(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
2021年12月2日(02.12.2021)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2021/241446 A1

(51) 国際特許分類:
C07K 16/00 (2006.01) *C12Q 1/48* (2006.01)
C07K 17/00 (2006.01) *C12Q 1/66* (2006.01)
C12P 19/32 (2006.01) *C12N 9/12* (2006.01)
C12N 15/115 (2010.01) *G01N 33/543* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/019390

(22) 国際出願日： 2021年5月21日(21.05.2021)

(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 2020-090398 2020年5月25日(25.05.2020) JP

(71) 出願人:横河電機株式会社(**YOKOGAWA ELECTRIC CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1808750 東京都武蔵野市中町２丁目９番３２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 秋吉 竜太郎 (**AKIYOSHI Ryutaro**); 〒1808750 東京都武蔵野市中町２丁目９番３２号 横河電機株式会社内 Tokyo (JP).

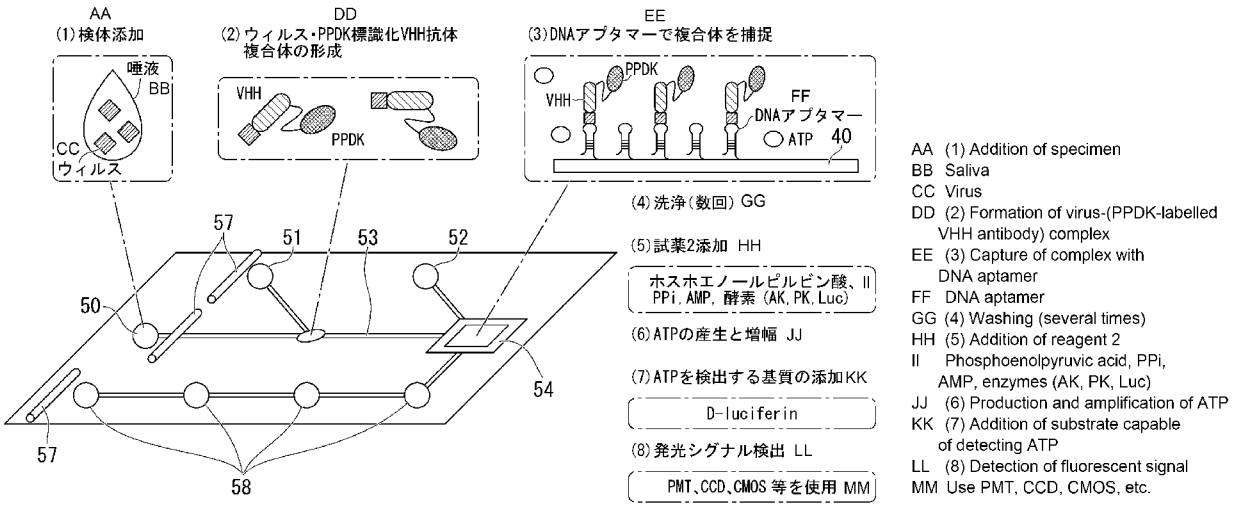
(74) 代理人: 棚井 澄雄, 外 (**TANAI Sumio** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY,

(54) **Title:** METHOD FOR DETECTING TARGET MOLECULE IN SPECIMEN, AND TARGET MOLECULE DETECTION KIT

(54) 発明の名称： 検体中の標的分子の検出方法、及び標的分子検出キット

[図6]



(57) **Abstract:** A method for detecting a target molecule in a specimen, comprising: a (target molecule)-(labelled binding molecule)-(capturing molecule) complex formation step for reacting the target molecule in the specimen, a capture molecule that is capable of binding to the target molecule and a labelled binding molecule that has been labelled with an enzyme capable of catalyzing an ATP production reaction and is capable of binding to the target molecule with one another to form a complex composed of the target molecule, the capturing molecule and the labelled binding molecule; a step for removing the labelled binding molecule that has not been bound to the target molecule; an ATP production step for reacting the (target molecule)-(labelled binding molecule)-(capturing molecule) complex with a substrate for the enzyme capable of catalyzing an ATP production reaction to produce ATP; an ATP amplification step for amplifying the produced ATP; and an ATP detection step for detecting the amplified ATP.

WO 2021/241446 A1

[続葉有]

MA, MD, ME, MG, MK, MN, 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, 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, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, 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, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約:検体中の標的分子と、前記標的分子と結合する捕捉分子と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、前記標的分子と結合する標識化結合分子とを反応させ、前記標的分子と前記捕捉分子と前記標識化結合分子とからなる複合体を形成させる、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体形成工程と、標的分子と結合しなかった前記標識化結合分子を除去する工程と、前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体とＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質とを反応させＡＴＰを産生させる、ＡＴＰ産生工程と、産生されたＡＴＰを増幅する、ＡＴＰ増幅工程と、増幅したＡＴＰを検出する、ＡＴＰ検出工程と、を含む、検体中の標的分子の検出方法。

明　細　書

発明の名称 ：

検体中の標的分子の検出方法、及び標的分子検出キット

技術分野

[0001] 本発明は、検体中の標的分子の検出方法、及び標的分子検出キットに関する。

背景技術

[0002] 免疫測定法は、ヒトの体液中のウィルスや食品中のアレルゲンなどの標的物を検出する手法として広く用いられている。イムノクロマトグラフィは、セルロース膜上を検体が試薬を溶解しながらゆっくりと流れる性質（毛細管現象）を応用した免疫測定法であり、妊娠診断、インフルエンザ検査等に応用されている。

しかしながら、イムノクロマトグラフィは、非常に簡便に測定が可能というメリットがあるが、呈色による判定方法を使用しているため、低感度である。インフルエンザなどの判定においては、発症直後の検体中のウィルス量が少ない場合などに、ウィルスを検出することができず、ウィルス量が十分に増えるまで時間をおいてからの再測定が必要になることがある。

[0003] ＥＬＩＳＡ（Ｅｎｚｙｍｅ－Ｌｉｎｋｅｄ　ＩｍｍｕｎｏＳｏｒｂｅｎｔ Ａｓｓａｙ）は種々の抗原抗体反応の組合せを利用し、酵素標識した抗原あるいは抗体を反応系に組込んで、酵素活性を検出することによって、検体中の標的分子を検出する手法であり、イムノクロマトグラフィで一般的に採用されている金属コロイドによる呈色を目視判定する方法と比較して、高感度に標的分子を検出することが可能である。ＥＬＩＳＡは、酵素反応によって吸光スペクトルが変化する基質（比色法）、蛍光シグナルを出す基質（蛍光法）、発光する基質（化学発光法、生物発光法）などを利用して、プレートリーダーやルミノメーターなどの測定装置で酵素活性が数値化され、標的分子を検出・定量することができる。

[0004] 一方、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素を用いて、産生するＡＴＰを、ルシフェラーゼを用いて発光させ、生成する発光量を測定することによるＡＴＰの定量法が知られている（特許文献１）。また、検体中のＡＴＰを増幅させ、増幅したＡＴＰを、生物発光法を用いて定量する方法が知られている（特許文献２）。しかしながら、これらの定量方法は、いずれもＡＴＰ等のＡＴＰ変換反応に用いられる分子の定量方法であり、検体中のＡＴＰ変換反応に関与しない標的分子を、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素を標識酵素として用いて検出する免疫測定方法ではない。

[0005] ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素を標識酵素として用いて検出する免疫測定方法として、非特許文献１に、酢酸キナーゼ又はピルビン酸リン酸ジキナーゼを標識酵素として用いる、標的分子の免疫測定方法が開示されている。しかしながら、この方法では、酢酸キナーゼ又はピルビン酸リン酸ジキナーゼの代謝回転数のみに依存したＡＴＰ産生量に基づく発光シグナルしか得ることができず、微量のＡＴＰの検出はできない。また、この方法は、分解しやすいＡＤＰを用いた酢酸キナーゼによるＡＴＰ供給を初段反応としており、検出キットなどの商業的利用には適していない。

先行技術文献

特許文献

[0006] 特許文献1：特開平９－２３４０９９号公報

特許文献2：特開２００１－２９９３９０号公報

非特許文献

[0007] 非特許文献1：Ａｎａｌ Ｓｃｉ． ２００３ Ｊａｎ；１９（１）：１０５－９．

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] イムノクロマトグラフィやＥＬＩＳＡのような免疫測定法では、抗体の標識物とその検出法で感度が決定される。免疫測定法の中で、最も高感度に分

子を検出できる生物発光法は、１アッセイにおいて１０$^{-20}$ｍｏｌ（分子数で数千個）程度の分子の検出が可能であるが、この生物発光法を用いても、１アッセイあたりで数千分子以上の標的分子が検体に含まれている必要があり、それ以下の分子数では標的分子を検出することができない。

[0009] したがって、本発明の目的は、従来の免疫測定方法では、検体中の標的分子の量が検出限界以下であるため測定できない場合であっても測定可能な、検体中の標的分子の検出方法、及び標的分子検出キットを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0010] 上記の目的を達成するために、本発明は以下の構成を採用した。

［１］ 工程（１）：検体中の標的分子と、前記標的分子と結合する捕捉分子と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、前記標的分子と結合する標識化結合分子とを反応させ、前記標的分子と前記標識化結合分子と前記捕捉分子とからなる複合体（以下、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体と称する）を形成させる、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体形成工程と、

工程（２）：前記工程（１）において、標的分子と結合しなかった前記標識化結合分子を除去する工程と、

工程（３）：前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質とを反応させＡＴＰを産生させる、ＡＴＰ産生工程と、

工程（４）：前記工程（３）で産生されたＡＴＰを増幅する、ＡＴＰ増幅工程と、

工程（５）：前記工程（４）で増幅したＡＴＰを検出する、ＡＴＰ検出工程と、

を含む、検体中の標的分子の検出方法。

［２］ 前記工程（１）において、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させる前に、予め、検体中のＡＴＰを除去する工程を含む、［１

］に記載の検出方法。

［３］　前記捕捉分子が、標的分子と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマーである、［１］又は［２］に記載の検出方法。

［４］　前記標識化結合分子が、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、標的分子と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマーである、［１］～［３］のいずれか一項に記載の検出方法。

［５］　前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ピルビン酸リン酸ジキナーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸及びＡＭＰである、［１］～［４］のいずれか一項に記載の検出方法。

［６］　前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、アセチル－ＣｏＡシンテターゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ＡＭＰ、ピロリン酸、及びアセチル－ＣｏＡである、［１］～［４］のいずれか一項に記載の検出方法。

［７］　前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ＡＴＰスルフリラーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、アデノシン５’－ホスホスルフェート及びピロリン酸である、［１］～［４］のいずれか一項に記載の検出方法。

［８］　前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、II型ポリリン酸キナーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ＡＭＰ及びポリリン酸である、［１］～［４］のいずれか一項に記載の検出方法。

［９］　前記工程（４）において、ＡＴＰの増幅を、アデニル酸キナーゼとピルビン酸キナーゼとを用いることにより行う、［１］～［８］のいずれか一項に記載の検出方法。

［１０］　前記工程（４）において、ＡＴＰの増幅を、アデニル酸キナーゼとポリリン酸キナーゼとを用いることにより行う、［１］～［８］のいずれか一項に記載の検出方法。

［１１］　前記工程（４）において、ＡＴＰの増幅を、アデニル酸キナーゼと酢酸キナーゼとを用いることにより行う、［１］～［８］のいずれか一項に記載の検出方法。

［１２］　前記工程（５）において、ＡＴＰの検出を、ルシフェラーゼを用いることにより行う、［１］～［１１］のいずれか一項に記載の検出方法。

［１３］　標的分子と結合する捕捉分子が固定化された不溶性担体と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、前記標的分子と結合する標識化結合分子と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質と、ＡＴＰを増幅する試薬と、ＡＴＰを検出する試薬と、を含む、検体中の標的分子検出キット。

［１４］　前記捕捉分子が、標的分子と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマーである、［１３］に記載の検出キット。

［１５］　前記標識化結合分子が、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、標的分子と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマーである、［１３］又は［１４］に記載の検出キット。

［１６］　前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ピルビン酸リン酸ジキナーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸及びＡＭＰである、［１３］～［１５］のいずれか一項に記載の検出キット。

［１７］　前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、アセチル－ＣｏＡシンテターゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ＡＭＰ、ピロリン酸及びアセチル－ＣｏＡである、［１３］～［１５］のいずれか一項に記載の検出キット。

［１８］　前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ＡＴＰスルフリラーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、アデノシン５’－ホスホスルフェート及びピロリン酸である、［１３］～［１５］のいずれか一項に記載の検出キット。

［１９］　前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、II型ポリリン酸キ

ナーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ＡＭＰ及びポリリン酸である、［１３］～［１５］のいずれか一項に記載の検出キット。

［２０］　前記ＡＴＰを増幅する試薬が、ＡＭＰ、ホスホエノールピルビン酸、マグネシウムイオン、アデニル酸キナーゼ及びピルビン酸キナーゼである、［１３］～［１９］のいずれか一項に記載の検出キット。

［２１］　前記ＡＴＰを増幅する試薬が、ＡＭＰ、ポリリン酸、マグネシウムイオン、アデニル酸キナーゼ及びポリリン酸キナーゼである、［１３］～［１９］のいずれか一項に記載の検出キット。

［２２］　前記ＡＴＰを増幅する試薬が、ＡＭＰ、アセチルリン酸、マグネシウムイオン、アデニル酸キナーゼ及び酢酸キナーゼである、［１３］～［１９］のいずれか一項に記載の検出キット。

［２３］　前記ＡＴＰを検出する試薬が、Ｄ－ルシフェリン及びルシフェラーゼである、［１３］～［２２］のいずれか一項に記載の検出キット。

発明の効果

[0011]　本発明の検体中の標的分子の検出方法によれば、従来の免疫測定方法では、検体中の標的分子の量が検出限界以下であるため測定できない場合であっても、検体中の標的分子を検出することができる。また、本発明の検体中の標的分子検出キットによれば、従来の免疫測定キットでは、検体中の標的分子の量が検出限界以下であるため測定できない場合であっても、検体中の標的分子を検出することができる、標的分子検出キットが提供される。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]検体中の標的分子１０と、不溶性担体４０に固定化された、標的分子１０と結合する捕捉分子２０と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された標識化結合分子３０とを反応させ、不溶性担体４０上に、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させた状態を示した図である。

