

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	521		G 0 1 N 33/543	521
33/53			33/53	D
33/545			33/545	A
33/552			33/552	
33/553			33/553	
審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 9 数) 最終頁に続く				

(21)出願番号	特願2001 - 72260(P2001 - 72260)	(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
(22)出願日	平成13年3月14日(2001.3.14)	(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
		(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
		(74)代理人	100095832 弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 免疫測定法

(57)【要約】

【課題】バックグラウンド発色が生じることなく被検物質を検出できる免疫測定法を提供すること。

【解決手段】免疫クロマトグラフ法において、界面活性剤の存在下、被検試料を、(a) 吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合しうる第 1 の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片に展開することを特徴とする、免疫測定法。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 免疫クロマトグラフ法において、界面活性剤の存在下、被検試料を、(a) 吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合しうる第 1 の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片に展開することを特徴とする、免疫測定法。

【請求項 2】 (1) 被検試料と界面活性剤とを混合して、混合物を得るステップ、および (2) 前記 (1) で得られた混合物を、試験片に滴下して、展開するステップ、を含み、被検試料中における被検物質の有無を、下記 (b) と (c) : (b) 試験片の固定相における第 1 の特異的結合物質に捕捉された被検物質、(c) 金属コロイド粒子、水分散型高分子粒子、シリコンおよびガラスケイソウ土粒子からなる群より選ばれた 1 種の粒子を担体とし、該担体に、被検物質に特異的に結合しうる第 2 の特異的結合物質と標識物質とを固定化した標識複合体、との複合体の有無により検出する、請求項 1 記載の免疫測定法。

【請求項 3】 ステップ (1) において、得られた混合物中における界面活性剤濃度が 0.01 ~ 3 重量%である、請求項 1 または 2 記載の免疫測定法。

【請求項 4】 被検物質が細菌由来の物質である、請求項 2 または 3 記載の免疫測定法。

【請求項 5】 細菌がグラム陰性菌である、請求項 4 記載の免疫測定法。

【請求項 6】 グラム陰性菌が大腸菌である、請求項 5 記載の免疫測定法。

【請求項 7】 細菌由来の物質が、ベロ毒素または志賀毒素である、請求項 4 ~ 6 いずれかに記載の免疫測定法。

【請求項 8】 担体として使用する粒子が、金コロイド粒子またはラテックス粒子である、請求項 2 ~ 7 いずれかに記載の免疫測定法。

【請求項 9】 標識物質が、着色粒子、酵素または蛍光物質である、請求項 2 ~ 8 いずれかに記載の免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、バックグラウンド発色が抑制されうる免疫測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】大腸菌 O157 等の感染性病原体の検査、または感染症をはじめとする種々の疾患の診断分野において、免疫化学的検査が行なわれている。特に、被検物質を高感度かつ再現性よく測定するために、酵素免疫法 (EIA 法)、ラジオイムノアッセイ法 (RIA 法) 等の免疫測定法が汎用されている。しかしながら、かかる方法は、特別な設備が必要である。さらに前記免疫測定法は、操作時間、または検出時間が長く、洗浄工程も有するため、結果が出るまでに時間がかかるという

欠点を有する。

【0003】近年、迅速かつ簡便に免疫化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。当該方法は、例えば以下の工程を経る。被検試料中に被検物質が存在する場合、試験片上に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に、該被検物質に特異的に結合しうる特異的結合物質と標識物質とを含有した標識複合体と該被検物質との複合体が形成する。続いて固定相にて結合した標識物質を検出することにより、被検試料中に被検物質の存在を確認することができる。

【0004】また、被検物質が細菌由来の物質であり、その菌体に内在している場合、被検試料中に被検物質が含まれているにも関わらず検出ができない場合がある。このような場合、内包されている被検物質を放出させることが有効である。溶菌処理における溶菌剤としては、一般的に、ポリミキシン B 等の抗生物質が用いられる。

【0005】しかしながら、被検試料をポリミキシン B 等を溶菌剤として用いて処理し、得られた被検試料を免疫クロマト測定法に適用した場合、被検試料中の前記溶菌剤の存在により非特異的なシグナル (発色) が現れたり、バックグラウンド発色が高くなるため、確実な判定が妨げられるという欠点を有する。

【0006】したがって、菌体に内在する被検物質を放出させて、かつバックグラウンド発色の不具合のない免疫測定法が求められている。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前記従来技術に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、バックグラウンド発色が生じることなく被検物質を検出できる免疫測定法を提供することにある。

