

(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
2024年7月18日(18.07.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/150786 A1

(51) 国際特許分類:

C12Q 1/04 (2006.01) C12Q 1/28 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01) C12Q 1/48 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12Q 1/66 (2006.01)
C12N 9/02 (2006.01) C12Q 1/70 (2006.01)
C12N 9/04 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C12N 9/12 (2006.01) G01N 33/536 (2006.01)
C12Q 1/26 (2006.01)

特願 2023-003981 2023年1月13日(13.01.2023) JP

(71) 出願人: キッコーマン株式会社 (KIKKOMAN CORPORATION) [JP/JP]; 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 Chiba (JP).

(72) 発明者: 前田 泰一 (MAEDA Yasukazu); 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマン株式会社内 Chiba (JP). 鈴木 繁哉 (SUZUKI Shigeya); 〒2788601 千葉県野田市野田 2 5 0 番地 キッコーマンバイオケミファ株式会社内 Chiba (JP). 池袋 一典 (IKEBUKURO Kazunori); 〒1838538 東京都府中市晴見町 3 - 8 - 1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP). 浅野 竜太郎 (ASANO Ryutaro); 〒1838538 東京都府中市晴見町 3 - 8 - 1 国立大学法人

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/000383

(22) 国際出願日: 2024年1月11日(11.01.2024)

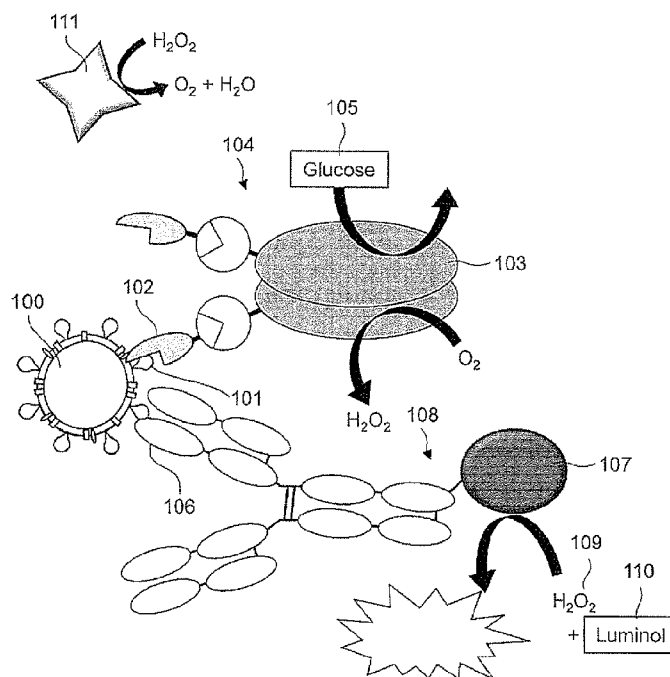
(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:

(54) Title: TARGET SUBSTANCE DETECTION REAGENT AND DETECTION METHOD

(54) 発明の名称: 標的物質の検出試薬及び検出方法



(57) Abstract: The present invention detects, with high sensitivity, a target, on the surface of which exist proteins such as microorganisms and viruses in high density. A first binding molecule and a second binding molecule bonded to a target substance approach each other such that an enzyme reaction caused an enzyme joined to each binding molecule progresses continuously. The enzyme reaction is measured optically.

(57) 要約: 微生物やウイルスといったタンパク質が表面に密に存在する対象を高感度に検出する。標的物質に結合した第1の結合分子と第2の結合分子が近接することで、各結合分子に連結された酵素による酵素反応が連続して進行し、当該酵素反応を光学的に測定する。

[続葉有]

東京農工大学内 Tokyo (JP). 三浦 大明(MIURA Daimei); 〒1838538 東京都府中市晴見町 3 - 8 - 1 国立大学法人東京農工大学内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人平木国際特許事務所 (HIRAKI & ASSOCIATES); 〒1056232 東京都港区愛宕二丁目 5 - 1 愛宕グリーンヒルズ MORI タワー 3 2階 Tokyo (JP).

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

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

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

明 細 書

発明の名称： 標的物質の検出試薬及び検出方法

技術分野

[0001] 本発明は、標的物質に対して特異的に結合する分子を用いた、当該標的物質の検出試薬及び当該標的物質の検出方法に関する。

背景技術

[0002] 一般に抗原-抗体反応を用いた免疫測定システムのように、試料中の標的物質を検出する技術が知られている。特に、抗原-抗体反応を用いた免疫測定システムでは、酵素標識体の結合型（B）と遊離型（F）の分離（B/F分離）が不要なホモジニアスアッセイ（均一系免疫測定法、ホモジニアス検出系とも称す）が簡便且つ迅速な測定系として注目されている。

[0003] 特許文献1には、このようなアッセイの例であり、第1の酵素と第2の酵素をそれぞれ測定対象物質に特異的に結合させ、第2の酵素により触媒される反応を検出することで、試料中の測定対象物質の濃度を測定する方法が開示されている。ここで、第2の酵素により触媒される反応は、第1の酵素が触媒する反応により生成する生成物を利用する反応である。したがって、第1の酵素と第2の酵素とそれぞれの酵素の基質とを含む反応液に測定対象物質が存在すると第1の酵素と第2の酵素とが近接し、第2の酵素が触媒する反応が進行する。特許文献1には、第1の酵素及び第2の酵素の具体的な例として、それぞれグルコースオキシダーゼ及びペルオキシダーゼとすることが開示されている。この場合、グルコースオキシダーゼが生成する過酸化水素を第2の酵素であるペルオキシダーゼが利用してオルトフェニレンジアミン等の基質を用いた酵素反応が進行する。

[0004] 特許文献1には、測定対象物質として、抗原、抗体、低分子有機化合物、タンパク質、高分子有機物質、脂質、糖、ペプチド、ホルモン、核酸、ウイルス等が挙げられているものの、実施例としてはウサギIgGを検出する二次抗体を使用した例が開示されている。

[0005] また、特許文献2には、抗原性物質に対して一対の抗体フラグメントが複合体を形成し、各抗体フラグメントに結合した標識が近接して結合することにより増感されたシグナルを検出することで、抗原性物質を測定する方法が開示されている。ここで、一方の抗体フラグメントに結合した標識の例としてグルコースオキシダーゼが挙げられており、他方の抗体フラグメントに結合した標識の例としてホースラディッシュペルオキシダーゼが挙げられている。特許文献2には、抗原性物質としてHIV抗原を検出した例、血中チロキシンを検出した例、抗ウサギヤギ抗体を検出した例が開示されている。

[0006] さらに、特許文献1及び2以外にも、測定対象物質に対して抗原抗体反応を利用して複合体を形成し、近接した二種類の酵素が連続的に反応することで、測定対象物質を検出する方法が知られている(例えば、特許文献3、4、5及び6)。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開2003-28874号公報

特許文献2：特開平1-150856号公報

特許文献3：特許第3032293号

特許文献4：特許第6522636号

特許文献5：W02006/031815号

特許文献6：特許第5722298号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 上述のように、B/F分離が不要なホモジニアスアッセイ系において、2種類の酵素反応が連続的に生じることで測定対象物質を検出する例は公知である。しかしながら、従来公知の技術においては、測定対象物質の種類によってはS/N比が悪く、実際に高感度な検出系に適用できないといった問題があった。そこで、本発明は、上述した実情に鑑み、微生物やウイルスといったタン

パク質が表面に密に存在する対象を測定対象の標的物質として高感度に検出できる、標的物質の検出試薬や検出方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0009] 上述した目的を達成した本発明は以下を包含する。

(1) タンパク質が表面に存在する標的物質に対して特異的に結合するポリペプチドからなる第1の特異的結合部と、当該第1の特異的結合部に直接又は間接的に結合した第1の酵素部とを有する第1の結合分子と、

上記第1の結合分子における第1の酵素部の基質となる第1の基質と、

上記標的物質に特異的に結合するポリペプチドからなる第2の特異的結合部と、当該第2の特異的結合部に直接又は間接的に結合し、上記第1の酵素部における酵素反応で上記第1の基質から生成した物質を第2の基質とする第2の酵素部とを有する第2の結合分子と、

上記第2の結合分子における第2の酵素部が、上記第2の基質とともに酵素反応の基質とする第3の基質と

を含む、標的物質の検出キット。

(2) 上記第2の結合分子における上記第2の酵素部における酵素反応を光学的に検出する検出装置に使用されることを特徴とする(1)記載の標的物質の検出キット。

(3) 上記検出装置は、光電子増倍管を有さず、フォトダイオードを光学検出素子として備えることを特徴とする(2)記載の標的物質の検出キット。

(4) 上記第2の基質を基質として消費する第3の酵素を更に含むことを特徴とする(1)記載の標的物質の検出キット。

(5) 上記第1の結合分子における第1の酵素部はオキシダーゼ活性を有し、上記第2の結合分子における第2の酵素部はペルオキシダーゼ活性を有し、上記第3の基質がオルトフェニレンジアミン又はルミノールであることを特徴とする(1)記載の標的物質の検出キット。

(6) 上記第1の結合分子における第1の酵素部はATPを産生するキナー

ぜ活性を有し、上記第2の結合分子における第2の酵素部はルシフェラーゼ活性を有し、上記第3の基質がルシフェリンであることを特徴とする(1)記載の標的物質の検出キット。

(7) 上記標的物質はウイルス又は微生物であることを特徴とする(1)記載の標的物質の検出キット。

(8) 上記(1)乃至(7)いずれかに記載の検出キットと、タンパク質が表面に存在する標的物質を含みうる試料とを混合する工程と、

上記検出キットに含まれる第2の結合分子における第2の酵素部による酵素反応を測定する工程とを含み、

上記第2の酵素の酵素反応に基づいて上記試料中の標的物質を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

(9) 検出装置によって、上記第2の結合分子における上記第2の酵素部における酵素反応を光学的に検出することを特徴とする(8)記載の標的物質の検出方法。

(10) 上記検出装置は、光電子増倍管を有さず、フォトダイオードを光学検出素子として備えることを特徴とする(9)記載の標的物質の検出方法。

[0010] 本明細書は本願の優先権の基礎となる日本国特許出願番号2023-003981号の開示内容を包含する。

発明の効果

[0011] 本発明に係る標的物質の検出キット及び検出方法によれば、ウイルスや微生物といった、タンパク質が表面に存在する標的物質を極めて高感度に検出することができる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]本発明を適用した標的物質の検出スキームの一例を模式的に示す図である。

