

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開2002 - 148264

(P2002 - 148264A)

(43)公開日 平成14年5月22日 (2002.5.22)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マ-ト* (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	S 4 B 0 6 3
C 1 2 Q 1/10		C 1 2 Q 1/10	
G 0 1 N 33/543	521	G 0 1 N 33/543	521

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 9 数)

(21)出願番号 特願2000 - 339084(P2000 - 339084)

(22)出願日 平成12年11月7日(2000.11.7)

(71)出願人 000003964

日東電工株式会社

大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号

(72)発明者 岡田 圭策

大阪府茨木市下穂積1 - 1 - 2 日東電工株式会社内

(72)発明者 岡田 研一

大阪府茨木市下穂積1 - 1 - 2 日東電工株式会社内

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 標識複合体および免疫学的検査法

(57)【要約】 (修正有)

【課題】ペロ毒素産生性大腸菌の判定が可能であり、ペロ毒素1型と2型の検出を簡便、迅速にかつ同時に検出することができる免疫学的検査法を提供すること。

【解決手段】V T 1 第1特異的結合物質とV T 2 第1特異的結合物質とを同一担体上に固定化した標識複合体；免疫クロマトグラフィーで、吸水性基材上の一端にV T 1 第2特異的結合物質とV T 2 第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片の固定相上で、下記：(a) V T 1 第1特異的結合物質とV T 2 第1特異的結合物質とを同一担体上に固定化した標識複合体、(b) 被検試料中のV T 1 又はV T 2、及び(c) 固定相上のV T 1 第2特異的結合物質又はV T 2 第2特異的結合物質、からなる複合体を形成させ、該複合体を検出することを特徴とする、免疫学的検査法；ならびに免疫クロマトグラフィー用キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 ペロ毒素1型(VT1という)に特異的に結合しうる第1特異的結合物質(VT1第1特異的結合物質という)とペロ毒素2型(VT2という)に特異的に結合しうる第1特異的結合物質(VT2第1特異的結合物質という)とを同一担体上に固定化してなる標識複合体。

【請求項2】 担体が、着色粒子、金属コロイド及び水分散型高分子粒子からなる群より選択された1種である、請求項1記載の標識複合体。

【請求項3】 免疫クロマトグラフィーにおいて、吸水性基材上の一端にVT1に特異的に結合しうる第2特異的結合物質(VT1第2特異的結合物質)とVT2に特異的に結合しうる第2特異的結合物質(VT2第2特異的結合物質)とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片の固定相上で、下記：

(a) VT1に特異的に結合しうる第1特異的結合物質(VT1第1特異的結合物質)とVT2に特異的に結合しうる第1特異的結合物質(VT2第1特異的結合物質)とを同一担体上に固定化してなる標識複合体、

(b) 被検試料中のVT1又はVT2、及び(c) 固定相上のVT1第2特異的結合物質又はVT2第2特異的結合物質、からなる複合体を形成させ、該複合体を検出することを特徴とする、免疫学的検査法。

【請求項4】 (I) 前記(a)の標識複合体と被検試料とを接触させて、該標識複合体と前記(b)のVT1又はVT2との複合体を形成するステップ；(II) 吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片で、前記(I)のステップで得られた複合体を展開するステップ；並びに(III) 前記(II)のステップで展開された複合体を、固定相に捕捉するステップを含む、請求項3記載の免疫学的検査法。

【請求項5】 (I) 吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片の他端から、被検試料を展開し、該固定相で被検試料中のVT1又はVT2を捕捉するステップ；並びに(II) 試験片に前記(a)の標識複合体を展開し、固定相に捕捉するステップを含む、請求項3記載の免疫学的検査法。

【請求項6】 (I) 吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有し、かつ該吸水性基材上の他端に試薬受領部を有する試験片上の固定相と試薬受領部との間に、被検試料を供するステップ；

(II) 該試薬受領部に前記(a)の標識複合体を供して、展開し、それにより、該標識複合体と前記(b)のVT1又はVT2との複合体を形成するステップ；並びに

(III) 前記(II)のステップで得られた複合体を展開

し、固定相に捕捉するステップを含む、請求項3記載の免疫学的検査法。

【請求項7】 (A) VT1に特異的に結合しうる第1特異的結合物質(VT1第1特異的結合物質)とVT2に特異的に結合しうる第1特異的結合物質(VT2第1特異的結合物質)とを同一担体上に固定化してなる標識複合体；及び(B) 吸水性基材上の一端にVT1に特異的に結合しうる第2特異的結合物質(VT1第2特異的結合物質)とVT2に特異的に結合しうる第2特異的結合物質(VT2第2特異的結合物質)とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片を含有してなる、免疫クロマトグラフィー用キット。

【請求項8】 (B)の試験片が、吸水性基材上の他端に試薬受領部をさらに有するものである、請求項7記載の免疫クロマトグラフィー用キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、簡単、迅速に且つ高精度に、被検試料中のペロ毒素1型と2型の検出を同一の試験片上で同時に行なうことができる免疫学的検査用の標識複合体および免疫学的検査法に関するものである。

