

(19) 日本国特許庁 (JP)

再 公 表 特 許 (A1)

(11) 国際公開番号

W02017/146118

発行日 平成30年12月20日 (2018.12.20)

(43) 国際公開日 平成29年8月31日 (2017.8.31)

(51) Int.Cl. F I テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 Z N A D
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 2 1

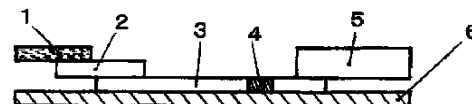
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 25 頁)

出願番号	特願2018-501741 (P2018-501741)	(71) 出願人	509352945
(21) 国際出願番号	PCT/JP2017/006676		田中貴金属工業株式会社
(22) 国際出願日	平成29年2月22日 (2017.2.22)		東京都千代田区丸の内2丁目7番3号
(31) 優先権主張番号	特願2016-32418 (P2016-32418)	(74) 代理人	110002000
(32) 優先日	平成28年2月23日 (2016.2.23)		特許業務法人栄光特許事務所
(33) 優先権主張国	日本国 (JP)	(72) 発明者	鈴木 啓太
			神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内
		(72) 発明者	望月 浩子
			神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内
		(72) 発明者	岩本 久彦
			神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 グリアジン検出用免疫クロマト分析装置、免疫クロマト分析キットおよび免疫クロマト分析方法

(57) 【要約】

本発明は、食品中のグリアジン以外の他の抗原との交叉反応を抑制し、特異性が向上した、グリアジンを検出するための免疫クロマト分析装置を提供することを課題とする。本発明は、試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部とを含む、グリアジン (Gliadin) を検出するための免疫クロマト分析装置であって、前記標識物質保持部及び検出部が、 α -グリアジン (α -Gliadin) を認識する抗体を含有する、免疫クロマト分析装置に関する。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部とを含む、グリアジン（G l i a d i n）を検出するための免疫クロマト分析装置であって、

前記標識物質保持部及び検出部が、 α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体を含有する、免疫クロマト分析装置。

【請求項 2】

前記抗体が、前記 α -グリアジン（ α -G l i a d i n）の全アミノ酸配列の中に存在する配列番号 2 ～ 6 で示される 5 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する、請求項 1 に記載の免疫クロマト分析装置。

10

【請求項 3】

前記標識物質保持部が含有する抗体と、前記検出部が含有する抗体とが同一の抗体である、請求項 1 または 2 に記載の免疫クロマト分析装置。

【請求項 4】

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の免疫クロマト分析装置と、検体を希釈して展開するための検体希釈液とを含む、免疫クロマト分析キット。

【請求項 5】

試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部とを含む免疫クロマト分析装置を用いて、検体中のグリアジン（G l i a d i n）を検出する方法であって、以下の工程（1）～（4）を含む免疫クロマト分析方法。

20

（1）検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料添加部に添加する工程

（2）標識物質保持部に保持されている、 α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体によりグリアジン（G l i a d i n）を認識させる工程

（3）前記検体及び抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

（4）展開された移動相中のグリアジン（G l i a d i n）を、検出部に含まれる α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体により検出する工程

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

30

本発明は、グリアジン（G l i a d i n）を検出するための免疫クロマト分析装置、免疫クロマト分析キットおよび免疫クロマト分析方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

近年、食物アレルギーの増加が大きな社会問題となっている。食物アレルギー患者は、アレルギーの原因となる物質（アレルゲン）を含む食品を摂取できない。食品中に含まれる食物アレルゲンに対して食物アレルギー患者は、喘息、皮膚炎、胃腸障害、アナフィラキシーショックといったさまざまなアレルギー症状を引き起こし、時には深刻な事態に至るケースもある。食物アレルギー患者は増加傾向にあることもあって、食品の安全性に関する消費者の関心は非常に高まっている。

40

【0003】

従来から、卵、牛乳、大豆が 3 大食物アレルゲンと言われてきたが、近年、食物アレルギーに起因するアトピー性皮膚炎患者のうち、3 大アレルゲンに比べて、小麦に感受性を示す患者が予想以上に多いことが分かってきている。小麦アレルギーの原因物質としては、グリアジン（G l i a d i n）が挙げられる。グリアジン（G l i a d i n）は小麦中に存在する糖タンパク質の一種であり、 α 、 β 、 γ 、 ω の 4 タイプに分類される。

【0004】

食物アレルギー症状の発症を防ぐためには、アレルギーの原因となる食品の摂取を制限することが望ましい。しかし、小麦はパンや麺類、パスタなど主食として利用されている他にも、様々な加工食品の原料として含まれているため、食品中における小麦アレルギー

50

の原因物質の有無について、簡易に診断できる方法が従来から求められている。

【 0 0 0 5 】

近年、免疫クロマト分析用ストリップ形式のイムノアッセイは、抗体の持つ特異的反応性を利用して、試料液中の抗原を検出する簡便な体外診断キットもしくは携帯用診断装置として重要性が高まっている。食品検査は、多数の食品試料を短時間で検査することが求められており、免疫クロマト分析法はその迅速性と簡便性から汎用性の高い手法である。

【 0 0 0 6 】

金ナノ粒子に抗体を結合し標識試薬として用いる免疫クロマト分析法の検査薬は、安価で操作が簡便であり、検査も短時間で終わることから、ノイズが少ない希薄な抽出試料中の微量特定成分の検出に使われている。

10

【 0 0 0 7 】

これまで、食品中における小麦アレルギーの原因物質の有無を簡易に診断できる方法として、上記免疫クロマト分析法を利用した方法が知られている。例えば、特許文献 1 は、小麦グリアジンを認識しかつ異なるエピトープを認識する 2 種類の抗小麦グリアジンモノクローナル抗体を併用したイムノクロマトストリップにより、食品中の小麦グリアジンを検出する方法が開示されている。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 8 】

【 特許文献 1 】 日本国特許第 5 0 4 3 0 7 3 号公報

20

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 9 】

しかしながら、食品試料中には、グリアジン以外のノイズとなる夾雑物が多く含有されており、従来のグリアジン検出用の免疫クロマト分析装置では、食品中のグリアジン以外の他の抗原と交叉反応が見られ、グリアジンに対する特異性は不十分なものであった。その結果、検出対象であるグリアジンが存在しないにも関わらず、グリアジン陽性反応が見られる偽陽性反応が生じてしまっていた。

【 0 0 1 0 】

そこで本発明の課題は、食品試料中に存在するグリアジン以外の他の抗原との交叉反応を抑制し、従来よりもグリアジンに対する特異性が向上した、グリアジンを検出するための免疫クロマト分析装置、免疫クロマト分析キット、及びそれらを用いた免疫クロマト分析方法を提供することにある。

30

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 1 1 】

上述のとおり、グリアジン (G l i a d i n) は小麦中に存在する糖タンパク質の一種であり、 α 、 β 、 γ 、 ω の 4 タイプに分けられる。本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、これら 4 種のグリアジンの中でも α - グリアジン (α - G l i a d i n) を認識する抗体は、グリアジン以外の他の抗原との交叉反応が少なく、グリアジンを特異的に検出できることを初めて知見した。

40

【 0 0 1 2 】

特に α - グリアジンの全アミノ酸配列 (配列番号 1) の中に存在する配列番号 2 ~ 6 で示される 5 つのアミノ酸配列のうち少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体は、グリアジンをより特異的に検出できることを初めて知見した。

