

(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 - 328128

(P2002 - 328128A)

(43)公開日 平成14年11月15日(2002.11.15)

(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 33/53			G 0 1 N 33/53	S
	33/543	521	33/543	521
	33/569		33/569	F

審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 7 数)

(21)出願番号 特願2001 - 134328(P2001 - 134328)

(22)出願日 平成13年5月1日(2001.5.1)

(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】 免疫学的検出法

(57)【要約】

【課題】ペロ毒素を検出するための免疫クロマトグラフ法であって、高感度で検出することが可能な免疫学的検出法を提供すること。

【解決手段】(1)(a)着色粒子に、ペロ毒素1型Aサブユニット又はペロ毒素2型Aサブユニットへの第1特異的結合物質を結合した標識複合体と(b)被検液とを混合して、(a)と(b)との混合物を得、(2)該混合物を(c)吸水性基材上に、ペロ毒素1型Bサブユニット又はペロ毒素2型Bサブユニットへの第2特異的結合物質を固定化した固定相を有した試験片の一端に、滴下し、展開し、(3)固定相において、標識複合体に由来する標識を検出し、前記(1)において、(a)と(b)との混合物を濃縮して、さらに(b)と混合して、混合物を得るプロセスを少なくとも1回行なう免疫学的検出法；並びに該標識複合体と該試験片とを含有した、該免疫学的検出法用試薬キット。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 (1) (a) 着色粒子に、ペロ毒素1型のAサブユニットまたはペロ毒素2型のAサブユニットに特異的に結合しうる第1特異的結合物質を結合した標識複合体と、(b) 被検液とを混合して、(a)と(b)との混合物を得るステップ、(2) 該(a)と(b)との混合物を(c) 吸水性基材上に、ペロ毒素1型のBサブユニットまたはペロ毒素2型のBサブユニットに特異的に結合しうる第2特異的結合物質を固定化した固定相を有してなる試験片の一端に、滴下し、展開するステップ、ならびに(3) 固定相において、標識複合体に由来する標識を検出するステップ、を含み、ここで、前記ステップ(1)において、(a)と(b)との混合物を濃縮して、さらに(b)と混合して、混合物を得るプロセスを少なくとも1回行なうことを特徴とする免疫学的検出法。

【請求項2】 ステップ(2)において、(a)と(b)との混合物を試験片の一端に滴下するに先立ち、ステップ(1)で得られた混合物を濃縮し、得られた濃縮物を緩衝液と混合して、(a)と(b)との混合物を得るプロセスをさらに行なう、請求項1記載の免疫学的検出法。

【請求項3】 着色粒子に、ペロ毒素1型のAサブユニットまたはペロ毒素2型のAサブユニットに特異的に結合しうる第1特異的結合物質を結合した標識複合体；および吸水性基材上に、ペロ毒素1型のBサブユニットまたはペロ毒素2型のBサブユニットに特異的に結合しうる第2特異的結合物質を固定化した固定相を有した試験片を含有してなる、請求項1または2記載の免疫学的検出法に用いるための試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、被検液中に含まれるペロ毒素1型またはペロ毒素2型の検出を高感度に行なうことができる免疫学的検出法に関する。

【0002】

【従来の技術】近年、問題となっているペロ毒素産生大腸菌O157(以下、O157ともいう)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後、下痢症状などの症状を発症する。血便は、感染初期から見られることもある。そのうち、O157が産生するペロ毒素の作用により、溶血性貧血、腎不全、血小板減少などの症状が引き起こされ、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における前記ペロ毒素産生大腸菌の診断は、操作が非常に煩雑であり、かつ結果が出るまでに、多くの日数を要するという欠点を有する。