[図2]本発明を適用した標的物質の検出スキームの他の例を模式的に示す図である。

[図3]実施例で使用したHRP融合抗SARS-CoV-2抗体の濃度と化学発光強度との関係を示す特性図である。

[図4]終濃度1.1ng/mLのHRP融合抗SARS-CoV-2抗体を用いたときの不活化SARS-CoV-2濃度と化学発光強度との関係を示す特性図である。

[図5]終濃度2.1ng/mLのHRP融合抗SARS-CoV-2抗体を用いたときの不活化SARS-CoV-2濃度と化学発光強度との関係を示す特性図である。

[図6]終濃度2.1ng/mLのHRP融合抗SARS-CoV-2抗体を用いたときの不活化SARS-CoV-2濃度と化学発光強度（フォトダイオードを備えた検出装置にて測定）との関係を示す特性図である。

[図7]ピルベートオルトホスフェートジキナーゼ／ルシフェラーゼを用いた検出系におけるウイルスを添加しないコントロールと、ウイルスを添加した場合の発光強度の比較を示す。

[図8]大腸菌を含む溶液、及び、含まない溶液を加えた反応液を測定した結果を示す。

[図9]SARS-CoV-2三量体スパイクタンパク質の結果を図9に示す（比較例）。

[図10]SARS-CoV-2受容体結合ドメインの結果を図10に示す（比較例）。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明に係る標的物質の検出キット及び検出方法を、図面を参照して詳細に説明する。

[0014] [標的物質]

本発明に係る検出キット及び検出方法において、検出対象となる標的物質は、タンパク質や抗体といった物質と異なり、タンパク質が表面に存在する標的物質である。すなわち、標的物質は、エンベロープや細胞膜、細胞壁を有する構造を備え、これらエンベロープや細胞膜、細胞壁の表面にタンパク質を有している。標的物質としては、エンベロープを有するウイルス、細胞膜や細胞壁を有する微生物を挙げることができる。なお、エンベロープを有しないウイルスであっても、カプシドを有する場合には標的物質とすることができる。

[0015] また、標的物質となり得るウイルスは、DNAゲノムを有するウイルス及びRNAゲノムを有するウイルスのいずれでも良いし、DNA又はRNAの構造も2本鎖又は1本鎖のいずれでも良い。標的物質となるウイルスの例としては、特に限定されないが、インフルエンザウイルス（例えばA型、B型等）、風疹ウイルス、エボラウイルス、コロナウイルス、麻疹ウイルス、水痘・帯状疱疹ウイルス、ヘルペスウイルス、ムンプスウイルス、アルボウイルス、RSウイルス、SARSウイルス、肝炎ウイルス（例えば、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス等）、黄熱ウイルス、エイズウイルス、狂犬病ウイルス、ハンタウイルス、デングウイルス、ニパウイルス、リッサウイルス等のエンベロープウイルス（以上、エンベロープを有するウイルス）、アデノウイルス、ノロウイルス、ロタウイルス、ヒトパピローマウイルス、ポリオウイルス、エンテロウイルス、コクサッキーウイルス、ヒトパルボウイルス、脳心筋炎ウイルス、ライノウイルス（以上、エンベロープを有さないウイルス）を挙げることができる。

[0016] 特に、標的物質となるウイルスとしては、新型コロナウイルス感染症（COVID-19）の原因となる新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）とすることが好ましい。

[0017] また、標的物質となり得る微生物としては、細菌、真菌類、微細藻類、原生動物（アメーバやゾウリムシなど）等を挙げることができる。これら微生物は、それぞれ特異的な膜タンパク質を有しているため、当該膜タンパク質を抗原とすることで標的物質となる。なかでも、標的物質となる微生物としては、コレラ菌、サルモネラ菌、大腸菌、レジオネラ菌、炭疽菌、ヘリコバクターピロリ菌、リステリア菌、結核菌、非結核性抗酸菌、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌、髄膜炎菌、肺炎桿菌、セラチア菌、ジフテリア菌、ブルセラ菌、バルトネラヘンセラ、エリジペロスリックスールシオパシエ、放線菌、ライム病菌、ウエルシュ菌、赤痢菌、ペスト菌、破傷風菌及びエンテロバクター菌等の感染症に関与する細菌を挙げることができる。また、標的物質となる微生物としては、カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカス

、ブラストミセス、コクシジオイデス、ヒストプラスマ、パラコクシジオイデス及びスポロトリクス等の感染症に關与する真菌類を挙げることができる。

[0018] また、上述したような標的物質を含みうる試料としては、例えば、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、喀痰、糞便（排泄便、直腸便）、嘔吐物、唾液、うがい液及び涙液等の生体由来試料を挙げるができる。また、標的物質を含みうる試料としては、生体由来試料に限定されず、着衣、マスク、眼鏡、フィルター、家具、調理器具等から採取した非生体試料を挙げるができる。

[0019] さらに、標的物質を含みうる試料としては、食品や飲料などの製品；食品や飲料などの原料；食品や飲料などの工程中間品；飲料水、下水、製造用水、井戸水及び冷却塔冷却水などの水；上記微生物を培養した培地；濃縮に使用したフィルター；及び溶出した溶出液なども挙げられる。さらにまた、標的物質を含みうる試料としては、試料表面をふき取った綿棒等のサンプリング器具やそれを水などに懸濁した懸濁液を挙げられる。なお、サンプリング器具でふき取られる箇所としては、食品工場、レストラン、食堂、介護現場、医療現場、オフィスにおける高頻度接触部位、例えば、ドアノブ、手すり、スイッチ、PCのキーボード、マウス、電話、ナースコール、テーブル、椅子、蛇口、ベッドサイドレール、便座、エレベーターボタン、製造工程の設備や作業着、看護師、医師、患者などの手指などが挙げられる。

[0020] [標的物質の検出スキーム1]

上述した標的物質を高精度に検出するシステム例の概略を図1に示す。なお、図1に示す例は、標的物質100として新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を検出するスキームである。新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）は、表面にスパイクタンパク質が密に存在しているため、本システムではスパイクタンパク質における、受容体結合ドメイン（RBD）を抗原101として利用している。なお、上述したように、標的物質100は、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）に限定されず、他のウイルスや微生物でも同様なスキームが適用で

きることは容易に理解できる。

[0021] 本システムでは、図1に示すように、標的物質100における抗原101に対して特異的に結合する第1の特異的結合部102と、第1の特異的結合部102に直接又は間接的に結合した第1の酵素部103とを有する第1の結合分子104を利用する。ここで、第1の酵素部103は、所定の物質を基質（第1の基質105）として酵素反応を触媒し、過酸化水素を発生するオキシダーゼ活性を有している。また、第1の酵素部103は、標的物質100に対して特異的に結合する第1の特異的結合部102と複合体を形成している。ここで、第1の特異的結合部102は、標的物質100、すなわち新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のRBD（抗原101）に対する抗体とすることができる。また、第1の特異的結合部102として抗体を利用する場合、抗体としては、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のスパイクタンパク質におけるRBD以外の領域を抗原101とするものでも良いし、スパイクタンパク質以外の例えば、Nタンパク質やMタンパク質、Eタンパク質を抗原101とするものであっても良い。

[0022] 第1の酵素部103としては、例えば、グルコースオキシダーゼ、アルデヒドオキシダーゼ、チトクロムオキシダーゼ、シトクロムオキシダーゼ、カテコールオキシダーゼ、ジフェノールオキシダーゼ、コレステロールオキシダーゼ、シトクロムCオキシダーゼ、ヒポキサンチンオキシダーゼ、キサンチンオキシダーゼ、NADPHオキシダーゼ、乳酸オキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、アルコールオキシダーゼ、グルタミン酸オキシダーゼ、ホルムアルデヒドオキシダーゼ、ソルビトールオキシダーゼ、フルクトースオキシダーゼ、ピルビン酸オキシダーゼ、アスコルビン酸オキシダーゼ、コリンオキシダーゼ、アミンオキシダーゼ、サルコシンオキシダーゼ、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、フルクトシルペプチドオキシダーゼ、ビリルビンオキシダーゼ、ポリフェノールオキシダーゼ、ウリカーゼ、グリセロールオキシダーゼ、ピラノースオキシダーゼ等を使用することができる。中でも、第1の酵素部103としては、グルコースオキシダーゼを使用することが好まし

い。

[0023] また、第1の基質105は、第1の酵素部103の種類に応じて適宜選択して使用することができる。第1の酵素部103及び第1の基質105のペアは、グルコースオキシダーゼ及びグルコースとすることが好ましい。第1の基質105であるグルコースが安定した化合物であり、安価であるためである。

[0024] 第1の特異的結合部102は、具体的には、免疫グロブリン（IgG、IgA、IgM、IgD、IgE）抗体、重鎖抗体及びフラグメント抗体のいずれであってもよい。免疫グロブリン抗体は、重鎖（VH）及び軽鎖（LH）からなり、重鎖及び軽鎖がそれぞれCDR1、CDR2及びCDR3の3つのCDRを有する。重鎖抗体は、重鎖のみからなり、重鎖におけるCDR1、CDR2及びCDR3の3つのCDRを有する。フラグメント抗体は、酵素や遺伝子工学的な手法を用いて断片化された抗体であり、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、VHH抗体等を含む。また、フラグメント抗体は、Fab、F(ab')、F(ab')₂を構成する軽鎖と重鎖を、リンカー配列を介して結合させて、それぞれ一本鎖抗体としたscFab、scF(ab')、scF(ab')₂も含まれる。ここで、scFab、scF(ab')、scF(ab')₂において、軽鎖のC末端側にリンカー配列を、そして更にそのC末端側に重鎖を結合させてなるものでもよい。さらにまた、重鎖のC末端側にリンカー配列を、そして更にそのC末端側に軽鎖を結合させてなるものでもよい。さらには、軽鎖の可変領域と重鎖の可変領域をリンカー配列を介して結合させて一本鎖抗体としたscFVもまた第1の特異的結合部102として利用できる。さらには、第1の特異的結合部102は、上述した抗体分子に限定されず、標的物質100に対して特異的に結合するタンパク質及びペプチドであってもよい。すなわち、第1の特異的結合部102は、標的物質100に特異的に結合できる、免疫グロブリン（IgG、IgA、IgM、IgD、IgE）抗体、重鎖抗体並びにフラグメント抗体、タンパク質及びペプチドからなる群から選ばれるポリペプチドであってもよい。