【 0 0 1 3 】

さらに、免疫クロマト分析装置の標識物質保持部と検出部が含有する抗体を同一の抗体とすることで、偽陽性反応の発生をより低減することができることを初めて知見した。

【 0 0 1 4 】

本発明者らは上記知見をもとに本発明を完成するに至った。

【 0 0 1 5 】

50

したがって、本発明は以下の通りである。

１．試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部を含む、グリアジン（G l i a d i n）を検出するための免疫クロマト分析装置であって、

前記標識物質保持部及び検出部が、 α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体を含有する、免疫クロマト分析装置。

２．前記抗体が、前記 α -グリアジン（ α -G l i a d i n）の全アミノ酸配列の中に存在する配列番号２～６で示される５つのアミノ酸配列のうち、少なくとも１つのアミノ酸配列を認識する、前記１に記載の免疫クロマト分析装置。

３．前記標識物質保持部が含有する抗体と、前記検出部が含有する抗体とが同一の抗体である、前記１または２に記載の免疫クロマト分析装置。

４．前記１～３のいずれか１に記載の免疫クロマト分析装置と、検体を希釈して展開するための検体希釈液とを含む、免疫クロマト分析キット。

５．試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部を含む免疫クロマト分析装置を用いて、検体中のグリアジン（G l i a d i n）を検出する方法であって、以下の工程（１）～（４）を含む免疫クロマト分析方法。

（１）検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料添加部に添加する工程

（２）標識物質保持部に保持されている、 α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体によりグリアジン（G l i a d i n）を認識させる工程

（３）前記検体及び抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

（４）展開された移動相中のグリアジン（G l i a d i n）を、検出部に含まれる α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体により検出する工程

【発明の効果】

【００１６】

本発明は、グリアジン（G l i a d i n）を検出するための免疫クロマト分析装置において、グリアジンのなかでも特に α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体を用いることによって、他の抗原との交叉反応が抑えられ、グリアジンを特異的に検出することができる。

【００１７】

特に α -グリアジンの全アミノ酸配列の中に存在する配列番号２～６で示される５つのアミノ酸配列のうち、少なくとも１つのアミノ酸配列を認識する抗体を用いることによって、グリアジンをより特異的に検出できる。

【００１８】

さらに、免疫クロマト分析装置の標識物質保持部と検出部が含有する抗体を同一の抗体とすることで、偽陽性反応の発生をより低減することができる。

【図面の簡単な説明】

【００１９】

【図１】図１は、本発明の一実施形態の免疫クロマト分析装置の構造を説明するための断面図である。

【発明を実施するための形態】

【００２０】

以下に、本発明を実施するための形態を説明する。

【００２１】

<免疫クロマト分析装置>

本発明の、グリアジン（G l i a d i n）を検出するための免疫クロマト分析装置は、検体試料を添加する試料添加部と、標識物質を保持する標識物質保持部と、グリアジン（G l i a d i n）を検出する検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、検出部を通過した液体を吸収する吸収部とを備え、標識物質保持部及び検出部が、 α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体を含有することを特徴としている。

【００２２】

10

20

30

40

50

本発明の免疫クロマト分析装置に使用する抗体は、 α -グリアジン (α -Gliadin) を認識する抗体である。

【0023】

グリアジン (Gliadin) は、70%エタノールに溶解する小麦粉のタンパク質であり、分子量やアミノ酸組成の似通った多種類のタンパク質の混合物である。グリアジンは、電気泳動における移動度にもとづいて、 α -、 β -、 γ -、 ω -グリアジンの4種類に分類されている。

【0024】

さらにグリアジンは、セファデックス G-100 カラムを用いたゲルろ過法で、3つのグループに分けられている。分子量約 30,000 の低分子量グリアジン (α 、 β 、 γ -グリアジン) と、分子量約 100,000 の高分子量グリアジン、及び分子量約 70,000 の ω -グリアジンである。

【0025】

このうち、 α -グリアジン (α -Gliadin) とは、配列番号 1 で示される 292 のアミノ酸からなり、分子量約 30,000 の低分子量グリアジンである。

本発明においては、種々のグリアジンの中でも特に上記 α -グリアジンを認識する抗体を、免疫クロマト分析装置に用いることによって、グリアジン以外の他の抗原との交叉反応を抑え、グリアジンを特異的に検出することができるものである。

【0026】

特に、 α -グリアジン (α -Gliadin) を認識する抗体の中でも、 α -グリアジンの全アミノ酸配列の中に存在する配列番号 2 ~ 6 で示される 5 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識する抗体であることが好ましい。

【0027】

これらの抗体の中でも特に、後述する繰り返し配列が多く存在するという理由から、配列番号 3 で示されるアミノ酸配列を認識する抗体であることが好ましい。

【0028】

上記アミノ酸配列の少なくとも 1 つを認識する抗体を用いることによって、他の抗原との交叉反応をより低減することができ、グリアジンをより特異的に検出することができる。

【0029】

配列番号 2 のアミノ酸配列 (QPQNPSQQQPQE QVPLVQQQQ) は α -グリアジン (α -Gliadin) の全アミノ酸配列のうち 29 番目から 49 番目までのアミノ酸配列を指す。

【0030】

配列番号 3 のアミノ酸配列 (PQQPY P Q P Q P F P S Q Q P Y L Q L Q P F P Q P Q P F P) は α -グリアジン (α -Gliadin) の全アミノ酸配列のうち 59 番目から 88 番目までのアミノ酸配列を指す。

【0031】

配列番号 4 のアミノ酸配列 (PQLPY P Q P Q S F P P Q Q P Y P Q Q Q P Q Y L Q P Q Q P) は α -グリアジン (α -Gliadin) の全アミノ酸配列のうち 89 番目から 118 番目までのアミノ酸配列を指す。

【0032】

配列番号 5 のアミノ酸配列 (PSSQVS F Q Q P Q Q Q Y P S S Q V S F Q) は α -グリアジン (α -Gliadin) の全アミノ酸配列のうち 236 番目から 257 番目までのアミノ酸配列を指す。

【0033】

配列番号 6 (QYPSSQVS F Q P S Q L N P Q A Q G S) のアミノ酸配列は α -グリアジン (α -Gliadin) の全アミノ酸配列のうち 248 番目から 268 番目までのアミノ酸配列を指す。

【0034】

10

20

30

40

50

本発明に使用する抗体としては、例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が挙げられる。感度の観点からモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0035】

α -グリアジン (α -G l i a d i n) を認識する抗体、特に、配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体としては、下記実施例において上記配列を認識することが確認された、X G Y 0 6 や X G Y 1 0 (X E M A 社製、商品名: M u r i n e m o n o c l o n a l a n t i b o d i e s t o p r o l a m i n s c l o n e N o . X G Y 0 6、X G Y 1 0) 等を購入し、使用できる。

【0036】

次に、図面を参照しながら本発明の免疫クロマト分析装置の一実施形態について説明する。なお本明細書において、「固定」とは、抗体が移動しないように膜等の担体に配置されていることを意味し、「保持」とは、膜等の担体の中または表面を移動可能に配置されることを意味する。

【0037】

本発明の免疫クロマト分析装置の一実施形態としては、図1に示すように、試料添加部(1)、標識物質保持部(2)、クロマトグラフ媒体部(3)、検出部(4)、吸収部(5)、パッキングシート(6)から構成されている。

