

(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2011-174836

(P2011-174836A)

(43) 公開日 平成23年9月8日(2011.9.8)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 N | |
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 2 1 | |
| GO 1 N 33/12 (2006.01) | GO 1 N 33/543 5 0 1 A | |
| | GO 1 N 33/12 | |

審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 22 頁)

| | | | |
|--------------|----------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2010-39631 (P2010-39631) | (71) 出願人 | 509352945 田中貴金属工業株式会社 東京都千代田区丸の内2丁目7番3号 |
| (22) 出願日 | 平成22年2月25日 (2010.2.25) | (74) 代理人 | 100123423 弁理士 柿澤 紀世雄 |
| (11) 特許番号 | 特許第4686639号 (P4686639) | (72) 発明者 | 榊原 雄広 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式 会社技術開発センター内 |
| (45) 特許公報発行日 | 平成23年5月25日 (2011.5.25) | (72) 発明者 | 望月 一芳 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式 会社技術開発センター内 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生豚肉検出法およびその検出キット

(57) 【要約】

【課題】免疫測定法により非加熱食品中の豚生肉の検出を、非特異的反応を惹起すること無く特異的に高性能、かつ高感度に行なうための最適な検出抗体の調製と、その検出抗体を用いる簡便かつ高精度な検出法ならびにそのための検査キットを提供することである。

【解決手段】非加熱食品中の豚生肉に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識する抗体を、検出抗体とする非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法およびそれを実施するためのイムノクロマトグラフィー検出装置ならびにイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

非加熱食品中の豚生肉に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識する抗体を、検出抗体とする非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項 2】

抗体がポリクローナル抗体である請求項 1 に記載のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項 3】

ポリクローナル抗体が豚血清中のイムノグロブリン G をヤギまたはウサギに免疫して得られたものである請求項 1 または 2 に記載のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項 4】

検出抗体が、ヤギ抗豚イムノグロブリン G 抗体である請求項 3 に記載のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項 5】

豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 6】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されている請求項 5 に記載のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 7】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【請求項 8】

ポリクローナル抗体が豚血清中のイムノグロブリン G をヤギ又はウサギに免疫して得られる請求項 7 に記載のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【請求項 9】

標識抗体と検出部に固定した抗体が、同一の方法でヤギに免疫して得られる請求項 8 に記載のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、非加熱食品中の（生）豚肉を検出する方法およびその検出キットに関するものである。さらに、本発明は、豚血清中のイムノグロブリン G を動物に免疫することにより得られる、前記イムノグロブリン G を特異的に認識する抗体を用いて、非加熱食品中の（生）豚肉を検出する免疫クロマト測定試薬に関するものである。

【背景技術】

【0002】

ウシ海綿状脳症（BSE）といった牛感染症のヒトへの感染の危険性が、EU 科学運営委員会の意見として報告されて以来、BSE 感染牛の肉骨粉の家畜飼料への使用が問題視され、また、地域ブランド牛にみられる偽装ブランド牛肉といった偽装食品に対する検査にも強い関心もたれて来た。

一方で、食品中に含まれる食物アレルギーに対して食物アレルギー患者は、喘息、皮膚炎、胃腸障害、アナフィラキシーショックといったさまざまなアレルギー症状を引き起こし、時には深刻な事態に至るケースもある。食物アレルギー患者は増加傾向にあることもあって、食品への安全性に関する消費者の関心は非常に高まっている。

10

20

30

40

50

【0003】

食物アレルギー含有物質として代表的な食品としては、穀類（そば、小麦等）、卵類、肉類（牛、豚、鶏など）、魚類（サバ、イワシ等々）、牛乳類、甲殻類（カニなど）、軟体動物類、豆類（落花生、大豆など）、果実類（マンゴーなど）、野菜類（ニンニクなど）などが一般的には良く知られており、これらの食物アレルギー誘発食品中には、グルテン、ゼラチン、カゼイン、オボアルブミン、オボムコイド、リゾチーム、 γ -ラクトアルブミン、 α -ラクトグロブリン等々といった食物アレルギー誘発成分が含まれている。加工食品中には、多数の食品や多数の食物アレルギーが含まれているが、これらを簡便に検出することは出来ないのが現状である。

【0004】

さらに加工処理（加熱、加圧、酵素処理、凍結、乾燥、塩蔵など）された食品は、処理により食品中のたんぱく質成分が分子構造的に変性もしくは分子修飾されてしまうため、加工食品中のこれらの成分を簡便に検出するには、加工処理された成分と加工処理されていない生の成分とでは、それぞれに対応した適切な抗原やエピトープを用いることが肝要であり、その模索と研究が進められてきた。

【0005】

例えば、缶詰食品や家畜用飼料といった試料中に存在する高温、例えば100℃を超える温度条件で加熱処理された牛、豚、鶏に代表される動物性組織由来原料を検出するための検出試薬として、血清アルブミンを加熱して変性したタンパク質を免疫原として免疫した動物から生産される抗体が、加熱変性した血清アルブミンを特異的に認識し、非加熱の血清アルブミンに対しては交差反応性を示さないことを見出し、試料中の加熱処理された動物性組織由来原料の存在を検出する手法（イムノクロマト法含む）を提供している。（特許文献1、特許文献2参照）

【0006】

また、未変性および/または変性物質からなる食物アレルギーの混合物（蛋白質）を動物に免疫して得られるIgE（イムノグロブリンE）抗体、及び当該抗体を用いる食物アレルギー並びに食物アレルギー誘発性食品の検出方法（イムノクロマト法含む）が公知である。（特許文献3参照）

【0007】

更に、寄託された特定細胞（加熱した豚肉中の特定タンパクを動物に免疫し得られる細胞）から生産されるモノクローナル抗体をELISA（免疫学的測定の種類）法で用い加熱食品中の豚肉を検出することが公知である。（特許文献4参照）

【0008】

しかしながら、この検出法は、特定細胞（加熱した豚肉中の特定タンパクを動物に免疫し得られる細胞）から生産されるモノクローナル抗体を用いているため、正確に検出可能であるが、モノクローナル抗体の調製には高額な費用がかかり、医療分野において多くの患者さんや食文化の異なる一般消費者に普及を図る場合には適切でないという課題があった。