[図2]ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程とを分けて行う場合の標的分子の検出方法の操作手順の一例を示した図である。

[図3]ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程とを同時に行う場合の標的分子の検出方法の操作手順の一例を示した図である。

[図4]ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程とを同時に行う場合の標的分子の定量方法の操作手順の一例を示した図である。

[図5A]本実施形態の標的分子の検出方法を用いたイムノクロマトグラフィの構成例の側面を示した図である。

[図5B]本実施形態の標的分子の検出方法を用いたイムノクロマトグラフィの構成例の上面を示した図である。

[図6]ローラーで弾性容器に外から力をかけて送液を行うカートリッジを用いて、標的分子１０としてウィルス、標的分子１０に結合する捕捉抗体２０としてＤＮＡアプタマー、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された標識化結合物質３０としてピルビン酸リン酸ジキナーゼ標識化重鎖可変領域抗体、ＡＴＰを増幅する酵素としてアデニル酸キナーゼとピルビン酸キナーゼ、ＡＴＰを検出する酵素としてルシフェラーゼ、不溶性担体４０としてシクロオレフィンポリマー（ＣＯＰ）をそれぞれ用いたイムノクロマトグラフィの構成例と動作の一例を示した図である。

[図7]実施例１のサンプル番号１～７のサンプルの発光強度を示したグラフである。

[図8]実施例２のＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体とＡＴＰを増幅する試薬を組み合わせて用いた場合、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体を単独で使用した場合、ネガティブコントロール（ＡＴＰ増幅を行った場合とＡＴＰ増幅を行わなかった場合）の発光強度を示したグラフである。

[図9]実施例２のＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体とＡＴＰを増幅する試薬を組み合わせて用いた場合と、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体を単独で使用した場合とにおいて、ＡＴＰの増幅を行った場合のネガティブコントロールの発光強度と、ＡＴＰの増幅を行わなかった場合のネガティブコントロールの発光強度とをバックグラウンドとしてそれぞれ減算した発光強度を示したグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の検体中の標的分子の検出方法は、

工程（１）：検体中の標的分子と、前記標的分子と結合する捕捉分子と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、前記標的分子と結合する標識化結合分子とを反応させ、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させる、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体形成工程と、

工程（２）：前記工程（１）において、標的分子と結合しなかった前記標識化結合分子を除去する工程と、

工程（３）：前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質とを反応させＡＴＰを産生させる、ＡＴＰ産生工程と、

工程（４）：前記工程（３）で産生されたＡＴＰを増幅する、ＡＴＰ増幅工程と、

工程（５）：前記工程（４）で増幅したＡＴＰを検出する、ＡＴＰ検出工程と、

を含むことを特徴とする。

[0014] 以下、本発明の検体中の標的分子の検出方法の実施形態について説明する。

なお、以下の記載において、特に断らない限り、捕捉分子、標識化結合分子とは、それぞれ、標的分子と結合する捕捉分子、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、標的分子と結合する標識化結合分子を意味する。

［工程（１）］

工程（１）は、検体中の標的分子と、捕捉分子と、標識化結合分子とを反応させ、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させる、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体形成工程である。

[0015] 工程（１）において、検体中の標的分子と、捕捉分子と、標識化結合分子とを反応させる方法としては、検体中の標的分子と、捕捉分子と、標識化結

合分子とを同時に反応させる方法であっても、標的分子と捕捉分子とを反応させ、標的分子と捕捉分子とからなる標的分子・捕捉分子複合体を形成させた後に、標識化結合分子を反応させる方法であってもよい。また、標的分子と標識化結合分子とを反応させ、標的分子と標識化結合分子とからなる標的分子・標識化結合分子複合体を形成させた後に、捕捉分子を反応させる方法であってもよい。

前記捕捉分子は、不溶性担体に固定化されていなくても、固定化されていてもよいが、固定化されていることが好ましい。

[0016] 図１に、前記工程（１）において、検体中の標的分子１０と、不溶性担体４０に固定化されている捕捉分子２０と、標識化結合分子３０とを反応させ、不溶性担体４０上に、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させた状態を示す。捕捉分子２０が不溶性担体４０に固定化されている場合、後述する工程（２）において、不溶性担体４０を洗浄液で洗浄することにより、工程（１）において形成された標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を、未反応成分（検体由来の成分、標的分子１０に結合しなかった標識化結合分子３０等）から容易に分離することができる。洗浄液としては、リン酸緩衝化生理食塩水（以下、ＰＢＳとも称する）、界面活性剤を含有するＰＢＳ、後述の水性媒体等が挙げられる。前記界面活性剤としては、例えばツイーン（Ｔｗｅｅｎ）２０等の非イオン性界面活性剤等が挙げられる。

[0017] 前記不溶性担体４０としては、前記捕捉分子２０を固定化できるものであれば特に制限はない。不溶性担体４０の好ましい素材としてはポリスチレン、ポリカーボネート、ポリビニルトルエン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ナイロン、ポリメタクリレート、ゼラチン、アガロース、セルロース、ニトロセルロース、セルロースアセテート、酢酸セルロース、シクロオレフィンポリマー、ポリエチレンテレフタレート等の高分子素材、ガラス、セラミックス、磁性粒子や金属等が挙げられるが、タンパク質を吸着せず、標識化結合分子３０の不溶性担体への非特異的結合を抑制できる、酢酸セルロース、シクロオレフィンポリマー等が好ましい。不溶性担体の

好ましい形状としてはチューブ；ビーズ；プレート；基板；ラテックス等の微粒子；スティック等が挙げられる。

[0018] 捕捉分子２０の不溶性担体４０への固定化方法としては、物理学的結合を利用した方法と化学的結合を利用した方法またはこれらの併用等、公知の方法が用いられる。物理学的結合としては、例えば静電的結合、水素結合、疎水結合等が挙げられる。化学的結合としては、例えば共有結合、配位結合等が挙げられる。例えば、シクロポリオレフィン系ポリマー製の基板を不溶性担体４０として使用する場合には、前記基板に捕捉分子２０の溶液を添加して、１時間から１日間、４℃～３０℃でインキュベートすることにより、物理吸着させ固定化する方法を挙げることができる。

[0019] 捕捉分子２０は、直接、不溶性担体４０に固定化してもよいし、間接的に不溶性担体４０に固定化してもよい。間接的な固定化方法としては、例えばアビジンを固定化した不溶性担体４０に、ビオチン化した捕捉分子２０の溶液を添加し、ビオチンとアビジンとの特異的結合を介して、捕捉分子２０を不溶性担体４０に固定化する方法が挙げられる。また、不溶性担体４０に、捕捉分子２０に特異的に結合する抗体を固定化し、この抗体を介して捕捉分子２０を不溶性担体４０に固定化してもよい。あるいは、捕捉分子２０は、リンカーを介した共有結合により不溶性担体４０に固定化してもよい。リンカーとしては、例えば、捕捉分子２０の官能基と不溶性担体４０がその表面に保持している官能基の両者と共有結合できる分子等が挙げられる。前記分子としては、捕捉分子２０の官能基と反応することができる第１の反応活性基と、不溶性担体４０がその表面に保持している官能基と反応することができる第２の反応活性基とを同一分子内に持つ分子が好ましい。その中でも、第１の反応活性基と第２の反応活性基が異なる基である分子が特に好ましい。捕捉分子２０の官能基および不溶性担体４０がその表面に保持している官能基としては、カルボキシル基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、Ｎ－ヒドロキシサクシニル基、マレイミド基等が挙げられる。リンカーにおける活性な反応性基としては、アリルア

ジド、カルボジイミド、ヒドラジド、アルデヒド、ヒドロキシメチルホスフィン、イミドエステル、イソシアネート、マレイミド、Ｎ－ヒドロキシスクシンイミド（ＮＨＳ）エステル、ペンタフルオロフェニル（ＰＦＰ）エステル、ソラレン、ピリジルジスルフィド、ビニルスルホン等の基が挙げられる。

[0020] 本実施形態における検出方法において、検体としては特に制限はなく、例えば、ヒト等の哺乳動物の血液、血球、血清、血漿、髄液、尿、汗、唾液、羊水、膵液等の体液や組織等、食品や食品からの抽出物、動物細胞、植物細胞、昆虫細胞、微生物細胞の細胞培養液等、医療機器等の洗浄液等が挙げられる。検体は、検出対象物から採取されたものであっても、採取した検体に通常行われる希釈、濃縮等の処理を行ったものであってもよい。また、本実施形態の検出方法に用いる検体は、本実施形態の検出方法の実施時に採取または調製されたものであっても、予め採取又は調製され保存されたものであってもよい。

[0021] 本実施形態における検出方法において、標的分子１０としては、本実施形態の検出方法において検出の対象となる分子であって、本実施形態の検出方法により検出可能であれば特に制限はなく、例えば、タンパク質、核酸、脂質、ビタミン、多糖類、低分子化合物等が挙げられる。核酸としては、ＤＮＡ、ＲＮＡ等が挙げられる。また、タンパク質としては、酵素、ホルモン、各種ペプチド等が挙げられる。

[0022] 本実施形態における検出方法において、捕捉分子２０としては、検体中の標的分子１０と特異的に結合することができる分子であれば特に制限はなく、例えば、前記標的分子１０と特異的に結合する抗体若しくは抗体フラグメント、前記標的分子１０と特異的に結合するアプタマー等が挙げられる。前記抗体としては、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれも用いることができるが、モノクローナル抗体が好ましい。抗体フラグメントとしては、例えば、Ｆ（ａｂ’）$_2$、Ｆ（ａｂ）$_2$、Ｆａｂ’、Ｆａｂ、Ｆｖ、ｓｃＦｖ、これらの変異体、抗体部分を含む融合タンパク質又は融合ペプチド

等が挙げられる。

[0023] 前記抗体フラグメントとしては、ラクダ科動物抗体の重鎖可変領域抗体（以下、ＶＨＨ抗体とも称する）を用いることもできる。ＶＨＨ抗体は、重鎖可変領域のみで抗原と結合することができる。また、ＶＨＨ抗体は、タンデム化して用いることができ、タンデム化することにより、標的分子である抗原との結合親和性を向上させることができ、抗原以外の分子との非特異結合を軽減することができる。

これらの抗体及び抗体フラグメントは、公知の方法により作製することができる。

[0024] 検体中の標的分子と特異的に結合するアプタマーとしては、ＤＮＡアプタマー、ＲＮＡアプタマー等の核酸アプタマーであっても、ペプチドアプタマーであってもよい。核酸アプタマーは、ｉｎ ｖｉｔｒｏ ｓｅｌｅｃｔｉｏｎ法、ＳＥＬＥＸ法等の公知の方法により作製することができる。また、核酸アプタマーは、2’－フッ化ピリミジンやＰＥＧ鎖等による分子修飾がされたものであってもよく、前記分子修飾により、核酸アプタマーの半減期を長くすることができる。

[0025] 本実施形態における検出方法において、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素としては、ＡＴＰを産生する反応を触媒することができる酵素であれば、特に制限はなく、例えば、ピルビン酸リン酸ジキナーゼ（Ｐｙｒｕｖａｔｅ ｐｈｏｓｐｈａｔｅ ｄｉｋｉｎａｓｅ；以下、ＰＰＤＫとも称する）、アセチル－ＣｏＡシンテターゼ（Ａｃｅｔｙｌ－ＣｏＡ ｓｙｎｔｈｅｔａｓｅ）、ＡＴＰスルフリラーゼ（ＡＴＰ－Ｓｕｌｆｕｒｙｌａｓｅ）、II型ポリリン酸キナーゼ等が挙げられるが、ＰＰＤＫが好ましい。

[0026] ＰＰＤＫは、下記式に示すように、補因子としてのマグネシウムイオン存在下で、ＡＭＰ、ホスホエノールピルビン酸及びピロリン酸（ＰＰｉ）に作用して、ＡＴＰ、ピルビン酸及びリン酸（Ｐｉ）を生じる反応を触媒し、その逆の反応も触媒する公知の酵素であり、ピルベートオルトホスフェートジキナーゼともいう。

[0027] [化1]

$$\text{ホスホエノールピルビン酸} + \text{PPi} + \text{AMP} \overset{\text{PPDK}}{\rightleftarrows} \text{ピルビン酸} + \text{Pi} + \text{ATP}$$

PPi:ピロリン酸
Pi:リン酸

[0028] 本実施形態における検出方法において、標識化結合分子３０としては、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、標的分子１０と結合する分子であれば特に制限はなく、例えば、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、前記標的分子１０と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマー等が挙げられる。標識化結合分子３０は、捕捉分子２０とは異なる部分で標的分子１０と結合してもよいし、捕捉分子２０と同一の部分で標的分子１０と結合してもよい。

[0029] 前記標識化結合分子３０における抗体、抗体フラグメント、及びアプタマーとしては、それぞれ前述した捕捉分子２０における抗体、抗体フラグメント、及びアプタマーが挙げられる。前記標識化結合分子３０と前記捕捉分子２０の組み合わせとしては、抗体同士であってもよく、抗体と抗体フラグメントの組み合わせ、抗体とアプタマーの組み合わせ、抗体フラグメントとアプタマーの組み合わせ等いずれであってもよい。

[0030] 前記標識化結合分子３０の標識化は、標的分子１０と結合する分子の官能基と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の官能基との間で、リンカーを介してまたは介さず共有結合を生じる反応によって行うことができる。官能基としては、カルボキシル基やアミノ基、グリシジル基、スルフヒドリル基、水酸基、アミド基、イミノ基、ヒドロキシサクシニルエステル基、マレイミド基、イソチオシアナート基等が挙げられる。この官能基同士の間で縮合反応を行わせることが可能である。

[0031] リンカーを介さない結合方法としては例えば、ＥＤＣ等のカルボジイミド化合物を用いる方法等が挙げられる。この場合、ＮＨＳまたはその誘導体等の活性エステルを使用することも可能である。イソチオシアナート基とアミノ基の間の縮合反応は、他の試薬を必要とせず、中性～弱アルカリ性の条件