【0008】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、免疫クロマトグラフ法において、界面活性剤の存在下、被検試料を、(a) 吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合しうる第 1 の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片に展開することを特徴とする、免疫測定法、に関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の免疫測定法は、免疫クロマトグラフ法において、界面活性剤の存在下、被検試料を、(a) 吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合しうる第 1 の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片、に展開することを 1 つの特徴とする。本発明によれば、界面活性剤の存在下、被検試料を展開するため、溶菌剤 (ポリミキシン B 等) の影響が抑制されることにより、免疫クロマトグラフ法においてバックグラウンド発色が生じることなく被検物質を検出することができる。また溶菌作用を持つ界面活性剤を用いることにより溶菌剤 (ポリミキシン B 等) の添加が必要となくなる

ため、免疫クロマトグラフ法においてバックグラウンド発色が生じることなく被検物質を検出することができる。

【0010】本発明の免疫測定法により検出されうる被検物質としては、免疫化学的反応（すなわち抗原抗体反応）によりサンドイッチ免疫複合体を形成し得るものであれば特に制限されない。例えば、細菌（特に大腸菌O157、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌等の病原性大腸菌）、放線菌、酵母、かび、ウィルス（特にHIV、HBV、HCV等）等の微生物またはそれらに対する抗体、細菌等が産生する毒素などの細菌由来の物質、あるいは腫瘍マーカー抗原等の生体試料中の抗原性ペプチド等が挙げられる。本発明の免疫測定法は、特に細菌由来の物質を被検物質とし、細菌を溶菌して該被検物質を検出する場合に有利である。

【0011】前記細菌としては、例えば、大腸菌（具体的には大腸菌O157等）、腸炎ピブリオ等のグラム陰性菌、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌等のグラム陽性菌等が挙げられる。前記免疫測定法においては、市場での要求としてグラム陰性菌が好ましい。なかでも、大腸菌

【0012】また、前記細菌等が産生する毒素としては、具体的には病原性微生物が産生する毒素、菌体内の核酸等が挙げられる。かかる毒素としては、例えば、ペロ毒素、志賀毒素等が挙げられる。前記免疫測定法においては、毒素が細菌体内に内包されやすく、溶菌処理が必要であるという観点から、ペロ毒素および志賀毒素が好ましい。

【0013】本発明の免疫測定法において、被検試料としては、前記被検物質を含有する疑いがある試料が挙げられる。具体的には、培養液および血液成分等が挙げられる。また、前記被検試料は液体試料であってもよく、固体試料であってもよい。固体試料の場合、該固体試料を、例えば、緩衝液、生理的食塩水等の溶媒に、溶解または希釈して得られた溶液として用いてもよい。

【0014】前記界面活性剤は、標識複合体に作用することなく良好な検出が得られる観点から、ノニオン系またはノニオン-アニオン系の界面活性剤が好ましい。また、界面活性剤は、被検物質を変性させにくいものが望ましく、例えば、被検物質がタンパク質である場合には、好ましくはタンパク質変性作用の少ない界面活性剤が望ましい。前記界面活性剤は、バックグラウンド発色の抑制効果を十分に発揮し、かつ免疫反応を行ない得るものであればよく、免疫反応を阻害しにくい観点から、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート（TweenTM20）、ポリオキシエチレンモノパルミタート（TweenTM40）、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート（TweenTM60）、ポリオキシエチレンソルビタンモノオレエート（TweenTM80）、ポリオキシエチレンソルビタントリオレエート

（TweenTM85）、ポリオキシエチレンオクチルフェニルエーテル（TritonTMX-100）、ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム等が好ましい。また、被検物質が細菌菌体内に存在する物質である場合、界面活性剤は、溶菌作用を有するものが好ましい。

【0015】界面活性剤は、溶媒に溶解させて用いてもよい。前記溶媒は、バックグラウンド発色の抑制効果を十分に発揮し、かつ免疫反応を行ない得るものであればよく、例えば、蒸留水、生理食塩水、緩衝液等が挙げられる。

【0016】本発明の免疫測定法においては、前記被検試料と界面活性剤とを、あらかじめ混合して、得られた混合物を試験片に滴下して、展開してもよい（態様1）。

【0017】被検試料と界面活性剤とをあらかじめ混合しておく場合、得られた混合物における界面活性剤の終濃度は、効果を十分に発揮する観点から、0.01重量%以上が好ましく、0.1重量%以上がさらに好ましく、良好な検出の観点から、3重量%以下が好ましく、1重量%以下がさらに好ましい。

【0018】被検物質が細菌内に存在する物質である場合、混合時に振盪することが好ましい。さらに、得られた混合物を遠心分離し、得られた上清を被検試料としてもよい。この場合、混合物中の界面活性剤の量は、溶菌作用を十分に発揮させる観点から、用いる界面活性剤の臨界ミセル濃度（CMC）以上となる量であり、また、免疫測定法を十分に行なう観点から、0.01～3重量%が好ましく、0.1～1重量%がさらに好ましい。

