

(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2011-112631

(P2011-112631A)

(43) 公開日 平成23年6月9日(2011.6.9)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 H
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 A
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/576	Z
	GO 1 N 33/53	D

審査請求 未請求 請求項の数 16 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2009-272339 (P2009-272339)	(71) 出願人	390014960 シスメックス株式会社 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(22) 出願日	平成21年11月30日 (2009.11.30)	(74) 代理人	100088867 弁理士 西野 卓嗣
		(72) 発明者	山垣内 孝博 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
		(72) 発明者	武田 和彦 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

(54) 【発明の名称】 C型肝炎ウイルスのコア蛋白検出のための試料の前処理方法及び前処理用試薬キット

(57) 【要約】

【課題】

本発明は、粒子の凝集が抑制することが可能な、H C V コア蛋白検出のための試料の前処理方法、及びその方法で用いるH C V コア蛋白検出のための試料の前処理用試薬キットを提供することを目的とする。

【解決手段】

本発明は、粒子を用いた免疫測定法によるH C V コア蛋白の検出において、C型肝炎ウイルスを含む疑いのある試料を、アルカリ性物質を含有する試薬で処理し、さらに酸性物質を含有する試薬で中和処理する際に、いずれかの試薬が還元剤を含有することを特徴とする、H C V コア蛋白検出のための試料の前処理方法、及びその方法で用いるH C V コア蛋白検出のための試料の前処理用試薬キットを提供できる。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

粒子を用いた免疫測定法による C 型肝炎ウイルス (HCV) コア蛋白の検出のための試料の前処理方法であって、
C 型肝炎ウイルスを含む疑いのある試料を、アルカリ性物質を含有する試薬で処理する第 1 処理工程と、
第 1 処理工程で得られた試料を、酸性物質を含有する試薬で処理する第 2 処理工程と、を含み、
第 1 処理工程及び第 2 処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つが、還元剤を含有する、HCV コア蛋白検出のための試料の前処理方法。

10

【請求項 2】

還元剤が、メルカプトエチルアミン、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、システイン、ジチオエリトリール、水素化ホウ素ナトリウム及びホスフィンから選択される少なくとも一つである請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

第 1 処理工程で用いられる試薬が、さらに非イオン性界面活性剤を含有する、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤から選択される請求項 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

第 1 処理工程で用いられる試薬が、さらにカオトロピック剤を含有する、請求項 1 ~ 4 いずれかに記載の方法。

【請求項 6】

カオトロピック剤が、尿素、グアニジン塩酸塩、サリチル酸ナトリウム、アセトアミド及びホルムアミドから選択される少なくとも一つである請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

アルカリ性物質が、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及び水酸化マグネシウムから選択される少なくとも一つである請求項 1 ~ 6 いずれかに記載の方法。

30

【請求項 8】

酸性物質が、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、リン酸、ギ酸、フマル酸、酒石酸、塩酸及び硫酸から選択される少なくとも一つである請求項 1 ~ 7 いずれかに記載の方法。

【請求項 9】

粒子が、磁性粒子である請求項 1 ~ 8 いずれかに記載の方法。

【請求項 10】

第 1 処理工程及び第 2 処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つが、無機塩類を含有する、請求項 1 ~ 9 いずれかに記載の方法。

【請求項 11】

無機塩類が、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム及び硫酸ナトリウムから選択される少なくとも一つである請求項 10 に記載の方法。

40

【請求項 12】

免疫測定法が、液相中で形成された HCV コア蛋白、抗 HCV コア蛋白抗体および磁性粒子からなる複合体を、磁気分離によって液相から分離して HCV コア蛋白を検出する免疫測定法である請求項 9 に記載の試料の方法。

【請求項 13】

粒子を用いた免疫測定法による C 型肝炎ウイルス (HCV) コア蛋白の検出のための試料の前処理用試薬キットであって、
アルカリ性物質を含む第 1 試薬と、
酸性物質を含む第 2 試薬と、

50

を含み、

第1試薬及び第2試薬の少なくとも一つが、還元剤を含有する、C型肝炎ウイルスの有無を判定するための試薬キット。

【請求項14】

第1試薬及び第2試薬の少なくとも一つが、無機塩類を含有する、請求項13に記載の試薬キット。

【請求項15】

第1試薬が、さらに非イオン性界面活性剤を含有する、請求項13または14に記載の試薬キット。

【請求項16】

第1試薬が、さらにカオトロピック剤を含有する、請求項13～15いずれかに記載の試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、C型肝炎ウイルスのコア蛋白(HCVコア蛋白)検出のための試料の前処理方法及び前処理用試薬キットに関する。

【背景技術】

【0002】

C型肝炎は、C型肝炎ウイルス(HCV)により引き起こされる伝染性の疾病である。HCVは、直径約60nmのRNAウイルスで、エンベロープをもつ。HCV RNAは一本鎖プラス鎖で、約9500塩基配列よりなっている。遺伝子構造はフラビウイルスに類似しており、5'末端と3'末端に非翻訳領域(UTR)があり、この間に約3000アミノ酸をコードする翻訳領域が存在する。翻訳領域は、5'側より、構造タンパクをコードするコア領域、エンベロープ領域1、エンベロープ領域2があり、これに続いて非構造領域が存在する。