【0002】

【従来技術】近年問題となっているペロ毒素産生性大腸菌であるO157は、主に感染源となる食品から体内に入り、4～9日間程度の潜伏期間を経たのちに発症する。また、血便は感染初期から呈することもあり、そのうち、場合によってはO157が産生するペロ毒素の作用によって、溶血性貧血、腎不全、血小板減少などの症状を引き起こし、溶血性尿毒症症候群(HUS)に至ることもある。

【0003】下痢症状を有する患者の糞便中から、このようなペロ毒素産生性大腸菌の診断を行なう操作は非常に煩雑であり、結果が出るまでには多くの日数を要するものであるが、最近では免疫測定法を用いることによって比較的簡便に検出することができるようになっている。

【0004】具体的な検出法としては、ラテックス凝集法(商品名：大腸菌O157検出キット「UNI」、ユニパス社製)を用いる方法がある。その他に、ELISA法(商品名：オーソE.coli O157、オーソダイアグノスティック社製)がある。しかしながら、上記のラテックス凝集法は測定するまでに増菌培養が必要であり、ELISA法は操作に手間がかかるものである。

【0005】一方、近年、迅速かつ簡便に免疫学的検査が行なえる方法として、免疫クロマトグラフ法が注目されている。かかる免疫クロマトグラフ法は、例えば、以下のようなステップにより行なわれる：被検物質と結合しうる特異的結合物質を固定化した固定相を有する吸水性基材上で被検液を展開する。ついで、前記被検物質に特異的に結合しうる特異的結合物質を有する標識複合体

10

20

30

40

50

と被検物質との複合体を前記固定相上で捕捉する。その後、固定相に捕捉された標識複合体を検出することにより、被検試料中の被検物質を測定することができる。かかる免疫クロマトグラフ法による検査用キット（商品名：E.coli O157ダイレクトワコー、和光純薬社製）が市販されている。

【0006】しかしながら、上記の検出法は、すべてペロ毒素産生性大腸菌の外膜のO抗原であるリポ多糖（LPS）を検出し、直接的に菌の存在を測定する手法であり、糞便試料中でLPSは、経時的に分解・減少する

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、近年問題視されているO157に代表されるペロ毒素産生性大腸菌の判定が可能であり、ペロ毒素1型と2型の検出を簡便、迅速にかつ同時に検出することができる免疫学的検査法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明の要旨は、〔1〕ペロ毒素1型（VT1という）に特異的に結合しうる第1特異的結合物質（VT1第1特異的結合物質という）とペロ毒素2型（VT2という）に特異的に結合しうる第1特異的結合物質（VT2第1特異的結合物質という）とを同一担体上に固定化してなる標識複合体、〔2〕免疫クロマトグラフィーにおいて、吸水性基材上の一端にVT1に特異的に結合しうる第2特異的結合物質（VT1第2特異的結合物質）とVT2に特異的に結合しうる第2特異的結合物質（VT2第2特異的結合物質）とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片の固定相上で、下記：

（a）VT1第1特異的結合物質とVT2第1特異的結合物質とを同一担体上に固定化してなる標識複合体、

（b）被検試料中のVT1又はVT2、及び（c）固定相上のVT1第2特異的結合物質又はVT2第2特異的結合物質、からなる複合体を形成させ、該複合体を検出することを特徴とする、免疫学的検査法、並びに〔3〕

（A）VT1に特異的に結合しうる第1特異的結合物質（VT1第1特異的結合物質）とVT2に特異的に結合しうる第1特異的結合物質（VT2第1特異的結合物質）とを同一担体上に固定化してなる標識複合体；及び（B）吸水性基材上の一端にVT1に特異的に結合しうる第2特異的結合物質（VT1第2特異的結合物質）とVT2に特異的に結合しうる第2特異的結合物質（VT2第2特異的結合物質）とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片を含有してなる、免疫クロマトグラフィー用キット、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の標識複合体は、ペロ毒素

1型（以下、VT1という）に特異的に結合しうる第1特異的結合物質とペロ毒素2型（以下、VT2という）に特異的に結合しうる第1特異的結合物質とを同一担体上に固定化したものである。

【0010】なお、本明細書において、「特異的結合物質」とは、ペロ毒素1型またはペロ毒素2型に特異的に結合しうる物質をいう。また、前記特異的結合物質のなかで、標識複合体に固定化される物質を、第1特異的結合物質といい、後述の試験片上の固定相に固定化される物質を、第2特異的結合物質という。具体的には、VT1に特異的に結合する第1特異的結合物質を、VT1第1特異的結合物質、VT1に特異的に結合する第2特異的結合物質を、VT1第2特異的結合物質と表記し、VT2に特異的に結合する第1特異的結合物質を、VT2第1特異的結合物質、VT2に特異的に結合する第2特異的結合物質を、VT2第2特異的結合物質と表記する。

【0011】本発明の標識複合体は、VT1第1特異的結合物質とVT2第1特異的結合物質とが同一担体上に固定化されているため、1回の検査で、VT1とVT2との両方を検出することが可能になるという優れた性質を有する。

