

(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2008-89415

(P2008-89415A)

(43) 公開日 平成20年4月17日(2008.4.17)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 8 5	2 G 0 5 4
<b>GO 1 N 33/53 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/53 K	
<b>GO 1 N 21/78 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/78 Z	
<b>GO 1 N 21/82 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 8 1 C	
	GO 1 N 21/82	

審査請求 未請求 請求項の数 6 O L (全 10 頁)

(21) 出願番号 特願2006-270824 (P2006-270824)  
 (22) 出願日 平成18年10月2日 (2006.10.2)

(71) 出願人 306003914  
 株式会社 鎌倉テクノサイエンス  
 神奈川県鎌倉市手広1111番地  
 (74) 代理人 100104950  
 弁理士 岩見 知典  
 (72) 発明者 村尾 康雄  
 神奈川県鎌倉市手広1111番地 株式会  
 社鎌倉テクノサイエンス内  
 Fターム(参考) 2G054 AA06 AB02 CA21 CE01 EA06  
 GA03 GB04

(54) 【発明の名称】 検査試薬および検査方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】複数の免疫学的凝集反応試薬を含有し、それぞれ単項目で調製された試薬を用いてそれぞれ別々に検査を行う必要がなく、検査が多項目におよぶ場合であっても煩雑ではなく、多量の検体が必要とならない検査試薬の提供。

【解決手段】複数の免疫学的凝集反応試薬を含有する検査試薬であって、個々の免疫学的凝集反応試薬がそれぞれ異なる色に着色された微粒子で調製されている検査試薬。この検査試薬は、検査試薬と検体を混合して凝集した微粒子の単色または混合色を観察することにより、あるいは、凝集しなかった微粒子の単色または混合色を観察することにより、または、凝集した微粒子と凝集しなかった微粒子の単色または混合色を観察することにより、検体中の物質、例えば抗原または抗体の存在を、多項目同時に検査することができる。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

複数の免疫学的凝集反応試薬を含有する検査試薬であって、個々の免疫学的凝集反応試薬がそれぞれ異なる色に着色された微粒子で調製されている検査試薬。

## 【請求項 2】

3色の着色微粒子を用いる請求項 1 に記載の検査試薬。

## 【請求項 3】

検査試薬が血液型検査試薬である請求項 1 または 2 に記載の検査試薬。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の検査試薬を用いて、免疫学的凝集反応を行い、凝集した微粒子の色調から、複数の被検物質の存否を同時に判定する検査方法。

10

## 【請求項 5】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の検査試薬を用いて、免疫学的凝集反応を行い、凝集しなかった微粒子の色調から、複数の被検物質の存否を同時に判定する検査方法。

## 【請求項 6】

請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の検査試薬を用いて、免疫学的凝集反応を行い、凝集した微粒子の色調と、凝集しなかった微粒子の色調から、複数の被検物質の存否を同時に判定する検査方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

20

## 【0001】

本発明は、免疫学的凝集反応を利用して項目毎にそれぞれ異なる色に着色した微粒子を用いて凝集試薬を調製し、それらを複数混合した検査試薬を用いて複数項目を同時に検査する検査方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

従来、血液、尿あるいは唾液などの体液中に存在する免疫学的物質である抗原あるいは抗体を検出するために、一般的に下記の検査方法が行われている。

## 【0003】

天然由来微粒子またはポリスチレンラテックス、(メタ)アクリル酸エステルを主成分とする重合体などのポリマー微粒子担体に抗原または抗体を吸着、イオン結合あるいは共有結合により固定化して免疫学的凝集反応試薬を調製する(図1参照)。次いで、免疫学的凝集反応試薬を検体(抗原または抗体を含有)と混合して微粒子が凝集するか否かを観察する(図1、図2参照)。

30

## 【0004】

免疫学的凝集反応試薬は、無色あるいは着色微粒子を用いてそれぞれ単項目で調製された試薬を用い、それぞれの試薬で、別々に検査が行われている。例えば、HBs抗原、HBs抗体、 $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)、C-反応性プロテイン(CRP)、抗ストレプトリジン-O(ASO)、リウマチ因子(RF)、ヒト胎児性ゴナドトロピン(HCG)、癌胎児性抗原(CEA)、ABO式血液型等の検査試薬が、実際に使用されている(非特許文献1、特許文献1参照)。例えば、非特許文献1、特許文献1には、ABO式血液型検査試薬が開示されている。

