

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2008-292326

(P2008-292326A)

(43) 公開日 平成20年12月4日(2008.12.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	

審査請求 未請求 請求項の数 30 O L (全 17 頁)

(21) 出願番号 特願2007-138448 (P2007-138448)
 (22) 出願日 平成19年5月24日 (2007.5.24)

(71) 出願人 593025712
 株式会社ビーエル
 静岡県沼津市神田町6番26号
 (74) 代理人 100091502
 弁理士 井出 正威
 (74) 代理人 100125933
 弁理士 野上 晃
 (72) 発明者 難波 靖治
 静岡県沼津市神田町6番26号 株式会社
 ビーエル内

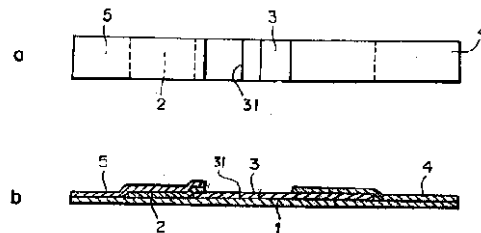
(54) 【発明の名称】 ヒアルロン酸存在下における免疫測定法及びそれに用いられる物

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 生体試料を検体抽出液で希釈して得られた被験試料中の検体を免疫測定法によって高感度に検出できるようにする。

【解決手段】 被験試料をヒアルロン酸の存在下で抗体抗原反応に供することからなる免疫測定法。免疫測定法は、第一の抗体と第二の抗体との間に被験試料に含まれる検体をサンドイッチするサンドイッチ式免疫測定法が好ましく、特に、イムノクロマトグラフィー測定法であることが好ましい。ヒアルロン酸は、採取した生体試料を希釈して免疫測定に供する被験試料を得るための検体抽出液や、イムノクロマトグラフィー測定に使用する展開溶媒に含有させてよく、使用時に該抽出液や展開溶媒に投入したり、クロマト用膜担体に配置して使用できるように、凍結乾燥状態で含浸部材に含浸させて形態としてもよい。ヒアルロン酸の分子量は1万~100万Daであることが好ましい。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

被験試料をヒアルロン酸の存在下で抗体抗原反応に供することからなる免疫測定法。

【請求項 2】

前記免疫測定法が、第一の抗体と第二の抗体との間に被験試料に含まれる検体をサンドイッチするサンドイッチ式免疫測定法である、請求項 1 に記載免疫測定法。

【請求項 3】

前記免疫測定法が、イムノクロマトグラフィー測定法である、請求項 2 に記載の免疫測定法。

【請求項 4】

ヒアルロン酸を含有する被験試料を、イムノクロマト法テストストリップに注入してクロマト展開させることからなる、請求項 3 に記載の免疫測定法。

【請求項 5】

被験試料を、ヒアルロン酸が配置されたイムノクロマト法テストストリップに注入して該ヒアルロン酸とともにクロマト展開させることからなる、請求項 3 に記載の免疫測定法。

【請求項 6】

ヒアルロン酸の分子量が 1 万 ~ 1 0 0 万 D a である請求項 3 乃至 5 の何れか 1 項に記載の免疫測定法。

【請求項 7】

検体の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の物質を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、前記検体の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の物質と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる検体と前記第二の抗体とを備えた複合体を前記捕捉部位に捕捉させるイムノクロマトグラフィー測定法であって、クロマト展開の前またはクロマト展開と同時に、前記被験試料をヒアルロン酸と混合することを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 8】

膜担体とは別体の容器中で前記混合液又は前記被験試料にヒアルロン酸を混合した後、これをクロマト展開せしめる、請求項 7 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 9】

ヒアルロン酸は予め含浸部材に凍結乾燥状態で含浸されており、該含浸部材を前記容器に配置することにより、前記混合液又は前記被験試料をヒアルロン酸と混合する、請求項 8 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 10】

ヒアルロン酸を膜担体に配置しておき、前記混合液又は前記被験試料をクロマト展開させた時に前記混合液又は前記被験試料とヒアルロン酸とが混合するようにした、請求項 7 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 11】

前記第二の物質は金属コロイドまたはラテックスで標識されている請求項 7 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 12】

前記膜担体がニトロセルロース膜である請求項 11 に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 13】

ヒアルロン酸の分子量が 1 万 ~ 1 0 0 万 D a である、請求項 7 乃至 12 の何れか 1 項に記載のイムノクロマトグラフィー測定法。

【請求項 14】

検体の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の物質と、前記検体の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の物質と、膜担体とを少なくとも備え、前記第一の物質は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の

10

20

30

40

50

物質は前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されてなるイムノクロマト法テストストリップと、検体を希釈して前記膜担体にクロマト展開できるように被験試料を調製するための展開溶媒とを少なくとも備えてなるイムノクロマトグラフィー測定用キットであって、さらに、前記展開溶媒に添加するヒアルロン酸を備えていることを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定用キット。

【請求項 15】

ヒアルロン酸は予め含浸部材に凍結乾燥状態で含浸されており、展開溶媒を含有する容器中に該含浸部材を配置して用いられる、請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

前記第二の物質は金属コロイドまたはラテックスで標識されている、請求項 14 に記載のキット。

10

【請求項 17】

前記膜担体がニトロセルロース膜である、請求項 16 に記載のキット。

【請求項 18】

ヒアルロン酸の分子量が 1 万 ~ 1 0 0 万 Da である、請求項 14 乃至 17 の何れか 1 項に記載のキット。

【請求項 19】

検体の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の物質と、前記検体の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の物質と、膜担体とを少なくとも備え、前記第一の物質は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の物質は前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されてなるイムノクロマト法テストストリップであって、ヒアルロン酸が前記膜担体の前記第二の物質が配置されている箇所又はその近傍に配置されていることを特徴とする、イムノクロマト法テストストリップ。

20

【請求項 20】

ヒアルロン酸は凍結乾燥状態で配置されている、請求項 19 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 21】

ヒアルロン酸は含浸部材に含浸された状態で膜担体に配置されている、請求項 20 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

30

【請求項 22】

前記第二の物質は金属コロイドまたはラテックスで標識されている請求項 19 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 23】

前記膜担体がニトロセルロース膜である請求項 22 に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 24】