【0012】一方、従来のように、抗VT1抗体を担体に固定化した標識複合体と抗VT2抗体を担体に固定化した標識複合体との2種を用いる場合、展開混合液中（被検物質+標識複合体）に添加するラテックスビーズ量は、被検物質であるVT1およびVT2それぞれに対して、十分な検出感度を得るに適した量であることが望ましい。すなわち、各被検物質は、ある一定量の標識複合体を各々添加する必要がある。その結果、標識複合体濃度の上昇により、バックグラウンドの上昇を招き、目視判定の妨げとなるという欠点を有する。

【0013】しかしながら、本発明の標識複合体のように、抗VT1抗体と抗VT2抗体とを同一担体上に固定化した標識複合体の場合、1種類の標識複合体を添加するだけでよいため、標識複合体濃度は一定であり、発色感度を保ちつつ、バックグラウンドの発色を抑制することができるという優れた効果を発揮する。

【0014】ペロ毒素産生性大腸菌は、人体など感染後、産生するペロ毒素により様々な症状を引き起こす。血便は、感染初期から呈することもあり、そののち、場合によっては溶血性貧血や腎不全や血小板減少などの症状を引き起こし、溶血性尿毒症症候群（HUS）に至ることもある。ペロ毒素1型とペロ毒素2型の両者共に人体への病原因子となりうるが、ペロ毒素2型がHUSなどの重篤な症状に移行しやすいと疑われている。したがって、ペロ毒素の検査において、1型と2型との判別は、治療指針の設定に重要である。本発明の標識複合体によれば、1回の検査で、ペロ毒素産生性大腸菌が産生している毒素の種類が判明するため、重篤症状への移行

を早期に予見することができるという優れた効果を発揮する。

【0015】特異的結合物質としては、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、単鎖抗体などが挙げられる。第1特異的結合物質と第2特異的結合物質とは、用いる抗体の種類によっても異なるが、同一の抗原決定基を認識する同一種の抗体を用いてもよく、異なる抗原決定基を認識する二種の抗体を用いてもよい。一方の特異的結合物質がモノクローナル抗体である場合には、もう一方の特異的結合物質は、当該モノクローナル抗体とは異なる抗原決定基を認識するものであることが望ましい。

【0016】本発明の標識複合体における第1特異的結合物質の全固定化量は、検出感度及び再現性の観点から、担体乾燥重量1gあたり0.5mg以上、好ましくは1mg以上であることが望ましく、経済性及び凝集の防止の観点から、担体乾燥重量1gあたり100mg以下、好ましくは50mg以下であることが望ましい。

【0017】本発明の標識複合体に用いられる担体としては、その表面上に、特異的結合物質および、任意に標識物質を固定することができる担体であればよく、金属コロイド、水分散型高分子粒子が挙げられる。

【0018】金属コロイドとしては、金コロイドやセレンウムコロイド等が例示される。

【0019】前記水分散型高分子粒子は、不飽和二重結合を有する少なくとも1種の単量体の乳化重合によって調製される。かかる単量体としては、例えば、エチレン、プロピレンなどのオレフィン系単量体、酢酸ビニル、塩化ビニルなどのビニル系単量体、スチレン、メチルスチレン、クロロスチレンなどのスチレン系単量体、メタアクリル酸メチルなどのメタクリル酸エステル系単量体、ブタジエンなどのジエン系単量体などが挙げられる。

【0020】水分散型高分子粒子は、単量体の単重合体または共重合体に改質用単量体を共重合して得られた重合体でもよい。このような改質用単量体としては、例えば、アクリル酸、メタクリル酸、2,2,2-トリフルオロエチルメチルメタクリレートなどのフッ素化メタクリル酸エステル、アクリロニトリル、メタクリロニトリル、アクリルアミド、スチレンスルホン酸ナトリウム、スルホプロピル(メタ)アクリレートナトリウム塩、N-ビニル-2-ピロリドン、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、グリシジルメタクリレートなどが挙げられる。

【0021】また本発明においては、担体は、市販されている種々の水分散性高分子粒子でもよい。市販されている水分散性高分子粒子としては、例えば、スチレン-ブタジエン共重合体、スチレン-アクリロニトリル-ブタジエン共重合体等の種々のスチレン共重合体からなるエマルジョン等のスチレンまたはその誘導体を単量体成

分とする単重合体や共重合体のエマルジョン；(メタ)アクリル酸の長鎖アルキルエステルまたはその誘導体を単量体成分とする単重合体、該単量体成分と(メタ)アクリル酸メチルや(メタ)アクリル酸エチル、グリシジル(メタ)アクリレート等との共重合体；前記したスチレンまたはその誘導体と、(メタ)アクリレートエステルやその誘導体との共重合体；ゴム、ナイロン、ポリウレタン、微結晶質セルロース等が挙げられる。

【0022】個々の単量体の具体的な種類は、得られる水分散型高分子粒子を担体として使用された標識複合体が、その使用時や保存時に融着、凝集を起こさないように当該高分子粒子が所要のガラス転移点を有するように選ばれる。水分散型高分子粒子のガラス転移点は、好ましくは10以上、特に好ましくは室温以上であることが望ましい。