【0003】

HCVを検出するための方法として、コア領域がコードするHCVコア蛋白を抗原とし、免疫学的手法を用いて検出する方法が知られている。ここで、HCVコア蛋白は、エンベロープを持つHCVの内部に存在する。従って、HCVコア蛋白を抗原として検出するには、HCVコア蛋白をHCVから遊離させる必要がある。HCVコア蛋白をHCVから遊離させる前処理方法としては、HCVをアルカリ性溶液で処理した後、酸性溶液で中和する前処理方法が知られている。例えば、特許文献1には、C型肝炎ウイルスを含む疑いのある試料を、非イオン性界面活性剤、蛋白変性剤及びアルカリ性物質を含有する試薬で処理する第1処理工程、及び第1処理工程で得られた試料を、酸性物質を含有する試薬で処理する第2処理工程により、HCVコア蛋白を遊離させる前処理方法が開示されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2001-004621号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

特許文献1のような、HCVをアルカリ性溶液で処理した後、酸性溶液で中和する方法を用いれば、簡便に短時間でHCVコア蛋白を検出するための試料を調製することができる。しかしながら、当該方法で調整した試料を使用し、粒子を用いた免疫測定法でHCVコア蛋白を検出する場合、B/F分離を行った後、粒子を液相に分散させると粒子の凝集が生じることがある。

【0006】

従って、本発明は、上述の粒子の凝集を抑制することが可能な、HCVコア蛋白検出のた

10

20

30

40

50

めの試料の前処理方法、及びHCVコア蛋白検出のための試料の前処理用試薬キット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】

【0007】

本発明者らは、上記の課題を解決するために鋭意研究を重ねた結果、HCVコア蛋白をHCVから遊離させるのに用いられるアルカリ性物質を含有する試薬、並びに酸性物質を含有する試薬の少なくとも一方に還元剤を添付することにより、粒子の凝集を抑制できることを見出し、本発明を完成するに至った。

【0008】

すなわち、本発明は

(1) 粒子を用いた免疫測定法によるC型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白の検出のための試料の前処理方法であって、C型肝炎ウイルスを含む疑いのある試料を、アルカリ性物質を含有する試薬で処理する第1処理工程と、第1処理工程で得られた試料を、酸性物質を含有する試薬で処理する第2処理工程と、を含み、

第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つが、還元剤を含有する、HCVコア蛋白検出のための試料の前処理方法；

(2) 還元剤が、メルカプトエチルアミン、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、システイン、ジチオエリトリール、水素化ホウ素ナトリウム及びホスフィンから選択される少なくとも一つである(1)に記載の方法；

(3) 第1処理工程で用いられる試薬が、さらに非イオン性界面活性剤を含有する、(1)または(2)に記載の方法；

(4) 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤から選択される(3)に記載の方法；

(5) 第1処理工程で用いられる試薬が、さらにカオトロピック剤を含有する、(1)~(4)いずれかに記載の方法；

(6) カオトロピック剤が、尿素、グアニジン塩酸塩、サリチル酸ナトリウム、アセトアミド及びホルムアミドから選択される少なくとも一つである(5)に記載の方法；

(7) アルカリ性物質が、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム及び水酸化マグネシウムから選択される少なくとも一つである(1)~(6)いずれかに記載の方法；

(8) 酸性物質が、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、リン酸、ギ酸、フマル酸、酒石酸、塩酸及び硫酸から選択される少なくとも一つである(1)~(7)いずれかに記載の方法；

(9) 粒子が、磁性粒子である(1)~(8)いずれかに記載の方法；

(10) 第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つが、無機塩類を含有する、(1)~(9)いずれかに記載の方法；

(11) 無機塩類が、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウム及び硫酸ナトリウムから選択される少なくとも一つである(10)に記載の方法；

(12) 免疫測定法が、液相中で形成されたHCVコア蛋白、抗HCVコア蛋白抗体および磁性粒子からなる複合体を、磁気分離によって液相から分離してHCVコア蛋白を検出する免疫測定法である(9)記載の試料の方法；

(13) 粒子を用いた免疫測定法によるC型肝炎ウイルス(HCV)コア蛋白の検出のための試料の前処理用試薬キットであって、アルカリ性物質を含む第1試薬と、酸性物質を含む第2試薬と、

を含み、第1試薬及び第2試薬の少なくとも一つが、還元剤を含有する、C型肝炎ウイルスの有無を判定するための試薬キット；

(14) 第1試薬及び第2試薬の少なくとも一つが、無機塩類を含有する、(13)に記載の試薬キット；

(15) 第1試薬が、さらに非イオン性界面活性剤を含有する、(13)または(14)に記載の試薬キット；

(16) 第1試薬が、さらにカオトロピック剤を含有する、請求項13~15いずれかに

10

20

30

40

50

記載の試薬キット；
を提供する。

【発明の効果】

【0009】

本発明によれば、粒子を用いた免疫測定法によるHCVコア蛋白の検出において、粒子の凝集を抑制することができる。

【発明を実施するための形態】

【0010】

本実施形態におけるHCVコア蛋白検出のための試料の前処理方法は、粒子を用いた免疫測定法によるHCVコア蛋白の検出に用いられる、試料の前処理方法であって、C型肝炎ウイルスを含む疑いのある試料を、アルカリ性物質を含有する試薬で処理する第1処理工程と、第1処理工程で得られた試料を、酸性物質を含有する試薬で処理する第2処理工程と、を含み、第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つが、還元剤を含有する。

10

【0011】

本実施形態において、第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つは、還元剤を含む。第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つが還元剤を含有することにより、後述する分離工程において、粒子の凝集を抑制することができる。ここで、「還元剤」は、後述する形成工程に影響を及ぼさない還元剤であれば、特に限定されない。本実施形態における還元剤としては、特に、蛋白質のジスルフィド結合を解離させるものが好ましい。より具体的な還元剤としては、例えば、メルカプトエチルアミン、メルカプトエタノール、ジチオスレイトール、システイン、ジチオエリトリオール、水酸化ホウ素ナトリウムまたはホスフィンなどが挙げられる。本実施形態における還元剤としては、特にメルカプトエチルアミン、ジチオスレイトールおよびシステイン塩酸塩が好ましい。

