

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3934205号

(P3934205)

(45) 発行日 平成19年6月20日(2007.6.20)

(24) 登録日 平成19年3月30日(2007.3.30)

(51) Int. Cl.		F I		
CO7F	15/00	(2006.01)	CO7F	15/00 C
C12Q	1/68	(2006.01)	CO7F	15/00 F
GO1N	33/533	(2006.01)	C12Q	1/68 Z
			GO1N	33/533

請求項の数 5 (全 23 頁)

(21) 出願番号	特願平9-146909	(73) 特許権者	591215177
(22) 出願日	平成9年6月4日(1997.6.4)		ロシュ ダイアグノスティックス ゲーエムペーハー
(65) 公開番号	特開平10-67791		ドイツ連邦共和国 68298 マンハイム, サンドホファーシュトラッセ 116
(43) 公開日	平成10年3月10日(1998.3.10)	(74) 代理人	100091096
審査請求日	平成16年4月16日(2004.4.16)		弁理士 平木 祐輔
(31) 優先権主張番号	96108951:3	(74) 代理人	100096183
(32) 優先日	平成8年6月4日(1996.6.4)		弁理士 石井 貞次
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)	(72) 発明者	グレゴール サグナー
			ドイツ連邦共和国 ディー-82377 ペンツバーグ, マイケルベックシュトラッセ 16

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生物物質の検出のための金属ポルフィリン結合体の使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

下記的一般式(I)：



〔式中、Mはパラジウムまたは白金であり、

Pはポルフィリン部分であり、

R C O O Xは上記ポルフィリン部分に共有結合している活性化カルボン酸エステル基であり、

XはN-ヒドロキシスクシンイミド、チオフェニルエステル、アリールエステル、およびビニルエステルから選択される活性エステル結合剤に由来する基であり、

Rはそれぞれの場合に独立して化学結合またはリンカー基であり、そして

nは1から4である〕

を有する活性化金属ポルフィリン誘導体の製造方法であって、下記的一般式(II)：



〔式中、M、PおよびRは上に定義した通りであり、mはポルフィリン部分に共有結合しているカルボン酸基の数である〕

を有する金属ポルフィリンを有機溶媒中でカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールならびにN-ヒドロキシスクシンイミド、チオフェニルエステル、アリールエステル、およびビニルエステルから選択される活性エステル結合剤と反応させ、活性化金属ポルフィリン誘導体(I)を得る、上記方法。

10

20

【請求項 2】

下記の一般式 (I) :



〔式中、Mはパラジウムまたは白金であり、

Pはポルフィリン部分であり、

RCOOXは上記ポルフィリン部分に共有結合している活性化カルボン酸エステル基であり、

XはN-ヒドロキシスクシンイミド、チオフェニルエステル、アリアルエステル、およびビニルエステルから選択される活性エステル結合剤に由来する基であり、

Rは化学結合またはリンカー基であり、そして

nは1から4である〕

を有する活性化金属ポルフィリン誘導体。

10

【請求項 3】

金属ポルフィリン結合体の製造方法であって、請求項 2 に記載の活性化金属ポルフィリンまたは請求項 1 に記載の方法によって得られる活性化金属ポルフィリンを少なくとも 1 個の第一級アミノ基を有する分子に結合し、活性化カルボン酸エステル基と第一級アミノ基の間に少なくとも 1 個の結合を形成させる、上記方法。

【請求項 4】

請求項 2 に記載の金属ポルフィリン誘導体 (I) または請求項 1 に記載の方法によって得られる金属ポルフィリン誘導体 (I) がその活性化カルボン酸エステル基の少なくとも 1 つを介して少なくとも 1 個の第一級アミノ基を有する分子に結合している、金属ポルフィリン結合体。

20

【請求項 5】

請求項 4 に記載の結合体または請求項 3 に記載の方法によって得られる結合体の、検出方法における使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、活性化金属ポルフィリン誘導体の製造方法、および該方法により得られる新規な活性化金属ポルフィリン誘導体に関する。さらに本発明は、金属ポルフィリンと、少なくとも 1 個の第一級アミノ基を有する分子、特に生体分子との結合体に関する。このような結合体は生物物質 (biological substance) の検出のための手順、特にイムノアッセイまたは核酸ハイブリダイゼーションアッセイにおいて使用される。

30

【0002】

【従来の技術】

ポルフィリンとは、ピロールがメチレン架橋によって結合されて、キレート形成性内部空洞を有する環状結合体構造を形成している、置換されたテトラピロール構造体である。ポルフィリンは、ヘミンおよびヘミンタンパク質 (ヘモグロビン、ミオグロビンシトクロム) クロロフィル等の多数の生物色素および合成色素中に見いだされる。

【0003】

ポルフィリンは強い発光性を示す。Pt - 金属ポルフィリンおよびPd - 金属ポルフィリンは適切な溶媒中で室温でりん光を発することが知られている。ポルフィリンおよび金属ポルフィリンの幾つかの用途が先行技術で知られている。EP-A-0 071 991およびEP-A-0 127 797は、蛍光イムノアッセイにおいて標識としてポルフィリンを使用する手順を開示する。EP-A-0 127 797においては、1 個のカルボン酸基を有するポルフィリン誘導体を水溶性カルボジイミド誘導体と接触させ、得られた生成物を次に抗体と接触させることにより、ポルフィリンを抗体と結合させている。EP-A-0 071 991においては、カルボジイミド、イソブチルクロロホルメート/ジオキサン、グルタルアルデヒドまたは無水コハク酸/ピリジン/カルボジイミドを介して金属ポルフィリンバクテリオクロロフィル b を種々の生体分子に結合させている。

40

50

【 0 0 0 4 】

Mantrovaらの刊行物 (Anal. Biochem. 219 (194), 109-114)においては、りん光イムノアッセイにおける金属ポルフィリン抗体結合体の使用が開示されている。金属ポルフィリンの抗体への結合は、EP-A-0 127 797に記述されているように実施される。

【 0 0 0 5 】

しかし、先行技術で公知の金属ポルフィリン結合体の不利な点は、in situ 用途、すなわち組織抽出物中の細胞性巨大分子および形態学的に完全な分子の検出に適さないという事実にある。また、先行技術により公知である、生体分子に標識基を結合させるための一連の他の方法は、in situ 用途に使用できる金属ポルフィリン結合体の製造には適さないことが判明した。

10

【 0 0 0 6 】

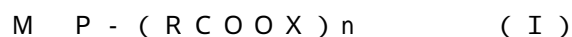
【 発明が解決しようとする課題 】

したがって、本発明が解決すべき問題は、in situ 用途に適した金属ポルフィリン結合体の製造方法を提供することである。

【 0 0 0 7 】

【 課題を解決するための手段 】

この課題は、下記の一般式 (I) :



〔 式中、Mはパラジウムまたは白金であり、

Pはポルフィリン部分であり、

R C O O Xは上記ポルフィリン部分に共有結合している活性化カルボン酸エステル基であり、

20

Rはそれぞれの場合に独立して化学結合またはリンカー基であり、そして

nは1から4である〕

を有する活性化金属ポルフィリン誘導体の製造方法であって、下記の一般式 (I I) :



〔 式中、M、PおよびRは上に定義した通りであり、mはポルフィリン部分に共有結合しているカルボン酸基の数である〕

を有する金属ポルフィリンを有機溶媒中でカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾチアゾールおよび活性エステル結合剤と反応させ、活性化金属ポルフィリン誘導体 (I) を得る、上記方法により解決される。

30

【 0 0 0 8 】

驚くべきことに、少なくとも1個、通常は1~4個のカルボン酸基を有する金属ポルフィリンをカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾチアゾールおよび活性エステル結合剤と反応させることにより活性化することができ、そしてこれにより、少なくとも1個の第一級アミノ基を有する分子への結合に適した金属ポルフィリン活性エステル誘導体を得られることが判明した。特に、この金属ポルフィリン活性エステル誘導体を少なくとも1個の第一級アミノ基を有する分子と反応させて得られる結合体は、検出手順 (例えば生物物質を検出するための手順) に用いた場合、驚くべき有利な点を示す。これらの結合体は、特にin situ 測定 (例えば、免疫組織化学的測定、免疫細胞化学的測定またはハイブリダイゼーション測定) において驚くほど高いりん光量子収量を示す。対照的に、他の方法で (例えば水溶液中で) 製造された金属ポルフィリンと生物物質との結合体は、in situ 測定において陽性の結果を全くもたらさなかった。

40

【 0 0 0 9 】

本発明の方法においては、異なるポルフィリン構造体のカルボン酸基をカルボジイミド、好ましくはジシクロカルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾチアゾールおよび活性エステル結合剤の混合物と反応させる。通常、この混合物を室温で一晩反応させる。これにより白色のジシクロ尿素の結晶の沈殿物が副生成物として形成される。本発明の活性エステルは、有機溶媒、好ましくは水との反応による活性エステルの加水分解を避けるため二回蒸留DMF等の無水有機溶媒中で製造される。これらの活性エステルは - 2 0 で保存する

50

ことができ、それらの活性は少なくとも7か月間保持される。

【0010】

ポルフィリン出発物質(II)は数個の、通常は4個までのカルボン酸基を有することができるので、活性化カルボン酸基の数は調節できる。これは、ポルフィリン(II)と他の試薬のモル比を変えることにより達成できる。好ましくは、活性化されるべきカルボン酸基(n)とカルボジイミドと1-ヒドロキシベンゾチアゾールと活性エステル結合剤とのモル比は約1:1:1:1である。より好ましくは、2~3個の活性化カルボン酸エステル基を有する活性化金属ポルフィリン誘導体が得られるようにモル比を選択する。本発明により定義される活性化カルボン酸基の数nは統計上の平均数であって、したがって必ずしも整数ではないことに留意すべきである。