[0025] また、図1に示すように、本システムでは、標的物質100に特異的に結合する第2の特異的結合部106と、第2の特異的結合部106に直接又は

間接的に結合した第2の酵素部107とを有する第2の結合分子108を利用する。第2の酵素部107は、第1の酵素部103における酵素反応で生成した過酸化水素（第2の基質109）とルミノール（第3の基質110）を基質として利用する、ペルオキシダーゼ活性を有する酵素である。第2の酵素部107は、ペルオキシダーゼ活性を有する酵素であれば良く、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（Horseradish peroxidase、HRP）を利用することが好ましく、カビなどの微生物由来のペルオキシダーゼを利用することもできる。その他にも第2の酵素部107としては、ミオグロビン、ヘモグロビン、メトミオグロビン、カタラーゼ、シトクロムP450等のペルオキシダーゼ活性を有する酵素を適宜使用することができる。また、第3の基質110は、第2の酵素部107の基質となり、且つ、第2の酵素部107における酵素反応の進行を光学的に検出できる物質とすることが好ましい。具体的には、第3の基質110としては、ルミノールの他にオルトフェニレンジアミンを使用することができる。

[0026] また、第2の酵素部107は、標的物質100に対して特異的に結合する第2の特異的結合部106と複合体を形成している。ここで、第2の特異的結合部106は、第1の特異的結合部102と同様に、標的物質100、すなわち新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のRBD（抗原101）に対する抗体分子とすることができる。また、第2の特異的結合部106として抗体を利用する場合、抗体としては、新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）のスパイクタンパク質におけるRBD以外の領域を抗原101とするものでも良いし、スパイクタンパク質以外の例えば、Nタンパク質やMタンパク質、Eタンパク質を抗原101とするものであっても良い。なお、第2の特異的結合部106が特異的に結合する抗原101と第1の特異的結合部102が特異的に結合する抗原101とにおいて、エピトープは同じでも良いし、同じ分子内の異なるエピトープでも良い。また、第2の特異的結合部106と第1の特異的結合部102とは、標的物質100に表面に存在する異なるタンパク質を抗原としても良い。

- [0027] また、第2の特異的結合部106は、第1の特異的結合部102と同様に、免疫グロブリン抗体、重鎖抗体及びフラグメント抗体のいずれであってもよい。すなわち、第2の特異的結合部106もまた、Fab、F(ab')、F(ab')₂、Fv、VHH抗体、scFab、scF(ab')、scF(ab')₂及びscFv等のフラグメント抗体とすることもできる。また、第2の特異的結合部106は、抗体に限定されず、標的物質100に対して特異的に結合するタンパク質及びペプチドであってもよい。すなわち、第2の特異的結合部106は、標的物質100に特異的に結合できる、免疫グロブリン（IgG、IgA、IgM、IgD、IgE）抗体、重鎖抗体並びにフラグメント抗体、タンパク質及びペプチドからなる群から選ばれるポリペプチドであってもよい。
- [0028] さらに、図1に示すように、本システムには、第1の酵素部103によるオキシダーゼ反応により生じる過酸化水素を基質として消費する第3の酵素111を含むことが好ましい。第3の酵素111は、過酸化水素を基質として消費する酵素であって、例えば、カタラーゼを使用することができる。
- [0029] 以上のように構成された本システムでは、第1の結合分子104、第2の結合分子108、第1の基質105、第3の基質110が存在する反応系において、標的物質100を検出することができる。具体的には、当該反応系に標的物質100が存在すると、第1の特異的結合部102を介して第1の結合分子104が標的物質100に結合するとともに、第2の特異的結合部106を介して第2の結合分子108が標的物質100に結合する。すなわち、標的物質100が反応系に存在すると、第1の結合分子104と第2の結合分子108とが近接した状態を形成する。
- [0030] この状態で第1の酵素部103により第1の基質105を利用したオキシダーゼ反応が進行し、過酸化水素が発生する。第2の酵素部107は、第1の酵素部103と近接した位置にあるため、当該第1の酵素部103の酵素反応で発生した過酸化水素を基質（第2の基質109）として、反応系に存在するルミノール等の第3の基質110とともに酵素反応に利用することができる。すなわち、第1の結合分子104と第2の結合分子108とが標的

物質 100 を介して近接した状態では、第 2 の酵素部 107 によるペルオキシダーゼ反応が進行することとなる。

[0031] したがって、本システムによれば、第 2 の酵素部 107 による第 3 の基質 110 を用いたペルオキシダーゼ反応を測定することで、標的物質 100 を検出することができる。例えば第 3 の基質 110 としてルミノール等の光学的に検出可能な物質を使用した場合、いわゆるルミノール反応により生じる化学発光を測定することで標的物質 100 を検出することができる。なお、化学発光を測定する手段は、特に限定されないが、目視により測定しても良いし、化学発光を検出できる検出装置を使用しても良い。

[0032] 特に、本システムでは、タンパク質が表面に存在する、ウイルスや微生物等を標的物質 100 としている。このため、本システムでは、第 1 の結合分子 104 と第 2 の結合分子 108 とが近接した状態を安定的に密に形成することができる。例えば、目視や検出装置によって上記化学発光を検出することができる。例えば、光電子増倍管を備える高感度光学検出装置を使用することもできるが、これと比較して安価であるが、光電子増倍管を有しない、フォトダイオードを光学検出素子として備える検出装置を使用しても上記化学発光を検出することができる。このような、光電子増倍管を有しない、フォトダイオードを光学検出素子として備える検出装置を使用することで、標的物質 100 を簡便且つ低コストに検出することができる。さらに、第 3 の基質 110 としてルミノールではなく発色基質（例えば、4 アミノアンチピリンとフェノール等）を使うこともでき、この場合には生成する色素の発色を分光光度計やカメラ、目視などで確認することができる。

[0033] 一方、第 1 の結合分子 104、第 2 の結合分子 108、第 1 の基質 105、第 3 の基質 110 が存在する反応系において、標的物質 100 が存在しない場合には、第 1 の結合分子 104 における第 1 の酵素部 103 により第 1 の基質 105 を利用したオキシダーゼ反応が進行し、過酸化水素が発生するものの、近接した位置に第 2 の結合分子 108 が存在しない。このため、第 2 の結合分子 108 における第 2 の酵素部 107 は、過酸化水素を利用する

ことができず、ルミノール等の第3の基質110を用いたペルオキシダーゼ反応が殆ど進行することはない。したがって、反応系に標的物質100が存在しない場合には、ルミノール等の光学的に検出可能な物質のルミノール反応により生じる化学発光は観察されない。

[0034] また、当該反応系に第3の酵素111が存在する場合には、第1の酵素部103の酵素反応で生じた過酸化水素を第3の酵素111により消費することができる。この場合には、第2の結合分子108における第2の酵素部107による酵素反応に必要な過酸化水素を消費することができるため、反応系に過酸化水素が生成されても、第2の酵素部107によるルミノール反応の進行をより確実に阻害することができる。このように、本システムでは、反応系に第3の酵素111を加えることで、偽陽性の発生を抑えることができる。偽陽性を抑制するための第3の酵素111の添加量は適宜、決定し得る。例えば、陰性対照を用いて測定を行い、測定系がこれを陽性と出力した場合には、第3の酵素111を添加してもよく、例えば測定系の出力が陰性となるまで第3の酵素111を添加し得る。

[0035] さらに、上述した本システムを用いた標的物質100の検出方法では、少なくとも第1の基質105を含む第1の試薬と、少なくとも第1の結合分子104を含む第2の試薬とを分けて用いることができる。なお、第1の基質105及び第1の結合分子104以外の成分（例えば、第2の結合分子108等）は、第1の試薬及び第2の試薬の何れに含まれていても良いし、両方に含まれていても良い。第1の試薬と第2の試薬とに分けることで、試薬の保管時において、第1の結合分子104における第1の酵素部103による第1の基質105を用いたオキシダーゼ反応の進行を抑えることができる。そして、第1の試薬と第2の試薬とを混合したときに、第1の酵素部103による第1の基質105を用いたオキシダーゼ反応を進行させることができ、上述したように、標的物質100を検出することができる。

[0036] [標的物質の検出スキーム2]

上述した標的物質を高精度に検出するシステムの他の例の概略を図2に示

す。なお、図2に示す例は、図1に示したシステムと同様に、標的物質100として新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）を検出するスキームである。図2に示すシステムにおいて、図1に示したシステムと同じ構成については同じ符号を付すことによって、本項においては、その詳細な説明を割愛する。

[0037] 本システムでは、図2に示すように、第1の特異的結合部102と、第1の特異的結合部102に直接又は間接的に結合した第1の酵素部203とを有する第1の結合分子204を利用する。ここで、第1の酵素部203は、所定の物質或いは物質群を基質（第1の基質205）として酵素反応を触媒し、ATPを産生するキナーゼ活性を有している。ATPを産生するキナーゼ活性を有する酵素としては、AMPを基質の一部としてATPを産生するキナーゼ及びADPを基質の一部としてATPを産生するキナーゼのいずれを使用してもよい。

[0038] AMPを基質の一部とし、ATPを産生するキナーゼ活性を有する酵素としては、一例として、ピルベートオルトホスフェートジキナーゼ及びピルベートウォータージキナーゼ等を挙げることができる。ピルベートオルトホスフェートジキナーゼの酵素反応では、AMP、ホスホエノールピルビン酸及びピロリン酸が基質として利用され、ATP、ピルビン酸及び2分子のリン酸が生成される。すなわち、本例では、第1の結合分子204は、第1の酵素部203において第1の基質205としてAMPを利用し、ATPを反応系に生成する。

[0039] 一方、ADPを基質の一部とし、ATPを産生するキナーゼ活性を有する酵素としては、一例として、ピルベートキナーゼ、アセテートキナーゼ、クレアチンキナーゼ、ポリリン酸キナーゼ及びヘキソキナーゼ等を挙げることができる。ピルベートキナーゼの酵素反応では、ADP及びホスホエノールピルビン酸が基質として利用され、ATP、ピルビン酸及びピロリン酸が生成される。すなわち、本例では、第1の結合分子204は、第1の酵素部203において第1の基質205としてADPを利用し、ATPを反応系に生成する。

[0040] 特に、第1の酵素部203としては、AMPを基質とし、ATPを産生するキナーゼ活性を有する酵素を使用することが好ましい。ADPを基質とし、ATPを産生するキナーゼ活性を有する酵素を使用する場合、基質となるADPからATPが

非酵素的に産生されることから、標的物質１００を含まない場合であっても、非酵素的に産生したATPによりルシフェラーゼ発光が観察される場合もある。このように、ADPを基質とし、ATPを産生するキナーゼ活性を有する酵素を使用する場合、標的物質１００の検出感度が悪くなり、偽陽性を引き起こす可能性が考えられる。

[0041] また、標的物質を含みうる試料には、アデニル酸キナーゼ（ミオキナーゼ）が含まれることがある。アデニル酸キナーゼはADPを基質として利用しATPを産生する安定的な酵素である。標的物質１００を含まない場合であっても、アデニル酸キナーゼが産生したATPによりルシフェラーゼ発光が観察される場合もある。この場合も標的物質１００の検出感度を悪化させ、偽陽性を引き起こす可能性が高くなる。