【0023】担体として水分散型高分子粒子を用いる場合、後述の着色ラテックスとして用いてもよく、酵素、蛍光物質などに代表される標識物質を固定化した水分散型高分子粒子として用いてもよい。担体として、酵素を固定化した水分散型高分子粒子を用いる場合、適宜、標識複合体の展開の後に、酵素基質を展開してもよい。

【0024】前記酵素としては、公知の標識に用いられる酵素を用いることができる。具体的にはペルオキシダーゼ、D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、エステラーゼ、D-グルクロニダーゼ等が挙げられる。より高感度で安定な検出を達成することが可能なペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼが好ましい。

【0025】前記蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート等が挙げられる。

【0026】担体は、着色粒子でもよい。着色粒子としては、肉眼で検出可能なものであればよく、例えば、金、銀、銅などの金属からなるコロイド粒子、スタンブルーやスタンレッドIV、スタンIII、オイルオレンジ、キニザリングリーンなどに代表される顔料や染料などでラテックスを着色してなる着色ラテックスなどが挙げられる。目視確認性の点からは、好ましくは、金コロイド；青色、赤色、緑色またはオレンジ色などに着色した着色ラテックスが望ましく、さらに好ましくは、青色や赤色などで着色した水分散型高分子重合体粒子からなる着色ラテックスを用いることが分散安定性や検出感度の調整し易さなどの点から望ましい。

【0027】上記担体の粒径は、着色粒子を用いる場合、十分な目視確認性を得る観点から、平均粒子径約0.01μm以上であり、好ましくは約0.05μm以上であることが望ましく、吸水性基材における目詰まり及び非特異的発色を抑制する観点から、平均粒子径約3μm以下であり、好ましくは約0.5μm以下であることが望ましい。

【0028】前記担体に第1特異的結合物質を固定化する方法としては、従来からよく知られている方法、例えば共有結合法、物理的吸着法、イオン結合法などが挙げられる。なかでも、固定化後の特異的結合物質の安定性の観点から、共有結合法が望ましい。

【0029】標識複合体は、抗原抗体反応が行なわれうるpH及び塩濃度の緩衝液に分散させて用いてもよい。この時、展開時の標識複合体濃度は、固定相に結合する粒子数を向上させ目視確認性を向上させる観点から、0.005重量%以上であり、好ましくは0.01重量%以上であることが望ましく、経済性、十分な目視確認性を得る観点から、5重量%以下であり、好ましくは0.5重量%以下であることが望ましい。なお、標識複合体を含有した溶液を標識複合体液ともいう。

【0030】本発明の標識複合体によれば、ペロ毒素1型とペロ毒素2型の検出を同時に、簡便かつ迅速に検出することができる免疫学的検査法を行なうことができる。かかる免疫学的検査法も本発明の範囲に含まれる。

【0031】本発明の免疫学的検査法は、免疫クロマトグラフィーにおいて、吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片の固定相上で、下記：

(a) VT1第1特異的結合物質とVT2第1特異的結合物質とを同一担体上に固定化してなる標識複合体、

(b) 被検試料中のVT1又はVT2、及び(c) 固定相上のVT1第2特異的結合物質又はVT2第2特異的結合物質、からなる複合体を形成させ、該複合体を検出することを特徴とする。

【0032】ここで、被検試料は、液体であっても、固体であってもよい。被検試料が固体である場合、該被検試料を適切な緩衝液等に懸濁して、液体試料として用いてもよい。

【0033】本発明の免疫学的検査方法は、具体的には、下記の態様が挙げられる：

態様1

(I) 前記(a)の標識複合体と被検試料とを接触させて、該標識複合体と前記(b)のVT1又はVT2との複合体を形成するステップ；

(II) 吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片で、前記(I)のステップで得られた複合体を展開するステップ；並びに

(III) 前記(II)のステップで展開された複合体を、固定相に捕捉するステップを含む、免疫学的検査法。

【0034】態様2 (I) 吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片の他端から、被検試料を展開し、該固定相で被検試料中のVT1又はVT2を捕捉するステップ；並びに(II) 試験片に

前記(a)の標識複合体を展開し、固定相に捕捉するステップを含む、免疫学的検査法。

【0035】態様3 (I) 吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有し、かつ該吸水性基材上の他端に試薬受領部を有する試験片上の固定相と試薬受領部との間に、被検試料を供するステップ；(II) 該試薬受領部に前記(a)の標識複合体を供して、展開し、それにより、該標識複合体と前記(b)のVT1又はVT2との複合体を形成するステップ；並びに(III) 前記(II)のステップで得られた複合体を展開し、固定相に捕捉するステップを含む、免疫学的検査法。