10

【0011】

一般式(I)においてRは活性化カルボン酸エステル基をポルフィリン構造に結合させている化学結合またはリンカー基を表す。例えば、リンカー基は脂肪族、脂環式および/または芳香族炭化水素基であってよく、それらはヘテロ原子を含んでもよい。好ましくは、リンカー基はヘテロ原子を含みうるC₁~C₂₀アルキレン基、アリーレン基、およびアラキレン基またはアルカリーレン基である。より好ましくは、Rは化学結合、C₁~C₅アルキレン基、またはフェニレン基である。

【0012】

本発明の方法のために、少なくとも1個、好ましくは少なくとも2個、そして最も好ましくは4個のカルボン酸基を有する金属ポルフィリン出発物質(II)が用いられる。適切なポルフィリンの具体例は、4個のプロピオン酸基または4個の酢酸基をそれぞれ有するPt-またはPd-コプロポルフィリンおよびウロポルフィリンである。適切なポルフィリンのさらに別の例は、2個のプロピオン酸基を有するPd-またはPt-メソポルフィリン、ジュウテロポルフィリン、プロトポルフィリン、ヘマトポルフィリンおよびシトポルフィリンである。適切なポルフィリンのさらなる例は、当業者に公知である。

20

【0013】

金属ポルフィリン、特にPt-ポルフィリンおよびPd-ポルフィリンの合成については、参照としてここに組み入れるJ.W. Buchler著、The porphyrins, Structure and Synthesis、パートB(1978)、第10章およびD. Dolphin(編)、Synthesis and Properties of metallo-porphyrins, Academic Press Inc., London, pp. 390-483、特にpp. 471-474に言及されている。

30

【0014】

適切な金属ポルフィリンの特に好ましい例は、Pd-またはPt-3,8,13,18-テトラメチル-21H,23H-ポルフィン-2,7,12,17-テトラプロピオン酸(図1)およびPd-またはPt-メソ-テトラ(4-カルボキシフェニル)ポルフィン(図2)である。

【0015】

本発明の方法は、有機性の、そして好ましくは水を含まない溶媒中で実施される。本発明に使用されるカルボジイミドは、有機溶媒に可溶性のカルボジイミドである。ジクロロヘキシルカルボジイミド等のジクロロカルボジイミドが好ましい。

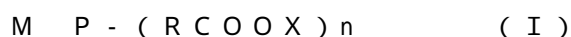
【0016】

本発明に使用される活性エステル結合剤は、好ましくはDMF等の有機溶媒に可溶性の物質である。適切な活性エステル結合剤の具体例は、N-ヒドロキシスクシンイミド、チオフェニルエステル、アリールエステル、およびビニルエステルである。

40

【0017】

本発明の別な主題は、下記の一般式(I)：



〔式中、M、P、RCOOXおよびnは先に定義した通りである〕を有する活性化金属ポルフィリン誘導体である。好ましくは、nは2または3である。

【0018】

本発明の活性化金属ポルフィリン誘導体は、第一級アミノ基を修飾するのに十分な試薬で

50

あることが示された。この修飾手順は、本発明の活性化金属ポルフィリンが少なくとも1個の第一級アミノ基を有する分子と結合している金属ポルフィリン結合体の製造方法を含む。この方法によって、活性化カルボン酸エステル基と第一級アミノ基との間に少なくとも1つの結合が形成される。生体分子またはポリマー等の異なる分子を活性化金属ポルフィリンに結合することができる。例えば、生体分子は生体アミン、ホルモン、ビタミン、代謝生成物、ヌクレオシド、ヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、核酸、ペプチド、ポリペプチド、糖タンパク質、糖、脂質、細胞性およびウイルス性成分、細胞並びにウイルスからなる群より選択することができる。生体分子の具体例は、チラミン、アリルアミン修飾ヌクレオチド、免疫グロブリン、免疫グロブリンフラグメントおよびアビジンである。ポリマーの一例としてはアミノ修飾ポリビニルアルコール(PVA-NH₂)が挙げられる。

10

【0019】

活性化金属ポルフィリンを少なくとも1個の第一級アミノ基を有する分子に結合させると、カルボン酸基が脂肪族鎖に結合しているポルフィリンの活性エステルは、カルボン酸エステル基が芳香族基に結合しているポルフィリンの活性エステルよりも反応性に富むことが見いだされた。さらに、複数(好ましくは2~3)の活性エステル基を有する活性化ポルフィリンは、特定のポルフィリンのモノエステル化合物よりも反応性に富むことが見いだされた。

【0020】

タンパク質等の生体分子の標識のためには、2~3個のエステル基を有する金属ポルフィリン誘導体の使用が特に好ましい。なぜなら、モノエステル誘導体に較べ、上記誘導体の場合にタンパク質に対するポルフィリンの比(F/P比)が最も高くなり、またアビジン/抗体への干渉がより少なくなるからである。さらに、結合手順はタンパク質濃度をあまり高くせずに、例えばタンパク質濃度を5 mg/mlまでにして(例えば、1 mg/mlのアビジン濃度または2 mg/mlのIgG濃度)実施すべきであることが判明した。タンパク質は好ましくはポルフィリンジ-またはトリ-活性エステルの3~6倍過剰で結合させる。反応温度は、活性化金属ポルフィリン誘導体の反応性に依存し、活性エステル基が脂肪族鎖に結合しているポルフィリン誘導体の場合には0~4の範囲が適切であり、活性エステル基が芳香族鎖に結合しているポルフィリン誘導体の場合には30~40の範囲が適切である。

20

【0021】

本発明のさらに別の主題は、金属ポルフィリン誘導体(I)がその活性化カルボン酸エステル基の少なくとも1つを介して少なくとも1個の第一級アミノ基を有する分子に結合している、金属ポルフィリン結合体である。本発明の結合体は、生物物質を検出するための手順に使用される。この手順は一般にりん光による上記結合体の検出を含む。好ましくは、りん光は10から200 μsまで、好ましくは50から150 μsまでの本発明の化合物の減衰時間による時間分解測定(time-resolved measurement)によって検出される。

30

【0022】

時間分解測定により金属ポルフィリン結合体のりん光を検出する場合は、特異的バックグラウンド蛍光の有利な点を利用することができる。この検出方法においては、発光のゲート化(gated)検出と組み合わせてパルス励起を用いることができる。時間分解顕微鏡検査を適用する場合は、金属ポルフィリン結合体の寿命は一般に、望ましくないバックグラウンドシグナルの不在下で特異的りん光が検出されうるように選択される。

40

【0023】

本発明の金属ポルフィリン結合体を用いる場合は、10~100 μsまでの範囲(例えば約50 μs)にある励起光のパルス長が適切である。一連のパルスの反復期間は100 μs程度に短くすることが可能である。例えば100~500 μsで、好ましくは約250 μsである。検出ウィンドウ(window)は、例えば約1~100 μsの長さを有し、例えば生物自己蛍光物質と共に用いる場合は好ましくは5~10 μsの範囲にある遅延時間と組み合わせて約10 μsであり、または膜上のハイブリダイゼーションアッセイに使用する場合は1 μs未満である。

【0024】

50

より具体的には、本発明の結合体はイムノアッセイ、核酸ハイブリダイゼーションアッセイおよび特異的沈殿アッセイ等の他の種類のアッセイに用いることができる。

【0025】

本発明の結合体は、組織片、全細胞、および中期調製物、等の自己蛍光環境における *in situ* および / または *in vitro* 測定に特に適している。自己蛍光環境の他の例は、ニトロセルロースまたはポリフッ化ビニリデン膜、等の自己蛍光膜である。

【0026】

本発明の結合体は *in situ* 用途において抗原または核酸を検出するための幾つかの異なるアプローチに用いることができる。1つは、西洋ワサビペルオキシダーゼによるピオチンまたは金属ポルフィリンで標識したチラミド (tyramide) の沈殿に基づく酵素的な方法である。ピオチン沈殿物は金属ポルフィリンで標識したアビジンにより検出することができる。さらに、金属ポルフィリンで標識した抗体またはアビジンを用いる従来の免疫蛍光技法が適用可能である。

10

【0027】

チラミドに基づく方法を用いると、異なる顕微鏡を用いる連続および時間分解励起 / 検出の両方において良好な感受性が得られる。培養細胞中のハウスキーピング遺伝子 mRNA および中期調製物上のコスミドプローブほど小さい標的を、集積 (integrating) カメラを使用せずに可視化できることが判明した。特異的シグナルは、ピチチン法で染色するよりも直接金属ポルフィリンで標識したチラミドによって一層強く染色される。しかし、直接法は特に組織片を用いた場合バックグラウンドの増大を示す。しかし、このバックグラ

20

【0028】

従来の免疫蛍光技法もまた適用することができる。集積カメラを使用することなく、培養細胞中の 28 S rRNA および中期調製物上の (中間) 反復プローブ (middle repetitive probe) 等の相対的に豊富な標的のみを可視化することができる。これを達成するためには、抗体 / アビジンの多重ラウンドの適用が好ましい。 *in situ* ハイブリダイゼーション用途のためには、ピオチニル化抗ハプテン抗体および金属ポルフィリン標識アビジンにより検出することができるハプテン標識プローブ (例えばジゴキシゲニン標識プローブ) を用いると最善の結果が得られる。通常、上記の標的を可視化するには抗体と共に 3 ~ 4 回インキュベーションすることが好ましい。集積カメラを使用すると、これらの多層ア

