試薬をイオン、界面活性剤および／または当該シグナルの特性の改変をもたらすｐＨをもつ緩衝液のいずれかとともに保温することを含む。

改変できるそのような特性の例には放射シグナルの波長、または生成物形成速度が含まれるが、他の特性（例えば密度、屈折率およびインピーダンス）もまた影響を受け、これらの変化もまた、例えばバルクサンプル分析または単粒子検出を用いて測定できる。

【００６２】

適切にはシグナル発生試薬は、色素、特に蛍光色素、例えばＥＬＦ、ＥＬＦ基質またはその誘導体もしくは改変形である。

コバルトイオンと同様に、改変用化学物質は界面活性剤、特に、適切なｐＨ値で提供され

る緩衝液の成分を形成することができるトリトン－Ｘのような洗剤であろう。
【００６３】
保温作用は改変用化学物質の検出に利用できる。したがって、本発明のまた別の特徴では、シグナル発生試薬から発生するシグナルを改変する化学物質の存在を検出する方法が提供される。本方法は、当該化学物質を含むと思われるサンプルと当該シグナル発生試薬を接触させ、続いて化学的アクティベーターと接触させてそれから発生するシグナルを検出することを含む。
【００６４】
観察された保温作用は、改変用化学物質と自己消光の減少を生じる基質とが結合するであろうということを示唆している。そのような変化は他の測定可能パラメーター（例えば密度、屈折率およびインピーダンス）における変化をもたらし、これらの変化は、当技術分野で知られている他の適切な手段、バルク測定および単粒子検出の両方で測定できる。
【００６５】
これらアッセイ反応の多くは数時間を越える顕著な時間依存性を示し（すなわち反応速度は時間とともに変化する）、これは一般に分析物のレベルに左右される。したがって、アッセイ値または速度の測定は好ましくは反応開始から予め定めた時間で実施される。適切にはバックグラウンドシグナル測定のサンプルもまた同時に測定される。
【００６６】
基質の反応時間の影響および反応の不可逆的性質は、反応速度の本質的測定値としてこの依存関係を用いることを許容する。これによって反応中のいずれの時間にも測定を実施でき、結果は適切に修正できる。
波長シフトの大きさは反応速度の本質的な測定値である。さらに、これは効果的に実験全体の速度を平均するので、この時点でより高い感度を得ることができると言えよう。
【００６７】
理想的には、本発明はアッセイに適しているが、単に新規なマーカーを製造するためにも用いることができる。”保温”という用語は、基質と処理添加物を適切な時間接触させる過程をいうために本明細書では用いられる。この時間は、含まれる試薬の正確な性質および必要とされる改変作用にしたがって予備保温しないものから数日間の保温まで変動するであろう。
本発明をこれから添付の模式図を参考にしながら具体的に説明する。
【００６８】
図１の実施態様では、粒子状収納手段（例えばリポソーム）（１）はシグナル発生試薬（２）を含み、この試薬はイオン（例えばH^+）の存在に反応してシグナルを生じる。適切な試薬（２）はしたがってピラニンである。リポソーム（１）表面のイオン（３）のための全てのチャンネル（３）は抗体（４）の手段によって封鎖される。抗体はまた分析物（５）に対して特異的である。
抗体（４）が分析物分子（５）と接触するとき、当該抗体は好ましくは分析物と結合し、複合体（６）を形成する。複合体はリポソーム表面から分離してもしなくてもよい。イオンチャンネルはこれにより開口され（７）、リポソーム（７）へのイオンの進入を許す。イオンとの接触時に、シグナル発生試薬は活性化されシグナル（８）が記録される。
【００６９】
イオンによって始動される収納された蛍光をもつこのタイプの多くの具体例を想定することができる。２つのそのような例がそれぞれ下記の実施例１および２で提供される。実施例１では、ｐＨグラジエントを崩壊させることによるイオングラジエントについて蛍光モニター法の使用が示されている。その他のそのような一連のイオングラジエントも崩壊させることができる。第二に、本発明の実施に適した蛍光金属イオン複合体の新規な発見が示される。
【００７０】
図２の実施態様では、シグナル発生試薬（２）の活性化は、シグナルを生じるために一続きの２つの反応を必要とする。この場合には、収納手段または膜はチャンネル形成ペプチ

ド（９）を含む（このペプチドに対して、分析物に対するハプテンが結合している）。ペプチド（９）の輸送活性は抗体（１０）の結合によって封鎖されている。
しかしながら抗体（１０）は複合体（１２）を形成するプロトン付加に関して分析物（５）に対して特異的で、この複合体は収納手段（１）から分離してチャンネルを開口させる。したがってこの事例では、スイッチ切り換えメカニズムは、活性化のために抗体およびプロトン付加反応の両方を必要とする。これはより高い正確性を提供し、バックグラウンドの基質透過性を減少させる。
チャンネルペプチド（９）による開口によって酵素基質（Ｓ）が進入し、これはシグナル発生手段内の酵素（１１）に作用してシグナルを発生させる。

【００７１】

ナノスフェア内のシグナルを発生させるためにチャンネル、ポアを形成するかまたは膜のリポソーム収納試薬の透過性を変化させる上記のアプローチの他に、サンプル中の遊離基質を収納酵素と接触させることによって、またはイオングラジエントを崩壊させることによって、ナノスフェア内の触媒活性を始動させる方法を本発明にしたがって実施できる。特異的に不活性酵素を再活性化させるか、基質または触媒活性を挿入するペプチドを用いる方法が研究されてきた。

【００７２】

また別の実施態様（図３）では、活性化は抗体、プロトン付加およびアポ酵素反応の合体を必要とする。この事例でには、抗体（１５）結合が補助因子の収納手段（１）への進入およびアポ酵素（１８）の結合を防御することができるようにハプテンおよび補助因子がシグナルペプチド（１４）に結合している。
封鎖または競合抗体と分析物の結合が、ペプチド－ハプテン－補助因子共役物のリポソームへの進入を可能にする。補助因子およびアポ酵素の再構成は酵素を活性化させシグナルを発生させる。

【００７３】

以下の実施例は本発明を具体的に説明する。下記実施例は、ペプチドによって始動することができ、さらにサンプル内またはリポソームもしくはナノスフェア表面に結合している生物学的検出反応と共役させることができるリポソーム収納反応を提示する。
リポソーム膜が基質に対して透過性になっている場合でさえ強い蛍光生成物が容易に収納されるために、ELF-97の収納反応は特に有用であることが分かった。沈降実験（例えば粒子を凝集させるためにプロトアミンまたはアビジンを使用する）によって、この反応は粒子に局在することが示された。

【００７４】

（実施例）

実施例１：４１merペプチドおよびイオノフォアによって仲介されるイオン輸送に続くリポソーム収納ピラニンの蛍光

リポソームに含まれる１ｍＭビス－トリスおよび５０ｍＭ K_2SO_4（ｐＨ７．５）中の１ｍＭピラニンを、約２５倍希釈で（例えば１００μｌを２．４ｍｌに）ｐＨ７．０の緩衝液（１ｍＭビス－トリスおよび５０ｍＭ K_2SO_4を含む）に加えてｐＨグラジエントを形成する。リポソームは、クロロホルム中の１２０μｌのダイズレシチン（Sigma Type IV-S)を１００ｍｇ／ｍｌの濃度で丸底フラスコの底にスメアさせ、アルゴンガスの気流下で（５－１０分）乾燥させて調製した。上記のピラニン溶液（１．８７ｍｌ）をアルゴンガス下で乾燥レシチンに添加し、２から３時間震盪し、迅速な凍結融解（液体窒素下で凍結し続いて熱い水道水で融解）を５サイクル実施し、続いて２枚の１００ｎｍのポアサイズをもつヌクレオポア（Nucleopore）メンブレンフィルターを通して押し出した。非収納ピラニンは、ＰＤ－１０カラムを１ｍＭビス－トリスおよび５０ｍＭ K_2SO_4（ｐＨ７．５）で溶出させるゲル濾過で除去した。リポソーム透過性４１merペプチド、プロトンイオノフォア（ＣＣＣＰ）およびカリウムイオンイオノフォア（バリノマイシン）は、それぞれ２．２μＭ、１．６μＭ、および１．６μＭの濃度で添加した。４１merペプチドは、SEAGGSSSFASNNIYGIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ－アミドの配列であった。

【００７５】
蛍光は分光蛍光計を用いてモニターした。蛍光の検出可能な変化は、４１merがリポソーム膜に結合するときに観察され、さらに残りのｐＨグラジエントを崩壊させるためにイオノフォアでさらに処理（バリノマイシン＋ＣＣＣＰ）することによってさらに小さな変化が生じた（図４）。
しかしながら同時に、４１merペプチドおよびイオノフォアの添加に際して光散乱における小さな変化が示され（図５）、洗剤（トリトンＸ－１００）で処理するまでリポソームは実質的に無傷のままで、ピラニンは収納されたままであることが示唆された。コントロールは、リポソームが溶解されたとき光散乱で相当な減少を生じた。
蛍光の変化は（上記のように）分光蛍光計でモニターできるが、反応リポソームと非反応リポソーム粒子間の相違は、それらを（後の実施例と同様な態様で）蛍光単粒子検出装置によって十分に識別できた。
【００７６】
実施例２：コバルトイオン誘発蛍光
蛍光色素（ELF-97、Molecular Probes Inc.)は水溶性で、未反応形では非蛍光性（より長い波長で）で、反応形では不溶性で蛍光性（より長い波長で）である。
ＥＬＦ（１０μＭ）の蛍光を２０μｌの塩化コバルト溶液（２ｍＭ）を添加した後モニターした。ＥＬＦの赤色にシフトした蛍光放射は、コバルトイオンに暴露したとき徐々に増加した。
ＥＬＦ色素とコバルトイオンの反応によって形成された蛍光複合体は、通常のＥＬＦ生成物（アルカリフォスファターゼによって生成）のそれと同一の励起スペクトルを有する。しかしながら、放射スペクトルは通常の酵素生成不溶性生成物のように相当に赤色シフトするが、そのピーク放射はわずかに短い波長で認められる。
【００７７】
ＥＬＦとのコバルト複合体の放射スペクトル（図６のトレースａ）は大きさが増加し、アルカリフォスファターゼによって触媒されたＥＬＦ反応によって生成された通常の沈殿物（トレースｂ）の放射と比較して赤色シフトを示した（以下を参照）。しかしながら、励起スペクトル（図７）はピークの位置の顕著なシフトは示さなかった。
したがってこの系は本発明で特に有用であろう。コバルトイオンへの暴露は（例えば分析物の存在下でリポソームに直接的または間接的に透過性を付与した結果として）、ＥＬＦ蛍光で赤色シフトをモニターすることによって検出できる。
【００７８】
実施例２ａ：コバルト誘発蛍光の更なる研究を実施した
特に記載がないかぎり、実験では１０μＭのELF-97を４μｌ、１０ｍＭトリス（ｐＨ７．１）を１．５ｍｌ、およびアルカリホスファターゼリポソームを１０μｌ使用した。コバルトイオンは２ｍＭの塩化コバルト溶液により供給した。ＥＬＦという用語は、モリキュラープローブ社が供給するELF97を指すために用いられる。
図６は、ＥＬＦ沈殿物およびコバルト処理沈殿物の蛍光放出を示す。コバルト処理は２０μｌのコバルト溶液を添加し、１時間保温して実施した。コバルトとともに保温したサンプルのトレースは顕著に高く、励起ピークも２０ｎｍのオーダーで移動した。コントロールトレース（図７）では励起ピークのシフトは認められなかったが、ただしコバルトサンプルはわずかに高い吸収を示した。
【００７９】
図８は、コバルトの存在下で通常の生成物は安定であることを示している。２０μｌのコバルトを１５時間にわたって生成させた生成物に添加した。続いてこのサンプルをコバルト添加後１０、４５、９２および２４０分で測定した。放射の変化は観察されなかった。このことは、コバルトは生成物に対して直接的に作用せず、通常の生成物反応は少なくとも４時間の間コバルトの存在下で不可逆であることを示している。通常の生成物反応の蛍光の大きさは１時間以内で安定であるが、一方この反応は完了しておらず、この時点でのコバルトの添加はコバルト生成物の発生をもたらすかもしれないことが示された。