【0038】

試料添加部(1)は、免疫クロマト分析装置において、検体試料を添加する部位である。試料添加部(1)では検体試料が迅速に吸収されるが、保持力は弱く、速やかに検体試料が移動していくような性質の多孔質シートで構成することができる。多孔質シートとしては、例えば、セルロース濾紙、グラスファイバー、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロン、及び綿布等が挙げられる。

【0039】

標識物質保持部(2)は、後述する標識物質を含有しており、該標識物質は上記 α -グリアジン (α -G l i a d i n) を認識する抗体と結合した標識試薬として標識物質保持部(2)に保持されている。標識物質保持部(2)内を検体が移動する際に、上記標識試薬と検体中のグリアジンとが結合する。標識物質保持部(2)には、グラスファイバーまたはセルロースの膜が通常使用される。

【0040】

標識物質保持部(2)中の α -グリアジン (α -G l i a d i n) を認識する抗体(以下、第1抗体ともいう)の含有量は、通常 $0.01 \mu\text{g}/\text{装置} \sim 1.0 \mu\text{g}/\text{装置}$ であり、好ましくは $0.05 \mu\text{g}/\text{装置} \sim 0.75 \mu\text{g}/\text{装置}$ であり、より好ましくは $0.075 \mu\text{g}/\text{装置} \sim 0.5 \mu\text{g}/\text{装置}$ である。

【0041】

また、標識物質保持部(2)の単位面積当たりの第1抗体の含有量は、通常 $0.006 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 0.42 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、好ましくは $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 0.3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、より好ましくは $0.01 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。

【0042】

免疫クロマト分析における検出試薬の標識には、一般に酵素等も使用されるが、被検出物質の存在を目視で判定するのに適していることから、標識物質としては不溶性担体を用いることが好ましい。 α -グリアジン (α -G l i a d i n) を認識する抗体(第1抗体)を不溶性担体に結合することにより標識化した検出試薬を調製することができる。なお、 α -グリアジン (α -G l i a d i n) を認識する抗体(第1抗体)を不溶性担体に結合する手段は、公知の方法に従えばよい。

【0043】

標識物質としての不溶性担体には、金、銀もしくは白金のような金属粒子、酸化鉄のような金属酸化物粒子、硫黄などの非金属粒子及び合成高分子よりなるラテックス粒子、ま

10

20

30

40

50

たはその他を用いることができる。

【0044】

不溶性担体は、被検出物質の存在を視覚的に判定するのに適した標識物質であり、目視による判定を容易にするためには有色であることが好ましい。金属粒子及び金属酸化物粒子は、それ自体が粒径に応じた特定の自然色を呈するものであり、その色彩を標識として利用することができる。

【0045】

標識物質としての不溶性担体は、特に金粒子が、検出が簡便であり、かつ凝集しづらく非特異的な発色が起こりにくい点で好ましい。金粒子の平均粒径は、例えば10nm～250nm、好ましくは35nm～120nmである。平均粒径は、透過型電子顕微鏡（TEM：日本電子（株）製、JEM-2010）により、撮影した投影写真を用いて無造作に100個の粒子の投影面積円相当径を計測し、その平均値から算出することができる。

10

【0046】

標識物質保持部が含有する金粒子は、標識物質保持部の単位面積あたり、通常0.006 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ～0.42 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、好ましくは0.01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ～0.3 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ であり、より好ましくは0.01 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ～0.2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ である。上記範囲に設定することによって、標識された粒子が分散したまま展開し、抗体の認識部位が阻害されず高感度化できるからである。

【0047】

クロマトグラフ媒体部（3）は、本発明の免疫クロマト分析装置の展開部位である。クロマトグラフ媒体部（3）は、毛管現象を示す微細多孔性物質からなる不活性の膜である。

20

【0048】

本発明の免疫クロマト分析装置で使用される検出試薬、固定化試薬または被検出物質などと反応性を有しないという観点から、また、本発明の効果が向上するという観点から、例えば、ニトロセルロース製のメンブレン（以下、ニトロセルロースメンブレンともいう）や、酢酸セルロース製のメンブレン（以下、酢酸セルロースメンブレンともいう）が好ましく、ニトロセルロースメンブレンがさらに好ましい。なお、セルロース類メンブレン、ナイロンメンブレン及び多孔質プラスチック布類（ポリエチレン、ポリプロピレン）も使用可能である。

30

【0049】

ニトロセルロースメンブレンとしては、ニトロセルロースが主体で含まれていればよく、純品またはニトロセルロース混合品などニトロセルロースを主材とするメンブレンを使用することができる。

【0050】

ニトロセルロースメンブレンは、さらに毛細管現象を促進させる物質を含有させることもできる。上記物質としては、膜面の表面張力を低下させ、親水性をもたらす物質が好ましい。

【0051】

例えば、糖類、アミノ酸の誘導体、脂肪酸エステル、各種合成界面活性剤またはアルコール等の両親媒性の作用を有する物質であって、被検出物質の移動に影響がなく、標識物質（例えば金コロイド粒子など）の発色に影響を及ぼさない物質が好ましい。

40

【0052】

ニトロセルロースメンブレンは、多孔性であって、毛細管現象を示す。この毛細管現象の指標は、吸水速度（吸水時間：capillary flow time）を測ることで確認できる。吸水速度は、検出感度と検査時間に影響する。

【0053】

上記のようなニトロセルロースメンブレンや酢酸セルロースメンブレンに代表されるクロマトグラフ媒体部（3）の形態及び大きさは特に制限されるものではなく、実際の操作の点及び反応結果の観察の点において適切であればよい。

50

【 0 0 5 4 】

さらに操作をより簡便にするためには、クロマトグラフ媒体部（３）の裏面に、プラスチックなどよりなる支持体を設けることが好ましい。この支持体の性状は特に制限されるものではないが、目視判定によって測定結果の観察を行う場合には、支持体は、標識物質によりもたらされる色彩と類似しない色彩を有するものであることが好ましく、通常、無色又は白色であることが好ましい。

【 0 0 5 5 】

検出部（４）は、上記クロマトグラフ媒体部（３）上に形成される。すなわち、被検出物質の α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体が、クロマトグラフ媒体部（３）上の任意の位置に固定化される。第２抗体の固定化は常法に従って行うことができる。

10

【 0 0 5 6 】

検出部（４）における α -グリアジン（ α -G l i a d i n）を認識する抗体（以下、第２抗体ともいう）の含有量は、通常 $0.01 \mu\text{g} / \text{装置} \sim 0.8 \mu\text{g} / \text{装置}$ であり、好ましくは $0.03 \mu\text{g} / \text{装置} \sim 0.6 \mu\text{g} / \text{装置}$ であり、より好ましくは $0.1 \mu\text{g} / \text{装置} \sim 0.5 \mu\text{g} / \text{装置}$ である。

【 0 0 5 7 】

また、検出部（４）の単位面積当たりの第２抗体の含有量は、通常 $0.025 \mu\text{g} / \text{cm}^2 \sim 3 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ であり、好ましくは $0.05 \mu\text{g} / \text{cm}^2 \sim 2 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ であり、より好ましくは $0.1 \mu\text{g} / \text{cm}^2 \sim 1 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ である。