40

【非特許文献1】河原均、矢澤伸、「モノクローナル抗体固定化染色微粒子を利用したヒト唾液中の血液型抗原の簡便な検出法」、科警研報告、43:101-107(1990)。

【特許文献1】特許第2918593号明細書

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

それぞれ単項目で調製された試薬を用い、それぞれ別々に検査を行う場合、検査が多項

50

目におよぶ場合はそれに応じて手技が煩雑になり、多数の容器が必要となって検査費用がかさむとともに、多量の検体が必要となり、被験者に負担を強いることになる。本発明は、このような問題を解決し、より有利な検査試薬と検査方法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】

【0006】

項目毎にそれぞれ異なる色に着色した微粒子を用いて凝集試薬を調製し、それらを複数混合した検査試薬を用いて複数項目を同時に検査するために、本発明に想到した。

【0007】

すなわち、本発明は、複数の免疫学的凝集反応試薬を含有する検査試薬であって、個々の免疫学的凝集反応試薬がそれぞれ異なる色に着色された微粒子で調製されている検査試薬である。

10

【発明の効果】

【0008】

本発明の検査試薬は、複数の免疫学的凝集反応試薬を含有する検査試薬であり、それぞれ単項目で調製された試薬を用いて、それぞれ別々に検査を行う必要がなく、検査が多項目におよぶ場合であっても、煩雑ではなく、多量の検体が必要とならない。

【0009】

本発明の検査試薬は、生物学的検査の分野で利用することができる。本発明の検査試薬は、例えば、インフルエンザウイルス、サイトカイン、血液型などの検査に利用可能である。

20

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明の検査試薬は、複数の免疫学的凝集反応試薬を含有する検査試薬である。

【0011】

さらに、本発明の検査試薬は、個々の免疫学的凝集反応試薬がそれぞれ異なる色に着色された微粒子で調製されている。

【0012】

本発明の検査試薬では、微粒子は、血球（ホルマリン等により固定）、菌体などの天然由来微粒子、またはポリスチレンラテックス、（メタ）アクリロニトリルを主成分とする重合体、（メタ）アクリル酸エステルを主成分とする重合体などのポリマー微粒子である。本発明の検査試薬では、微粒子は、それぞれ異なる色に着色されている。微粒子の着色は、好ましくは、顔料または染料により行われる。本発明の検査試薬では、微粒子は、好ましくは、顔料または染料を混入、含浸、吸着、イオン結合あるいは共有結合により着色する。本発明の検査試薬は、微粒子が、共有結合により着色していることがより好ましい。

30

【0013】

本発明の検査試薬では、微粒子に、抗原、抗体などの物質を固定化して、免疫学的凝集反応試薬を調製する（図1参照）。本発明の検査試薬において、固定化する物質は特に限定されないが、具体的には肝炎（A型、B型、C型）ウイルス、AIDSウイルス、ATLウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、麻疹ウイルス、ポリオーマウイルス、パピローマウイルス、SV40ウイルス、コクサッキーウイルス、エコーウイルス、インフルエンザウイルス、狂犬病ウイルス、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、マールブルグ病ウイルス、アデノウイルス、デングウイルス、EBウイルス、マンブスウイルス、ワクシニアウイルス、パルボウイルス、ロタウイルス、タナボックスウイルス、ヤバウイルス、ラッサ熱ウイルス、タバコモザイクウイルス、マイコプラズマウイルス、ツツガムシリケツチャ、Q熱リケツチャ、発疹チフスリケツチャ、クラミジアトラコーマチス、クラミジアプシタコシス、リン菌、破傷風菌、黄色ブドウ球菌、レンサ球菌、結核菌、緑膿菌、炭疽菌、肺炎球菌、サルモネラ菌、コレラ菌、チフス菌、パラチフス菌、ボツリヌス菌、ブルセラ菌、赤痢菌、腸炎ピブリオ菌、ペスト菌、大腸菌、カンピロバクター

40

50

、カンジダ菌、トキソプラズマ、マラリア原虫、トレポネーマパリダムなどのウイルスあるいは細菌、真菌、原生動物などの微生物由来の抗原、C反応性蛋白、癌胎児性抗原、  
-フェトプロテイン、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、熱凝集イムノグロブリンG、ヘモグロ  
ピン、核蛋白、核酸、エストロゲン、補体成分、ストレプトリジンO、血液型抗原（A型  
、B型、H型）など、あるいはそれらを抗原とする抗体などがある。