【0019】前記態様1の方法の具体例としては、（1）被検試料と界面活性剤とを混合して、混合物を得るステップ、および（2）前記（1）で得られた混合物を、試験片に滴下して、展開するステップ、を含み、被検試料中における被検物質の有無を、下記（b）と（c）：（b）試験片の固定相における第1の特異的結合物質に捕捉された被検物質、（c）金属コロイド粒子、水分散型高分子粒子、シリコンおよびガラスケイソウ土粒子からなる群より選ばれた1種の粒子を担体とし、該担体に、被検物質に特異的に結合しうる第2の特異的結合物質と標識物質とを固定化した標識複合体、との複合体の有無により検出する方法が挙げられる。

【0020】また、本発明の免疫測定法においては、被検試料にポリミキシンB等の溶菌剤を含む場合は、被検試料と界面活性剤とを、それぞれ別に試験片に滴下して、展開し、試験片上で被検試料と界面活性剤とが共存するようにしてもよい（態様2）。

【0021】前記態様2の方法の具体例としては、被検試料を含有した溶液（但し、溶菌剤を含む）と界面活性剤とを、それぞれ別に試験片に滴下して、展開するステップ、を含み、被検試料中における被検物質の有無を、下記（b）と（c）：（b）試験片の固定相における第

1の特異的結合物質に捕捉された被検物質、(c)金属コロイド粒子、水分散型高分子粒子、シリコンおよびガラスケイソウ土粒子からなる群より選ばれた1種の粒子を担体とし、該担体に、被検物質に特異的に結合する第2の特異的結合物質と標識物質とを固定化した標識複合体、との複合体の有無により検出する方法が挙げられる。

【0022】特異的結合物質としては、被検物質に特異的に結合し得る物質であればよく、例えば、抗原、ハプテン、抗体、オリゴヌクレオチド、エフェクター、レセプター、酵素、酵素補助因子、酵素阻害剤等が挙げられる。前記特異的結合物質は、被検物質に応じて、サンドイッチ法等の通常の検出方法で用いられる公知の物質を少なくとも1種選択すればよい。

【0023】前記特異的結合物質が抗原またはハプテンの場合、当該抗原およびハプテンとしてはクラミジア・トラコマティス、溶連菌、百日咳菌、ヘリコバクター・ピロリ、レプトスピラ、トレポネーマ・パリダム、トキソプラズマ・ゴンディ、ボレリア等の各種微生物抗原、マイコプラズマ脂質抗原、HA抗原、HBc抗原、HBs抗原、HBe抗原、HCV抗原、HIV抗原および前記抗原に由来するハプテン等が挙げられる。

【0024】前記特異的結合物質が抗体の場合、当該抗体としてはモノクローナル抗体やポリクローナル抗体を使用することができる。

【0025】本発明においては、被検物質の検出に際して、抗原、ハプテンまたは抗体からなる群より選ばれた特異的結合物質を有し、かつ標識物質による標識を有する担体からなる標識複合体を用いることが望ましい。

【0026】なお、本明細書において、「特異的結合物質」には、被検物質の検出の際に用いられる標識複合体に用いられる特異的結合物質(以下、第2の特異的結合物質という)、および展開した被検物質を試験片上で捕捉するための固定相に用いられる特異的結合物質(以下、第1の特異的結合物質という)のいずれをも包含される。したがって、単に「特異的結合物質」と記載する場合、第1または第2のいずれか、あるいは第1および第2の特異的結合物質を総称することを意図する。

【0027】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、金属コロイド粒子、水分散型高分子粒子、シリコン、ガラスケイソウ土粒子等が挙げられる。

【0028】水分散型高分子粒子としては、粒径コントロール、分散安定性、結合容易性の観点から、ラテックス粒子が好ましい。前記水分散型高分子粒子は、例えば、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、プロピレン等のオレフィン系単量体、酢酸ビニル、塩化ビニル等のビニル系単量体、スチ

レン、メチルスチレン、クロロスチレン等のスチレン系単量体、メタアクリル酸メチル等のメタクリル酸エステル系単量体、ブタジエン等のジエン系単量体等が挙げられる。

【0029】担体の粒子径は、分散性、ならびに酵素、特異的結合物質等の固定化量の調整を良好にする観点から、好ましくは3μm以下、さらに好ましくは2μm以下であり、得られた標識複合体の精製の容易性の観点から、好ましくは0.01μm以上、さらに好ましくは0.1μm以上であることが望ましい。