【0004】近年、かかる診断を簡便に行なうため、イムノアッセイによりペロ毒素産生大腸菌の検出が行なわ

れる場合がある。生体試料などのイムノアッセイにおいて、迅速かつ簡便にその検出を行なう方法として、免疫クロマトグラフ法が挙げられる。

【0005】前記免疫クロマトグラフ法は、抗体により被検物質をサンドイッチする手法を応用したものである。一般的には、吸水性基材上に、被検物質に特異的に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試験片の一端より、被検液と、被検物質に特異的に結合しうる特異的結合物質を保持した標識複合体との混合物を滴下、展開させる。ここで、被検液中に被検物質が存在する場合、〔標識複合体-被検物質〕からなる複合体(本明細書における免疫複合体)が、前記固定相における特異的結合物質により捕捉される。したがって、固定相において捕捉された複合体中の標識を検出することにより、被検液中の被検物質の有無を判定できる。

【0006】しかしながら、例えば、ペロ毒素を前記免疫クロマトグラフ法により検出する際、被検液中のペロ毒素が少ない場合、ペロ毒素と標識複合体との免疫複合体も減少する。したがって、固定相に捕捉される免疫複合体量も減少することになり、目視による判定が困難になるという欠点を有する。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、ペロ毒素を検出するための免疫クロマトグラフ法であって、高感度で検出することが可能な免疫学的検出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】すなわち、本発明の要旨は、

〔1〕 (1) (a) 着色粒子に、ペロ毒素1型のAサブユニットまたはペロ毒素2型のAサブユニットに特異的に結合しうる第1特異的結合物質を結合した標識複合体と、(b) 被検液とを混合して、(a)と(b)との混合物を得るステップ、(2) 該(a)と(b)との混合物を(c) 吸水性基材上に、ペロ毒素1型のBサブユニットまたはペロ毒素2型のBサブユニットに特異的に結合しうる第2特異的結合物質を固定化した固定相を有してなる試験片の一端に、滴下し、展開するステップ、ならびに(3) 固定相において、標識複合体に由来する標識を検出するステップ、を含み、ここで、前記ステップ(1)において、(a)と(b)との混合物を濃縮して、さらに(b)と混合して、混合物を得るプロセスを少なくとも1回行なうことを特徴とする免疫学的検出法；

〔2〕 ステップ(2)において、(a)と(b)との混合物を試験片の一端に滴下するに先立ち、ステップ(1)で得られた混合物を濃縮し、得られた濃縮物を緩衝液と混合して、(a)と(b)との混合物を得るプロセスをさらに行なう、前記〔1〕記載の免疫学的検出法；ならびに

〔3〕着色粒子に、ペロ毒素1型のAサブユニットまたはペロ毒素2型のAサブユニットに特異的に結合しうる第1特異的結合物質を結合した標識複合体；および吸水性基材上に、ペロ毒素1型のBサブユニットまたはペロ毒素2型のBサブユニットに特異的に結合しうる第2特異的結合物質を固定化した固定相を有した試験片を含有してなる、前記〔1〕または〔2〕記載の免疫学的検出法に用いるための試薬キットに関する。

【0009】

【発明の実施の形態】本発明の免疫学的検出法による検出対象のペロ毒素は、病原性大腸菌（下痢原性大腸菌）のうち、腸管出血性大腸菌、例えば、大腸菌O157などが産生する毒素であり、かかるペロ毒素としては、志賀赤痢菌の1型菌が産生するシガトキシンと同一であるペロ毒素1型と、該ペロ毒素1型と約60%の相同性を有するペロ毒素2型とが挙げられる。前記ペロ毒素は、いずれもAサブユニット1個とBサブユニット5個とから構成されたヘテロ型のタンパク質毒素である。

【0010】本発明の免疫学的検出法は、(a)着色粒子に、ペロ毒素1型のAサブユニットまたはペロ毒素2型のAサブユニットに特異的に結合しうる第1特異的結合物質〔抗Aサブユニット抗体〕を結合した標識複合体と、(b)被検液とを混合して、(a)と(b)との混合物を得るステップ〔ステップ(1)〕において、(a)と(b)との混合物を濃縮して、得られた濃縮物をさらに(b)と混合して、混合物を得るプロセス〔プロセスAという〕を少なくとも1回行なうことに1つの特徴を有する。したがって、本発明の免疫学的検出法によれば、被検液中におけるペロ毒素の濃度が低い場合でも、該ペロ毒素を高感度に検出することができる。