【0014】

本発明の検査試薬では、これらの抗原または抗体の中で、好ましくは、関連する、或いは、同一のグループの物質が用いられる。

【0015】

本発明の検査試薬では、好ましくは、インターフェロン、IL-6、IL-8などのサイトカイン類、鳥インフルエンザなどインフルエンザウイルス、あるいは、A型、B型、H型の血液型抗原などの免疫学的凝集反応試薬が用いられる。

10

【0016】

本発明の検査試薬では、免疫学的凝集反応試薬を、好ましくは、2~4種類、更に好ましくは、2~3種類、含有する。

【0017】

本発明の検査試薬を、例を挙げて説明する。

【0018】

本発明の検査試薬は、検査試薬と検体を、好ましくは、ガラス、プラスチックなどの平板上または窪みのある板の窪みの中で混合する。本発明の検査試薬は、検査試薬と検体を混合して、凝集した微粒子の単色または混合色を観察することにより、あるいは、凝集しなかった微粒子の単色または混合色を観察することにより、または、凝集した微粒子と凝集しなかった微粒子の単色または混合色を観察することにより、検体中の物質、例えば、抗原または抗体の存在を、多項目同時に検査することができる。

20

【0019】

以下、赤色、青色、黄色の各微粒子にそれぞれ異なる抗体を固定化して調製した検査試薬を例にあげて説明する。

【0020】

赤色、青色、黄色の各微粒子にそれぞれ異なる抗体を固定化して調製した場合、3種類の免疫学的凝集反応試薬を混合すると黒色（赤色と青色と黄色の混合色）になる。

30

【0021】

赤色と黄色の微粒子に固定化した各抗体に対する抗原が存在する検体を混合したとき、凝集した微粒子が集合する場合は、青色の視野に橙色（赤色と黄色の混合色）の凝集塊が認められる（図3（1））。この場合、青色の微粒子は、凝集していない。

【0022】

青色と黄色の微粒子に固定化した各抗体に対する抗原が存在する検体を混合したときは、赤色の視野に緑色（青色と黄色の混合色）の凝集塊が認められる（図3（2））。この場合、赤色の微粒子は、凝集していない。

【0023】

青色と赤色の微粒子に固定化した各抗体に対する抗原が存在する検体を混合したときは、黄色の視野に紫色（青色と赤色の混合色）の凝集塊が認められる（図3（3））。この場合、黄色の微粒子は、凝集していない。

40

【0024】

黄色の微粒子に固定化した抗体に対する抗原が存在する検体を混合したときは、紫色（青色と赤色の混合色）の視野に黄色の凝集塊が認められる（図3（4））。この場合、青色の微粒子と赤色の微粒子は、凝集していない。

【0025】

赤色の微粒子に固定化した抗体に対する抗原が存在する検体を混合したときは、緑色（青色と黄色の混合色）の視野に赤色の凝集塊が認められる（図3（5））。この場合、青色の微粒子と黄色の微粒子は、凝集していない。

50

## 【0026】

青色の微粒子に固定化した抗体に対する抗原が存在する検体を混合したとき、橙色（赤色と黄色の混合色）の視野に青色の凝集塊が認められる（図3（6））。この場合、赤色の微粒子と黄色の微粒子は、凝集していない。

## 【0027】

青色と赤色と黄色の微粒子に固定化した各抗体に対する抗原が全て存在しない検体を混合したときは、黒色の視野に凝集塊は認められない（図3（7））。この場合、赤色の微粒子、青色の微粒子、黄色の微粒子は、凝集していない。

## 【0028】

さらに、青色と赤色と黄色の微粒子に固定化した各抗体に対する抗原が全て存在する検体を混合したときは、無色の視野に黒色の凝集塊が認められる（図3（8））。この場合、赤色の微粒子、青色の微粒子、黄色の微粒子は、凝集している。

以上記載したように、赤色、青色、黄色の各微粒子にそれぞれ異なる抗体を固定化して調製した検査試薬を用いると、8通りの色調の組み合わせで、3種類の免疫学的凝集反応を一度に判定することができる。本発明の検査試薬は、上記のように、3色の着色微粒子を用いることが好ましい。