20

【 0 0 5 8 】

また、クロマトグラフ媒体部（３）上には、非特異的な吸着により分析の精度が低下することを防止するため、必要に応じて、クロマトグラフ媒体部（３）に、公知の方法でブロッキング処理を行うことができる。

【 0 0 5 9 】

一般にブロッキング処理はウシ血清アルブミン、スキムミルク、カゼインまたはゼラチン等のタンパク質が好適に用いられる。かかるブロッキング処理後に、必要に応じて、例えば、ポリエチレングリコールソルビタンモノラウレート（例えば、T w e e n 2 0：和光純薬社製）、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（例えば、T r i t o n X - 1 0 0：和光純薬社製）またはドデシル硫酸ナトリウム（例えば、S D S：和光純薬社製）等の界面活性剤を１つ又は２つ以上組み合わせて洗浄してもよい。

30

【 0 0 6 0 】

吸収部（５）は、クロマトグラフ媒体部（３）の末端に、検出部（４）を通過した検体や展開液等の液体を吸収させるために設置される。本発明の免疫クロマト分析装置において、吸収部（５）は、例えば、グラスファイバー、パルプ、セルロースファイバー等、またはそれら不織布にアクリル酸重合体等の高分子、エチレンオキシド基等を持つ親水性薬剤を含有させたもの等を用いることができる。好ましくは、グラスファイバーである。吸収部（５）にグラスファイバーを用いることによって、試料液の液戻りを大幅に低減することができる。

【 0 0 6 1 】

バックグシート（６）は、基材である。片面に粘着剤を塗布したり、粘着テープを貼り付けることにより、片面が粘着性を有し、該粘着面上に試料添加部（１）、標識物質保持部（２）、クロマトグラフ媒体部（３）、検出部（４）、および吸収部（５）の一部または全部が密着して設けられている。バックグシート（６）は、粘着剤によって試料液に対して不透過性、非透湿性となるようなものであれば、基材としては、特に限定されない。

40

【 0 0 6 2 】

上記のようにして作製した免疫クロマト分析装置は、製品化する前に、通常乾燥処理に施される。乾燥温度は例えば $20 \sim 50$ 、乾燥時間は $0.5 \sim 1$ 時間である。

【 0 0 6 3 】

50

本発明の免疫クロマト分析装置において、標識物質保持部及び検出部が含有する α -グリアジン(α -G l i a d i n)を認識する抗体は、 α -グリアジン(α -G l i a d i n)の全アミノ酸配列の中に存在する配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体であることが好ましい。上記アミノ酸配列の少なくとも1つを認識する抗体を用いることによって、他の抗原との交叉反応をより低減でき、グリアジンをより特異的に検出することができる。

【0064】

また、標識物質保持部が含有する抗体(第1抗体)と検出部が含有する抗体(第2抗体)は同一の抗体であることが好ましい。第1抗体と第2抗体を同一の抗体にすることによって、両方の抗体の各種条件(例えば、温度条件)を揃えることが可能となる。これにより、片方の抗体だけ抗原との反応性が高くなったり、あるいは低くなったり等のバラツキを抑えることができ、また抗体の持つ他抗原との反応(交叉反応)を揃えることで各種条件における偽陽性反応の発生を低減することができる。

10

【0065】

本発明の免疫クロマト分析装置においては、標識物質保持部及び検出部が含有する α -グリアジン(α -G l i a d i n)を認識する抗体が、 α -グリアジン(α -G l i a d i n)の全アミノ酸配列の中に存在する配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体であり、かつ標識物質保持部が含有する抗体(第1抗体)と検出部が含有する抗体(第2抗体)とが同一の抗体であることがより好ましい。

20

【0066】

標識物質保持部が含有する抗体と検出部が含有する抗体が同一の抗体であり、かつその抗体が、上記配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列の少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体である場合は、該抗体が α -グリアジン(α -G l i a d i n)のアミノ酸配列を認識する態様は少なくとも以下の2つの場合が推定される。

【0067】

(1) 配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列に存在する繰り返し配列の一次構造を認識する場合

(2) 配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列に共通する立体構造を認識する場合
上記2つの態様を以下に説明する。

30

【0068】

(1) 配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列に存在する繰り返し配列の一次構造を認識する場合

配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列には、以下に示す繰り返し配列が存在する。

配列番号3及び配列番号4:P Q Q P Y P Q

配列番号3及び配列番号4:P Y P Q P Q P

配列番号3(2箇所):P Q P Q P F P

配列番号5(2箇所)及び配列番号6:P S S Q V S F Q

【0069】

本発明の抗体が、上記繰り返しのアミノ酸配列の一次構造を認識する場合、本発明の免疫クロマト分析装置を用いて分析を行うことにより、標識物質保持部が含有する抗体と検出部が含有する抗体とが同一の抗体であっても、下記に示すようなサンドイッチ構造が形成され、検出対象のグリアジンの検出が可能となると推定される。

40

【0070】

すなわち、本発明の免疫クロマト分析装置の標識物質保持部及び検出部に上記抗体を含有させた場合、まず、標識物質保持部に保持された抗体(第1抗体)が、 α -グリアジン(α -G l i a d i n)に存在する上記繰り返し配列のいずれかに結合する。続いて、検出部に固定化された上記抗体(第2抗体)が、標識物質保持部に保持された第1抗体が結合した箇所と別の箇所に存在する同じ繰り返し配列に結合することによって、 α -グリア

50

ジンを第1抗体と第2抗体で挟むようにしてサンドイッチの構造を形成し、グリアジンを検出する。

【0071】

この場合、上記抗体は、上記繰り返し配列のいずれかを認識するため、 α -グリアジン (α -G l i a d i n) のアミノ酸配列の複数の箇所を認識することができ、グリアジンの検出感度を高め、かつ交叉反応性を抑えられることができるため好ましい。

【0072】

特に、配列番号3で示されるアミノ酸配列は繰り返し配列を多く有するため、上記抗体は、配列番号3で示されるアミノ酸配列を認識する抗体であることが好ましい。配列番号3で示されるアミノ酸配列を認識する抗体であれば、 α -グリアジン (α -G l i a d i n) のアミノ酸配列のうち、より多くの箇所を認識することができ、 α -グリアジン (α -G l i a d i n) の検出感度を高めることができる。

10

【0073】

(2) 配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列に共通する立体構造を認識する場合 α -グリアジン (α -G l i a d i n) は、配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列の中で、アミノ酸配列の相同性が高い箇所が存在する場合、当該アミノ酸配列の相同性の高い箇所同士は、アミノ酸配列の化学的性質が極めて類似することになり、同一または類似する立体構造をとり得る。この場合、 α -グリアジンタンパク質全体の立体構造の中で、同一または類似の立体構造を有する箇所が複数存在することになる。

20

【0074】

本発明における抗体が、この共通するアミノ酸配列の立体構造を認識する場合、本発明の免疫クロマト分析装置を用いて分析を行うことにより、標識物質保持部が含有する抗体と検出部が含有する抗体とが同一の抗体であっても、下記に示すようなサンドイッチ構造が形成され、検出対象のグリアジンの検出が可能となる。

