

(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2003 - 107090

(P2003 - 107090A)

(43)公開日 平成15年4月9日(2003.4.9)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	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
	33/532			A
	33/58			Z

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L ( 全 10数 )

(21)出願番号	特願2001 - 302276(P2001 - 302276)	(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9月28日(2001.9.28)	(72)発明者	丸山 幸治 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	雑賀 健 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】 免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物

(57)【要約】

【課題】広い範囲の被検物質量での被検物質の検出が確実性を有する免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物およびそれを用いた免疫クロマトグラフ法を提供すること。

【解決手段】標識物質と被検物質に対する抗体とを有する標識複合体を2種以上含む標識複合体組成物であって、各標識複合体における抗体の該被検物質に対する検出感度が互いに異なることを特徴とする免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物、ならびに吸水性基材上に、被検物質に対する抗体が固定化された固定相を有する試験片を用いて、被検試料中における被検物質の有無を、下記(a)と(b)：(a)被検物質、(b)請求項1～4いずれかに記載の標識複合体組成物中の標識複合体、との複合体の有無により検出することを特徴とする、免疫クロマトグラフ法。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 標識物質と被検物質に対する抗体とを有する標識複合体を2種以上含む標識複合体組成物であって、各標識複合体における抗体の該被検物質に対する検出感度が互いに異なることを特徴とする免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物。

【請求項2】 最大の検出感度と最小の検出感度の差が、免疫クロマト法による測定で $5 \sim 5 \times 10^4$ 倍の差である請求項1記載の標識複合体組成物。

【請求項3】 標識物質が、着色粒子または酵素である請求項1または2記載の標識複合体組成物。

【請求項4】 標識複合体が、金属コロイド粒子または水分散型高分子粒子に標識物質と抗体とを固定させたものである請求項1～3いずれかに記載の標識複合体組成物。

【請求項5】 吸水性基材上に、被検物質に対する抗体が固定化された固定相を有する試験片を用いて、被検試料中における被検物質の有無を、下記(a)と(b)：(a)被検物質、(b)請求項1～4いずれかに記載の標識複合体組成物中の標識複合体、との複合体の有無により検出することを特徴とする、免疫クロマトグラフ法。

【請求項6】 試験片が、固定相より下流側の吸水性基材上に、標識複合体に含まれる抗体に特異的に結合しうる物質が固定化されたリファレンス相を有してなる、請求項5記載の免疫クロマトグラフ法。

【請求項7】 標識複合体組成物を含有する溶液を、試験片上に滴下して、被検試料に接触させるステップ、を含む請求項5または6記載の免疫クロマトグラフ法。

【請求項8】 試験片が、請求項1～4いずれかに記載の2種以上の標識複合体を被検試料との接触により脱離可能に保持した標識複合体相を有するものである、請求項5または6記載の免疫クロマトグラフ法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、広範囲の量の被検物質の検出において、高い確実性を有する免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物およびそれを用いた免疫クロマトグラフ法に関する。

## 【0002】

【従来の技術】近年、迅速かつ簡便に免疫化学的検査が行なうことができる方法として、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有する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。

【0003】しかしながら、被検物質が過剰に存在する場合、標識複合体と該被検物質との複合体が形成された後、得られた複合体同士が凝集塊となり、クロマト展開が正常に行われない場合がある。通常、免疫クロマトグラフ法にはリファレンスラインが設けられており、未反応の標識複合体を捕捉することで試験が正常に行われたことを確認している。ところが、多くのクロマトキットは未感作動物のイムノグロブリン標識体を用いたテストの成否を判定している。これは、実際の被検物質に対する標識複合体が正常に展開していることの直接的な証拠とはなりえないという問題を含んでいる。

## 【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、広い範囲の被検物質質量での被検物質の検出が確実性を有する免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物およびそれを用いた免疫クロマトグラフ法を提供することにある。

## 【0005】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明の要旨は、〔1〕標識物質と被検物質に対する抗体とを有する標識複合体を2種以上含む標識複合体組成物であって、各標識複合体における抗体の該被検物質に対する検出感度が互いに異なることを特徴とする免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物、ならびに〔2〕吸水性基材上に、被検物質に対する抗体が固定化された固定相を有する試験片を用いて、被検試料中における被検物質の有無を、下記(a)と(b)：