## 【0029】

本発明の検査方法は、複数の免疫学的凝集反応試薬を含有する検査試薬であって、個々の免疫学的凝集反応試薬がそれぞれ異なる色に着色された微粒子で調製されている検査試薬を用いて、免疫学的凝集反応を行い、凝集した微粒子の色調から、複数の被検物質の存否を同時に判定する。

## 【0030】

本発明の検査方法は、好ましくは、免疫学的凝集反応を行い、凝集しなかった微粒子の色調から、複数の被検物質の存否を同時に判定する。

## 【0031】

本発明の検査方法は、好ましくは、免疫学的凝集反応を行い、凝集した微粒子の色調と、凝集しなかった微粒子の色調から、複数の被検物質の存否を同時に判定する。

## 【0032】

本発明の検査試薬では、検査試薬が、血液型検査試薬であることが好ましい。以下に、本発明の検査試薬を用いた血液型判定の例を示す。

## 【0033】

動物の体液、特にヒトの血清、血漿、精液、唾液などの体液中には血液型抗原すなわちA型はA抗原とH抗原が、B型はB抗原とH抗原が、AB型はA抗原とB抗原とH抗原が、O型はH抗原のみが存在する。

## 【0034】

例えば、青色の微粒子にA型の抗原に対する抗体を固定化し、赤色の微粒子にB型の抗原に対する抗体を固定化し、さらに黄色の微粒子にH型の抗原に対する抗体を固定化して調製する。次いで、青色の微粒子（A型の抗原に対する抗体を固定化）、赤色の微粒子（B型の抗原に対する抗体を固定化）、黄色の微粒子（H型の抗原に対する抗体を固定化）した試薬を混合して黒色（青色と赤色と黄色の混合色）の試薬を調製する。

## 【0035】

血液検査用プレートの穴の中で、本試薬と検体を混合しない場合は黒色（青色と赤色と黄色が非凝集）の視野に凝集塊はみとめられない（図3（7））。

## 【0036】

A型の検体を混合したとき、A型にはA抗原とH抗原が存在するので、赤色（赤色が非凝集）の視野に凝集塊（青色と黄色が凝集）が認められる（図3（2））。

## 【0037】

B型の検体を混合したとき、B型にはB抗原とH抗原が存在するので、青色（青色が非凝集）の視野に凝集塊（赤色と黄色が凝集）が認められる（図3（1））。

## 【0038】

10

20

30

40

50

また、A B型の検体を混合したとき、A B型にはA抗原とB抗原とH抗原が存在するので、無色の視野に凝集塊（青色と赤色と黄色が凝集）が認められる（図3（8））。

【0039】

さらに、O型の検体を混合したとき、O型はH抗原のみが存在するので、紫色（赤色と青色が非凝集）の視野に凝集塊（黄色が凝集）が認められる（図3（4））。

【0040】

上記のように、本発明の検査試薬により、血液型検査を行うことができる。

【実施例】

【0041】

#### 1. ポリマー微粒子の調製

グリシジルメタアクリレート13.96g、2-ヒドロキシエチルメタアクリレート1.42g、トリエチレングリコールジメタアクリレート1.56g、プロピオン酸エチル30g、四塩化炭素30gおよび2,2'-アゾビス(2,4-ジメチルバレロニトリル)0.06gを混合して2本の試験管に採り、窒素で試験管内を置換後密封して45℃で16時間加温静置した。試験管内容物をアセトン中に取り出して超音波破碎機でポリマー微粒子を分散させつつ遠心分離によりアセトンで3回洗浄して直径約2μmのポリマー微粒子約15gを得た。

【0042】

赤色反応性染料ロータスFカラー赤[(有)林ケミカル製]2gをジメチルフォルムアミド80mLに溶解して遠心し、上澄を染料溶液採って染料溶液を調製した。ポリマー微粒子5gを150mLのジメチルフォルムアミドに分散して遠心し、上澄を除去して染料溶液7.5mLにポリマー微粒子を分散させる。1N NaOH溶液16mLを加え50℃で1時間攪拌した。遠心分離によりジメチルフォルムアミドで3回洗浄後蒸留水で3回洗浄して蒸留水250mLに分散してアンモニア水(28%)12.5mLを加え、40℃で1.5時間攪拌した。遠心によりポリマー微粒子を蒸留水で3回洗浄して蒸留水250mLに分散して濃硫酸0.4mLを加えて50℃で24時間攪拌した。遠心によりポリマー微粒子を蒸留水で3回洗浄後0.1M重炭酸ナトリウム12.5mLに分散して遠心し、蒸留水で3回遠心によりポリマー微粒子を洗浄して蒸留水100mLに分散して赤色ポリマー微粒子を調製した。