【0075】

すなわち、本発明の免疫クロマト分析装置の標識物質保持部及び検出部に上記抗体を含有させた場合、まず、標識物質保持部に保持された抗体(第1抗体)が、 α -グリアジン (α -G l i a d i n) に存在する共通する立体構造のいずれかに結合する。続いて、検出部に固定化された上記抗体(第2抗体)が、標識物質保持部に保持された第1抗体が結合した箇所と別の箇所に存在する、同一の立体構造に結合することによって、 α -グリアジン (α -G l i a d i n) を第1抗体と第2抗体で挟むようにしてサンドイッチの構造を形成し、グリアジンを検出する。

30

【0076】

この場合も、上記抗体は、複数存在する同一の立体構造を認識するため、 α -グリアジン (α -G l i a d i n) の立体構造の複数の箇所を認識することができ、グリアジンの検出感度を高め、かつ交叉反応性を抑えられることができるため好ましい。

【0077】

<免疫クロマト分析キット>

本発明の免疫クロマト分析キットは、上記の免疫クロマト分析装置と、検体を希釈して展開するための検体希釈液とを含む。

40

【0078】

本発明の免疫クロマト分析キットにおいて検体希釈液は、展開液としても使用することができるものである。検体希釈液は、通常溶媒として水を用い、これに緩衝液、塩、および非イオン性界面活性剤、さらに、例えば抗原抗体反応の促進または非特異的反応を抑制するためのタンパク質、高分子化合物(PVP等)、イオン性界面活性剤もしくはポリアニオン、または、抗菌剤、キレート剤等の1種もしくは2種以上を加えてもよい。

【0079】

検体希釈液を展開液として用いる場合には、検体と展開液を予め混合したものを、試料添加部に供給・添加して展開させることもできるし、先に検体を試料添加部に供給・添加した後、展開液を試料添加部に供給・添加して展開させてもよい。

50

【0080】

<免疫クロマト分析方法>

本発明の免疫クロマト分析方法は以下の工程(1)～(4)を含み、上記の免疫クロマト分析装置を用いて検体に含まれる被検出物質のグリアジン(Gliadin)を検出する。

(1) 検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料添加部に添加する工程

(2) 標識物質保持部に保持されている、 α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体によりグリアジン(Gliadin)を認識させる工程

(3) 前記検体及び抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

(4) 展開された移動相中のグリアジン(Gliadin)を、検出部に含まれる α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体により検出する工程

10

各工程について以下に説明する。

【0081】

(1) 検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料添加部に添加する工程

工程(1)では、第1に、検体を、測定精度を低下させることなく、装置内をスムーズに移動する程度の濃度に、検体希釈液で調整または希釈して検体含有液とするのが好ましい。検体希釈液は上述したものを使用できる。

【0082】

第2に、検体含有液を試料添加部(1)上に、所定量(通常、0.1～2ml)添加する。検体含有液が添加されると、検体含有液は試料添加部(1)中で移動を開始する。

20

【0083】

本発明において使用する検体は、被検出物質であるグリアジン(Gliadin)を含む可能性がある検体である。例えば、小麦粉、パン、パスタ、及びてんぷら等、加工の有無を問わず小麦を原材料として使用する食品が挙げられる。

【0084】

検体試料の調製については、実施例に記載の方法の他にも公知の任意の方法で行うことができる。検体が食品である場合における検体試料の調製の方法について、以下に一例をあげて説明する。

【0085】

1. 小麦を原材料として使用する食品を粉砕機により均一な状態に破碎またはペーストとする。粉砕機としては、フードカッター(MK-K48; パナソニック社製)やミルサー(IFM700G; 岩谷産業社製)等を使用できる。均一化の目的は、食品中には特定原材料が偏って混入している可能性が高いため、食品を均一な状態にする必要があるためである。なお、食品が液状の食品(ジュース等)や粉状の食品(小麦粉等)の場合は均一化(破碎)の必要はない。

30

【0086】

2. 破碎した食品からタンパク質を抽出する。例えば、破碎した試料2gに対して、検体希釈液38mlを加え、ホモジナイザー等で30秒間ずつ3回抽出操作を繰り返すことで、食品からタンパク質を抽出する。

【0087】

3. 抽出液の遠心分離を行い、抽出液中の大きな不溶性成分を除去する。遠心分離後の上清を、ろ紙を用いてろ過し、得られたろ液を検体希釈液で10倍希釈することで、検体試料を調製できる。

40

【0088】

(2) 標識物質保持部に保持されている、 α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体によりグリアジン(Gliadin)を認識させる工程

工程(2)は、工程(1)において試料添加部に添加された検体含有液を、標識物質保持部(2)へと移動させ、標識物質保持部に保持されている標識物質が結合した α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体(第1抗体)により検体中の被検出物質であるグリアジンを認識させる工程である。標識物質は上述したものを使用できる。

50

【0089】

(3) 前記検体及び抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

工程(3)は、工程(2)において被検出物質であるグリアジン(Gliadin)が標識物質保持部において標識物質が結合した α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体(第1抗体)に認識された後、検体および第1抗体を、クロマトグラフ媒体部上を移動相として通過させる工程である。

【0090】

(4) 展開された移動相中のグリアジン(Gliadin)を、検出部に含まれる α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体により検出する工程

工程(4)は、クロマトグラフ媒体部上を移動相として通過した検体中のグリアジン(Gliadin)が、抗原・抗体の特異的結合反応により、検出部に保持、即ち、固定されている α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体(第2抗体)と、上記工程(2)において標識物質が結合した α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体(第1抗体)とによってサンドイッチ状に挟まれるように特異的に反応結合して、検出部が着色する工程である。

10

【0091】

被検出物質であるグリアジン(Gliadin)が存在しない場合には、試料の水分に溶解した標識試薬は、クロマトグラフ媒体部上の検出部を通過しても特異的結合反応が起こらないので、検出部が着色しない。

【0092】

最後に、検体含有液の水分は、吸収部(5)へと移動する。

20

【実施例】

【0093】

以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明は下記例に制限されるものではない。

【0094】

試験例1

本試験では、 α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する種類の異なる2種類の抗体を用意し、それぞれ抗体が α -グリアジン(α -Gliadin)の全アミノ酸配列の中に存在する配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する抗体であることを確認するための試験を行った。使用した抗体は、抗体A(XGY06: XEMA社製)と抗体B(XGY10: XEMA社製)の2種類である。

30

【0095】

まず、 α -グリアジン(α -Gliadin)の全アミノ酸配列の中に存在する配列番号2~6で示される5つのアミノ酸配列を有するペプチド1~5を、ペプチドの化学合成法の常法であるペプチド固相合成法により作製した。

ペプチド1: QPQNPSQQQPQE QVPLVQQQQ (配列番号2)

ペプチド2: PQQPYPPQPQPFPSQQPYLQLQPFPPQPQPFPP (配列番号3)

ペプチド3: PQLPYPPQPQSFPFPQQPYPPQQQPQYLQPQQP (配列番号4)

ペプチド4: PSSQVSFQQPQQQYPSSQVSFQ (配列番号5)

ペプチド5: QYPSSQVSFQPSQLNPQAQGS (配列番号6)

40

各ペプチドをNunc Immunomodules (Thermo Fisher Scientific社製、コード469949) ELISA用96ウェルプレートに固定化し、常法である抗原固相化ELISAにより各ペプチドとの反応をマイクロプレートリーダー(BIORAD社製)での吸光度を測定することで確認した。