ヒアルロン酸の分子量が 1 万 ~ 1 0 0 万 Da である、請求項 19 乃至 23 の何れか 1 項に記載のイムノクロマト法テストストリップ。

【請求項 25】

検体を希釈して免疫測定に供する被験試料を得るための抽出液であって、ヒアルロン酸を含有することを特徴とする免疫測定用抽出液。

40

【請求項 26】

イムノクロマトグラフィー展開溶媒として使用される請求項 25 に記載の免疫測定用抽出液。

【請求項 27】

ヒアルロン酸の分子量が 1 万 ~ 1 0 0 万 Da である、請求項 26 に記載の免疫測定用抽出液。

【請求項 28】

検体を希釈して免疫測定に供する被験試料を得るための抽出液調製キットであって、溶媒

50

と、ヒアルロン酸を凍結乾燥状態で含浸した含浸部材とを備え、使用時に該溶媒に該含浸部材を接触させて抽出液を調製できるようにした、免疫測定用抽出液調製キット。

【請求項 29】

イムノクロマトグラフィー展開溶媒として使用される請求項 28 に記載の免疫測定用抽出液調製キット。

【請求項 30】

ヒアルロン酸の分子量が 1 万 ~ 1 0 0 万 Da である、請求項 29 に記載の免疫測定用抽出液調製キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本発明は、ヒアルロン酸を用いた高感度な免疫測定法、及び、該測定法に用いられる物に関するものであり、とりわけ、イムノクロマトグラフィー測定法に有用な方法及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫測定法は抗原抗体反応を利用して抗原又は抗体を同定又は定量する方法であり、代表的には、免疫比濁法 (TIA)、標識化免疫測定法などが知られており、後者には、ラジオイムノアッセイ (RIA)、エンザイムイムノアッセイ (EIA)、蛍光イムノアッセイ (FIA) などが含まれる。また、これらを応用した免疫測定法として、酵素免疫測定法 (ELISA 法) やイムノクロマトグラフィー測定法などのサンドイッチ式免疫測定法が知られている。このうち、イムノクロマトグラフィー測定法は、抗原抗体反応に起因する高い特異性を備え、操作が煩雑な重厚な設備や機器を必要とせず、軽便な器具を用いて簡易かつ迅速に測定を行え、結果を目視で判定できることから、臨床診断法として広く普及している。

20

【0003】

しかし、従来 of 免疫測定法では、感度が不十分な場合があり、特に、生体から採取した試料をそのまま検体抽出液で希釈して被験試料を調製し、これを膜担体に浸透すなわちクロマト展開させて膜担体の捕捉部位における標識物質の集積量を目視判定するイムノクロマトグラフィー測定法では、生体試料又は検体の種類、構造、濃度等によって十分な感度が得られない場合があった。

30

免疫測定法では、従来、検出感度の向上を目的として、検体抽出液にポリエチレングリコール (PEG) などの増感剤を配合することが行われている。また、イムノクロマトグラフィー測定法では、非特異的凝集および非特異反応を防止するために、展開溶媒中にウシ血清アルブミン (BSA) やホスホリルコリン基を有する重合体を含有させることが提案されている (特許文献 1 参照)。

【0004】

しかしながら、いずれの免疫測定法においても更に一層の感度上昇が求められており、特に、採取した生体試料をそのまま検体抽出液で希釈して抗原抗体反応に供するイムノクロマトグラフィー測定法の感度を上昇させる増感剤が求められていた。

40

【0005】

【特許文献 1】特開 2003-344406 号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

そこで、本発明は、生体試料を検体抽出液で希釈して得られた被験試料中の検体を免疫測定法によって高感度に検出できるようにする方法を提供することを目的とする。また、本発明は前記方法を実施するに好適なイムノクロマトグラフィー測定用キット等の装置及びその他の物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】

50

【0007】

本発明者等は、被験試料を各種化合物の共存下で抗原抗体反応させた場合の免疫測定感度への影響について検討した結果、被験試料をヒアルロン酸の存在下で抗体抗原反応に供した場合に、免疫測定感度が有意に向上することを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明の一局面によれば、被験試料をヒアルロン酸の存在下で抗体抗原反応に供することからなる免疫測定法が提供される。

この検出法における免疫測定法としては、特に限定されるものではなく、例えば、上記した免疫測定法が全て含まれるが、そのうち、第一の抗体と第二の抗体との間に被験試料に含まれる検体をサンドイッチするサンドイッチ式免疫測定法、とりわけE L I S A (E n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y) 法、イムノクロマトグラフィー測定法など、特にイムノクロマトグラフィー測定法において高い効果が得られる。

10

【0009】

したがって、本発明の好ましい実施形態によれば、ヒアルロン酸を含有する被験試料を、イムノクロマト法テストストリップに注入してクロマト展開させることからなる免疫測定法、すなわち、イムノクロマトグラフィー測定法が提供される。

また、本発明の他の好ましい実施形態によれば、被験試料を、ヒアルロン酸が配置されたイムノクロマト法テストストリップに注入して該ヒアルロン酸とともにクロマト展開させることからなる免疫測定法、すなわち、イムノクロマトグラフィー測定法が提供される。

20

【0010】

さらに、本発明の他の局面によれば、検体の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の物質を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、前記検体の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の物質と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる検体と前記第二の抗体とを備えた複合体を前記捕捉部位に捕捉させるイムノクロマトグラフィー測定法であって、クロマト展開の前またはクロマト展開と同時に、前記被験試料をヒアルロン酸と混合することを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定法が提供される。

30

【0011】

前記被験試料とヒアルロン酸との混合は、例えば、クロマト展開の前に、膜担体とは別体の容器中で前記混合液又は前記被験試料をヒアルロン酸と混合することが挙げられる。ヒアルロン酸を予め含浸部材に凍結乾燥状態で含浸させておき、該含浸部材を前記容器に配置して、前記混合液又は前記被験試料とヒアルロン酸を容器中で接触させて混合できるようにしてもよい。含浸部材は、容器中に直接投入してもよく、または、容器の排出口付近に設置して、容器の排出口から前記混合液又は前記被験試料を排出する時にヒアルロン酸と混合するようにしてもよい。

別法としては、ヒアルロン酸を膜担体に配置しておき、前記混合液又は前記被験試料が膜担体をクロマト展開する時に前記混合液又は前記被験試料とヒアルロン酸とが共存する

40

【0012】

また、本発明の更に他の局面によれば、本発明のイムノクロマトグラフィー測定法を実施するのに好適な装置として、検体の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の物質と、前記検体の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の物質と、膜担体とを少なくとも備え、前記第一の物質は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の物質は前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されてなるイムノクロマト法テストストリップと、検体を希釈して前記膜担体にクロマト展開できるように被験試料を調製するための展開溶媒とを少なくとも備えてなるイムノクロマトグラフィー測定用キットであって、さらに、前記展開