で混合するだけで進行するため、好ましい。

[0032] リンカーとしては、例えば、標的分子１０と結合する分子の官能基に反応する官能基と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の官能基に反応する官能基の両方の官能基を分子内に有するものが挙げられる。前記両方の官能基を分子内に有するものとしては、前記標的分子１０と結合する分子のアミノ酸残基と反応することができる第１の官能基と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の官能基と反応することができる第２の官能基とを同一分子内に有する分子が好ましい。その中でも、第１の官能基と第２の官能基とが異なる基である分子が特に好ましい。リンカーの官能基としては、例えば前述の官能基が挙げられる。

[0033] また、標的分子１０と結合する分子が、抗体、抗体フラグメント等のタンパク質である場合は、標的分子１０と結合する分子と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素とを、一つの融合タンパク質として製造することもできる。前記融合タンパク質において、標的分子１０と結合する分子と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素との間には数残基から数十残基のリンカーペプチドを挿入してもよい。また、前記融合タンパク質において、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素は、標的分子１０を結合する分子のＮ末側とＣ末側のいずれに融合させてもよい。

[0034] 工程（１）において、前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させる前に、予め、検体中のＡＴＰを除去することが好ましい。工程（１）において、前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させる前に、予め、検体中のＡＴＰを除去することにより、後述する工程（４）において、検体中に存在するＡＴＰにより、ＡＴＰが増幅し、擬陽性が発生することを抑制でき、正確に検体中の標的分子１０を検出することができる。

[0035] 前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させる前に、予め、検体中のＡＴＰを除去する方法としては、検体中のＡＴＰを除去できる方法であれば、特に制限はないが、例えば、洗浄によりＡＴＰを除去する方法

、アデノシンリン酸デアミナーゼ、アピラーゼ、ヘキソキナーゼ等のＡＴＰを分解する酵素を作用させることにより、ＡＴＰを分解除去する方法等が挙げられる。

[0036] ［工程（２）］

工程（２）は、工程（１）において、標的分子１０と結合しなかった標識化結合分子３０を除去する工程である。工程（１）において、標的分子と結合しなかった標識化結合分子３０を除去することにより、擬陽性の発生を抑制でき、正確に標的分子を検出することができる。また、工程（１）において、標的分子と結合しなかった標識化結合分子３０以外にも、標的分子１０以外の検体由来の成分も除去することができる。

[0037] 工程（２）において、標的分子と結合しなかった前記標識化結合分子３０を除去する方法としては、特に制限はなく、例えば、洗浄、遠心分離等が挙げられるが、洗浄が好ましい。例えば、捕捉分子・標的分子・標識化結合分子複合体が固定化されている不溶性担体を洗浄液を用いて洗浄する方法が挙げられる。洗浄液としては、ＰＢＳ、界面活性剤を含有するＰＢＳ、後述の水性媒体等が挙げられる。前記界面活性剤としては、例えばツイーン（Ｔｗｅｅｎ）２０等の非イオン性界面活性剤等が挙げられる。

[0038] ［工程（３）］

工程（３）は、前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質とを反応させＡＴＰを産生させる、ＡＴＰ産生工程である。

前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質としては、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素に応じて、適宜決定することができる。例えば、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ＰＰＤＫである場合は、ホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸及びＡＭＰが挙げられる。前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、アセチル－ＣｏＡシンテターゼ（Ａｃｅｔｙｌ－ＣｏＡ　ｓｙｎｔｈｅｔａｓｅ）である場合は、ＡＭＰ、ピロリン酸及びアセチル－ＣｏＡが挙げられる。前記ＡＴＰを産生する反応を触媒す

る酵素が、ＡＴＰスルフリラーゼ（ＡＴＰ－Ｓｕｌｆｕｒｙｌａｓｅ）である場合は、アデノシン５’－ホスホスルフェート及びピロリン酸が挙げられる。前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素がII型ポリリン酸キナーゼである場合は、ＡＭＰ及びポリリン酸が挙げられる。なお、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質と前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素との反応は、使用する酵素に応じ、マグネシウムイオン等の補因子存在下で行う。

[0039] ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素としてＰＰＤＫで標識した標識化結合分子を用いた場合は、前記工程（１）で生成した標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体に、補因子としてのマグネシウムイオン存在下、ホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸（ＰＰｉ）及びＡＭＰを反応させることにより、ピルビン酸、リン酸（Ｐｉ）及びＡＴＰが産生する。この産生したＡＴＰを、次の工程（４）のＡＴＰ増幅工程に供する。

[0040] ［工程（４）］

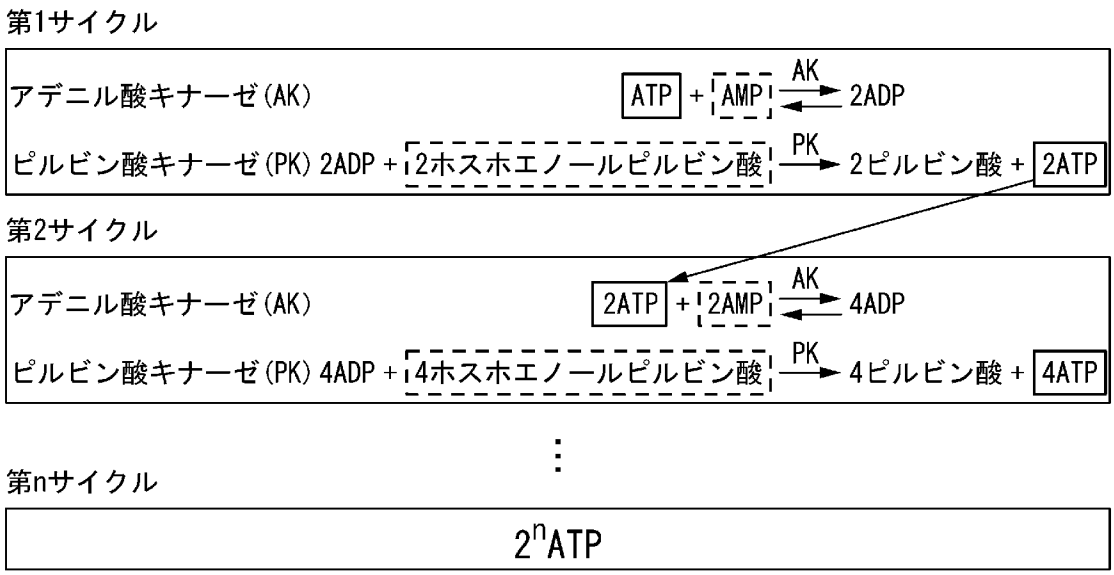
工程（４）は、前記工程（３）で産生されたＡＴＰを増幅する、ＡＴＰ増幅工程である。ＡＴＰを増幅する方法としては、特に制限はないが、ＡＴＰを増幅する試薬を用いる方法が好ましい。ＡＴＰを増幅する試薬としては、ＡＴＰを増幅する酵素とその基質が挙げられる。ＡＴＰを増幅する酵素とその基質とを用いる場合は、ＡＴＰを増幅する試薬には、その酵素反応に必要な補因子を含む。ＡＴＰを増幅する酵素としては、例えば、アデニル酸キナーゼ（以下、ＡＫとも称する）とピルビン酸キナーゼ（以下、ＰＫとも称する）の組み合わせ、ＡＫとポリリン酸キナーゼの組み合わせ、ＡＫとクレアチンキナーゼの組み合わせ、ＡＫと酢酸キナーゼとの組み合わせ等が挙げられるが、ＡＫとＰＫの組み合わせが好ましい。

[0041] ＡＴＰを増幅する酵素の基質及び補因子としては、ＡＴＰを増幅する酵素に応じて適宜決定することができる。例えば、ＡＴＰを増幅する酵素が、ＡＫとＰＫの組み合わせである場合は、ＡＴＰを増幅する酵素の基質としては、ＡＭＰ及びホスホエノールピルビン酸が挙げられ、補因子としてはマグネ

シウムイオンが挙げられる。ＡＴＰを増幅する酵素が、ＡＫとポリリン酸キナーゼの組み合わせである場合は、ＡＴＰを増幅する酵素の基質としては、ＡＭＰ及びポリリン酸が挙げられ、補因子としてはマグネシウムイオンが挙げられる。ＡＴＰを増幅する酵素が、ＡＫとクレアチニンキナーゼの組み合わせである場合は、ＡＴＰを増幅する酵素の基質としては、ＡＭＰ及びクレアチンリン酸が挙げられ、補因子としてはマグネシウムイオンが挙げられる。ＡＴＰを増幅する酵素が、ＡＫと酢酸キナーゼの組み合わせである場合は、ＡＴＰを増幅する酵素の基質としては、ＡＭＰ及びアセチルリン酸が挙げられ、補因子としてはマグネシウムイオンが挙げられる。

[0042] ＡＫとＰＫの組み合わせを用いてＡＴＰを増幅する方法を、下記の反応式で示す。

[0043] [化2]



[0044] ＡＫとＰＫとを用いるＡＴＰの増幅方法では、補因子としてのマグネシウムイオンの存在下、ＡＫを用いて、工程（３）で産生した１分子のＡＴＰと、１分子のＡＭＰとから、２分子のＡＤＰが産生する。次に、補因子としてのマグネシウムイオンの存在下、ＰＫを用いて、産生した２分子のＡＤＰと２分子のホスホエノールピルビン酸とから、２分子のピルビン酸と２分子のＡＴＰが産生する(第１サイクル)。第１サイクルで産生した２分子のＡＴＰ

を、再度上記ＡＫとＰＫとを用いる反応系により、４分子のＡＴＰを産生させる(第２サイクル)。このサイクルをｎ回繰り返すことにより、第ｎサイクルでは2^n倍にＡＴＰが増幅される。

[0045] 工程（４）は、前記工程（３）と同時に行ってもよい。工程（４）を工程（３）と同時に行う場合は、工程（３）において、前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体に、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質と、ＡＴＰを増幅する試薬とを添加することにより、ＡＴＰの産生とＡＴＰの増幅を同時に行うことができる。例えば、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素がＰＰＤＫであり、ＡＫとＰＫとを用いて、ＡＴＰを増幅させる場合、前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体に、ホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸（ＰＰｉ）、ＡＭＰ、ＡＫ、ＰＫ及びマグネシウムイオンを添加することにより、ＡＴＰの産生と増幅とを同時に行うことができる。

[0046] ［工程（５）］

工程（５）は、前記工程（４）で増幅したＡＴＰを検出する、ＡＴＰ検出工程である。ＡＴＰを検出する方法としては、特に制限はないが、ＡＴＰを検出する試薬を用いる方法が好ましい。ＡＴＰを検出する試薬としては、ＡＴＰと反応して色素や発光を生じさせる酵素とその基質やＡＴＰと反応して過酸化水素を産生する酵素とその基質等が挙げられる。

[0047] ＡＴＰを検出する試薬を用いる方法としては、ルシフェラーゼを用い、ＡＴＰと、Ｄ－ルシフェリンにより生成する発光を測定する方法、ＡＴＰを検出する酵素としてグルコキナーゼとアセテートキナーゼを併用して、ＡＴＰとグルコースとからグルコース－６－リン酸の生成する反応を増幅し、さらにグルコース－６－リン酸デヒドロゲナーゼ、およびジアホラーゼを組み合わせて目視可能な呈色反応を行う方法（特開２００３－２２５０９８）、ヘキソキナーゼとピルベートキナーゼとを併用して、ＡＴＰとＤ－グルコースとからグルコース６－リン酸の生成する反応を増幅し、１－メトキシ－５－フェナジンメチルサルフェート及びイソルミノールを使用した化学発光によって定量する方法（特開昭６４－２３９００）、ＡＴＰにヌクレオシドホス

ホリラーゼとキサンチンオキシダーゼを加え、反応で生じる過酸化水素を定量する方法（特開昭６３－１１８４８）、ＡＴＰにＡＴＰ分解酵素を作用させ、生じたリン酸とモリブデンとの反応により生じるモリブデン青を測定する方法（特開平４－３６０７００号等）、ＡＴＰに、ニコチン酸アミドモノヌクレオチドとアデニリルトランスフェラーゼを作用させ、生じたＮＡＤを、ＮＡＤを補酵素とする酸化還元反応系と、還元型ＮＡＤを補酵素とする補酵素サイクリング反応を行い定量する方法（特開昭５９－１６６０９９）等が挙げられるが、ルシフェラーゼを用い、ＡＴＰと、Ｄ－ルシフェリンにより生成する発光を測定する方法が好ましい。その他、ＡＴＰを検出する方法として、比色または蛍光を用いてＡＴＰ量を検出する市販のキット（例えば、ＡＴＰ Ｃｏｌｏｒｉｍｅｔｒｉｃ／Ｆｌｕｏｒｏｍｅｔｒｉｃ Ａｓｓａｙ Ｋｉｔ、ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ社製）を用いることもできる。

ＡＴＰを検出する酵素としてルシフェラーゼを用い、工程（４）で増幅したＡＴＰと、Ｄ－ルシフェリンとにより発光が発生する反応式を下記に示す。

[0048] [化3]

$$\text{D-luciferin} + \text{ATP} + O_2 \overset{\text{Luc}}{\rightleftarrows} \text{Oxyluciferin} + \text{PPi} + \text{AMP} + CO_2 + \text{発光}$$

PPi:ピロリン酸
Luc:ルシフェラーゼ

[0049] ルシフェラーゼとしては、例えば、Ｐｈｏｔｉｎｕｓ ｐｙｒａｌｉｓなどのホタルやクリックビートルなどに由来する甲虫ルシフェラーゼ、甲虫ルシフェラーゼの組換え体、耐熱性及び／又は耐薬品性を付与した甲虫ルシフェラーゼの変異体、又は、ＡＴＰ、ルシフェリン、分子状酸素、及び補因子としてのマグネシウム若しくは他の任意の２価陽イオンと反応して発光を生成する任意のルシフェラーゼを使用することができる。また、ルシフェラーゼの基質としては、Ｄ－ルシフェリンの他に、アミノルシフェリンやＡｋａＬｕｍｉｎｅ等のルシフェリンアナログを用いることもできる。