【００８０】
実施例３：酵素基質によって始動させた蛍光
この実施例ではアルカリホスファターゼをリポソームに収納し、サンプル内の蛍光発生基質（ELF97）から分離させた。当該基質に対するリポソーム膜の透過性獲得時に、産生された蛍光生成物はリポソームに収納されていることが明らかにされた。
【００８１】
カルセインおよびアルカリホスファターゼリポソーム並びにブランクリポソームを周知の方法で調製した。ビオチン付加リポソームおよび通常の（非ビオチン化）リポソームを通常の押出し法で製造した。典型的には、１：１クロロホルム／メタノール溶液中のホスファチジルコリン（４０ｍｇ）、コレステロール（１１ｍｇ）およびジヘキサデシルホスフェート（２．８ｍｇ）組成物を調製し、ビオチン付加リポソームの場合にはさらに３０２μｌの０．５８％（ｗ／ｖ）ビオチン－ＤＰＰＥ（ビオチノイルジパルミトイルホスファチジルエタノールアミン（Pierce）溶液と混合した。この混合物を乾燥させ、典型的には３．７５ｍｌの１０ｍＭトリスＨＣｌ（ｐＨ７．１）（６．５ｍｇ（１００００ユニット）のアルカリホスファターゼ酵素（Sigma)または１２０ｍＭのカルセイン色素を含む）で水和させた。リポソームは４００ｎｍ続いて２００ｎｍのポリカーボネートフィルターから押し出すことによって製造した。非捕捉酵素からの精製はゲル濾過（セファロースＣＬ－６Ｂ（Pharmacia)）によって実施した。バックグラウンド酵素活性は、固定トリプシンで外部結合酵素を処理することによってさらに減少させた。トリプシンビーズ１００ｍｇ（Sigma)を１ｍｌのリポソーム調製物に添加し、メカニカルローラー上で１１時間混合し、その時点でビーズをろ過によって除去した。
【００８２】
実施例３ａ：遠心実験
以下の結果は、収納手段としてリポソームを用いた基質チャンネル手法の潜在的可能性を示す。
コントロール反応として、２ｍｌの１０ｍＭトリスＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７）中のアルカリホスファターゼを４μｌ（５ｍＭ）のＥＬＦ基質とともに保温し、全シグナルをモニターした（図９、トレースａ）。得られた生成物を遠心し（１３０００ｇ、２０分）、コロイド複合体またはより小さな複合体を含む上清分画（トレースｃ）および続いて同じ容積に再懸濁させた沈澱分画（トレースｂ）について蛍光を記録した。励起および放射波長はそれぞれ３６５ｎｍおよび５１５ｎｍであった。
【００８３】
これらの結果は、蛍光をもつＥＬＦ生成物は相応に大きな複合体（これはリポソーム中に輸送されるには大きすぎる）であることを示している。リポソームに収納されていないアルカリホスファターゼによって形成された蛍光生成物は基質と比較して水に不要であった。反応の後で、生成された複合体は励起二量体蛍光を生じた（励起二量体またはエキサイマーの形成を促進する色素分子間の緊密な接触によって強化される）。図９の結果は、いくつかの複合体は低速遠心で沈降することが可能なサイズに凝集し、他の複合体はより小型であることを示している。
【００８４】
１０ｍＭのトリスＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７）中の通常の（非ビオチン化）アルカリホスファターゼリポソーム（１０μｌ）および2ｍｌのアッセイ容積で、１０μｇのリポペプチドミニ－ミリステート化ＧＡＬＡ（以下の構造のミニ－ｍ－ＧＡＬＡ：ミリスチック－LAEALAEALEALAA）を用いて反応を始動させて基質チャンネルを形成する。ＥＬＦ基質の反応後、同様な低速遠心実験（１２０００ｇ、２０分）を実施し結果を図１０に示した。
この結果は、同じ容積に再懸濁させた沈澱分画の蛍光は無視できるもので（トレースｂ）、実質的に全ての蛍光は上清分画に出現し（トレースａ）、これは増加を続けることを示している。このことは、蛍光複合体はリポソーム内に保持されていることを示唆している（リポソームは低速遠心で沈降するには小さすぎる）。
【００８５】

実施例４：ペプチド仲介蛍光シグナル（非ビオチン化リポソーム）

以下の実験は、ペプチドによって仲介される蛍光シグナルの発生についての可能性を示す。

条件は上記（実施例３ａ）のとおりであった：アルカリホスファターゼ収納リポソーム１０μｌを２．５ｍｌの緩衝液に加え、５ｍＭのELF-97基質４μｌの存在下で多量のミニ－ｍ－ＧＡＬＡペプチドを用いて反応を始動させた。反応の進行は分光蛍光計を用いて２０分間記録した（図１１）。１０μｇのミニ－ｍ－ＧＡＬＡペプチドを用いた始動により、生成物の形成は強化され（トレースｂ）、より高レベルのペプチド（２０μｇ）はより迅速なシグナルの発生をもたらした（トレースａ）。

【００８６】

これは部分的にはアルカリホスファターゼの遊離（リポソームを破壊させる”溶解性”作用による）のためと考えられる。図１１の結果は、２０μｇのレベルではペプチドは相当に”溶解性”で、一方１０μｇのレベルのペプチドは顕著には”溶解性”ではない。コントロール実験で観察された非特異的シグナル（トレースｃ）は、リポソーム調製物のわずかなバックグラウンド（外部）酵素活性から生じたと考えられるか、および／またはＥＬＦ基質の緩徐な進入、または膜内へのその参入を含むのかもしれない。

【００８７】

実施例５：ペプチド仲介比色シグナル（非ビオチン化リポソーム）

酵素の比色アッセイを用いて平行的に実施した実験では、９００μｌの１０ｍＭトリスＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７）、１０μｌのリポソームおよび１００μｌの１ｍｇ／ｍｌｐ－ニトロフェニルホスフェート（ＰＮＰ）基質を含むアッセイ容積を作製した。ＥＬＦ基質（５ｍＭを４μｌ）を記録の直前に加え（図１２、トレースｃ）、一方、トリトンを表示のようにコントロール実験に添加した（トレースａ）。ＥＬＦ生成物については（トレースｂ）、この生成物は実施例３ａのように生成され、ＰＮＰを９００μｌのサンプルに添加した。これを続いて分光光度計にアッセイのために移した。吸収を４０５ｎｍ波長で持続的に記録した。

より感度の高いＥＬＦ蛍光測定と比較して、ＰＮＰ比色アッセイは、ＥＬＦの存在下で低いバックグラウンド活性を示した（バックグラウンド活性はＥＬＦ基質よりはむしろＥＬＦ生成物の存在下で高かった）。

【００８８】

実施例６：ペプチド仲介比色シグナル（ビオチン付加リポソーム）

９００μｌの１０ｍＭトリスＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７）、１０μｌのリポソームおよび１００μｌの１ｍｇ／ｍｌｐ－ニトロフェニルホスフェート（ＰＮＰ）基質を用い実施例５と同様な態様で比色アッセイを実施した。結果は図１３に示されている。トリトンの非存在下では顕著な活性は存在せず（左側）、一方、トリトン添加で活性が出現した（右側）。バックグラウンド酵素活性（これはリポソームを溶解させるトリトンの添加で遊離させることができた）はほとんど存在しなかったので、ビオチン付加リポソームは、リポソームの外側への顕著な酵素結合がなく安定性が高いように思われる。

【００８９】

アルカリホスファターゼ収納ビオチン付加リポソームもまた、ELF-97基質によるわずかな非特異的（反応始動によらない）シグナルを示した。

用いたアッセイ条件は以下のとおりであった：１０μｌのリポソームおよび４μｌのELF97基質（５ｍＭ）を含む１０ｍＭトリスＨＣｌ緩衝液で構成される１ｍｌのアッセイ容積。発生シグナルをモニターし、結果は実質的に速度０を示した（図１４、トレースｂ）。続いてトリトンを添加し多くのシグナルが発生した（トレースａ）。

【００９０】

実施例７：ミニ－ミリスチックＧＡＬＡペプチドとビオチン付加リポソームによる基質チャンネル形成

実験条件は、非ビオチン化リポソームについて上記の実施例４で用いたものと同じであった。ビオチン付加リポソームはペプチド（１０μｇ）で反応を始動させた。その速度は、

３０分処理（トレースｂ）および６０分処理（トレースａ）について図１５で示したとおりで、これは、顕著な活性を示さなかったペプチド無添加のコントロール（トレースｃ）と比較できる。
ビオチン付加リポソームの場合、非特異的シグナルの発達は除去できたが、特異的シグナルの発達は非ビオチン化リポソームを用いた場合よりもはるかに緩徐であった。これは、ペプチドチャンネルのみを介する基質で予想されるより緩徐な拡散と一致する（すなわち以前のデータはペプチドチャンネル＋非特異的バックグラウンドのものであった）。
【００９１】
実施例８：リポソーム凝集によるシグナルの局在
１０μｌのリポソームを含む２ｍｌの１０ｍＭトリスＨＣｌ緩衝液（ｐＨ７）を４μｌのELF97基質（５ｍＭ）で処理した。アビジン（４μｇ）を添加してリポソームの凝集を惹起させるときは、サンプルは９０分保温した。凝集リポソームを沈降させて（遠心によらない）、上層の清澄層を取り出し蛍光を記録した。同様に凝集リポソームを再懸濁させシグナルを記録した。結果は図１６に示す。
明らかなように、シグナルは多くがリポソーム分画に結合していた（トレースａ）。非リポソーム性ELF生成物を沈降させないようにここでは遠心を用いていないので、上清層に残されたシグナル（トレースｂ）は不完全な沈降および不完全な凝集で説明できる。
明らかにビオチン付加リポソーム酵素は、アビジンによるリポソームの凝集に続いて沈降させることができる。
【００９２】
実施例９：非特異的シグナルの消光
上記の実施例を実施している間に、比色アッセイのためのｐ－ニトロフェニルホスフェート（ＰＮＰ）基質は、ELF97生成物の蛍光を消光することができることが観察された。
図１７（トレースａ）は、非消光生成物の放射スペクトルを示している（０．９ｍｌのトリス緩衝液（ｐＨ７）、４μｌのELF97基質、１０μｌのリポソーム性アルカリホスファターゼおよび１０μｌのトリトン）。最初のスペクトル（トレースａ）を記録した後でＰＮＰ（１００μｇ）を添加し、消光トレースｂを得た。放射スペクトルは真の消光を示す（いずれの波長シフト消光とも異なっている）。
この観察は、サンプル中のＥＬＦの顕著な一切の非収納蛍光、したがって非特異的蛍光を維持するために有用であった。
【００９３】
実施例１０：ｐＨによってスイッチが切り換えられるＴＮＰ－ＧＡＬＡ活性
ＧＡＬＡペプチドのｐＨによるスイッチ切り換えの潜在能力を示すために、ＧＡＬＡペプチド単独およびハプテンのトリニトロフェノール（ＴＮＰ、爆発性ＴＮＴの類似体）をそのＮ末端に結合させたＧＡＬＡペプチドの存在下で、蛍光カルセインリポソームを種々のｐＨ値でアッセイした。カルセインアッセイは、１４０ｍＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭ緩衝液の２ｍｌで実施した。酸性緩衝液として酢酸ナトリウムをｐＨ５．４で用い、一方トリスＨＣｌはｐＨ７．４のために用いた。アッセイでは、３μｌのカルセインリポソームを２ｍｌのアッセイ緩衝液に添加して蛍光を記録した。ペプチドは定常基準線が得られた後で（通常は１００秒以上）添加され、その後に溶解が続いた。
【００９４】
このペプチドは、本アッセイではｐＨ感受性であり、より低いｐＨ値で活性のスイッチが入った。ｐＨ感受性は、アスパラギン酸残基のプロトン付加によって誘発されるヘリックス形成の結果であると考えられている。このペプチドがより低いｐＨのときそのヘリックス形態でリポソーム小胞に進入するときポアが形成され、このポアはより高いｐＨでその構造が元に復帰するとき存在しなくなると考えられている。ＴＮＰによるＧＡＬＡの改変は全体的な活性にほとんど影響を与えなかったが（図１８参照）、しかしながらこの改変によってこの酸性反応はアルカリ領域にもう少し移動した。この改変はＮ末端で領域特異的に行われ、この領域はヘリックスの安定化に必要とされないので、活性の保持は予想されていた。

【００９５】
標準的なリポソーム収納アルカリホスファターゼナノスフェアに対するＴＮＰ－ＧＡＬＡの影響は、比色アッセイによって、このペプチドは酵素を遊離しないが、一方カルセインを遊離することを示した。このことは所望のペプチドチャンネルサイズを選択できることを示唆している。形成されたポアは、小さな分子（例えば基質）のナノスフェアへの輸送は許すが、大きな分子（例えば酵素または蛍光複合体）の輸送を許さないようになっているようである。
【００９６】
実施例１１：酸性ｐＨでアルカリホスファターゼによって生成された蛍光生成物
種々の緩衝液へのELF基質の添加を調べ、これらは蛍光生成物の産生に対してどのような影響をもつかを観察した。生成物は上記の実施例２で述べたように形成したが、ただしコバルトイオン溶液が添加されていない種々の緩衝液が用いられた。
励起は３５５ｎｍで放射は５２５ｎｍであった。蛍光モニタリングの結果は図１９に示されている。
典型的な実験では、５ｍＭのELF97（４μｌ）を含む２ｍｌの１０ｍM酢酸ナトリウム緩衝液（ｐＨ５．７）を用い、さらに１０μｌのリポソームを添加した。
【００９７】
図１９は、サンプルの製造直後に測定した一連の緩衝液で構成されたサンプルの強さを示す。即時シグナルは、トリス緩衝液が最も適切で、さらに驚くべきことにはこの酵素はｐＨ４でも活性をもつことを示した。図１９では、トレースの番号は最初の最も高いものからその後に続く緩衝液に対応する：
（ａ）１０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ８（ピークの強さは１５５．７６）
（ｂ）１０ｍＭトリスＨＣｌ、ｐＨ７．１（ピークの強さは１５５．７６）
（ｃ）クエン酸ナトリウム、ｐＨ６．２５（ピークの強さは１５５．７６）
（ｄ）酢酸ナトリウム、ｐＨ４（ピークの強さは１５５．７６）
（ｅ）リン酸ナトリウム、ｐＨ７．６（ピークの強さは１５５．７６）
【００９８】
１時間後、結果は図１９ａで示すように逆転した。酸性サンプルはｐＨ４でさえも高い強さを示した。さらにトリス緩衝液を除く全てのトレースはブルーシフトを示すようであった。コントロールは励起ピークの位置に違いはなく、相対的な吸収の変化を示しただけであった
２６時間後（図１９ｂ）、トリス緩衝液（ａ，ｂ）を除く全てのサンプルはブルーシフトを示した。周波数シフトは同じであったが、ｐＨ４のサンプルは、トリス緩衝液のそれと同じ強さに減少した。ブルーシフトは単にｐＨ基準で出現しないが、緩衝液のタイプに左右されるらしいことが観察された。放射スペクトルのピークは全体を通して位置が変わらなかった。
【００９９】
驚くべきことに、ＥＬＦが蛍光生成物を産生する反応は酸性ｐＨでアルカリホスファターゼによって触媒されるようである。通常は、アルカリホスファターゼはそのようなｐＨで検出可能な活性をもたない。蛍光生成物のホスファターゼ触媒産生はｐＨ４で発揮され、この場合ＥＬＦ基質のそのような緩衝液による前処理は、酵素の添加に際して予想しなかった迅速な反応をもたらした。
これは、上記で示すように低ｐＨでＴＮＰ－ＧＡＬＡペプチドが活性を有するとき本発明に有用である。したがってアルカリホスファターゼの触媒作用は同様な反応条件で利用できる。
【０１００】
実施例１２ELF-97基質と反応させるためのリポソーム収納アルカリホスファターゼナノスフェアのＴＮＰ－ＧＡＬＡによる始動
一連の実験で、シグナル発生アルカリホスファターゼ酵素を収納するナノスフェアを、ｐＨ５．７でELF97基質の存在下でＴＮＰ－ＧＡＬＡペプチドで処理し、反応の進行を蛍光