30

【0029】

さらに、金属ポルフィリン標識抗体および金属ポルフィリン標識 DNA プローブの適用、等の他の免疫化学的方法が、免疫組織化学的用途、免疫細胞化学的用途および *in situ* ハイブリダイゼーション用途に適切である。

【0030】

本発明の結合体の別な用途は酸素イメージング (oxygen imaging) である。Wilson および Cerniglia, *Cancer Res.* 52 (1992), 3988-3993 に、りん光イメージングによる腫瘍の位置決定およびその酸素化状態の評価が記述されている。Vanderkooijら (*Biochemistry* 29, (1990), 5332-5338) は、励起状態のトリプレットプローブからの遅延発光を用いたミトコン

40

【0031】

【発明の実施の形態】

さらに、以下の実施例および図面により本発明を詳細に説明する。

【0032】

【実施例】

〔実施例1〕 PtP - および Pt c P - NHS エステルの調製

50

等モル量のCOOH、N-ヒドロキシスクシンイミド (Aldrich)、DCC (ジシクロカルボジイミド、Pierce) およびHBTO (1-ヒドロキシベンゾチアゾール、Aldrich) を無水DMF中で反応させることにより、Pt-メソ-テトラ(4-カルボキシフェニル)ポルフィン (PtP; 図2) およびPt-3,8,13,18-テトラメチル-21H,23H-ポルフィン-2,7,12,18-テトラプロピオン酸 (PtCP; 図1) のN-ヒドロキシスクシンイミドエステル (NHS) 誘導体を合成した。室温で一晩インキュベートして尿素沈殿物を形成させた。NHSエステル誘導体はそれ以上精製しないで使用した。反応経路を図3に示す。

【0033】

下記のNHS誘導体を調製するための試薬の量はそれぞれ以下の通りであった。

【0034】

【表1】

	Pt-porph.	HBTO	DCC	NHS	vol.	PtP-NHS
	mg	mg	mg	mg	ml	[mM]
PtPモノNHSエステル PtP-1-NHS	19.3	2.7	4.1	2.3	2.8	7.0
PtPジ/トリNHSエステル PtP-2.5-NHS	26.6	11.2	7.3	6.2	12.0	2.2
PtCPモノNHSエステル PtCP-1-NHS	20.6	5.0	3.3	2.8	1.13	18.7
PtCPジNHSエステル PtCP-2-NHS	17.9	8.7	5.7	4.9	1.24	17.0
PtCPトリNHSエステル PtCP-3-NHS	10.8	7.9	5.2	4.4	0.78	17.7
PtCPテトラNHSエステル PtCP-4-NHS	10.8	10.5	6.9	5.9	0.79	<17.5

【0035】

〔実施例2〕 PtPおよびPtCP標識抗体結合体の調製

2-1. ヤギ抗DIG IgG PtP結合体の調製

ヤギIgG抗DIG抗血清の全IgG画分をまず硫酸アンモニウム沈降により精製し、次いで溶離液として1x NHS緩衝液を用いてSuperdex 200カラム (Pharmacia)により精製した。IgGをPtP-NHSまたはフルオレセイン-NHSを用いて標識した。PtPで標識する場合は、1x NHS緩衝液中でIgG濃度を2 mg/ml (13.33 μM)として33、83、132若しくは220 μM PtP-2.5-NHS または47、83、140若しくは210 μM PtP-1-NHSを用いてIgGを標識した。反応を氷上で16時間進行させた。精製は、溶離液としてPBSEを用いてSephadex G50fを用いたゲル濾過により実施した。

【0036】

【表2】

10

20

30

40

NHS-エステル	PtP:IgG	F/P ¹	活性 ² (%)
PtP-2.5-NHS	2.5	1.9	84
"	6.2	4.9	42
"	9.9	6.8	25
"	16.3	7.6	15
PtP-1-NHS	3.0	2.0	42
"	6.0	4.4	23
"	9.0	5.0	21
"	13.5	6.8	12

10

【0037】

$${}^1F/P = Pt\text{-ポルフィン} : IgG \text{の比}$$

$$= 0.9 A^{397} / (A^{280} - 0.35 A^{397})$$

²抗DIG ELISAで得られた

20

$$\frac{\text{標識化IgG } \mu\text{MあたりのOD}_{495}}{\text{非標識IgG } \mu\text{MあたりのOD}_{495}} \times 100\%$$

$$\frac{\text{非標識IgG } \mu\text{MあたりのOD}_{495}}{\text{非標識IgG } \mu\text{MあたりのOD}_{495}}$$

によるタンパク質の活性

【0038】

2-2. ヤギ抗マウス抗体 Pt c P 結合体の調製

A. 1 mgまたは434 μ l のヤギ IgG 抗マウス IgG (Pierce, 抗マウス IgG H + L、アフィニティー単離抗体、10 mM リン酸塩 pH 7.6および0.25 M NaClを含む緩衝液中2.3 mg/ml)を 1.4または2.5 μ l の PtcP-3-NHS (DMF中17.7 mM)で処理した。反応を氷上で2時間進行させ、ゲル濾過 (Seph. G50f, PBSE) により精製した。典型的な IgG の収率は >95%であった。

30

【0039】

B. 1 mgまたは770 μ l のヤギ抗マウス IgG (Pierce、アフィニティー単離 IgG の F(ab')₂フラグメント、10 mM リン酸塩 pH 7.6および0.25 M NaClを含む緩衝液中1.3 mg/ml)を 2.3 μ l の PtcP-3-NHS エステルで処理した。反応を氷上で2時間進行させ、ゲル濾過 (Seph. G50f, PBSE) により精製した。F(ab')₂の収率は93.2%であった。

【0040】

C. ヤギ抗マウス (GaM) 抗血清の全 IgG 画分を PBS (pH 7.7)に対して透析し、タンパク質濃度 1.8 mg/ml (12 μ M)で標識した。1 ml (\pm 0.5 ml)の IgG に1または2.5 μ l の PtcP-3-NHS を添加した。反応を氷上で1.5時間進行させ、ゲル濾過 (Seph. G50f, PBSE) により精製した。典型的な IgG の収率は >85%であった。

40

【0041】

【表3】

方法 ¹	PtcP:IgG	F/P ²	活性 ³ (%)
A	3.8	2.9	>95
A	7.1	6.0	>95
B	3.7	2.5	>95
C	7.4	7.0	>95
C	3.0	2.6	>95

10

【0042】

¹ 上記の方法A、BまたはC。

$$^2 F/P (\text{IgG}) = \text{Pt-コプロポルフィン} : \text{IgG の比} = 3.8A^{380} / (A^{280} - 0.3A^{380})$$

$$F/P (\text{Fab}'_2) = 2.5A^{380} / (A^{280} - 0.3A^{380})$$

³ 百分率で表したタンパク質の活性はG a M E L I S A アッセイで得られた

$$\frac{\text{標識化IgG } \mu\text{M あたりのOD}_{495}}{\text{非標識タンパク質 } \mu\text{M あたりのOD}_{495}} \times 100\%$$

$$\frac{\text{標識化IgG } \mu\text{M あたりのOD}_{495}}{\text{非標識タンパク質 } \mu\text{M あたりのOD}_{495}}$$

20

の値である。

【0043】

すべてのPtPまたはPtcP標識抗体をIHCおよびISHアッセイで試験した(実施例8)。モノクローナル抗体をGaM結合体で検出するか、またはDIG標識プローブをヤギ抗DIG-PtP結合体で検出した。DM顕微鏡を用いた連続蛍光(緑または紫励起)の結果、特異的蛍光は全く観察されなかった。ラット抗ヤギFITC結合体を第3/第2層として用いることにより、これらの抗体は特異的に結合していたが検出されなかったことが判明した。また、PtP結合体を用いて共に標識したフルオレセイン化抗体は良好な標識およびマウスIgGまたはDIG-プローブの特異的(かつ感度のよい)検出の両方を示した。

30

【0044】

〔実施例3〕 アビジン-D結合体

Vectorより入手したアビジン-Dをアビジンの供給源として使用した。これは等電点が±7.5で、炭水化物を全く含んでいない。

【0045】

UV/VIS分光法により、またはアビジン濃度を測定するBCA試薬(Pierce)を分光計による397nm(PtP)または380nm(PtcP)における測定と組み合わせて用いて、F/P比を測定した。

【0046】

F/P比を計算するための式は下記の通りである。

$$\text{アビジン-D-PtP} : 1.1 A^{397} / (A^{280} - 0.4 A^{397})$$

$$\text{アビジン-D-PtcP} : 1.7 A^{380} / (A^{280} - 0.3 A^{380})$$

40

【0047】

3.1. アビジン-PtcPおよびアビジン-PtP結合体の調製

アビジン-Dを1xNHS緩衝液で2mg/mlの溶液として標識した(30μM)。標識はPtP-1/2.5-NHSおよびPtcP1、2または3-NHSを用いて実施し、氷上で16時間進行させた。標準的ゲル濾過により精製を行なった。

【0048】

5xNHS緩衝液

この緩衝液は、0.25Mリン酸ナトリウム pH 8.0、0.5M NaClおよび25mM EDTA pH 8.0

50

を含有する。

1. 500 mlの0.5 M リン酸ナトリウム pH 8.0を用意する。
2. 100 mlの5 M NaClおよび50 mlの0.5 M EDTA pH 8.0を添加する。
3. 120 で20分間オートクレーブにかける。
4. オートクレーブにかけた二重蒸留水を用いて容量を1リットルに調整する。