(a)被検物質、(b)前記〔1〕記載の標識複合体組成物中の標識複合体、との複合体の有無により検出することを特徴とする、免疫クロマトグラフ法、に関する。

## 【0006】

【発明の実施の形態】本発明の免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物は、標識物質と被検物質に対する抗体とを有する標識複合体を2種以上含む標識複合体組成物であって、各標識複合体における抗体の該被検物質に対する検出感度が互いに異なることに1つの特徴を有する。本発明の標識複合体組成物を用いて免疫クロマトグラフ法を行なうことにより、被検物質質量が少なくても被検物質の検出が可能であり、逆に被検物質質量が多くても標識複合体の展開が良好となるため、広い範囲の被検物質質量で高い確実性をもって被検物質の検出を行なうことができる。

【0007】被検物質に対する抗体の最大の検出感度と最小の検出感度の差は、免疫クロマト法による測定で、好ましくは $5 \sim 5 \times 10^4$ 倍の差であり、さらに好ましくは $50 \sim 1 \times 10^3$ 倍の差である。被検物質に対する検出感度が異なる抗体は、例えば、以下のような方法にて選択する。被検物質に対する抗体としてポリクローナル抗体、または、モノクローナル抗体を通常行なわれている方法によって数種類得る。それぞれの抗体を標識物質と結合させ感度を測定しようとする抗体の標識複合体

を作製する。クロマト試験紙はニトロセルロース膜を用いて常法に従い作製する。測定はサンドイッチ法を用いて試験紙側に被検物質に対する抗体（基準となる抗体）を一定量塗布し検出ラインとする。このクロマト試験紙を用いてサンプル滴下部及び吸水材などを配置した免疫クロマトキットを作製する。このようにして作製した免疫クロマトキットと標識複合体を用いて、被検物質の段階希釈溶液（例えば10倍希釈系列）、すなわち標準溶液を測定し、その結果としてそれぞれの抗体について被検物質を検出可能な最小濃度を検出感度として求める。このようにして検出感度の異なる抗体を選択できる。例えば、被検物質が大腸菌O157である場合、大腸菌O157を検出できる最小濃度の検体として、例えば $10^4$ 個/mL含む検体から検出できる抗体の感度は $10^4$ 個/mLで、最小濃度が $10^6$ 個/mL含む検体から検出できる抗体の感度は $10^6$ 個/mLと表示する。したがって、この場合、2つの抗体の検出感度の差は100倍の差があることになる。

【0008】被検物質に対する検出感度が異なる2種以上の抗体は、異種動物由来であってもよく、同種動物由来であってもよい。また、モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体のいずれであってもよい。

【0009】被検物質に対する最大の検出感度を有する抗体を含む標識複合体の含有率は、低濃度の被検物質を高感度に検出することおよび結合しなかった標識複合体がリファレンス相に達することができる観点から、標識複合体組成物の30~95重量%が好ましく、50~80重量%がより好ましい。

【0010】被検物質に対する最小の検出感度を有する抗体を含む標識複合体の含有率は、大過剰の被検物質が存在した場合、凝集塊にとり込まれず、クロマト展開できる観点から、標識複合体組成物の5~70重量%が好ましく、20~50重量%がより好ましい。

【0011】被検物質に対する検出感度の高い抗体を含む標識複合体を用いることにより、低濃度の被検物質をより高感度に検出できる。

【0012】また、被検物質に対する検出感度の低い抗体を含む標識複合体を用いることにより、被検物質が大過剰に存在する場合においても、検出感度の低い抗体を含む標識複合体は凝集塊を形成することなく、クロマト展開可能である。

【0013】本発明の免疫クロマトグラフ法により検出され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、大腸菌等の細菌およびその構成成分、細菌が産生する毒素、タンパク質、ウイルス抗原および抗体ならびにマイコプラズマ等の生物由来成分、および内分泌攪乱物質、農薬、医薬品等の化学物質が挙げられる。

【0014】標識物質と抗体とを有する標識複合体にお

いて、前記標識物質としては、免疫測定分野で用いられる公知の物質、例えば、着色粒子、酵素、蛍光物質等が挙げられる。なかでも目視判定が可能であり、測定装置を必要としないという観点から、着色粒子および酵素がより好ましい。