【0030】標識複合体に用いられる標識物質としては、着色粒子、酵素、蛍光物質等が挙げられる。かかる標識物質は、単独でまたは2種以上を混合して用いることができる。

【0031】前記着色粒子としては、肉眼で色が検出可能なものであればよく、例えば、金コロイド粒子等の金属コロイド粒子；スダンブルー、スダンレッドIV、スダンIII、オイルオレンジ、キニザリングリーン等に代表される染料、顔料等でラテックス粒子を着色した着色ラテックス粒子等が挙げられる。前記着色粒子の平均粒子径は、発色の良好性の観点から、約0.01μm以上、好ましくは0.05μm以上であり、着色粒子の僅かな凝集に起因する吸水性基材の目詰まりを防ぐ観点から、約3μm以下、好ましくは、約0.05μm以下であることが望ましい。具体的には、約0.01~3μm、好ましくは、約0.05~0.5μmの範囲であることが望ましい。

【0032】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、β-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、β-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。

【0033】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。

【0034】担体に、特異的結合物質および標識物質を固定させる方法としては、疎水結合(物理的吸着)、イオン結合、共有結合等が利用できる。安定性の観点から、共有結合を介して結合させる際に、必要に応じて、特異的結合物質等の当該高分子粒子上での自由度を高めるために、スパーサー基を介在させることができる。

【0035】このようにして得られた標識複合体中に含まれる特異的結合物質および標識物質の総固定量は、担体の乾燥重量1gあたり好ましくは5~200mgであり、その量は上記の範囲内で、使用する特異的結合物質、標識物質の種類等によって適宜変更し得る。例えば、担体が水分散型高分子粒子の場合、当該粒子の表面積に鑑みると、前記総固定量は、水分散型高分子粒子の

乾燥重量 1 g あたり、好ましくは 200 mg 以下であり、さらに好ましくは 150 mg 以下であり、被検物質の検出の迅速性、感度、再現性の観点から、好ましくは 5 mg 以上であり、さらに好ましくは 10 mg 以上であることが望ましい。

【0036】ここで、担体の「乾燥重量」とは、一定量の担体を 120 で 2 時間乾燥した後の重量をいう。

【0037】本発明において、標識物質として、酵素を用いる場合は、標識量はその活性としても表すことができる。勿論、用いる酵素の種類、その基質、温度等種々の条件によって異なる。用いる酵素がペルオキシダーゼである場合には、活性を以下の方法で測定する：基質である TMB (3, 3', 5, 5' - テトラメチルベンジジン) 0.2 mg / ml と過酸化水素 0.01 % とを含む 0.1 M - クエン酸緩衝液 (pH 4.5) 3.3 ml に、標識複合体 0.0125 % 懸濁液を 100 μ l 混合して、25 で反応、580 nm の波長での吸光度を経時的に測定し、1 分間に当該吸光度を 1 増加させる酵素活性を 1 U (ユニット) として換算する。

【0038】例えば、ペルオキシダーゼの場合、標識複合体が、水分散型高分子粒子の乾燥重量 1 g あたり、5,000 ~ 300,000 U、好ましくは 10,000 ~ 300,000 U、より好ましくは 50,000 ~ 300,000 U の酵素活性を有するように該ペルオキシダーゼが固定されていることが望ましい。

【0039】特異的結合物質が、ペプチドを有する物質、例えば、抗体、抗原もしくはハプテンである場合、または標識物質が酵素である場合、その固定量の測定は、色素結合法等の慣用のタンパク質定量法により測定し、タンパク質の量として算出する。特異的結合物質がオリゴヌクレオチドの場合は、固定後の遊離のオリゴヌクレオチドを 260 nm の吸光度を測定することにより算出する。

【0040】このように担体に特異的結合物質および標識物質を固定させた後、例えば膜分離法や濾過、遠心分離法等の慣用の分離法によって、標識複合体を分離精製することができる。標識複合体は、水中に浸漬して保存してもよく、または凍結乾燥して保存してもよい。

【0041】本発明において試験片としては、吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合し得る第 1 の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片が挙げられる。試験片に用いられる吸水性基材は、被検試料を吸収できる基材、またはこれらを緩衝液によって希釈した希釈液を吸収する基材であればよい。本発明においては、被検試料中の被検物質と標識複合体中の第 2 の特異的結合物質や固定相の第 1 の特異的結合物質との十分な反応を行なうための時間を確保できるような吸水性基材が用いられる。好ましい具体例としては、適度な吸水速度を有する観点から、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、多孔質材料

等が挙げられる。

【0042】吸水性基材の吸水性の程度は、5 mm 幅の短冊状に裁断した吸水性基材の片端部に水を浸漬し、1 分間経過後の吸水距離が 0.5 ~ 5 cm 程度のものが望ましい。親水性重合体を使用して吸水性基材の吸水性を調整することもできる。