[0042] これに対して、AMPを基質とし、ATPを産生するキナーゼ活性を有する酵素を使用する場合、基質となるAMPはルシフェラーゼ反応の生成物でもあるため、ルシフェラーゼのバックグラウンド発光が抑えられる結果、高感度に標的物質１００を検出することができ、偽陽性の発生を抑えることができる。また、試料にアデニル酸キナーゼ（ミオキナーゼ）が含まれる場合であっても、AMPはアデニル酸キナーゼの基質ではないため、上述したような検出感度の低下、偽陽性の誘発を回避することができる。

[0043] また、本システムでは、図２に示すように、第２の特異的結合部１０６と、第２の特異的結合部１０６に直接又は間接的に結合した第２の酵素部２０７とを有する第２の結合分子２０８を利用する。ここで、第２の酵素部２０７は、第１の酵素部２０３における酵素反応で生成したATP（第２の基質２０９）とD-ルシフェリン（第３の基質２１０）を基質として利用する、ルシフェラーゼ活性を有する酵素である。第２の酵素部２０７は、ルシフェラーゼ活性を有する酵素であれば良く、例えば、ホタルルシフェラーゼ等の甲虫類由来ルシフェラーゼ或いはATPを基質とし発光する酵素を適宜使用することができる。

[0044] さらに、図２に示すように、本システムには、第１の酵素部２０３によるA

TPを産生するキナーゼ酵素反応により生じるATPを基質として消費する第3の酵素211が含まれていても良い。第3の酵素211は、ATPを基質として消費する酵素であって、例えば、アピラーゼを使用することができる。

[0045] 以上のように構成された本システムでは、第1の結合分子204、第2の結合分子208、第1の基質205、第3の基質210が存在する反応系において、標的物質100を検出することができる。具体的には、当該反応系に標的物質100が存在すると、第1の特異的結合部102を介して第1の結合分子204が標的物質100に結合するとともに、第2の特異的結合部106を介して第2の結合分子208が標的物質100に結合する。すなわち、標的物質100が反応系に存在すると、第1の結合分子204と第2の結合分子208とが近接した状態を形成する。

[0046] この状態で第1の酵素部203により第1の基質205に含まれるAMPを利用したキナーゼ反応が進行し、ATPが発生する。第2の酵素部207は、第1の酵素部203と近接した位置にあるため、当該第1の酵素部203の酵素反応で発生したATPを基質（第2の基質209）として、反応系に存在するD-ルシフェリン等の第3の基質210とともに酵素反応に利用することができる。すなわち、第1の結合分子204と第2の結合分子208とが標的物質100を介して近接した状態では、第2の酵素部207によるルシフェラーゼ反応が進行することとなる。

[0047] したがって、本システムによれば、第2の酵素部207による第3の基質210を用いたルシフェラーゼ反応を測定することで、標的物質100を検出することができる。例えば第3の基質210としてD-ルシフェリン等の光学的に検出可能な物質を使用した場合、いわゆるルシフェラーゼ反応により生じる発光を測定することで標的物質100を検出することができる。なお、発光を測定する手段は、特に限定されないが、目視により測定しても良いし、発光を検出できる検出装置を使用しても良い。

[0048] 特に、本システムでは、タンパク質が表面に存在する、ウイルスや微生物等を標的物質100としている。このため、本システムでは、第1の結合分

子204と第2の結合分子208とが近接した状態を安定的に密に形成することができ、目視や検出装置によって上記発光を検出することができる。例えば、光電子増倍管を備える高感度光学検出装置を使用することもできるが、これと比較して安価であるが、光電子増倍管を有しない、フォトダイオードを光学検出素子として備える検出装置を使用しても上記化学発光を検出することができる。このような、光電子増倍管を有しない、フォトダイオードを光学検出素子として備える検出装置を使用することで、標的物質100を簡便且つ低コストに検出することができる。

[0049] 一方、第1の結合分子204、第2の結合分子208、第1の基質205、第3の基質210が存在する反応系において、標的物質100が存在しない場合には、第1の結合分子204における第1の酵素部203により第1の基質205に含まれるAMPを利用したキナーゼ反応が進行し、ATPが発生するものの、近接した位置に第2の結合分子208が存在しない。このため、第2の結合分子208における第2の酵素部207は、ATPを利用することができず、D-ルシフェリン等の第3の基質210を用いたルシフェラーゼ反応が殆ど進行することはない。したがって、反応系に標的物質100が存在しない場合には、ルシフェラーゼ反応により生じる発光は観察されない。

[0050] また、当該反応系に第3の酵素211が存在する場合には、第1の酵素部203の酵素反応で生じたATPを第3の酵素211により消費することができる。この場合には、第2の結合分子208における第2の酵素部207による酵素反応に必要なATPを消費することができるため、標的物質100に結合していない第2の酵素部207によりATPが生成されたり、標的物質100に結合した第2の酵素部207により生成されたATPが拡散により反応系に増加したり、試料に由来するATPが反応系に持ち込まれたりしても、第2の酵素部207によるルシフェラーゼ反応の進行をより確実に阻害することができる。このように、本システムでは、反応系に第3の酵素211を加えることで、偽陽性の発生を抑えることができる。偽陽性を抑制するための第3の酵素211の添加量は適宜、決定し得る。例えば、陰性対照を用いて測定を行い

、測定系がこれを陽性と出力した場合には、第3の酵素211を添加してもよく、例えば測定系の出力が陰性となるまで第3の酵素211を添加し得る。

[0051] さらに、上述した本システムを用いた標的物質100の検出方法では、少なくとも第1の基質205を構成する一部の物質又は全部の物質を含む第1の試薬と、少なくとも第1の結合分子204を含む第2の試薬とを分けて用いることができる。なお、第1の基質205及び第1の結合分子204以外の成分（例えば、第2の結合分子208等）は、第1の試薬及び第2の試薬の何れに含まれていても良いし、両方に含まれていても良い。また、第1の試薬が第1の基質205を構成する一部の物質を含む場合、第1の基質205を構成する残りの物質は第2の試薬に含まれていれば良い。第1の試薬と第2の試薬とに分けることで、試薬の保管時において、第1の結合分子204における第1の酵素部203による第1の基質205を用いたキナーゼ反応の進行を抑えることができる。そして、第1の試薬と第2の試薬とを混合したときに、第1の酵素部203による第1の基質205を用いたキナーゼ反応を進行させることができ、上述したように、標的物質100を検出することができる。

[0052] [標的物質の検出場面]

以上で説明した本システムは、特に限定されず、標的物質100を検出する様々な場面に適用することができる。標的物質100をウイルスとした場合、一例としては、ウイルスの付着が疑われる場所に上記第1の試薬及び第2の試薬を噴霧して上述した反応系を構築する。上述したルミノール反応やルシフェラーゼ反応に起因する発光を上述したような検出装置を使用して測定し、測定結果に基づいて当該場所に標的物質100が付着しているかを判断することができる。

[0053] また、本システムは、標的物質100であるウイルスが空気中に含まれているか検出する装置に適用することができる。このような装置としては、空気清浄機、エアコン、ハンディタイプの簡易型空気捕集機、建物や部屋の出

入り口に設置する空気捕集装置、病院等に設置した呼気や咳などの捕集装置等を挙げることができる。これら装置では、空気をフィルターに通過させる点が共通しており、本システムを適用することでフィルターに付着したウイルスを検出することができる。この場合、フィルターに対して上記第1の試薬及び第2の試薬を噴霧して上述した反応系を構築しても良いし、フィルターで捕集した微細粒子や埃に上記第1の試薬及び第2の試薬を噴霧して上述した反応系を構築しても良い。また、これら装置においてフィルターをディスプレイとすることで、標的物質100であるウイルスの逐次検出が可能となる。

[0054] さらに、本システムは、標的物質100であるウイルスが液体中に含まれているかを検出する装置に適用することができる。このような装置としては、発熱症状等を訴える患者から採取した唾液やその他体液を捕集する装置、医療従事者が着用した衣類やマスク等を浸漬した液体を捕集する装置、ウイルス付着が疑われる表面を綿棒等のサンプリング器具でふき取り、ふき取ったウイルスを液体に捕集する装置などを挙げることができる。このような装置は、標的物質100であるウイルスを含みうる液体を回収する。回収した液体に上記第1の試薬及び第2の試薬を添加して上述した反応系を構築することができる。このように液体に含まれる標的物質100を検出する際には、試薬類の添加のみでBound/Free分離を行う必要のないホモジニアス検出系とすることができる。特に、液体における発光は、上述したような検出装置により簡易に検出することができる。よって、例えばマイクロ流路デバイスと組み合わせて、簡易且つ高性能なウイルス検査装置を作製することができる。

実施例

[0055] 以下、実施例を用いて本発明を更に詳細に説明するが、本発明の技術的範囲は以下の実施例に限定されるものではない。

[0056] [実施例1：使用するHRP融合抗体の濃度検討]

本実施例では、ルミノール発光強度に関して、HRP融合抗SARS-CoV-2抗体(A

bcam;ab273169)の至適濃度範囲を検討した。具体的には、先ず、96穴プレートに終濃度0.42、1.1、2.1、4.2、11ng/mLになるようにHRP融合抗SARS-CoV-2抗体(Abcam;ab273169)、終濃度0.1mMになるように過酸化水素(富士フイルム和光純薬株式会社)をそれぞれ5 μ Lずつ、及び10mM KClを含む10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.0)を10 μ L混合し、その後、直ちに、ルミノールを含むBM Chemiluminescence ELISA Substrate Solution A(Roche)を80 μ L添加してプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific社製、製品名: Varioskan Flash)にて化学発光強度を測定した。

[0057] 結果を図3に示した。図3に示したように、HRP融合抗SARS-CoV-2抗体の濃度依存的な化学発光強度の増加が認められた。

[0058] [実施例2：光学的検出装置による標的物質(不活化SARS-CoV-2)の検出]

本実施例では、標的物質として市販の不活性化SARS-CoV-2を用い、不活性化SARS-CoV-2の検出スキームを構築した。

[0059] 先ず、本実施例では、大腸菌BL21(DE3)株を用いた組換え生産により、SpyCatcher融合グルコース酸化酵素と、SpyTag融合抗SARS-CoV-2 Sタンパク抗体を調製した。具体的には、SpyTagをC末端に融合した抗SARS-CoV-2 Sタンパク質抗体scFvと、SpyCatcherをN末端に融合したG0x(SpyCatcher-G0xと称す)を調製した。SpyCatcher-G0xのアミノ酸配列を配列番号1に示し、SpyTag融合抗SARS-CoV-2 Sタンパク質scFvのアミノ酸配列を配列番号2に示した。これらを量論的に混合し、4 $^{\circ}$ Cで一晩静置することで抗体酵素複合体を調製した。