【0015】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、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、顔料等で着色した着色水分散型高分子粒子等が挙げられる。目視確認性の点からは、青色、赤色、緑色またはオレンジ色に着色した着色水分散型高分子粒子が好ましい。分散安定性や被検物質の検出感度を調整し易い点から青色または赤色等に着色した着色ラテックス粒子が望ましい。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 $0.01\mu\text{m}$ 以上、好ましくは $0.05\mu\text{m}$ 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 $3\mu\text{m}$ 以下、好ましくは、約 $0.5\mu\text{m}$ 以下であることが望ましい。具体的には、約 $0.01\sim 3\mu\text{m}$ 、好ましくは、約 $0.05\sim 0.5\mu\text{m}$ の範囲であることが望ましい。

【0016】酵素としては、例えば、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。

【0017】また、蛍光物質としては、例えば、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。

【0018】さらに、本発明においては、前記標識複合体は、金属コロイド粒子または水分散型高分子粒子等を担体とし、該担体に、標識物質（前記酵素または蛍光物質）と抗体とが固定された複合体であってもよい。

【0019】標識複合体に用いられる担体としては、その表面上に、抗体および標識物質を固定することができるものであればよく、金属コロイド粒子、水分散型高分子粒子、シリコン、シリカ、ガラスケイソウ土粒子等が挙げられる。

【0020】金属コロイド粒子としては、金コロイド粒子およびセレンウムコロイド粒子等が例示される。

【0021】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。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。

【0022】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等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-ピニル-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等が挙げられる。

【0023】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含有物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。

【0024】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した抗体が、その使用時や保存時に融着、凝集を起こさないように、前記水分散型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、特に室温以上であることが望ましい。

【0025】前記水分散型高分子粒子のうち、粒子の安定性の点から、スチレン系単量体を主成分とする重合体が好ましく、また、抗体および標識物質を固定するために、アクリル酸やメタクリル酸等のカルボキシル基を有する単量体を共重合した高分子粒子が望ましい。

【0026】前記担体は、該担体表面への抗体および標識物質の固定、スパーサーの導入または水分散状態での安定性の向上の観点から、官能基を有していてもよい。このような官能基としては、例えばカルボキシル基、水酸基、グリシジル基、アミノ基、ホルミル基、カルバモイル基、イソチオシアナート基、アジドカルボニル基、ヒドラジド基、酸無水物基等を挙げることができ、好ましくはカルボキシル基が導入される。これらの官能基を有する担体を調製するには、単量体成分として、例えば、アクリル酸、メタクリル酸のようなカルボキシル基

を有する単量体、例えば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のような水酸基を有する単量体、例えば、グリシジルメタクリレートのようなグリシジル基を有する単量体を共重合させること、あるいは必要に応じて他の共重合性単量体と乳化共重合させることによって、それぞれカルボキシル基、水酸基およびグリシジル基を有する担体を得ることができる。また、所要の単量体成分を重合させた後、得られた担体に官能基を導入することもできる。

【0027】担体の粒子径は、分散性、ならびに酵素、抗体等の固定化量の調製を良好にする観点から、好ましくは3 $\mu\text{m}$ 以下、さらに好ましくは2 $\mu\text{m}$ 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0.01 $\mu\text{m}$ 以上、さらに好ましくは0.1 $\mu\text{m}$ 以上であることが望ましい。

【0028】担体に、抗体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、抗体等の当該水分散型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。

【0029】前記スパーサー基は、予め水分散型高分子粒子に結合させた後、抗体および標識物質と結合させてもよく、予め抗体および標識物質に結合させた後、これを水分散型高分子粒子に結合させてもよい。更に、必要に応じて、水分散型高分子粒子、抗体および標識物質の全てに予めスパーサー基を結合させ、これらを相互に結合させることもできる。

【0030】スパーサー基として用い得る化合物は、少なくとも二官能性の有機化合物であり、特に炭素数1~12の炭素鎖基を有する二官能性の有機化合物が好ましい。このようなスパーサー基として機能する化合物としては、特に限定されないが、例えば、ヘキサメチレンジアミン、ドデカメチレンジアミン、キシリレンジアミン等のジアミン類、グリシン、 $\alpha$ -アミノプロピオン酸、 $\beta$ -アミノ酪酸、 $\gamma$ -アミノカプロン酸、 $\delta$ -アミノカプリル酸等のアミノアルキルカルボン酸、リジン、グルタミン酸、 $\alpha$ -アラニン、アルギニン、グリシルグリシン等のアミノ酸類等が好ましい。