【0009】

本発明者等は、上記モノクローナル抗体を用いる代わりにポリクローナル抗体を用いて、非加熱食品中の豚生肉を検出するイムノクロマト法について鋭意研究を重ねたところ、ウサギに免疫して得られたウサギ由来ポリクローナル抗体を用いた場合においては、標準緩衝液だけでも反応してしまい非特異的の反応が強く見られて、精度の点で使用不可能であった。このように、試料中の検出対象物である非加熱食品中の豚生肉をポリクローナル抗体を用いてイムノクロマト法により検出する方法を実施する際、非特異的の反応が依然として起こることを観察しており、非特異的の反応を十分に抑制できないという課題が依然としてあった。

【0010】

これまで挽き肉類中への他の肉類の混入（牛、豚、鶏など）を検査する手段として、免疫学的手法であるCEIA（cloth-based enzyme immunoassay）

10

20

30

40

50

s a y)法が公知であり、その検査に用いる標識抗体(コンジュゲート)として豚肉の混入を検査する場合には、ウサギ抗豚 I g G - h o r s e r a d i s h p e r o x i d a s e (H R P) 標識抗体を用いることは公知である。(非特許文献1参照)

【0011】

しかしながら、この C E I A 法では検査時間が約 30 分程度かかる上に、牛肉中への他の肉類の混入を検査するにおいては、5%以上の混入濃度が必要であり、検出感度が悪く、実用的には満足できるようなものではなかった。

本発明者等は、この C E I A 法をより実用的な、簡便で検出時間が迅速であるイムノクロマトグラフィ法に適用する目的で研究を進め、ウサギ抗豚 I g G を検出抗体として使用してみたところ、非特異的認識が惹起して使用不能であり、さらなる研究が必要であった。

10

【0012】

従来から、肉類の検査においては、免疫学的手法としては C E I A 法といった 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) 法が、また遺伝子学的手法として P C R 法が知られているが、E L I S A 法は、P C R 法に比べれば検出時間は早いですが、イムノクロマトグラフ法に比べると検出までには相当な時間がかかり、さらに検出装置も必要となる。また、E L I S A 法は、P C R 法に比べると特異性は低いものとなる。P C R 法は、特異性が高いが検出までに略 3 時間程度の時間がかかり、さらに、遺伝子増幅装置や検出装置などの機材が必要であるという問題点があった。

【発明の概要】

20

【発明が解決しようとする課題】

【0013】

本発明の目的は、免疫測定法により非加熱食品中に含まれる豚生肉をその他の肉類と区別して特異的に認識する検出抗体を調製することにより、非加熱食品中の豚生肉の検出を、非特異的反応を惹起すること無く迅速、高性能、かつ高感度に行なうための最適なイムノクロマトグラフ検出法を提供すること、さらに詳しくは、非加熱食品中に含まれる豚生肉をその他の肉類と区別できる特定タンパク質のイムノグロブリン G を特異的に認識する検出抗体としてポリクローナル抗体を用いる簡便かつ高精度なイムノクロマトグラフ検出法ならびにそのための検査用キットを提供することである。

【課題を解決するための手段】

30

【0014】

本発明は、非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマト検出に係り、検出に用いられる展開液組成や試験キットに用いられる化学物質(生体物質以外)の組成は、従来イムノクロマトグラフ法で多用される試薬である。例えば抽出展開液においては、超純水に非イオン性界面活性剤(Tween 20、Triton-100など)と塩化ナトリウム、さらに防腐剤(アジ化ナトリウム等)を加えたものである。

【0015】

本発明者等は、非加熱食品検出系において使用する抗体を調製するための免疫用抗原としては、豚の血清中から精製される蛋白質であるイムノグロブリン G (以下、「I g G」と略す)を用いるものであり、市販品を用いることも出来る。

40

【0016】

本発明の非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフ検出で使用される検出抗体(生体物質)は、非加熱食品検出系に特に適したものであり、加熱食品中の豚肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフ検出系と異なるのみならず、従来公知の非加熱食品中の豚肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフ検出で使用される検出抗体(生体物質)とも異なっている。その検出抗体を特定したうえで、イムノクロマトグラフ法による非加熱食品中の豚生肉の有無を検査(検知)する方法および検査(検出)用キットの発明を、本発明者等が初めて完成した。

本発明の非加熱食品検出系では、例えば豚生肉中に含まれる特定蛋白質の I g G を特異的に認識するポリクローナル抗体を、検出抗体として好適に用いるものである。

50

【0017】

本発明は、下記の(a)～(i)のイムノクロマトグラフ検出法およびそれに使用する抗体ならびに検出用装置および検出用キットを提供するものである。

(a)本発明の第1の特徴は、非加熱食品中の豚生肉に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識する抗体を、検出抗体とする非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィ検出法にある。

(b)本発明の第2の特徴は、抗体がポリクローナル抗体である前記(a)に記載のイムノクロマトグラフィ検出法にある。

(c)本発明の第3の特徴は、ポリクローナル抗体が豚血清中のイムノグロブリンGをヤギまたはウサギに免疫して得られたものである前記(b)に記載の検出法にある。

(d)本発明の第4の特徴は、検出抗体が、ヤギ抗豚イムノグロブリンG抗体である前記(c)に記載のイムノクロマトグラフィ検出法にある。

【0018】

(e)本発明の第5の特徴は、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィ検出装置にある。

(f)本発明の第6の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィ媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されている前記(e)に記載のイムノクロマトグラフィ検出装置にある。

(g)本発明の第7の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィ媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィ検出用キットにある。

【0019】

(h)本発明の第8の特徴は、ポリクローナル抗体が豚血清中のイムノグロブリンGをヤギ又はウサギに免疫して得られる前記(g)に記載のイムノクロマトグラフィ検出用キットにある。

(i)本発明の第9の特徴は、標識抗体と検出部に固定した抗体が、同一の方法でヤギに免疫して得られ前記(g)に記載のイムノクロマトグラフィ検出用キットにある。

【発明の効果】

【0020】

本発明の非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィ検出法においては、豚生肉中に含まれる特定蛋白質のIgGをヤギ又はウサギ(ただし、ウサギ抗体の場合には、予備操作が必要となる。)に免疫して得られるポリクローナル抗体を検出抗体(生体物質)として使用するため、モノクローナル抗体を用いる場合に比して安価であり、安定に、しかも容易に入手できるので、多くの需要者に、例えば、医療分野において多くの食物アレルギー患者さんに対応する場合や、食文化上、豚肉の忌避行為が前提にある一般消費者に対する食品成分の識別に好適に使用できる。