下記の結合体を得られた。

【0049】

【表4】

標識	Pt(c)P:アビジン	収率(%)	F/P	
Pt(c)P-1-NHS	2	67	2.0	10
	4	46	3.3	
	8	23	7.4	
Pt(c)P-2-NHS	2	68	2.2	20
	4	41	3.3	
	8	15	7.3	
Pt(c)P-3-NHS	2	70	2.3	
	4	49	3.1	
	8	15	6.8	
PtP-1-NHS	2	67	0.1	30
	4	40	0.3	
	8	24	0.6	
PtP-2.5-NHS	2	72	0.2	
	4	55	0.4	
	8	31	0.8	

【0050】

Pt(c)P標識から、2倍過剰のPt(c)Pを用いて作成した結合体をすべてプールし、Centricon30 カットオフフィルターを用いて濃縮した(アビジン - Pt(c)P A、3.9 mg/ml、F/P 2.2)。また、すべての4倍過剰サンプル(アビジン - Pt(c)P B、1.1 mg/ml、F/P 3.2)および8倍過剰サンプル(アビジン - Pt(c)P C、0.33 mg/ml、F/P 7.1)をプールした。 40

【0051】

上記3つのPt(c)P結合体をビオチンELISAアッセイで試験した。試験データは、Pt(c)P結合体Aは82%、Bは68%およびCは43%の初期活性(OD490/ng アビジン)を保持することを示した。

【0052】

3.3. アビジン - PVA - PtP 結合体

PtPおよびビオチン標識ポリビニルアルコール(PVA)の調製

1. 11.5 mgのPVA-NH₂ (1/3 OH = NH₂; DMSO 中 0.4 ml)に 50 μlのトリエチルアミン(TE 50

A) を加え、そして0.5 mlのPtP-1-NHS エステル (7 mM) + 50 μ l の10 mM ビオチン-LC-NHS エステル (Pierce, DMSOに溶解) を加えて PtP1B15 (NHSエステルの15% が1個のビオチン含有していた) を得るか、または0.5 mlのPtP-2.5-NHS エステル (2.2 mM) + 25 μ l の10 mM ビオチン-LC-NHS エステル (DMSOに溶解) を加えて PtP2B20を得た。60 で18時間インキュベートした。

【0053】

2. 各サンプルに4 mlの二重蒸留水を加えた後、1サンプルあたり2枚の Centricon 100 フィルター (Amicon) を用いて標識化 PVA 分子を精製した。1 x TEを用いて100 kDa より大きい生成物を洗浄した。これらの生成物を Sorval 遠心機を用いて4 で3 x 90分間3000 rpmで遠心した。収量は PtP1B15 (非常に暗く着色) が2 x 50 μ l で、PtP2B20 (オレンジ色) が2 x 500 μ l であった。モノNHSエステルを用いた場合、ジNHSエステルを用いた場合よりも多くの生成物が <100 kDaとなるように思われた。100 kDa より大きいビオチン化 PVA は、100 kDa未満の PVA よりも優れた結果をもたらすことが判明した。

【0054】

PtP - PVA - アビジン - D 結合体の調製

3. PtP / ビオチン標識 PVA の100 kDaより大きい生成物をアビジン - Dで処理して、アフィニティー化学によりアビジン - PVA - PtP 結合体を調製した。このために、100 μ l の 4 x SSPE に溶解した0.5 mgのアビジン - Dを100 μ l の PtP1B15に加えるか、または200 μ l の 4 x SSPE に溶解した1 mgのアビジン - Dを1 mlの PtP2B20に加えるかした。サンプルを30 で2時間反応させ、その後PBSE (PBS + 2 mM EDTA)を用いて両方のサンプルの容量を1.5 mlとした。両サンプルの色は褐色であった。

【0055】

4. Centricon 100 フィルターを用いて、サンプルを未結合アビジン - Dから精製した (3 x 90分、3000 rpm、外液PBSE)。アビジン - Dを用いた試験は1%未満の収率を示すのみであり、この方法によりすべての未結合アビジン - Dが除去されることを示していた。収量は以下の通りであった：

A P P 1 : 0.2 mlのアビジン - PtP1B15、暗褐色に着色

A P P 2 : 1.0 mlのアビジン - PtP2B20、オレンジ色に着色

100 kDa 未満の生成物は微かな色 (A P P 1) を示すか、または殆ど色を示さなかった (A P P 2)。

【0056】

4. ELISAの実験

4.1. 抗DIG ELISA

このELISAの目標は、ポルフィリン標識ヤギIgG抗DIG (GaDIG) 抗体のジゴキシゲニン (DIG) 結合活性を調べることである。DIGをプレートにコーティングし、このプレートを、各種のGaDIG結合体の逐次希釈液とともに、未標識GaDIGの同様の逐次希釈液を100%対照として使用してインキュベートした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ (HRP) 標識抗ヤギIgG抗体とともにインキュベートすることによって、質量単位IgGあたりの、結合 (=免疫活性) ヤギIgGの量を測定した。HRPを、o - フェニレンジアミン (OPD) を用いて分析によって測定した。

1. 96ウェルのプレート (Greiner) を、DIG標識ウサギIgG (1 : 500) を0.1 M炭酸Na (pH 10) へ溶解した10 μ g/ml溶液150 μ lで、37°Cにて2時間コーティングする。TNT (50 mM Tris HCl (pH 7.4)、0.15 M NaCl、0.05% Tween 20) でプレートを3回洗浄する。

2. 150 μ lのTNB (50 mM Tris HCl (pH 7.4)、0.15 M NaCl、0.5% (w/v) プロッキング剤 (Boehringer Mannheim)) とともに、37°Cで30分間インキュベートする。

3. 100 μ lのGaDIG結合体とともに、37°Cで1時間インキュベートする (未標識GaDIGを100%対照とする)。50 μ g/mlのIgGからスタートした場合、TNBによる2倍の逐次希釈液で最良の結果が得られた。TNTでプレートを3回洗浄す

10

20

30

40

50

る。

4. 125 μ lのウサギ抗ヤギ抗体 - HRP 結合体 (Sigma、1 : 2500) のTNB希釈液とともに、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする。TNTでプレートを3回洗浄する。

5. 0.03%の H_2O_2 を含有する、OPDをOPD緩衝液(0.1Mクエン酸塩/リン酸塩(pH5.3))へ溶解した0.4mg/ml溶液150 μ lとともに、室温で少なくとも30分間インキュベートする。50 μ lの0.18M H_2SO_4 で反応を停止させる。492nmで光学濃度(OD)を読みとる。

【0057】

4.2 GaM ELISA

このELISAの目標は、ポルフィリン標識ヤギIgG抗マウスIgG(GaM)抗体のマウスIgG結合活性を調べることである。マウスIgGをプレートにコーティングし、このプレートを、各種のGaM結合体の逐次希釈液とともに、未標識GaMの同様の逐次希釈液を100%対照として使用して、インキュベートした。ホースラディッシュペルオキシダーゼ(HRP)標識抗ヤギIgG抗体とともにインキュベートすることによって、質量単位IgGあたりの、結合(=免疫活性)ヤギIgGの量を測定した。HRPを、o-フェニレンジアミン(OPD)を用いて分析によって測定した。

1. 96ウェルのプレート(Greiner)を、マウスIgG(Sigma)を0.1M炭酸Na(pH10)へ溶解した10 μ g/ml溶液150 μ lで、37 $^{\circ}$ Cにて2時間コーティングする。TNTでプレートを3回洗浄する。

2. 150 μ lのTNBとともに、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートする。

3. 100 μ lのGaM結合体とともに、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする(未標識GaMを100%対照とする)。50 μ g/mlのIgGからスタートした場合(抗血清の全IgG分画を使用した場合)も、10 μ g/mlのIgGからスタートした場合(抗血清のアフィニティ単離IgG分画を使用した場合)も、TNBによる2倍の逐次希釈液で最良の結果が得られた。TNTでプレートを3回洗浄する。

4. 125 μ lのウサギ抗ヤギIgG - HRP (Sigma、1 : 2500) のTNB希釈液とともに、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする。TNTでプレートを3回洗浄する。

5. 0.03%の H_2O_2 を含有する、OPDをOPD緩衝液へ溶解した0.4mg/ml溶液150 μ lとともに、室温で少なくとも30分間インキュベートする。50 μ lの0.18M H_2SO_4 で反応を停止させる。492nmで光学濃度(OD)を読みとる。

【0058】

4.3 ビオチンELISA

このELISAの目標は、ポルフィリン標識アビジンDのビオチン結合活性を調べることである。ビオチン化BSAをプレートにコーティングし、このプレートを、各種のアビジンD結合体の逐次希釈液とともに、未標識アビジンDの同様の逐次希釈液を100%対照として使用して、インキュベートした。HRP標識抗アビジンD抗体とともにインキュベートすることによって、質量単位アビジンDあたりのアビジンDの結合量を測定した。HRPを、OPDを用いて分析によって測定した。

1. 96ウェルのプレート(Greiner)を、ビオチン化BSA(20mg/mlの原液; BSAは、Pierceから入手した5mg/mlのビオチン-LC-NHSで、30 $^{\circ}$ Cにて2時間20mg/mlにて標識し、DMSOに溶解して50mg/mlの原液とした)を0.1M炭酸Na(pH10)へ溶解した10 μ g/ml溶液150 μ lで、37 $^{\circ}$ Cにて2時間コーティングする。TNTでプレートを3回洗浄する。