【0031】水分散型高分子粒子に直接またはスパーサー基を介して抗体および標識物質を共有結合にて結合させるための方法は、特に限定されず、慣用の方法が挙げられる。かかる方法としては、例えば、結合試薬として水溶性カルボジイミドを用いる方法が挙げられる。具体的には、例えば、アミノアルキルカルボン酸をスパーサー基として用いる場合であれば、水溶性カルボジイミドを用いて、抗体および標識物質を共有結合にて水分散型高分子粒子に結合させることができる。

【0032】前記水溶性カルボジイミドとしては、例えば、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、1-シクロヘキシル-3-(2-モルホリノエチル)カルボジイミド-メト-p-トルエンスルホネート等が挙げられる。このような水溶性カルボジイミドを用いて、スパーサー基を介するまたは直接的な共有結合による、抗体および標識物質の水分散型高分子粒子への結合は、慣用の方法および条件により行なわれ得る。本発明において、抗体および標識物質の水分散型高分子粒子への結合は、両者の結合を同時に行なってもよく、別々に行なってもよい。

【0033】このようにして得られた標識複合体に含まれる抗体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、使用する抗体、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1gあたり、好ましくは200mg以下であり、さらに好ましくは150mg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5mg以上であり、さらに好ましくは10mg以上であることが望ましい。

【0034】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。

【0035】免疫クロマトグラフ法とは、例えば、以下のような工程を含む方法が挙げられる。すなわち、吸水性基材上に、被検物質に対する抗体が固定化された固定相を有する試験片の一端より、標識複合体組成物を含有する溶液と、被検試料とを、別々にあるいはそれらを予め混合して、試験片に滴下して展開する。被検試料中に被検物質が存在する場合、形成された〔被検物質-標識複合体〕からなる複合体は、固定相に固定化された抗体と結合して固定相上に捕捉される。したがって、該固定相に補足された〔被検物質-標識複合体〕からなる複合体中の標識物質を測定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。

【0036】被検試料としては、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、血液成分、尿、唾液、汗、便等の生体由来成分、食品および培養液等が挙げられる。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。

【0037】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抗体や固定相の抗体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。

【0038】吸水性基材の吸水性の程度は、5mm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0.5~5cmのものが好ましい。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。

【0039】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。

【0040】前記試験片の固定相に用いられる、被検物質に対する抗体は、前記標識複合体に用いられる抗体と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。

【0041】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、固定相に使用する抗体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、ヒドロキシエ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。

【0042】固定相は、被検試料の吸液によって展開し移動してきた〔被検物質-標識複合体〕からなる複合体を捕捉するために、吸水性基材上に抗体を0.005~5mg/cm<sup>2</sup>塗布することが望ましい。

【0043】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、固定した抗体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リ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。前記処理液中のタンパク質の含有量は、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。

【0044】試験片には、固定相より下流側の吸水性基材上に、標識複合体に含まれる抗体に特異的に結合しうる物質が固定化されたリファレンス相を設けてもよい。リファレンス相では、展開してきた標識複合体そのものを捕捉することができる。リファレンス相を設けることにより、免疫クロマトグラフ法による試験の成否を直接

的に判定することが可能となる。

【0045】なお、本明細書において、「下流」とは、後述の被検試料受領部からみて固定相側を意味する。

【0046】リファレンス相に用いられる標識複合体に含まれる抗体に特異的に結合しうる物質としては、例えば、標識複合体に含まれる抗体に対する抗体（抗IgG抗体、抗Fc抗体等）、抗体結合性のあるプロテインAおよびプロテインG等が挙げられる。ここで、捕捉する標識複合体は、検出感度の高い標識複合体と低い標識複合体に用いられる抗体種が例えば同一動物由来のIgG 10 である場合、その動物のIgGに対する抗IgG抗体を単独で用いることができる。また異種動物であれば、それぞれの動物由来の抗体に対する抗IgG抗体を混合して用いることができる。このようにすれば、いずれの標識複合体も捕捉できる。

【0047】リファレンス相は、固定相を作製する方法と同様の方法より作製される。また、リファレンス相は、被検試料等の吸液によって展開し移動してきた標識複合体を捕捉するために、吸水性基材上に、標識複合体 20 に含まれる抗体に特異的に結合しうる物質を0.05～10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 塗布することが望ましい。