【0036】前記態様1の方法において、まず、被検試料と標識複合体液とを混合させる。この時、被検試料中にVT1及び/又はVT2が含まれる場合、該VT1及び/又はVT2は、それぞれに特異的に結合する各標識複合体と結合し、標識複合体とVT1又はVT2との複合体〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT1〕又は〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT2〕をそれぞれ形成する。ついで、VT1及びVT2のそれぞれに対応する固定相を設けた吸水性基材の一端から、前記被検試料と標識複合体液との混合物を吸収させる。混合物中で形成された複合体は、液体成分の移動とともに吸水性基材を移動し、固定相に到達する。固定相においては、移動してきた複合体が、対応する固定相に固定された第2特異的結合物質と更に結合し、新たに〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT1-第2特異的結合物質〕又は〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT2-第2特異的結合物質〕の複合体を形成して、固定相上に固定化される。VT1又はVT2に対応する固定相に固定化された複合体を検出することにより、VT1又はVT2の存在を検査することができる。

【0037】前記態様2の方法において、VT1及びVT2のそれぞれに対応する固定相を設けた吸水性基材の一端から、被検試料を吸収させ、被検試料中のVT1又はVT2を固定相上の対応する第2特異的結合物質に結合させる。それにより、〔VT1-第2特異的結合物質〕又は〔VT2-第2特異的結合物質〕が形成される。この方法では、被検試料は、液体であっても、固体であってもよい。被検試料が固体である場合、該被検試料を適切な緩衝液等に懸濁して、液体試料として用いる。ついで、標識複合体液を展開することにより、各標識複合体は、固定相に結合しているVT1又はVT2と複合体を形成して、新たに〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT1-第2特異的結合物質〕又は〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT2-第2特異的結合物質〕の複合体を形成して、固定相上に固定化結合される。VT1又はVT2に対応する固定相に固定化された複合体を検出することにより、VT1又

はVT2の存在を検査することができる。

【0038】前記態様3の方法において、まず、試験片上の固定相と試薬受領部との間に、被検試料を供する。ついで、試験片上の試薬受領部から標識複合液体を展開させる。これにより、対応する標識複合体と被検試料中のVT1又はVT2との複合体が形成する。形成した複合体は、液体成分の移動とともに吸水性基材を移動し、固定相に到達する。固定相においては、移動してきた複合体が、固定化された対応する第2特異的結合物質と結合し、新たに〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT1-第2特異的結合物質)又は〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT2-第2特異的結合物質)の複合体を形成して、固定相上に固定化される。VT1又はVT2に対応する固定相に固定化された複合体を検出することにより、VT1又はVT2の存在を検査することができる。

【0039】このように、〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT1-第2特異的結合物質)又は〔標識複合体(担体-第1特異的結合物質)-VT2-第2特異的結合物質)の複合体は、それぞれ対応する固定相に捕捉される。そのため、標識複合体中の担体は、一カ所に集積し、固定化されるので、明瞭な呈色を得ることができる。したがって、被検物質の存在を目視確認できる。本発明では固定相には、VT1及びVT2のそれぞれに対応する第2特異的結合物質がそれぞれ異なった位置に固定されているので、一度にVT1及びVT2のそれぞれの存在を確認することができる。

【0040】本発明に用いられる試験片としては、吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片が挙げられる。また、前記試験片において、吸水性基材上の他端に試薬受領部をさらに有する試験片であってもよい。

【0041】試験片に用いられる吸水性基材は、被検試料、例えば、食品から抽出した溶液や培養液の上澄み、糞便懸濁(溶解)溶液;これらを緩衝液によって希釈して得られた希釈液;標識複合体を含有した液などを吸収・展開できるものであればよい。本発明においては、検査時間の短縮及び検出感度の向上の観点から、被検試料中のVT1又はVT2と、標識複合体や固定相上の対応する第2特異的結合物質とが、十分に抗原抗体反応をするための時間を確保できるような吸水性を有する吸水性基材が用いられる。具体的には、例えば、不織布、濾紙、ガラス繊維布、ガラスフィルター、ニトロセルロースフィルター、多孔質材料等が挙げられる。これらの基材は適度な吸水速度を有すると共に、担体が結合して発色した際の目視確認性に優れるものである。

【0042】以上の点を考慮すると、本発明における吸水性基材の吸水の程度は、5mm幅の短冊状に裁断した吸水性基材の片端部を水に浸漬し、1分間経過後の吸水

距離が0.5~5cm程度のものが望ましい。

【0043】また、前記基材の吸水性を調整するために、吸水性基材の表面に親水性重合体や界面活性剤を被覆させることもでき、該基材を親水性重合体や界面活性剤を含浸させることもできる。さらに、本発明においては、吸水性基材として同一材料からなる基材を用いてもよいし、あるいは異種の材料からなるものを任意の接合手段によって接合して得た連続した基材を用いることもできる。

【0044】本発明において、吸水性基材の形状は、被検試料を展開できる形状であれば特に限定されるものではなく、例えば、矩形のシート状(片状)やロッド状などが好ましい。