【0043】

黄色反応性染料ロータスFカラー黄[(有)林ケミカル製]を用いて赤色ポリマー微粒子と同様に黄色ポリマー微粒子を調製した。

【0044】

青色ポリマー微粒子は、(株)鎌倉テクノサイエンス製のGN(青)を用いた。

#### 2. 検査試薬の調製

赤色ポリマー微粒子、黄色ポリマー微粒子および青色ポリマー微粒子[市販品(株)鎌倉テクノサイエンス製GN(青)]をそれぞれ150μL採り、それぞれに蒸留水600μLとグルタルアルデヒド水溶液(25%)15μLを添加して30℃で15分間攪拌後遠心分離によりPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で3回洗浄し、それぞれのポリマー微粒子を300μLのPBS(リン酸緩衝生理食塩水)に分散した。

【0045】

抗ヒトBlood Group Aモノクローナル抗体(特殊免疫研究所製)をBSA(ウシ血清アルブミン)のPBS(リン酸緩衝生理食塩水)溶液(0.05%)で80倍希釈した溶液300μLをグルタルアルデヒド処理した青色ポリマー微粒子分散液300μLに添加して30℃で1時間攪拌後遠心分離によりPBS(リン酸緩衝生理食塩水)で3回洗浄し、BSA(ウシ血清アルブミン)のPBS溶液(1%)3.6mLに分散して抗A抗体固定化青色ポリマー微粒子分散液を調製した。

【0046】

脱アルブミン処理したモノクローナル抗Bワコー(和光純薬)をBSA(ウシ血清アルブミン)のPBS(リン酸緩衝生理食塩水)溶液(0.05%)で5倍希釈した溶液300μLをグルタルアルデヒド処理した赤色ポリマー微粒子分散液300μLに添加して3

10

20

30

40

50

0 で1時間攪拌後遠心分離によりPBS（リン酸緩衝生理食塩水）で3回洗浄し、BSA（ウシ血清アルブミン）のPBS（リン酸緩衝生理食塩水）溶液（1%）3.6mLに分散して抗B抗体固定化赤色ポリマー微粒子分散液を調製した。

【0047】

抗Hモノクローナル抗体[(株)鎌倉テクノサイエンス製]をBSA（ウシ血清アルブミン）のPBS（リン酸緩衝生理食塩水）溶液（0.05%）で20倍希釈した溶液300μLをグルタルアルデヒド処理した黄色ポリマー微粒子分散液300μLに添加して30で1時間攪拌後遠心分離によりPBSで3回洗浄し、BSA（ウシ血清アルブミン）のPBS（リン酸緩衝生理食塩水）溶液（1%）3.6mLに分散して抗H抗体固定化黄色ポリマー微粒子分散液を調製した。

10

【0048】

抗A抗体固定化青色ポリマー微粒子分散液、抗B抗体固定化赤色ポリマー微粒子分散液および抗H抗体固定化黄色ポリマー微粒子分散液をそれぞれ400μLずつ採って混合し、遠心して上澄800μLを除いた後ポリマー微粒子を分散して黒色の混合分散液を調製した。

3. 血液型検査

A型、B型、AB型およびO型のヒトの唾液を採取してBSA（ウシ血清アルブミン）のPBS（リン酸緩衝生理食塩水）溶液（0.1%）でA型、B型およびO型は1000倍に、AB型は100倍に希釈して血液検査用プレート（旭テクノグラス 1884-024）に40μLずつ採った。それぞれに上記黒色の混合分散液40μLずつを添加して水平回転攪拌して静置後プレートの垂直上部から各混合液を観察した結果、本試薬と検体を混合しない場合は黒色（青色と赤色と黄色が非凝集）の視野に凝集塊はみとめられなかった（図4（1））。A型の検体を混合したとき、赤色（赤色が非凝集）の視野に凝集塊（青色と黄色が凝集）が認められた（図4（2））。B型の検体を混合したとき、青色（青色が非凝集）の視野に凝集塊（赤色と黄色が凝集）が認められた（図4（3））。また、AB型の検体を混合したとき、白色（プレートの色）の視野に凝集塊（青色と赤色と黄色が凝集）が認められた（図4（4））。さらに、O型の検体を混合したとき、紫色（赤色と青色が非凝集）の視野に凝集塊（黄色が凝集）が認められた（図4（5））。