【0043】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) やロッド状等が好ましい。

【0044】前記試験片の固定相に用いられる第 1 の特異的結合物質は、前記標識複合体に用いられる第 2 の特異的結合物質と同様である。例えば、標識複合体に用いられる第 2 の特異的結合物質が抗体の場合、固定相には、同じ抗体または同一抗原の別のエピトープを認識する抗体を使用することができる。標識複合体に用いられる第 2 の特異的結合物質が抗原やハプテンの場合、固定相には、同一の抗原、ハプテンあるいは第 2 の特異的結合物質とは異なるが被検物質と特異的に結合する抗原、抗体、ハプテン等が用いられる。

【0045】固定相は、公知の物理吸着法、共有結合法等により作製されうる。また、固定相に使用する第 1 の特異的結合物質と親水性重合体とを含む溶液を吸水性基材に塗布した後、該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、ヒドロキシアセチルセルロース等が挙げられる。凝固溶剤としては、アセトン、エタノール、メタノール、エーテル等が挙げられる。

【0046】固定相は、被検試料の吸液によって展開し移動してきた複合体を捕捉するために、吸水性基材上に特異的結合物質を 0.005 ~ 5 mg / cm² 塗布することが望ましい。

【0047】固定後の吸水性基材は、被検対象でないタンパク質の基材への非特異的吸着の防止、展開の容易性、固定した第 1 の特異的結合物質の保存安定性の観点から、ブロッキング剤、界面活性剤および糖を含有する溶液 (処理液という) で処理されることが好ましい。ここで使用するブロッキング剤としては、ウシ血清アルブミン、カゼイン、ゼラチン、スキムミルク等が挙げられる。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン (10) オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレンアルキルアルエーテルリン酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル等が挙げられる。前記処理液中のブロッキング剤の含有量は、好ましくは 0.1 ~ 10 重量 % である。前記処理液中の界面活性剤の含有量は、好ましくは 0.01 ~ 1 重量 % である。前記処理液中の糖の含有量は、0.1 ~ 10 重量 % である。

【0048】本発明に用いられる試験片には、滴下パッド部、すなわち、試料受領部（試料を供するための部分）と、展開組成物受領部（展開組成物を供給するための部分）または発色基質溶液受領部（発色基質溶液を供給するための部分）とを設けてもよい。また、被検試料等に含まれる液体成分の接触により前記標識複合体を展開できるように、該標識複合体を試験片に固定させてもよい。

【0049】また本発明に用いられる試験片において、展開移動距離は、固定相での発色の均一性および発色感度の観点から、0.5 cm以上、好ましくは1 cm以上となり、固定相までの被検試料の到達性、発色感度および測定時間の観点から、8 cm以下、好ましくは6 cm以下となるように設定されていることが望ましい。

【0050】本発明においては、前記展開移動距離を得るように、試料受領部、固定相等を配置した試験片を用いることができる。

【0051】被検試料、試薬等の展開方法としては、試験片の一端側から、上記の方法で調製した複合体の溶液を加え、毛細管現象によって自然展開させる。また、試料受領部の反対端に吸水パッドを設けてもよく、これにより、試験片を展開する液体部分を吸収するので展開が容易に進行する。

【0052】ついで、固定相上で〔被検物質 - 標識複合体〕の複合体の形成の有無を検出する。〔被検物質 - 標識複合体〕の複合体の検出は、標識複合体中の標識物質を測定することにより検出することができ、色を有する担体を有する標識複合体を用いた場合、固定相における呈色の有無により検出できる。固定相上で前記複合体が検出された場合（例えば、固定相における呈色等）、被検試料中に被検物質が存在することの指標となる。

【0053】

【実施例】以下、実施例および比較例を挙げ、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】調製例 1：標識複合体溶液の作製

1) ラテックス粒子懸濁液の作製

スチレン 50 g と、アクリル酸 0.5 g と、トリエチレングリコールメタクリレート 0.2 g と、蒸留水 440 g とからなる混合液を窒素ガス雰囲気下で 75 に維持し、攪拌しながら、重合開始剤として過硫酸カリウム 0.25 g を蒸留水 10 g に溶解した水溶液を加え、10 時間重合を行なった。その結果、カルボキシル化された水分散性粒子としてカルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子（平均粒子径：0.2 μm）を得た。

【0055】得られたカルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子を緩衝液（0.01 M - ホウ酸緩衝液、pH 8.2）に固形分濃度が 5 重量% になるよう分散し、ラテックス粒子分散液を得た。

【0056】2) 固定化

本実施例では、特異的結合物質として抗体（抗ペロ毒素 1 型抗体）および標識物質として酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼ）を用いた。前記抗体および酵素を上記 1) で作製したラテックス粒子に以下のようにして固定した。