また、本発明では、ポリクローナル抗体であっても、豚生肉中に含まれる特定蛋白質のIgGをヤギ又はウサギ(ただし、ウサギ抗体の場合には、予備操作が必要となる。)に免疫して得られるポリクローナル抗体を検出抗体(生体物質)として使用するため、大豆といった植物由来蛋白質のみならず、牛、鶏、羊といった豚以外の動物由来蛋白質に対する交差反応が完無であり、感度の低下がなく、正確かつ容易に非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィ法による検出結果の判定が可能である。

【0021】

本発明の豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフ検出法は、非加熱食品のみならず、

10

20

30

40

50

蛋白質の変性を引き起こさないような加工処理（加圧、成形、乾燥等）を施した健康食品、医薬品、家畜飼料、ペットフードなどに含有される豚生肉由来蛋白質の検出においても、簡便かつ安価に活用することが可能である。そのため、本発明は、豚生肉に対してアレルギー反応を引き起こす患者さんや、嗜好上または食文化上、豚肉を食さないなどの理由に依拠した、いわゆる食生活に依存する社会通念上の問題に対処できるというような、いわゆる安価に、簡易に、正確に食肉に関する諸問題の解決に貢献できる。

本発明のイムノクロマトグラフ検出用キットは、PCR法やELISA法に比べて、簡便な装置であるから、操作が容易であり、かつ迅速に、正確に非加熱食品中の豚生肉由来蛋白質の検出が可能であるばかりでなく、器具が非常に安価に供給できるため、一般消費者のニーズに適切に普及および貢献できるという優れた利点を有する。

【図面の簡単な説明】

【0022】

【図1】豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キットの使用方法を示す概略図。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、免疫測定法により非加熱食品中に含まれる豚生肉をその他の肉類と区別して特異的に認識する手法として、豚生肉に含まれる蛋白質である、特にイムノグロブリンG（以下、「IgG」ともいう）に着目し、イムノクロマトグラフィー法においてそれを認識する抗体として有効に機能する、IgGのイムノクロマトグラフィー検出用ポリクローナル抗体を知見したものである。このIgGの検出用抗体としては、酵素標識した標識抗体（コンジュゲート）がCEIA法において有効であることは従来から知られているが、その識別の性能、感度、時間などにおいて満足できるものではなかった。

また、IgGの検出用抗体として、免疫能力が精緻で、抗体産生能力においても勝っている鳥類の典型的なニワトリ由来モノ（もしくはポリ）クローナル抗体、その他マウス由来モノ（もしくはポリ）クローナル抗体、ウマ由来モノ（もしくはポリ）クローナル抗体、ヤギ由来モノ（もしくはポリ）クローナル抗体或いはウサギ由来モノ（もしくはポリ）クローナル抗体などの特異性を有するものがIgGの検出用抗体として種々考えられる。しかし、それらのモノ（もしくはポリ）クローナル抗体のうち、鋭意検討した結果、IgGをヤギまたはウサギに免疫して得られるポリクローナル抗体（ウサギ由来ポリクローナル抗体にあっては、抗原結合性フラグメントにして使用する。）が、最も簡便かつ性能よく、しかも安価に供給できる検出用抗体であるということを知見したものである。

【0024】

さらに、このヤギ由来ポリクローナル抗体、およびウサギ由来ポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントは、非加熱食品中の豚生肉のIgGの検出を、非特異的の反応を惹起すること無く迅速、高性能、かつ高感度に行なうことができるために非常に有効である。

そして、このヤギ由来ポリクローナル抗体、およびウサギ由来ポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントの識別性能は、イムノクロマトグラフィー検出法に最適な性能を備えている。

さらに詳しい最良の実施態様は、非加熱食品中に含まれる豚生肉をその他の肉類と区別できる特定タンパク質のIgGを特異的に認識する検出抗体としてヤギ由来ポリクローナル抗体、またはウサギ由来ポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントからなるポリクローナル抗体類を用いる簡便かつ高精度なイムノクロマトグラフィー検出法ならびにそのための検査用キットを提供することができる。

ヤギ由来ポリクローナル抗体は、直接に抗体として使用できるが、ウサギ由来ポリクローナル抗体の場合には、少なくとも標識成分側の検出用抗体としては、酵素により脂溶性の大きいFc領域を切断処理して抗原結合性フラグメントにすれば、識別用抗体として直接使用することができる。

【0025】

10

20

30

40

50

本発明の非加熱食品中の豚生肉のIgGの検出において、ヤギ由来ポリクローナル抗体、またはウサギ由来ポリクローナル抗体を試験キットに使用した実施態様を説明をすれば、以下のようになる。

【0026】

本発明に用いる展開液組成や試験キットに用いられる化学物質（生体物質以外）の組成は、従来イムノクロマトグラフ法で多用される試薬である。このようなイムノクロマトグラフィ用試薬には、非イオン性界面活性剤、塩、防腐剤、場合によっては緩衝剤、キレート剤といった各種の化学物質が種々の機能/役割の下に用いることができる。

【0027】

本発明のイムノクロマトグラフィ用試薬組成物中に使用できる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、ポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（商品名「Tween」シリーズ）、ポリオキシエチレンp-t-オクチルフェニルエーテル（商品名「Triton」シリーズ）、ポリオキシエチレンp-t-ノニルフェニルエーテル（商品名「Triton N」シリーズ）、アルキルポリグルコシド、脂肪酸ジエタノールアミド、アルキルモノグリセリルエーテル等を挙げることができる。非イオン性界面活性剤は、単独でも2種以上を混合しても用いることができる。

10

【0028】

本発明のイムノクロマトグラフィ用試薬組成物中に使用する非イオン性界面活性剤の含有量としては、0.01~10重量%の範囲であり、好ましくは0.05~5重量%の範囲でイムノクロマトグラフィ用試薬組成物に含有させることができる。0.01重量%未満では、例えば0.005重量%では正確な判定が行えない。0.05重量%未満では、非特異的反応を抑制できず正確な判定がやや難しくなる傾向を示す。10重量%以上、例えば12重量%、18重量%となると、必要以上の濃度となり、非特異的反応の抑制には好ましい影響を与えることがないばかりか、技術的に無意味になり、経済的でなく無駄となる。