20

【0012】

第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つに含有される還元剤の濃度は、使用する還元剤の種類により適宜調整すれば良く、限定されるものではない。例えば、還元剤としてメルカプトエチルアミンを用いる場合、第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つに含有されるメルカプトエチルアミンの濃度は、10～60mMが好ましい。

30

【0013】

本実施形態において、第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つは、さらに無機塩類を含有することが好ましい。第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つが、さらに無機塩類を含有することにより、後述する分離工程において、粒子の凝集をさらに抑制することができる。ここで、「無機塩類」は、後述する形成工程に影響を及ぼさない塩類であれば、特に限定されない。本実施形態における塩類としては、特に、無機塩が好ましい。より具体的な無機塩としては、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化マグネシウムまたは硫酸ナトリウムなどが挙げられる。本実施形態における塩類としては、塩化ナトリウム、塩化カリウムおよび硫酸ナトリウムが好ましい。

40

【0014】

第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つに含有される無機塩類の濃度は、使用する無機塩類の種類により適宜調整すれば良く、限定されるものではない。例えば、無機塩類として塩化ナトリウムを用いる場合、第1処理工程及び第2処理工程で用いられる試薬の少なくとも一つに含有される塩化ナトリウムの濃度は、0.1～1.0Mが好ましい。

【0015】

ここで、「HCVを含む疑いのある試料」は、生体試料又は生体試料から調製された試料が好ましい。生体試料及び生体試料から調製された試料としては、例えば、尿、糞便、全

50

血、血漿、血清、胆汁、胃腸分泌物、リンパ液、精液、骨髓液、唾液、母乳、組織抽出液、組織ホモジネート、細胞抽出液、細胞ホモジネートなどが挙げられる。

【0016】

本実施形態において、第1処理工程で用いられる試薬は、さらに非イオン性界面活性剤を含有することが好ましい。ここで、「非イオン性界面活性剤」は、上述のHCVコア蛋白をHCVから遊離させる方法で用いることができる非イオン性界面活性剤であれば、特に限定されない。本実施形態における非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤が好ましい。具体的なポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル（Triton X-100、Triton X-114及びNP-40等）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（Tween-20及びTween-80等）、及びポリオキシエチレンアルキルエーテル（Brij35及びBrij45等）などが挙げられる。本実施形態におけるポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテルが好ましい。

10

【0017】

第1処理工程における、非イオン性界面活性剤の濃度は、使用する非イオン性界面活性剤の種類により適宜調整すれば良く、限定されるものではない。例えば、非イオン性界面活性剤として、ポリオキシエチレンアルキルエーテルを用いる場合、第1処理工程における、ポリオキシエチレンアルキルエーテルの濃度は2～4%が好ましい。

【0018】

また、本実施形態において、第1処理工程で用いられる試薬は、さらにカオトロピック剤を含有することが好ましい。ここで、「カオトロピック剤」は、蛋白質の分子構造を不安定化する性質を持つ物質であり、例えば尿素、グアニジン塩酸塩、サルチル酸ナトリウム、チオシアン酸ナトリウム、過塩素ナトリウム、アセトアミド及びホルムアルデヒドなどが挙げられる。本実施形態におけるカオトロピック剤としては、尿素が好ましい。

20

【0019】

第1処理工程における、カオトロピック剤の濃度は、使用するカオトロピック剤の種類により適宜調整すれば良く、限定されるものではない。例えば、カオトロピック剤として尿素を用いる場合、第1処理工程における、尿素の濃度は2～4Mが好ましい。

【0020】

「アルカリ性物質」は、上述のHCVコア蛋白をHCVから遊離させる方法で用いることができるアルカリ性物質であれば、特に限定されない。ここで、アルカリ性物質としては、例えば、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化マグネシウム及び硫酸ナトリウムなどが挙げられる。本実施形態におけるアルカリ物質としては、水酸化ナトリウムが好ましい。

30

【0021】

第1処理工程における、アルカリ性物質の濃度は、使用するアルカリ性物質の種類により適宜調整すれば良く、限定されるものではない。例えば、アルカリ性物質として、水酸化ナトリウムを用いる場合、第1処理工程における水酸化ナトリウムの濃度は、0.15～0.5Nが好ましい。

【0022】

「第1処理工程」は、HCVを含む疑いのある試料と、アルカリ性物質を含有する試薬を混合する処理であれば、特に限定されない。第1処理工程を行うことにより、HCVからHCVコア蛋白を遊離することができる。ここで、第1処理工程における、処理時間や処理温度は、試料と試薬の混合条件に応じて、適宜設定すればよく、特に制限されるものではない。具体的な第1処理工程における処理時間や処理温度としては、例えば、第1処理工程において、ポリオキシエチレン系非イオン性界面活性剤の濃度が2～4%で、尿素の濃度が2～4Mで、水酸化ナトリウムの濃度が0.1～0.4Nの試薬を用いる場合、20～30の処理温度で6～10分の処理時間で第1処理工程を行うことができる。

40

【0023】

なお、本実施形態における、アルカリ性物質を含有する試薬は、非イオン性界面活性剤と

50

カオトロピック剤とを含有する試薬、及びそれぞれの成分を二つ以上の試薬に分けて含有する試薬キットが含まれる。ここで、試薬キットとしては、例えば、非イオン性界面活性剤及びカオトロピック剤を含有する第1試薬と、アルカリ性物質を含有する第2試薬とを備えた試薬キットなどが挙げられる。