【0057】前記 1) で得られたラテックス粒子懸濁液 3 ml に、水溶性カルボジイミド〔同仁化学研究所製、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、10 mg/ml、0.01 M - ホウ酸緩衝液（pH 8.2）〕0.6 ml と、抗ペロ毒素 1 型抗体〔以下、抗 VT1 抗体と略す；トキシテクノロジー社製、2 mg/ml、0.01 M - ホウ酸緩衝液（pH 8.2）〕2.1 ml とを加えて 10 で 3 時間反応させた。次いで、得られた反応物について、洗浄液として 0.01 M - ホウ酸緩衝液（pH 8.2）を用いて遠心分離洗浄を行い、前記 0.01 M - ホウ酸緩衝液で固形分濃度 5 重量% に調製し、抗体固定化ラテックス粒子懸濁液を得た。

【0058】次いで、上記で作製した抗体固定化ラテックス粒子懸濁液 3 ml に、水溶性カルボジイミド〔同仁化学研究所製、1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、10 mg/ml、0.01 M - ホウ酸緩衝液（pH 8.2）〕1 ml と、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ〔以下、HRP と略す；和光純薬社製、12 mg/ml（比活性 250 ~ 350 U/mg）、0.01 M - ホウ酸緩衝液（pH 8.2）〕2 ml とを加えて 10 で 3 時間反応させた。次いで、得られた反応物について、洗浄液として 0.01 M - ホウ酸緩衝液（pH 8.2）を用いて遠心分離洗浄を行い、前記 0.01 M - ホウ酸緩衝液で固形分濃度 2.5 重量% に調製し、抗 VT1 抗体と HRP とを固定化したラテックス粒子の懸濁液（標識複合体懸濁液という）を作製した。

【0059】得られた標識複合体において、標識複合体乾燥重量 1 g あたりの抗体（分子量約 1.6×10^5 ）固定化量は 25.0 mg、酵素（分子量約 4×10^4 ）の固定化量は 20.0 mg、および酵素活性は 4330 U であった。

【0060】3) 標識複合体溶液の調製

前記標識複合体懸濁液を緩衝溶液（組成：0.01 M - ホウ酸緩衝液、pH 8.2）で希釈して標識複合体溶液を調製した。希釈比は、標識複合体懸濁液：緩衝液 = 1：150 とした。

【0061】調製例 2：標識複合体溶液の調製

調製例 1 の 2) で得られた標識複合体懸濁液 100 μl を、緩衝溶液（組成：0.2 M - 塩化アンモニウム / 0.9 重量% NaCl / 0.1 重量% ウシ血清アルブミン、pH 8.2）15 ml に混合し、標識複合体溶液を調製した。

【0062】調製例 3：免疫クロマトグラフィー用試験

片の作製

抗V T 1抗体(トキシンテクノロジー社製、1mg/ml、0.01M-リン酸緩衝液、0.9重量%NaCl含有、pH7.2)をニトロセルロースメンブレン(ワットマン社製、孔径約12μm、PET(ポリエチレンテレフタレート)サポート付、6mm×60mm)の一端から30mmの箇所に、ディスペンサーを用いてライン状(幅1mm)に塗布し、固定相を配置したメンブレンを得た。

【0063】得られたメンブレンを、ウシ血清アルブミン(オリエンタル酵母社製、1重量%)と、プライサーフA212E(第一工業製薬社製、0.1重量%)と、サッカロース(和光純薬工業社製、1重量%)とを含む水溶液中に20分浸漬させた。ついで、得られたメンブレンを、室温で16時間乾燥させた。

【0064】次に、終濃度1重量%となるようにTMBをトルエンで溶解して得られた発色基質溶液1.2μlを、前記ニトロセルロースメンブレン上の固定相から5mm離れた箇所に塗布した。その後、得られたメンブレンを乾燥させて発色基質相とした。

【0065】固定相から発色基質相と同じ方向に10~22mmの箇所にポリエステル製不織布(7×12mm、厚さ1mm)を貼り合わせ、試料受領部を作製した。また、固定相から試料受領部と同じ方向に27~39mmの箇所にポリエステル不織布(7×12mm、厚さ1mm)を貼り合せ、展開組成物受領部を作製した。

【0066】さらに固定相から試料受領部と逆の方向に20~50mmの箇所に吸水剤基材としてガラス繊維製不織布(ワットマン社製、GF/B、15×30mm、厚さ1mm)を貼り合せた。前記のようにして得られた試験片は一例であり、かかる試験片にのみ限定されるものではない。

【0067】調製例4：免疫クロマトグラフィー用試験片の作製

抗V T 1抗体(トキシンテクノロジー社製、1mg/ml、0.01M-リン酸緩衝液、0.9重量%NaCl含有、pH7.2)をニトロセルロースメンブレン(ワットマン社製、孔径約12μm、PET(ポリエチレンテレフタレート)サポート付、6mm×60mm)の一端から30mmの箇所に、ディスペンサーを用いてライン状(幅1mm)に塗布し、固定相を配置したメンブレンを得た。