抗体が結合しているシグナルが得られたものを+、抗体が結合しているシグナルが他と比較して特に強く得られたものを++、ブランクと同程度のシグナルしか得られなかった

50

ものを - とした。結果を表 1 に示す。

【 0 0 9 6 】

【 表 1 】

表1

	抗体A	抗体B
ペプチド1 (配列番号2)	+	-
ペプチド2 (配列番号3)	++	+
ペプチド3 (配列番号4)	+	-
ペプチド4 (配列番号5)	-	+
ペプチド5 (配列番号6)	-	+

10

【 0 0 9 7 】

以上の結果より、抗体 A 及び抗体 B はいずれも、配列番号 2 ~ 6 (ペプチド 1 ~ 5) で示される 5 つのアミノ酸配列のうち、少なくとも 1 つのアミノ酸配列を認識することが分かった。なお、配列番号 3 (ペプチド 2) で示されるアミノ酸配列は、抗体 A 及び抗体 B のいずれにも認識されることがわかった。

【 0 0 9 8 】

試験例 2

本試験では、本発明の免疫クロマト分析キットを作製し、グリアジンやグリアジンを含

20

む食品を検体として、グリアジンの検出を行った。

[実施例 1]

まず、検体希釈液、及び、試料添加部 (1) と、標識物質保持部 (2) と、検出部 (4) を有するクロマトグラフ媒体部 (3) と、吸収部 (5) とを含む免疫クロマト分析装置からなる免疫クロマト分析キットを作製した。

標識物質保持部が含有する抗体と検出部が含有する抗体は同一の抗体とし、抗体は上記抗体 A (X G Y 0 6 : X E M A 社製) を使用した。

【 0 0 9 9 】

(1) 試料添加部の作製

試料添加部としてグラスファイバーからなる不織布 (ミリポア社製 : 3 0 0 m m × 3 0 m m) を用いた。

30

【 0 1 0 0 】

(2) 標識物質保持部の作製

金コロイド懸濁液 (田中貴金属工業社製 : L C 4 0 n m) 0 . 5 m l に、リン酸緩衝液 (p H 7 . 4) で 0 . 0 5 m g / m l の濃度になるように希釈した抗体 A (X G Y 0 6 : X E M A 社製) を 0 . 1 m l 加え、室温で 1 0 分間静置した。

次いで、1 質量 % の牛血清アルブミン (B S A) を含むリン酸緩衝液 (p H 7 . 4) を 0 . 1 m l 加え、更に室温で 1 0 分間静置した。その後、十分攪拌した後、8 0 0 0 × g で 1 5 分間遠心分離を行い、上清を除去した後、1 質量 % の B S A を含むリン酸緩衝液 (p H 7 . 4) を 0 . 1 m l 加えた。以上の手順で標識物質溶液を作製した。

40

上記作製した標識物質溶液 3 0 0 μ L に 3 0 0 μ L の 1 0 質量 % トレハロース水溶液と 1 . 8 m l の蒸留水を加えたものを 1 2 m m × 3 0 0 m m のグラスファイバーパッド (ミリポア社製) に均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、標識物質保持部を作製した。

【 0 1 0 1 】

(3) クロマトグラフ媒体部および検出部の作製

メンブレンとしてニトロセルロースからなるシート (ミリポア社製、商品名 : H F 1 2 0 、 3 0 0 m m × 2 5 m m) を用いた。

次に、5 質量 % のイソプロピルアルコールを含むリン酸緩衝液 (p H 7 . 4) で 1 . 0 m g / m l の濃度になるように、上記抗体 A (X G Y 0 6 : X E M A 社製) を希釈した溶

50

液 150 μ L を、乾燥されたメンブレン上の検出部位（検出ライン）に 1 mm の幅でイムノクロマト用ディスペンサー「XYZ3050」（BIODOT 社製）を用いて 1 μ L / mm の量（1 シートあたり 25 μ L）でライン状に塗布した。

また、金ナノ粒子標識試薬の展開の有無や展開速度を確認するために検出部位の下流に、金ナノ粒子標識試薬と広く親和性を有するヤギ由来抗血清をリン酸緩衝液（pH 7.4）で希釈した液をコントロール部位（コントロールライン）に塗布した。その後、50 で 30 分間乾燥させ、室温で一晩乾燥させ、クロマトグラフ媒体部および検出部を作製した。

【0102】

（4）免疫クロマト分析装置の作製

次に、バックグシートからなる基材に、試料添加部、標識物質保持部、検出部を有するクロマトグラフ媒体部、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収部としてグラスファイバー製の不織布を順次貼り合わせた。そして、裁断機で幅が 5 mm となるように裁断し、免疫クロマト分析装置とした。なお、標識物質保持部の試料展開方向の長さを 12 mm とした。

【0103】

（5）検体希釈液の調製

1 質量 % の非イオン性界面活性剤（ナカライテスク社製 NP-40 と日油社製ノニデット MN-811 の 1 : 1 混合物）を含む 50 mM の HEPES 緩衝液（pH 7.5）を調製し、検体を希釈処理するための検体希釈液とした。

【0104】

（6）測定

上記作製した免疫クロマト分析キットを用いて、以下の方法で検体中の検出対象であるグリアジンの存在の有無を測定した。

検体は、精製 Gliadin（XEMA 社製）とした。精製 Gliadin が 2 ng / mL となるように上記検体希釈液で希釈し、検体含有液を調製した。

上記調製した検体含有液 150 μ L を免疫クロマト分析装置の試料添加部に添加し展開させ、15 分後に目視判定をした。テストラインの赤い線を目視確認できるものを「+」、鮮明に目視確認できるものを「++」、赤い線をうっすら目視確認できるものを「±」、赤い線を目視確認できないものを「-」とした。結果を表 2 に示す。

【0105】

[実施例 2]

標識物質保持部が含有する抗体と検出部が含有する抗体のいずれも、抗体 B（XGY10 : XEMA 社製）を使用した点を除いては、実施例 1 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し測定を行った。結果を表 2 に示す。

【0106】

[実施例 3]

標識物質保持部が含有する抗体を抗体 A（XGY06 : XEMA 社製）、検出部が含有する抗体を抗体 B（XGY10 : XEMA 社製）とした点を除いては、実施例 1 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し測定を行った。結果を表 2 に示す。

【0107】

[実施例 4]

標識物質保持部が含有する抗体を抗体 B（XGY10 : XEMA 社製）、検出部が含有する抗体を抗体 A（XGY06 : XEMA 社製）とした点を除いては、実施例 1 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し測定を行った。結果を表 2 に示す。

【0108】

10

20

30

40

【表 2】

表2

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4
標識物質保持部側	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
検出部側	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	++	++	+	+

【0109】

10

試験の結果、抗体 A 及び抗体 B のいずれの抗体を用いても、グリアジンを検出することができた。特に、標識物質保持部と検出部に同じ抗体を用いた実施例 1 及び 2 において、高感度にグリアジンを検出することができた。

【0110】

[実施例 5]

検体を小麦粉としたことを除いては、実施例 1 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し、測定を行った。検体の小麦粉は以下のように処理を行い、検体含有液を調製した。すなわち、市販の小麦粉（日清製粉社製）を 0.1 g 測り取り、そこに 70 % エタノールを 1 mL 加え、その後、遠心分離にて不溶成分を沈殿させ、この上清を小麦粉抽出物とした。この抽出物を検体希釈液にて 100 倍希釈し、検体含有液を調製した。

20

結果を表 3 に示す。

【0111】

[実施例 6]