50

溶媒に添加するヒアルロン酸を備えていることを特徴とするイムノクロマトグラフィー測定用キットが提供される。

【0013】

このキットでは、被験試料は、クロマト展開前に、ヒアルロン酸を含有する展開溶媒と混合され、ヒアルロン酸との混合が確実に行われ、また、イムノクロマト法テストストリップは従来と同様の構成のものをそのまま使用できるので、好都合である。

このキットにおいては、ヒアルロン酸を予め含浸部材に凍結乾燥状態で含浸させておき、該含浸部材を前記容器に配置して、前記混合液又は前記被験試料とヒアルロン酸を容器中で接触させて混合できるようにしてもよい。含浸部材は、容器中に直接投入してもよく、または、容器の排出口付近に設置して、容器の排出口から前記混合液又は前記被験試料を排出する時にヒアルロン酸と混合するようにしてもよい。

10

【0014】

また、本発明の更に別の局面によれば、検体の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の物質と、前記検体の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の物質と、膜担体とを少なくとも備え、前記第一の物質は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の物質は前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されてなるイムノクロマト法テストストリップであって、ヒアルロン酸が前記膜担体の前記第二の物質が配置されている箇所又はその近傍に配置されていることを特徴とする、イムノクロマト法テストストリップが提供される。ヒアルロン酸は凍結乾燥状態で配置することが好ましい。また、ヒアルロン酸は膜担体に直接配置されてもよく、又は、含浸部材に含浸された状態で膜担体に配置されてもよく、例えば、膜担体に接続された含浸部材に第二の抗体とともに含浸させておいてもよい。

20

このイムノクロマト法テストストリップでは、被験試料は、クロマト展開と同時に、膜担体に配置されたヒアルロン酸と混合されるので、従来のイムノクロマト法テストストリップと同様の操作で本発明の測定法が実施できるので、好都合である。

【0015】

さらに、本発明によれば、上記免疫測定法を実施するのに好適な物として、検体を希釈して免疫測定に供する被験試料を得るための抽出液であって、ヒアルロン酸を含有することを特徴とする免疫測定用抽出液が提供される。

さらに、本発明によれば、上記免疫測定法を実施するのに好適な他の物として、検体を希釈して免疫測定に供する被験試料を得るための抽出液調製キットであって、溶媒と、ヒアルロン酸を凍結乾燥状態で含浸した含浸部材とを備え、使用時に該溶媒に該含浸部材を接触させて抽出液を調製できるようにした、免疫測定用抽出液調製キットが提供される。

30

上記抽出液が、イムノクロマトグラフィー測定用展開溶媒としての組成を備えている場合は、該抽出液を用いて検体を希釈することにより、イムノクロマトグラフィー測定用の被験試料としてそのまま使用できる。

【発明の効果】

【0016】

本発明によれば、免疫測定法において、被験試料をヒアルロン酸の存在下で抗体抗原反応に供することとしたので、免疫測定感度を向上させることができる。

40

従来、気管スワブ、クローアスワブ、鼻汁、血液等の生体から採取した試料をそのまま検体抽出液で希釈して被験試料として免疫測定に供した場合、免疫測定感度が低下することが問題とされていた。

本発明によれば、理論は明らかではないが、ヒアルロン酸により、上記生体試料中に含まれる細胞成分や粘膜成分などの生体成分による反応阻害が低下するため、免疫測定感度が向上するものと考えられる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

なお、本明細書において、被験試料とは、免疫測定に供される試料を意味し、検体とは、免疫測定によって測定しようとする対象物質(analyte)を意味する。

50

【0018】

本発明で用いるヒアルロン酸(hyaluronic acid)は、グリコサミノグリカン(ムコ多糖)の一種であり、N-アセチルグルコサミンとグルクロン酸の二糖単位が連結した構造を有する高分子化合物であり、生体内では、通常分子量数百万Daの高分子として存在する。本発明においては、ヒアルロン酸の分子量は1万~100万Daであることが好ましく、より好ましくは3万~75万Daであり、さらにより好ましくは5万~50万Daであり、特に好ましくは5万~10万Daである。ヒアルロン酸の分子量が小さすぎると十分な増感効果が得られなくなり、ヒアルロン酸の分子量が大きすぎると、特にイムノクロマトグラフィー測定法では十分な反応性が得られなくなる。ヒアルロン酸の分子量は、公知の粘度測定法に基づき極限粘度値から求めることができる。なお、本発明において、ヒアルロン酸とは、ナトリウム塩等の塩を含む概念である。

10

【0019】

本発明の免疫測定法において、被験試料をヒアルロン酸の存在下で抗体抗原反応に供するためには、例えば、ヒアルロン酸を適当な水系溶媒、例えば、水、生理食塩水または緩衝液と混合し、これに生体から採取された試料を分散又は溶解させればよい。抗体抗原反応は、通常、室温で行える。溶媒のpHは、必要に応じて、適当なpH調整剤を用いて、ヒアルロン酸の添加効果が最も向上するpH(4.5~7.0)に合わせることができる。但し、イムノクロマトグラフィー測定法においては、展開溶媒のpHは6.7~7.7の範囲とすることが好ましい。緩衝液としては、例えば、トリス緩衝液およびリン酸緩衝液などが挙げられ、その他、HEPES(2-ヒドロキシピペラジン-N'-2-エタンスルホン酸)緩衝液なども使用できる。pH調整剤としては、例えば、塩酸、水酸化ナトリウムなどが使用できる。被験試料中のヒアルロン酸の濃度は、対象とする検体や生体試料によって異なるが、通常、0.01~0.25重量%であればよく、好ましくは0.1~0.23重量%、さらにより好ましくは0.15~0.23重量%、特に好ましくは0.17~0.23重量%である。ヒアルロン酸を過剰に添加すると、非特異反応が生じることがあり、好ましくない。

20

【0020】

本発明においては、溶媒に所定量のヒアルロン酸を含有せしめたものを、検体抽出液の形態で提供することもできる。この場合、生体から採取した試料を検体抽出液に添加して希釈することで、ヒアルロン酸を含有する被験試料を得ることができる。この被験試料は、そのまま、本発明の免疫測定法に供することができ、好都合である。

30

なお、該検体抽出液は、保存時におけるヒアルロン酸の失活を防止するために、凍結乾燥状態で含浸部材に含浸させておき、使用時に、溶媒と該含浸部材を接触させることで上記検体抽出液を調製できる免疫測定用抽出液調製キットの形態としてもよい。含浸部材としては、例えば、ガラス繊維不織布、セルロース類布(濾紙、ニトロセルロース膜等)、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック布類などが使用できる。