[0050] 工程（５）におけるＡＴＰの検出反応は、工程（３）におけるＡＴＰ産生反応、及び工程（４）におけるＡＴＰ増幅反応よりも、反応速度が遅いため、工程（５）は、工程（３）と工程（４）と同時に行ってもＡＴＰを検出することができる。工程（３）と工程（４）と工程（５）とを同時に行う場合は、工程（３）において、前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体に、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質を添加すると同時に、ＡＴＰを増幅する試薬と、ＡＴＰを検出する試薬とを添加することにより、ＡＴＰの産生と増幅と検出とを同時に行うことができる。例えば、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素がＰＰＤＫであり、ＡＴＰの増幅にＡＫとＰＫとを用い、ルシフェラーゼでＡＴＰを検出する場合、工程（３）において、前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体に、ホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸、ＡＭＰ、ＡＫ、ＰＫ、Ｄ－ルシフェリン、ルシフェラーゼ及び補因子としてのマグネシウムイオンを添加することにより、ＡＴＰの産生と増幅と検出とを同時に行うことができる。

[0051] 検体の代わりに、既知濃度の標的分子を用いて、工程（１）から工程（５）を行うことにより、標的分子の濃度とＡＴＰ検出工程におけるシグナルとの関係を表す検量線を作成し、作成された検量線と、検体を用いて、工程（１）から工程（５）を行い、工程（５）で検出されたシグナルの測定値とから、検体中の標的分子の濃度を定量することができる。

[0052] また、既知濃度の標的分子を用いて、工程（１）から工程（５）を行い、ＡＴＰの検出工程におけるシグナル発生からのシグナル強度の経時変化を測定してシグナル強度の増加曲線を作成し、検体を用いて、工程（１）から工程（５）を行い、工程（５）におけるシグナル強度の増加曲線とのカーブフィッティングを行うことにより、検体中の標的分子の濃度を定量することもできる。

[0053] 本実施形態の標的分子の検出方法において、工程（１）及び工程（３）～工程（５）は水性媒体中で行うことが好ましい。前記水性媒体としては、例えば、脱イオン水、蒸留水、緩衝液等が挙げられ、緩衝液が好ましい。緩衝

液の調製に使用される緩衝剤としては、緩衝能を有するものならば特に限定されないが、ｐＨ１～１１の例えば乳酸緩衝剤、クエン酸緩衝剤、酢酸緩衝剤、コハク酸緩衝剤、フタル酸緩衝剤、リン酸緩衝剤、トリエタノールアミン緩衝剤、ジエタノールアミン緩衝剤、リジン緩衝剤、バルビツール緩衝剤、イミダゾール緩衝剤、リンゴ酸緩衝剤、シュウ酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、ホウ酸緩衝剤、炭酸緩衝剤、グリシン緩衝剤、トリス緩衝剤、グッド緩衝剤等が挙げられる。

[0054] 緩衝液の濃度は、標的分子の検出に適した濃度であれば特に制限はされないが、０．００１～２．０ｍｏｌ／Ｌが好ましく、０．００５～１．０ｍｏｌ／Ｌがより好ましく、０．０１～０．１ｍｏｌ／Ｌが特に好ましい。

[0055] 次に、本実施形態の標的分子の検出方法により標的分子を検出及び定量する操作手順について説明する。図２は、ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程を分けて行う場合の標的分子の検出方法の操作手順の一例を示した図である。

[0056] ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程を分けて行う場合の標的分子の検出方法においては、まず、検体と標識化結合分子３０を混合し、得られた検体と標識化結合分子３０の混合物を捕捉抗体２０が固定化された不溶性担体４０上に添加する。その結果、不溶性担体４０上に固定化された捕捉抗体２０に、標的分子・標識化結合分子複合体が結合し、不溶性担体４０上に標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体が形成される。次に、不溶性担体４０を、洗浄液を用いて洗浄し、標的分子１０と結合しなかった標識化結合分子３０を除去する。洗浄が不十分である場合は、洗浄を繰り返す。洗浄が十分であるかは、例えば、洗浄液に標的分子１０に結合しなかった標識化結合分子３０が存在するか否かによって判断することができる。洗浄液に標識化結合分子３０が存在しなくなれば、洗浄が十分であると判断することができる。

[0057] 洗浄が十分であれば、次に、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質と、ＡＴＰを増幅する試薬と、ＡＴＰを検出する酵素と、必要に応じ、前記

酵素の補因子とを含む酵素反応液（以下、酵素反応液１とも称する）を不溶性担体４０に添加し、標識化結合分子３０に標識されているＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素により産生したＡＴＰを、ＡＴＰを増幅する試薬により増幅させる。ＡＴＰ産生反応及びＡＴＰ増幅反応に十分な時間が経過した場合は、ＡＴＰ検出工程に進む。ＡＴＰ産生反応及びＡＴＰ増幅反応に十分な時間が経過せずに、ＡＴＰの増幅量が不十分である場合は、反応時間を延長する。ＡＴＰの増幅量が十分であるか否かは、増幅したＡＴＰを検出できるか否かで判断することができる。

[0058] ＡＴＰの産生反応及び増幅反応時間が十分であり、検出するのに十分な量のＡＴＰが増幅された場合は、ＡＴＰを検出するための基質（以下、酵素反応液２とも称する）を添加し、発生するシグナルを測定する。例えば、発生するシグナルが発光であれば、発光シグナル強度を測定する。発生するシグナル強度が一定の閾値を超えた場合は、検体中に標的分子１０が含まれていると判定することができる。発生するシグナル強度が一定の閾値を超えない場合は、検体中に標的分子１０が含まれていないと判定することができる。検体に標的分子１０が含まれていると判定するシグナル強度の閾値は、検出の目的や検出感度等により適宜設定することができる。

[0059] 図３は、ＡＴＰの増幅工程と検出工程を同時に行う場合の標的分子の検出方法の操作手順の一例を示す図である。

[0060] ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程を同時に行う場合の標的分子の検出方法においては、不溶性担体４０を、洗浄液を用いて洗浄し、標的分子１０と結合しなかった標識化結合分子３０を除去する工程までは、前記ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程を分けて行う場合と同じである。ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程を同時に行う場合は、不溶性担体４０の洗浄後、酵素反応液１と酵素反応液２とを不溶性担体４０に添加し、標識化結合分子３０に標識されているＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素により産生したＡＴＰを増幅させる反応と同時に増幅したＡＴＰを検出する反応を行う。反応に十分な時間が経過した場合は、反応で発生したシグナルを測定する。反応

に十分な時間が経過せずに、ＡＴＰの検出量が不十分である場合は、反応時間を延長する。反応時間が十分であるか否かは、反応で発生したシグナルの強度で判断することができる。

[0061] 反応時間が十分であり、シグナルが発生する場合は、シグナル強度を測定する。発生するシグナル強度が一定の閾値を超えた場合は、検体中に標的分子１０が含まれていると判定することができる。発生するシグナル強度が一定の閾値を超えない場合は、検体中に標的分子１０が含まれていないと判定することができる。

[0062] 図４は、ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程を同時に行う場合の標的分子の定量方法の操作手順の一例を示す図である。

[0063] ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程とを同時に行う場合の標的分子の定量方法においては、不溶性担体４０を、洗浄液を用いて洗浄し、標的分子１０と結合しなかった標識化結合分子３０を除去する工程までは、前記ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程を分けて行う標的分子の検出方法の場合と同じである。ＡＴＰの増幅工程とＡＴＰの検出工程を同時に行う標的分子の定量方法の場合は、不溶性担体４０の洗浄後、酵素反応液１と酵素反応液２とを不溶性担体４０に添加し、標識化結合分子３０に標識されているＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素により産生したＡＴＰを増幅させると同時に増幅したＡＴＰを検出する反応を行い、ＡＴＰ検出反応で発生したシグナルの強度のシグナル発生開始時間からの経時変化を測定する。反応に十分な時間が経過せずに、シグナル強度が定量に不十分である場合は、反応時間を延長する。

[0064] 反応時間が十分であり、シグナル強度が定量に十分である場合は、予め、既知濃度の標的分子を用いて同様にシグナルを発生させて作成しておいた、シグナル強度の経時変化データとのフィッティングを行い、検体中に含まれる標的分子の量を算出する。

[0065] 次に、本実施形態の標的分子の検出方法を用いたイムノクロマトグラフィの具体例について説明する。本実施形態の標的分子の検出方法を用いたイム

ノクロマトグラフィは、ＥＬＩＳＡ法で広く用いられている装置を用いることができる。

[0066] 図５Ａに、本実施形態の標的分子の検出方法を用いたイムノクロマトグラフィの構成例の側面図を示す。図５Ｂに、本実施形態の標的分子の検出方法を用いたイムノクロマトグラフィの構成例の上面図を示す。本実施形態の標的分子の検出方法を用いたイムノクロマトグラフィは、検体添加部５０、第１試薬収容部５１、第２試薬収容部５２、流路５３、混合／反応部５４、検出部５５及び廃液収容部５６から構成されている。第１試薬収容部５１には、標識化結合分子３０（以下、試薬１とも称する）が収容されている。第２試薬収容部５２には、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質、ＡＴＰを増幅する試薬及びＡＴＰを検出する酵素（以下、試薬２とも称する）が収容されている。混合／反応部５４には、捕捉分子２０が固定化された不溶性担体４０が収容されている。なお、混合／反応部５４は、検出部５５を兼ねることもできる。

[0067] まず、検体は、ピペット等を用いて検体添加部５０に添加され、流路５３に送液される。検体の送液は、機械を用いた自動送液を用いることもできる。自動送液は、例えば、ポンプやローラーで弾性容器に外から力を加えて送液を行うカートリッジを使用して行うこともできる。図５Ａ、図５Ｂでは、ローラー５７を用いた送液の例を示している。

[0068] 次に、第１試薬収容部５１に収容されている試薬１がローラー５７により流路５３に送液され、検体と混合され、標的分子・標識化結合分子複合体が形成され、混合／反応部５４に供給される。混合／反応部５４に供給された標的分子・標識化結合分子複合体は、混合／反応部５４に収容されている不溶性担体４０に固定化されている捕捉分子２０に捕捉され、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体が不溶性担体４０上に形成される。

[0069] 次いで、混合／反応部５４を洗浄液で洗浄した後、第２試薬収容部５２に収容されている試薬２がローラー５７により流路５３を通じて混合／反応部５４に送液され、混合／反応部５４に収容されている不溶性担体４０上に固

定化されている標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体に添加され、ＡＴＰが産生し、増幅される。次に、混合／反応部５４にＡＴＰを検出する基質を添加すると、増幅したＡＴＰとＡＴＰを検出する酵素とＡＴＰを検出する酵素の基質とが反応しシグナルが発生する。発生したシグナルは、検出部５５でシグナルに応じた検出器により測定される。前記検出器としては、プレートリーダー、ルミノメーター、光電子増倍管（ＰＭＴ）、電荷結合素子（ＣＣＤ）、ＣＭＯＳ、感光素材（写真フィルム、インスタントフィルム、印画紙等）等を挙げることができる。シグナル測定後の反応液や洗浄液は、廃液収容部５６に収容され、廃棄される。

[0070] 次に、ローラーで弾性容器に外から力をかけて送液を行うカートリッジを用いて、標的分子１０としてウィルス、標識化結合物質３０としてＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体、捕捉抗体２０としてＤＮＡアプタマー、不溶性担体４０としてシクロオレフィンポリマー（ＣＯＰ）、ＡＴＰを増幅する酵素としてＡＫとＰＫの組み合わせ、ＡＴＰを検出する酵素としてルシフェラーゼ、ＡＴＰを検出する基質としてＤ－ルシフェリンをそれぞれ用いたイムノクロマトグラフィの構成例と動作の一例を、図６を用いて説明する。

[0071] （１）検体添加

検体が検体添加部５０からカートリッジに添加される。図６では、検体としてウィルスを含む唾液を例として示している。

[0072] （２）ウィルス・ＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体複合体の形成

検体と、第１試薬収容部５１に収容されているＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体（試薬１）がローラー５７により送液され、検体とＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体とが混合される。ＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体は検体中のウィルスと複合体を形成する。

[0073] （３）ＤＮＡアプタマーのウィルス・ＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体複合体の捕捉

ウィルス・ＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体複合体は、不溶性担体４０に固定化された捕捉分子２０であるＤＮＡアプタマーに捕捉され、ウィルス・ＰＰＤ

Ｋ標識化ＶＨＨ抗体・ＤＮＡアプタマー複合体が形成される。

（４）洗浄

ローラー５７で洗浄液収容部５８に収容されている洗浄液を送液し、混合／反応部５４に収容されているＣＯＰ上に形成されているウィルス・ＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体・ＤＮＡアプタマー複合体を洗浄する。洗浄は複数回行う。この洗浄により、検体中のＡＴＰやウィルスと結合しなかったＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体が除去される。

[0074] （５）試薬２の添加

第２試薬収容部５２に収容されているホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸（ＰＰｉ）、ＡＭＰ、ＡＫ、ＰＫ及びルシフェラーゼ（Ｌｕｃ）を含む試薬２をローラー５７で混合／反応部５４に送液する。

[0075] （６）ＡＴＰの産生と増幅

試薬２とＣＯＰ上に形成されているウィルス・ＰＰＤＫ標識化ＶＨＨ抗体・ＤＮＡアプタマーとが反応し、ＡＴＰの産生とＡＴＰの増幅が生じる。反応が十分に進むまで静置する。

[0076] （７）ＡＴＰを検出する酵素の基質の添加

混合／反応部５４にＡＴＰを検出する酵素であるルシフェラーゼの基質であるＤ－ルシフェリンを添加する。Ｄ－ルシフェリンを添加すると、試薬２中のルシフェラーゼと、増幅したＡＴＰと、Ｄ－ルシフェリンが反応し、発光シグナルが発生する。