標識物質保持部が含有する抗体と検出部が含有する抗体のいずれも抗体 B（XGY10：XEMA 社製）を使用した点を除いては、実施例 5 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し、測定を行った。結果を表 3 に示す。

【0112】

[実施例 7]

標識物質保持部が含有する抗体を抗体 A（XGY06：XEMA 社製）、検出部が含有する抗体を抗体 B（XGY10：XEMA 社製）とした点を除いては、実施例 5 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し、測定を行った。結果を表 3 に示す。

30

【0113】

[実施例 8]

標識物質保持部が含有する抗体を抗体 B（XGY10：XEMA 社製）、検出部が含有する抗体を抗体 A（XGY06：XEMA 社製）とした点を除いては、実施例 5 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し、測定を行った。結果を表 3 に示す。

【0114】

【表 3】

表3

	実施例5	実施例6	実施例7	実施例8
標識物質保持部側	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
検出部側	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	++	++	++	+

40

【0115】

試験の結果、抗体 A 及び抗体 B のいずれの抗体を用いても、検体である小麦粉中のグリアジンを検出することができた。

【0116】

50

[実施例 9]

検体をパン（フジパン社製、製品名：小麦の朝食）としたことを除いては、実施例 1 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し、測定を行った。検体のパンは以下のように処理を行い、検体含有液を調製した。すなわち、市販の食パンを 0.1 g 測り取り、そこに 70 % エタノールを 1 mL 加え、その後、遠心分離にて不溶成分を沈殿させ、この上清をパン抽出物とした。この抽出物を検体希釈液にて 100 倍希釈し、検体含有液を調製した。結果を表 4 に示す。

【 0 1 1 7 】

[実施例 10]

標識物質保持部が含有する抗体と検出部が含有する抗体のいずれも抗体 B（XGY10：XEMA 社製）を使用した点を除いては、実施例 9 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し、測定を行った。結果を表 4 に示す。

【 0 1 1 8 】

[実施例 11]

標識物質保持部が含有する抗体を抗体 A（XGY06：XEMA 社製）、検出部が含有する抗体を抗体 B（XGY10：XEMA 社製）とした点を除いては、実施例 9 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し、測定を行った。結果を表 4 に示す。

【 0 1 1 9 】

[実施例 12]

標識物質保持部が含有する抗体を抗体 B（XGY10：XEMA 社製）、検出部が含有する抗体を抗体 A（XGY06：XEMA 社製）とした点を除いては、実施例 9 と同様に免疫クロマト分析キットを作製し、測定を行った。結果を表 4 に示す。

【 0 1 2 0 】

【 表 4 】

表4

	実施例9	実施例10	実施例11	実施例12
標識物質保持部側	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
検出部側	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	++	++	+	+

【 0 1 2 1 】

試験の結果、抗体 A 及び抗体 B のいずれの抗体を用いても、検体であるパン中のグリアジンを検出することができた。特に、標識物質保持部と検出部に同じ抗体を用いた実施例 9 及び 10 において、高感度にパン（グリアジン）を検出することができた。

【 0 1 2 2 】

試験例 3

[実施例 13]

標識物質保持部及び検出部の両方に抗体 A（XGY06：XEMA 社製）を含有させた実施例 1（試験例 2）の免疫クロマト分析キットを用い、検体を精製トウモロコシタンパク質（以下精製 z e i n）、市販のそば粉、市販のインゲン豆、市販の鮭フレークとして、実施例 1 と同様に測定を行った。なお、精製 z e i n の濃度は 2 ng/mL となるように検体含有液を作製した。

また、そば粉、インゲン豆、鮭フレークは、市販のそば粉、インゲン豆、鮭フレークを 0.1 g 測り取り、そこに 70 % エタノールを 1 mL 加え、その後、遠心分離にて不溶成分を沈殿させ、この上清を各抽出物とした。この抽出物を検体希釈液にて 100 倍希釈し、検体含有液を調製した。

結果を表 5 に示す。

【 0 1 2 3 】

[比較例 1]

市販のグリアジン (G l i a d i n) 検出イムノクロマトキット (日本ハム社製、 F A S T K I T S l i m) を用いたことを除いては、実施例 1 3 と同様に測定を行った。結果を表 5 に示す。

【 0 1 2 4 】

【表 5】

表5

	実施例13	比較例1
精製Zein	-	±
そば粉	-	±
インゲン豆	-	+
鮭フレーク	-	+

10

【 0 1 2 5 】

試験の結果、本発明の免疫クロマト分析キットにおいては、精製 z e i n、そば粉、インゲン豆、及び鮭フレークのいずれの検体に対しても交叉反応は見られなかった。一方、比較例 1 の市販のグリアジン (G l i a d i n) 検出イムノクロマトキットにおいては、上記いずれの検体においても交叉反応が見られた。したがって、本発明の免疫クロマト分析キットは、市販のグリアジンを検出するイムノクロマトキットと比較して、グリアジン以外の他の抗原に対する交叉反応が抑制されていることが分かった。

20

【 0 1 2 6 】

試験例 4

本発明の免疫クロマト分析キットにおいて、試験例 3 における検体の濃度では、グリアジン以外のいくつかの抗原について交叉反応は見られなかった。そこで本試験では、試験例 3 で使用した検体 (精製 z e i n、そば粉、インゲン豆、鮭フレーク) について、その濃度を 5 0 0 0 倍とすることにより、グリアジン以外の他の抗原に対する交叉反応性に関し、最適な抗体の組み合わせについて検討した。

30

【 0 1 2 7 】

[参考例 1 ~ 4]

検体の精製 z e i n の検体含有液における濃度を、試験例 3 の濃度の 5 0 0 0 倍である 1 0 μ g / m L とし、標識物質保持部及び検出部が含有する抗体の組み合わせを表 6 に示すものとしたことを除いては、試験例 3 (実施例 1 3) と同様に試験を行った。結果を表 6 に示す。

【 0 1 2 8 】

【表 6】

表6

	参考例1	参考例2	参考例3	参考例4
標識物質保持部側	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
検出部側	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	-	-	±	-

40

【 0 1 2 9 】

[参考例 5 ~ 8]

50

検体のそば粉について、試験例3（実施例13）の濃度の5000倍となるように検体含有液を調製し、標識物質保持部及び検出部が含有する抗体の組み合わせを表7に示すものとしたことを除いては、試験例3（実施例13）と同様に試験を行った。結果を表7に示す。

【0130】

【表7】

表7

	参考例5	参考例6	参考例7	参考例8
標識物質保持部側	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
検出部側	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	±	±	+	+

10

【0131】

[参考例9～12]

検体のインゲン豆について、試験例3（実施例13）の濃度の5000倍となるように検体含有液を調製し、標識物質保持部及び検出部が含有する抗体の組み合わせを表8に示すものとしたことを除いては、試験例3（実施例13）と同様に試験を行った。結果を表8に示す。

20

【0132】

【表8】

表8

	参考例9	参考例10	参考例11	参考例12
標識物質保持部側	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
検出部側	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	—	—	+	+

30

【0133】

[参考例13～16]

検体の鮭フレークについて、試験例3（実施例13）の濃度の5000倍となるように検体含有液を調製し、標識物質保持部及び検出部が含有する抗体の組み合わせを表8に示すものとしたことを除いては、試験例3（実施例13）と同様に試験を行った。結果を表8に示す。