【0021】

本発明の免疫測定法がイムノクロマトグラフィー測定法である場合は、溶媒に所定量のヒアルロン酸を含有せしめたものを、イムノクロマトグラフィー測定用展開溶媒の形態で提供することもできる。この場合、生体から採取した試料を展開溶媒に添加して希釈することで、ヒアルロン酸を含有する被験試料を得ることができる。この処理液は、そのまま、被験試料として従来のイムノクロマトテストストリップを用いた測定に供することができ、好都合である。

40

なお、このイムノクロマトグラフィー測定用展開溶媒は、保存時におけるヒアルロン酸の失活を防止するために、ヒアルロン酸を凍結乾燥状態で含浸部材に含浸させておき、使用時に、展開溶媒と該含浸部材とを接触させることで上記展開溶媒を調製できる免疫測定用展開溶媒調製キットの形態としてもよい。含浸部材としては、例えば、ガラス繊維不織布、セルロース類布(濾紙、ニトロセルロース膜等)、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック布類などが使用できる。

上記抽出液及び展開溶媒は、必要に応じ、界面活性剤、防腐剤、無機塩、特開2003-344

50

406に記載の重合体等の各種添加剤を含有しても良い。

【0022】

本発明の免疫測定法が、第一の抗体と第二の抗体との間に前記抗原をサンドイッチするサンドイッチ式免疫測定法である場合、使用する抗体は、各種免疫測定法において通常使用されているポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体であってよいが、反応特異性の点から、通常、モノクローナル抗体であることが好ましい。特に、本発明の免疫測定法がイムノクロマトグラフィ測定法である場合、第一の抗体及び第二の抗体の少なくとも何れか一方がモノクローナル抗体であることが好ましい。

【0023】

本発明を適用するイムノクロマトグラフィ測定法としては、特に制限はなく、競合法であっても非競合法であってもよく、例えば、特開昭61-145459号公報、国際公開WO88/8534、特開昭64-63865号公報、特開2001-337091号公報、特開2005-31029号公報、特開2007-46959号公報などに記載のものが挙げられる。

10

【0024】

イムノクロマトグラフィ測定法は、例えば、検体の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の物質を予め所定位置に固定せしめて形成された捕捉部位を備える膜担体を用意し、前記検体の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の物質と所定量の被験試料との混合液を、前記捕捉部位に向けて前記膜担体にてクロマト展開せしめ、前記被験試料中に含まれる検体と前記第二の抗体とを備えた複合体を前記捕捉部位に捕捉させることで実施できる。ここで、クロマト展開の前またはクロマト展開と同時に、前記被験試料をヒアルロン酸と混合することで本発明を実施できる。

20

イムノクロマトグラフィ測定法は、公知のイムノクロマト法テストストリップの構成に準拠して容易に実施できる。

【0025】

一般に、かかるイムノクロマト法テストストリップは、検体の第一の抗原決定基にて抗体抗原反応可能な第一の物質と、前記検体の第二の抗原決定基にて抗体抗原反応可能で且つ標識された第二の物質と、膜担体とを少なくとも備え、前記第一の物質は前記膜担体の所定位置に予め固定されて捕捉部位を形成し、前記第二の物質は前記捕捉部位から離隔した位置で前記膜担体にてクロマト展開可能なように配置されて構成される。

30

このイムノクロマト法テストストリップは、検体を希釈して前記膜担体にクロマト展開できるように被験試料を調製するための展開溶媒と、前記展開溶媒に混合するヒアルロン酸とをセットにしたイムノクロマトグラフィ測定用キットの形態で供給することもできる。この場合、ヒアルロン酸は、上記免疫測定用抽出液調製キットと同様の形態で用意されていてもよい。

【0026】

検体が抗原である場合、前記第一の物質及び第二の物質として抗体が使用され、上述のように、各抗体はそれぞれ独立に、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、少なくとも何れか一方がモノクローナル抗体であることが好ましい。通常は、第一の物質（抗体）及び第二の物質（抗体）は「ヘテロ」の組み合わせで用いられ、すなわち、抗原上の位置および構造の何れもが異なる各抗原決定基をそれぞれ認識する第一の物質（抗体）及び第二の物質（抗体）が組み合わせで用いられる。しかしながら、第一の抗原決定基と第二の抗原決定基は抗原上の位置が異なっていれば構造的に同一であってもよく、その場合、第一の物質（抗体）および第二の物質（抗体）は「ホモ」の組み合わせのモノクローナル抗体であってよく、すなわち、第一の物質（抗体）および第二の物質（抗体）の両方に同一のモノクローナル抗体が使用できる。

40

検体が抗体である場合、第一の物質として抗原が使用され、第二の物質として検体に対して特異的反応性を有する抗体などの物質が使用される。

【0027】

イムノクロマト法テストストリップの具体例としては、例えば、図1に示されるテスト

50

ストリップが挙げられる。図 1 において、数字 1 は粘着シート、2 は含浸部材、3 は膜担体、3 1 は捕捉部位、4 は吸収用部材、5 は試料添加用部材を示している。

図示の例では、膜担体 3 は、幅 5 mm、長さ 36 mm の細長い帯状のニトロセルロース製メンブレンフィルターで作成されている。

該膜担体 3 には、そのクロマト展開開始点側の末端から 7.5 mm の位置に、第一の抗体が固定され、検体の捕捉部位 3 1 が形成される。

図示の例では、膜担体 3 は、ニトロセルロース製メンブレンフィルターを用いているが、被験試料に含まれる検体をクロマト展開可能で、かつ、上記捕捉部位 3 1 を形成する上記第一の物質を固定可能なものであれば、いかなるものであってもよく、他のセルロース類膜、ナイロン膜、ガラス繊維膜なども使用できる。

10

【0028】

含浸部材 2 は、前記第一の物質が結合する第一の抗原決定基と異なる部位に位置する第二の抗原決定基にて検体と抗体抗原反応する第二の物質を含浸せしめた部材からなる。当該第二の物質は、適当な標識物質で予め標識される。

図示の例では、含浸部材 2 として、5 mm × 15 mm の帯状のガラス繊維不織布を用いているが、これに限定されるものではなく、例えば、セルロース類布（濾紙、ニトロセルロース膜等）、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック布類なども使用できる。