【0045】本発明において、固定相とは、吸水性基材上の一端において、VT1第2特異的結合物質又はVT2第2特異的結合物質が固定化された領域を意味する。第2特異的結合物質を吸水性基材上に固定化する方法(固定化相の作製方法)は、特に限定されないが、従来から知られている物理吸着法及び共有結合法が好適であり、特に、特異的結合物質が基材から脱離しにくい観点から、共有結合法が望ましい。吸水性基材が上記共有結合法のための官能基を有しないときは、例えば適宜の官能基を有する重合体を、吸水性基材の吸水性を阻害しない程度に付着させる。また、第2特異的結合物質および親水性重合体を含む溶液を吸水性基材に塗布したのち、前記親水性重合体を凝固させる凝固溶剤に浸漬することで固定相を作製することもできる。親水性重合体としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロースなどが挙げられる。凝固溶剤としては、アセトン、エタノール、メタノール、エーテルなどが挙げられる。

【0046】固定化する第2特異的結合物質の量は、検出感度及び再現性の観点から、0.01~1mg/cm²であることが望ましい。

【0047】各固定相に関して、被検試料の吸液によって移動してきたVT1、VT2、対応する複合体などを捕捉して、VT1及びVT2を別々に検出するためには、各第2特異的結合物質は少なくとも1mm以上、各発色が混じり合わないようするためには、好ましくは5mm以上の間隔を設けて吸水性基材上に固定化することが望ましい。

【0048】また、試験片における固定相と、被検試料および/または標識複合体を含有する液の吸収が開始される部位(以下、試薬受領部という)との間の距離は、適切な発色感度、検査に要する時間の短縮の観点から、1cm以上、好ましくは3cm以上であることが望ましく、発色の均一性、発色感度の向上の観点から、6cm以下、好ましくは4cm以下であることが望ましい。

【0049】なお、前記固定相は、前記試薬受領部から同じ距離の異なる位置に各固定相を並列に配置してもよ

く、前記試薬受領部から異なる距離の位置に各固定相を直列に配置してもよい。

【0050】試薬受領部としては、被検試料や標識複合体を含有する液の吸水性基材への移動を妨げないものであればよく、吸水性基材と兼用したものであっても、新たに不織布や織布等を該吸水性基材に接着させたものであってもよい。

【0051】本発明の免疫学的検査方法は、本発明の免疫クロマトグラフィー用キットを用いることにより、より好適に実施できる。前記免疫クロマトグラフィー用キットとしては、(A)VT1第1特異的結合物質とVT2第1特異的結合物質とを同一担体上に固定化してなる標識複合体；及び(B)吸水性基材上の一端にVT1第2特異的結合物質とVT2第2特異的結合物質とを異なる位置に固定化した固定相を有する試験片を含有した、免疫クロマトグラフィー用キットが挙げられる。また、前記(B)の試験片が、吸水性基材上の他端に試薬受領部をさらに有するものである、免疫クロマトグラフィー用キットであってもよい。当該キットを構成する標識複合体及び試験片は、前記したものと同様のものが用いられる。

【0052】例えば、本発明の免疫クロマトグラフィー用キットを用いて検査する場合、用いる吸水性基材の種類や大きさ、用いる特異的結合物質の特性によっても異なるが、通常、液量にして1~500μl、VTの量にして、0.01~1.0×10⁵ ngの被検試料を好適に測定することが可能である。

【0053】

【実施例】以下に本発明の実施例を挙げ、さらに具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

【0054】実施例1

(1) 標識複合体の作製

青色着色カルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子分散液(固形分濃度5重量%、平均粒子径約0.1μm、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0)3mlに水溶性カルボジイミド(10mg/ml)1ml、抗ペロ毒素1型抗体(マウスIgG、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0)1ml及び抗ペロ毒素2型抗体(マウスIgG、1mg/ml、0.01M-ホウ酸

*緩衝液pH8.0)1mlを加えて10で3時間反応させた。ついで、得られた反応物について、洗浄液として0.01M-ホウ酸緩衝液(pH8.0)を用いて遠心分離洗浄を行ない、抗VT1抗体と抗VT2抗体との両方を固定化した青色着色ラテックス粒子からなる標識複合体を得た(固形分濃度2%)。

【0055】(2) 試験片の作製

吸水性基材として、ニトロセルロースメンブラン(孔径8μm、6mm×60mm)を用い、該メンブランの一端から25mmの箇所に抗ペロ毒素1抗体(マウスIgG、2mg/ml)、20mmの箇所に抗ペロ毒素2抗体(マウスIgG、2mg/ml)をそれぞれ1.5μlずつ、ディスペンサーを用いてライン状に塗布した。かかるライン状の領域を固定相とする。なお、かかる固定相側の端部を下流端とする。

【0056】得られたメンブランをウシ血清アルブミン(1重量%)とポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(和光純薬工業社製、0.1重量%)とからなる水溶液中に10分間浸漬させた後、40で2時間乾燥させた。

【0057】ついで、得られたメンブランの裏側(抗体塗布面の反対側)にポリエステルフィルム(90μm厚、大きさ:6mm×60mm)をスプレー糊を用いて貼り合わせた。