の発達によって持続的に測定した。コントロール実験ではペプチドは添加されなかった。結果は図２０に示されている。
蛍光シグナルの増加がペプチドの存在下で観察された。上記の観察を基に、ペプチドは、ナノスフェア粒子中に基質を拡散させるチャンネルを形成すると結論した。いったん中に入れば、酵素の触媒作用はこれを生成物に変換し、これは、ペプチドによって形成された小さなポア（サイズが１ｎｍ以下）を通って侵入または拡散するには大きすぎる複合体または固形物が形成されるために物理的に捕捉される。
【０１０１】
発生したシグナルをリポソーム分画に結合させること担保するために、プロタミン存在下でのリポソーム凝集を用いた。結果は図２１に示されている。
リポソーム収納ホスファターゼによるＥＬＦ生成物の産生は上記のようにＴＮＰ－ＧＡＬＡによって始動させた（トレースｂ）。この調製物をプロタミン（１ｍＭ）で処理した。蛍光生成物の５０％以上が低速遠心（２０００ｇ、１０分）で沈降し（トレースｃ）、上清分画（トレースａ）にはほとんど残存しないで、蛍光生成物は主にリポソーム収納アルカリホスファターゼナノスフェア系に収容されていることを示した。
【０１０２】
実施例１３：ｐＨによりスイッチが入る、リポソーム収納アルカリホスファターゼのナノスフェアにおけるＴＮＰ－ＧＡＬＡ始動によるＥＬＦ生成物の産生
同様な方法を用いて、リポソーム収納アルカリホスファターゼのナノスフェア上のＴＮＰ－ＧＡＬＡ活性に対するｐＨによるスイッチ切り換えおよび抗体による封鎖の影響を調べた。
基質の反応はｐＨ５．４でＴＮＰ－ＧＡＬＡによって始動されたが、ｐＨ６．４では始動されないことが分かった（図２２）。
ある容積中の抗ＴＮＴモノクローナル抗体のＴＮＰ－ＧＡＬＡ始動リポソーム系への添加で（図２３）、ＴＮＰ－ＧＡＬＡペプチドの活性は定量的に阻害された。これは、トレースによって表示したように種々の量の抗ＴＮＴ抗体でカルセインリポソームを用いた通常の遊離アッセイによって示されたとおりであった。
【０１０３】
ＴＮＰ－ＧＡＬＡの活性を封鎖するために、３０μｌの抗体の存在下で反応を繰り返したが、この事例では種々の量のＴＮＴも反応に添加した。結果は図２４に示されている。ＴＮＴは定量的にＴＮＰ－ＧＡＬＡの抗体封鎖と競合し、シグナルが発生した。
したがって、リポソーム収納アルカリホスファターゼナノスフェア中に収納されたＥＬＦ蛍光生成物の産生はＴＮＰ－ＧＡＬＡペプチドによって始動され、このペプチドの活性はｐＨおよびＴＮＰハプテンへの抗体結合によって改変されることが示された。
【０１０４】
実施例１４：ペプチドの膜貫通挿入
チャンネルを形成するよりはむしろ（またはいくつかの事例ではチャンネル形成に加えて）、ペプチドを膜を貫通して挿入させるために用いることができる。脂質二重層によって提供される透過性障壁の破壊による顕著な広範囲の透過性の変化を惹起しないで、一連のペプチドを膜中または膜を貫通して挿入することができる。そのような態様の典型的なものは、ＦＩＴＣを含むかまたは含まないシグナルペプチド（例えば下記に挙げたもの）である。
Ｐ２５：(FITC)-MLSLRQSIRFFKPATRTLCSSRYLL－アミド
Ｐ３４：(FITC)-MLSLRQSIRFFKPATRTLCSSRYLLQQKPVVKTA-アミド
（Molecular and Membrane Biology, 2:183-192(1995）を参照されたい）。
【０１０５】
結合、挿入および貫通を明らかにするために、最初に上記のペプチドまたはリン脂質のどちらかを、前者を蛍光プローブ（フルオレセインイソチオシアネート類似体、ＦＩＴＣ）で後者をフルオレセイン（フルオレセインホスファチジルエタノールアミン、ＦＰＥ）で標識した。生じた蛍光の変化をシグナル発生の特異的始動手段として用いることができ、

またペプチドの挿入および貫通を用いて触媒活性を始動させることができる。そのようなペプチドの挿入および貫通活性もまた抗体を用いて定量的に阻害することができることは上記から理解されよう。

【０１０６】

リポソームの二層膜は外側および内側リン脂質の小葉を有する。リポソームは両方の小葉に（ＦＰＥをリポソーム調製物に取り込ませることによって）、および外側小葉にのみ（リポソームの調製後フルオレセインでＰＥ改変することによって）ＦＰＥを用いて調製した（Biochem. 35:10931-10937(1996)）。迅速な結合および蛍光の変化のモニタリングによって、シグナルペプチド（Ｐ２５、Ｐ３４）の結合および挿入を迅速な（１から１００ミリ秒）タイムスケールおよび緩徐な（１－５０秒の挿入）タイムスケールプロセスで測定した。

【０１０７】

１から１００ミリ秒のタイムスケールでの結果は図２５に示されている。これらは、ＦＰＥ標識リポソームとのｐ－２５の結合を示す２つのシグナルを示している。１つのシグナルは、ＦＰＥが外側小葉にのみ存在するときに産生され、１つは両方の小葉が標識されているとき産生される。ペプチドがリポソームのリン脂質に結合したとき蛍光の迅速な増加が示される。これは、外側小葉のみまたは両方（外側および内側）の小葉にＦＰＥを有するリポソームのいずれをモニターしても、同じ規模および動力学を有していた。

【０１０８】

１から５０秒のタイムスケールで得られた結果は図２６に示されている。これは、ペプチドが挿入されたとき緩徐なその後の蛍光の減少を示し、これは、ＦＰＥが外側小葉にのみ存在するときに大きく、挿入のプロセスを示唆している。２つのトレースの引き算は、内側小葉がシグナルペプチドと反応するときに得られたシグナルを示す。これは図２７に示されている。

これらの結果は、シグナルペプチドの迅速な（ミリ秒）結合および非改変シグナルペプチドの膜二重層の内側小葉への緩徐な（秒）挿入と貫通を示している。

【０１０９】

実施例１５：水／リン脂質境界で露出されるように分子部分を結合させるためにシグナルペプチド挿入を利用する

挿入ペプチドは、抗フルオレセイン抗体が蛍光を消光できるように当該ペプチドのＮ末端をフルオレセインで標識した。抗体はそれ自体では膜の中に侵入できないことは分かっている。

蛍光ＦＩＴＣ－Ｐ２５（５０μｇ／ｍｌの１０μｌ）を２ｍｌの１０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．１）に添加し、蛍光放射をスキャンした（図２８、トレースａ）。このペプチドを同じ緩衝液中のリポソーム（５０μｌ）にも添加し、その放射を直ちに（トレースｂ）および１分後に（トレースｃ）スキャンした。抗フルオレセイン抗体（０．１ｍｇ／ｍｌの１０μｌ、Sigma)の添加時に蛍光の放射は顕著に消光された（トレースｄ）。抗体は顕著な蛍光を示さなかった（トレースｅ）。

【０１１０】

同じ実験をより長いシグナルペプチドＰ３４で実施した。蛍光ＦＩＴＣ－Ｐ３４（５０μｇ／ｍｌの１０μｌ）を２ｍｌの１０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．１）に添加し、蛍光放射をスキャンした（図２９、トレースａ）。このペプチドを同じ緩衝液中のリポソーム（５０μｌ）にも添加し、その放射を１分後にスキャンした（トレースｂ）。抗フルオレセイン抗体（０．１ｍｇ／ｍｌの１０μｌ）の添加時に蛍光の放射は顕著に消光された（トレースｃ）。抗体は顕著な蛍光を示さなかった（トレースｄ）。

この事例では、同様なわずかの蛍光の減少がペプチドのリポソームへの結合時に観察されたが、実質的に全ての蛍光が抗体の添加時に消光された。このことは、このペプチドは大きくて膜の上により広く差し渡されるためこのペプチドと結合する分子部分に向けてその存在をより明瞭に示すことができるので予想されたことであった。

【０１１１】

実施例１６：ヘム触媒活性の挿入
最初の開陳は以下の物質による膜の”シーディング”に依存している：１３（Ｓ）－ヒドロペルオキシ－9,11(シス，トランス)－オクタデカジエン酸（１３－ＨＰＯＤＥ）、脂質ペルオキシド、これは図３０にに示した模式図にしたがってフェリル種を形成するヘムと反応し、これは続いて更なるペルオキシドを形成する脂質塊と反応する。
脂質ヒドロペルオキシドである１３－ＨＰＯＤＥは、１００ｍＭの四ホウ酸二ナトリウム緩衝液（ｐＨ９．４）中でダイズのリポキシゲナーゼ－１によってリノール酸を過酸化して製造した。ＨＰＬＣによる精製後、１３－ＨＰＯＤＥ（８０μＭ）の吸収スペクトルを調べた（図３１）。これは２３４ｎｍでピークを示し、共役ジエンの吸収はこの部位で生じる。

【０１１２】
酸素の取り込み（図３２）によって分かるように、１３－ＨＰＯＤＥ処理ナノスフェアへのヘミンの添加は脂質の完全な過酸化をもたらす。１００ｍＭのヘペス緩衝液（ｐＨ７．５）中での超音波処理によってリポソームを調製するためにアソレクチンを使用した。イオンキレーターＥＤＴＡ（１００μＭ）の存在下で、リポソーム（１ｍｇ／ｍｌ）をヘミン（１０μＭ）および１３－ＨＰＯＤＥ（４９μＭ）と保温した。

【０１１３】
光学的に実施した類似の実験によって、脂質共役ジエン含有量の変化（過酸化のための予想された）およびヘミンスペクトルの変化を示すこの結果が確認された。アソレクチンナノスフェア（１５０ｍＭのカルボキシフルオレセインで被包化）は、１００ｍＭヘペス／１００μＭ中でｐＨ７．５で超音波処理によって調製した。反応はパーキン－エルマー（Perkin Elmer）蛍光計でモニターした（励起波長４８５ｎｍおよび放射波長５２０ｎｍ）。ヘミン（５μＭ）および１３－ＨＰＯＤＥ（４５μＭ）を標識ナノスフェアに添加した。酸素は緩衝液中を二度泡だてて通した。結果は図３３に示した。蛍光の強さの増加が観察された。この増加は、カルボキシフルオレセインが遊離され、したがって蛍光を増したことを示している。トリトンＸ－１００は反応終末点を調べるために添加した。

【０１１４】
したがって、被包化カルボキシフルオレセインを収納するナノスフェアへのヘミンの添加は、過酸化の結果として蛍光の増加をもたらした。コントロール実験（ここには提示されていない）は、蛍光の増加をもたらしたのは脂質＋ＨＰＯＤＥ＋ヘムの組み合わせのみであることを示した。

【０１１５】
実施例１７：また別のヘム供給源の使用
また別のヘム供給源は、過酸化性であることが知られているヘム蛋白質である（すなわち、ミオグロビンまたはヘモグロビン）。
１５０ｍＭのカルボキシフルオレセインを収納するナノスフェアを、１００ｍＭヘペス／１００μＭ ＤＴＰＡ中でｐＨ７．５で超音波処理によって調製した。ミオグロビン（２μＭ）をナノスフェアに添加し、５２０ｎｍでの放射を時間の関数として追った。励起波長は４８５ｎｍであった。結果は図３４に示されている。

【０１１６】
カルボキシフルオレセイン（１５０ｍＭ）を収納するナノスフェアをｐＨ７．５で１００ｍＭヘペス／１００μＭ ＤＰＴＡ中で超音波処理して調製した。図３５に示したように、１００ｎＭ（低濃度）のヘモグロビンをナノスフェアに添加したとき、蛍光発光団はゆっくりと遊離した。
これらの結果は、ミオグロビンおよびヘモグロビンの両方が有効であることを示している（ヘモグロビンは特に有効である）。コントロール実験は、ヘモグロビンはカルボキシフルオレセインに直接作用をもたないことを示した。