[0060] そして、96穴プレートに、終濃度50nMの抗体酵素複合体、終濃度1.1ng/mLのHRP融合抗SARS-CoV-2抗体(Abcam;ab273169)、終濃度500、250、125、50、25、0dC/mLの不活化SARS-CoV-2ウイルス(Sino Bio)、及び10mM KClを含む10mMリン酸ナトリウムバッファー(pH 7.0)をそれぞれ5 μ Lずつ混合し、室温で1時間静置した。その後、終濃度200mMのグルコース及び終濃度24ng/mLのカタラーゼを含むBM Chemiluminescence ELISA Substrate Solution A(Roche)を80 μ L添加してプレートリーダー(Thermo Fisher Scientific社製、製品名: Va

rioskan Flash) にて化学発光強度を測定した。また、続く実験では、終濃度 2.1ng/mL の HRP 融合抗 SARS-CoV-2 抗体を使用し、他は上記同様に検出を行った。

[0061] 終濃度 1.1ng/mL の HRP 融合抗 SARS-CoV-2 抗体を用いたときの結果を図 4 に示し、終濃度 2.1ng/mL の HRP 融合抗 SARS-CoV-2 抗体を用いたときの結果を図 5 に示した。図 4 及び 5 から判るように、いずれの HRP 融合抗 SARS-CoV-2 抗体濃度を用いた場合でも、不活化 SARS-CoV-2 濃度依存的な化学発光強度の増加が認められた。また、直線範囲は不活化 SARS-CoV-2 濃度が 25~125dC/mL と算出され、バックグラウンドの標準偏差の 3 倍の値を示す不活化 SARS-CoV-2 濃度として検出下限 (Limit of detection: LOD) を算出した結果、3.3dC/mL と高感度検出が達成されたことが示された。

[0062] [実施例 3 : フォトダイオードルミノメーターによる標的物質 (不活化 SARS-CoV-2) の検出]

本実施例では、実施例 2 に倣い、標的物質として市販の不活性化 SARS-CoV-2 を用い、不活性化 SARS-CoV-2 の検出スキームを構築し、光電子倍增管を有しない、フォトダイオードを光学検出素子として備えた検出装置によって化学発光強度を測定した。

[0063] 本実施例における抗体酵素複合体の調製は実施例 2 と同様である。タンパク質低吸着マイクロチューブに、終濃度 50nM の抗体酵素複合体、終濃度 2.1ng/mL の HRP 融合抗 SARS-CoV-2 抗体 (Abcam; ab273169)、終濃度 500、250、125、50、25、0dC/mL の不活化 SARS-CoV-2 ウイルス (Sino Bio) または終濃度 500 particles/mL の不活化インフルエンザウイルス (Hytest) 又は終濃度 500ng/mL の牛血清アルブミン (BSA)、及び 10mM KCl を含む 10mM リン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) をそれぞれ 5 μ L ずつ混合し、室温で 1 時間静置した。その後、検出装置測定用チューブに全量移し、終濃度 200mM のグルコース及び終濃度 24ng/mL のカタラーゼを含む BM Chemiluminescence ELISA Substrate Solution A (Roche) を 80 μ L 添加して、光電子倍增管を有しない、フォトダイオードを光学検出素子として備えた検出装置 (キッコーマンバイオケミファ社製、製品名 :

ルミテスター Smart) によって化学発光強度を測定した。

[0064] 化学発光強度の測定結果を図6に示した。図6から判るように、同量の不活化インフルエンザウイルス又はBSAにおいては、バックグラウンドと同程度の化学発光しか確認されなかったのに対し、不活化SARS-CoV-2では濃度依存的な化学発光強度の増加が認められた。また、直線範囲は不活化SARS-CoV-2濃度が25~125dC/mLと算出され、光電子倍增管を有しない、フォトダイオードを光学検出素子として備えた検出装置を使用した場合でも検出が達成されたことが示された。

[0065] [実施例4：ルシフェラーゼ-抗SARS-CoV-2抗体複合体の調製]

本実施例では、ビオチン化ルシフェラーゼ（キッコーマンバイオケミファ；BLU-Y、60408）と、市販のストレプトアビジン（東京化成；S0951）、ビオチン化抗SARS-CoV-2抗体（Abcam；ab273638）を用いた。0.25mg/mLのビオチン化ルシフェラーゼ4μLと、0.25mg/mLの市販ストレプトアビジン8μLを混合し、室温で15分間放置した。その後、0.25mg/mLのビオチン化抗SARS-CoV-2抗体を8μL添加し、室温でさらに15分間放置した。この反応液を、「ルシフェラーゼ-抗SARS-CoV-2抗体複合体溶液」とした。

[0066] [実施例5：ピルベートオルトホスフェートジキナーゼ-抗SARS-CoV-2抗体複合体の調製]

本実施例では、ピルベートオルトホスフェートジキナーゼ（キッコーマンバイオケミファ；PPDK-E、61313）と、PBSタブレット（タカラバイオ；T9181）、N-エチルマレイミド（富士フィルム和光純薬；058-02061）、N-（6-マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミド（東京化成；S0428）、TCEP塩酸塩（富士フィルム和光純薬；209-19861）、抗SARS-CoV-2抗体（Abcam；ab272854）を用いた。2.5mg/mLピルビン酸リン酸ジキナーゼ8μLに、5mMのN-エチルマレイミド5μL、PBS7μLを混合し、1時間室温で放置した。反応液20μLを透析カップ（ThermoFisher

； 69550）に添加、4℃で2時間放置し、未反応のN-エチルマレイミドを除去した。透析後、回収した反応液8μLに、10mM N-（6-マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミド 1μLと、PBS 1μLを添加、室温、遮光下で1時間放置した。反応液10μLを透析カップに添加、4℃で2時間放置し、未反応の N-（6-マレイミドカプロイルオキシ）スクシンイミドを除去した。透析後回収した反応液を「架橋剤修飾ピルビン酸リン酸ジキナーゼ」とした。続いて、1mg/mLの抗SARS-CoV-2抗体 2μLに、10mM TCEP 1μL、100mM リン酸カリウムバッファー pH6.0 17μLを添加、37℃で1.5時間放置し、還元処理を行った。この還元処理抗体10μLに、先ほどの「架橋剤修飾ピルベートオルトホスフェートジキナーゼ」を2μL、10mM EDTA含有100mM リン酸カリウムバッファー pH6.0を3μL添加、4℃で終夜放置した。この反応液を「ピルビン酸リン酸ジキナーゼ-抗SARS-CoV-2抗体複合体溶液」とした。

[0067] 〔実施例6：ピルベートオルトホスフェートジキナーゼ／ルシフェラーゼを用いた標的物質（不活化SARS-CoV-2）の検出〕

本実施例では、不活化SARS-CoV-2（ATCC；VR-1986 HK（商標））、D-Luciferin（BIOSYNTH；L-8200）、AMP-Na（富士フィルム和光純薬；306-50741）を用いた。1/100量のルシフェラーゼ-抗SARS-CoV-2抗体複合体溶液、および、1/200量のピルベートオルトホスフェートジキナーゼ-抗SARS-CoV-2抗体複合体溶液を含むTricine緩衝液（25mM Tricine、1mM EDTA、12mM 酢酸マグネシウム、0.1%BSA、pH7.9）を酵素液とし、840μM D-Luciferin、1μM AMPを含むTricine緩衝液を基質液とし、50dC/50μLの不活化SARS-CoV-2を含むTricine緩衝液をウイルス液とし、100μLの酵素液、100μLの基質液、50μLのウイルス液を測定用チューブに加え、混合し、360秒後の化学発光強度をルミノ

メーター（キッコーマンバイオケミファ；ルミテスター C-110）にて測定した。

[0068] ウイルスを添加しないコントロールと、ウイルスを添加した場合の発光強度の比較を図7に示す。ウイルスを含まないコントロールと比較し、ウイルスを添加した反応液において化学発光強度の増加が認められた。この結果から、ピルベートオルトホスフェートジキナーゼ／ルシフェラーゼを用いた系でウイルスが検出できることが示された。また、ほかのウイルスについても、表面に標的タンパク質が集積していることから、同様に検出できることが理解される。

[0069] [実施例7：光学的検出装置による標的物質（大腸菌）の検出]

先ず、本実施例ではGlucose Oxidase Conjugation Kit(Abcam；ab102887)及び抗大腸菌抗体（Abcam；ab217910）を用いて、グルコース酸化酵素（G0x）融合抗大腸菌抗体複合体を作製した。

[0070] 大腸菌懸濁液は、DH5 α Competent cell（コスモバイオ；DH01-20）を用い、培養したものを分光光度計（GE Healthcare社製、製品名：GeneQuant 1300）を用いて、OD₆₀₀を測定した後、 $10D_{600}=8.0\times 10^8\text{cells/mL}$ とし、濃度（cells/mL）を算出した。

[0071] そして、96穴プレート（LBS OptiPlate-96、PerkinElmer；6065420）に終濃度2.0 ng/mLのG0x-抗大腸菌抗体複合体、終濃度2.0 ng/mLのHRP-抗OmpC抗体（CUSABIO；CSB-PA356994LB01ENV）、PBS、及び大腸菌懸濁液をPBSにて $1.0\times 10^5\text{cells/mL}$ になるように希釈した大腸菌溶液を、それぞれ5 μL ずつ添加し、25 $^{\circ}\text{C}$ にて1時間静置した（大腸菌を含む）。比較として、大腸菌溶液の代わりにPBSを添加したものも同様に静置した（大腸菌を含まない）。静置後、さらに終濃度200mMのグルコース及び終濃度24 ng/mLのカタラーゼを含むBM chemiluminescence ELISA substrate (POD) (Roche；11582950001) solution Aを80 μL 添加し、プレートリーダー（Thermo Fisher Scientific社製、製品名：Varioskan Flash）にて化学発光強度を測定した。

[0072] 大腸菌を含む溶液、及び、含まない溶液を加えた反応液を測定した結果を

図8に示した。図8に示したように、大腸菌を含む溶液を加えた反応液において化学発光強度の増加が認められた。また、ほかの微生物についても、表面に標的タンパク質が集積していることから、同様に検出できることが理解される。

[0073] [比較例：光学的検出装置による標的物質（SARS-CoV-2三量体スパイクタンパク質及び受容体結合ドメイン(RBD)）の検出]