2. 150 μ lのTNBとともに、37 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートする。

3. 100 μ lのアビジンD結合体とともに、37 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートする(未標識GaMを100%対照とする)。200 μ g/mlのアビジンDからスタートした場合、TNBによる2倍の逐次希釈液で、最良の結果が得られた。TNTでプレートを3回洗浄する。

4. 125 μ lのヤギ抗アビジンD - HRP (Vector、1 : 400) のTNB希釈液と

10

20

30

40

50

ともに、37°Cで1時間インキュベートする。TNTでプレートを3回洗浄する。

5. 0.03%のH₂O₂を含有する、OPDをOPD緩衝液へ溶解した0.4mg/ml溶液150μlとともに、室温で少なくとも30分間インキュベートする。50μlの0.18M H₂SO₄で反応を停止させる。492nmで光学濃度(OD)を読みとる。

【0059】

6. PtPならびにPtcPで標識したチラミドの調製

6.1 DCC/HBTO法(比較)

PtPのカルボキシル基を、チラミン(Tyr)のアミノ基と反応させた。PtP-(COOH)₄(8mM)を、新たに開封したDMSO中で、1、2...4倍過剰量のDCC、HBTO、ならびに、0、1...4倍過剰量のチラミンと反応させた。

チラミドは、リンパ球のCD4を検出することによって8ならびに80μMの濃度について調べた。チラミド非含有の対照は、どのリンパ球でも、比較的高いバックグラウンドを示した。どのPtP-Tyrでも、特異的な検出結果は観察されなかった。

次に、同じ方法を用いて、PtP-(COOH)₂(Tyr)₂を調製した。この場合、反応はDMF中で行い、2工程、すなわち、(1)DCCならびにHBTOとの反応(PtP:DCC、HBTO=2:1)、ならびに(2)チラミンとの反応(PtP:Tyr=2:1)に分けて実施した。最初の反応は、インキュベーション時間を各種変更して実施した。得られたチラミドを、20μMで、リンパ球染色体へのin situハイブリダイゼーションによって調べた。結果は得られなかった。

【0060】

6.2 混合無水物法(比較)

PtPを、トリエチルアミン(TEA)、エチルクロロホルメート(ECF)、ならびにチラミンと反応させた。溶媒としてはDMFを使用した。PtP:TEA、ECF、あるいはTyrは、2:1とした。得られたチラミドを、20μMで、リンパ球染色体へのin situハイブリダイゼーションによって調べた。結果は得られなかった。

6.3 DCC/HBTO-NHS法(本発明)

実施例1にしたがって、PtP-ならびにPtcP-NHSEステルを調製し、次にDMF+0.3~10%のTEA中でチラミンと反応させた。インキュベーションは、42°Cで一晩、あるいは、50°Cで4時間行った。サンプルを、-20°Cで保存し、フィルターアッセイで調べた。マウスIgGは、1ng 1:3 100fgの0.1%BSA溶液として、ハイボンドセクストラ(hybond Cextra)に滴下した。TNBを抗体のブロッキング/希釈に使用し、TNTをインキュベーション工程間の洗浄に使用して、ヒツジ抗マウス-DIG結合体(1:2500)ならびにヒツジ抗DIG-HRP結合体(1:1000)によってmIgGを検出した。チラミドの検出は、pH8.0/0.003% H₂O₂、ならびに50μMの濃度で実施した。調製したチラミドのすべてで、±10pgが検出された(吸収)。

調製したチラミドは、以下のとおりである。

【0061】

記載	使用NHSエステル	[PtP] (mM)	[NHS] (mM)	[チラミド] (mM)
PtP(COOH) ₃ (Tyr) ₁	PtP-1-NHS	5.5	5.5	4.5
PtP(COOH) ₂ (Tyr) ₂	PtP-2.5-NHS	1.8	4.5	4.5
PtP(COOH) ₃ (Tyr) ₁	PtP-2.5-NHS	1.8	4.5	1.8
PtcP(COOH) ₃ (Tyr) ₁	PtcP-1-NHS	14.5	14.5	16.3
PtcP(COOH) ₂ (Tyr) ₂	PtcP-2-NHS	11.6	23.2	22.9

フィルター試験では、複数のチラミドで標識したPt-ポルフィリンの感度の方が、単一

10

20

30

40

50

のチラミドで標識した P t - ポルフィリンの感度より良好であった。

【 0 0 6 2 】

7 . P t P ならびに P t c P で標識した D N A プローブの調製

P t - ポルフィリン N H S エステルによる D N A の標識を、2 つの方法を使用して行った。

7 . 1 P t P / P t c P - d U T P を用いたニックトランスレーション。

7 . 2 アリルアミン - d U T P を用いたニックトランスレーションを行い、次に、P t P / P t c P - N H S エステルとのインキュベーションを行う方法。

P t - ポルフィリン - d U T P の調製

アリルアミン - d U T P に、5 倍過剰量の P t P - 1 - N H S エステルあるいは P t c P - 1 - N H S エステルを加え (全 : 1 x N H S バッファー、1 0 - 2 5 % D M F)、3 7 ° C で、1 - 4 時間インキュベートした。

P t P - d U T P ならびに P t c P - d U T P を、薄層クロマトグラフィーで精製した。キーセルゲル (Kieselgel) H P T L C (2 5 4 n m) プレートで固相として使用し、7 0 % エタノール、3 0 % H ₂ O を溶離剤として使用した。R f 値は、以下のとおりであった。

P t P - 2 . 5 - N H S (インキュベーション後) R f = 0 . 9 5

P t P - d U T P (1 P t P / d U T P) 0 . 8 0 - 0 . 8 5

アリルアミン - d U T P 0 . 2

N - ヒドロキシスクシンイミド 0 . 8 5

10

20

【 0 0 6 3 】

N H ₂ 標識 D N A の調製ならびに P t - ポルフィリン - N H S を用いた標識

D N A プローブを、第一アミノ基で標識した。この際、標準的なニックトランスレーションを行った。ニック混合物は、特に、下記のもの、すなわち、5 0 μ M の d A T P、d C T P、d G T P、ならびに 5 4 μ M のアリルアミノ d U T P (1 / 5 0 2 . 7 m M の原液) を含有しするものとした。D N A は、エタノール沈殿によって精製、濃縮した。ペレットを 1 x N H S バッファーに溶解し、P t P / P t c P - N H S エステルと反応させた。プローブを、ゲル濾過によって精製し、さらに、D N A 担体の存在下でエタノール沈殿させた。

【 0 0 6 4 】

8 . 免疫組織化学 / 免疫細胞化学的アッセイ (I H C)、ならびに in situ ハイブリダイゼーション (I S H) の実験

8 . 1 チラミド利用型 I H C

P t - ポルフィリン標識アビジン D を用いた抗原の免疫化学的検出を行うために、ビオチンチラミド (B T) による H R P の検出を、2 種のアッセイで調べた。まず、ポリマー - ラット I g A 複合体を注射しておいたラットから得た 4 μ m のラットの肝臓のクリオスタット切片で、ビメンチンを免疫学的に染色した。切片は、アセトンで室温にて 1 0 分間固定した後、マウス I g G 抗ビメンチン (Amersham R P N 1 1 0 2、T N B で 1 : 4 0 に希釈) とともに 3 7 ° C で 1 時間インキュベートし、T N T で 3 x 5 分間洗浄し、T N B に 1 : 2 5 0 で希釈した H R P 標識抗マウス抗体 - アビジン複合体とともに 3 7 ° C で 3 0 分間インキュベートした。T N T で 3 x 5 分間洗浄した後、0 . 1 5 M の N a C l 中でスライド標本を洗浄した。次に、0 . 5 m l のチラミド検出液を加え、室温で 3 0 分間インキュベートした。検出バッファーは、2 0 μ M B T、0 . 2 M Tris H C l (p H 7 . 5)、1 0 m M イミダゾール、0 . 0 0 1 % H ₂ O ₂ を含むものとした。P t P あるいは P t c P で標識したアビジン D で、ビオチン化チラミドを検出した (3 7 ° C で 3 0 分間インキュベーション、T N B で希釈)。次に、サンプルを、T N T 中で室温にて 3 x 5 分間洗浄し、脱水し、Vectashield (登録商標) 中に包埋した。

1 % ホルムアルデヒドで固定したヒト単核白血球で、各種の C D マーカーを検出した。C D 4、9、1 3、1 4、1 9 (Dakopatts, Beckton and Dickinson) に対するマウス I g G モノクローナル抗体を、細胞のサイトスピン調製物上でインキュベートした。その後、

30

40

50

スライド標本を、HRP標識ヤギ抗マウスIgG抗体-アビジン複合体とともにインキュベートした。抗体のインキュベーションならびに洗浄は、それぞれ、TNBならびにTNT中で実施した。検出は、組織切片に関して記載したのと同様にして実施した。

【0065】

8.2 チラミド利用型りん光in situ ハイブリダイゼーション (PHISH)
 チラミド利用型PHISHの標的として、ヒト分裂中期標本を使用した。メタノール/酢酸で固定したリンパ球調製物をスライド標本に滴下し、2分間乾燥し、70%酢酸に浸漬した。このスライド標本を一晩乾かした。次に、このスライド標本を、RNase A (Promega) を2xSSPEへ溶解した0.1mg/ml溶液 (Sambrookら、Molecular Cloning.