【０１１７】
実施例１８：触媒基質としての挿入ペプチド
カルジオリピン（ＣＬ）が膜に取り込まれるときのシグナルペプチドＰ２５の結合速度を

調べた（図３６の説明参照）。ｐ－２５に対する結合速度定数のペプチドへの依存性をモデルにしたがって分析した。このモデルでは、結合工程に取り込まれ、続いてリポソームの表面でペプチドが再構成され、完全な蛍光強化を生じる。このモデルは一般に以下のように表される：

ａ＋ｂ←^{K}→ｃ－^{k}→ｄ

さらに具体的には以下のように表される：

Ｐ－２５＋ナノスフェア←^{K}→最初の複合体←^{k}→最後の複合体

このモデルは以下の等式によって表される：

K_{obs}＝K*k*〔ｐ－２５〕／１＋K*〔ｐ－２５〕

式中、Ｋは結合平衡定数で、ｋは表面での再構成のための速度定数で、〔ｐ－２５〕はペプチドの濃度である。

【０１１８】

３つのリポソーム集団（通常のホスファチジルコリン（ＰＣ）および種々のレベルのＣＬを補充したものを含む）のためのＫおよびｋの値は以下のとおりであった：

リポソームのタイプ	Ｋ (M^{-1})	ｋ (s^{-1})
PC (◆)	$1.8\pm0.2\times10^{5}$	$1.56\pm0.09\times10^{3}$
CL／PC(1/50) (■)	$3.1\pm0.3\times10^{5}$	$1.37\pm0.08\times10^{3}$
CL／PC(1/30) (▲)	$3.5\pm1\times10^{6}$	$8.52\pm0.4\times10^{2}$

結果はこのモデルと適合し、陰性荷電の添加時に陽性荷電ペプチドとリポソームとの間の結合定数の増加を説明する。興味深いことには、おそらくある程度の立体的移動の束縛を生じるペプチドおよび表面の固有の電荷間のより緊密な結合によって、表面における再構成のための速度定数は減少する。

【０１１９】

ＣＬは２つのリン酸基をもち、陽性荷電ペプチドの結合増加を説明できる。この速度増加は予想外の振幅の減少を伴った。

この後者の現象は、膜に取り込まれたときの蛍光発光団（ＦＰＥ）の特性に対する陰性荷電脂質の影響を決定することによって重点的に調べられた。二重層を通過するＦＰＥの輸送が増加することが見出された。

したがって、陰性荷電脂質（例えばカルジオリピン）は結合速度、特に挿入速度を高め、さらに二重層を通過するＦＰＥの輸送を高める傾向がある。

【０１２０】

実施例１９：ｐＨは蛋白分解切断に影響を与える

ｐ２５のようなペプチドの蛋白分解切断の検出を含む１つの方法はｐＨを測定するものである。入ってくるペプチドの加水分解はＦＰＥの蛍光により検出できる。

ｐＨ７（カルボキシル基が脱プロトンされアミノ基がプロトン付加されるｐＨ）では、正味のプロトンの溶液中からの取り込みも容器中への放出もないことが見出された。しかしながら、ｐＨ９ではアミノ基が部分的にプロトン付加されるのでプロトンの放出が認められた。検出される変化の大きさはペプチドの更なる改変によって増加した。

【０１２１】

例えば、ペプチドをエステル(ＴＡＭＥ)に置換することによってより強い蛍光シグナル変化が得られた。トリプシンによるＴＡＭＥの加水分解は、ＨＣｌの標準物と比較して１分子当たり平均して０．６プロトンを遊離させた（図３８）。ＴＡＭＥ：ＨＣｌプロットの勾配比は０．６２５８である。この値は、定量可能なアルギニン基によるいくつかのプロトンの取り込みのために単位量よりも小さい。

この実験は、ＦＰＥ蛍光はエステルの加水分解をモニターすることを示している。

【０１２２】

典型的には、トリプシンまたはキモトリプシンの場合は、直径約１００ｎｍのリポソームに約２００－３００分子のプロテイナーゼを収納できる。小型で比較的親水性の基質分子（例えばキモトリプシンのためにはベンゾイル－L-Trp－ｐ－ニトロアニリドまたはアセチル－L-Phe－ｐ－ニトロアニリド（Bachem))は膜を直接透過できるが、大型の基質（例

えばサクシニル－L-Ala－L-Ala－L-Pro－L-Phe－p－ニトロアニリド）はそのようなシグナルペプチドと共役させないかぎり膜を透過できない。

【０１２３】

実施例２０：電子顕微鏡実験

シグナルは、１０mMトリス（ｐＨ７．１）（２ｍｌ）中でアルカリホスファターゼ収納ナノスフェア（０．２ｍｌ）を保温し、続いてペプチドＧＡＬＡ－ＴＮＰ（２００ｍｌ、０．１ｍｇ／ｍｌ）を添加してポアを形成し、最後にELF-97（４０ｍｌ、５mM）基質を添加することによってナノスフェアに導入された。この調製物を２％（ｗ／ｖ）の四酸化オスミウム、０．１Mカコジル酸ナトリウムおよび２mM塩化カルシウム溶液（ｐＨ７．４に調整）を用いて固定した。ナノスフェアの部分標本（１．５ｍｌ）を２％四酸化オスミウム溶液（４．５ｍｌ）に添加し、穏やかに２時間攪拌した。

【０１２４】

このナノスフェア／オスミウム溶液の一部分（１ｍｌ）を続いて０．５％（ｗ／ｖ）ゼラチン、０．１Mカコジル酸ナトリウム、２mM塩化カルシウム溶液（５ｍｌ）に添加し、密集パッキングを防止した。得られた溶液の少量（３００－５００ｍｌ）を１００ｎｍのポアサイズのフィルターで穏やかに吸引しながらろ過した。続いて一連のエタノール洗浄（７０％－１００％ｖ／ｖ）を用いて濾液を脱水し、最後にプロピレンオキシドを入れた。続いて濾液をスパーの（Spurr's)樹脂に浸透させ６０℃で１６時間乾燥させた。続いてリヒャルト＝ウルトラカットＥ（Reichert Ultracut E)ウルトラミクロトームを用いてフィルター面に垂直にサンプルの超薄切片（１００ｎｍ）を作製した。切片を銅のグリッド（２００メッシュ、３．０５ｍｍ）上に置き、酢酸ウラニル（２％）およびクエン酸鉛（２％）で染色した。電子顕微鏡写真はＪＥＯＬ１００ＣＸＩＩ透過型電子顕微鏡を用いて撮影した。

【０１２５】

図３９に示した電子顕微鏡実験で、生成物は、ペプチドにより始動された反応の後リポソーム収納アルカリホスファターゼ粒子内に保持されていることが明らかである。

ＧＡＬＡペプチドは、リポソーム収納アルカリホスファターゼによるELF97の反応を始動し、未始動コントロールリポソーム（図３９、右）と比較して特に膜領域に近接する蛍光生成物の顕著な沈積（図３９、左）を示した。

【０１２６】

実施例２１：ナノスフェア検出

リポソーム収納アルカリホスファターゼナノスフェアはＧＡＬＡペプチドによって始動されELF97生成物を生じ、これを未始動ナノスフェアと比較した。図４０は、典型的な蛍光の強さの分布データ示している（反応（上部トレース、４０９６のスケール))および無蛍光、未反応（下部トレース、１０２４のスケール))。分布は、粒子の強さ（右方向に増加）に対する計測数によって表されている。未反応ナノスフェアは８倍少ないシグナルを示し、一方、反応ナノスフェアは明瞭にピークがさらに右側に移動していた。

このような実験によって、３００００またはそれ未満のナノスフェア（これは少なくとも通常のアッセイで必要とされるものの少なくとも１／１０００である）を測定することが可能であることが明らかになった。

これらの結果はまた、いずれの集団でも反応ナノスフェアは未反応ナノスフェアと区別できることを明らかにした。部分的に反応したナノスフェアは顕著には検出されなかった。これは、本発明の方法がナノスフェア収納反応の始動検出のデジタル法(あるいは計測法)として適していることを意味する。

【０１２７】

デジタル法の優れた感度および解析は、種々のレベルの反応、未反応ナノスフェアを収納するナノスフェア集団の検出によって明らかにされた。種々のレベルの反応ナノスフェアを含む集団を調製し分析した。結果を図４１に示し、下記表１に一覧表とした。反応ナノスフェアが低濃度であることおよび反応数の変化の少なさが検出され、反応ナノスフェア計測数は全体の0.01～0.045％であることが検出された。

%反応	粒子計測数
０．０１	２１３５．５
０．０１５	４３４１
０．０４５	１３１８６

＜10^3のペプチド分子が各ナノスフェア反応を始動させるという基準で、明示された物理的検出感度は約１０$^{-17}$モルの分析物に匹敵する。

【０１２８】

実施例２２：リポソーム収納アルカリホスファターゼのナノスフェア内でのｐＨによってスイッチが切り換えられるＴＮＰ－ＫＡＬＡ始動ＥＬＦ生成物の形成

基質反応はｐＨ５．４でＴＮＰ－ＧＡＬＡによって始動されるが、ｐＨ６．４では始動されないとことが発見された（上記実施例１３）。ＧＡＬＡペプチドは酸性ｐＨで活性を有するが、このｐＨは抗体抗原反応には有利ではない。結果として別のペプチド、WEAKLAKALAKALAKHLAKALAKALKACE（Ｌｙｓ１５をＴＮＰで標識、ＴＮＰ－ＫＡＬＡ）を用いて、分析物ＴＮＴによる基質チャンネルの改変を示した。

２ｍｌの緩衝液に３μｍｌのナノスフェア収納マーカーおよび１０μｍｌの０．１ｍｇ／ｍｌＫＡＬＡ－ＴＮＰペプチド（水で調製）を加えた。蛍光の強さの増加は、基質（ELF97）の添加後それぞれ３６５ｎｍおよび５１５ｎｍの励起および放射波長を用いて持続的に追跡した。

【０１２９】

抗体結合をモニターするために、典型的には３０μｍｌの抗体溶液を１μｍｇまでのペプチドとともに全アッセイ容積２ｍｌで用いた。分析物感応実験では、ＴＮＴを０．０１ｍｇ／ｍｌ溶液から種々のレベルで抗体に添加し、続いてペプチドを加え、さらに１０分保温した。図４２は０．１μｇのＴＮＴのデータを示している。アッセイ条件は３μｌのナノスフェアおよび２ｍｌの１０ｍＭトリス緩衝液（ｐＨ７．４）中の２ｍｌのＥＬＦであった。トレース１は２０μｌのＫＡＬＡ－ＴＮＰペプチド（０．１ｍｇ／ｍｌ）のもので、トレース４はナノスフェア単独である。トレース２は抗ＴＮＴ抗体３０μｌを含むもので、２０μｌのＫＡＬＡ－ＴＮＰペプチドと１０分予備保温された。分析物感応曲線トレースでは、３０μｌの抗ＴＮＴ＋１０μｌのＴＮＴ（０．１または０．０１ｍｇ／ｍｌ溶液）およびＫＡＬＡ－ＴＮＰペプチド（０．１ｍｇ／ｍｌ）を続いて加え１０分保温した。

【０１３０】

ＴＮＴに対するモノクローナル抗体をＴＮＰ－ＫＡＬＡ始動リポソーム系にある容積で加えたとき（図４２）、ＴＮＰ－ＫＡＬＡペプチドの活性は提供的に阻害された。

したがって、リポソーム収納アルカリホスファターゼナノスフェア中の収納ＥＬＦ蛍光生成物の産生はＴＮＰ－ＫＡＬＡペプチドによって始動され、その活性は分析物に感応してスイッチが切り換えられることが示された。

【０１３１】

実施例２３：ポア形成試薬としてメリチンペプチドの使用

収納アルカリホスファターゼとしてリポソーム（１００μｌ）を１４０ｍＭのＮａＣｌを含む１０ｍＭトリスＨＣｌ（ｐＨ７）の１ｍｌ中に懸濁させた。ＴＮＰ共役ペプチド３μｇ（ＧＩＧＡＶＬＫＶＬＴＴＧＫＰＡＬＩＳＷＩＫＲＫＲＱＱ）を添加し溶解を実行した。１０分後混合物を１００００ｇで１時間超遠心で遠心し、遊離酵素をナノスフェア結合酵素と分離させた。上清中の酵素活性量を求め、トリトン（０．１％、１０μｌ）可溶化サンプル中のそれと比較した。トリトン処理サンプルの上清と比較して、酵素はもっぱら（９９．１％）リポソームに結合したままで、活性の０．９％のみがペプチド処理サンプルの上清中に認められることが分かった。ペプチドメリチンＴＮＰ－１３はしたがって、それが形成するポアが顕著な酵素の遊離をもたらさないので分析物検出を評価するために適切なものとして選択した。