20

【図面の簡単な説明】

【0049】

30

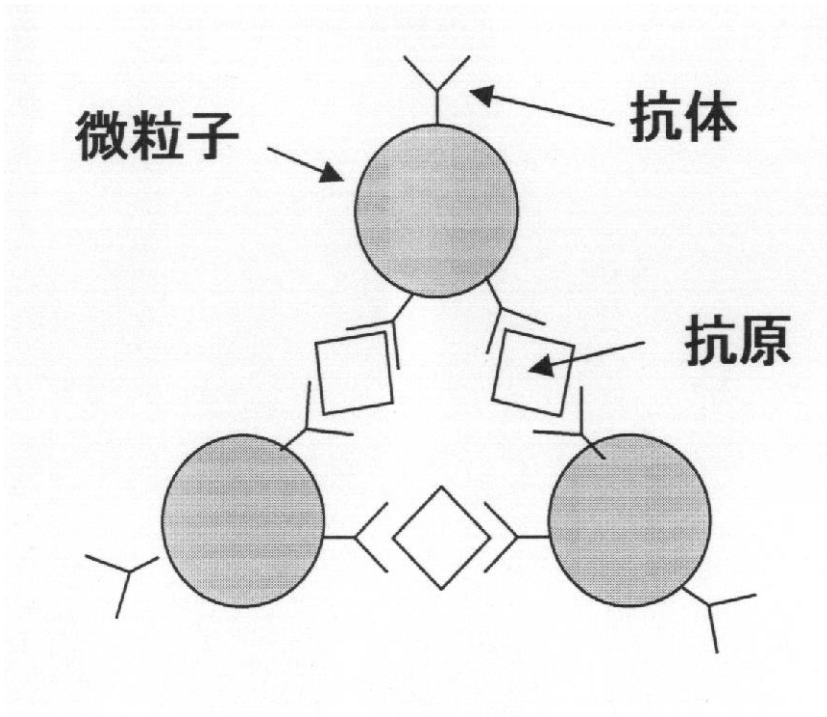
【図1】微粒子凝集の概要図である。

【図2】免疫学的凝集反応検査の概要図である。

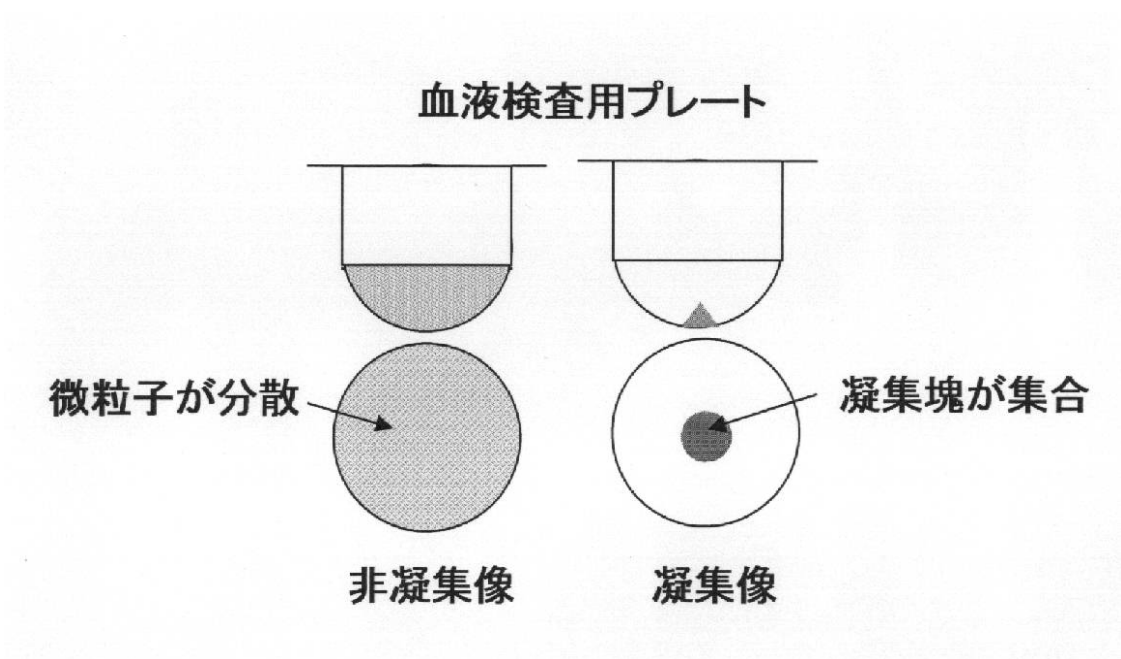