【0048】本発明に用いられる吸水性基材には、被検試料受領部（被検試料を供給するための部分）および標識複合体受領部（標識複合体組成物を含有する溶液を供給するための部分）を設けてもよい。標識物質に酵素を用いる場合は、さらに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）を設けてもよい。前記標識複合体組成物を含有する溶液は、例えば、緩衝液等に標識複合体組成物を溶解させることにより得ることができる。また、被検試料等に含まれる液体成分の接触により 30 前記標識複合体を展開できるように、該標識複合体を脱離可能に試験片に保持させて、標識複合体相を設けてもよい。

【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、0.5cm以上、好ましくは1cm以上であり、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、8cm以下、好ましくは6cm以下となるように設定されていることが望ましい。

【0050】本発明の免疫クロマトグラフ法において 40 は、例えば、前記展開移動距離を得るように、標識複合体受領部、被検試料受領部、固定相およびリファレンス相を配置した試験片を用いることができる。

【0051】展開方法としては、例えば、吸水性基材の一端側から、標識複合体組成物を含有する溶液および被検試料等のそれぞれの溶液を加え、毛細管現象によって自然展開させる方法が挙げられる。また、吸水性基材には固定相の下流側の末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成分を吸収するので展開が容易に進行する。

【0052】本発明の被検物質の検出方法について、図1を代表例として参照して説明する。被検試料受領部2にピペット等を用いて被検試料を滴下し、標識複合体組成物を含有する溶液を標識複合体受領部1に滴下する。被検試料および標識複合体組成物を含有する溶液は、吸水パッド5の方向に試験片上に展開していき、固定相3を通過して、リファレンス相4へと移動する。被検試料中に被検物質が存在する場合、形成された〔被検物質-標識複合体〕からなる複合体は、固定相3に固定化された被検物質に対する抗体と結合して固定相3上に捕捉される。すなわち、固定相3で標識物質が検出された場合、被検試料中に被検物質が存在することの指標となる。また、標識複合体の展開が正常である場合、固定相3で捕捉されなかった残りの標識複合体は、リファレンス相4に固定化された標識複合体に含まれる抗体に特異的に結合しうる物質と結合して、リファレンス相4に捕捉される。すなわち、リファレンス相4で標識物質が検出された場合、免疫クロマトグラフ法による試験において正常なクロマト展開が行なわれたことの指標となる。

【0053】

【実施例】調製例1：標識複合体組成物の作製

1) 着色ラテックス粒子懸濁液の作製

スチレンモノマー50gと、アクリル酸0.5gと、トリエチレングリコールメタクリレート0.2gと、蒸留水440g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、重合開始剤としての過硫酸カリウム0.25gを蒸留水10gに溶解した水溶液を加え、10時間重合を行い、ポリスチレンラテックス粒子（平均粒子径：0.2 $\mu\text{m}$ ）を得た。得られたラテックス粒子を緩衝液（0.01M - ホウ酸緩衝液、pH 8.2）に固形分濃度が10重量%になるように分散し、ラテックス粒子分散液を得た。スタンプルー0.2gをトルエン20mlに溶解し、これにドデシル硫酸ナトリウム0.2g、および蒸留水100mlを加え、超音波分散機でこの混合液を乳化した。この乳化液に上記ラテックス粒子分散液30mlを加え、室温で24時間攪拌した。得られた液をエバポレータにてトルエンを除去した後、緩衝液（0.01M - ホウ酸緩衝液、pH 8.2）にて遠心洗浄を行い、固形分濃度が5重量%になるように分散し、着色ラテックス粒子懸濁液を得た。

【0054】2) 抗体の固定化

本実施例では、抗体としてヤギ抗E.coli O157:H7ポリクローナル抗体を、前記1)で得られた着色ラテックス粒子に以下のようにして固定した。抗体は、被検物質である大腸菌O157に対する検出感度が互いに異なる2種を使用して、抗体結合着色ラテックス粒子を2種類作製した。

【0055】高感度抗体結合着色ラテックス粒子

前記1)で得られた着色ラテックス粒子懸濁液3ml 50 に、水溶性カルボジイミド〔同仁化学研究所製、1-E

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、10mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液(pH8.2)0.5mlと、ヤギ抗E.coli O157:H7ポリクローナル抗体〔大腸菌O157に対する免疫クロマト感度:10<sup>4</sup> cells/ml、Kirkegaard & Perry Laboratories Inc. (KPL) 製、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液(pH8.2)2ml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0.01M-ホウ酸緩衝液(pH8.2)を用いて遠心分離洗浄を行い、前記0.01M-ホウ酸緩衝液で固形分濃度5重量%に調製し、高感度抗体結合着色ラテックス粒子懸濁液を得た。