【０１３２】

実施例２４：分析物の検出

１０mMのトリスＨＣｌ　ｍｌおよび実施例２３のペプチド（１μｇ）＋３０μｌの抗ＴＮＴ（テストサンプルの場合は１５分ＴＮＴ（１μｇ）と予備保温した）。ＴＮＴはバックグラウンドサンプルには存在しなかった。リポソーム１０μｌおよび基質（ELF97（Molecular Probes）、５mM溶液）４μｌを続いて添加し、サンプルの蛍光を持続的に記録した。基質の拡散は比較的緩徐な過程であるので、粒子計測により検出を測定する前にサンプルは一晩放置した。１１００および１０００倍希釈のサンプルもフローサイトメーターで測定した。　ＥＬＦ基質は固体の蛍光生成物を形成し、したがって粒子内に保持されることは知られており（Molecular Probes handbook)、酵素もまたこのような環境下では粒子内に保持されることが分かっている（実施例２３）。蛍光の増加は、ＴＮＴを含まないコントロールよりもテストサンプルで極めて高かった。

【０１３３】

しかしながら、ほとんどの蛍光発光団は高濃度で消光する。さらにまた、ＥＬＦのための励起はＵＶの近くの狭いバンド内になければならず、研究で用いられる市販の強力なレーザーの大半は４８８－１０６４ｎｍの範囲内で最適に作動する。リポソームは屈折率の低い薄壁（５－１０ｎｍ）をもち、ほとんど光を散乱させない。基質は溶解され、散乱もまた限定される。しかしながら、テストサンプルリポソームには比較的屈折率の高い物質が充填され、顕著な量の光を散乱させる。この物質は４８８－５２４ｎｍでは光学的に活性をもたず、この波長ではアルゴンイオンレーザーを用いることができる。

【０１３４】

この実施例は、改変エピクスフローサイトメーターで緑色チャンネルを用いる９０度光散乱測定を用いた。このフローサイトメーターは、４８８ｎｍ集光ダイクロイック（dicroic）ミラーを搭載し（バンド幅は約＋／－４０ｎｍ）、全方向で稼働する干渉性インノバ９０アルゴンイオンレーザーを備えている。”ピーク”散乱シグナルを１０２４チャンネルＡ／Ｄでモニターし、特に記載が無ければ６００Ｖの電圧を２０の後増幅とともに用いた。測定は約３０μｌ／分の流速で１００秒間実施した。

【０１３５】

バックグラウンドおよびテストサンプルは、フローサイトメーターで分析すると、明瞭に異なる特徴的な散乱分布を示した。水のサンプルのシグナルは、バックグラウンドサンプルの形状とは異なる形状をもち、バックグラウンドサンプルはテストサンプルのそれと異なる形状を有している。これは密な沈殿物が粒子内に沈積され、より高い散乱強度を与えているからであると考えられる。通常の蛍光計と比べて１／１００および１／１０００希釈での実験で示されたように、より低い濃度を検出することができるので、計測法によって粒子を測定する方が有利である。１／１００および１／１０００のサンプルは希釈しすぎで通常の蛍光では信頼できる測定ができないが、全てのこれらの事例でフローサイトメーターで測定するときは、テストサンプルの特徴は分布に残されている。このことから、個々の粒子を計測することは、通常の検出法よりもはるかに高い感度レベルを提供する。

【０１３６】

図４３および４３Ａはこのタイプのアッセイにおけるバックグラウンドシグナルの可能な理論的トレースを示している。図４３では、テストサンプルの全カウント（Ａ）はバックグラウンドサンプルの全カウント（Ｂ）よりも大きいが、同じ形状である。すなわち、バックグラウンドサンプルはより少数の粒子を含むが、この粒子はテストサンプルと類似している。

図４３Ａでは、テストサンプルおよびバックグラウンドサンプルは同じ数の粒子を含むが、テストサンプルは大きいか、および／または密な粒子を有する。バックグラウンドはリポソーム全体（または集団）として少量のシグナルをもち、一方、テストサンプルは完全に活性化されたリポソームを含んでいる。当業者には、後者の事例がバックグラウンドに対して良好な識別を可能にすることは理解されよう。

【０１３７】

以下の実験は、ＴＮＴアッセイは、単なる数とは対照的に異なる分布が存在する後者の理論的事例としてもっぱら実施できることを示す。

図４４Ａは、水について約７０カウント／秒（ｃｐｓ）を示し、一方、図４４Ｂは、バックグラウンドシグナルは１００ｃｐｓで高く、その形状は大体同じであるが、バックグラウンドシグナルはわずかに右に移動しているようであることを示している。
図４４Ｃは、テストシグナルは４４３ｃｐｓで、さらにトレースの形状は顕著に異なることを示している。これは、４４Ｃと４４Ｂの重ね合わせである図４４Ｄで最も顕著に示されている。この組み合わせの最後のトレース（４４Ｅ）は、水のシグナルを除去した後のテストサンプルとバックグラウンドのシグナルである。

【０１３８】

これらのトレースは、バックグラウンドシグナルは完全に活性なリポソームの数によるものではなく、それらリポソームの全てまたは多くは低い収納シグナルを有していることを示唆している。
ピークの位置のシフトは、より大型および／またはより密な粒子を示唆し、したがってペプチドの結合時にテストリポソームは実質的に完全に充填されたか、または酵素の活性が消失するまで充填が進んでいると結論することができる。したがって、リポソームアッセイは、ペプチド活性化に関してデジタルのオン／オフとして作動し、一方、バックグラウンドはリポソーム（または集団）全体で低いシグナルを産生することが示された。
これは、単粒子検出法の使用はノイズに対して極めて高いシグナルを提供することができることを示している。本実験では、液流は顕著な散乱を生じるジェット流で、四角の壁をもつセルの使用および光量子計測検出装置の使用はノイズに対してシグナルをさらに高めるであろう。

【０１３９】

非常に小さな粒子サイズでのエピクス系（１－１００ミクロンの粒子の検出のためにデザインされている）の操作では、先の実施例での識別装置の設定（バックグラウンドシグナルが水のノイズパルスの数によって圧倒された）のために可能なバックグラウンドの測定で違いを生じた。
これらの結果はより高い感度をもつ識別装置によって改善できるであろう。

【０１４０】

実施例２５：分析物の更なる検出

識別装置の設定を変更して実施例２４を繰り返した。この変更設定は、水、バックグラウンドリポソームおよび活性リポソームの分布形状が顕著に異なることを示し、したがってより正確な分析を可能にする。繰り返せばこれらの結果は、多くの低レベルシグナルのリポソームと比較したとき、二元性活性化リポソームがバックグラウンドサンプルに存在することを示している。

【０１４１】

図４４Ｆは水とバックグラウンドの比較を示し、それぞれ１５ｃｐｓおよび７２ｃｐｓをもち、後者については明瞭な分布形状が示されている。図４４Ｇは、４１１ｃｐｓの活性サンプルとバックグラウンドの比較を示し、より密な粒子の分布が示されている。図４４Ｈは完璧にするために提示され、活性サンプル対水サンプルを示し、非常に大きなピークのシフトを示している。
図４４Ｉは１００倍希釈で実施したアッセイで５７ｃｐｓのカウントを示し、図４４Ｊは１０００倍希釈で実施したアッセイで３５ｃｐｓを示す。後の２つの例では、水のシグナルが添加されているが、その形状は、バックグラウンドとは対照的にテストサンプルによって得られたシグナルと同様な形状であることに留意されたい。

【０１４２】

実施例２６：更なる分析物の検出

７００ｖの高いＰＭＴゲインおよびタイム１０のより低い増幅装置設定を用いて実施例２５を繰り返した。図４４Ｋは、活性なアッセイの７８ｃｐｓ（図Ｌ）と匹敵する１６ｃｐｓのシグナルをもつバックグラウンドである。トレースのクロスオーバーを示す手描きの差し込み図である図Ｍは分布の相違を明瞭に示している。
６２５thのチャンネルを越える全てのデータについて統合された図４４Ｋおよび４４Ｌの

トレースでは、顕著な量のバックグラウンドシグナルが除去されている。シグナルの強さは、全てのデータを考慮する場合は5.1で、活性サンプルからバックグラウンドサンプルまでについて６２５thの点を越えるデータを選別する場合は12.1で、さらに異なる分布形状を示している。

【０１４３】

これらの結果は装置設定の人工産物と考えることはできないということを示すために、活性なサンプルが液流と比較される広い設定数値および電圧で装置をチェックした（水はサンプルとして注入されなかった）。

ｘ５０の増幅装置ゲインを用いて８００ｍＷでトレース４４Ｎが得られ、トレース４４Ｏはｘ２０の増幅装置設定を用いて得られ、トレース４４Ｐはゲイン１０を用いて得られ、４４Ｑはゲイン５を用いて得られた。予想されたように、分離は低いゲインで低下した。７００ｍＷではトレース４４Ｒはゲイン２０で得られ、トレース４４Ｓはゲイン５で得られた。

【図面の簡単な説明】

【図１】　図１は、本発明の１つの実施態様である反応を示す模式図である。

【図２】　図２は、本発明の異なる実施態様の１つである反応を示す模式図である。

【図３】　図３は、本発明のさらに別の実施態様である反応を示す模式図である。

【図４】　図４は、ピアニンを含むリポソームがｐＨグラジエントで崩壊したときに観察される蛍光の変化を示す。

【図５】　図５は、ｐＨグラジエントによる崩壊時の光散乱のモニタリングの結果を示し、この処理の間リポソームが完全であることを示している。

【図６】　図６は、蛍光コバルト生成物の放射スペクトルを示している。

【図７】　図７は、蛍光コバルト複合物の励起スペクトルを示している。

【図８】　図８は、コバルト存在下の基質－酵素生成物の安定性を示す実験結果である。

【図９】　図９は、固形生成物の形成を示す遠心実験の結果である。

【図１０】　図１０は、リポソーム内の蛍光の局在を示す。

【図１１】　図１１は、チャンネル形成ペプチドの作用を示すグラフである。

【図１２】　図１２は、リポソーム中に含まれるアルカリホスファターゼの比色アッセイの結果を示す。

【図１３】　図１３は、ビオチン付加リポソームの比色アッセイの結果を示す。

【図１４】　図１４は、ビオチン付加リポソームの蛍光測定アッセイの結果を示す。

【図１５】　図１５は、ビオチン付加リポソーム中のある種のＧＡＬＡペプチドによる基質チャンネル形成を示す。

【図１６】　図１６は、リポソーム凝集の結果のシグナル局在を示す。

【図１７】　図１７は、ELF-97の蛍光に対するパラニトロフェニルホスフェートの消光作用を示す。

【図１８】　図１８は、ＴＮＰ－ＧＡＬＡのｐＨによるスイッチ切り換え活性を示す。

【図１９】　図１９は、酵素－基質反応に対する緩衝液のｐＨの影響を示す放射スペクトルである：図１９ａは１時間後の放射スペクトルで、図１９ｂは２６貯蔵後の放射スペクトルである。

【図２０】　図２０は、ELF-97基質との反応に対するリポソーム含有アルカリホスファターゼナノスフェアのＴＮＰ－ＧＡＬＡ始動を示す。

【図２１】　図２１は、プロタミンでリポソームＥＬＦを処理した後の上清および沈澱分画の相対的蛍光レベルを示す。

【図２２】　図２２は、リポソームに含有されたアルカリホスファターゼのナノスフェアにおけるＥＬＦ生成物のｐＨによるスイッチ切り換えＴＮＰ－ＧＡＬＡ始動形成を示す。

【図２３】　図２３は、抗体力価測定によるＴＮＰ－ＧＡＬＡ活性の阻害を示す。

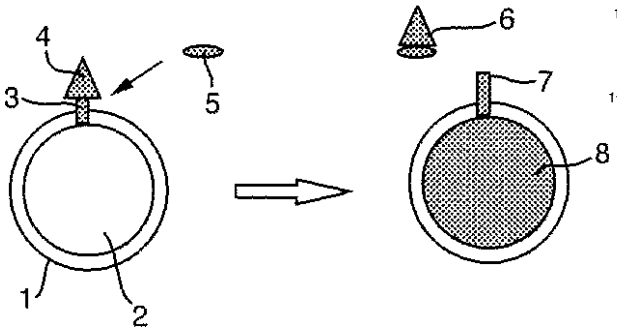
【図２４】　図２４は、ＴＮＴによる抗体封鎖の競合を示す。

【図２５】　図２５は、ＦＰＥ標識リポソームとｐ－２５の結合によって得られたシグナルを示す。

【図２６】　図２６は、図２４の挿入トレースを示す。
【図２７】　図２７は、ＦＰＥが外側小葉上にあるとき得られたシグナルをＦＰＥが両小葉上にあるときに得られたシグナルから差し引いた結果を示す。
【図２８】　図２８は、ＦＩＴＣ－Ｐ２５およびＦＩＴＣ－Ｐ３４リポソームの蛍光に対する抗体の影響を示す。
【図２９】　図２９は、ＦＩＴＣ－Ｐ２５およびＦＩＴＣ－Ｐ３４リポソームの蛍光に対する抗体の影響を示す。
【図３０】　図３０は、ヘム触媒ラジカル仲介連鎖反応を示す。
【図３１】　図３１は、１３－ＨＰＯＤＥの吸収スペクトルおよびＨＰＬＣ分析を示す。
【図３２】　図３２は、ヘミンおよび１３－ＨＰＯＤＥによるナノスフェアの保温時の酸素消費を示す
【図３３】　図３３は、ヘミンおよび１３－ＨＰＯＤＥによる脂質の過酸化反応がどのようにしてカルボキシフルオレセインに脂質層を移動させることができるかを示す。
【図３４】　図３４は、ミオグロビンがどのようにしてカルボキシフルオレセインに脂質層を移動させるかを示す。
【図３５】　図３５は、ヘモグロビンの存在の結果としてナノスフェア内部からカルボキシフルオレセインが遊離するのを示している。
【図３６】　図３６は、ペプチドのリポソーム収納蛋白分解切断の模式図である。
【図３７】　図３７は、カルジオリピン（ＣＬ）の存在下および非存在下でのＰ－２５のホスファチジルコリン（ＰＣ）との結合の速度定数を示す：σはＣＬ／ＰＣが１／３０の曲線を示し、νはＣＬ／ＰＣが１／５０の曲線を示し、υは１００％ＰＣを示す。
【図３８】　図３８は、溶液中のプロトンの濃度に対する蛍光の変化（５）を示す。
【図３９】　図３９は、リポソーム収納反応の透過型顕微鏡による観察を示す。
【図４０】　図４０は、蛍光および非蛍光ナノスフェアのシグナルを示す。
【図４１】　図４１は、ナノスフェアの粒子のカウントを示す。
【図４２】　図４２は、アルカリホスファターゼを含むナノスフェアにおけるＥＬＦ－生成物形成による分析物（ＴＮＴ）の検出を示す。
【図４３】　図４３および４３Ａは、フローサイトメーターを用いる本発明のアッセイで発生する可能性がある理論的バックグラウンドのトレースを示す。
【図４４】　図４４Ａ－Ｓは、本発明のアッセイでフローサイトメーターを用いて得られた結果を示す。

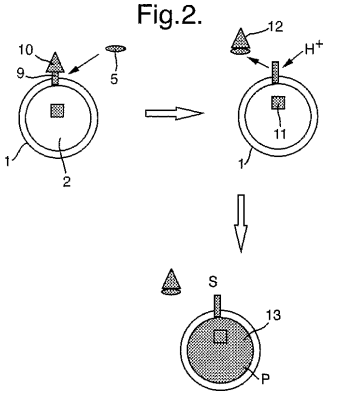
【図１】

Fig.1.