【図3】本発明の一つの形態である免疫学的凝集反応検査結果の概要図である。

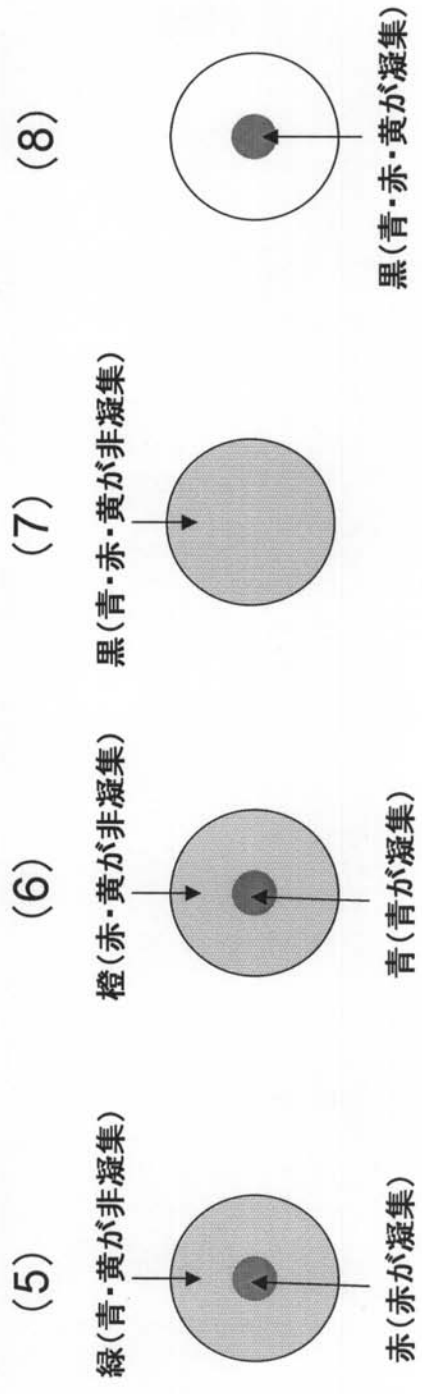
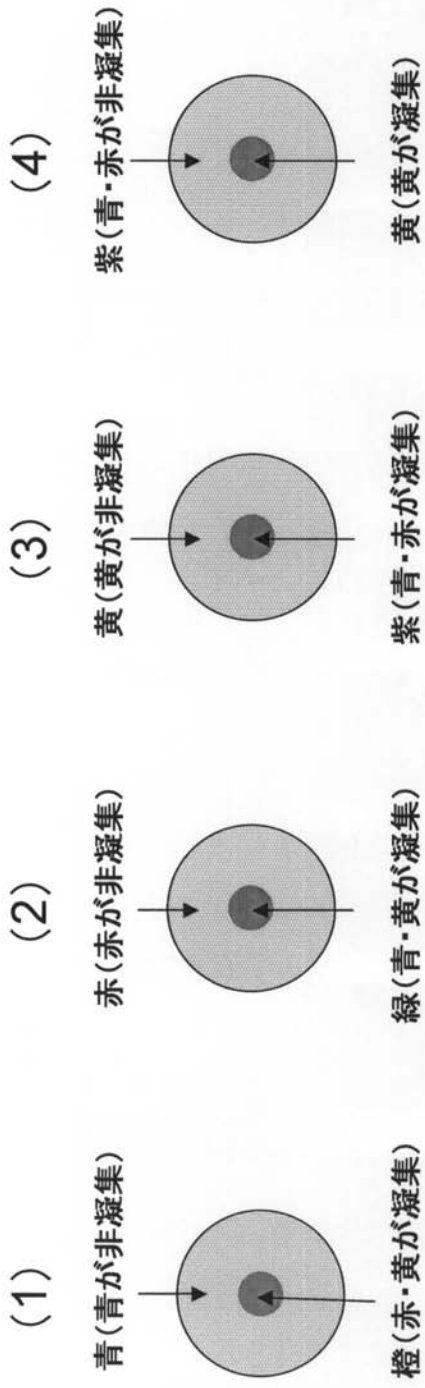
【図4】本発明の実施例の結果の概要図である。