【0029】

第二の物質の標識物質としては、使用可能なものであればいかなる物質であってもよく、呈色標識物質、酵素標識物質、放射線標識物質などが挙げられる。

20

このうち、捕捉部位 3 1 での色の変化を肉眼で観察することにより迅速かつ簡便に判定できる点から、呈色標識物質を用いることが好ましい。

呈色標識物質としては、金コロイド、白金コロイド等の金属コロイドの他、赤色および青色などのそれぞれの顔料で着色されたポリスチレンラテックスなどの合成ラテックスや、天然ゴムラテックスなどのラテックスが挙げられ、このうち、金コロイドなどの金属コロイドが特に好ましい。

当該含浸部材 2 は、標識された第二の物質の懸濁液を前記ガラス繊維不織布等の部材に含浸せしめ、これを乾燥させることなどによって作製できる。

【0030】

30

図 1 に示されるように、膜担体 3 を粘着シート 1 の中程に貼着し、該膜担体 3 のクロマト展開の開始点側（すなわち図 1 の左側、以下「上流側」と記す、また、その逆の側、すなわち図 1 の右側を、以下「下流側」と記す）の末端の上に、含浸部材 2 の下流側末端を重ね合わせて接続するとともに、この含浸部材 2 の上流側部分を粘着シート 1 に貼着して本発明のイムノクロマト法テストストリップを作成できる。

さらに、必要に応じて、含浸部材 2 の上面に試料添加用部材 5 の下流側部分を載置するとともに、該試料添加用部材 5 の上流側部分を粘着シート 1 に貼着してもよく、また、膜担体 3 の下流側部分の上面に吸収用部材 4 の上流側部分を載置するとともに、該吸収用部材 4 の下流側部分を粘着シート 1 に貼着せしめることもできる。

【0031】

40

試料添加用部材 5 としては、例えば、多孔質ポリエチレンおよび多孔質ポリプロピレンなどのような多孔質合成樹脂のシートまたはフィルム、ならびに、濾紙および綿布などのようなセルロース製の紙または織布もしくは不織布を用いることができる。

吸収用部材 4 は、液体をすみやかに吸収、保持できる材質のものであればよく、綿布、濾紙、およびポリエチレン、ポリプロピレン等からなる多孔質プラスチック不織布等を挙げることができるが、特に濾紙が最適である。

【0032】

さらに、市販品の場合、図 1 のイムノクロマト法テストストリップは、試料添加用部材 5 と捕捉部位 3 1 の上方にそれぞれ被験試料注入部と判定部が開口された適当なプラスチック製ケース内に収容されて提供される。

50

【0033】

かくして、生体から採取した試料を、ヒアルロン酸を含有した展開溶媒と混合してクロマト展開可能な混合液を得た後、当該混合液を図1に示されるイムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上に注入すると、該混合液は、該試料添加用部材5を通過して含浸部材2において、標識された第二の物質と混合する。

その際、該混合液中に検体が存在すれば、抗原抗体反応により検体と第二の物質との複合体が形成される。

この複合体は、膜担体3中をクロマト展開されて捕捉部位31に到達し、そこに固定された第一の物質と抗原抗体反応して捕捉される。

このとき、標識物質として金コロイドなどの呈色標識物質が使用されていれば、当該呈色標識物質の集積により捕捉部位31が発色するので、直ちに、検体を定性的または定量的に測定することができる。

10

【0034】

本発明においては、被験試料がクロマト展開と同時にヒアルロン酸で処理されるように、上記イムノクロマト法テストストリップの適当な箇所にヒアルロン酸を例えば凍結乾燥状態で配置しておくこともできる。この場合、上記のように展開溶媒にヒアルロン酸を含有させておかなくてもよく、従来と同様の展開溶媒を用いて従来と同様の操作で、本発明の高感度な測定が行えるので、好都合である。

ヒアルロン酸を配置する箇所は、上記イムノクロマト法テストストリップの捕捉部位31よりも上流側であれば特に限定されないが、長い処理時間を確保するために、試料添加用部材5又は含浸部材2等のヒアルロン酸を含浸し得る部材又はその上などの近傍の箇所に配置しておくことが好ましい。

20

【0035】

本発明によれば、クロアカスワブ、気管スワブ、糞便、鼻腔吸引液、鼻腔ぬぐい液および咽頭ぬぐい液、血液（全血でも、血清でも、血漿でもよい）、唾液、尿、臓器乳剤等などの生体試料を、上記検体抽出液中に懸濁または溶解せしめるだけで、試料を均一に分散させた被験試料が得られる。例えば、咽頭などの患部を拭ったガーゼまたは綿棒などを検体抽出液中に浸漬又は振盪するだけで、被験試料を調製できる。

検体は、ヒアルロン酸と交差反応すること無く免疫測定法で検出可能なものであれば特に制限はなく、咽頭スワブに含まれる結核菌やO-157等の病原菌、インフルエンザウイルス、アデノウイルス等のウイルス、血液中に含まれるC反応性蛋白質などの抗原や各種抗体などの生体高分子の他、環境中に存在する環境ホルモン様物質などの微量物質が挙げられる。

30

【0036】

なお、全血を被験試料として用いるときで、特に標識物質として金コロイドなどの呈色標識物質が用いられる場合、前記試料添加用部材に血球捕捉膜部材を配置しておくことが好ましい。血球捕捉膜部材は、前記含浸部材と前記試料添加用部材との間に積層することが好ましい。これにより、赤血球が膜担体に展開されるのが阻止されるので、膜担体の捕捉部位における呈色標識の集積の確認が容易になる。血球捕捉膜部材としては、カルボキシメチルセルロース膜が用いられ、具体的には、アドバンテック東洋株式会社から販売されているイオン交換濾紙CM（商品名）や、ワットマンジャパン株式会社から販売されているイオン交換セルロースペーパーなどを用いることができる。

40

【実施例】

【0037】

下記の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこの実施例に限定されるものではない。

【0038】

参考例1（イムノクロマト法テストストリップの作成）（1）金コロイド溶液の調製

加熱によって沸騰させた超純水99mlに、1%（v/w）塩化金酸水溶液1mlを加え、さらに、

50

その1分後に1% (v/w) クエン酸ナトリウム水溶液1.5mlを加えて加熱し5分間沸騰させた後、室温に放置して冷却した。次いで、この溶液に200mM炭酸カリウム水溶液を加えてpH9.0に調製し、これに超純水を加えて全量を100mlとして金コロイド溶液を得た。