【0134】

【表9】

表9

	参考例13	参考例14	参考例15	参考例16
標識物質保持部側	抗体A	抗体B	抗体A	抗体B
検出部側	抗体A	抗体B	抗体B	抗体A
判定	—	—	±	±

40

【0135】

50

参考例 1 ～ 1 6 の結果からも分かるように、標識物質保持部側及び検出部側に同一の抗体を使用した本発明の免疫クロマト分析キットは、標識物質保持部側及び検出部側に異なる抗体を使用した場合と比較して、交叉反応が生じにくいことが分かった。

【 0 1 3 6 】

本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更及び変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお本出願は、2 0 1 6 年 2 月 2 3 日付で出願された日本特許出願（特願 2 0 1 6 - 0 3 2 4 1 8 ）に基づいており、その全体が引用により援用される。

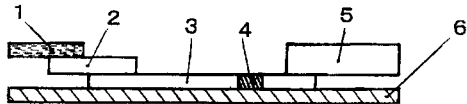
【 符号の説明 】

【 0 1 3 7 】

10

- 1 試料添加部
- 2 標識物質保持部
- 3 クロマトグラフ媒体部
- 4 検出部
- 5 吸収部
- 6 パッキングシート

【 図 1 】



【配列表】

2017146118000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成29年7月14日(2017.7.14)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部とを含む、グリアジン(Gliadin)を検出するための免疫クロマト分析装置であって、

前記標識物質保持部及び検出部が、 α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体を含有し、かつ前記標識物質保持部が含有する抗体と、前記検出部が含有する抗体とが同一の抗体である、免疫クロマト分析装置。

【請求項2】

前記抗体が、前記 α -グリアジン(α -Gliadin)の全アミノ酸配列の中に存在する配列番号2～6で示される5つのアミノ酸配列のうち、少なくとも1つのアミノ酸配列を認識する、請求項1に記載の免疫クロマト分析装置。

【請求項3】

請求項1または2に記載の免疫クロマト分析装置と、検体を希釈して展開するための検体希釈液とを含む、免疫クロマト分析キット。

【請求項4】

試料添加部と、標識物質保持部と、検出部を有するクロマトグラフ媒体部と、吸収部とを含む免疫クロマト分析装置を用いて、検体中のグリアジン(Gliadin)を検出する方法であって、以下の工程(1)～(4)を含む免疫クロマト分析方法。

(1) 検体希釈液により検体を希釈した検体含有液を試料添加部に添加する工程

(2) 標識物質保持部に保持されている、 α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体によりグリアジン(Gliadin)を認識させる工程

(3) 前記検体及び抗体を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

(4) 展開された移動相中のグリアジン(Gliadin)を、検出部に含まれる、前記標識物質保持部に保持されている抗体と同一の、 α -グリアジン(α -Gliadin)を認識する抗体により検出する工程

【請求項5】

(削除)

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2017/006676
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/53, G01N33/543 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2017 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2017 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2017 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CAPLUS/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.
Y A	JP 5043073 B2 (Prima Meat Packers, Ltd.), 10 October 2012 (10.10.2012), claims; example 1; all drawings & JP 2009-244277 A & WO 2005/085847 A1 & US 2007/0275427 A1 example 3; fig. 13 to 14 & EP 1731907 A1 & KR 10-2007-0002044 A & CN 1930474 A	1-2, 4-5 3
Y A	US 2008/0152780 A1 (DRIJFHOUT et al.), 26 July 2008 (26.07.2008), paragraphs [0001], [0024]; example 1; tables 1 to 5; fig. 1 to 7 & WO 2006/004394 A2 & EP 1612558 A1	1-2, 4-5 3
☒ 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 26 April 2017 (26.04.17)		Date of mailing of the international search report 16 May 2017 (16.05.17)
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/JP2017/006676

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Reagents for food, agriculture and environment testing 2015, XEMA 2015 Product Catalogue [online], Xema group of companies, 2015, p.11-17, Internet <URL:http://xema-medica.com/eng/agriculture/Food%20reagents%20catalogue%202015.pdf>, [retrieval date 2017.4.24]	1-5
A	JP 2011-099789 A (Morinaga & Co., Ltd.), 19 May 2011 (19.05.2011), (Family: none)	1-5
A	JP 2006-512893 A (ISIS Innovation Ltd.), 20 April 2006 (20.04.2006), & WO 2003/104273 A2 & US 2006/0178299 A1 & EP 1513873 A2	1-5

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 6 6 7 6	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/53(2006.01)i, G01N33/543(2006.01)i			
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)) Int.Cl. G01N33/53, 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 1971-2017年 日本国実用新案登録公報 1996-2017年 日本国登録実用新案公報 1994-2017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) CAplus/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	
Y A	JP 5043073 B2 (プリマハム株式会社) 2012.10.10, [特許請求の範囲], [実施例1], 全図 & JP 2009-244277 A & WO 2005/085847 A1 & US 2007/0275427 A1, EXAMPLE 3, [Fig.13]-[Fig.14] & EP 1731907 A1 & KR 10-2007-0002044 A & CN 1930474 A	1-2, 4-5 3	
Y A	US 2008/0152780 A1 (DRIJFHOUT et al.) 2008.07.26, [0001], [0024], Example 1, Table1-5, Figure1-7 & WO 2006/004394 A2 & EP 1612558 A1	1-2, 4-5 3	
☒ 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矛盾するものではなく、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 26.04.2017		国際調査報告の発送日 16.05.2017	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号		特許庁審査官 (権限のある職員) 西浦 昌哉 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J 5704

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 7 / 0 0 6 6 7 6
C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Reagents for food, agriculture and enviroment testing 2015, XEMA 2015 Product Catalogue [オンライン], Xema group of companies, 2015, p. 11-17, インターネット<URL : http://xema-medica.com/eng/agriculture/Food%20reagents%20catalogue%202015.pdf >, [検索日 2017. 4. 24]	1-5
A	JP 2011-099789 A (森永製菓株式会社) 2011.05.19, (ファミリーなし)	1-5
A	JP 2006-512893 A (アイシス・イノベーション・リミテッド) 2006.04.20, & WO 2003/104273 A2 & US 2006/0178299 A1 & EP 1513873 A2	1-5

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), 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, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	用于检测麦醇溶蛋白的免疫色谱分析仪，免疫色谱分析试剂盒和免疫色谱分析方法		
公开(公告)号	JPWO2017146118A1	公开(公告)日	2018-12-20
申请号	JP2018501741	申请日	2017-02-22
[标]申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
[标]发明人	鈴木啓太 望月浩子 岩本久彦		
发明人	鈴木 啓太 望月 浩子 岩本 久彦		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/558 G01N2333/415		
FI分类号	G01N33/53.ZNA.D G01N33/543.521		
优先权	2016032418 2016-02-23 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的一个目的是提供一种用于检测麦醇溶蛋白的免疫色谱分析仪，其抑制了与食物中麦醇溶蛋白以外的抗原的交叉反应并且具有提高的特异性。本发明是样品添加单元，标记物保持单元，具有检测单元的色谱介质单元和吸收单元，用于检测麦醇溶蛋白 (Gliadin) 的免疫色谱分析仪，其中所述标记 免疫色谱分析仪技术领域本发明涉及一种免疫色谱分析仪，其中物质保持单元和检测单元包含识别 α -麦醇溶蛋白的抗体。