[0077] （８）発光シグナルの検出

（７）で発生した発光シグナルを光電子増倍管（ＰＭＴ）、電荷結合素子（ＣＣＤ）、ＣＭＯＳ等の検出器を用いて測定する。発光シグナルが予め設定した閾値より高い場合、検体（唾液）中にウィルスが存在すると判定することができる。発光シグナルが予め設定した閾値より低い場合、検体（唾液）中にウィルスが存在しないと判定される。

[0078] 次に、本実施形態の標的分子を検出するキットについて説明する。

本実施形態の標的分子を検出するキットは、本実施形態の標的分子を検出

する方法に用いられるキットであって、捕捉分子、標識化結合分子、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質、ＡＴＰを増幅する試薬、及びＡＴＰを検出する試薬を含む。

[0079] 本実施形態の標的分子を検出するキットにおける、捕捉分子、標識化結合分子、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質、ＡＴＰを増幅する試薬、及びＡＴＰを検出する試薬としては、それぞれ前述の本実施形態の標的分子を検出する方法で挙げられた、捕捉分子、標識化結合分子、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質、ＡＴＰを増幅する試薬、及びＡＴＰを検出する試薬が挙げられる。

[0080] 本実施形態のキットは、本実施形態の標的分子を検出する方法によって、標的分子を検出するために必要な試薬及び装置をさらに含んでいてもよい。

[0081] 本実施形態のキットは、捕捉分子、標識化結合分子、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質、ＡＴＰを増幅する試薬、及びＡＴＰを検出する試薬の他、基板等の不溶性担体を含んでいてもよい。このようなキットの場合、基板等の不溶性担体４０に捕捉抗体２０を固定化する。捕捉抗体２０を固定化した不溶性担体４０を含むキットとしては、前記図５で示した、検体添加部５０、第１試薬収容部５１、第２試薬収容部５２、流路５３、混合／反応部５４、検出部５５及び廃液収容部５６から構成されているカートリッジ、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された標識化結合分子３０、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質、ＡＴＰを増幅する試薬、及びＡＴＰを検出する試薬を含むキットが挙げられる。第１試薬収容部５１には、標識化結合分子３０（試薬１）を収容することができる。第２試薬収容部５２には、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質と、ＡＴＰを増幅する試薬と、ＡＴＰを検出する酵素とを含む試薬（試薬２）を収容することができる。混合／反応部５４には、捕捉分子２０が固定化された不溶性担体４０が収容されている。なお、第１試薬収容部５１、第２試薬収容部５２には、それぞれ試薬１、試薬２を予め、収容しておいてもよい。

[0082] このようなキットの場合、検体は、ピペット等を用いて検体添加部５０に

添加され、流路５３に送液される。送液は、機械を用いた自動送液を用いることもできる。自動送液は、例えば、ポンプやローラーで弾性容器に外から力を加えて送液を行うこともできる。

[0083] 本実施形態のキットは、さらに、必要な緩衝液、酵素反応停止液、プレートリーダーやルミノメーター等の検出器、製品説明書等を含んでいてもよい。

[0084] 次に、本実施形態のキットの使用方法の一例について説明する。

まず、第１試薬収容部５１に収容されている試薬１をローラー５７により流路５３に送液し、検体と混合して、標的分子・標識化結合分子複合体を形成し、混合／反応部５４に供給する。混合／反応部５４に供給された標的分子・標識化結合分子複合体は、混合／反応部５４に収容されている不溶性担体４０に固定化されている捕捉分子２０に捕捉され、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体が不溶性担体４０上に形成される。

[0085] 次いで、混合／反応部５４を洗浄液で洗浄した後、第２試薬収容部５２に収容されている試薬２をローラー５７により流路５３を通じて混合／反応部５４に送液する。次に、混合／反応部５４に収容されている不溶性担体４０上に形成されている標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体に試薬２を添加し、ＡＴＰを産生し、増幅する。次に、混合／反応部５４にＡＴＰを検出する基質を添加し、増幅したＡＴＰとＡＴＰを検出する酵素とＡＴＰを検出する酵素の基質とを反応させシグナルを発生させる。発生したシグナルを、検出部５５でシグナルに応じた検出器により測定する。前記検出器としては、プレートリーダーやルミノメーター等を挙げることができる。シグナル測定後の反応液や洗浄液は、廃液収容部５６に収容し、廃棄する。

[0086] 本発明の適用範囲は上記実施形態に限定されることはない。本発明は、免疫測定方法により検体に含まれる標的分子を検出する方法及びキットに対し、広く適用することができる。

実施例

[0087] 以下、実施例に基づき本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに

より限定されるものではない。

[0088] （実施例１）

ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素を単独で使用した場合と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素とＡＴＰを増幅する試薬とを組み合わせて使用した場合のシグナル強度を比較した。ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素としては、ＰＰＤＫを用いた。ＡＴＰを増幅する酵素としては、ＡＫ及びＰＫを用いた。ＡＴＰを検出する試薬としては、甲虫ルシフェラーゼと、その基質を用いた。以下に本実施例で用いた試薬を示す。

[0089] ・ピルビン酸リン酸ジキナーゼ（ＰＰＤＫ、ＢｉｏＶｉｓｉｏｎ社製）

・アデニル酸キナーゼ（ＡＫ、Ｓｉｇｍａ社製）

・ピルビン酸キナーゼ（ＰＫ、Ｓｉｇｍａ社製）

・甲虫ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ、Ｓｉｇｍａ社製）

・ＡＭＰ（富士フィルム和光純薬社製）

・ピロリン酸（ＰＰｉ、富士フィルム和光純薬社製）

・Ｄ－ルシフェリン（富士フィルム和光純薬社製）

・ホスホエノールピルビン酸（ＰＥＰ、富士フィルム和光純薬社製）

・ＡＴＰ（富士フィルム和光純薬社製）

・$MgCl_2$（富士フィルム和光純薬社製）

[0090] 次に、これらの試薬を以下の表１に示す最終濃度となるようにＰＢＳ（ｐＨ７．４）に溶解し、サンプル番号１～７のサンプルを調製した。

[0091]

[表1]

サンプル番号	試薬								
1		10μg/ml PPDK	1mM PPi	1mM PEP	1mM AMP	10μg/ml PK	10μg/ml AK	10μg/ml Luc	10mM $MgCl_2$
2		2μg/ml PPDK	1mM PPi	1mM PEP	1mM AMP	10μg/ml PK	10μg/ml AK	10μg/ml Luc	10mM $MgCl_2$
3	20μM ATP		1mM PPi	1mM PEP	1mM AMP	10μg/ml PK	10μg/ml AK	10μg/ml Luc	10mM $MgCl_2$
4		10μg/ml PPDK	1mM PPi	1mM PEP	1mM AMP			10μg/ml Luc	10mM $MgCl_2$
5		2μg/ml PPDK	1mM PPi	1mM PEP	1mM AMP			10μg/ml Luc	10mM $MgCl_2$
6	20μM ATP							10μg/ml Luc	10mM $MgCl_2$
7			1mM PPi	1mM PEP	1mM AMP			10μg/ml Luc	10mM $MgCl_2$

[0092] 各サンプルは９６ウェルプレート（パーキンエルマー社製）の各ウェル内において、それぞれ５０μｌになるように調製した（Ｎ＝４）。サンプル調

製後、ＡＴＰ産生反応およびＡＴＰ増幅反応を進行させるため、室温で１０分間インキュベートした。インキュベート後、最終濃度２ｍＭとなるようにＤ－ルシフェリンを添加し、各サンプルの発光強度を、マルチモードプレートリーダーＥｎｖｉｓｉｏｎ（パーキンエルマー社製）を用いて測定した。発光強度の測定は、９６ウェルプレートの各ウェル当たり１秒間の発光量（ｃｏｕｎｔ　ｐｅｒ　ｓｅｃ；ｃｐｓ）を測定する方法で行った。その結果を図７に示す。

[0093] 図７に示すように、ＰＰＤＫを単独で用い、ＡＫとＰＫを用いたＡＴＰ増幅反応を行わなかった場合のサンプル番号４およびサンプル番号５のサンプルの発光強度の平均値は、それぞれ１５２５２０、２８４１０であった。それに対して、ＰＰＤＫに、ＡＫとＰＫを用いたＡＴＰ増幅反応を組み合わせて用いた場合のサンプル番号１およびサンプル番号２のサンプルの発光強度の平均値は、それぞれ４９５２９４５、３４５１５９８であった。サンプル番号１のサンプルは、サンプル番号４のサンプルの３２．５倍、サンプル番号２のサンプルは、サンプル番号５のサンプルの１２１．５倍の発光強度を示しており、ＰＰＤＫがより低濃度の条件において、ＡＴＰ産生反応とＡＴＰ増幅反応との組み合わせがシグナル増強に有利に働くことが示された。

[0094] 以上のことから、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素を単独で使用する方法と比較して、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素とＡＴＰを増幅する試薬とを組み合わせて使用する本発明の方法が、ＡＴＰの検出において顕著な効果を有することが示された。さらに、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素であるＰＰＤＫの量が少ない場合にシグナル増強の効率が高まるため、標的分子に結合する標識化結合分子の量が少ない場合、即ち、標的分子が少ない場合であっても、本発明の標的分子の検出方法は、標的分子を検出できると考えられる。

[0095]（実施例２）

ＰＰＤＫで標識した抗ＢＳＡ－ラクダ科動物抗体の重鎖可変領域抗体（以下、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体とも称する）を用いて、ＢＳＡの検

出を行い、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体を単独で使用した場合と、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体とＡＴＰを増幅する試薬を組み合わせて使用した場合のシグナル強度を比較した。ＡＴＰを増幅する酵素としてはＡＫ及びＰＫを用いた。ＢＳＡの検出する試薬としては、甲虫ルシフェラーゼと、その基質を用いた。以下に本実施例で用いた試薬を示す。

[0096] ・ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体（ＲｅＰＨＡＧＥＮ社製）

・ビオチン標識抗ＢＳＡ抗体（ＩＴＥＡ社製）

・アデニル酸キナーゼ（ＡＫ、ニプロ社製）

・ピルビン酸キナーゼ（ＰＫ、ニプロ社製）

・甲虫ルシフェラーゼ（Ｌｕｃ、Ｓｉｇｍａ社製）

・ＡＭＰ（富士フィルム和光純薬社製）

・ピロリン酸（ＰＰｉ、富士フィルム和光純薬社製）

・Ｄ－ルシフェリン（富士フィルム和光純薬社製）

・ホスホエノールピルビン酸（ＰＥＰ、富士フィルム和光純薬社製）

・$MgCl_2$（富士フィルム和光純薬社製）

[0097] 上記の試薬を用いて、以下の手順でＢＳＡを検出した。

（１）プレートの準備

Ｎｕｎｃ Ｉｍｍｏｂｉｌｉｚｅｒ Ｓｔｒｅｐｔａｖｉｄｉｎ Ｆ９６ Ｂｌａｃｋプレート（Ｔｈｅｒｍｏ社製）をプレートウォッシャーＷｅｌｌｗａｓｈ Ｖｅｒｓａ（Ｔｈｅｒｍｏ社製）を用いて、３００μｌのＰＢＳで３回洗浄した。次に、１μｇ／ｍｌに調製したビオチン標識抗ＢＳＡ抗体を各ウェルに１００μｌずつ添加し、室温で１時間インキュベートした。各ウェル内のビオチン標識抗ＢＳＡ抗体溶液を除去した後、プレートウォッシャーを用いて、３００μｌのＰＢＳで３回洗浄した。

[0098] （２）サンプルの添加

１μｇ／ｍｌのＢＳＡ溶液を各ウェルに５０μｌずつ添加し（Ｎ＝３）、室温で１時間インキュベートした。また、ＰＢＳ（コントロール）も同様に各ウェルに５０μｌずつ（Ｎ＝３）添加した。各ウェルからＢＳＡ溶液又は

ＰＢＳを除去した後、各ウェルを３００μｌのＰＢＳで３回洗浄した。次に、ＰＢＳで１μｇ／ｍｌに希釈したＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体溶液を各ウェルに５０μｌずつ添加し、室温で１時間インキュベートした。各ウェルからＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体溶液を除去した後、プレートウォッシャーを用いて、各ウェルを３００μｌのＰＢＳで４回洗浄した。

[0099] （３）シグナル検出

各ウェルに終濃度１０μｇ／ｍｌに調製したＡＫを５μｌずつ添加した後、終濃度１０μｇ／ｍｌに調製したＰＫ酵素液を１０μｌずつ添加した。次に、各ウェルにＰＢＳを１０μｌずつ添加した後、試薬Ａ（１ｍＭ　ＰＰｉ、１ｍＭ　ＰＥＰ、１ｍＭ　ＡＭＰ、１０ｍＭ　$MgCl_2$を含むＰＢＳ）を８連ピペッターで２５μｌずつ添加した。

[0100] 上記で得られた９６ウェルプレートをルミノメーターＧｌｏＭＡＸ　ｎａｖｉｇａｔｏｒ（Ｐｒｏｍｅｇａ社製）にセットし、１５分間静置した。各ウェルに試薬Ｂ（５μｇ／ｍｌ　Ｌｕｃ、２００μＭ　Ｄ－ルシフェリンを含むＰＢＳ）をルミノメーターのポンプで５０μｌずつ添加し、添加後すぐに各サンプルの発光強度を測定した。発光強度の測定は、９６ウェルプレートの各ウェル当たり１秒間の発光量（ｃｏｕｎｔｓ／ｓｅｃｏｎｄ；ｃｐｓ）を測定する方法で行った。測定結果を図８に示す。

[0101] 図８に示したように、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体を単独で使用した場合の発光強度は、平均で１２２６ｃｐｓであり、ＡＴＰの増幅を行わなかった場合のネガティブコントロールの発光強度である１１８７ｃｐｓと比較して、差はわずかであった。一方、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体とＡＴＰを増幅する試薬を組み合わせて使用した場合の発光強度は１９２９０ｃｐｓとなり、ＡＴＰの増幅を行った場合のネガティブコントロールの発光強度である３４０９ｃｐｓと比較して、発光強度は大きく増幅された。ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体とＡＴＰを増幅する試薬を組み合わせて使用した場合と、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体を単独で使用した場合とについて、ＡＴＰの増幅を行った場合のネガティブコントロールの発光強度と