【0024】

「第2処理工程」では、第1処理工程で得られた試料と、酸性物質を含有する試薬とを混合し、第1処理工程で得られた試料のアルカリを中和する。第2処理工程で得られる試料のpHは、後述する形成工程に影響を及ぼさないpHであることが好ましい。より具体的な第2処理工程で得られる試料のpHとしては、pH6.5~8が好ましい。ここで、具体的な第2処理工程における処理時間や処理温度としては、試料と試薬の混合条件に応じて、適宜設定すればよく、特に制限されるものではない。具体的な第1処理工程における処理時間や処理温度としては、20~30の処理温度で3~15分である。

10

【0025】

「酸性物質」は、特に限定されないが、例えば、酢酸、乳酸、クエン酸、リンゴ酸、コハク酸、リン酸、ギ酸、フマル酸、酒石酸、塩酸、硫酸などが挙げられる。本実施形態における酸性物質としてはクエン酸が好ましい。ここで、第2処理工程で用いられる酸性物質を含有する試薬における、酸性物質の濃度は、使用する酸性物質や上述の第1工程で使用されたアルカリ性物質などに応じて、適宜調整すればよく、特に制限されない。酸性物質を含有する試薬における、酸性物質の濃度としては、例えば、酸性物質がクエン酸の場合、試薬中のクエン酸の濃度は、0.1~0.3Mが好ましい。

20

【0026】

HCVを含む疑いのある試料は、上述の第1処理工程及び第2処理工程により希釈される。ここで、第1処理工程及び第2処理工程後における、HCVを含む疑いのある試料の希釈は、HCVを含む疑いのある試料の種類に応じて、適宜調整すれば良い。例えば、HCVを含む疑いのある試料が血清の場合、免疫測定に対する血清成分等の影響を抑制し、且つ、HCVコア蛋白を検出可能な濃度にする観点から、第1処理工程及び第2処理工程後における、血清の希釈は、3~5倍が好ましい。

【0027】

なお、粒子を用いた免疫測定法によるC型肝炎ウイルスの検出は、HCVコア蛋白を、公知の粒子を用いた免疫測定法を用いて検出するものであれば良い。また、粒子も、免疫測定法で用いられる公知の粒子であればよく、例えば、磁性粒子、ラテックス粒子、赤血球、ゼラチン粒子などが挙げられるが、磁性粒子が好ましい。ここで、磁性粒子としては、磁性を有する材料を基材として含み、通常免疫測定に用いられる粒子であればよい。例えば、基材としてFe₂O₃および/またはFe₃O₄、コバルト、ニッケル、フィライト、マグネタイトなどを用いた磁性粒子が知られている。

30

【0028】

磁性粒子を用いた免疫測定法を用いてC型肝炎ウイルスの検出する場合、液相中で形成されたHCVコア蛋白、抗HCVコア蛋白抗体および磁性粒子からなる複合体を、磁気分離によって液相から分離してHCVコア蛋白を検出することができる。より具体的には、液相中で、HCVコア蛋白、標識抗HCVコア蛋白抗体(以下、単に標識抗体という場合がある)および磁性粒子からなる複合体を形成する。次に、液相中の複合体を磁気分離によって液相から分離する。次に、分離された複合体を液相に分散し、複合体の標識を測定する。そして、測定の結果に基づいて、試料中のC型肝炎ウイルスの有無を判定することができる。

40

【0029】

本実施形態における、第2処理工程で得られた試料を用いて、HCVコア蛋白、標識抗体および磁性粒子からなる複合体を形成する場合、第2処理工程後、標識抗体及び第2処理工程で得られた試料に含まれるHCVコア蛋白を含む複合体を、粒子上に形成させればよい。

【0030】

50

ここで、「標識抗体」は、免疫測定法で一般的に用いられる公知の標識物質により標識された抗体であれば、特に限定されない。また、標識抗体は、HCVコア蛋白と抗原抗体反応により結合する。ここで、標識物質としては、例えば、酵素、蛍光物質、放射性同位元素などが挙げられる。酵素としては、例えば、アルカリホスファターゼ、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、チロシナーゼ、酸性ホスファターゼなどが挙げられる。蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、グリーン蛍光タンパク質(GFP)、ルシフェリンなどが挙げられる。放射性同位元素としては、 ^{125}I 、 ^{14}C 、 ^{32}P などが挙げられる。なお、標識物質としては、酵素が好ましい。

【0031】

標識物質が酵素である場合、該酵素に対する基質は、標識物質として用いる酵素に応じて、適宜公知の基質を選択すればよい。例えば、酵素としてアルカリホスファターゼを用いる場合の基質としてはCDP-Star(商標登録)、(4-クロロ-3-(メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2'-(5'-クロロ)トリクシロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン}-4-イル)フェニルリン酸2ナトリウム)、CSPD(商標登録)(3-(4-メトキシスピロ{1,2-ジオキセタン-3,2-(5'-クロロ)トリクシロ[3.3.1.1^{3,7}]デカン}-4-イル)フェニルリン酸2ナトリウム)などの化学発光基質；p-ニトロフェニルホスフェート、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)、4-ニトロブルーテトラゾリウムクロリド(NBT)、ヨードニトロテトラゾリウム(INT)などの発光基質；4-メチルウムベリフェニル・ホスフェート(4MUP)などの蛍光基質；5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸(BCIP)、5-プロモ-6-クロロ-インドリルリン酸2ナトリウム、p-ニトロフェニルリンなどの発色基質が挙げられる。

【0032】

なお、標識抗体は、当該分野において公知の方法で作成することができる。例えば、抗体のチオール(-SH)を用いて上記の標識物質を抗体と結合させる方法が知られている。より具体的には、チオール基と反応できる官能基、例えばマレイミド基を導入した上記の標識物質を、抗体と反応させることにより、抗体を標識物質で標識できる。