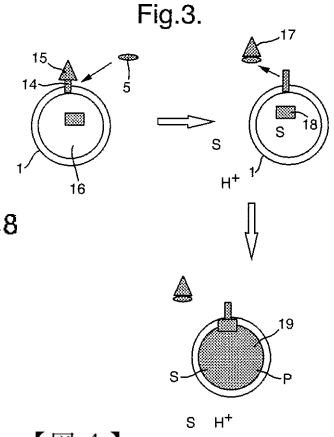
【図２】

Fig.2.



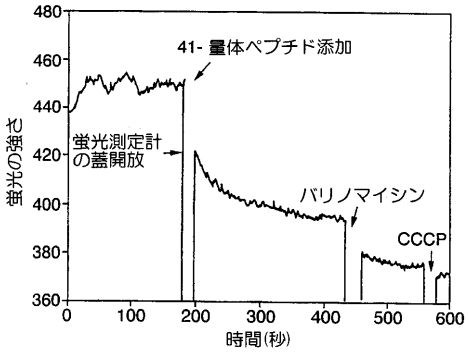
【図３】

Fig.3.



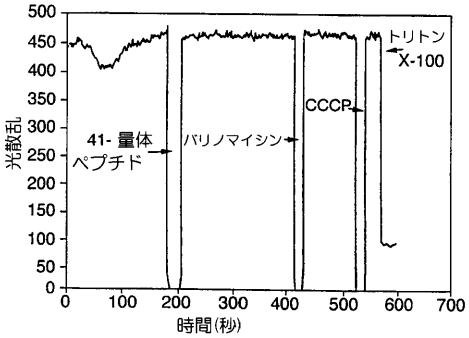
【図４】

Fig.4.



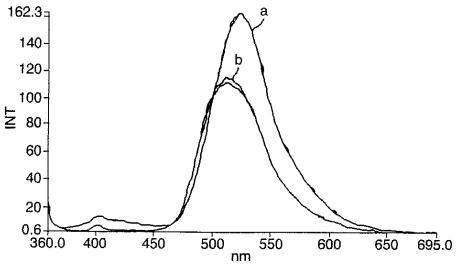
【図５】

Fig.5.



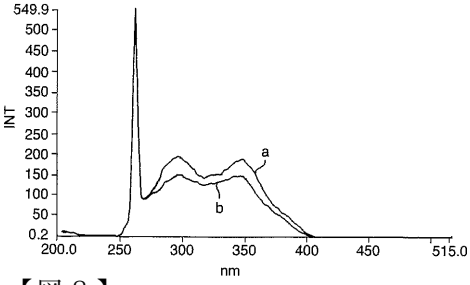
【図６】

Fig.6.



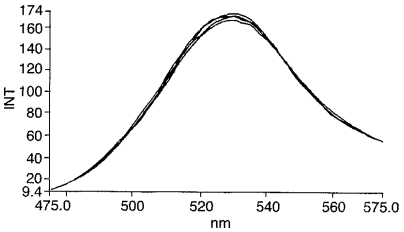
【図７】

Fig.7.



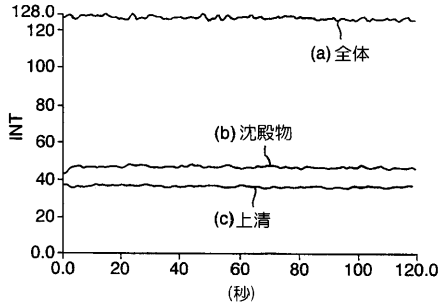
【図８】

Fig.8.



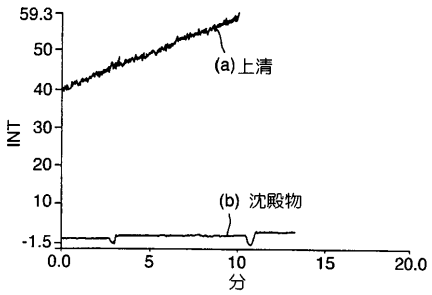
【図９】

Fig.9.



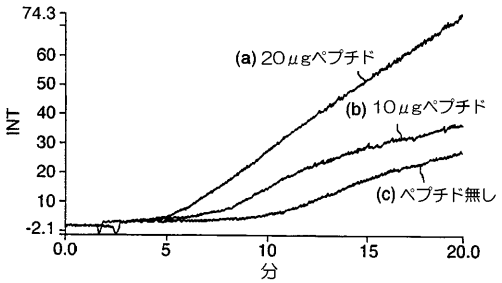
【図１０】

Fig.10.



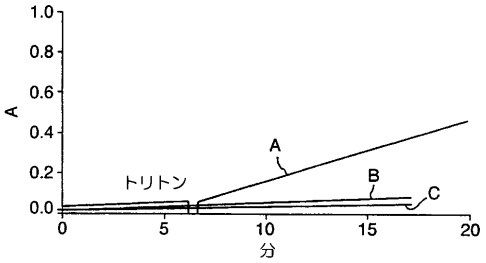
【図１１】

Fig.11.



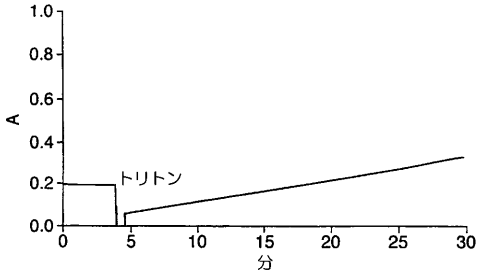
【図１２】

Fig.12.



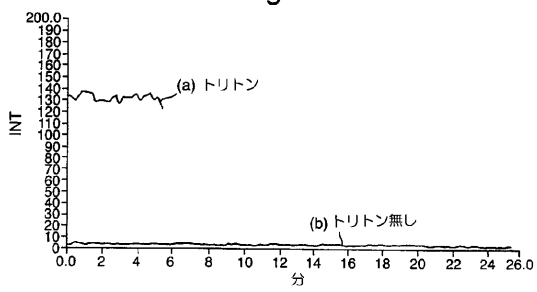
【図１３】

Fig.13.



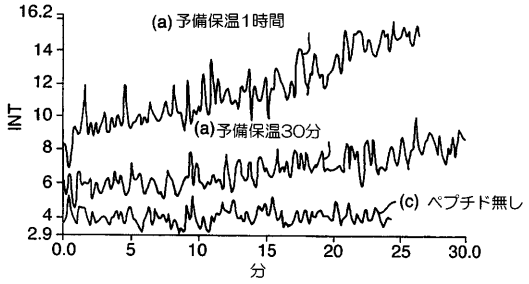
【図１４】

Fig.14.



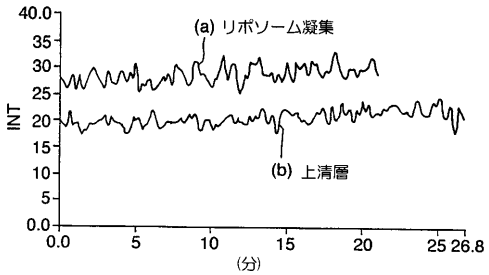
【図１５】

Fig.15.



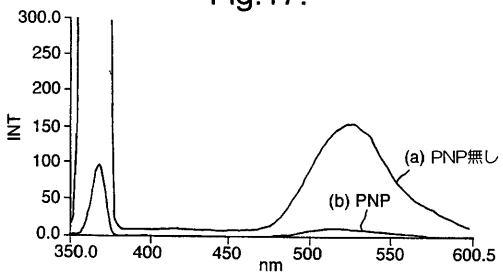
【図１６】

Fig.16.



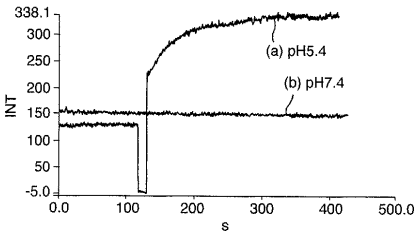
【図１７】

Fig.17.



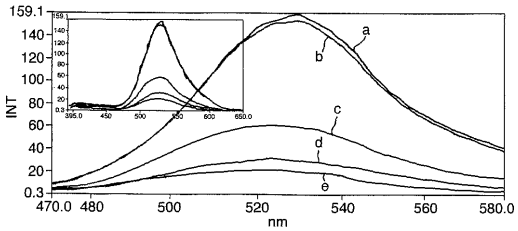
【図１８】

Fig.18.



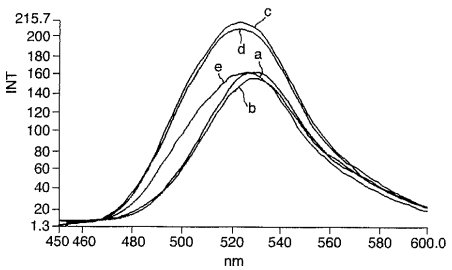
【図１９】

Fig.19.



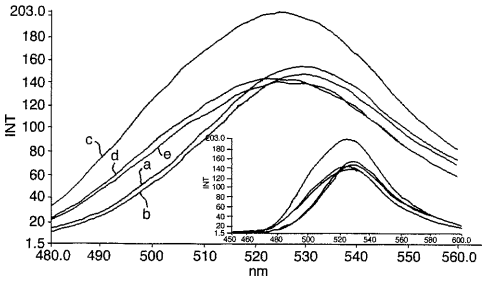
【図１９Ａ】

Fig.19A.



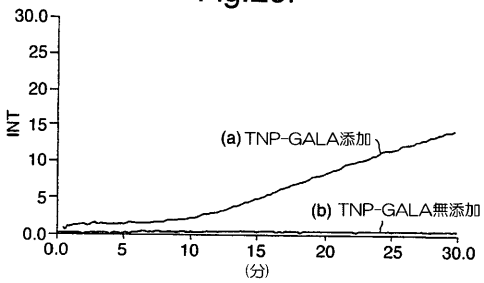
【図１９Ｂ】

Fig.19B.



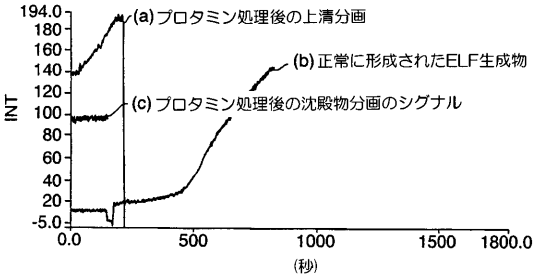
【図２０】

Fig.20.



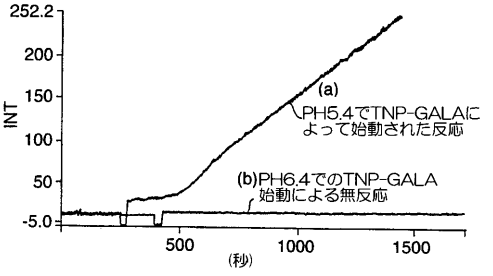
【図２１】

Fig.21.



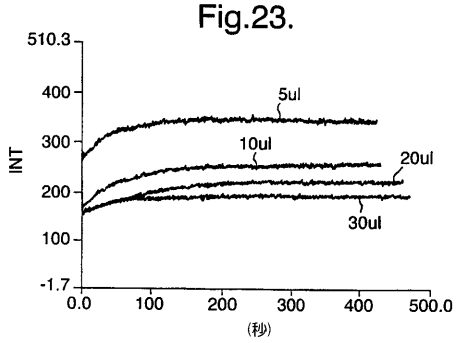
【図２２】

Fig.22.