20

その他の非イオン性界面活性剤、イオン性界面活性剤などを任意に配合、併用して使用することも可能である。

【0029】

本発明の抽出展開液などのイムノクロマトグラフィ用試薬組成物中に使用される塩としては、代表的なものとしては塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、塩化マグネシウム等々が挙げられる。好ましくは塩化ナトリウムである。

30

本発明の抽出展開液などのイムノクロマトグラフィ用試薬組成物中に使用される塩の濃度としては、0.02M~2Mの範囲であり、0.05~1Mの範囲が好ましく、0.1~0.5Mの範囲がより好ましい。濃度が0.02Mより低くなると、例えば0.002Mと少なくなるとタンパク質の抽出作用が不十分になる。2M以上では、例えば、5M、10Mと多くなれば、技術的に無意味な量であり、必要以上の濃度となり経済的でなく無駄となる。

本発明のイムノクロマトグラフィ用試薬組成物中に使用される塩としては、1種のみならず2種以上配合して使用することもできる。

40

【0030】

本発明の抽出展開液などのイムノクロマトグラフィ用試薬組成物中に必要に応じて使用される緩衝剤としては、試料の添加や試料の蒸発や希釈による濃度の変化、外部からの多少の異物の混入によっても致命的な影響を生じない作用（緩衝作用）を持つものであれば特に制限はない。

本発明において、緩衝剤としては、酢酸緩衝液（酢酸+酢酸ナトリウム）、リン酸緩衝液（リン酸+リン酸ナトリウム）、クエン酸緩衝液（クエン酸+クエン酸ナトリウム）、ホウ酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン+塩酸）、TE緩衝液（トリス+エチレンジアミン四酢酸）、TAE緩衝液（トリス+酢酸+エチレンジアミン四酢酸）、TBE緩衝液（トリス+ホウ酸+エチレンジアミン四酢酸）又は

50

HEPES緩衝液(2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸)等の一種または少なくとも二種の併用のものが挙げられる。好ましくは、酢酸緩衝液、リン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液などであり、より好ましくは、トリス塩酸緩衝液である。

【0031】

本発明のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物中に必要に応じて使用される緩衝剤の濃度としては、0.01~250mMの範囲であり、10~200mMの範囲が好ましく、30~180mMの範囲がより好ましい。濃度が0.01mMより低くなること、例えば0.008mMと少なくなると緩衝作用が不十分になる。250mM以上では、例えば、260mM、280mMと多くなれば、技術的に無意味な量であり、必要以上の濃度となり経済的でなく無駄となる。

10

本発明のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物中に必要に応じて使用される緩衝剤としては、2種以上配合して使用することもできる。

【0032】

本発明のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物中に必要に応じて使用されるキレート剤としては、複数の配位座を持つ配位子となり得る作用をもつであれば使用可能である。

本発明において、キレート剤としては、エチレンジアミン、ジピリジン、エチレンジアミン四酢酸(以下、「EDTA」という)、EDTA・2Na、EDTA・3Na、EDTA・4Na、EDTA誘導体(例えば、EDTA・2NH₄、EDTA・3K、EDTA・特殊アミン塩等)、EDTA金属塩(例えば、EDTA・Ca・2Na等)、ヒドロキシエチルエチレンジアミン三酢酸(HEDETA)系、ジヒドロキシエチルエチレンジアミン二酢酸(DHEDDA)系、1,3-プロパンジアミン四酢酸(1,3PDTA)系、ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)系、トリエチレントトラミン六酢酸(TTHA)系、ニトリロ三酢酸(NTA)系、グルコン酸系、ヒドロキシエチルイミノ二酢酸(HIMDA)系、L-アスパラギン酸-N、N-二酢酸(ASDA)系、アミノトリメチレンホスホン酸(NTMP)系、ヒドロキシエタンホスホン酸(HEDP)系、3-ヒドロキシ-2,2'-イミノジコハク酸4ナトリウム、フェナントロリン、ポルフィリン、クラウンエーテル等が挙げられる。

20

【0033】

本発明のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物中に必要に応じて含有させるキレート剤の濃度としては、0.01~10mMの範囲であり、0.1~5mMの範囲が好ましく、0.5~2mMの範囲がより好ましい。0.01mM未満では、例えば、0.008mMと少なくなれば、非特異的反応を抑制できず正確な判定が行なえない。10mM以上、例えば、12mM、18mMと多くなれば、必要以上の濃度となり経済的でなく無駄となる。

30

【0034】

また、本発明のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物には、生物学的親和性に基づく副反応を抑制したり、非特異的反応を抑制することが公知の添加剤、例えば、抗原抗体反応の促進あるいは非特異的反応を抑制するための蛋白質(例えば、牛血清アルブミン、カゼイン、ゼラチン等)、高分子化合物(例えば、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、デキストラン等)、イオン性界面活性剤又はポリアニオン(例えば、デキストラン硫酸、ヘパリン、ポリスチレンスルホン酸、コンドロイチン硫酸等)、防腐剤あるいは抗菌剤等々の1種もしくは2種以上を添加して使用することも可能かつ有効であって、何ら妨げるものではない。また、これらの抗原抗体反応の促進あるいは非特異的反応を抑制するための蛋白質、高分子化合物、イオン性界面活性剤又はポリアニオン、防腐剤あるいは抗菌剤等々の1種もしくは2種以上を、固定相を構成するクロマトグラフィー媒体上の、移動相の移動経路上に保持させておくことも可能かつ有効であって、何ら妨げるものではない。

40

【0035】

本発明のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物の使用方法としては、イムノクロマト

50

グラフィー装置におけるサンプルパッド（試料添加部分）中へ塗布又は含浸させた後、乾燥させる方法により、サンプルパッド中へ保持させる態様とすることができる。本発明のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物をイムノクロマトグラフィー媒体上に保持させる他の態様としては、試料添加部位の端部と吸収部位との間の任意の場所に、添加剤保持部を設けて、そこに保持させる態様とすることができる。例えば、試料添加部分の近辺、標識物質保持部位やその近辺とすることもできる。なかでも試料添加部分および/または標識物質保持部のみに保持させる態様が好ましい。