【0033】

標識抗体及び第2処理工程で得られた試料に含まれるHCVコア蛋白を含む複合体を、粒子上に形成するには、標識抗体と、磁性粒子と、第2処理工程で得られた試料に含まれるHCVコア蛋白とを液相中で接触させればよい。これにより、HCVコア蛋白、標識抗体及び磁性粒子とからなる複合体が、形成される。ここで、標識抗体とHCVコア蛋白は、抗原抗体反応により結合し、標識抗体-HCVコア蛋白複合体を形成する。さらに、標識抗体-HCVコア蛋白複合体は、HCVコア蛋白複合体と磁性粒子に結合可能な物質を介して、磁性粒子に結合させることができる。ここで、HCVコア蛋白複合体と磁性粒子に結合可能な物質としては、例えば、HCVコア蛋白と磁性粒子に結合する粒子結合抗体が挙げられる。HCVコア蛋白と磁性粒子に結合する粒子結合抗体を用いた場合、磁性粒子上には標識抗体-HCVコア蛋白-粒子結合抗体複合体が形成される。

【0034】

ここで、「HCVコア蛋白と粒子に結合する粒子結合抗体」は、上述の標識抗体とは異なるHCVコア蛋白のエピトープと抗原抗体反応により結合し、且つ粒子に結合可能な抗体であれば特に制限されない。なお、粒子に結合可能な抗体は、当該技術において公知の方法を用いて作成することができる。例えば、抗体に粒子結合部位を結合させ、粒子に粒子結合部位に結合可能な結合物質を固定化することで、粒子に結合可能な抗体を作成することができる。すなわち、粒子結合部位と結合物質との結合能を利用して、抗体を粒子に結合可能にすることができる。

【0035】

上記の粒子結合部位と結合物質は、形成工程において、特異的に結合できる物質の組み合わせであれば特に限定されない。これらの組み合わせとして、例えばビオチンとアビジン類、ハプテンと抗ハプテン抗体、ニッケルとヒスタチジンタグ、グルタチオンとグルタチ

10

20

30

40

50

オン - S - トランスフェラーゼなどが挙げられる。粒子結合部位と結合物質の組み合わせとしては、ビオチンとアビジン類との組み合わせが好ましい。粒子結合部位と結合物質との組み合わせに用いられる各々の物質は、どちらを粒子結合部位または結合物質を使用してもよい。より好ましい組み合わせとしては、粒子結合部位がビオチンを含み、結合物質がアビジン類を含む組み合わせが挙げられる。なお、「アビジン類」とは、アビジン及びスプレプトアビジンを含むことを意味する。

【0036】

なお、粒子結合部位を抗体に結合させる方法は、当該技術において公知である。例えば、粒子結合部位がビオチンを含む場合、抗体中のアミノ基やチオール基などと反応性を有する基を介してビオチンを抗体に結合させることができる。アミノ基と反応性を有する基としてはN-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)基が挙げられ、チオール基と反応性を有する基としてはマレイミド基などが挙げられる。

10

【0037】

また、結合物質を粒子に固定化する方法も、当該技術において公知である。該固定化は、例えば物理的吸着法、共有結合法、イオン結合法、これらの組み合わせなどにより行うことができる。例えば、結合物質がアビジン類である場合、物理的吸着によりアビジンを粒子に直接固定化することができる。また、アビジン類と結合可能な物質、例えばビオチンが結合した粒子にアビジン類を結合させることで、アビジン類を粒子に固定化することもできる。また、特開2006-226689号公報に記載の方法により、アビジン類を粒子に固定化することも可能である。なお、市販のアビジン類を結合させた粒子を用いることもできる。

20

【0038】

次に、液相中のHCVコア蛋白、標識抗体及び磁性粒子とからなる複合体を磁気分離によって液相から分離する。より具体的には、HCVコア蛋白、標識抗体及び磁性粒子とからなる複合体を含む液が入った容器の壁面に磁石を近づける。これにより、磁石を用いて複合体を容器の壁面に固定する。そして、複合体を容器の壁面に固定した状態で液相を吸引除去することで、分離工程を行うことができる。この分離を行うことにより、液相中に存在する、非イオン性界面活性剤、カオトロピック剤、及び複合体の形成に使用されなかった標識抗体など、後述する複合体の標識の測定において不要又は悪影響を及ぼす成分を除去することができる。

30

【0039】

なお、HCVコア蛋白、標識抗体及び磁性粒子とからなる複合体を磁気分離によって液相から分離する際に、複合体を洗浄することもできる。例えば、上述の分離された複合体に、洗浄液を添加して複合体を懸濁し、さらに複合体を洗浄液から磁気分離することで、複合体を洗浄することができる。この洗浄工程を行うことで、複合体の標識の測定において不要又は悪影響を及ぼす成分を、さらに除去することができる。この洗浄も、磁性粒子を用いた免疫測定法において公知である。ここで、洗浄液としては、HCVコア蛋白、標識抗体及び磁性粒子とからなる複合体に影響を及ぼさない緩衝液が好ましい。また、洗浄液は、界面活性剤を含有する緩衝液が特に好ましい。より具体的な洗浄液としては、例えば、TBS-T(0.05% Tween 20)及びPBS-T(0.05% Tween 20)などが挙げられる。なお、HISCL洗浄液(シスメックス社製)などの、市販の洗浄液を用いることもできる。

40

【0040】

次に、分離された複合体を液相に分散し、複合体の標識を測定する。分離された複合体の液相への分散は、分離された複合体を、基質液や緩衝液等の液相に分散させればよい。ここで、標識の測定は、上述の標識抗体に用いた標識物質の種類に応じて、適宜適切な測定方法で行えばよく、特に限定されない。例えば、該標識物質が酵素である場合、該酵素に対する基質を反応させることにより発生する光、色などを適切な装置を用いて測定することにより行うことができる。該装置としては、分光光度計、ルミノメータなどが挙げら