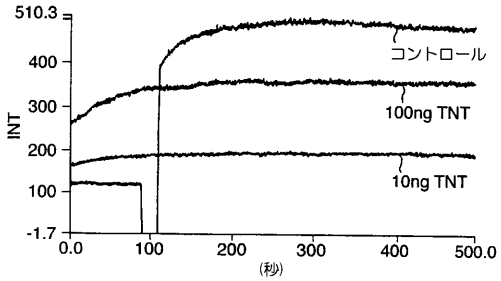
【図２３】

Fig.23.



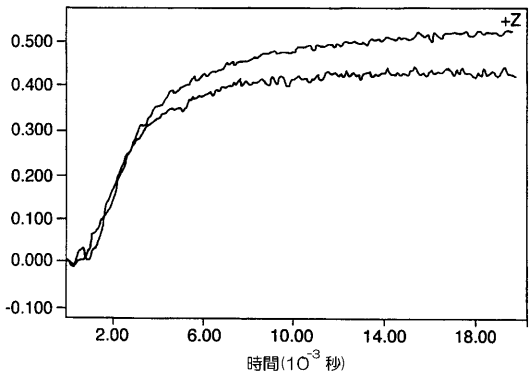
【図２４】

Fig.24.



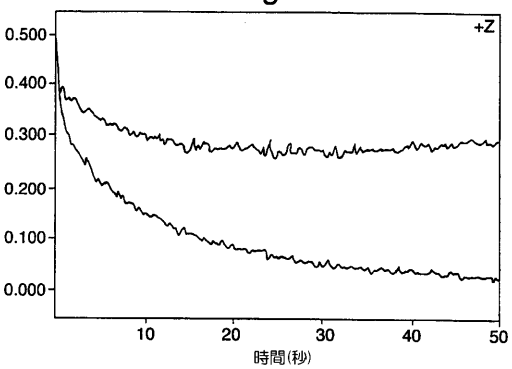
【図２５】

Fig.25.



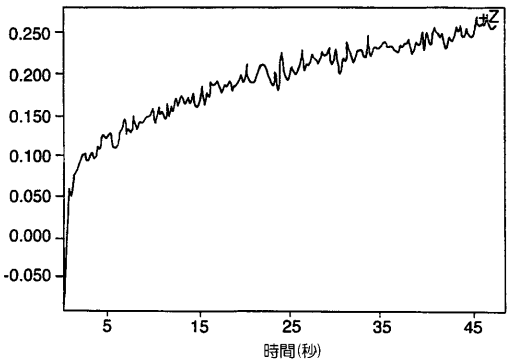
【図２６】

Fig.26.



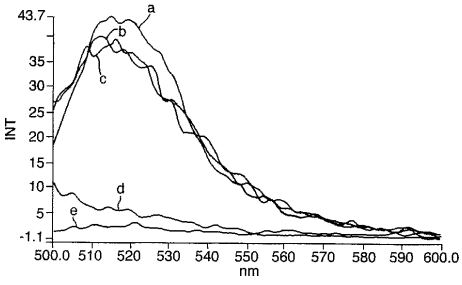
【図２７】

Fig.27.



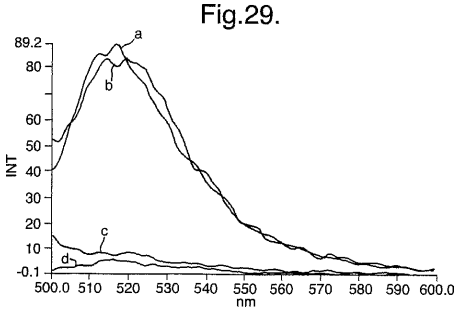
【図２８】

Fig.28.



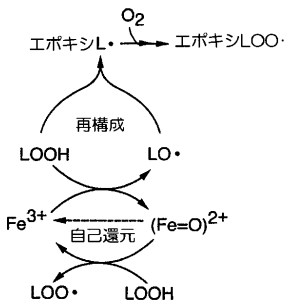
【図２９】

Fig.29.



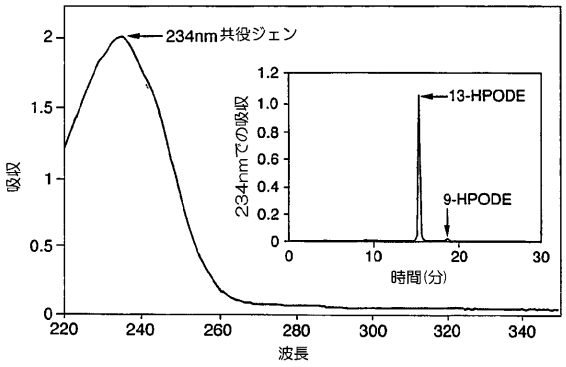
【図３０】

Fig.30.



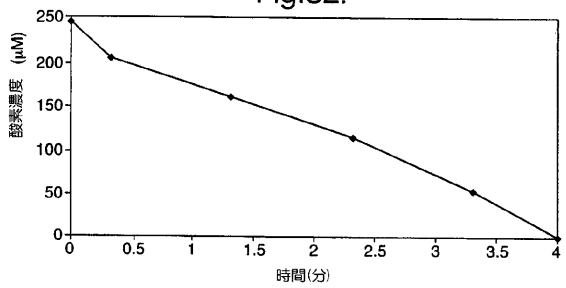
【図３１】

Fig.31.



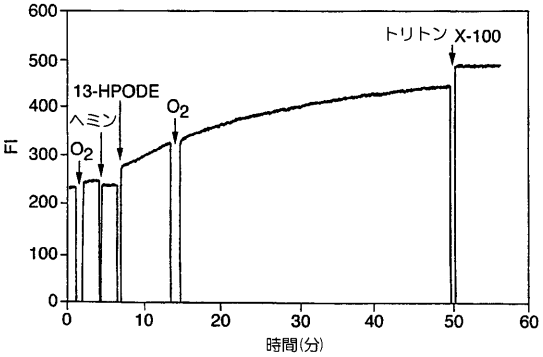
【図３２】

Fig.32.



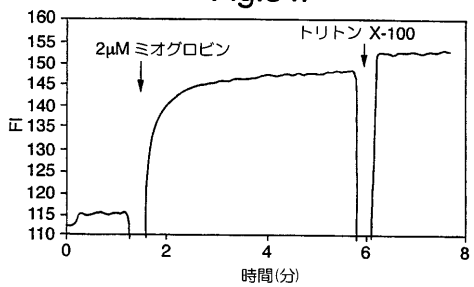
【図３３】

Fig.33.



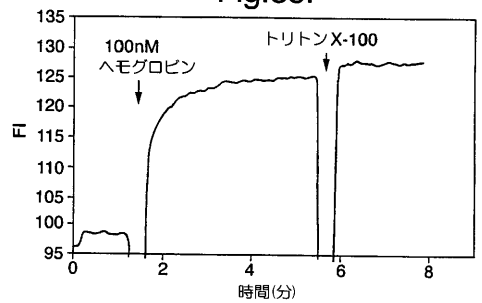
【図３４】

Fig.34.



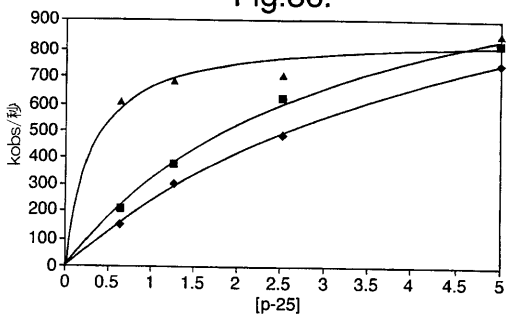
【図３５】

Fig.35.



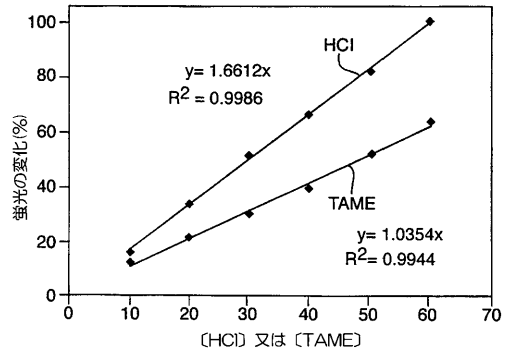
【図３６】

Fig.36.



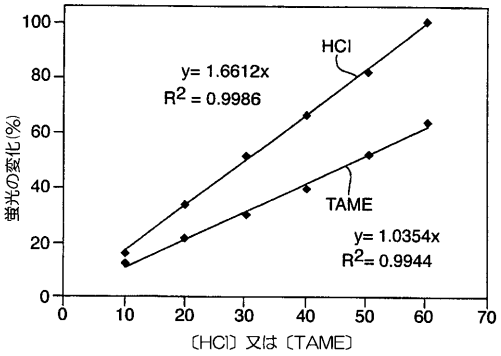
【図３７】

Fig.37.



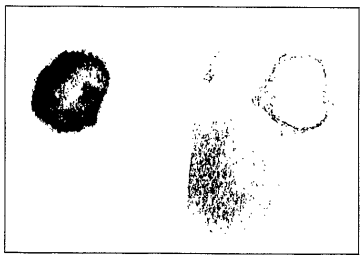
【図３８】

Fig.38.



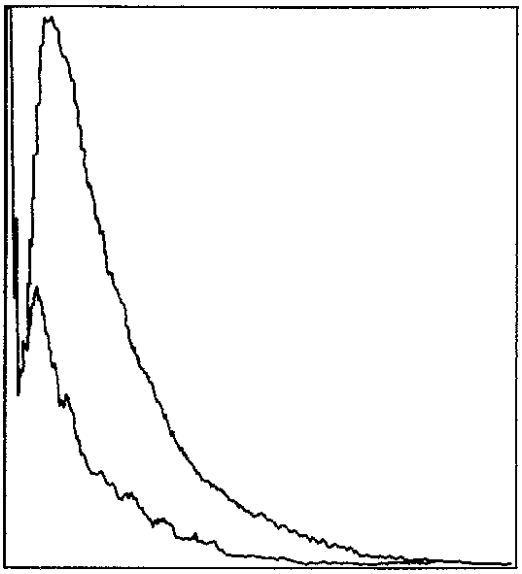
【図３９】

Fig.39.



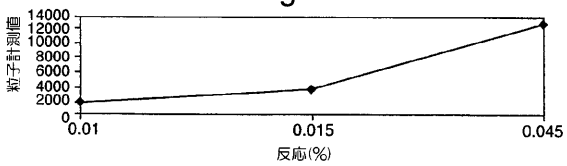
【図４０】

Fig.40.



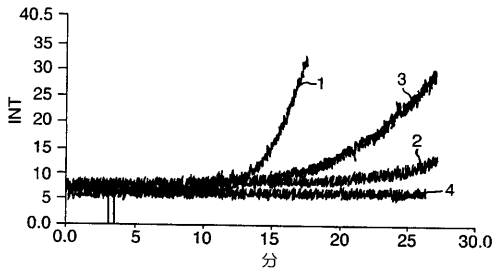
【図４１】

Fig.41.



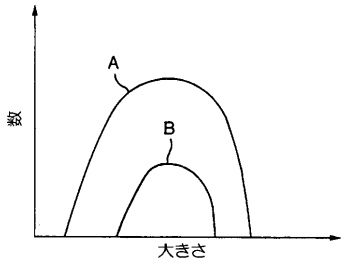
【図４２】

Fig.42.



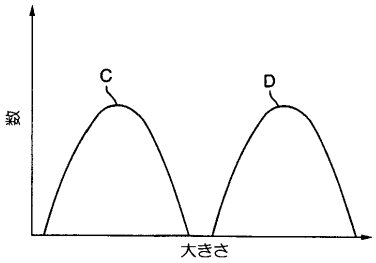
【図４３】

Fig.43.

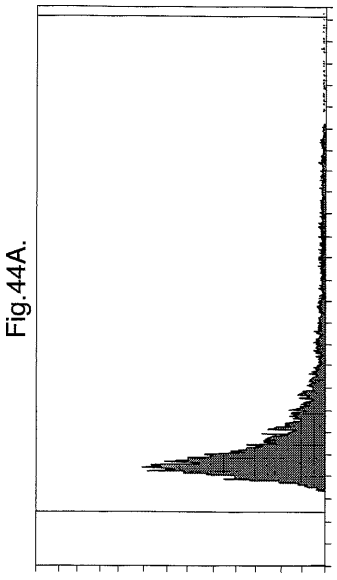


【図４３Ａ】

Fig.43A.



【図４４Ａ】



【図４４Ｂ】

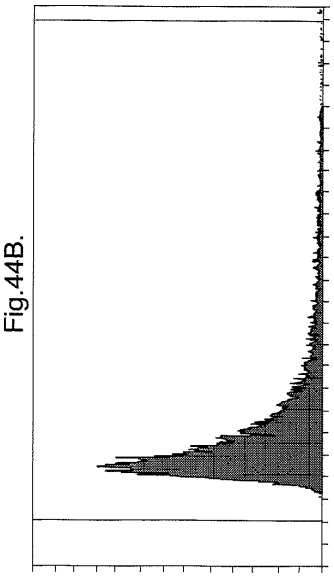


Fig.44B.