96穴プレート（LBS OptiPlate-96、PerkinElmer；6065420）に、終濃度50 nMの抗体酵素複合体、終濃度2.1 ng/mLのHRP融合抗SARS-CoV-2抗体、10 mM KClを含む10 mMリン酸ナトリウムバッファー（pH 7.0）および終濃度100、50、25、0 nMのSARS-CoV-2三量体スパイクタンパク質（BioServ）、または終濃度300、150、75、0 nMのSARS-CoV-2受容体結合ドメイン（RBD）（Sino Biological）をそれぞれ5 μ Lずつ添加、混合し、25°Cで1時間静置した。その後、終濃度200 mMのグルコース、終濃度24 ng/mLのカタラーゼ（富士フイルム和光純薬）を含むBM Chemiluminescence ELISA Substrate Solution A（Roche）を80 μ L添加してプレートリーダー（Thermo Fisher Scientific社製、製品名：Varioskan Flash）にて化学発光強度を測定した。

[0074] SARS-CoV-2三量体スパイクタンパク質の結果を図9に、SARS-CoV-2受容体結合ドメインの結果を図10に示した。図9、及び、図10で示したように、それぞれのタンパク質を含む場合に得られる化学発光強度は、それぞれのタンパク質を含まない場合に得られる化学発光強度とほぼ同程度であり、実施例2のような濃度依存的な化学発光強度の増加が認められなかった。この結果から、本検出系はそれぞれの標的タンパク質が分散されている状態では発光量の増加は見られないことを示しており、微生物やウイルスなどの表面に標的タンパク質が集積し、それぞれの酵素が近接する必要があることが示している。

[0075] [配列情報]

本開示は以下の配列情報を包含する。

配列番号1：

MHHHHHGGAMVDTLSGLSSEQGQSGDMTIEEDSATHIKFSKRDEDGKELAGATMELRDSSGKTISTWIS
DGQVKDFYLYPGKYTFVETAAPDGYEVATAITFTVNEQGQVTVNGKATKGAHIGSGMNGIEASLLTDP
KDVSGRTVDYIIAGGGTLGLTTAARLTENPNISVLVIESGSYESDRGPIEDLNAYGDIFGSSVDHAYE
TVELATNNQTALIRSGNGLGGSTLVNGGTWTRPHKAQVDSWETVFGNEGWNWDNVAAYSLQAERARAPN
AKQIAAGHYFNASCHGVNGTVHAGPRDTGDDYSPIVKALMSAVEDRGVPTKKDFGCGDPHGVSMPNTL
HEDQVRSDAAREWLLPNYQRPNLQVLTGQYVGKVLSSQNGTTPRAVGVEFGTHKGNTNHNVYAKHEVLLA
AGSAVSPTILEYSGIGMKSILEPLGIDTVVDLPVGLNLQDQTTATVRSRITSAGAGQGQAAWFATFNET
FGDYSEKAHELLNTKLEQWAEAVARGGFHNTTALLIQYENYRDWIVNHNVAyselFLDTAGVASFDVW
DLLPFTRGYVHILDKDPYLHHFAYDPQYFLNELDLLGQAAATQLARNISNSGAMQTYFAGETIPGDNLA
YDADLSAWTEYIPYHFRPNYHGVGTCSMMPKEMGGVVDNAARVYGVQGLRVIDGSIPPTQMSSHVMTVF
YAMALKISDAILEDYASMQ

配列番号 2 :

MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSNYMSWVRQAPGKGLEW
VSVIYSGGSTFYADSVKGRFTISRDNMNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCARVLPYMGDYLDYWGQGTLT
VSSGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISRYLNWYQQKPKGAPKLLIYAA
SSLQSGVPSRFSGSGGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPPEYTFGGGTKLEIKRAAAGSGAHIV
MVDAYKPTKAEQKLISEEDLNLGGGMRGSHHHHHH

[0076] 本明細書で引用した全ての刊行物、特許及び特許出願はそのまま引用により本明細書に組み入れられるものとする。

請求の範囲

- [請求項1] タンパク質が表面に存在する標的物質に対して特異的に結合するポリペプチドからなる第1の特異的結合部と、当該第1の特異的結合部に直接又は間接的に結合した第1の酵素部とを有する第1の結合分子と、
- 上記第1の結合分子における第1の酵素部の基質となる第1の基質と、
- 上記標的物質に特異的に結合するポリペプチドからなる第2の特異的結合部と、当該第2の特異的結合部に直接又は間接的に結合し、上記第1の酵素部における酵素反応で上記第1の基質から生成した物質を第2の基質とする第2の酵素部とを有する第2の結合分子と、
- 上記第2の結合分子における第2の酵素部が、上記第2の基質とともに酵素反応の基質とする第3の基質と
- を含む、標的物質の検出キット。
- [請求項2] 上記第2の結合分子における上記第2の酵素部における酵素反応を光学的に検出する検出装置に使用されることを特徴とする請求項1記載の標的物質の検出キット。
- [請求項3] 上記検出装置は、光電子増倍管を有さず、フォトダイオードを光学検出素子として備えることを特徴とする請求項2記載の標的物質の検出キット。
- [請求項4] 上記第2の基質を基質として消費する第3の酵素を更に含むことを特徴とする請求項1記載の標的物質の検出キット。
- [請求項5] 上記第1の結合分子における第1の酵素部はオキシダーゼ活性を有し、上記第2の結合分子における第2の酵素部はペルオキシダーゼ活性を有し、上記第3の基質がオルトフェニレンジアミン又はルミノールであることを特徴とする請求項1記載の標的物質の検出キット。
- [請求項6] 上記第1の結合分子における第1の酵素部はATPを産生するキナーゼ活性を有し、上記第2の結合分子における第2の酵素部はルシフェ

ラーゼ活性を有し、上記第3の基質がルシフェリンであることを特徴とする請求項1記載の標的物質の検出キット。

[請求項7] 上記標的物質はウイルス又は微生物であることを特徴とする請求項1記載の標的物質の検出キット。

[請求項8] 請求項1乃至7いずれか一項記載の検出キットと、タンパク質が表面に存在する標的物質を含みうる試料とを混合する工程と、

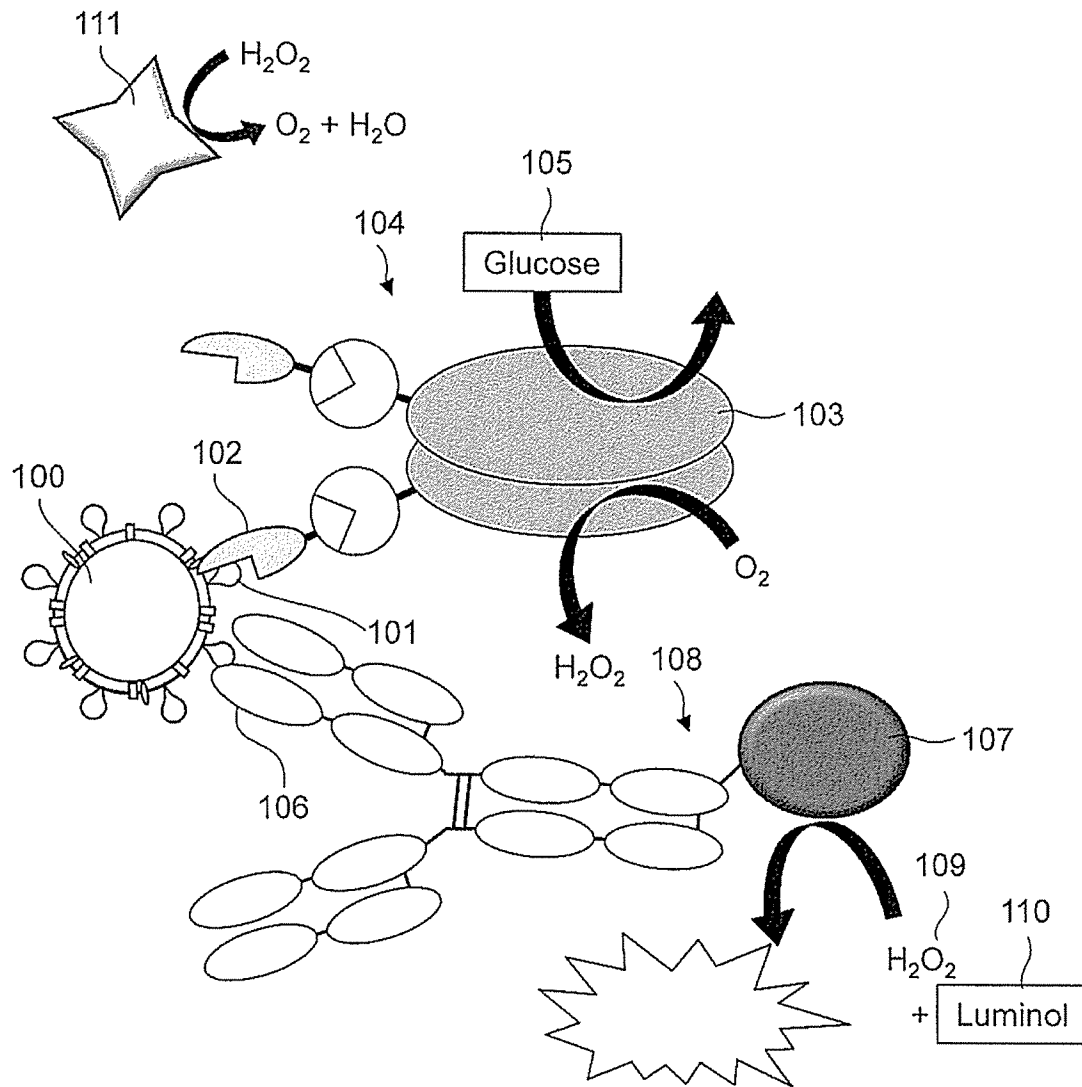
 上記検出キットに含まれる第2の結合分子における第2の酵素部による酵素反応を測定する工程とを含み、