【0011】また、本発明の免疫学的検出法は、前記プロセスAを行なうとともに、標識複合体における特異的結合物質（第1特異的結合物質）として、ペロ毒素1型のAサブユニットまたはペロ毒素2型のAサブユニットに特異的に結合しうる物質を用い、固定相における特異的結合物質（第2特異的結合物質）として、ペロ毒素1型のBサブユニットまたはペロ毒素2型のBサブユニットに特異的に結合しうる物質を用いることをさらなる特徴とする。したがって、前記標識複合体同士の凝集が抑制され、かつ固定相において、ペロ毒素を効率よく捕捉できるため、該ペロ毒素を良好に検出することができる。

【0012】本発明において、第1特異的結合物質および第2特異的結合物質は、前記したように、それぞれペロ毒素に特異的に結合しうる抗体である。特異的結合物質は、検出対象のペロ毒素の型（1型および2型）に応じて、サンドイッチ法などで用いられる公知のものを適宜選択することができる。第1特異的結合物質と第2特異的結合物質とは、異なる抗原決定基を認識する2種の抗体であることが好ましい。具体的には、第1特異的結

合物質は、ペロ毒素のAサブユニットに特異的に結合しうる抗体であり、第2特異的結合物質は、ペロ毒素のBサブユニットに特異的に結合しうる抗体である。

【0013】また、ペロ毒素と標識複合体との混合時における凝集の発生を抑制する観点から、第1特異的結合物質は、モノクローナル抗体であることが好ましい。さらに、第2特異的結合物質は、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体のいずれでもよい。前記抗体としては、例えば、ウサギ、ヤギ、ヒツジ等由来のポリクローナル抗体、マウス、ラット由来のモノクローナル抗体などが挙げられる。また、H鎖、L鎖、Fab、F(ab')₂等の断片化された抗体であってもよい。

【0014】前記抗体は、慣用の方法により、ペロ毒素のAサブユニットまたはペロ毒素のBサブユニットを抗原として用いて適切な動物を免疫することにより得られる。

【0015】本発明の免疫学的検出法においては、まず、前記ステップ(1)を行なう。かかるステップ(1)においては、前記プロセスAを少なくとも1回繰り返す。これにより、被検液中におけるペロ毒素濃度が低い場合でも、標識複合体とペロ毒素との免疫複合体が、検出に十分な量で形成され、それにより固定相において良好に検出できる。

【0016】前記プロセスAを行なう回数は、被検液と標識複合体とを十分に反応させ、検出するに十分な免疫複合体を生じる回数であればよく、かかる回数は、検出感度に応じて決定することができる。

【0017】ステップ(1)においては、該被検液中にペロ毒素が存在する場合、該標識複合体とペロ毒素とからなる免疫複合体が形成される。

【0018】濃縮は、例えば、遠心分離により行なわれる。これにより、免疫複合体および未反応の標識複合体は、濃縮物（沈澱）として回収される。回収された濃縮物を、(b)被検液と混合し、混合物を得る。

【0019】前記標識複合体に用いられる着色粒子は、肉眼で色が検出可能な粒子であればよく、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。

【0020】さらに、本発明においては、前記標識複合体は、水分散型高分子粒子等を担体とし、該担体に、標識物質（酵素または蛍光物質）と第1特異的結合物質と

を固定化された複合体であってもよい。

【0021】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。

【0022】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、フルオレセイン、ローダミン等が 10 挙げられる。

【0023】前記水分散型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独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独重合体、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 20 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】前記標識複合体は、慣用方法により、第1特異的結合物質と着色粒子とを結合させること、または第1特異的結合物質および標識物質と担体とを結合させることにより作製されうる。