A Laboratory Manual、第2版、1989、Cold Spring Harbor Laboratory Press, B. 13を参照のこと)で、37°Cにて15分間処理し、PBSで5分間ずつ2回洗浄し、0.01M HClで37°Cにて5分間1回洗浄した。次に、0.05% (w/v) ペプシン (Sigma) / 0.01M HCl中で37°Cにて10分間インキュベートし、PBS中で2回洗浄し、1%ホルムアルデヒド/PBS中で室温にて10分間後固定した。スライド標本は、PBS中で2回洗浄した後、一連のアルコール処理で脱水し、乾燥させた。

【0066】

コンプレキシティー (複雑度) の低いプローブ (プラスミド) と、コンプレキシティーの高いプローブ (コスミド、染色体ライブラリー) の両方を使用した。プラスミドプローブ (28S rRNA遺伝子に対して特異的なもの) は、変性し、50%のホルムアミド、2xSSPE、10%の硫酸デキストラン、0.3-1ng/μlのプローブ、50ng/μlのニシン精子DNAを含有する混合物中でハイブリダイズした。染色体ライブラリーとコスミドプローブは、50%のホルムアミド、2xSSPE、10%の硫酸デキストラン中で80°Cで10分間インキュベートすることによって変性した。この混合物は、さらに、10倍過剰量 (ライブラリー)、あるいは50倍過剰量 (ライブラリー以外) のヒトCot1DNA (Boehringer) を含有するものとした。このプローブを、混合物を37°Cで60分間インキュベートすることによって、Cot1DNAにプレアニールした。スライド標本は、80°Cで2分間インキュベートすることによって変性し、70%EtOH (-20°C) 中で2分間洗浄してから脱水した。次に、プレアニールしたプローブ/Cot1混合物を加え、10ng/μlの標識プローブならびに100-500ng/μlのヒトCot1DNAを含有する同じ混合物中でハイブリダイズさせた。ハイブリダイゼーションは、37°Cで16-20時間実施し、その後、スライド標本を、2xSSPE/0.1% Tween 20 (Sigma) 中で、室温で1回、60°Cで2x5分間洗浄し、さらに、0.1xSSPE中で、60°Cにて5分間ずつ2回洗浄した。

【0067】

ニックトランスレーションによって、ビオチン化したあるいはジゴキシゲニンで標識したプローブを調製し、ストレプトアビジン-HRP (Vector、TNBの5μg/ml溶液) あるいはヒツジ抗ジゴキシゲニン-HRP (Boehringer、TNBに1:200で溶解) を用いて免疫化学的に検出した。より良い結果が得られたのは、マウス抗ビオチン (Sigma、1:50) + ウサギ抗マウス-HRP (DAKO、1:150) (ビオチン化プローブの場合)、あるいはマウス抗DIG-ビオチン (Sigma、1:200) + ストレプトアビジン-HRP (Vector、1:100) を用いた2工程免疫プローブ検出法の場合であった。抗体は、37°Cで30分間インキュベートし、TNT中で3x5分間洗浄した。チラミドの検出は、検出用混合物に20%w/vの硫酸デキストランを加えた以外は、組織切片について記載したのと同様にして実施した。プローブとしてライブラリーを使用する場合には、基質バッファー中の硫酸デキストランの濃度を5% (w/v) に下げた。最後に、高頻度反復配列特異的なプローブ (たとえば、動原体特異的プローブ) を使用する場合には、硫酸デキストランのかわりに10%PVA (Mw: 72kDa) を加えた。

【0068】

スライド標本は、最後にTNTで洗浄した後、10ng/μlの青色の蛍光を発するDNA対比染色用のジアミノプロピジウムヨウ素 (DAPI) を含有するTNT中で室温にて10

10

20

30

40

50

分間インキュベートし、その後、一連のアルコール処理で脱水した。このスライド標本を、Vectashield（登録商標）あるいはMerckoglas（登録商標）（キシレンで1：1に希釈、37°Cにて30分以上重合）に包埋した。

【0069】

8.3 通常のPHISH

ハイブリダイゼーション、ならびにハイブリダイゼーション後の洗浄は、上述のようにして行った。プラスミドプローブのプローブ濃度は、5 - 10 ng/μlに上げ、コスミドのハイブリダイゼーションは20 ng/μl + 1 μg/μlのCot1-DNAで実施した。

【0070】

通常、分裂中期標本でPHISH信号を可視化する際には、3ないし4工程の免疫化学的アプローチが使用されてきた。プローブは、ニックトランスレーションによってフルオレセイン-12-dUTP、Dig-11-dUTP、あるいはエストラジオール-11-dUTPで標識し、マウス抗DIG（Sigma、1：200）、ウサギ抗FITC（DAKO、1：100）、あるいはウサギ抗エストラジオール（Boehringer、1：250）で免疫学的に検出し、3工程のアプローチの際には、スライド標本を、ヒツジ抗マウス-ビオチン結合体（Boehringer、1：200）あるいはヤギ抗ウサギ-ビオチン結合体（Sigma、1：400）とともにインキュベートしてから、アビジンD-PtP/PtCpとともにインキュベートした。いずれの場合も、希釈にはTNBを使用し、インキュベーションは37°Cで30分間実施した。各工程の間には、スライド標本をTNTで3×5分間洗浄した。

【0071】

ビオチン化したプローブは、（1）アビジン-PtCp、（2）ヤギ抗アビジンD-ビオチン結合体（Vector、1：100）、（3）アビジン-PtCpによって検出した。いずれの場合も、希釈には、TNBを使用し、インキュベーションは、37°Cで30分間実施した。各工程の間には、スライド標本をTNTで3×5分間洗浄した。

【0072】

ジゴキシゲニンで標識したプローブも、4工程のアプローチで検出した。マウス抗DIG-ビオチン結合体とともにインキュベートした後、ビオチン化したプローブについて記載したのと同様にして、スライド標本を3層でインキュベートした。

【0073】

スライド標本は、最後にTNTで洗浄した後、10 ng/μlのDAPIを含有するTNT中で室温にて10分間インキュベートし、その後、一連のアルコール処理で脱水した。このスライド標本を、Vectashield（登録商標）に包埋した。

【0074】

8.4 mRNAの検出

各種のin vitroで培養した細胞系統を使用して、各種のmRNAを検出した。

- ・ Rat9G細胞（ヒトCMV-IEA遺伝子の一部を包含）
- ・ HeLaX1細胞（ルシフェラーゼ遺伝子を包含）
- ・ HeLa細胞

培養液を捨てた後、顕微鏡用スライド標本ガラス上で生育させた細胞を、PBSで2回洗浄し、4%ホルムアルデヒド、5%酢酸、0.9%NaCl中で室温にて20分間固定した。次に、細胞を70%エタノールで洗浄し、この溶液中で4°Cにて貯蔵した。

【0075】

このスライド標本を一連のエタノール処理で脱水し、Histoclear（登録商標）あるいはキシレン中で室温にて10分間洗浄して脂質を除去した。スライド標本は、100%エタノール中で洗浄した後、90%ならびに70%のエタノールで再度含水させた。その後、0.01M HCl中で洗浄し、0.1%ペプシン/0.01M HCl中で37°Cにて1分間インキュベートし、二回蒸留水中で短時間洗浄した後、一連のエタノール処理で脱水した。

【0076】

ハイブリダイゼーション混合物（60%ホルムアミド、2×SSC（上掲のManiatisら、

10

20

30

40

50

B . 1 3 参照)、 1 0 % 硫酸デキストラン、ならびに 5 ng/μl の D I G 標識プローブ) を加えた。プローブと標的は、8 0 ° C で 2 . 5 分間変性し、3 7 ° C で 1 6 - 2 0 時間にわたってハイブリダイズさせた。スライド標本は、2 x S S C 中で室温にて 5 分間洗浄してカバーガラスを取り外し、6 0 % ホルムアミド、2 x S S C 中で 3 7 ° C にて 3 x 5 分間洗浄した。

上述のようにして、免疫化学的検出を行った。

【 0 0 7 7 】

8 . 5 Technovit(登録商標) 8 1 0 0 に包埋したラット肝臓切片でのグルタチオン - S - トランスフェラーゼ (G S T P) の検出

生検で採取した肝臓を、2 % パラホルムアルデヒド中で室温にて 2 時間固定してから、1 0 % 糖中で一晩インキュベートした。次に、この肝臓を、Technovit (登録商標) 8 1 0 0 に包埋した。4 μm の切片を切り出し、エタノール/エーテル (1 : 1) で清浄化したスライドガラスに載置し、このスライド標本を 4 ° C で保存した。

【 0 0 7 8 】

スライド標本は、3 7 ° C で 2 時間乾燥させ、0 . 1 M トリス H C l (p H 7 . 8) / 0 . 1 % C a C l₂ へ溶解させたトリプシン (Boehringer) の 0 . 0 1 % 溶液で、3 7 ° C にて 5 分間処理した。P B S 中で、1 0 分間ずつ 2 回洗浄した後、このスライド標本を、T N B 中で 3 7 ° C にて 1 5 - 3 0 分間インキュベートし、その後、ウサギ抗ラット G S T P ポリクローナル抗体を加えた (T N B で 1 : 1 5 0 に希釈)。3 7 ° C で 2 時間インキュベートした後、スライド標本を P B S 中で 3 x 5 分間洗浄し、ヤギ抗ウサギ抗体 - H R P 結合体 (Sigma、T N B で 1 : 2 0 0 に希釈) で 3 7 ° C にて 3 0 分間処理した。P B S 中で 3 x 5 分間洗浄した後、上述のようにして、P V A あるいは硫酸デキストランを使用せずに B T 反応を実施し、室温に 3 0 分間置いた後、P B S 中で 3 x 5 分間洗浄し、沈着したビオチンを、アビジン - P t P (T N B への 3 0 - 5 0 μg/ml 溶液) で免疫化学的に検出した (3 7 ° C にて 3 0 分間)。P B S 中で 3 x 5 分間洗浄した後、切片を一連のエタノール処理で乾燥させ、Merckoglas (登録商標) に包埋した。