50

れる。また、標識物質が放射性同位体である場合、シンチレーションカウンターなどの従来公知の装置を用いて測定することにより行うことができる。

【0041】

そして、測定の結果に基づいて、試料中のC型肝炎ウイルスの有無を判定する。このC型肝炎ウイルスの有無を判定は、前記測定の結果に基づいて行う。具体的には、上述の測定において、HCVコア蛋白、標識抗体及び磁性粒子とからなる複合体に由来する標識が測定された場合、試料中にHCVが有ると判定する。逆に、上述の測定においてHCVコア蛋白、標識抗体及び磁性粒子とからなる複合体に由来する標識が測定されなかった場合、試料中にHCVが無いと判定する。例えば、測定で得られた測定値と予め設定した閾値を比較する。そして、測定値が閾値以上の場合に、試料中にHCVが有ると判定することができる。また逆に、測定値が閾値未満の場合に、試料中にHCVが無いと判定することができる。ここで閾値は、公知の方法で適宜設定すれば良い。閾値の設定の方法としては、例えば、複数の予めHCVが含まれていることが分かっている試料と、複数の予めHCVが含まれていないことが分かっている試料とについて、それぞれの測定値を取得する。そして、HCVが含まれている試料の集団と、HCVが含まれていない試料の集団とを、二等分できる中央値を閾値として設定することができる。

10

【0042】

なお、粒子を用いた免疫測定法によるC型肝炎ウイルスの検出として、磁性粒子を用いた免疫測定法を説明したが、HCVコア蛋白検出のための試料の前処理方法の適用は、これに限られない。磁性粒子以外の粒子としては、ラテックス粒子、赤血球、及びゼラチン粒子等が挙げられる。磁性粒子以外の粒子を用いた場合、磁気分離の代わりに、遠心分離を行うことで、複合体を液相から分離することができる。

20

【実施例1】

【0043】

<還元剤による磁性粒子の凝集抑制の確認>

本例で使用する試薬は以下に示す。

【0044】

第1処理試薬：

カオトロピック剤として尿素を6M、界面活性剤としてBrij 35（シグマ社製）を4%、及びアルカリ性物質として水酸化ナトリウムを0.45N含む水溶液を、第1処理試薬とした。

30

【0045】

第2処理試薬：

酸性物質としてクエン酸を0.15M含む、以下の第2処理試薬A～Cの水溶液を調製した。

(第2処理試薬A)

クエン酸 0.15M

(第2処理試薬B)

クエン酸 0.15M

メルカプトエチルアミン 30mM

40

(第2処理試薬C)

クエン酸 0.15M

メルカプトエチルアミン 30mM

NaCl 0.6mM

ここで、第2処理試薬Bには、還元剤としてメルカプトエチルアミンが含まれている。また、第2処理試薬Cには、還元剤としてメルカプトエチルアミン、及び無機塩類としてNaClが含まれている。

【0046】

標識抗体試薬：

50

標識抗体として、ALPで標識された抗HCV抗体（ALP標識HCF3-807）を用いた。ここで、HCF3-807としては、NITE AP-842で受領されているハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を用いた。該ハイブリドーマは、受領番号NITE AP-842で、2009年11月25日に、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに受領された細胞である。具体的な標識抗体試薬の作製は、ペプシン消化、及び還元することでFab'に転換した該抗体と、架橋剤としてEMCS〔N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido〕（同仁化学）を用いてマレイミド化したALPを混合して、反応させることで標識抗体を調製する。この方法で調製したALP標識抗体20 μ lを、980 μ lの希釈液（Tris-HCl(pH7.5) 25mM、NaCl 0.15M、BSA 0.25%、NaN₃ 0.02%、MgCl₂ 1mM、ZnCl₂ 0.1mM）で50倍に希釈し、標識抗体試薬とした。

【0047】

第1抗体試薬：

第1抗体として、ビオチン及びDNPで修飾された抗体（Biotin/DNP標識HCF4-104）を用いた。ここで、HCF4-104としては、NITE AP-841で受領されているハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を用いた。該ハイブリドーマは、受領番号NITE AP-841で、2009年11月25日に、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに受領された細胞である。具体的な第1抗体試薬の作製は、ビオチン化試薬（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin Reagents:ピアス社）をBSAに添加して、次いでDNP標識試薬（DNP-X acid SE:ABD Bioquest社）を添加することでBiotin/DNP標識したBSAを調製する。次に、ペプシン消化、及び還元することでFab'に転換した該抗体と、架橋剤としてEMCS〔N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido〕（同仁化学）を用いてマレイミド化したBiotin/DNP標識したBSAを混合して、反応させることで第1抗体を調製する。この方法で調製した5 μ lの第1抗体を、495 μ lの希釈液で100倍に希釈し、第1抗体試薬とした。

【0048】

磁性粒子試薬：

第2抗体として抗DNP抗体（DNP-1753）を固定化した磁性粒子（Dyna beads M-270；インビトロジェン社製）を用いた。ここで、DNP-1753としては、NITE AP-845で受領されているハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を用いた。該ハイブリドーマは、受領番号NITE AP-845で、2009年11月25日に、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに受領された細胞である。100 μ lの該磁性粒子を、900 μ lの希釈液で10倍に希釈し、磁性粒子試薬とした。