【0058】上流端から0~8mmの箇所にポリエステル不織布(6mm×8mm、厚さ2.5mm)を貼り合わせて、試薬受領部を作製した。以上のように試験片を得た。

【0059】(3) VT2及びVT2の検出

0.1Mリン酸緩衝液(0.9重量%NaCl含有、pH7.4)にVT1型、VT2型を表1に示した濃度で分散させた被検試料を調製した。

【0060】この被検試料に前記(1)で得られた標識複合体を固形分濃度0.02重量%となるように混合した後、混合液100μlを上記で作製した試験片のポリエステル不織布部に滴下し、20分後の発色の有無を目視観察した。

【0061】

【表1】

被検試料	VT1 (ng/ml)	10	10	0	5	5	0	0
	VT2 (ng/ml)	10	0	10	5	0	5	0
固定相	VT1	+	+	-	+	+	-	-
	VT2	+	-	+	+	-	+	-
バックグラウンド		着色なし、視認性良好						

【0062】表1に示すように、バックグラウンドの着色は見られず、視認性が良好であることがわかる。

【0063】比較例1

(1) 標識複合体の作製

青色着色カルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子分散液（固形分濃度5重量%、平均粒子径約0.1μm、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0）3mlに水溶性カルボジイミド（10mg/ml）1ml、および抗ペロトキシン1型抗体（マウスIgG、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0）1mlを加えて10で3時間反応させた。その後、得られた反応物について、洗浄液としてホウ酸緩衝液（pH8.0）を用いて、遠心分離洗浄を行ない、抗VT1抗体を固定化した青色着色ラテックス粒子からなる標識複合体を得た（固形分濃度2%）。

【0064】同様に、青色着色カルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子分散液（固形分濃度5重量%、平均粒子径約0.1μm、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0）3mlに水溶性カルボジイミド（10mg/ml）1ml、および抗ペロトキシン2型抗体（マウスIgG、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0）1mlを加えて10で3時間反応させた後、洗浄液としてホウ酸緩衝液（pH8.0）を用いて遠心分離洗浄を行ない、抗VT2抗体を固定化した青色着色ラテックス粒子からなる標識複合体を得た（固形分濃度2%）。

【0065】（2）試験片の作製

吸水性基材として、ニトロセルロースメンブラン（孔径8μm、6mm×60mm）を用い、該メンブランの一端から25mmの箇所に抗ペロ毒素1抗体（マウスIgG、2mg/ml）、20mmの箇所に抗ペロ毒素2抗体（マウスIgG、2mg/ml）をそれぞれ1.5μ*

被検試料	VT1 (ng/ml)	10	10	0	5	5	0	0
	VT2 (ng/ml)	10	0	10	5	0	5	0
固定相	VT1	+	+	-	-	-	-	-
	VT2	+	-	+	-	-	-	-
バックグラウンド		着色が強く視認困難						

【0072】表2に示すように、バックグラウンドにおける着色が強く、目視観察が困難であることがわかる。

【0073】比較例2

（1）標識複合体の作製

青色着色カルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子分散液（固形分濃度5重量%、平均粒子径約0.1μm、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0）3mlに水溶性カルボジイミド（10mg/ml）1ml、および抗ペロトキシン1型抗体（マウスIgG、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0）1mlを加えて10で3時間反応させた。その後、得られた反応物について、洗浄液として0.01M-ホウ酸緩衝液（pH8.0）を用いて遠心分離洗浄を行ない、抗VT1抗体を固定化した青色着色ラテックス粒子からなる標識複合

*1ずつ、ディスペンサーを用いてライン状に塗布した。かかるライン状の領域を固定相とする。なお、かかる固定相側の端部を下流端とする。

【0066】得られたメンブランをウシ血清アルブミン（1重量%）とポリオキシエチレン（10）オクチルフェニルエーテル（和光純薬工業社製、0.1重量%）とからなる水溶液中に10分間浸漬させた後、40で2時間乾燥させた。

【0067】ついで、得られたメンブランの裏側（抗体塗布面の反対側）にポリエステルフィルム（90μm厚、大きさ：6mm×60mm）をスプレー糊を用いて貼り合わせた。

【0068】上流端から0~8mmの箇所にポリエステル不織布（6mm×8mm、厚さ2.5mm）を貼り合わせて、試薬受領部を作製した。以上のように試験片を得た。

【0069】（3）VT1及びVT2の検出
0.1M-リン酸緩衝液（0.9重量%NaCl含有、pH7.4）にVT1型、VT2型を表2に示した濃度で分散させた被検試料を調製した。

【0070】この被検試料に、前記（1）で得られた標識複合体をそれぞれ固形分濃度0.02重量%となるように混合した後、混合液100μlを上記で作製した試験片のポリエステル不織布部に滴下し、20分後の発色の有無を目視観察した。その結果を表2に示す。

【0071】

【表2】

体を得た（固形分濃度2%）。

【0074】同様に、青色着色カルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子分散液（固形分濃度5重量%、平均粒子径約0.1μm、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0）3mlに水溶性カルボジイミド（10mg/ml）1ml、および抗ペロトキシン2型抗体（マウスIgG、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液pH8.0）1mlを加えて10で3時間反応させた。その後、得られた反応物について、洗浄液として0.01M-ホウ酸緩衝液（pH8.0）を用いて遠心分離洗浄を行ない、抗VT2抗体を固定化した青色着色ラテックス粒子からなる標識複合体を得た（固形分濃度2%）。