【0068】得られたメンブレンをウシ血清アルブミン(オリエンタル酵母社製、1重量%)およびプライサーフA212E(第一工業製薬社製、0.1重量%)、サッカロース(和光純薬工業社製、1重量%)とを含む水溶液中に20分浸漬させた。次いで、得られたメンブ

ンを、室温で16時間乾燥させた。

【0069】固定相から7~14mmの箇所にポリエステル製不織布(7×7mm、厚さ1mm)を貼り合せ、試料受領部を作製した。また固定相から試料受領部と同じ方向に26~38mmの箇所にポリエステル不織布(7×12mm、厚さ1mm)を貼り合せ発色基質溶液受領部を作製した。

【0070】さらに固定相から試料受領部と逆の方向に17~47mmの箇所に吸水パッドとしてガラス繊維製不織布(ワットマン社製、GF/B、15×30mm、厚さ1mm)を貼り合せた。前記のようにして得られた試験片は一例であり、かかる試験片にのみ限定されるものではない。

【0071】調製例5：試料の調製

1.0×10⁴ U/mlのポリミキシンBを含む生理食塩水中、最終濃度が0ng/ml(対照)、1ng/ml、2ng/mlまたは4ng/mlになるようにペロ毒素1型(以下、V T 1と略す)を添加して試料を調製した。

【0072】試験例1

前記調製例5で得られた試料500μlを、0.4重量%Tween20/蒸留水500μlに添加し、混合物(実施例1)とした。

【0073】前記混合物70μlを調製例3で作製した各試験片の試料受領部に供し、直ちに混合物を展開させた。ついで、前記試験片の前記試料受領部に標識複合体溶液25μlを供し、次いで展開組成物受領部に展開組成物〔組成：0.01Mリン酸緩衝液(pH7.0)、20mMイミダゾール、0.01重量%H₂O₂、0.12重量%硫酸デキストランナトリウム、10重量%ヘキサントリオール〕150μlを供し、展開させた。

【0074】展開後、試験片の固定相における10~20分後の発色の有無を目視確認した。その結果を表1に示す。

【0075】前記調製例5で得られた試料500μlを、生理食塩水500μlに添加し、混合物(比較例1)とした。以下、実施例1と同様に展開し、展開後、試験片の固定相における10~20分後の発色の有無を目視確認した。その結果を表1に示す。

【0076】なお、判定基準は以下の通りである。

+：固定相に発色が見られる

±：固定相に弱い発色が見られる

-：固定相に発色が見られない

【0077】

【表1】

V T 1 の 検出	実施例 1				比較例 1			
	対照	1ng/ml	2ng/ml	4ng/ml	対照	1ng/ml	2ng/ml	4ng/ml
10分	—	—	—	±	—	—	—	±
15分	—	—	±	±	—	—	±	±
20分	—	—	±	+	—	—	±	+
バックグラウンド発色	なし	なし	なし	なし	発生	発生	発生	発生

【0078】表1より、比較例1のように界面活性剤を含まない混合物（界面活性剤の非存在下）を用いた場合、バックグラウンド発色が生じ、判定性が悪いことがわかる。また、実施例1のように界面活性剤を含む混合物（界面活性剤の存在下）を用いた場合、バックグラウンド発色は認められず、良好に判定できることがわかる。なお、実施例1の方法の感度は、比較例1の方法のものと同等であった。したがって、界面活性剤を含む混合物を用いることで、バックグラウンド発色が改善され、判定の確実性が向上することが示される。

【0079】調製例6：試料1の調製

mEC培地（ニッスイ製、mEC培地）（20mg/Lノボピオシン添加）250mLに大腸菌O157〔ATCC700376；ベロ毒素1型（以下、VT1と略す）産生株〕を97CFU接種し、42℃にて18時間、静置培養して、試料1を調製した。

【0080】調製例7：試料2の調製

mEC培地（20mg/Lノボピオシン添加）250mLに大腸菌O157〔ATCC35150；VT1、ベロ毒素2型（以下、VT2と略す）産生株〕を101CFU接種し、42℃にて18時間、静置培養して、試料2を調製した。

【0081】試験例2

調製例6で調製した試料1（500μl）と0.6重量% Tween20溶液（500μl）とを混合し、37℃で振盪を加えながら溶菌処理を行なった。この溶液を遠心分離処理（10000g×10分）し、得られた上清を処理試料（実施例2）とした。また、調製例7で調製した試料2（500μl）を用い、同様に処理試料（実施例3）を得た。