【0049】

還元剤による、磁性粒子の凝集の抑制効果を、以下の通り確認した。

<第1処理工程>

40 μ lのHCV陰性血清と、60 μ lの第1処理試薬とを混合し、室温にて8分間インキュベーションすることで、第1処理工程を実施した。

<第2処理工程>

第1処理工程で得られた試料に、60 μ lの第2処理試薬A～Cをそれぞれ添加し、室温にて5分間インキュベーションすることで、第1処理工程を実施した。なお、第2処理工程後の試料はpH7～7.5であることをpH試験紙（Whatman社製）により確認した。

<形成工程>

第2処理工程で得られた160 μ lの試料と、75 μ lの標識抗体試薬とを、反応キュベット（HISCL用反応キュベット；シスメックス社製）で混合し、室温で10分間インキュベートした。次に、反応キュベットに、50 μ lの第1抗体試薬を添加し、室温で10分間インキュベートした。次に、反応キュベットに、80 μ lの磁性粒子試薬を添加し、室温で10分間インキュベートすることで、形成工程を実施した。

< 分離工程 >

形成工程で得られた試料を含む反応キュベットを、集磁装置 (MINITUBE MAG SEPARATOR: SPHERO TECH社製) を用いて磁気分離を行った。

【0050】

分離工程において磁気分離した磁性粒子に、HISCL洗浄液 (シスメックス社製) を $300\ \mu\text{l}$ 添加し、ボルテックスミキサーを用いて分散させ、反応キュベットを静置した後、粒子の凝集を評価した。

【0051】

ここで、粒子の凝集の評価は、目視により観察し、凝集の程度を次の3段階に分けて評価した。

++ : 凝集が認められる。

+ : やや凝集が認められる。

- : 凝集が認められない。

第2処理工程において、第2処理試薬A~Cを用いた試料における、反応キュベット内の凝集の評価を表1に示す。

【0052】

【表1】

第2処理試薬	粒子の凝集の評価
A	++
B	-
C	-

【0053】

表1から明らかなように、第2処理工程において、メルカプトエチルアミンを含まない、第2処理試薬Aを用いて処理した試料では、磁性粒子の凝集が認められた。一方、メルカプトエチルアミンを含む、第2処理試薬B又は第2処理試薬Cを用いて処理した試料では、磁性粒子の凝集が確認が認められなかった。このことから、第2処理試薬に還元剤を添加することで、分離工程後の磁性粒子の凝集を抑制できることが示された。

【実施例2】

【0054】

< 還元剤の種類及びHCVの存在による磁性粒子の凝集抑制の確認 >

還元剤を含有する第2処理試薬による凝集抑制が、還元剤の種類に依存するものであるかを調べるため、以下の第2処理試薬D~Fを調製した。また、試料として使用する血清中のHCVの存在の有無が凝集に影響するかを調べるため、本例では、HCV陰性血清に代えて、HCV陽性血清を用いた。

【0055】

第2処理試薬:

酸性物質としてクエン酸を $0.15\ \text{M}$ 含む、以下の第2試薬D~Fの水溶液を調製した。

(第2処理試薬D)

クエン酸 $0.15\ \text{M}$

メルカプトエチルアミン $45\ \text{mM}$

(第2処理試薬E)

クエン酸 $0.15\ \text{M}$

ジチオトレイトール $45\ \text{mM}$

(第2処理試薬F)

クエン酸 $0.15\ \text{M}$

システイン塩酸塩 $90\ \text{mM}$

ここで、第2処理試薬Dには、還元剤としてメルカプトエチルアミンが含まれている。ま

10

20

30

40

50

た、第2処理試薬Eには、還元剤としてジチオトレイトールが含まれている。また、第2処理試薬Dには、還元剤としてシステイン塩酸塩が含まれている。

【0056】

上述した第2処理試薬D～F、及びHCV陽性血清を用いること以外は、実施例1と同様に、磁性粒子の凝集の抑制効果を確認した。なお、コントロールとして、第2処理液Aによる、磁性粒子の凝集の抑制効果も確認した。凝集の評価結果を表2に示す。

【0057】

【表2】

第2処理試薬	粒子の凝集の評価
A	++
D	-
E	-
F	-

10

【0058】

表2から明らかなように、第2処理工程において、メルカプトエチルアミンを含まない、第2処理試薬Aを用いて処理した試料では、HCV陽性血清を用いた場合でも、磁性粒子の凝集が認められた。一方、メルカプトエチルアミンを含む第2処理試薬Dでは、HCV陽性血清を用いた場合でも、実施例1と同様に磁性粒子の凝集が認められなかった。また、ジチオトレイトールを含む第2処理試薬E、およびシステイン塩酸塩を含む第2処理試薬Fを用いて処理した試料でも、第2処理試薬Dと同様に、磁性粒子の凝集が認められなかった。このことから、還元剤の種類を問わず、第2処理試薬に還元剤を添加することで、分離工程後の磁性粒子の凝集を抑制できることが示された。また、血清中のHCVの存在の有無にかかわらず、第2処理試薬に還元剤を添加することで、分離工程後の磁性粒子の凝集を抑制できることが示された。

20

【実施例3】

【0059】

<無機塩類による磁性粒子の凝集抑制の確認>

還元剤及び無機塩類を含有する第2処理試薬による凝集抑制が、無機塩類に依存するものであるかを調べるため、以下の第2処理試薬G～Iを調製した。

30

【0060】

第2処理試薬：

酸性物質としてクエン酸を0.15M含む、以下の第2試薬D～Fの水溶液を調製した。

(第2処理試薬G)

クエン酸 0.15M

塩化ナトリウム 0.6M

(第2処理試薬H)

クエン酸 0.15M

塩化カリウム 0.6M

(第2処理試薬I)