【0056】低感度抗体結合着色ラテックス粒子前記1)で得られた着色ラテックス粒子懸濁液3ml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、10mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液(pH8.2)0.5mlと、ヤギ抗E.coli O157:H7ポリクローナル抗体〔大腸菌O157に対する免疫クロマト感度:10<sup>6</sup> cells/ml、イムノプローブ製、1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液(pH8.2)2ml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0.01M-ホウ酸緩衝液(pH8.2)を用いて遠心分離洗浄を行い、前記0.01M-ホウ酸緩衝液で固形分濃度5重量%に調製し、低感度抗体結合着色ラテックス粒子懸濁液を得た。

【0057】なお、上記抗体の大腸菌O157に対する検出感度の差は、免疫クロマト法による測定で求めた。高感度抗体と低感度抗体の大腸菌O157に対する検出感度の差は、100倍の差であった。

【0058】3) 標識複合体を含有する溶液前記2)で得られた2種類の抗体結合着色ラテックス粒子の懸濁液を、下記のように組み合わせて、それぞれ緩衝液〔0.2M NH<sub>4</sub>Cl、0.9重量% NaCl、5重量%塩化コリン、1重量%サッカロース(pH8.0)〕で0.01重量%となるように希釈して、標識複合体A~Cを含有する溶液を得た。

【0059】標識複合体A: 高感度抗体結合着色ラテックス粒子と低感度抗体結合着色ラテックス粒子を重量比2:1で混合

標識複合体B: 高感度抗体結合着色ラテックス粒子のみ  
標識複合体C: 低感度抗体結合着色ラテックス粒子のみ

【0060】調製例2: 免疫クロマトグラフ用試験片の作製

図1に示される模式図のニトロセルロースメンブレン(ワットマン社製、孔径8μm、200μm厚、6×40mm)の一端から20mmの箇所にはヤギ抗E.coli O157:H7ポリクローナル抗体〔1mg/ml、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)〕を1.5μL、デイス

ペンサーを用いてライン状(幅1mm)に塗布し、固定相3を配置したメンブレンを得た。さらに、固定相3の下流10mmの箇所にウサギ抗ヤギIgG ポリクローナル抗体〔KPL製、1mg/ml、0.1M-リン酸緩衝液(pH7.4)〕を1.5μL、デイスペンサーを用いてライン状(幅1mm)に塗布し、リファレンス相4を配置したメンブレンを得た。

【0061】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、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、サッカロース(和光純薬工業社製、0.1重量%)とを含む水溶液中に10分間浸漬し、40で2時間乾燥させた。次いで、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(100μm厚)をスプレー糊を用いて貼り合せた。

【0062】ニトロセルロースメンブレンの上流端から0~7mmと9~16mmの2箇所にポリエステル不織布ハイボン4880C(富士繊維資材工業(株)製、6×7mm、厚さ2.5mm)を貼り合せて、それぞれ標識複合体受領部1および被検試料受領部2を作製した。さらに、吸水パッド5としてガラス繊維製の吸水材(10×10mm、厚さ5mm)を、ニトロセルロースメンブレンの下流端から5~10mmの箇所から下流方向に貼り合わせて試験片を作製した。得られた試験片を以下の検出に用いた。

【0063】試験方法

図1の被検試料受領部2に被検試料50μLを滴下し、次いで、標識複合体を含有する溶液100μLを標識複合体受領部1に滴下した。15分後に、固定相3およびリファレンス相4での発色の有無を観察した。青色の発色を陽性とした。

【0064】なお、判定基準は以下の通りである。

++: 非常に強い発色

+: 強い発色

±: 弱い発色

-: 発色なし

【0065】試験例1: 大腸菌O157加熱処理菌の検出

被検試料として、大腸菌O157(ATCC strain 35150)加熱処理菌の10倍段階希釈系列を生理食塩水にて調製したものを用いた。標識複合体を含有する溶液は、調製例1の3)で得られたもののうち、それぞれ標識複合体A(実施例1)、標識複合体B(比較例1)または標識複合体C(比較例2)を使用した。上記試験方法により、固定相3およびリファレンス相4での発色の有無を観察した。その結果を、表1に示す。