【0025】前記標識複合体における第1特異的結合物質質量は、乾燥重量として、検出感度の観点から、担体の 30 乾燥重量1g当たり0.1mg以上、好ましくは0.5mg以上であり、担体の表面積の大きさや経済性の観点から、200mg以下、好ましくは100mg以下であることが望ましい。

【0026】また、着色粒子のかわりに前記担体と標識物質とを用いる場合、具体的には、例えば、標識物質に酵素を用いる場合、前記標識複合体における標識物質質量は、乾燥重量として、検出の迅速性や感度、再現性の観点から、1mg以上、好ましくは10mg以上であり、担体の表面積の大きさやバックグラウンド発色の観点から、 40 100mg以下、好ましくは50mg以下であることが望ましい。例えば、標識物質に蛍光物質を用いる場合、担体1個(1分子)当たり、蛍光物質の分子を5,000~1,000,000、好ましくは、50,000~500,000の分子(数)を固定することが望ましい。

【0027】被検液としては、ペロ毒素が存在する可能性のある被検試料を含有した溶液が挙げられる。被検試料としては、例えば、糞便を適当な緩衝液に懸濁して得られた溶液や大腸菌O157と疑われる菌体の培養液な 50

どが挙げられる。被検試料が、液体試料である場合、そのまま被検液として用いることができる。また、被検試料が固体試料である場合、適切な緩衝液に懸濁して得られた溶液を被検液として用いることができる。

【0028】ついて、前記ステップ(1)で得られた、(a)と(b)との混合物を、(c)吸水性基材上に、ペロ毒素1型のBサブユニットまたはペロ毒素2型のBサブユニットに特異的に結合しうる第2特異的結合物質を固定化した固定相を有してなる試験片の一端に、滴下し、展開する〔ステップ(2)という〕。

【0029】なお、ステップ(2)においては、(a)と(b)との混合物を試験片の一端に滴下するに先立ち、ステップ(1)で得られた混合物を濃縮し、得られた濃縮物を緩衝液と混合して、(a)と(b)との混合物を得るプロセス〔プロセスBという〕をさらに行なってもよい。かかるプロセスBは、例えば、前記混合溶液を、さらに遠心分離し、免疫複合体を回収し、ついで、展開用の緩衝液に懸濁することにより実施されうる。

【0030】前記緩衝液としては、展開に適した緩衝液であればよく、例えば、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、Tris-HCl緩衝液、クエン酸緩衝液などが挙げられる。本発明においては、プロセスBを行なうことにより、免疫複合体等を、より良好に吸水性基材上に展開させることができる。

【0031】前記試験片に用いられる吸水性基材は、被検液を吸収及び展開できるものであればよい。本発明においては、前記吸水性基材は、迅速な測定が行なえ、かつ固定相での捕捉を十分に行なうことができる程度の吸水性を呈する吸水性基材であればよく、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程度のものが望ましい。

【0032】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、ニトロセルロースメンブレン、ガラス繊維濾紙、不織布、濾紙等が挙げられる。さらに本発明においては、吸水性基材として、同一材料からなる単一の基材を用いてもよく、あるいは異種の材料からなる基材を任意の接着手段によって連結して得られた連続した基材を用いてもよい。

【0033】また、これらの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、タンパク質(例えば、ウシ血清アルブミン、カゼイン等)、界面活性剤(例えば、Tween 20等)を被覆することもでき、基材に親水性重合体(例えば、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)、タンパク質、界面活性剤を含浸させることもできる。

【0034】吸水性基材の形状は、前記被検液等の液体を展開できる形状であればよく、例えば、矩形のシート状やロッド状等が好ましい。

【0035】固定相は、ペロ毒素1型のBサブユニットまたはペロ毒素2型のBサブユニットに特異的に結合しうる第2特異的結合物質を固定化した領域である。

【0036】本発明において、第2特異的結合物質を吸水性基材上に固定化する方法（固定相の作製方法）としては、公知の物理的吸着法及び共有結合法が挙げられる。例えば、吸水性基材がニトロセルロースフィルターである場合、第2特異的結合物質の水溶液を塗布して乾燥するだけで固定化することができる。吸水性基材がガラス繊維濾紙の場合は、特異的結合物質とポリビニルアルコールとの混合溶液を該吸水性基材に塗布した後、得られた基材をアルコールに浸漬して乾燥することにより強固に固定化することができる。