クエン酸 0.15M

硫酸ナトリウム 0.6M

40

ここで、第2処理試薬Gには、無機塩類として塩化ナトリウムが含まれている。また、第2処理試薬Hには、無機塩類として塩化カリウムが含まれている。さらにまた、第2処理試薬Iには、無機塩類として硫酸ナトリウムが含まれている。

【0061】

上述した第2処理試薬G～Iを用いること以外は、実施例2と同様に、磁性粒子の凝集の抑制効果を確認した。なお、コントロールとして、第2処理液Aによる、磁性粒子の凝集の抑制効果も確認した。凝集の評価結果を表3に示す。

50

【 0 0 6 2 】

【表 3】

第2処理試薬	粒子の凝集の評価
A	++
G	+
H	+
I	+

【 0 0 6 3 】

表 3 から明らかなように、第 2 処理工程において、無機塩類を含まない、第 2 処理試薬 A を用いて処理した試料では、磁性粒子の凝集が認められた。一方、塩化ナトリウムを含む第 2 処理試薬 G、塩化カリウムを含む第 2 処理試薬 H、及び硫酸ナトリウムを含む第 2 処理試薬 I では、磁性粒子の凝集がやや認められたものの、第 2 処理試薬 A に比べ、磁性粒子の凝集の抑制効果が認められた。このことから、還元剤の磁性粒子の凝集の抑制効果より低い、無機塩類にも磁性粒子の凝集の抑制効果があることが示された。従って、還元剤及び無機塩類の添加により、より効果的に磁性粒子の凝集が抑制できることが示唆された。

10

【 手 続 補 正 書 】

【 提 出 日 】 平 成 22 年 1 月 15 日 (2010.1.15)

【 手 続 補 正 1 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 4 6

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 4 6 】

標 識 抗 体 試 薬 :

標識抗体として、ALPで標識された抗HCV抗体（ALP標識HCF3-807）を用いた。ここで、HCF3-807としては、NITE P-842で受託されているハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を用いた。該ハイブリドーマは、受託番号NITE P-842で、2009年11月25日に、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに受託された細胞である。具体的な標識抗体試薬の作製は、ペプシン消化、及び還元することでFab'に転換した該抗体と、架橋剤としてEMCS〔N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido〕（同仁化学）を用いてマレイミド化したALPを混合して、反応させることで標識抗体を調製する。この方法で調製したALP標識抗体20μlを、980μlの希釈液（Tris-HCl(pH7.5) 25mM、NaCl 0.15M、BSA 0.25%、NaN3 0.02%、MgCl2 1mM、ZnCl2 0.1mM）で50倍に希釈し、標識抗体試薬とした。

【 手 続 補 正 2 】

【 補 正 対 象 書 類 名 】 明 細 書

【 補 正 対 象 項 目 名 】 0 0 4 7

【 補 正 方 法 】 変 更

【 補 正 の 内 容 】

【 0 0 4 7 】

第 1 抗 体 試 薬 :

第 1 抗体として、ビオチン及びDNPで修飾された抗体（Biotin/DNP標識HCF4-104）を用いた。ここで、HCF4-104としては、NITE P-841で受託されているハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を用いた。該ハイブリドーマは、受託番号NITE P-841で、2009年11月25日に、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに受託された細胞である。具体的な第 1 抗体試薬の作製は、ビオチン化試薬（EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin Reagents:ピラス

社)をBSAに添加して、次いでDNP標識試薬(DNP-X acid SE:ABD Bioquest社)を添加することでBiotin/DNP標識したBSAを調製する。次に、ペプシン消化、及び還元することでFab'に転換した該抗体と、架橋剤としてEMCS〔N-(6-Maleimidocaproyloxy)succinimido〕(同仁化学)を用いてマレイミド化したBiotin/DNP標識したBSAを混合して、反応させることで第1抗体を調製する。この方法で調製した5 μlの第1抗体を、495 μlの希釈液で100倍に希釈し、第1抗体試薬とした。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0048

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0048】

磁性粒子試薬：

第2抗体として抗DNP抗体(DNP-1753)を固定化した磁性粒子(Dynabeads M-270;インビトロジェン社製)を用いた。ここで、DNP-1753としては、NITE P-845で受託されているハイブリドーマから産生されるモノクローナル抗体を用いた。該ハイブリドーマは、受託番号NITE P-845で、2009年11月25日に、独立行政法人製品評価技術基盤機構 特許微生物寄託センターに受託された細胞である。100 μlの該磁性粒子を、900 μlの希釈液で10倍に希釈し、磁性粒子試薬とした。

专利名称(译)	检测丙型肝炎病毒核心蛋白样品的前处理方法及预处理试剂盒		
公开(公告)号	JP2011112631A	公开(公告)日	2011-06-09
申请号	JP2009272339	申请日	2009-11-30
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	山垣内孝博 武田和彦		
发明人	山垣内 孝博 武田 和彦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/576 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.501.H G01N33/543.541.A G01N33/576.Z G01N33/53.D G01N33/543.515.H		
其他公开文献	JP5351724B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

亲切代码：本发明提供一种能够抑制颗粒聚集的用于HCV核心蛋白检测的样品的预处理方法和用于检测用于该方法的HCV核心蛋白的样品的预处理的试剂盒其目的。 — 本发明涉及使用颗粒通过免疫测定检测HCV核心蛋白的方法，用含有碱性物质的试剂处理怀疑含有丙型肝炎病毒的样品，还包含含有酸性物质的试剂一种用于HCV核心蛋白检测的样品的预处理方法，其特征在于，任何一种试剂在进行总和处理时含有还原剂，以及用于预处理该方法中使用的用于HCV核心蛋白检测的样品的方法可以提供用于处理的试剂盒。【选择图】无

第2处理试剂	粒子の凝集の評価
A	++
B	-
C	-