【0036】

本発明のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物の使用方法としては、上記の使用態様に限定されるものではなく、抽出展開液として用いることもできるし、試料の希釈液としても使用することができる。例えば、本発明の抽出展開液においては、超純水あるいは緩衝液に非イオン性界面活性剤（Tween 20、Triton-100など）と塩化ナトリウム、防腐剤（アジ化ナトリウム）などを加えたものを使用しているが、さらに、生物学的親和性に基づく副反応を抑制したり、非特異的反応を抑制することが公知の上記添加剤（例えば、牛血清アルブミン、PVP等々）を添加して実施することもできる。抽出展開液としては、通常、溶媒として超純水を用い、これに非イオン界面活性剤、さらに蛋白質や高分子化合物、必要に応じて更に緩衝液やキレート剤などを加えることもできる。加える順序は特に特定されず、同時に加えても差支えない。抽出展開液として用いる場合には、検出する試料が固体状であるか、ペースト状であるかといった状態に応じて、適宜抽出展開液の使用態様を最適にするようにできる。検出する試料と抽出展開液を予め混合したものを、サンプルパッド（試料添加部）上に供給・滴下して展開させることもできるし、先に試料をサンプルパッド（試料添加部）上に供給・滴下して後、展開液をサンプルパッド（試料添加部）上に供給・滴下して展開させてもよい。試料希釈液として使用する場合には、試料を希釈した希釈液は、そのまま展開液としてサンプルパッド（試料添加部）上に供給・滴下しても良いし、試料を希釈した希釈液中にサンプルパッド（試料添加部）部分を浸すことにより展開させてもよい。

【0037】

本発明の検出対象物を含む試料（検体）としては、例えば、主として非加熱食品や乾燥または殺菌処理といった蛋白質が変性を受けないような温度で処理された食品、健康食品、ペットフード等が、代表的なものとして挙げられるが、これに限らず、家畜飼料や医薬品といったものでも試料（検体）として適用できる。

【0038】

本発明においては、豚血清中に含まれるIgG（市販品）を、免疫用抗原としてウサギもしくはヤギに免疫することにより得られる前記IgGを特異的に認識するポリクローナル抗体を検出抗体として好適に用いる。

【0039】

本発明のポリクローナル抗体の調製方法は、以下のとおりである。

【0040】

[ポリクローナル抗体の調製]

豚血清中に含まれるIgG（市販品）を用いて、常法に従ってウサギに免疫して、抗血清を得る。抗血清からのウサギ由来抗豚IgG抗体の精製は、50%飽和硫酸アンモニウムで塩析後、DEAEカラム（陰イオン交換カラム）を用いて精製回収する手法により得る。

【0041】

しかし、該ウサギ由来抗豚IgG抗体は、このままの状態ではイムノクロマトグラフ検出法やELISA検出法において検出抗体として用いると、豚生肉に顕著に反応するが、標準緩衝液（バックグラウンド）にも反応してしまっただけで検出抗体として使用できないものであった。そのため、牛肉、ラム肉、鶏肉については実施しなかった。この試験結果を「表1」として示す。

なお、表中の「浜ホト」とは、「浜松ホトニクスデンシトメーター」の略語である。

10

20

30

40

50

【0042】

【表1】

| ① ウサギ抗体使用 | | | |
|-----------|-------|------|-----|
| | 浜ホト | 目視判定 | SN比 |
| Buffer | 42.7 | ++ | |
| 豚肉 | 262.5 | ++++ | 6.1 |
| 牛肉 | - | | |
| ラム | - | | |
| 鶏肉 | - | | |

10

【0043】

そこで、本発明者等は、ウサギ由来抗豚IgG抗体の脂溶性が大きいFc領域を切断処理、例えば、酵素（パパイン、プロテアーゼ等々）により切断処理するか、もしくは切断処理後、還元剤（ジチオスレイトール等）で処理後、精製分離することによりウサギ由来抗豚IgG抗体の抗原結合性フラグメントであるFab化ウサギ抗体、Fab'化ウサギ抗体またはFab'2化ウサギ抗体を収得する。該Fab'2化ウサギ抗体を標識成分側（例えば、金コロイド側）の検出用抗体とし、ウサギ由来抗豚IgG抗体を反応部位側の検出用抗体として用いてイムノクロマトグラフ法により、非加熱食品中の肉類の検出を実施すると、標準緩衝液（バックグラウンド）に対する非特異的反応を抑制でき、豚生肉のイムノクロマトグラフ検出の目視判定が高性能で可能となる。この試験結果を「表2」として示す。

20

【0044】

【表2】

| ② Fab'2化ウサギ抗体使用(金コロイド側) | | | |
|-------------------------|-------|------|------|
| | 浜ホト | 目視判定 | SN比 |
| Buffer | 8.9 | - | |
| 豚肉 | 152.9 | +++ | 17.2 |
| 牛肉 | 3.5 | - | |
| ラム | 4.7 | - | |
| 鶏肉 | 4.9 | - | |

30

【0045】

同様にして、豚血清中に含まれるIgG（市販品）を抗原に用いて、常法に従いウサギに代えてヤギに免疫して、抗血清を得る。抗血清からのヤギ由来抗豚IgG抗体の精製は、上記ウサギの場合と同様に行なって、ヤギ由来抗豚IgG抗体を収得する。

40

【0046】

このようにして得たヤギ由来抗豚IgG抗体を使用して、非加熱の市販の4種の肉（豚、牛、羊、鶏）をイムノクロマトグラフ検出すると、標準緩衝液（バックグラウンド）に対する非特異的反応は惹起せず、豚IgGタンパクを強く認識するバンドが検出され、目視判定の結果は良好であった。豚以外の多種の肉に比べて、豚特異性が非常に高い抗体が得られた。ヤギ由来抗豚IgG抗体を検出用抗体として使用したイムノクロマトグラフ検出法では、市販の非加熱の4種の肉（豚、牛、羊、鶏）について検出を実施すると、非加熱食品中の豚生肉の検出感度は高いため、脂溶性が大きいFc領域を切断処理しなくても、ウサギ由来抗豚IgG抗体に比して非常に高いものであった。この試験結果を「表3」

50

として示す。

【0047】

【表3】

| ③ ヤギ抗体使用 | | | |
|----------|-------|------|-------|
| | 浜ホト | 目視判定 | SN比 |
| Buffer | 3.3 | - | |
| 豚肉 | 361.0 | ++++ | 109.4 |
| 牛肉 | 1.1 | - | |
| ラム | 4.1 | - | |
| 鶏肉 | 2.4 | - | |