【0037】固定相における第2特異的結合物質の固定化量は、第2特異的結合物質の検出感度の観点から、 0.005 mg/cm^2 以上、好ましくは 0.01 mg/cm^2 以上であり、経済性の観点から、 10 mg/cm^2 以下、好ましくは 5 mg/cm^2 以下であることが望ましい。

【0038】固定相の大きさは、〔ペロ毒素-第1特異的結合物質（標識複合体）〕からなる複合体を捕捉できるものであればよく、 $0.1\sim 5\text{ mm}$ 、好ましくは $0.5\sim 2\text{ mm}$ の幅であることが望ましい。

【0039】本発明に用いられる試験片は、被検液を滴下するための被検液受領部、被検液の展開を容易にするための吸水パッドをさらに含有していてもよい。

【0040】ステップ（2）により、免疫複合体は、液の移動とともに吸水性基材中を移動し、固定相に到達する。ついで、固定相において、標識複合体に由来する標識を検出する〔ステップ（3）という〕。

【0041】ステップ（3）においては、被検液中にペロ毒素が存在する場合、ペロ毒素と標識複合体とからなる免疫複合体が、固定相における第2特異的結合物質と結合する。

【0042】標識複合体に着色粒子または蛍光物質を用いた場合、被検液中のペロ毒素の存在により、固定相において、発色ラインが形成されるため、該ペロ毒素を肉眼的または光学的に検出することができる。

【0043】標識複合体に酵素を用いた場合、さらに、該酵素の基質を供給することにより、固定相において、発色ラインが形成されるため、該ペロ毒素を肉眼的または光学的に検出することができる。

【0044】本発明により、さらに、着色粒子に、ペロ毒素1型のAサブユニットまたはペロ毒素2型のAサブユニットに特異的に結合しうる第1特異的結合物質を結合した標識複合体；および吸水性基材上に、ペロ毒素1型のBサブユニットまたはペロ毒素2型のBサブユニットに特異的に結合しうる第2特異的結合物質を固定化した固定相を有してなる試験片、を含有した試薬キットが提供される。かかる試薬キットは、本発明の免疫学的検

出法に好適である。

【0045】

【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。

【0046】調製例1

1) 標識複合体溶液の作製

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 $0.1\ \mu\text{m}$ 、 0.01 M -ホウ酸緩衝液（ $\text{pH}8$ ）〕 3 ml に、水溶性カルボジイミド〔 1 mg/ml 、 0.01 M -ホウ酸緩衝液（ $\text{pH}8$ ）〕 1 ml と抗ペロ毒素Aサブユニットモノクローナル抗体〔マウスIgG（トキシテクノロジー社製） 1 mg/ml 、 0.01 M -ホウ酸緩衝液（ $\text{pH}8$ ）〕 1 ml とを添加し、 10°C で3時間反応させた。その後、得られた反応物を、洗浄液としてホウ酸緩衝液（ $\text{pH}8$ ）を用いて、遠心分離洗浄し、青色着色ラテックス粒子で標識された抗ペロ毒素Aサブユニット抗体（標識複合体）を作製した。ついで、標識複合体を、 0.01 M -ホウ酸緩衝液（ $\text{pH}8$ ）に、固形分濃度2重量%となるように分散し、標識複合体溶液を得た。得られた標識複合体を、固形分濃度 0.125 重量%となるように分散させて、標識複合体分散液を得た。