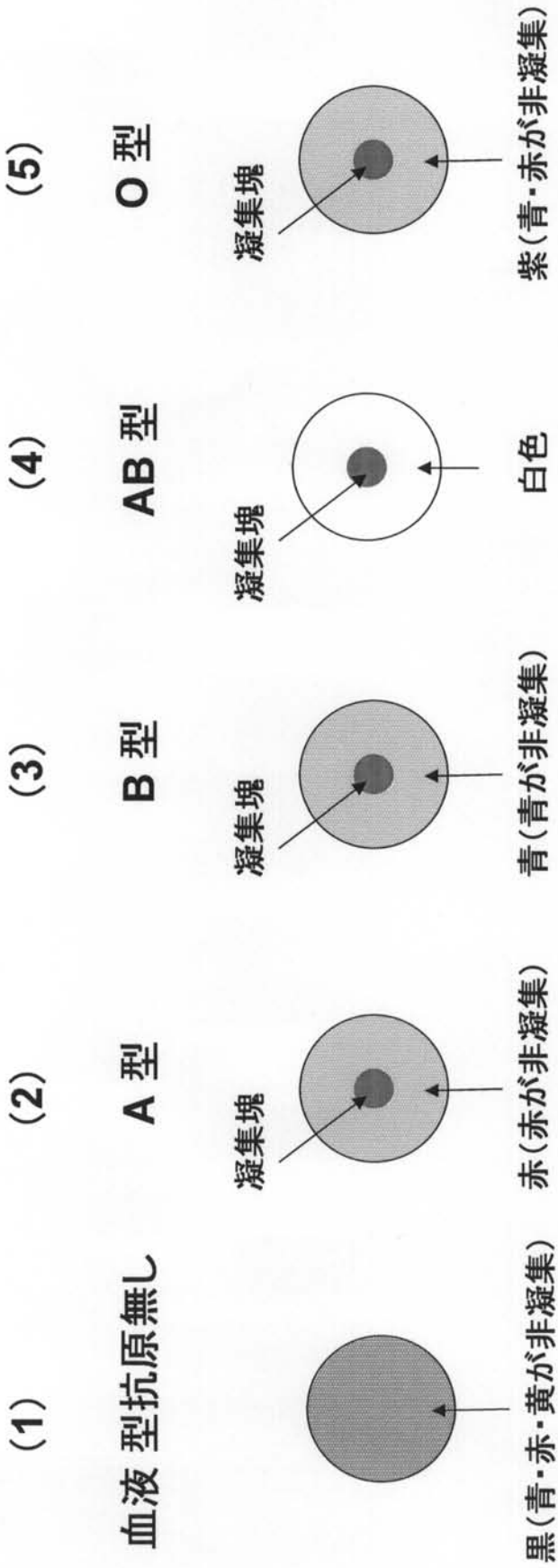
【図 1】



【図 2】







专利名称(译)	试剂和检验方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008089415A</a>	公开(公告)日	2008-04-17
申请号	JP2006270824	申请日	2006-10-02
[标]申请(专利权)人(译)	镰仓技术 - 科学		
申请(专利权)人(译)	镰仓有限公司技术 - 科学		
[标]发明人	村尾康雄		
发明人	村尾 康雄		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N21/78 G01N21/82		
FI分类号	G01N33/543.585 G01N33/53.K G01N21/78.Z G01N33/543.581.C G01N21/82		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/AB02 2G054/CA21 2G054/CE01 2G054/EA06 2G054/GA03 2G054/GB04		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：消除了使用单个试剂制备的试剂进行单独测试的需要，每个试剂都包含多种免疫凝集试剂，即使测试涉及大量试剂，也不复杂。提供不需要大量样品的测试试剂。一种包含多种免疫凝集剂的测试试剂，其中每种免疫凝集剂是通过以不同颜色着色的细颗粒制备的。通过观察通过混合测试试剂和样品而聚集的单体或混合颜色的细颗粒，或者通过观察未聚集的单体或混合的颜色或聚集的细颗粒，来获得该测试试剂。通过观察彼此不聚集的细颗粒的单体或混合色，可以同时多个项目中测试样品中诸如抗原或抗体的物质的存在。[选择图]无