*浜ホト:浜松ホトニクスデンシトメーター

【0048】

本発明におけるイムノクロマトグラフィー装置もしくは検出キットの構成について以下に説明する。

試料添加部は、試料が迅速に吸収されるが、保持力は弱く、速やかに反応部へと試料が移動していくような性質の多孔質シートで構成されている。多孔質シートとしては、セルローズ濾紙、ガラス濾紙、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルローズ、ナイロン、綿布等が挙げられる。本発明の多孔質シートとしては、ガラス濾紙が好ましく用いられる。本発明においては、非特異的反応を抑制するために、サンプルパッド（試料添加部）中に、緩衝液、非イオン界面活性剤、および蛋白質などの添加剤、必要に応じてキレート剤、を含むイムノクロマトグラフィー用試薬組成物を予め含浸させて後、乾燥させる等の手段により保持させる態様とすることができる。

【0049】

標識物質保持部には、標識成分によって試薬成分を標識した標識試薬を保持させてなる。標識成分としては、金コロイド粒子、銀コロイド粒子等の金属コロイド粒子、各種のモノマーを（共）重合させて合成した合成高分子を染色して得られる着色ラテックス粒子、酵素、蛍光化合物、その他を用いることができる。試薬成分としては、分析物を認識する能力を有する粒子又は分子であり、ポリクローナル抗体若しくはそのフラグメントである（第二試薬）。

【0050】

クロマトグラフィー媒体は、膜担体上に検出部（もしくは「反応部」ともいう）を作成したものである。膜担体としては、毛細管現象により試料検体を吸収し移動させることができるものであれば、特に限定されるものではない。例えば、ニトロセルローズ、酢酸セルローズ、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラス繊維、ポリオレフィン、セルローズ、これらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される。検出部には、ポリクローナル抗体若しくはそのフラグメント（第一試薬）が、ニトロセルローズのシート上に担持固定されている。

【0051】

吸収部は、過剰の試料を迅速に吸収する能力を有する材料、ガラス濾紙等が用いられる。

【0052】

パッキングシートは、基材である。片面に粘着剤を塗布したり、粘着テープを貼り付けることにより、片面が粘着性を有し、該粘着面上に試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体（検出部が設けられている）、および吸収部の一部または全部が密着して設けられている。パッキングシートは、粘着剤によって試料液に対して不透過性、非透

10

20

30

40

50

湿性となるようなものであれば、基材としては、特に限定されない。

【0053】

検出部（もしくは「反応部」ともいう）に用いる試薬成分（第一試薬）および標識物質保持部に用いる試薬成分（第二試薬）は、その両方がポリクローナル抗体もしくはそのフラグメントであり、これらの2種類の抗体は、同一の方法でウサギ又はヤギに免疫して得られる抗体を使用する。ただし、ウサギ由来抗豚IgG抗体の場合は、酵素切断処理等して得られる抗原結合性フラグメントを使用する。こうすることにより、特異性を保った上で製造コストや抗体の安定供給を図ることが可能である。

【0054】

ポリクローナル抗体若しくはそのフラグメントは、基本的に公知の方法により調製することができる。ポリクローナル抗体は、常套手法により、抗原（豚血清中のIgG）を産生動物（ウサギ、ヤギ）に免疫して得た抗血清中から目的とする抗体を分離することにより取得する。例えば、ベルガーらの文献（J. ASSOC. OFF. ANAL. CHEM. VOL. 71, NO. 2, 1988）を参照。

10

【0055】

判定の原理を概説すると、

1. 試料（例えば、肉類を含む非加熱食品の抽出展開液）を、サンプルパッド上に、所定量（通常、0.1～2ml）滴下する。試料が滴下されると、サンプルパッド中を、試料が移動を始める。サンプルパッド中に特定のイムノクロマトグラフィー用試薬組成物が含浸されたりしている場合には、イムノクロマトグラフィー用試薬組成物は試料の水分に溶解し、試料と共に移動を始める。

20

2. 試料（例えば、肉類を含む非加熱食品の抽出展開液）又はイムノクロマトグラフィー用試薬組成物を溶解した試料は、まず標識物質保持部へと移動する。ここを試料が通過する際、標識物質保持部に保持されていた標識試薬（第二試薬）が試料の水分に溶解し、試料と共に移動する。

3. ついで、試料の水分に溶解した標識試薬は、クロマトグラフィー媒体上の検出部を通過する。ここでは、抗原・抗体の特異的結合反応により、試料中に豚肉が含まれている場合には、検出部に保持、即ち、担持固定されている抗体と標識試薬とによってサンドイッチ状に挟まれるように特異的に反応結合して、検出部が着色する。試料中に豚肉が含まれていない場合には、試料の水分に溶解した標識試薬は、クロマトグラフィー媒体上の検出部を通過しても特異的結合反応が起こらないので、検出部が着色しない。

30

4. 最後に、試料の水分は、吸収部へと移動する。

このように、試料中の豚肉の有無を正確に判定することができる。

【実施例】

【0056】

以下に、本発明で使用するイムノクロマトグラフィー装置を詳細に説明するが、あくまでも一例として示すものであって、本発明はこれに限定されるものではない。

【0057】

1. クロマトグラフ媒体上への反応部位の作製

25×2.5cmのニトロセルロース膜（ミリポア社製：HF180）に、抗体塗布機（BioDot社製）を用いて5重量%のスクロースおよび5重量%のイソプロピルアルコールを含む炭酸緩衝液（pH7.5）で3.25mg/mLの濃度になるように希釈したヤギ由来抗豚IgG抗体を塗布し、42℃で60分間乾燥させた後、室温で一晩乾燥させ、クロマトグラフ媒体上の反応部位を作製した。

40

【0058】

2. 標識物質溶液の作製

金コロイド懸濁液（田中貴金属工業（株）製：平均粒子径60nm）0.5mLにHEPES緩衝液（pH7.5）で0.05mg/mLの濃度になるように希釈したヤギ由来抗豚IgG抗体を0.1mL加え、室温で10分間静置した。次いで、CE510（JSRCorporation）を0.1mL加え、リン酸カリウム溶液（pH7.5）に溶

50

解した 1% ポリエチレングリコールを 0.05 mL 加えて十分攪拌した後、室温で 10 分間静置した。8000 × g で 15 分間遠心分離を行った。上清を除去した後、1 重量% の牛血清アルブミンを含む緩衝液 (pH 7.4) 0.1 mL を加え、標識物質溶液とした。