【 0 0 7 9 】

9 . ビオチンチラミド利用型免疫組織化学 / 免疫細胞化学的アッセイ、ならびに in situ ハイブリダイゼーションアッセイ

9 . 1 ラット肝臓切片 (Technovit (登録商標) 8 1 0 0 に包埋) での G S T P の検出
切片を、プラスチック (Technovit (登録商標) 8 1 0 0) に包埋した。顕微鏡に装着した各種のフィルターセットを使用して、切片の自己蛍光を観察した。G S T P タンパク質を、2 工程の方法、すなわち、まずウサギ抗 G S T P 抗体を使用し、次に、ヤギ抗ウサギ抗体 - H R P 結合体を使用することによって、免疫化学的に検出した。ビオチン - チラミド結合体と反応させた後、沈着したビオチンを、アビジン - P t P で染色した。結果から、G S T P は、時間分解顕微鏡を使用すると、P t - ポルフィリン標識アビジンによって容易に検出することができ、バックグラウンドが完全な黒色となることがわかった。信号 / ノイズ比は、フルオレセインで標識した抗体の場合に得られる結果よりもはるかに高いものであった。

【 0 0 8 0 】

9 . 2 R a t 9 G 細胞での、R N A の P H I S H による C M V - m R N A の検出
ヒトサイトメガロウイルス (C M V) の前初期抗原に対して特異的な 7 kb のプラスミドプローブである p S S をジゴキシゲニン - 1 1 - d U T P で標識し、シクロヘキシミドで刺激した R a t 9 G 細胞の 1 0 - 3 0 % に存在する C M V - m R N A を検出する際のプローブとして使用した。ハイブリダイズしたプローブを、ヒツジ抗 D I G 抗体 - H R P 結合体 (1 : 1 0 0 に希釈) で免疫化学的に検出した後、ビオチンと反応させた。沈着したビオチンを次いでアビジン - P t P で染色した。

シグナルは、約 2 0 % の細胞において観察された。シグナルは、通常の蛍光 D M 顕微鏡 (Leica) を用いて肉眼で、および C C D カメラ (CH250, Photometrics Ltd., Tucson, USA) を用いた時間分解顕微鏡の両方の方法によって可視化した。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 1 】

1 0 . P t c P 標識アビジンDを使用した、ビオチンチラミド利用型 I H C ならびに I S H

1 0 . 1 ヒト分裂中期標本での P H I S H

各種の標的サイズに応じたプローブを使用して、Vectashield (登録商標) に包埋したサンプルの時間分解 P H I S H を実施した (1 0 . 1 - 1 0 . 4) 。プローブとしては、ヒトサテライト I I I D N A あるいは リピートに対して特異的な、各種の染色体動原体特異的プローブを使用し、また、2 8 S リボソーム遺伝子に対して特異的なプローブ、各種のコスミド、ならびに染色体ライブラリーも使用した。

【 0 0 8 2 】

上記プローブは、いずれも、容易に検出が可能であった。信号は、D M 顕微鏡あるいは時間分解蛍光定量法に適した他の顕微鏡を使用して、蛍光によって見る事が可能であった。

【 0 0 8 3 】

第2染色体の短いアーム (カルバモイル - P - シンセターゼ - アスパラギン酸トランスカルバモイラーゼ - ジヒドロオロターゼ (C A D) 遺伝子)、あるいは X 染色体 (デュシェンヌ型筋ジストロフィー (D M D) 遺伝子) に対して特異的なコスミドを使用して、各種の免疫学的方法を、B T とアビジン - P t P / P t c P の組み合わせについて調べた。ビオチンプローブ標識を使用した場合、マウス抗ビオチン (Sigma) ならびにウサギ抗マウス - H R P 結合体 (DAKO) を使用した場合に特に良好な結果が得られた。ジゴキシゲン 20
ンプローブ標識を使用した場合、マウス抗 D I G - ビオチン結合体 (Sigma) ならびにストレプトアビジン - H R P 結合体 (Vector) を使用した場合に特に良好な結果が得られた。

【 0 0 8 4 】

こうした方法を用いると、ヒト分裂中期標本の任意の標的を検出することが可能であった。感度は、フルオレセインあるいはローダミンで標識したプローブ / 抗体を用いる通常の免疫学的手法の場合より良好であった。

コピー数の多い標的 (たとえば、動原体プローブ) は、B T 中で、1 0 % (w/v) の P V A (7 2 kDa) とともにインキュベートし、他のプローブは、B T 中で、1 5 - 2 5 % (w/v) の硫酸デキストランとともにインキュベートした。こうした手順としたのは、信号の 30
光学解像度を確保するためである。

【 0 0 8 5 】

1 0 . 2 時間分解蛍光定量法による二重ハイブリダイゼーション

ヒト分裂中期標本で、二重 I S H 実験を実施した。ローダミン - 4 - d U T P (Boehringer) で標識した、第1染色体 (c # 1) に対して特異的なプラスミド p U C 1 . 7 7 (第1染色体のバンド 1 q 1 2 上に位置するヒトサテライト I I I D N A に対して特異的な 1 . 7 7 kb のインサートを含む p U C プラスミド) を、D I G 標識 2 8 S r D N A プローブと同時ハイブリダイズした。D I G プローブを、H R P 標識抗 D I G F a b フラグメントで検出し、B T で染色し、沈着したビオチンを、アビジン - P t c P で検出した。

【 0 0 8 6 】

連続的に蛍光を観察した結果、第1染色体、ならびにすべてのアコセントリックな (acocentric) 染色体の短いアーム (2 8 S r D N A 遺伝子) も陽性に染色されていた。最後に P t c P で染色した標的は、ローダミンで染色した標的より、濃赤色が強かった。時間分解蛍光定量法 (レーザー顕微鏡) を行うと、2 8 S の信号がなおもはっきり見えていたのに対し、第1染色体の信号は、もはや検出されなかった。このことから、P t c P の信号がなおも時間分解されており、この顕微鏡の使用時には、バックグラウンドが良好に差し引かれていることがわかる。

【 0 0 8 7 】

1 0 . 3 m R N A の検出

各種の m R N A 配列を、時間分解 I S H ならびに B T システムで検出した。HeLaX1細胞を 50

10

20

30

40

50

使用したところ、DIG標識プローブをHRP標識抗DIGFabフラグメントと組み合わせて使用したBT/アビジン-PtcPによって、rRNA、ヒト延長因子(HEF)-mRNA、ならびにルシフェラーゼ-mRNAが成功裡に検出された。

【0088】

10.4 アビジン-PtcP、アビジン-PtP、ならびにアビジン-PVA-PtPの比較

ラットの肝臓のクリオスタット切片のビメンチン染色を使用して、各種のアビジン-Ptポルフィリン結合体を比較した。モノクローナル抗体とともにインキュベートした後、スライド標本をウサギ抗マウス-HRP結合体(DAKO)とともにインキュベートし、さらに、BTとともにインキュベートした。沈着したビオチンを、アビジン-PtcP、アビジン-PtP、ならびにアビジン-PVA-PtPで検出した。PVA結合体を使用した場合に、最大の特異的信号が得られた。スライド標本は、いずれも、緑色ならびに紫色を励起することによって観察した。PtPならびにPtcPのいずれでも、紫色の励起の方が効率が高かった。レーザー顕微鏡を使用する場合には、PtP標識結合体の方がよい結果が得られた。これは、PtPの方が、PtcPより、514nmの光を多く吸収するからである。

10

【0089】

10.5 Merckoglas(登録商標)に包埋したサンプルでのPtPチラミドならびにPtcPチラミド利用型IHCならびにISH

PtPチラミドならびにPtcPチラミドは、Merckoglas(登録商標)に包埋したラット肝臓組織切片でのビメンチン染色でも、有用であった。時間分解顕微鏡を用いると、信号がさらに良好に検出された。

20

【0090】

11. PtPで標識した免疫反応性物質を用いた通常のIHCならびにISH

11.1 C#18プローブ、28Sプローブ、ならびにコスミドq2プローブを用いたヒト分裂中期標本での時間分解ISH

各種の標的サイズに応じたプローブを使用して、アビジン-PtcP結合体の性能を観察した。標的のサイズは、数百kb(C#18プローブ)、50-200kb(28Sプローブ、C#22の±20kbからC#15の±100kbまで、rDNA遺伝子の数に依存する)から、±30kb(コスミドプローブ、q2に局在するCAD遺伝子に対して特異的なプローブ)までとした。