【0066】

【表1】

	標識 複合体	大腸菌O157加熱処理菌 (cells /mL)															
		10 <sup>9</sup>		10 <sup>8</sup>		10 <sup>7</sup>		10 <sup>6</sup>		10 <sup>5</sup>		10 <sup>4</sup>		10 <sup>3</sup>		0	
		T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R	T	R
実施例1	A	+	+	++	+	++	+	++	+	+	+	±	+	-	+	-	+
比較例1	B	-	-	+	-	++	±	++	+	+	+	±	+	-	+	-	+
比較例2	C	+	+	+	+	+	+	±	+	-	+	-	+	-	+	-	+

A：高感度抗体結合着色ラテックス粒子と低感度抗体結合着色ラテックス粒子

B：高感度抗体結合着色ラテックス粒子

C：低感度抗体結合着色ラテックス粒子

T：固定相

R：リファレンス相

【0067】実施例1では、10<sup>4</sup> ~ 10<sup>9</sup> cells/mLの広範囲で大腸菌O157が検出可能であり、全ての測定範囲にわたってリファレンス相4の発色が明瞭であった。比較例1では、10<sup>4</sup> cells/mLから大腸菌O157が検出できた。しかし、10<sup>8</sup> cells/mLでは固定相3で発色が認められたが、リファレンス相4の発色が認められず判定不能であった。さらに、10<sup>9</sup> cells/mLでは固定相3、リファレンス相4ともに発色が認められず、判定不能であった。比較例2では、10<sup>6</sup> cells/mLになるまで大腸菌の測定はできなかつた。このように、大腸菌O157に対する検出感度が異なる抗体を有する2種類の標識複合体を使用すると、低濃度~高濃度の

\*開性が直接的に確認でき、検査が正常に行なわれたという確認ができる。

【0068】試験例2：大腸菌O157培養液からの大腸菌O157の検出

被検試料として、大腸菌O157 (ATCC strain 35150、700375、700376、700377) をTSB培地にて培養して、得られた培養液を用いた。菌数は、得られた培養液の希釈系列を作製し、ペトリフィルム(3M製)にて37、18時間培養し、コロニーを計数して求めた。標識複合体を含有する溶液は、調製例1の3)で得られたもののうち、標識複合体A(実施例2)または標識複合体B(比較例3)を使用した。上記試験方法により、固定相3およびリファレンス相4での発色の有無を観察した。その結果を、表2に示す。

【0069】

【表2】

	標識 複合体	大腸菌O157 (ATCC strain No.)							
		35150		700375		700376		700377	
		T	R	T	R	T	R	T	R
実施例2	A	++	+	++	+	++	+	++	+
比較例3	B	+	-	++	±	+	-	+	-
菌数 (cfu/mL)		1×10 <sup>9</sup>		2.6×10 <sup>8</sup>		9.7×10 <sup>8</sup>		1.3×10 <sup>9</sup>	

A：高感度抗体結合着色ラテックス粒子と低感度抗体結合着色ラテックス粒子

B：高感度抗体結合着色ラテックス粒子

T：固定相

R：リファレンス相

【0070】実施例2では、全てのstrainにおいてリファレンス相4が強く発色し、検査が正常に行なわれたことが確認された。一方、比較例3では、大腸菌O157 ATCC strain 35150、700376、700377においてリファレ

ンス相4の発色が認められず、検査が正常に行なわれたという確認ができなかつた。したがって、大腸菌O157に対する検出感度が異なる抗体を有する2種類の標識複合体を使用することにより、リファレンス相4が強く

発色するようになり、検査が正常に行なわれたという確認ができるようになることがわかる。

【0071】試験例3：食品培養液からの大腸菌O157の検出

大腸菌O157 (ATCC strain 35150、700375、700376、700377) をTSB培地で培養した。また、対照として、大腸菌非接種のものを同条件でTSB培地で培養した。得られた培養液を生理食塩水にて希釈し、10<sup>7</sup>倍希釈液0.4mLを牛挽肉10gに添加して、ノボピオシン(20mg/L)含有mEC(日水製薬製)9.0m\*10

\*Lを加えた。これをストマッカーでホモジナイズし、42、24時間静置培養したものを、被検試料として用いた。標識複合体を含有する溶液は、調製例1の3)で得られたもののうち、標識複合体A(実施例3)または標識複合体B(比較例4)を使用した。上記試験方法により、固定相3およびリファレンス相4での発色の有無を観察した。その結果を、表3に示す。