【0059】

3. クロマトグラフ媒体の作製

上記作製した標識物質溶液をガラスファイバー製パッドに均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、検出試薬保持部材とした。次いで、バックグシートから成る基材に、上記調製したクロマトグラフ媒体、検出試薬保持部材、試料を添加する部分に用いるサンプルパッド、及び展開した試料、不溶性担体を吸収するための吸収パッドを貼り合わせた。最後にラミネートシールを貼り付けて裁断機で幅が 5 mm となるように裁断し、クロマトグラフ媒体とした。

10

【0060】

4. 抽出展開液の調製

超純水に界面活性剤を 0.5 重量%、塩化ナトリウムを 0.2 M となるように加え、さらに防腐剤としてアジ化ナトリウムを 0.1% となるように加えて混和した。

【0061】

5. 試料の作製

上記した抽出展開液 0.5 mL に対して、豚肉あるいは豚以外の動物種由来の肉 0.1 ~ 0.2 g を加えて手で 30 秒間振とうした

【0062】

6. 測定

上記作製したクロマトグラフ媒体を用いて、以下の方法で試料中の豚肉の存在の有無を測定した。上記作製した豚肉が含まれる試料を陽性検体、また上記作製した豚以外の動物種由来の肉が含まれる試料を陰性検体とし、クロマトグラフ媒体の先端を各試料溶液に浸した。金コロイドがガラスファイバー製パッドから流出するのを確認した後、浸していたクロマト媒体を溶液から取り出して水平な台の上に置き、10 ~ 15 分後に目視判定した。

20

【0063】

上記のように作製したクロマトグラフ装置 (検査キット) を用いて、試験食品中の豚肉の有無の検査法を図 1 に示す。検査法は、以下の手順 1 ~ 5 により行なう。

1. 試験食品 0.1 ~ 0.2 g 程度を上記した抽出展開液 0.5 mL 入りチューブに添加する。

30

2. チューブの蓋をしっかりと閉め、手でチューブを約 30 秒程度振とうする。

3. 蓋を開け、検査キットの試料添加部先端を溶液中に浸し、赤色溶液が検査キット上に展開されることを確認する。

4. 赤色溶液の上昇を確認後、検査キットを取り出し、水平な場所に置く。

5. 10 ~ 15 分後にラインの有無を確認する。

【0064】

以下に、本発明の試験例を説明するが、あくまでも一実施態様にすぎないため、これらの試験例に限定されるものではない。

試料滴下後 10 分で目視判定を行い、判定部位におけるテストラインの赤い線を確認できるものを「+」、強く (濃い色で) よりはっきりと確認できるものを「++」、極めて強く確認されるものを「+++」、赤い線を確認できないものを「-」、弱く (薄い色で) 確認されるものを (±) とした。

40

【0065】

[試験例 a]

非加熱試験食品 (肉) として牛肉中に含まれている豚肉の割合 (豚肉 / 牛肉) が、0 重量%、0.01 重量%、0.025 重量%、1 重量%、5 重量% の各場合について、繰り返し 3 回の評価を行なった結果を「表 4」に示す。

【0066】

表 4 中の製造 Lot No. 1 ~ 3 においては、豚血清中の IgG を、ヤギに免疫して得

50

られるヤギ由来抗豚 I g G 抗体を検出試薬として用いて各 3 回の評価を行なったものである。

その結果は、非特異反応（偽陽性）を伴わず、牛肉中に含まれる 1 重量%以上の豚肉を検出できた。この試験例において、製造ロット間差及び繰り返し試験にばらつきは生じなかった。

【 0 0 6 7 】

【表 4】

非加熱試験食品中の豚肉検出

| 製造Lot No. | N = 3 | 重量% (豚肉/牛肉) | | | | |
|-----------|-------|-------------|-------|--------|-----|-----|
| | | 0 | 0.01% | 0.025% | 1% | 5% |
| 1 | 1 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 2 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 3 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| 2 | 1 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 2 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 3 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| 3 | 1 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 2 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 3 | - | + | ++ | +++ | +++ |

10

20

【 0 0 6 8 】

[試験例 b]

非加熱試験食品（肉）として鶏肉中に含まれている豚肉の割合（豚肉/鶏肉）が、0 重量%、0.005 重量%、0.025 重量%、1 重量%、5 重量%の各場合について、繰り返し 3 回の評価を行なった結果を表 5 に示す。

【 0 0 6 9 】

表 5 中の製造 Lot No. 1 ~ 3 においては、豚血清中の I g G を、ヤギに免疫して得られるヤギ由来抗豚 I g G 抗体を検出試薬として用いて、各 3 回評価を行なったものである。

30

その結果は、非特異反応（偽陽性）を伴わず、鶏肉中に含まれる 1 重量%以上の豚肉を検出できた。この試験例において、製造ロット間差及び繰り返し試験にばらつきは生じなかった。

【 0 0 7 0 】

【表 5】

| 製造Lot No. | N = 3 | 重量% (豚肉/鶏肉) | | | | |
|-----------|-------|-------------|--------|--------|-----|-----|
| | | 0 | 0.005% | 0.025% | 1% | 5% |
| 1 | 1 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 2 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 3 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| 2 | 1 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 2 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 3 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| 3 | 1 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 2 | - | + | ++ | +++ | +++ |
| | 3 | - | + | ++ | +++ | +++ |

40

【 0 0 7 1 】

[試験例 c]

50

本発明の検出キットを用いて、豚肉、牛肉、鶏肉、ラム肉、大豆の各非加熱単一食品（100%）からの抽出液を検出試料としたものについて、各3回その評価を測定した。結果を表6に示す。

【0072】

表6中の製造Lot No. 1～3においては、豚血清中のIgGを、ヤギに免疫して得られるヤギ由来抗豚IgG抗体を検出試薬として用いて、各3回繰り返し評価を行なったものである。

その結果は、牛肉、鶏肉、ラム肉、大豆から抽出されるタンパク質は検出されず、豚肉由来タンパク質のみが検出された。この結果から、豚肉の特異性が明らかとなった。この試験例においても、製造ロット間差及び繰り返し試験にばらつきは生じなかった。

【0073】

【表6】

| 製造Lot No. | N = 3 | 豚肉 | 牛肉 | 鶏肉 | ラム肉 | 大豆 |
|-----------|-------|-----|----|----|-----|----|
| 1 | 1 | +++ | - | - | - | - |
| | 2 | +++ | - | - | - | - |
| | 3 | +++ | - | - | - | - |
| 2 | 1 | +++ | - | - | - | - |
| | 2 | +++ | - | - | - | - |
| | 3 | +++ | - | - | - | - |
| 3 | 1 | +++ | - | - | - | - |
| | 2 | +++ | - | - | - | - |
| | 3 | +++ | - | - | - | - |