【0039】

(2) 金コロイド標識抗インフルエンザウイルスH5亜型抗体溶液の調製

インフルエンザウイルスH5亜型のヘマグルチニン蛋白に対して結合性を有する抗体(以下、抗H5抗体)を下記の手順でそれぞれ金コロイド標識した。

抗H5抗体の蛋白換算重量1 μ g(以下、抗体の蛋白換算重量を示すとき、単に、その精製蛋白質の重量分析による重量数値で示す)と上記(1)の金コロイド溶液1mlとを混合し、室温で2分間静置してこの抗体のこごとくを金コロイド粒子表面に結合させた後、金コロイド溶液における最終濃度が1%となるように10%ウシ血清アルブミン(以下、「BSA」と記す)水溶液を加え、この金コロイド粒子の残余の表面をこごとくこのBSAでブロックして、金コロイド標識抗H5抗体(以下、「金コロイド標識抗体」と記す)溶液を調製した。この溶液を遠心分離(5600 \times G、30分間)して金コロイド標識抗体を沈殿せしめ、上清液を除いて金コロイド標識抗体を得た。この金コロイド標識抗体を10%サッカロース・1%BSA・0.5%トリトン(Triton)-X100を含有する50mMトリス塩酸緩衝液(pH7.4)に懸濁して金コロイド標識抗体溶液を得た。

10

【0040】

(3) イムノクロマト法テストストリップの作成

図1に示されるイムノクロマト法テストストリップを下記の手順で作成した。

20

【0041】

(3-1) 捕捉部位の形成

幅5mm、長さ36mmの細長い帯状のニトロセルロース膜をクロマトグラフ媒体のクロマト展開用膜担体3として用意した。

抗H5抗体1.0mg/mlが含有されてなる溶液0.5 μ lを、このクロマト展開用膜担体3におけるクロマト展開開始点側の末端から7.5mmの位置にライン状に塗布して、これを室温で乾燥し、インフルエンザウイルスH5亜型と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位3-1とした。

【0042】

(3-2) 金コロイド標識抗体含浸部材

5mm \times 15mmの帯状のガラス繊維不織布に、金コロイド標識抗体溶液37.5 μ lを含浸せしめ、これを室温で乾燥させて金コロイド標識抗体含浸部材2とした。

30

【0043】

(3-3) イムノクロマト法テストストリップの作成

上記クロマト展開用膜担体3、上記標識抗体含浸部材2の他に、試料添加用部材5として綿布と、吸収用部材4として濾紙を用意した。そして、これらの部材を用いて、図1と同様のイムノクロマト法テストストリップを作成した。

【0044】

実施例1(ヒアルロン酸と他の高分子化合物との比較)

400mMトリス緩衝液(pH7.5)に、分子量50~100kDaのヒアルロン酸、ポリエチレングリコール(PEG)、又は、コンドロイチン硫酸を最終濃度0.2%となるように添加し、検体抽出液を調製した。対照として、何れの増感剤も添加していない400mMトリス緩衝液(pH7.5)からなる検体抽出液を用意した。

40

【0045】

上記検体抽出液に、インフルエンザウイルスであるA/Dk/Mong/54/01-Dk/Mong/47/01(H5N1)株を200ng/mlになるよう添加して被験試料とした。そして、被験試料100 μ lを参考例1で作成したインフルエンザウイルスH5亜型抗原検出用イムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上にマイクロピペットで滴下しクロマト展開させた。室温で30分放置後、捕捉部位3-1における捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダーで観察した。また、ウイルスを添加せずに(Blank)同様の実験を行った。

50

【0046】

捕捉量は、その量に比例して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で - (着色なし)、± (微弱な着色)、+ (明確な着色)、++ (顕著な着色) の4段階 (wは弱めを示す) に区分して判定し、それぞれイムノクロマトリーダーにより呈色強度を数値化した。結果を表1に示す。

【0047】

【表1】

表1

検体抽出液	未添加 (対照)		ヒアルロン酸		ポリエチレングリコール		コンドロイチン硫酸	
	目視	数値	目視	数値	目視	数値	目視	数値
Blank (緩衝液)	-	0	-	0	-	0	-	0
検体 200ng/ml	+w	13	++	81	+	35	±w	13

10

【0048】

検体抽出液として、インフルエンザウイルス感染陰性鳥より採取した気管の臓器乳剤を添加したものを使用した以外上記と同様の試験を行った。結果を表2に示す。なお、この臓器乳剤を含有する検体抽出液は下記の方法で調製した。

20

(臓器乳剤含有検体抽出液の調製方法)

インフルエンザウイルス感染陰性鳥より採取した気管に400mMトリス緩衝液 (pH 7.5) を添加し磨り潰すことで臓器乳剤を作製した。そして本乳剤を遠心分離し、遠心分離上清に分子量50~100kDaのヒアルロン酸、ポリエチレングリコール (PEG)、又は、コンドロイチン硫酸を最終濃度0.2%になるように添加し検体抽出液とした。対照として、何れの増感剤も添加していない臓器乳剤含有検体抽出液のみからなる検体抽出液を用意した。

30

【0049】

【表2】

表2

臓器乳剤 (気管)	未添加 (対照)		ヒアルロン酸		ポリエチレングリコール		コンドロイチン硫酸	
	目視	数値	目視	数値	目視	数値	目視	数値
Blank (緩衝液)	-	0	-	0	-	0	-	0
検体 200ng/ml	±ww	0	++	40	±	18	±ww	0

40

【0050】

表1及び表2の結果から、ヒアルロン酸は、公知の増感剤であるポリエチレングリコール (PEG) 及びヒアルロン酸と同じムコ多糖類であるコンドロイチン硫酸よりも高い増感効果を示すことがわかった。

【0051】

実施例2 (ヒアルロン酸分子量の検討)

400mMトリス緩衝液 (pH 7.5) に、分子量6.55kDa、3.5kDa、5.0

50

～100kDa又は132kDa、660kDa、1000kDaのヒアルロン酸を最終濃度0.2%となるように添加し、検体抽出液を調製した。対照として、ヒアルロン酸を添加していない400mMトリス緩衝液(pH7.5)からなる検体抽出液を用意した。

【0052】

上記検体抽出液に、インフルエンザウイルスであるA/Dk/Mong/54/01-Dk/Mong/47/01(H5N1)株を50ng/mlになるよう添加して被験試料とした。そして、被験試料100μLを参考例1で作成したインフルエンザウイルスH5亜型抗原検出用イムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上にマイクロピペットで滴下しクロマト展開させた。室温で30分放置後、捕捉部位31における捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダーで観察した。また、ウイルスを添加せずに(Blank)同様の実験を行った。