、ＡＴＰの増幅を行わなかった場合のネガティブコントロールの発光強度とをバックグラウンドとしてそれぞれ減算した発光強度のグラフを図９に示す。

[0102] 図９に示したように、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体を単独で使用し、ＡＴＰの増幅を行わなかった場合と比較して、ＰＰＤＫ標識抗ＢＳＡ－ＶＨＨ抗体とＡＴＰを増幅する試薬を組み合わせて、ＡＴＰの増幅を行った場合は、発光強度が大きく増加することが分かった。以上のことから、本発明の方法が、サンプル中に含まれる標的分子の検出において顕著な効果を有することが示された。標的分子が少なく、ＡＴＰ産生酵素で標識された抗体を単独で用いた場合ではシグナル検出が困難な場合であっても、本発明の標的分子の検出方法は、シグナルを増幅することで標的分子を検出できると考えられる。

符号の説明

[0103] １０ 標的分子

２０ 捕捉分子

３０ 標識化結合分子

４０ 不溶性担体

５０ 検体添加部

５１ 第１試薬収容部

５２ 第２試薬収容部

５３ 流路

５４ 混合／反応部

５５ 検出部

５６ 廃液収容部

５７ ローラー

５８ 洗浄液収容部

請求の範囲

[請求項1] 工程（１）：検体中の標的分子と、前記標的分子と結合する捕捉分子と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、前記標的分子と結合する標識化結合分子とを反応させ、前記標的分子と前記標識化結合分子と前記捕捉分子とからなる複合体（以下、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体と称する）を形成させる、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体形成工程と、

工程（２）：前記工程（１）において、標的分子と結合しなかった前記標識化結合分子を除去する工程と、

工程（３）：前記標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体と、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質とを反応させＡＴＰを産生させる、ＡＴＰ産生工程と、

工程（４）：前記工程（３）で産生されたＡＴＰを増幅する、ＡＴＰ増幅工程と、

工程（５）：前記工程（４）で増幅したＡＴＰを検出する、ＡＴＰ検出工程と、

を含む、検体中の標的分子の検出方法。

[請求項2] 前記工程（１）において、標的分子・標識化結合分子・捕捉分子複合体を形成させる前に、予め、検体中のＡＴＰを除去する工程を含む、請求項１に記載の検出方法。

[請求項3] 前記捕捉分子が、標的分子と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマーである、請求項１又は２に記載の検出方法。

[請求項4] 前記標識化結合分子が、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、標的分子と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマーである、請求項１～３のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項5] 前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ピルビン酸リン酸ジ

キナーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸及びＡＭＰである、請求項１～４のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項6] 前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、アセチル－ＣｏＡシンテターゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ＡＭＰ、ピロリン酸、及びアセチル－ＣｏＡである、請求項１～４のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項7] 前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ＡＴＰスルフリラーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、アデノシン５’－ホスホスルフェート及びピロリン酸である、請求項１～４のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項8] 前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、II型ポリリン酸キナーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ＡＭＰ及びポリリン酸である、請求項１～４のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項9] 前記工程（４）において、ＡＴＰの増幅を、アデニル酸キナーゼとピルビン酸キナーゼとを用いることにより行う、請求項１～８のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項10] 前記工程（４）において、ＡＴＰの増幅を、アデニル酸キナーゼとポリリン酸キナーゼとを用いることにより行う、請求項１～８のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項11] 前記工程（４）において、ＡＴＰの増幅を、アデニル酸キナーゼと酢酸キナーゼとを用いることにより行う、請求項１～８のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項12] 前記工程（５）において、ＡＴＰの検出を、ルシフェラーゼを用いることにより行う、請求項１～１１のいずれか一項に記載の検出方法。

[請求項13] 標的分子と結合する捕捉分子が固定化された不溶性担体と、

ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、前記標的分子と結合する標識化結合分子と、

ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質と、

ＡＴＰを増幅する試薬と、

ＡＴＰを検出する試薬と、

を含む、検体中の標的分子検出キット。

[請求項14] 前記捕捉分子が、標的分子と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマーである、請求項１３に記載の検出キット。

[請求項15] 前記標識化結合分子が、ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素で標識された、標的分子と特異的に結合する、抗体若しくは抗体フラグメント、又はアプタマーである、請求項１３又は１４に記載の検出キット。

[請求項16] 前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ピルビン酸リン酸ジキナーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ホスホエノールピルビン酸、ピロリン酸及びＡＭＰである、請求項１３～１５のいずれか一項に記載の検出キット。

[請求項17] 前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、アセチル－ＣｏＡシンテターゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ＡＭＰ、ピロリン酸及びアセチル－ＣｏＡである、請求項１３～１５のいずれか一項に記載の検出キット。

[請求項18] 前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、ＡＴＰスルフリラーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、アデノシン５’－ホスホスルフェート及びピロリン酸である、請求項１３～１５のいずれか一項に記載の検出キット。

[請求項19] 前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素が、II型ポリリン酸キナーゼであって、前記ＡＴＰを産生する反応を触媒する酵素の基質が、ＡＭＰ及びポリリン酸である、請求項１３～１５のいずれか一項に記

載の検出キット。

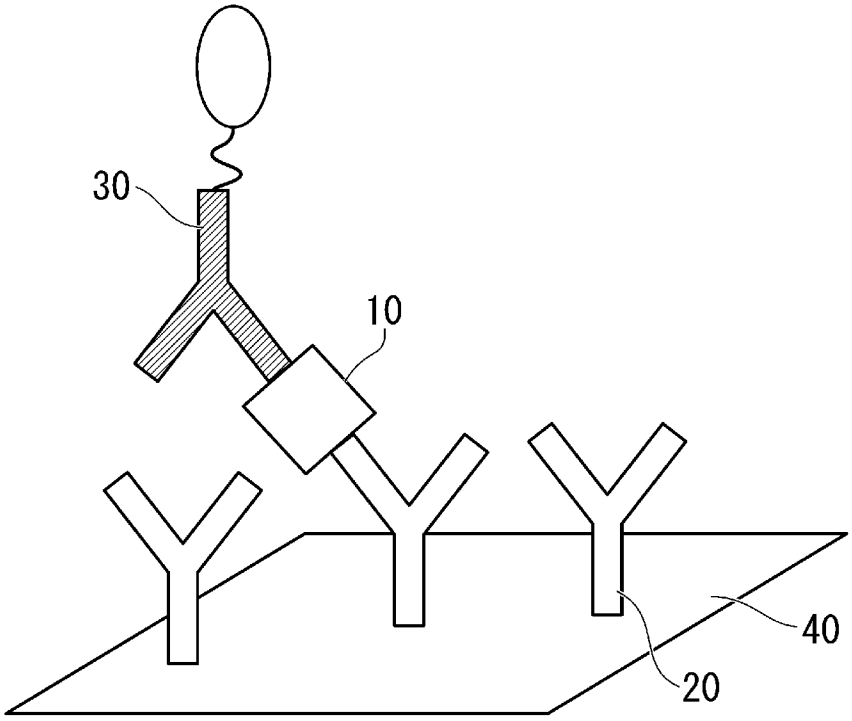
[請求項20] 前記ＡＴＰを増幅する試薬が、ＡＭＰ、ホスホエノールピルビン酸、マグネシウムイオン、アデニル酸キナーゼ及びピルビン酸キナーゼである、請求項１３～１９のいずれか一項に記載の検出キット。

[請求項21] 前記ＡＴＰを増幅する試薬が、ＡＭＰ、ポリリン酸、マグネシウムイオン、アデニル酸キナーゼ及びポリリン酸キナーゼである、請求項１３～１９のいずれか一項に記載の検出キット。

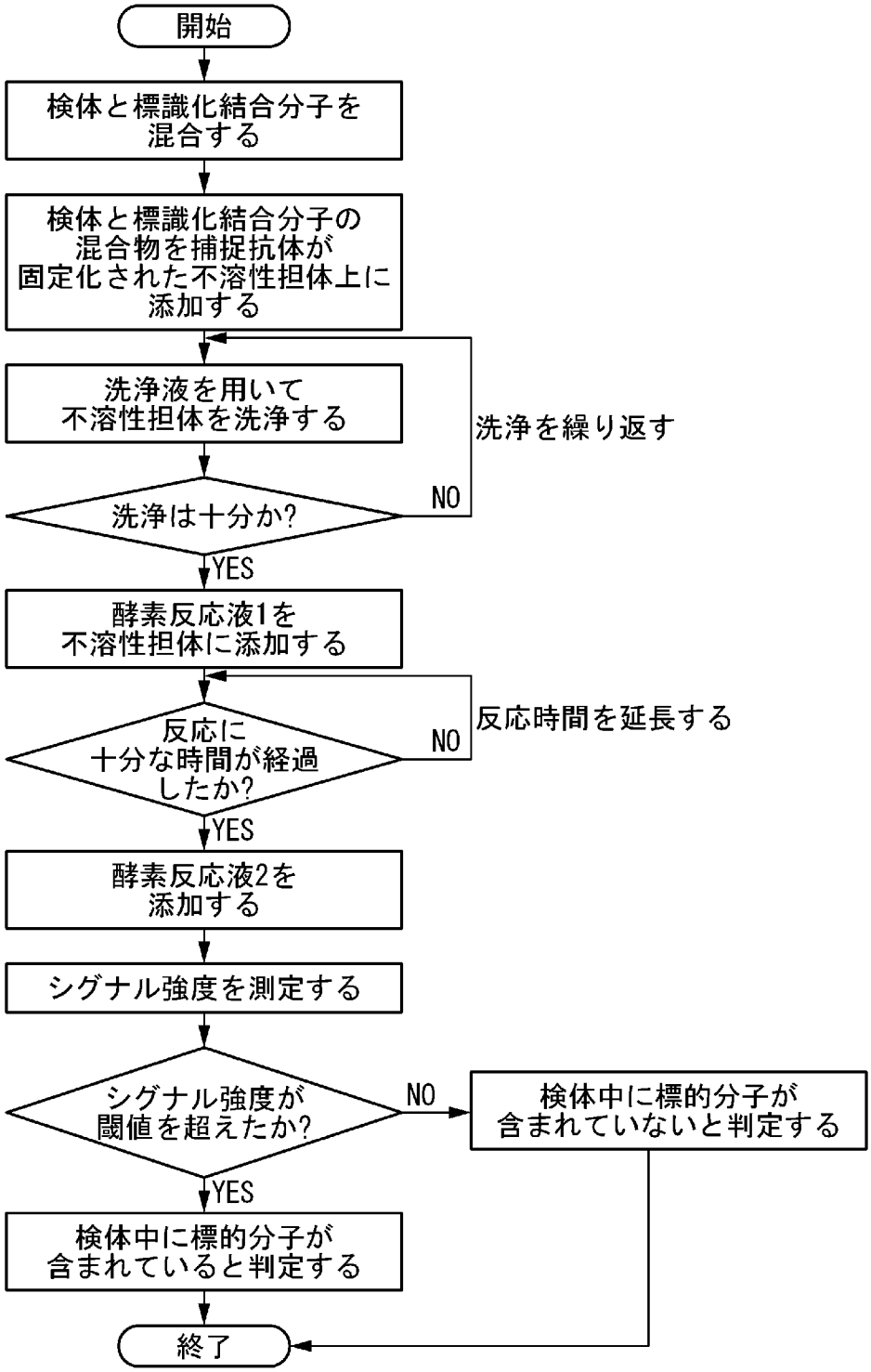
[請求項22] 前記ＡＴＰを増幅する試薬が、ＡＭＰ、アセチルリン酸、マグネシウムイオン、アデニル酸キナーゼ及び酢酸キナーゼである、請求項１３～１９のいずれか一項に記載の検出キット。

[請求項23] 前記ＡＴＰを検出する試薬が、Ｄ－ルシフェリン及びルシフェラーゼである、請求項１３～２２のいずれか一項に記載の検出キット。

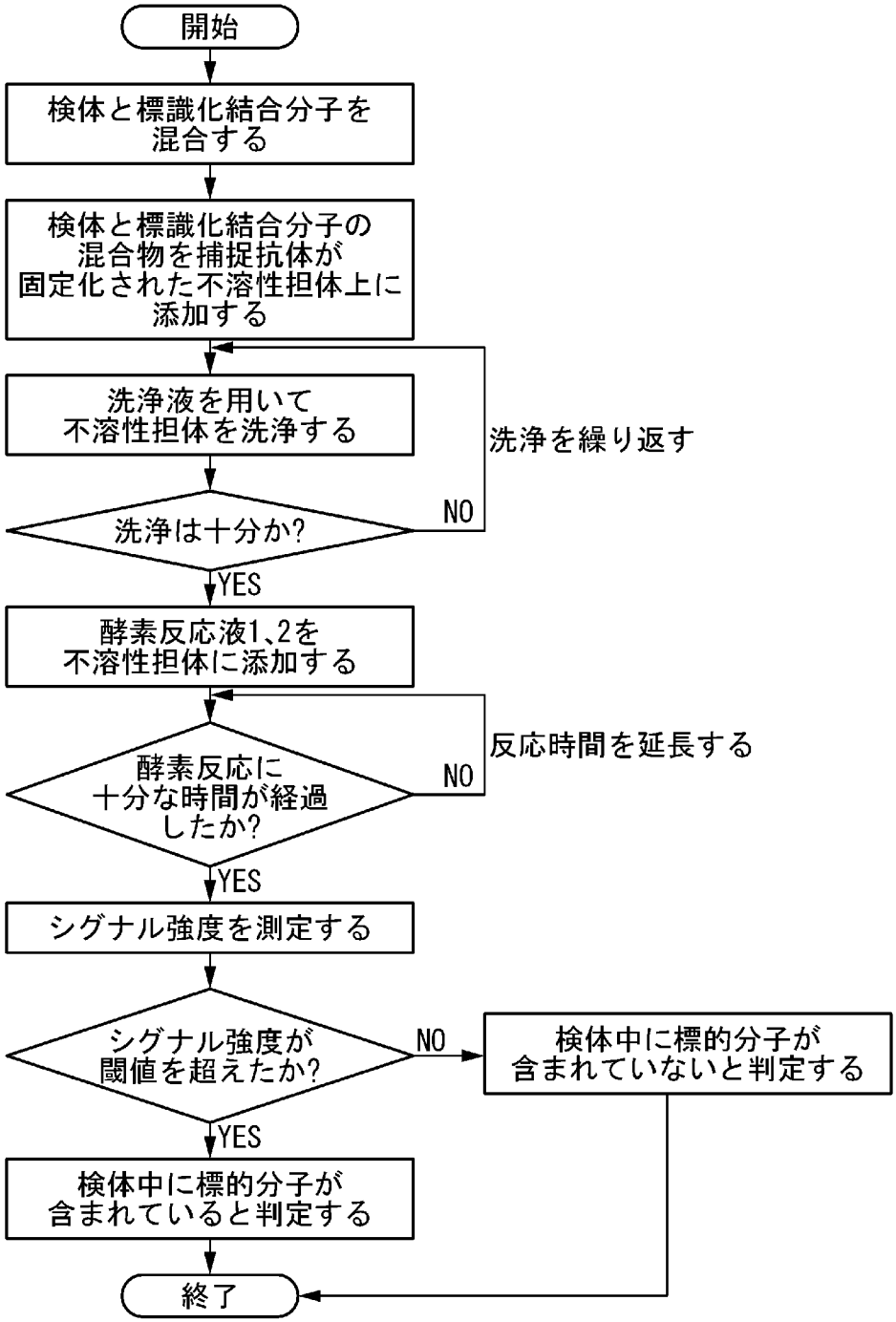
[図1]