【図４４Ｃ】

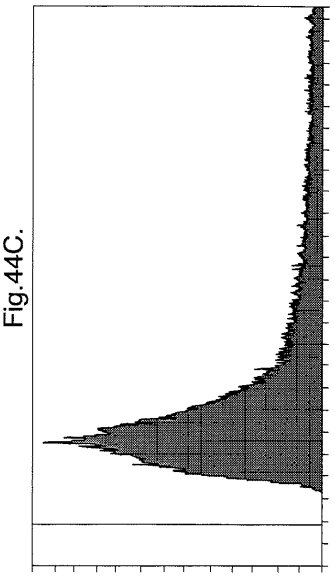


Fig.44C.

【図４４Ｄ】

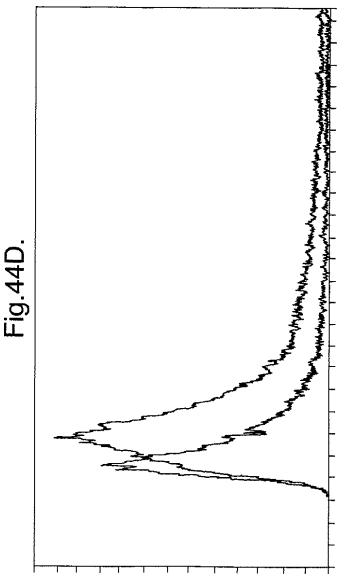


Fig.44D.

【図４４Ｅ】

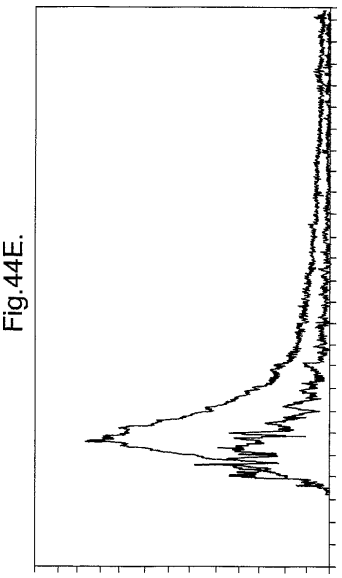


Fig.44E.

【図４４Ｆ】

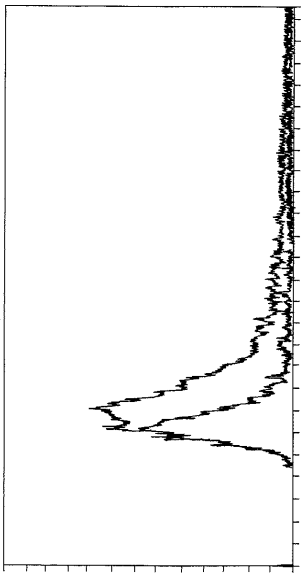


Fig.44F.

【図４４Ｇ】

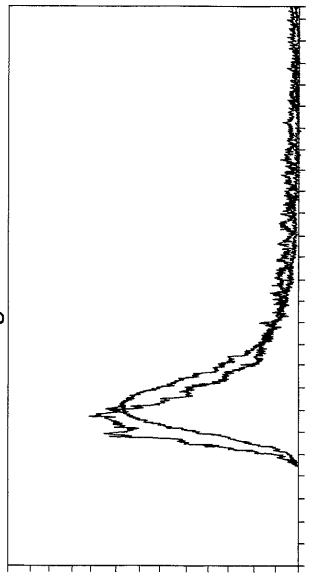


Fig.44G.

【図４４Ｈ】

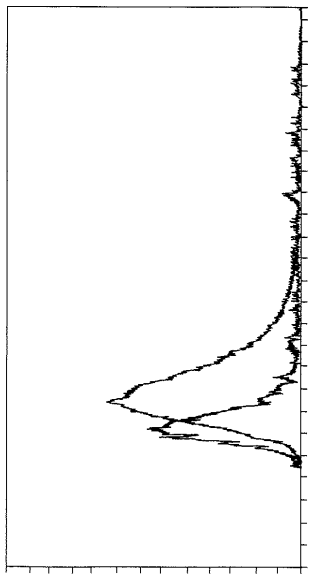


Fig.44H.

【図４４Ｉ】

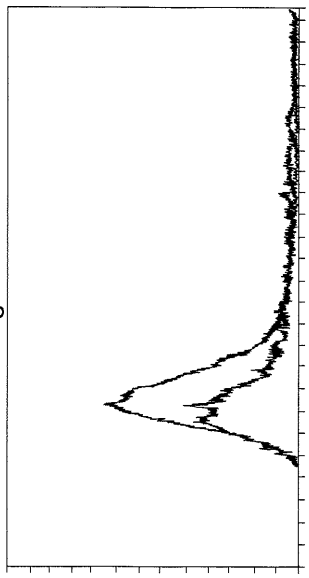


Fig.44I.

【図４４Ｊ】

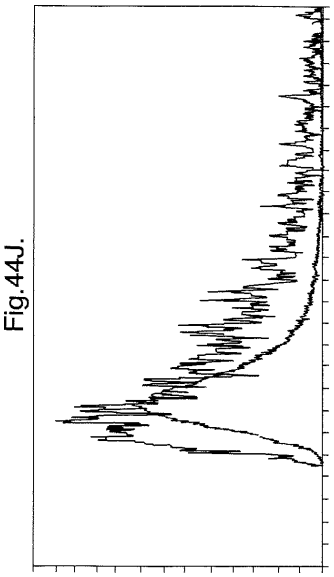


Fig.44J.

【図４４Ｋ】

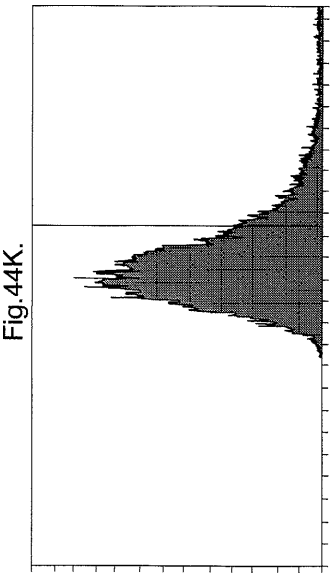


Fig.44K.

【図４４Ｌ】

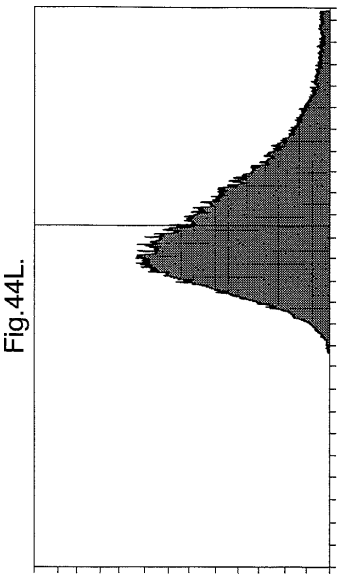


Fig.44L.

【図４４Ｍ】

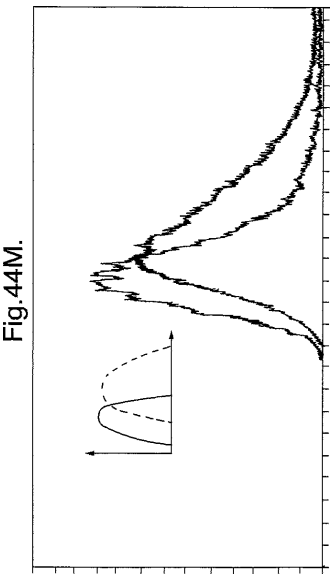


Fig.44M.

【図４４Ｎ】

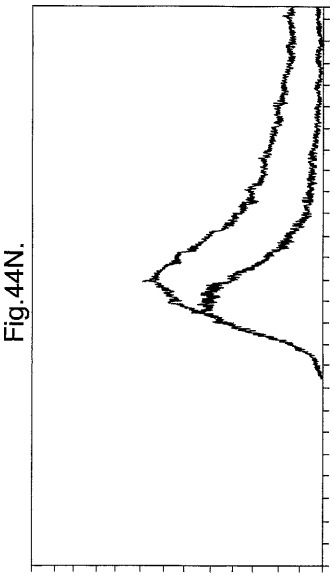


Fig.44N.

【図４４Ｏ】

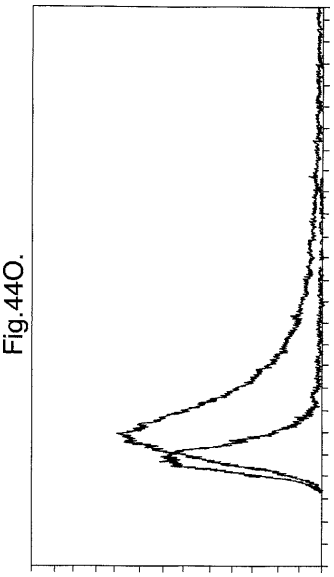


Fig.44O.

【図４４Ｐ】

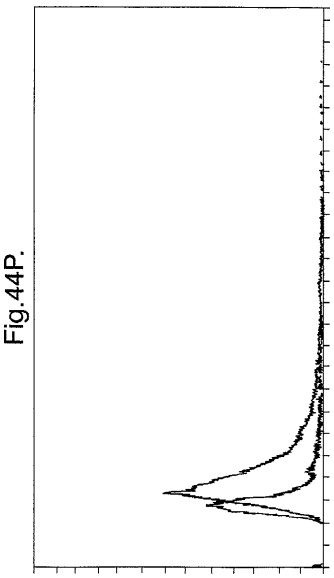


Fig.44P.

【図４４Ｑ】

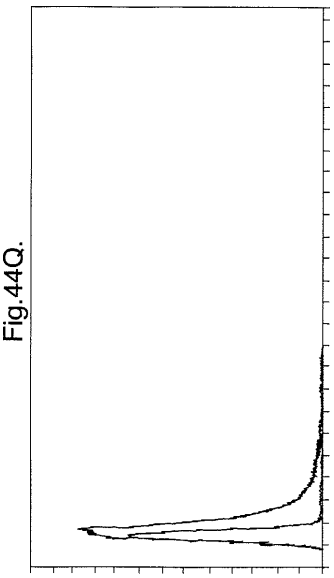


Fig.44Q.

【図４４Ｒ】

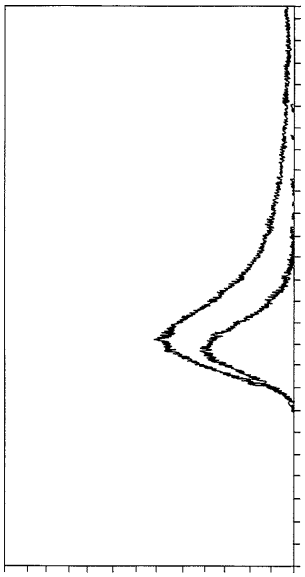


Fig.44R.

【図４４Ｓ】

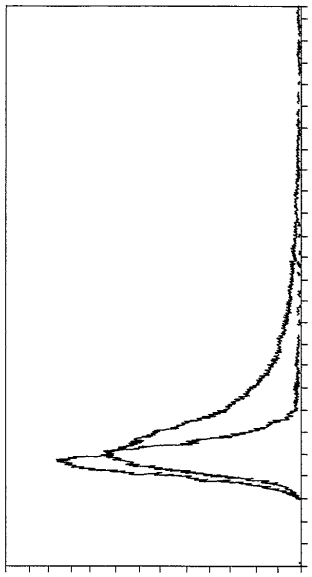


Fig.44S.

フロントページの続き

(74)代理人 100067013
弁理士 大塚 文昭
(74)代理人 100082005
弁理士 熊倉 禎男
(74)代理人 100065189
弁理士 宍戸 嘉一
(74)代理人 100096194
弁理士 竹内 英人
(74)代理人 100074228
弁理士 今城 俊夫
(74)代理人 100084009
弁理士 小川 信夫
(74)代理人 100082821
弁理士 村社 厚夫
(74)代理人 100086771
弁理士 西島 孝喜
(74)代理人 100084663
弁理士 箱田 篤
(72)発明者 ニックリン スティーヴン
イギリス国 ハンプシャー ジーユー１４ ０エルエックス ファーンボロー アイヴェリー ロード （番地なし） ディフェンス エヴァリュエイション アンド リサーチ エージェンシー
(72)発明者 クラーク ディヴィッド ジョン
イギリス国 マンチェスター エム１３ ９ピーエル オックスフォード ロード （番地なし） ユニヴァーシティー オヴ マンチェスター
(72)発明者 ロイド クリストファー ジェームズ
イギリス国 マンチェスター エム１３ ９ピーエル オックスフォード ロード （番地なし） ユニヴァーシティー オヴ マンチェスター
(72)発明者 アオジュラ ハルメシュ シング
イギリス国 マンチェスター エム１３ ９ピーエル オックスフォード ロード （番地なし） ユニヴァーシティー オヴ マンチェスター
(72)発明者 チロサニ マリナ
イギリス国 マンチェスター エム１３ ９ピーエル オックスフォード ロード （番地なし） ユニヴァーシティー オヴ マンチェスター
(72)発明者 ウィルソン マイケル トーマス
イギリス国 エセックス シーオー７ ０エルゼット ブライトリングシー エドワード アベニュー ２４

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 国際公開第９８／０００７１４（WO，Ａ１）
特表昭６１－５００１８２（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－０４５５６３（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－１３５９９７（ＪＰ，Ａ）
特開昭６２－２７４２６１（ＪＰ，Ａ）
国際公開第９６／００８７２１（WO，Ａ１）
国際公開第９６／０１０１７８（WO，Ａ１）
Journal of Immunological Methods，１９９７年，２０４，１０５－１３３

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
G01N 33/48-98