10

【0053】

捕捉量は、その量に比例して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で-(着色なし)、+ww(若干弱い着色)、+(明確な着色)の3段階に区分して判定し、それぞれイムノクロマトリーダーにより呈色強度を数値化した。結果を表3に示す。

【0054】

【表3】

表3

ヒアルロン酸分子量 (kDa)	Blank		検体 50ng/ml	
	目視	数値	目視	数値
未添加 (対照)	—	0	+ww	14
6.55	—	0	+ww	14
35	—	0	+	38
50~100	—	0	+	51
132	—	0	+	51
660	±w	25	++	62
1000	+	38	++	70

20

30

【0055】

表3の結果より、ヒアルロン酸の分子量は1万Da以上であることが好ましく、さらに好ましくは3万Da以上、特に好ましくは5万Da以上であることが示された。分子量1万Da未満の低分子ヒアルロン酸では対照と同等の感度であり十分な増感効果が得られなかった。

【0056】

実施例3 (ヒアルロン酸添加量の検討)

400mMトリス緩衝液(pH7.5)に、分子量50~100kDaのヒアルロン酸を最終濃度0.1、0.15、0.2又は0.25%となるように添加し、検体抽出液を調製した。対照として、ヒアルロン酸を添加していない400mMトリス緩衝液(pH7.5)からなる検体抽出液を用意した。

40

【0057】

上記検体抽出液に、インフルエンザウイルスであるA/Dk/Mong/54/01-Dk/Mong/47/01(H5N1)株を100ng/mlになるよう添加して被験試料とした。そして、被験試料100μLを参考例1で作成したインフルエンザウイルスH5亜型抗原検出用イムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上にマイクロピペットで滴下しクロマト展開させた。室温で30分放置後、捕捉部位31における捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダーで観察した。また、ウイルスを添加せずに(Blank)同様の実験を行った。

【0058】

50

捕捉量は、その量に比例して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で - (着色なし)、± (微弱な着色)、+ (明確な着色)、++ (顕著な着色) の4段階に区分して判定し、それぞれイムノクロマトリーダーにより呈色強度を数値化した。結果を表4に示す。

【0059】

【表4】

表4

検体抽出液	対照		ヒアルロン酸含有濃度							
			0.1%		0.15%		0.2%		0.25%	
	目視	数値	目視	数値	目視	数値	目視	数値	目視	数値
Blank (緩衝液)	-	0	-	0	-	0	-	0	±	15
検体 100ng/ml	+w	22	+	39	++	45	++	81	++	90

10

【0060】

上記検体抽出液に陰性鳥より採取した気管の臓器乳剤を添加した以外、上記と同様の試験を行った。結果を表5に示す。なお、この臓器乳剤を含有する検体抽出液は下記の方法で調製した。

(臓器乳剤含有検体抽出液の調製方法)

インフルエンザウイルス感染陰性鳥より採取した気管に400mMトリス緩衝液(pH7.5)を添加し磨り潰すことで臓器乳剤を作製した。そして本乳剤を遠心分離し、遠心分離上清に分子量50~100kDaのヒアルロン酸を最終濃度0.1、0.15、0.2又は0.25%となるように添加し検体抽出液とした。対照として、何れの増感剤も添加していない臓器乳剤含有検体抽出液のみからなる検体抽出液を用意した。

20

【0061】

【表5】

表5

臓器乳剤 (気管)	対照		ヒアルロン酸含有濃度							
			0.1%		0.15%		0.2%		0.25%	
	目視	数値	目視	数値	目視	数値	目視	数値	目視	数値
Blank (緩衝液)	-	0	-	0	-	0	-	0	±	14
検体 100ng/ml	±	2	±	16	+	34	++	46	++	80

30

【0062】

表4及び表5の結果より、ヒアルロン酸を添加することで生体試料を用いた場合においても増感効果が得られることが確認された。なお、ヒアルロン酸濃度0.25%において金コロイド標識抗体の強い凝集が見られBlankにおける非特異的呈色が確認された。したがって、ヒアルロン酸濃度は0.1%以上であることが好ましく、約0.2%が最適であることが示された。

40

【0063】

実施例4(ヒアルロン酸添加形態の検討)

【0064】

(1)ヒアルロン酸含浸パッドを検体抽出用容器に投入

5×15mmのガラス繊維製パッドに、分子量50~100kDaの0.5%ヒアルロン酸溶液20μlを含浸させた後、自然乾燥させ、ヒアルロン酸含浸パッドを作製した。その後、図2に示す検体抽出用容器の本体10に、400mMトリス緩衝液(pH7.5)200μlを入れた後、該含浸パッドを投入して該容器の側壁をもみつづし、ヒアルロン酸を最終濃度0.2%で含有する検体抽出液を調製した。その後、インフルエンザウイ

50

ルスであるA/Dk/Mong/54/01-Dk/Mong/47/01 (H5N1) 株を200 ng/mlになるように該容器に添加して被験試料とした。そして、被験試料100 µLを参考例1で作成したインフルエンザウイルスH5亜型抗原検出用イムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上にマイクロピペットで滴下しクロマト展開させた。室温で30分放置後、捕捉部位31における捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダーで観察した。また、ウイルスを添加せずに(Blank)同様の実験を行った。結果を表6に示す。

なお、図2の検体抽出用容器は、開口端11とそれに対向する閉止端12とを備えた柔軟なプラスチック材料で成形されたチューブ状の本体10と、該本体10の開口端11にネジ式に着脱可能に取り付けられるノズル20とからなり、ノズル20の内側に形成される排出経路21にはノズルフィルター22が配置されている。

【0065】

(2) ヒアルロン酸含浸パッドをイムノクロマト法テストストリップに配置

5 × 15 mmのガラス繊維製パッドの代わりに5 × 7.5 mmのガラス繊維製パッドを用いた以外、上記(1)と同様にしてヒアルロン酸含浸パッドを作製した。この含浸パッドを、参考例1で作成したインフルエンザウイルスH5亜型抗原検出用イムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上に配置した。なお、ヒアルロン酸は最終濃度0.2%で含有するよう調製している。400 mMトリス緩衝液(pH 7.5)に、インフルエンザウイルスであるA/Dk/Mong/54/01-Dk/Mong/47/01 (H5N1) 株を200 ng/mlになるよう添加して被験試料とした。そして、被験試料100 µLを上記インフルエンザウイルスH5亜型抗原検出用イムノクロマト法テストストリップのヒアルロン酸含浸パッド上にマイクロピペットで滴下しクロマト展開させた。室温で30分放置後、捕捉部位31における捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダーで観察した。また、ウイルスを添加せずに(Blank)同様の実験を行った。結果を表6に示す。