【0047】2) 試験片の作製

ニトロセルロースメンブレン（孔径 $8\ \mu\text{m}$ 、 $6\text{ mm}\times 60\text{ mm}$ ）の一端から 30 mm の箇所、に、ディスペンサーを用いて、 $1.5\ \mu\text{l}$ の抗ペロ毒素Bサブユニットモノクローナル抗体〔マウスIgG（トキシテクノロジー社製） 1 mg/ml 、 0.1 M -リン酸緩衝液（ $\text{pH}7.4$ ）〕を 1 mm のライン状に塗布し、固定相を作製した。

【0048】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°C で2時間乾燥させた。

【0049】ついで、乾燥後に得られたメンブレンの裏側（固定相のある面の反対側）に、スプレー糊を用いて、ポリエステルフィルム（ $100\ \mu\text{m}$ 厚）を貼り合わせた。

【0050】固定相側の反対側の一端から $0\sim 8\text{ mm}$ の箇所にポリエステル不織布（ $6\text{ mm}\times 12\text{ mm}$ 、厚さ 2.5 mm ）を貼り合わせ、被検液受領部を得た。得られたメンブレンを、試験片とした。

【0051】試験例1

表1または表2に示した濃度になるように、ペロ毒素（VT）を 0.1 M -リン酸緩衝液（ 0.9 重量% NaCl含有、 $\text{pH}7.4$ ）に懸濁して、被検試料を得た。

【0052】1) VTと標識複合体とを複数回混合して

展開する測定法（実施例1）

各被検試料600μlと調製例1の1)で得られた標識複合体分散液25μlとを混合し、反応チューブ内で25×30分間反応させた。ついで、18000rpm×30分間遠心分離して、沈澱物を得、得られた沈澱物を、被検試料600μlに再度懸濁した。その後、25×30分間反応したのち、18000rpm×30分間遠心分離して、沈澱物を得、得られた沈澱物を、0.1M-リン酸緩衝液(0.9重量%NaCl含有、pH7.4)145μlに分散させた。

【0053】得られた溶液145μlを、前記調製例1の2)で得られた試験片の被検液受領部に滴下、展開し、20分後、固定相における発色の有無を目視観察した。結果を表1に示す。

VT濃度 (ng/ml)	100	50	10	5	1	0
判定	+	+	+	+	-	-

【0057】

VT濃度 (ng/ml)	100	50	10	5	1	0
判定	+	+	-	-	-	-

【0058】表1および2に示すように、被検試料と標識複合体とを複数回混合して展開した実施例1の測定法の場合、被検試料と標識複合体とを複数回混合せずに展開した比較例1の測定法よりも、低いVT濃度の試料であっても良好に検出できることがわかる。

【0059】比較例2：TDH (Thermostable Direct Hemolysin: 同一サブユニットのダイマーから構成されるタンパク質毒素)の検出

1) 標識複合体液の作製

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0.1μm、0.01M-ホウ酸緩衝液 pH8)3mlに、水溶性カルボジイミド(1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液 pH8)1mlおよび抗TDHモノクローナル抗体[マウスIgG 1mg/ml、0.01M-ホウ酸緩衝液 pH8]1mlを加えて10で3時間反応させた。なお、前記マウスIgGは、慣用の方法に従って作製した抗体である。

【0060】その後、洗浄液としてホウ酸緩衝液(pH8)を用いて遠心分離洗浄を行ない、青色着色ラテックス粒子標識抗TDH抗体を作製した。ついで、ラテックス粒子標識複合体を0.01M-ホウ酸緩衝液(pH8)に、固形分濃度2重量%となるように懸濁した。

【0061】2) 試験片の作製

ニトロセルロースメンブレン(孔径8μm、6mm×60mm)の一端から30mmの箇所に、上記1)で用いた抗体と異なるクローンの抗TDHモノクローナル抗体

*【0054】2) VTと標識複合体とを複数回混合せずに展開する測定法(比較例1)

各被検試料120μlと調製例1の1)で得られた標識複合体分散液25μlとを混合し、反応チューブ内で25×30分間反応させた。ついで、この混合液145μlを前記調製例1の2)で得られた試験片の被検液受領部に滴下、展開し、20分後、固定相における発色の有無を目視観察した。結果を表2に示す。なお、表中の判定基準を、以下に示す。