【0075】（2）試験片の作製

吸水性基材として、ニトロセルロースメンブラン（孔径

8 μm、6 mm×60 mm)を用い、該メンブレンの一端から25 mmの箇所に抗ペロ毒素1抗体(マウスIgG、2 mg/ml)、20 mmの箇所に抗ペロ毒素2抗体(マウスIgG、2 mg/ml)をそれぞれ1.5 μlずつ、ディスペンサーを用いてライン状に塗布した。かかるライン状の領域を固定相とする。なお、かかる固定相側の端部を下流端とする。

【0076】得られたメンブレンをウシ血清アルブミン(1重量%)とポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル(和光純薬工業社製、0.1重量%)とからなる水溶液中に10分間浸漬させた後、40℃で2時間乾燥させた。

【0077】ついで、得られたメンブレンの裏側(抗体塗布面の反対側)にポリエステルフィルム(90 μm厚、大きさ:6 mm×60 mm)をスプレー糊を用いて貼り合わせた。

*【0078】上流端から0~8 mmの箇所にポリエステル不織布(6 mm×8 mm、厚さ2.5 mm)を貼り合わせて、試薬受領部を作製した。以上のように試験片を得た。

【0079】(3)VT1及びVT2の検出
0.1 M-リン酸緩衝液(0.9重量%NaCl含有、pH7.4)にVT1型、VT2型を表3に示した濃度で分散させた被検試料を調製した。

【0080】この被検試料に前記(1)で得られた標識複合体をそれぞれ固形分濃度0.01重量%となるように混合した後、混合液100 μlを上記で作製した試験片のポリエステル不織布部に滴下し、20分後の発色の有無を目視観察した。その結果を表3に示す。

【0081】

【表3】

被検試料	VT1 (ng/ml)	10	10	0	5	5	0	0
	VT2 (ng/ml)	10	0	10	5	0	5	0
固定相	VT1	+	+	-	-	-	-	-
	VT2	+	-	+	-	-	-	-
バックグラウンド	着色なし、かつ視認性良好であるが感度低下							

【0082】表3に示すように、バックグラウンドにおける着色は見られず、視認性が良好であったが、実施例に比べ、感度が低下することがわかる。

【0083】

【発明の効果】本発明の標識複合体によれば、食品中に存在するVTの検出や、糞便中に存在するVT1とVT2とを、1回の検査で、同時に検出することを可能にする。

また、本発明の免疫学的検査法によれば、1回の検査で、VT1とVT2の検出を同時に、簡便かつ迅速に検出することができるという優れた効果を奏する。また、本発明の免疫クロマトグラフィー用キットによれば、本発明の免疫学的検査法を簡便に行なうことができる。

フロントページの続き

(72)発明者 森岡 量子
大阪府茨木市下穂積1-1-2 日東電工株式会社内

(72)発明者 千田 修治
大阪府茨木市下穂積1-1-2 日東電工株式会社内

Fターム(参考) 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ06 QQ79
QQ91 QR48 QR56 QR83 QR84
QS33 QX01

专利名称(译)	标记复合物和免疫学试验方法		
公开(公告)号	JP2002148264A	公开(公告)日	2002-05-22
申请号	JP2000339084	申请日	2000-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	日东电工株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东电工株式会社		
[标]发明人	岡田圭策 岡田研一 森岡量子 千田修治		
发明人	岡田 圭策 岡田 研一 森岡 量子 千田 修治		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/10 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/53.S C12Q1/10 G01N33/543.521		
F-TERM分类号	4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ06 4B063/QQ79 4B063/QQ91 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QR83 4B063/QR84 4B063/QS33 4B063/QX01		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

(经修改) A为产生vero毒素的大肠杆菌的可能的判定, vero毒素1型和2方便类型检测, 快速, 以提供能够同时检测的免疫测定方法。甲VT1固定的标记复合物与第一个特异性结合物质和VT2第一特异性结合物质与在同一载波上;在免疫色谱法, VT1第二特定于吸水性基板的一个端部在固定在上, 下面的不同固定相结合剂和VT2第二特异性结合物质和具有固定相的试验片: (1) 第一-VT1特异性结合物质和VT2第一特异性结合物质 (B) 测试样品中的VT1或VT2和 (c) 来自固定在同一载体上的标记复合物的固定相上的VT1第二特异性结合物质或VT2第二特异性结合物质, 并检测所述复合物;和用于免疫层析的试剂盒。

gG, 1mg/ml, 0.01M-ホウ酸*40

被検試料	VT1 (ng/ml)	10	10	0	5	5	0	0
	VT2 (ng/ml)	10	0	10	5	0	5	0
固定相	VT1	+	+	-	+	+	-	-
	VT2	+	-	+	+	-	+	-
バックグラウンド		着色なし、視認性良好						