【0066】

(3) ヒアルロン酸含浸パッドを検体抽出用容器のノズルフィルターとして設置

5 × 15 mmのガラス繊維製パッドの代わりに図2の検体抽出用容器のノズルフィルター22(ガラス繊維製)を用いた以外、上記(1)と同様にして0.25%ヒアルロン酸をフィルター40 µl含浸させパッドを作製した。そして、この含浸パッドを、図2に示される容器ノズルのノズルフィルター22として配置した。なお、ヒアルロン酸は最終濃度0.2%で含有するよう調製している。そして、400 mMトリス緩衝液(pH 7.5)に、インフルエンザウイルスであるA/Dk/Mong/54/01-Dk/Mong/47/01 (H5N1) 株を200 ng/mlになるよう添加した被験試料200 µLを容器内に入れた後、該容器に該ノズルを装着した。そして、該容器の側壁を押圧することにより、被験試料100 µLを参考例1で作成したインフルエンザウイルスH5亜型抗原検出用イムノクロマト法テストストリップの試料添加用部材5上に滴下しクロマト展開させた。室温で30分放置後、捕捉部位31における捕捉量を肉眼およびイムノクロマトリーダーで観察した。また、ウイルスを添加せずに(Blank)同様の実験を行った。結果を表6に示す。

【0067】

(4) 対照として、上記(2)においてヒアルロン酸含浸パッドを配置せずに被験試料を試料添加用部材5に直接滴下した以外、同様の試験を行った。結果を表6に示す。

【0068】

(5) 400 mMトリス緩衝液(pH 7.5)の代わりに、下記の方法で調製した臓器乳剤を用いた以外、上記(1)~(4)と同様の試験を行った。結果を表7に示す。

(臓器乳剤の調製方法)

インフルエンザウイルス感染陰性鳥より採取した気管に400 mMトリス緩衝液(pH 7.5)を添加し磨り潰した後、遠心分離し、遠心分離上清を臓器乳剤として取得した。

【0069】

なお、上記(1)~(5)において、捕捉量は、その量に比例して増減する赤紫色の呈色度合いを肉眼で-(着色なし)、±(微弱な着色)、+(明確な着色)、++(顕著な着色)の4段階に区分して判定し、それぞれイムノクロマトリーダーにより呈色強度を数

10

20

30

40

50

値化した。

【 0 0 7 0 】

【 表 6 】

表 6

検体抽出液	(4) 未添加 (対照)		(1) パッドを容器に 投入		(2) パッドをテストストリッ プに配置		(3) パッドをノズルフィルター として配置	
	目 視	数 値	目 視	数 値	目 視	数 値	目 視	数 値
Blank (緩衝液)	—	0	—	0	—	0	—	0
検体 200ng/ml	+	32	—+	67	++	52	++	50

10

【 0 0 7 1 】

【 表 7 】

表 7

臓器乳剤 (気管)	(4) 未添加 (対照)		(1) パッドを容器に 投入		(2) パッドをテストストリッ プに配置		(3) パッドをノズルフィルター として配置	
	目 視	数 値	目 視	数 値	目 視	数 値	目 視	数 値
Blank (緩衝液)	—	0	—	0	—	0	—	0
検体 200ng/ml	±	4	++	41	—+	55	+	21

20

【 0 0 7 2 】

表 6 及び表 7 から、上記 (1) ~ (3) の何れの場合も、ヒアルロン酸による感度向上効果が得られることがわかった。

30

【 産業上の利用可能性 】

【 0 0 7 3 】

本発明は、高感度な免疫測定、特に、高感度なイムノクロマトグラフィ測定を可能にするものであり、各種生体試料を用いて迅速かつ簡便に各種抗原及び抗体を検出し、それに関連する疾病等の診断をするために有用である。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 7 4 】

【 図 1 】 a はイムノクロマト法テストストリップの平面図、 b は a で示されたイムノクロマト法テストストリップの縦断面図。

40

【 図 2 】 (a) は検体抽出用容器を示す分解図であり、 (b) は (a) の検体抽出用容器のノズルの断面図である。

【 符号の説明 】

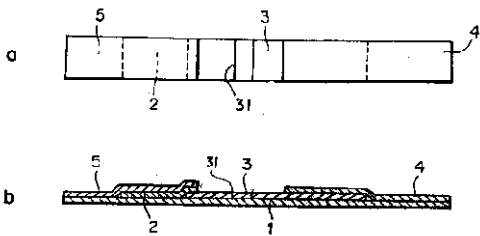
【 0 0 7 5 】

- 1 粘着シート
- 2 含浸部材
- 3 膜担体
- 3 1 捕捉部位
- 4 吸収用部材
- 5 試料添加用部材

50

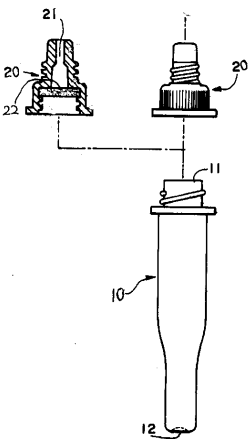
- 10 容器本体
- 11 開口端
- 12 閉止端
- 20 ノズル
- 21 排出経路
- 22 ノズルフィルター

【図1】



【図2】

(b) (a)



专利名称(译)	在透明质酸存在下的免疫测定及其使用		
公开(公告)号	JP2008292326A	公开(公告)日	2008-12-04
申请号	JP2007138448	申请日	2007-05-24
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社比尔生命		
申请(专利权)人(译)	株式会社ビー一工儿		
[标]发明人	難波靖治		
发明人	難波 靖治		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z		
代理人(译)	野上彰		
其他公开文献	JP5238190B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：通过免疫测定以高灵敏度将标本提取物稀释生物样品而获得的测试样品中的标本进行检测。一种免疫测定方法，包括在透明质酸存在下使测试样品进行抗体-抗原反应。免疫分析法优选为夹心免疫分析法，其中将测试样品中包含的样品夹在第一抗体和第二抗体之间，并且特别优选免疫色谱分析法。透明质酸可以包含在样品提取物中，用于通过稀释收集的生物样品来获得用于免疫测定的测试样品，或者可以包含在用于免疫色谱测量的显影溶剂中。浸渍构件可以以冷冻干燥状态浸渍，使得可以通过将其放置在用于色谱法的膜载体中或使用它来使用。透明质酸的分子量优选为10,000至1,000,000Da。[选型图]图1