30

【0091】

ビオチン、DIG、フルオレセイン、あるいはエストラジオール(E2)で標識したプローブを使用して、単一層ないし多層の各種の免疫化学的方法について調べた。

1層:	BIOプローブ	アビジン-P t c Pで検出	
2層:	DIGプローブ	マウス抗DIG-ビオチン結合体 + アビジン-P t c Pで検出	
3層:	BIOプローブ	アビジン-P t c P + ヤギ抗アビジン-ビオチン結合体 + アビジンP t c Pで検出	
	DIGプローブ	マウス抗DIG + ヒツジ抗マウス-ビオチン結合体 + アビジン-P t c Pで検出	10
	FLUプローブ	ウサギ抗FITC + ヤギ抗ウサギ-ビオチン結合体 + アビジン-P t c Pで検出	
	E2プローブ	ウサギ抗E2 + ヤギ抗ウサギ-ビオチン結合体 + アビジン-P t c Pで検出	
4層:	DIGプローブ	マウス抗DIG-ビオチン結合体 + アビジン-P t c P + ヤギ抗アビジン-ビオチン結合体 + アビジン-P t c Pで検出	20

【0092】

結果:

結果は、DM顕微鏡(連続緑色励起)、CCD撮像装置(連続緑色励起)、あるいはレーザー顕微鏡(時間分解しつつ514nmで励起)のいずれかを使用して観察した。

1層: 各標的のいずれも、ほとんど可視化されなかった。C#18プローブとCCDカメラとの組み合わせでのみ、多少の結果が得られた。

2層: C#18プローブと28Sプローブが、DM顕微鏡でわずかに染色された。CCDによる撮像では、平均すると、10個のアコセントリックな(acocentric)染色体のうち7つで検出が可能であった。コスミドプローブは、この方法では検出できなかった。

3層: BIOプローブで得られた結果は、2層法よりも悪かった。フルオレセインで標識した抗体を使用した場合にも、同様の結果であった。DIGプローブについては、バイオSPA(bioSPA)、シグマ(Sigma)、ダコ(DAKO)、ならびにベーリンガー(Boehringer)から入手した各種のビオチン化抗マウスIgG抗体を調べた。ヒツジ抗マウスF(a b')₂ビオチン結合体(Boehringer)で最良の結果が得られた、2層法と比べて高強度の信号が得られた。CCDによる撮像では、平均すると、10個のアコセントリックな(acocentric)染色体のうち9.5個が検出可能であった。また、DIG、FLU、E2で標識したプローブでも、同様の感度が得られた。コスミドプローブは、これらのプローブでは検出できなかった。

4層: (コスミド以外の)いずれのプローブも、この方法を用いると容易に検出され、最も染色強度の高い信号が見いだされたのも、この方法を用いた場合であった。コスミドプローブは、DM顕微鏡では検出されなかったものの、CCDによる撮像を行った場合にも、レーザー顕微鏡(カメラなし)を使用した場合にも検出された。

【0093】

11.3 mRNAの検出

HeLaX1細胞を使用して、2層法とDM顕微鏡(連続緑色ならびに紫色励起)を用いて28SrRNA分子を検出した。28Sプローブが検出可能であった。

【0094】

12. パラジウムコプロポルフィリン

12.1 P d c P - ジ - N H S、ならびにアビジン - P d c P の調製

P d c P - ジ - N H S エステルの調製

パラジウムコプロポルフィリン (P d c P) のジ - N H S エステルの調製を以下のようにして行った。6 . 2 mg の P d c P を 0 . 8 ml の乾燥 D M F に溶解し、3 4 μ l の D C C (1 0 0 mg/ml D M F 溶液)、2 2 μ l の H B T O (1 0 0 mg/ml D M F 溶液)、1 9 μ l の N - ヒドロキシスクシンイミド (1 0 0 mg/ml D M F 溶液) を加えた。室温で 1 6 時間インキュベートした後、P d c P - 2 - N H S (7 . 1 mM D M F 溶液) を - 2 0 $^{\circ}$ C で保存した。

【 0 0 9 5 】

1 2 . 2 アビジン - P d c P 結合体の調製

2 . 5 mg のアビジン D を、1 x N H S バッファー (1 5 μ M) 中で、1 mg/ml 溶液として標識した。P d c P - 2 - N H S を、濃度が 4 5 あるいは 9 0 μ M (3 ならびに 6 倍過剰) となるまで加え、氷上で 4 時間反応させた。標準的なゲル濾過によって精製を行った。染色された結合体を得られた。いずれの場合についても、P d c P 標識の一部が、低分子量生成物として保持され、アビジンと反応することはなかった。これらの結合体を \pm 0 . 7 5 mg/ml P B S E 溶液として - 2 0 $^{\circ}$ C で保存した。

次に、0 . 5 mg のアビジン D を、1 x N H S バッファー (1 5 μ M) 中で、1 mg/ml 溶液として標識した。P d c P - 2 - N H S を、濃度が 1 5 0、5 2 5、あるいは 7 5 0 μ M (1 0、3 5 ならびに 5 0 倍過剰) となるまで加え、3 0 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。標準的なゲル濾過によって精製を行った。さらに強度に標識されたアビジンを得られた。標識の強度は、P d c P - 2 - N H S が過剰となるほど増大した。これらの結合体を \pm 0 . 3 mg /ml P B S E 溶液として - 2 0 $^{\circ}$ C で保存した。

【 0 0 9 6 】

ビオチン化 B S A の逐次希釈液を滴下することにより (1 μ l の 0 . 5 μ g / μ l 溶液から開始)、各結合体のそれぞれについて、プロット上の最適希釈率を求めた。T N B 中に 3 0 分浸漬した後、ニトロセルロースプロットを、アビジン - P t c P A . 0 5 の各種希釈液を対照として使用し、P d c P で標識したアビジンの各種 T N B 希釈液とともにインキュベートした。T N T 中で 3 x 5 分間洗浄し、プロットをやぎ抗アビジン D アルカリホスファターゼ (A P) 結合体 (Vector : T N B で 1 : 1 5 0 0 に希釈) とともにインキュベートした。T N T 中で 3 x 5 分間洗浄し、二回蒸留水中で短時間ゆすいだ後、フィルターを N B T / B C I P (Rockland) 中でインキュベートした。

【 0 0 9 7 】

アビジン - P d c P	3 倍過剰	1 : 250	-	1 : 50 (I H C / I S H)
アビジン - P d c P	6 倍過剰	1 : 150	-	1 : 30 (I H C / I S H)
アビジン - P d c P	1 0 倍過剰	1 : 80	-	1 : 15 (I H C / I S H)
アビジン - P d c P	3 5 倍過剰	1 : 80	-	1 : 15 (I H C / I S H)
アビジン - P d c P	5 0 倍過剰	1 : 50	-	1 : 10 (I H C / I S H)

【 0 0 9 8 】

1 2 . 3 P d c P 標識アビジン D を使用したビオチンチラミド利用型 I H C ならびに I S H

Vectashield (登録商標) 中に包埋したサンプルを使用して、アビジン - P d c P 結合体を 2 種のアッセイ法で調べた。アッセイの一方は、H e l a 細胞中での 2 8 S r R N A の検出で、p 1 - ローダミンと 2 8 S - D I G を用いた二重ハイブリダイゼーションを行った。時間分解 D M 顕微鏡観察を、C C D カメラならびに連続紫色励起と組み合わせて使用し、核内の p 1 の信号と、核小体ならびに細胞質中の P d c P の信号 (2 8 S r R N A) を観察した。このことから、時間分解 D M 顕微鏡と組み合わせて、P d コプロポルフィリンを標識として使用すると、(自己) 蛍光が十分に低減することがわかる。

【 0 0 9 9 】

次に、ラットの肝臓のクリオスタット切片でビメンチンを検出した。連続緑色励起のみを使用した。各アビジン - P d c P 結合体を調べ、その際には、アビジン - P t c P を陽性の対照として使用した。最良の結果を得られたのは、3 倍ならびに 5 0 倍過剰量の結合体

を用いた場合であったが、他の3例の結合体によっても、動脈、静脈、ならびに胆管の上皮細胞にピメンチンが特異的に検出された。得られた信号は、アビジン - P t c P で得られた信号に匹敵するものであった。

【 0 1 0 0 】

【 図面の簡単な説明 】

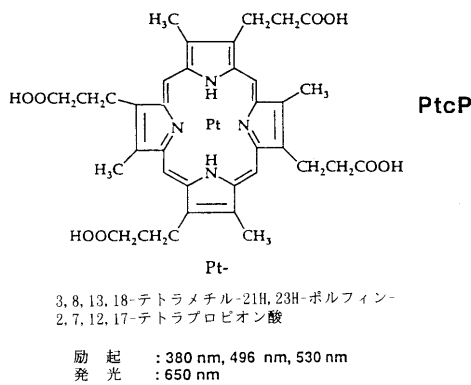
【 図 1 】 本発明の出発化合物として用いられる好ましい金属ポルフィリン (P t c P) の式を示す。

【 図 2 】 本発明の出発化合物として用いられる別の好ましい金属ポルフィリン (P t P) の式を示す。

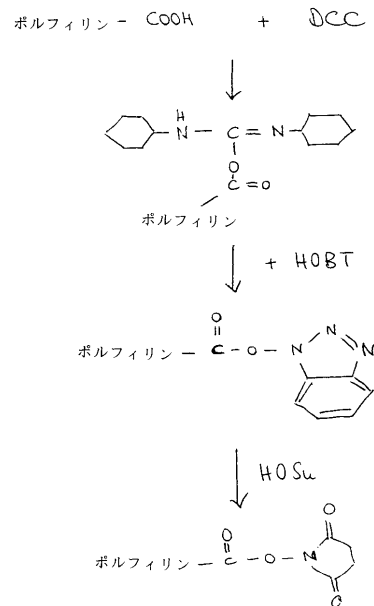
【 図 3 】 本発明の方法を実施するための反応経路を示す。

10

【 図 1 】



【 図 3 】



【 図 2 】