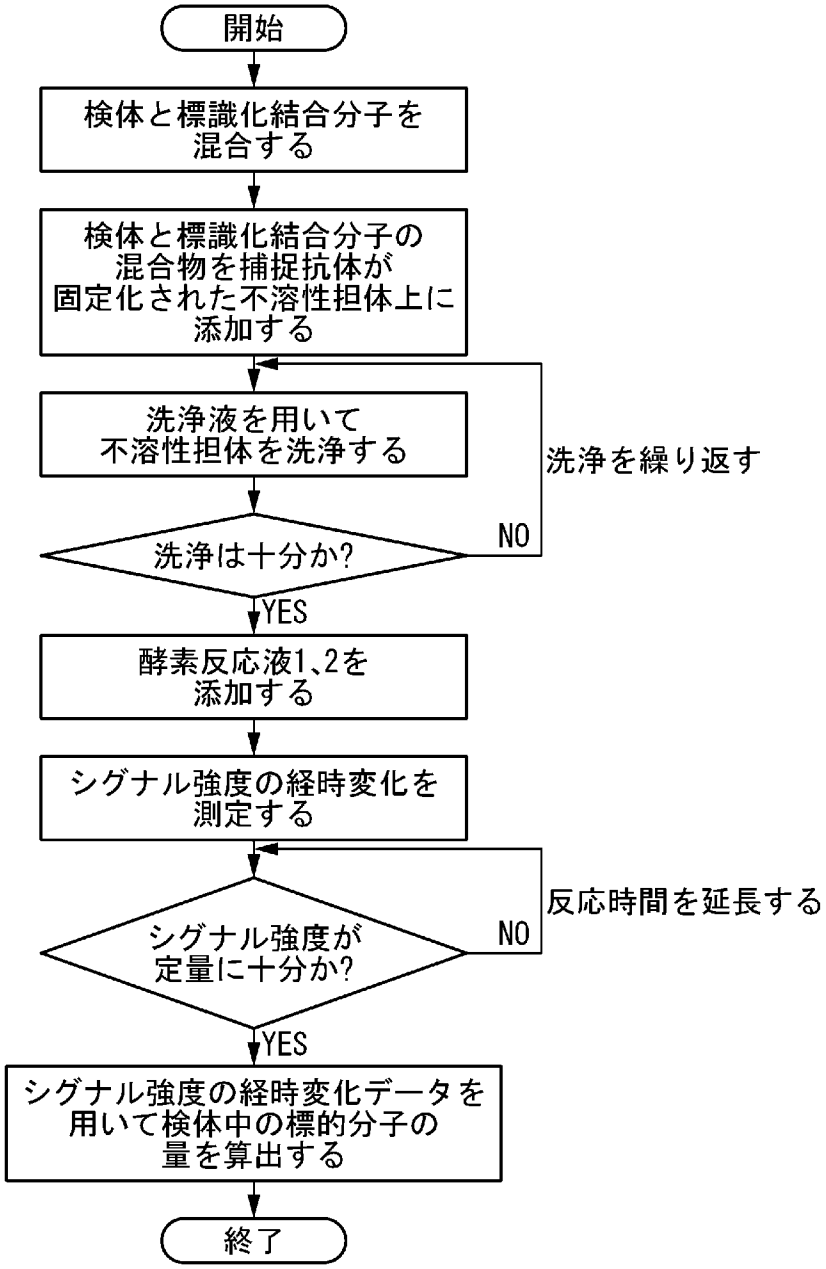
[図2]


開始
検体と標識化結合分子を混合する
検体と標識化結合分子の混合物を捕捉抗体が固定化された不溶性担体上に添加する
洗浄液を用いて不溶性担体を洗浄する
洗浄を繰り返す
洗浄は十分か?
NO
YES
酵素反応液1を不溶性担体に添加する
反応に十分な時間が経過したか?
反応時間を延長する
NO
YES
酵素反応液2を添加する
シグナル強度を測定する
シグナル強度が閾値を超えたか?
NO
検体中に標的分子が含まれていないと判定する
YES
検体中に標的分子が含まれていると判定する
終了

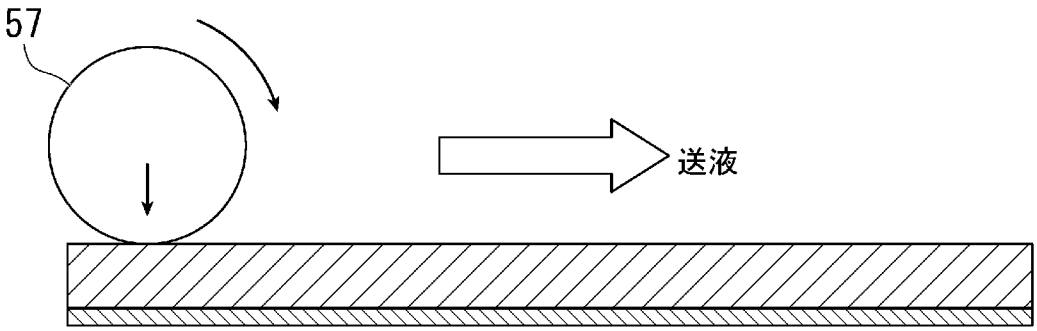
[図3]


開始
検体と標識化結合分子を混合する
検体と標識化結合分子の混合物を捕捉抗体が固定化された不溶性担体上に添加する
洗浄液を用いて不溶性担体を洗浄する
洗浄を繰り返す
洗浄は十分か?
NO
YES
酵素反応液1、2を不溶性担体に添加する
反応時間を延長する
酵素反応に十分な時間が経過したか?
NO
YES
シグナル強度を測定する
シグナル強度が閾値を超えたか?
NO
検体中に標的分子が含まれていないと判定する
YES
検体中に標的分子が含まれていると判定する
終了

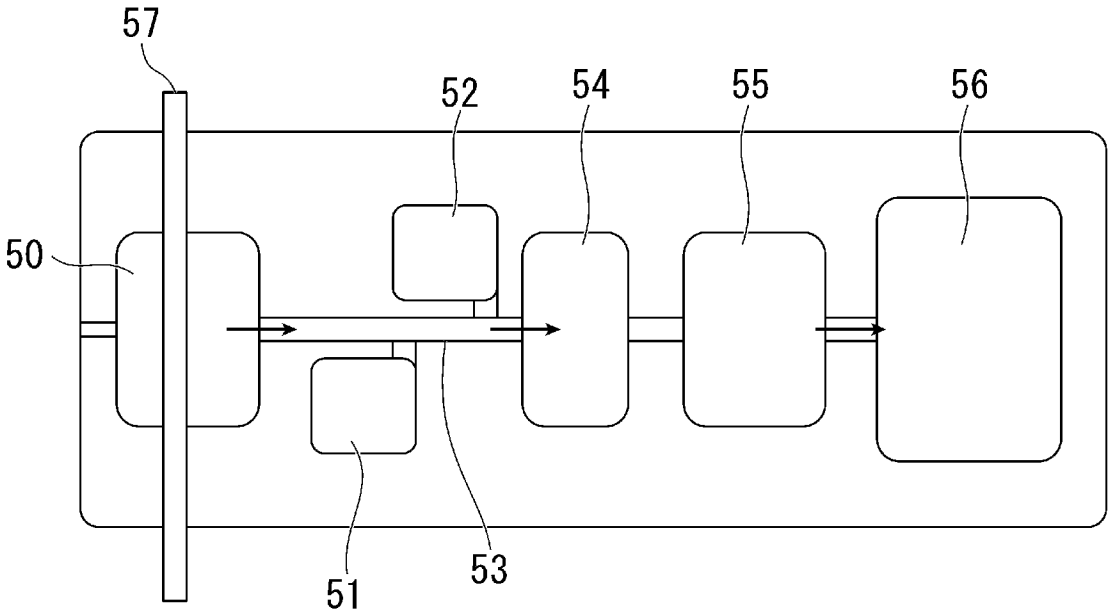
[図4]


開始
検体と標識化結合分子を混合する
検体と標識化結合分子の混合物を捕捉抗体が固定化された不溶性担体上に添加する
洗浄液を用いて不溶性担体を洗浄する
洗浄を繰り返す
洗浄は十分か?
NO
YES
酵素反応液1、2を添加する
シグナル強度の経時変化を測定する
反応時間を延長する
シグナル強度が定量に十分か?
NO
YES
シグナル強度の経時変化データを用いて検体中の標的分子の量を算出する
終了

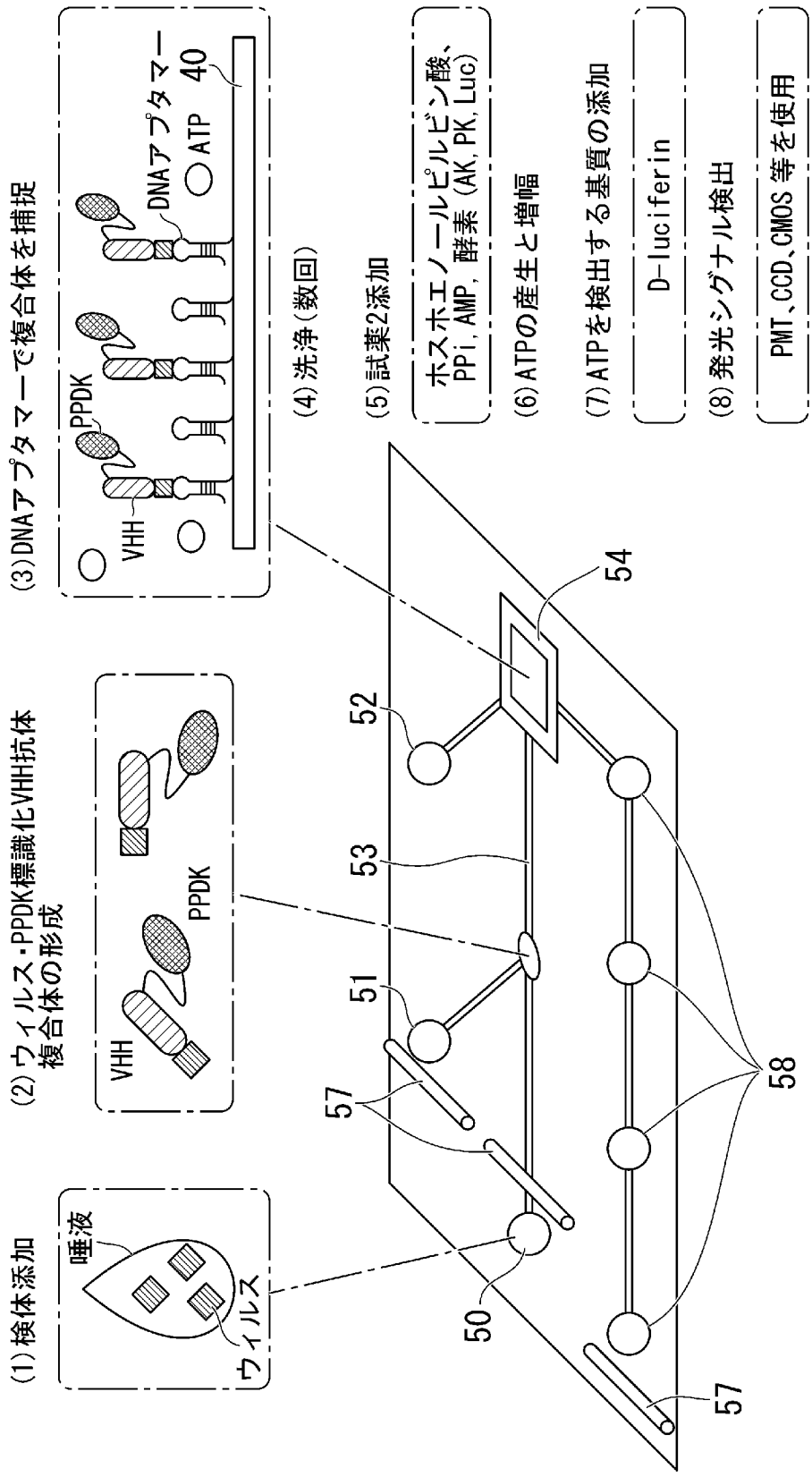
[図5A]