10 【0055】判定基準

- + : 固定相にライン状の発色が見える。
- : 固定相にライン状の発色が見られない。

【0056】

【表1】

【表2】

[マウスIgG 1mg/ml、0.01M-リン酸緩衝液 pH7.4)を1.5μl、ディスペンサーを用いてライン状に塗布した。

【0062】このメンブレンをウシ血清アルブミン(1重量%)および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%)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。

【0063】ついで、このメンブレンの裏側(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わせた。

【0064】抗体塗布個所の反対端から0~8mmの箇所にポリエステル不織布(6mm×12mm、厚さ2.5mm)を貼り合わせ、免疫学的試験片を作製した。

【0065】3) 測定

0.1Mリン酸緩衝液(0.9重量%NaCl含有、pH7.4)に、TDHを表3に示した濃度で分散させた検体(被検試料)を調製した。

【0066】この検体液600μlに上記1)で作製した標識複合体を固形分濃度0.125重量%となるように調製した分散液を25μl混合した、反応チューブ内で25×30分間反応したのち18000rpm×30分間遠心分離して得られた沈澱を、検体液600μlで再度懸濁混合した。25×30分間反応したのち再度18000rpm×30分間遠心分離して得られた沈澱を、0.1Mリン酸緩衝液(0.9重量%NaCl含有、pH7.4)145μlで分散した。この液14

5 μ l を上記ポリエステル不織布部に滴下し、20分後の固定相での発色の有無を目視観察した。表3に測定結果を示す。なお、表中の判定基準は、前記表1および表*

*2と同様である。

【0067】

【表3】

TDH 濃度 (ng/ml)	100	50	10	5	1	0
判 定	凝集	凝集	凝集	-	-	-

【0068】表3に示すように、同一サブユニットのダイマーから構成されるタンパク質毒素を検出するに際して、サブユニットに対する抗体を保持した標識複合体を用いた場合、該標識複合体が凝集するため、固定相において、タンパク質毒素を検出できないことがわかる。一方、上記実施例1のように、異なるサブユニット（Aサブユニット 1個とBサブユニット 5個）から構成されるタンパク質毒素を検出するに際して、Aサブユニットに対する抗体を保持した標識複合体を用いた場合、凝集が生じず、それにより固定相において、タンパク質

毒素を良好に検出できることがわかる。

【0069】

【発明の効果】本発明の免疫学的検出法によれば、被検液中における被検物質濃度が低い場合であっても、ペロ毒素を高感度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、本発明の試薬キットは、被検液中における被検物質濃度が低い場合であっても、ペロ毒素を高感度に検出ことができ、本発明の免疫学的検出法に好適である。

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

专利名称(译)	免疫学的檢出法		
公开(公告)号	JP2002328128A	公开(公告)日	2002-11-15
申请号	JP2001134328	申请日	2001-05-01
[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		
发明人	岡田 圭策 岡田 研一 森岡 量子		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/53.S G01N33/543.521 G01N33/569.F		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于检测verotoxin的免疫色谱法，以及能够以高灵敏度检测的免疫学检测方法。(1) 标记的复合物，其中(a) 有色颗粒与第一特异性结合物质结合至verotoxin 1A型亚基或verotoxin 2AA亚基和(b) 试验液体获得(a) 和(b) 的混合物，(2) 将混合物与(c) verotoxin 1 B亚基或verotoxin 2 B亚基混合将固定相与第二特异性结合物质固定于第二特异性结合物质的固定相的试验片的一端进行显影，(3) 检测来自固定相中的标记复合物的标记，)，一种免疫学检测方法，其中(a) 和(b) 的混合物被浓缩并进一步与(b) 混合以进行至少一次的过程以获得混合物;和标记的复合物和测试用于检测免疫学方法的试剂盒，其包含片段。

【表2】

VT濃度 (ng/ml)	100	50	10	5	1	0
判定	+	+	-	-	-	-