【0072】

【表3】

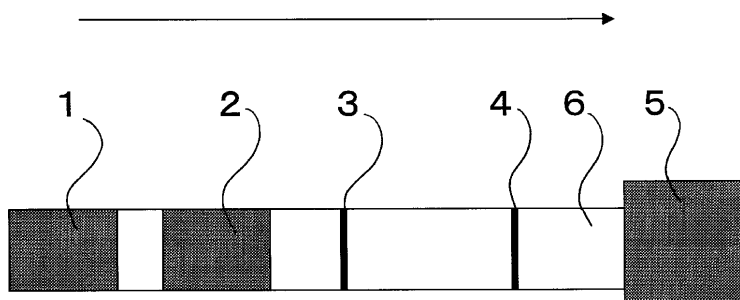
	標識複合体	大腸菌O157 (ATCC strain No.)									
		35150		700375		700376		700377		非接種	
		T	R	T	R	T	R	T	R	T	R
実施例3	A	++	±	++	+	++	±	++	±	-	+
比較例4	B	++	-	++	±	+	-	+	-	-	+

A：高感度抗体結合着色ラテックス粒子と低感度抗体結合着色ラテックス粒子  
 B：高感度抗体結合着色ラテックス粒子  
 T：固定相  
 R：リファレンス相

【0073】実施例3では、いずれのstrainを接種した牛挽肉培養液においても固定相3が強く発色し、大腸菌O157が存在することが示された。さらにリファレンス相4も発色し、検査が正常に行なわれたことが確認された。比較例4では、大腸菌O157 ATCC strain 35150、700376、700377において、固定相3ではいずれも発色が認められO157が検出されたが、リファレンス相4の発色が認められず、検査が正常に行なわれたという30確認ができなかった。したがって、大腸菌O157に対する検出感度が異なる抗体を有する2種類の標識複合体を使用することにより、リファレンス相4の発色が確実となり、検査が正常に行なわれたという確認ができるため、高濃度の大腸菌が存在した場合も不具合なく測定が可能であることがわかる。

【0074】

【図1】



\*【発明の効果】本発明の免疫クロマトグラフ用標識複合体組成物を使用することにより、広い範囲の被検物質での確実性の高い免疫クロマトグラフ測定を行なうことが可能となる。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、本発明の免疫クロマトグラフ用試験片の1つの態様を示す模式図(平面図)である。

【符号の説明】

- 1 標識複合体受領部
- 2 被検試料受領部
- 3 固定相
- 4 リファレンス相
- 5 吸水パッド
- 6 吸水性基材

フロントページの続き

(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

专利名称(译)	用于免疫层析的标记的复合组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003107090A</a>	公开(公告)日	2003-04-09
申请号	JP2001302276	申请日	2001-09-28
[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	丸山幸治 雜賀健 千田修治		
发明人	丸山 幸治 雜賀 健 千田 修治		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/532 G01N33/58		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/532.A G01N33/58.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA22 2G045/AA28 2G045/CA25 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB07 2G045/CB12 2G045/CB21 2G045/DA36 2G045/DA80 2G045/FA18 2G045/FB01 2G045/FB03 2G045/FB04 2G045/FB06 2G045/FB07 2G045/FB11 2G045/FB12 2G045/FB16 2G045/FB17 2G045/HA02 2G045/HA10		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种用于免疫色谱的标记复合物组合物以及使用该复合物组合物的免疫色谱方法，所述组合物具有确定性，该复合物能够可靠地检测多种受试物质中的受试物质。标记复合物组合物，其包含两种或更多种具有标记物质的标记复合物和针对测试物质的抗体，其中标记复合物中抗体对测试物质的检测敏感性彼此不同。一种用于免疫色谱的标记的复合物组合物，其特征在于：使用具有固定相的测试件，在该固定相上固定有针对测试物质的抗体在吸水基质上，以及测试样品中的测试物质。5.根据权利要求1至4中任一项所述的标记复合物组合物中，是否存在以下(a)和(b)：(a)测试物质，(b)标记复合物，复合物的存在或不存在。一种免疫色谱法，其特征在于被检测。

157に対する標識複合体の展\* 【表2】

	標識複合体	大腸菌O157 (ATCC strain No.)							
		35150		700375		700376		700377	
		T	R	T	R	T	R	T	R
実施例2	A	++	+	++	+	++	+	++	+
比較例3	B	+	-	++	±	+	-	+	-
菌数 (cfu/mL)		1×10 <sup>9</sup>		2.6×10 <sup>9</sup>		9.7×10 <sup>8</sup>		1.3×10 <sup>9</sup>	