 上記第2の酵素の酵素反応に基づいて上記試料中の標的物質を検出することを特徴とする標的物質の検出方法。

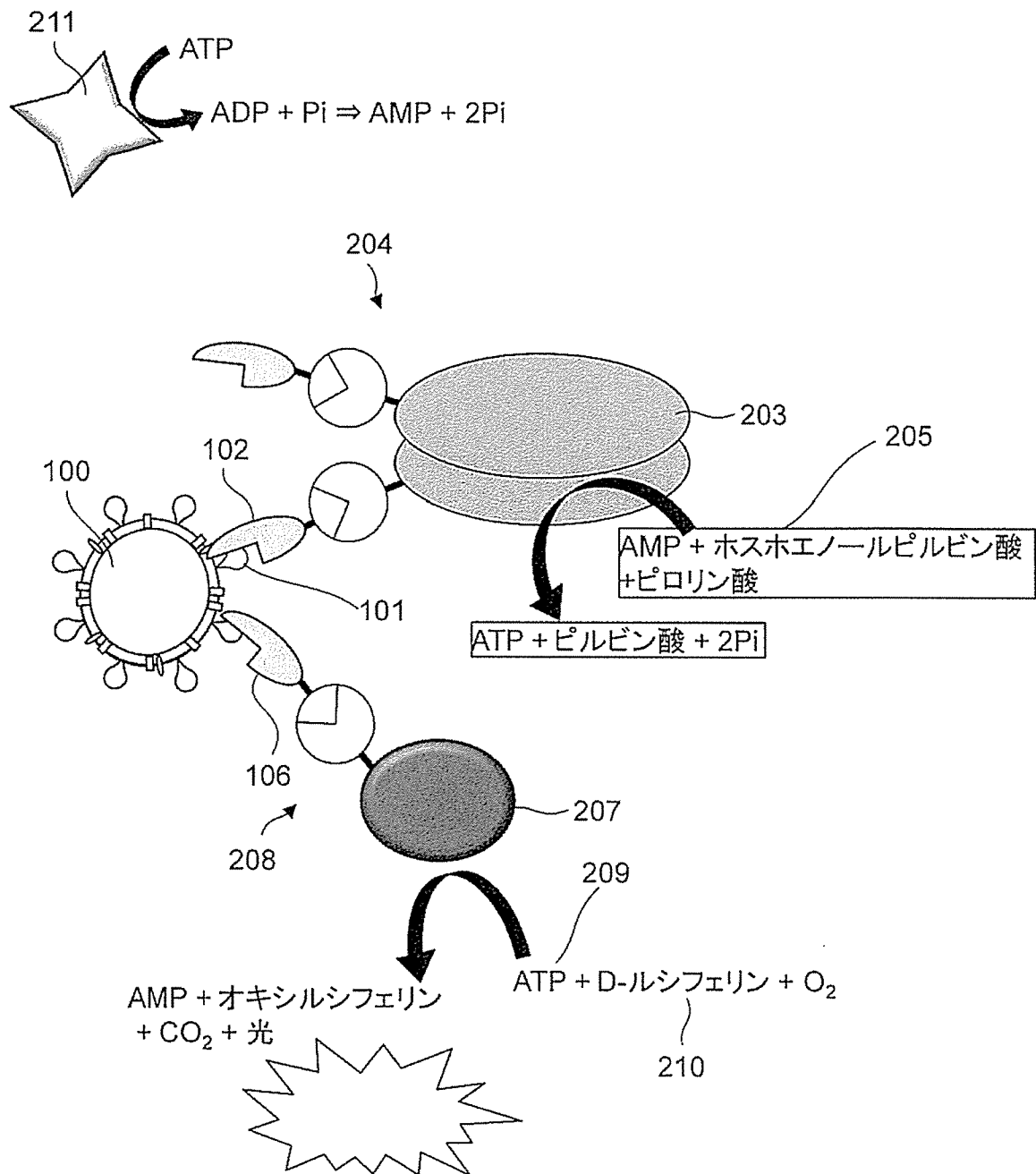
[請求項9] 検出装置によって、上記第2の結合分子における上記第2の酵素部における酵素反応を光学的に検出することを特徴とする請求項8記載の標的物質の検出方法。

[請求項10] 上記検出装置は、光電子増倍管を有さず、フォトダイオードを光学検出素子として備えることを特徴とする請求項9記載の標的物質の検出方法。

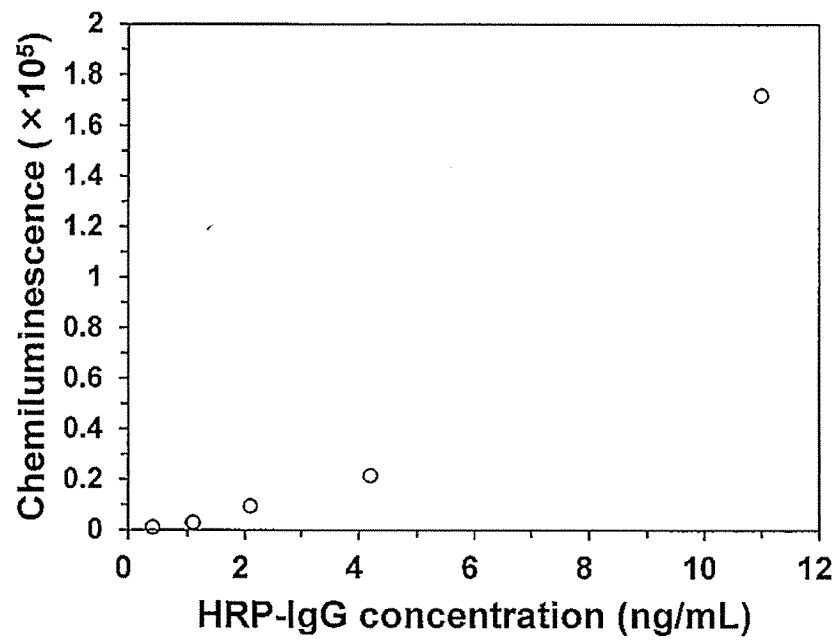
[図1]



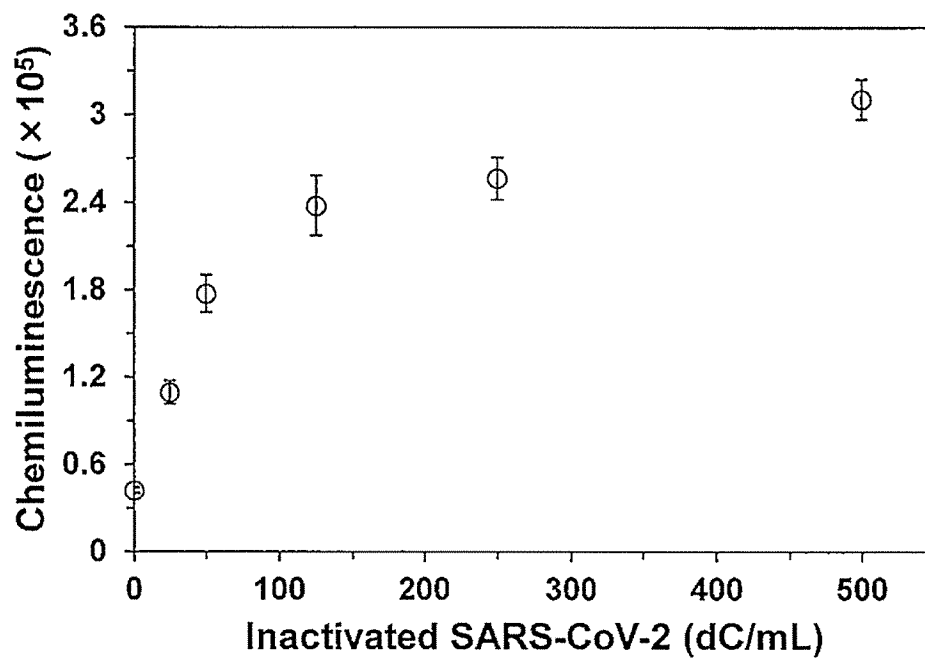
[図2]



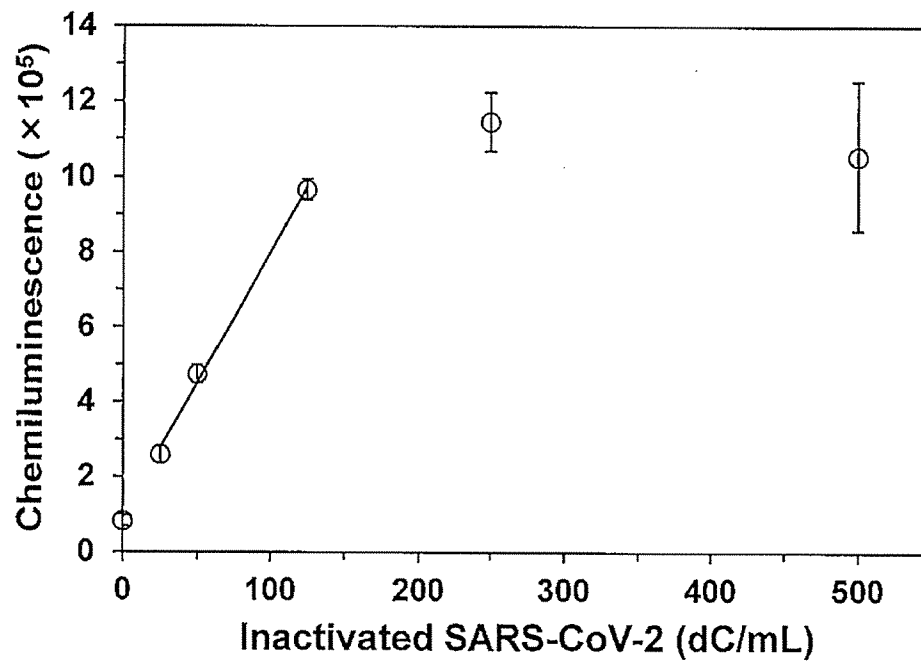
[図3]



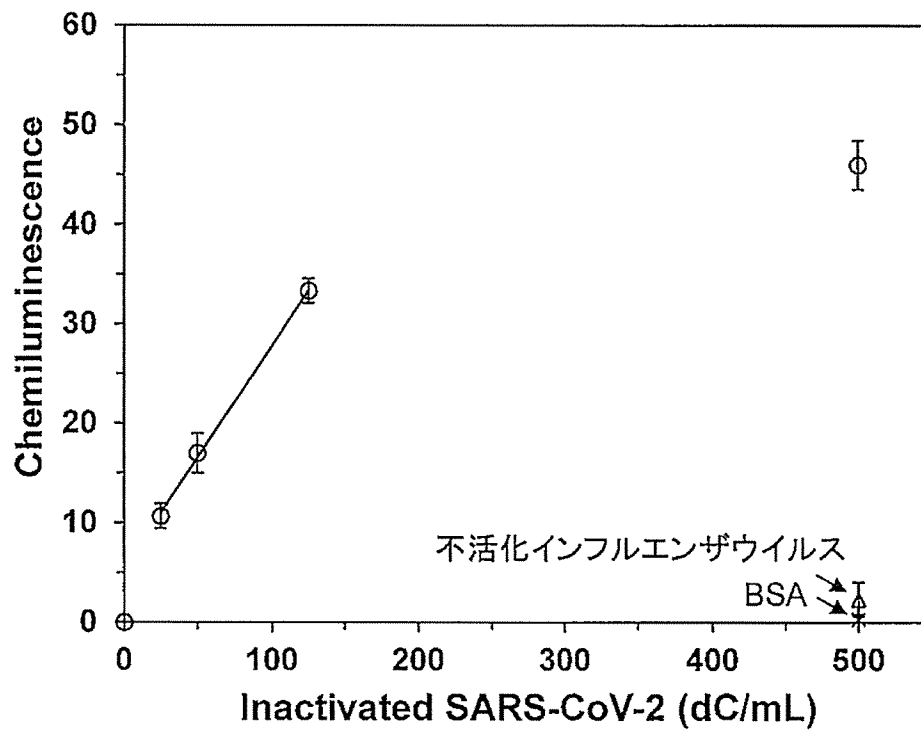
[図4]