【0082】一方、調製例6で調製した試料1（500μl）

（500μl）と10000U硫酸ポリミキシンB（ファイザー製薬製）溶液（500μl）とを混合し、37℃で振盪を加えながら溶菌処理を行なった。この溶液を遠心分離処理（10000g×10分）し、得られた上清を処理試料（比較例2）とした。また、調製例7で調製した試料2（500μl）を用い、同様に処理試料（比較例3）を得た。

【0083】さらに、調製例6で調製した試料1（500μl）を遠心分離処理（10000g×10分）し、得られた上清を処理試料（比較例4）とした。同様に、調製例7で調製した試料2（500μl）を用い、同様に処理試料（比較例5）を得た。

【0084】前記処理試料70μlを調製例4で作製した試験片の試料受領部に供し、直ちに処理試料を展開させた。次いで、前記試験片の試料受領部に調製例2の標識複合体溶液25μlを供し、発色基質溶液受領部に前記発色基質溶液〔組成：0.2M-塩化アンモニウム（pH8.0）、1.0mM-イミダゾール、0.2重量%3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン、1重量%ジメチルスルホキシド（DMSO）、0.01重量%H₂O₂、0.12重量%硫酸デキストランナトリウム〕100μlを供し、展開させた。展開後、試験片の固定相における20分後の発色の有無を目視確認して、VT1の検出を行なった。

【0085】実施例2～3および比較例2～5の処理試料を用いてVT1の検出を行なった結果を表2に示す。

【0086】なお、判定基準は以下の通りである。

+：固定相に発色が見られる
-：固定相に発色が見られない

【0087】

【表2】

	VT1判定	バックグラウンド	溶菌処理剤
実施例2	+	なし	Tween20
実施例3	+	なし	Tween20
比較例2	判定不可	大きい	ポリミキシンB
比較例3	判定不可	大きい	ポリミキシンB
比較例4	—	なし	なし
比較例5	—	なし	なし

【0088】表2より、実施例2の大腸菌O157(VT1産生株)の培養液をTween20(界面活性剤)で溶菌処理して得られた処理試料、または実施例3の大腸菌O157(VT1/VT2産生株)の培養液をTween20(界面活性剤)で溶菌処理して得られた処理試料を用いて測定した場合、バックグラウンド発色等がほとんどなく、処理試料からVT1が検出されることがわかる。

【0089】なお、比較例2の大腸菌O157(VT1産生株)の培養液を硫酸ポリミキシンBで溶菌処理して得られた処理試料、または比較例3の大腸菌O157(VT1/VT2産生株)の培養液を硫酸ポリミキシンBで溶菌処理して得られた処理試料を用いて測定した場合、バックグラウンド発色が大きく判定不可能であることがわかる。

【0090】また、比較例4の大腸菌O157(VT1産生株)の培養液を遠心分離して得られた処理試料、ま*

*たは比較例5の大腸菌O157(VT1/VT2産生株)の培養液を遠心分離して得られた処理試料を用いて測定した場合、バックグラウンド発色等はほとんどなかったが、VT1は検出されないことがわかる。

【0091】したがって、実施例2～3のように、大腸菌O157の培養液を界面活性剤(Tween20)で溶菌処理した処理試料を免疫クロマトグラフ法において用いた場合、菌体内のVT1が溶菌により放出されているため検出感度が高くなり、かつバックグラウンド発色がなく良好に検出が可能となることが示される。

【0092】

【発明の効果】本発明の免疫測定法によれば、界面活性剤の存在下に被検試料を展開するためバックグラウンド発色を抑制することができるという優れた効果を奏する。したがって、本発明の免疫測定法は、確実な判定が望まれる分野で幅広く使用することができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

G01N 33/569

識別記号

FI

G01N 33/569

テマコード(参考)

F

专利名称(译)	免疫测定法		
公开(公告)号	JP2002267671A	公开(公告)日	2002-09-18
申请号	JP2001072260	申请日	2001-03-14
[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 研一 森岡 量子		
发明人	岡田 研一 森岡 量子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/545 G01N33/552 G01N33/553 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.D G01N33/545.A G01N33/552 G01N33/553 G01N33/569.F		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫测定，可以检测待检测的物质，而不会产生背景颜色。解决方案：免疫测定以这样的方式构成：在免疫色谱法中，在表面活性剂的存在下，在包含固定相的测试片上显影的待检测样品，第一特定结合物质能够存在于该固定相上。特别是在吸水基质上粘合到待检物质上。

13

VT10 検出	実施例1				比較例1			
	対照	1ng/ml	2ng/ml	4ng/ml	対照	1ng/ml	2ng/ml	4ng/ml
10分	-	-	-	±	-	-	-	±
15分	-	-	±	±	-	-	±	±
20分	-	-	±	+	-	-	±	+
バックグラウンド発色	なし	なし	なし	なし	発生	発生	発生	発生