57
送液

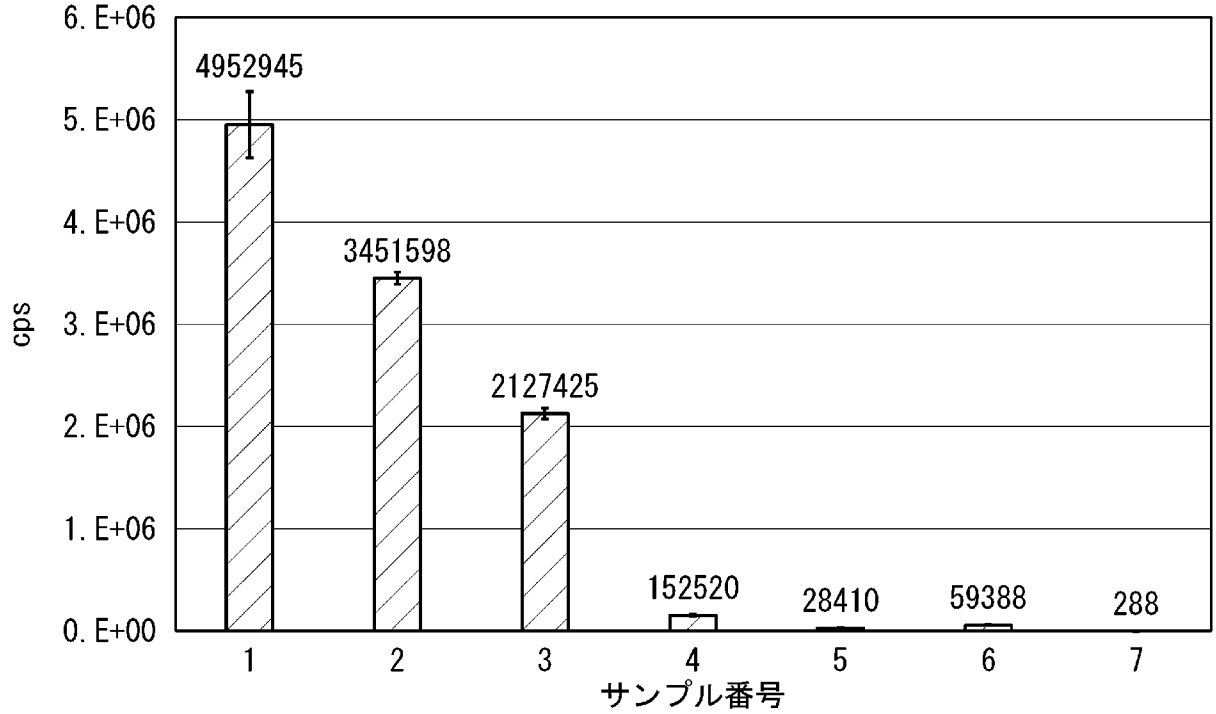
[図5B]



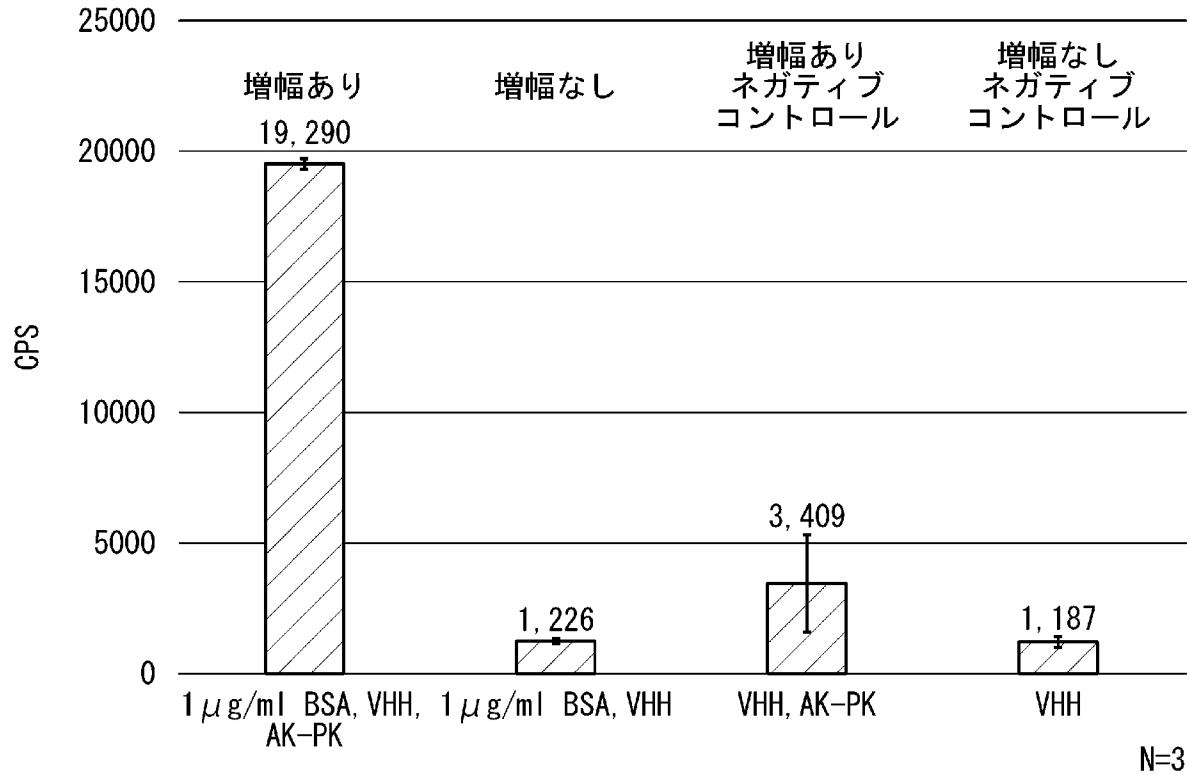
[図6]


(1)検体添加
唾液
ウィルス
(2)ウィルス・PPDK標識化VHH抗体
複合体の形成
VHH
PPDK
(3)DNAアプタマーで複合体を捕捉
PPDK
VHH
DNAアプタマー
ATP
40
(4)洗浄(数回)
(5)試薬2添加
ホスホエノールピルビン酸、
PPi, AMP, 酵素 (AK, PK, Luc)
(6)ATPの産生と増幅
(7)ATPを検出する基質の添加
D-luciferin
(8)発光シグナル検出
PMT、CCD、CMOS等を使用
50
51
52
53
54
57
57
58

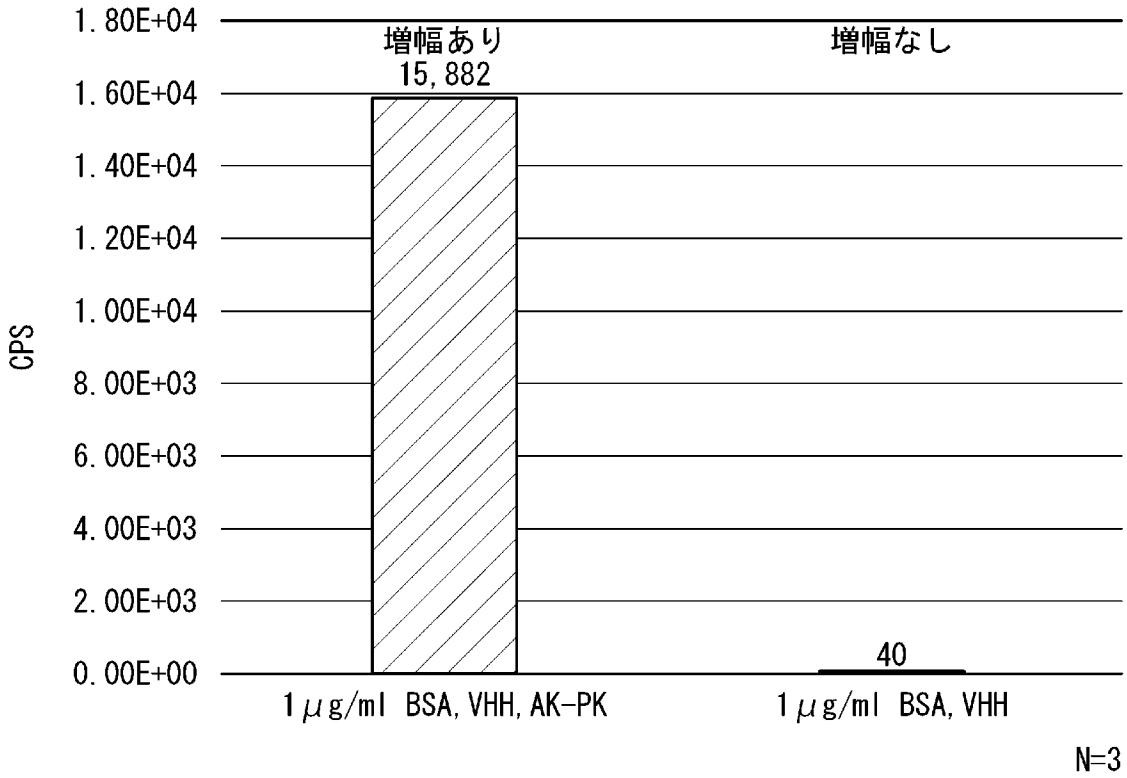
[図7]


6. E+06
5. E+06
4. E+06
3. E+06
2. E+06
1. E+06
0. E+00
cps
4952945
3451598
2127425
152520
28410
59388
288
1
2
3
4
5
6
7
サンプル番号

[図8]


25000
20000
15000
10000
5000
0
CPS
増幅あり
増幅なし
増幅あり
ネガティブ
コントロール
増幅なし
ネガティブ
コントロール
19, 290
1, 226
3, 409
1, 187
1μg/ml BSA, VHH, AK-PK
1μg/ml BSA, VHH
VHH, AK-PK
VHH
N=3

[図9]


1.80E+04
1.60E+04
1.40E+04
1.20E+04
1.00E+04
8.00E+03
6.00E+03
4.00E+03
2.00E+03
0.00E+00
CPS
増幅あり
15,882
増幅なし
40
1μg/ml BSA, VHH, AK-PK
1μg/ml BSA, VHH
N=3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/019390

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
C07K 16/00(2006.01)i; C07K 17/00(2006.01)i; C12P 19/32(2006.01)i; C12N 15/115(2010.01)i; C12Q 1/48(2006.01)i; C12Q 1/66(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i
FI: G01N33/543 501Z; C12Q1/48 Z; C07K16/00; C12N9/12; C12P19/32 Z; C12Q1/66; C07K17/00; C12N15/115 Z
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)
C07K16/00; C07K17/00; C12P19/32; C12N15/115; C12Q1/48; C12Q1/66; C12N9/12; G01N33/543

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	1971-2021
Registered utility model specifications of Japan	1996-2021
Published registered utility model applications of Japan	1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ITO, Katsutoshi et al., "Highly Sensitive Simultaneous bioluminescent Measurement of Acetate Kinase and Pyruvate Phosphate Dikinase Activities using a Firefly Luciferase-Luciferin Reaction and Its Application to a Tandem Bioluminescent Enzyme Immunoassay", Analytical Sciences, 2003, 19(1), 105-109 Materials and Methods, Results and Discussion, fig. 1, 5	1-23
Y	JP 2009-60809 A (HIROSHIMA UNIVERSITY) 26 March 2009 (2009-03-26) abstract, claims, paragraph [0062]	1-23

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.
☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search 08 June 2021 (08.06.2021)	Date of mailing of the international search report 22 June 2021 (22.06.2021)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/019390

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2015-42156 A (NATIONAL UNIVERSITY CORPORATION HOKKAIDO UNIVERSITY) 05 March 2015 (2015-03-05) entire text all drawings	1-23
A	JP 2013-40800 A (TOYOHASHI UNIVERSITY OF TECHNOLOGY) 28 February 2013 (2013-02-28) entire text all drawings	1-23
A	JP 2002-535985 A (MICROBIOLOGICAL RESEARCH AUTHORITY) 29 October 2002 (2002-10-29) entire text all drawings	1-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/019390

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
JP 2009-60809 A	26 Mar. 2009	(Family: none)	
JP 2015-42156 A	05 Mar. 2015	(Family: none)	
JP 2013-40800 A	28 Feb. 2013	(Family: none)	
JP 2002-535985 A	29 Oct. 2002	US 6913896 B1 entire text all drawings US 2005/0208608 A1 US 2009/0186368 A1 WO 2000/046357 A1	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/019390

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C07K 16/00(2006.01)i; C07K 17/00(2006.01)i; C12P 19/32(2006.01)i; C12N 15/115(2010.01)i; C12Q 1/48(2006.01)i; C12Q 1/66(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i
FI: G01N33/543 501Z; C12Q1/48 Z; C07K16/00; C12N9/12; C12P19/32 Z; C12Q1/66; C07K17/00; C12N15/115 Z

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））

C07K16/00; C07K17/00; C12P19/32; C12N15/115; C12Q1/48; C12Q1/66; C12N9/12; G01N33/543

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	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

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
Y	ITO, Katsutoshi et al., Highly Sensitive Simultaneous bioluminescent Measurement of Acetate Kinase and Pyruvate Phosphate Dikinase Activities using a Firefly Luciferase-Luciferin Reaction and Its Application to a Tandem Bioluminescent Enzyme Immunoassay, Analytical Sciences, 2003, 19(1), 105-109 Materials and Methods, Results and Discussion, Fig.1,5	1-23
Y	JP 2009-60809 A (国立大学法人広島大学) 26.03.2009 (2009-03-26) 要約,特許請求の範囲,[0062]	1-23
A	JP 2015-42156 A (国立大学法人北海道大学) 05.03.2015 (2015-03-05) 全文全図	1-23
A	JP 2013-40800 A (国立大学法人豊橋技術科学大学) 28.02.2013 (2013-02-28) 全文全図	1-23
A	JP 2002-535985 A (マイクロバイオロジカル リサーチ オーソリティ) 29.10.2002 (2002-10-29) 全文全図	1-23

☐ 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
"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	国際調査報告の発送日
08.06.2021	22.06.2021

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）
三好　貴大 2J 6200

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

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/JP2021/019390

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2009-60809 A	26.03.2009	（ファミリーなし）	
JP 2015-42156 A	05.03.2015	（ファミリーなし）	
JP 2013-40800 A	28.02.2013	（ファミリーなし）	
JP 2002-535985 A	29.10.2002	US 6913896 B1 全文全図 US 2005/0208608 A1 US 2009/0186368 A1 WO 2000/046357 A1	