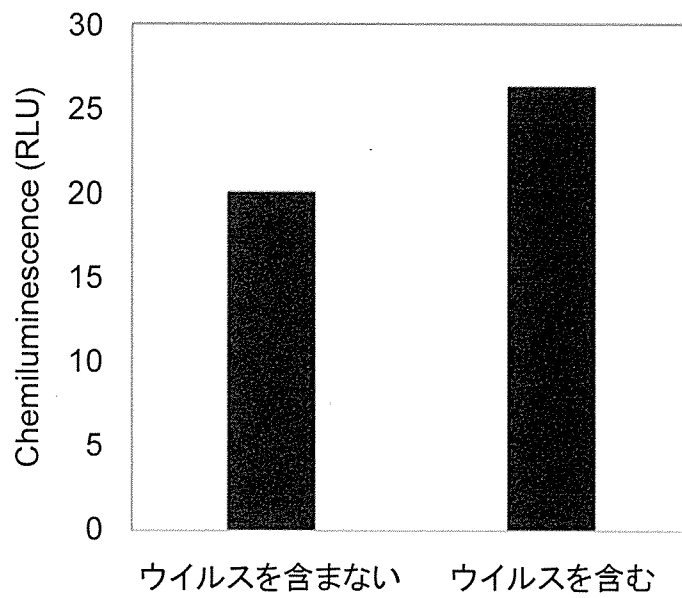
[図5]



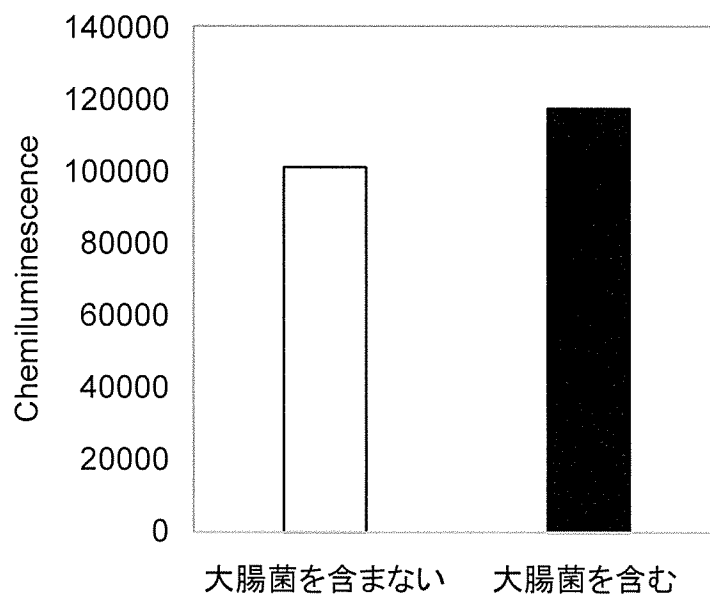
[図6]



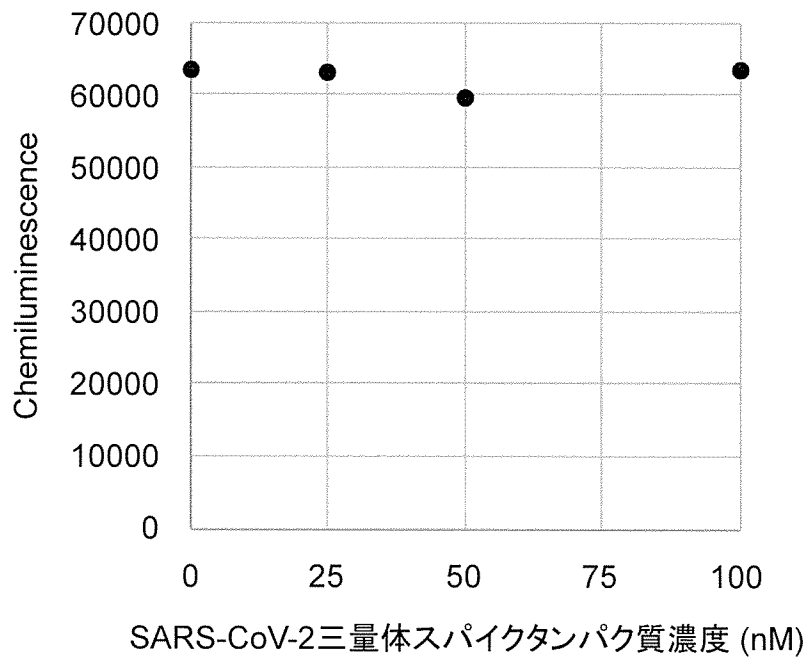
[図7]



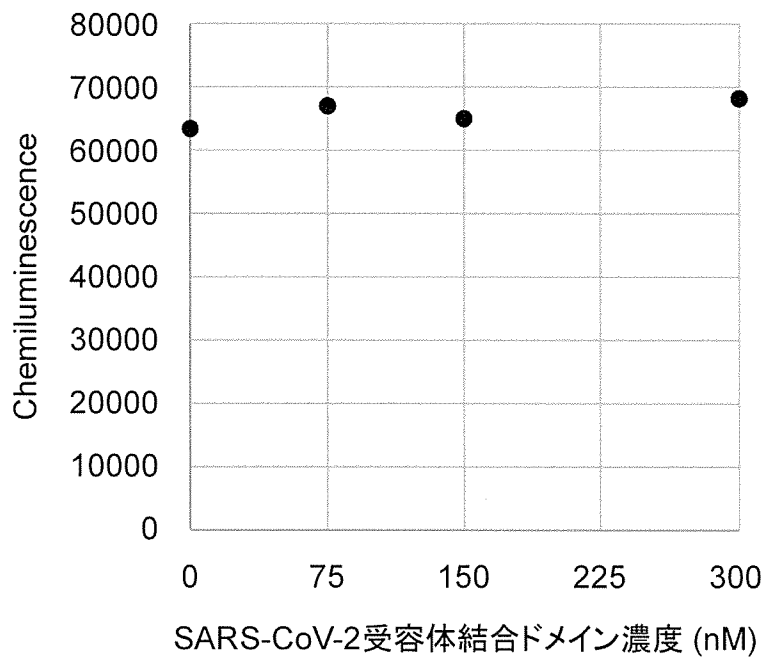
[図8]



[図9]



[図10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/000383

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12Q 1/04</i> (2006.01)i; <i>C07K 16/00</i> (2006.01)i; <i>C07K 19/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/02</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/04</i> (2006.01)i; <i>C12N 9/12</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/26</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/28</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/48</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/66</i> (2006.01)i; <i>C12Q 1/70</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/53</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/536</i> (2006.01)i FI: C12Q1/04 ZNA; C07K16/00; C07K19/00; C12N9/02; C12N9/04 Z; C12N9/12; C12Q1/26; C12Q1/28; C12Q1/48 Z; C12Q1/66; C12Q1/70; G01N33/53 D; G01N33/536 C 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) C12Q1/04; C07K16/00; C07K19/00; C12N9/02; C12N9/04; C12N9/12; C12Q1/26; C12Q1/28; C12Q1/48; C12Q1/66; C12Q1/70; G01N33/53; G01N33/536 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAlus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2003-028874 A (MITSUBISHI CHEMICAL CORPORATION) 29 January 2003 (2003-01-29) claims, examples, paragraphs [0028], [0038], [0039]	1, 2, 4, 5, 7-9
Y		3, 6, 10
Y	JP 1-150856 A (BIOVENTURES INC.) 13 June 1989 (1989-06-13) claims, examples, p. 6, lower left column, lines 10-19	3, 6, 10
A		1, 2, 4, 5, 7-9
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: “A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance “D” document cited by the applicant in the international application “E” earlier application or patent but published on or after the international filing date “L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) “O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means “P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed “T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention “X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone “Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art “&” document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 March 2024		Date of mailing of the international search report 02 April 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/000383

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/000383

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2003-028874	A	29 January 2003	(Family: none)	
JP	1-150856	A	13 June 1989	US 4943525 A	
				claims, examples, column 5, lines 7-16	
				EP 315364 A2	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12Q 1/04(2006.01)i; C07K 16/00(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 9/02(2006.01)i;
C12N 9/04(2006.01)i; C12N 9/12(2006.01)i; C12Q 1/26(2006.01)i; C12Q 1/28(2006.01)i;
C12Q 1/48(2006.01)i; C12Q 1/66(2006.01)i; C12Q 1/70(2006.01)i; G01N 33/53(2006.01)i;
G01N 33/536(2006.01)i
FI: C12Q1/04 ZNA; C07K16/00; C07K19/00; C12N9/02; C12N9/04 Z; C12N9/12; C12Q1/26; C12Q1/28; C12Q1/48
Z; C12Q1/66; C12Q1/70; G01N33/53 D; G01N33/536 C

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））

C12Q1/04; C07K16/00; C07K19/00; C12N9/02; C12N9/04; C12N9/12; C12Q1/26; C12Q1/28; C12Q1/48; C12Q1/66;
C12Q1/70; G01N33/53; G01N33/536

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

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

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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
X	JP 2003-028874 A（三菱化学株式会社）29.01.2003（2003 - 01 - 29） 特許請求の範囲、実施例、[0028]、[0038]、[0039]	1, 2, 4, 5, 7-9
Y		3, 6, 10
Y	JP 1-150856 A（バイオベンチャーズ、インコーポレイテッド）13.06.1989（1989 - 06 - 13） 特許請求の範囲、実施例、6 ページ左下欄 10 - 19 行	3, 6, 10
A		1, 2, 4, 5, 7-9

☐ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の 1 以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
18. 03. 2024

国際調査報告の発送日
02. 04. 2024

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

権限のある職員（特許庁審査官）

北田 祐介 4N 4868

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/000383

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP	2003-028874	A	29.01.2003	(ファミリーなし)	
JP	1-150856	A	13.06.1989	US 4943525 A	
				請求の範囲、実施例、カラ ム 5 7 - 1 6 行	
				EP 315364 A2	