【産業上の利用可能性】

【0074】

本発明の検出キットは、イムノクロマトグラフィー法に基づくものであるため、本発明の抗体を不溶性担体に固定して使用すれば、免疫学的測定法を適用する分野において広く使用できる。簡便、迅速かつ安価に、特異的に非加熱食品中の豚生肉の有無を検出できるので、豚肉に対してアレルギー反応を引き起こす患者さんや、嗜好上または生活習慣上、さらには食文化上、豚肉を食さないなどの理由に依拠した問題の解決に広く使用できる。さらに、本発明のイムノクロマトグラフィー検出法は、PCR法やELISA法に比べて、操作上、経済上において優位な産業上の利用可能性を有する。

【符号の説明】

【0075】

- 1 試験食品
- 2 抽出展開液
- 3 チューブ
- 4 蓋
- 5 検出チップ

【先行技術文献】

【特許文献】

【0076】

- 【特許文献1】特開2006-317226
 【特許文献2】特開2005-164583
 【特許文献3】特開2003-155297

10

20

30

40

50

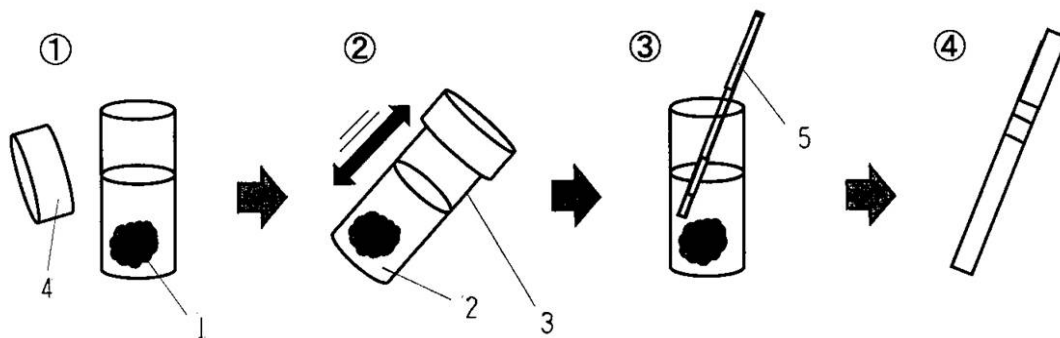
【特許文献4】米国特許第6288215

【非特許文献】

【0077】

【非特許文献1】Biotechnology Techniques, Vol. 11, No. 7, July 1997, pp. 533 - 535

【図1】



【手続補正書】

【提出日】平成22年6月17日(2010.6.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

豚イムノグロブリンGをヤギに免疫して得られる、豚生肉に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を、検出抗体とする豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項2】

検出抗体が、ヤギ抗豚イムノグロブリンG抗体である請求項1に記載のイムノクロマト

グラフィー検出法。

【請求項 3】

豚イムノグロブリン G をウサギに免疫して得られる、豚生肉に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントを、検出抗体とする豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項 4】

豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 5】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されている請求項 4 に記載のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 6】

豚イムノグロブリン G をウサギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントを標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 7】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【請求項 8】

標識抗体と検出部に固定した抗体が、同一の方法でヤギに免疫して得られる請求項 7 に記載のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【請求項 9】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚イムノグロブリン G をウサギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントを標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

本発明は、下記の (a) ~ (i) のイムノクロマトグラフ検出法およびそれに使用する抗体ならびに検出用装置および検出用キットを提供するものである。

(a) 本発明の第 1 の特徴は、豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を、検出抗体とする豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法にある。

(b) 本発明の第 2 の特徴は、検出抗体が、ヤギ抗豚イムノグロブリン G 抗体である前記

(a) に記載のイムノクロマトグラフィー検出法にある。

(c) 本発明の第 3 の特徴は、豚イムノグロブリン G をウサギに免疫して得られる、豚生肉に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントを、検出抗体とする豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法にある。

(d) 本発明の第 4 の特徴は、豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置にある。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

(e) 本発明の第 5 の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されている前記 (d) に記載のイムノクロマトグラフィー検出装置にある。

(f) 本発明の第 6 の特徴は、豚イムノグロブリン G をウサギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントを標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置にある。

(g) 本発明の第 7 の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キットにある。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

(h) 本発明の第 8 の特徴は、標識抗体と検出部に固定した抗体が、同一の方法でヤギに免疫して得られる前記 (g) に記載のイムノクロマトグラフィー検出用キットにある。

(i) 本発明の第 9 の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚イムノグロブリン G をウサギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体の抗原結合性フラグメントを標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キットにある。

【手続補正書】

【提出日】平成22年11月11日(2010.11.11)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を、検出抗体とする豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項 2】

検出抗体が、ヤギ抗豚イムノグロブリン G 抗体である請求項 1 に記載のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項 3】

豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 4】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されている請求項 3 に記載のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 5】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【請求項 6】

標識抗体と検出部に固定した抗体が、同一の方法でヤギに免疫して得られる請求項 5 に記載のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

本発明は、下記の (a) ~ (f) のイムノクロマトグラフ検出法およびそれに使用する抗体ならびに検出用装置および検出用キットを提供するものである。

(a) 本発明の第 1 の特徴は、豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を、検出抗体とする豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法にある。

(b) 本発明の第 2 の特徴は、検出抗体が、ヤギ抗豚イムノグロブリン G 抗体である前記 (a) に記載のイムノクロマトグラフィー検出法にある。

(c) 本発明の第 3 の特徴は、豚イムノグロブリン G をヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリン G を特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置にある。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

(d) 本発明の第4の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されている前記(c)に記載のイムノクロマトグラフィー検出装置にある。

(e) 本発明の第5の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚イムノグロブリンGをヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キットにある。

【手続補正 4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

(f) 本発明の第6の特徴は、標識抗体と検出部に固定した抗体が、同一の方法でヤギに免疫して得られる前記(e)に記載のイムノクロマトグラフィー検出用キットにある。

【手続補正書】

【提出日】平成23年1月17日(2011.1.17)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

豚イムノグロブリンGをヤギに免疫して得られる、豚生肉に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を、検出抗体とする豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法。

【請求項 2】

豚イムノグロブリンGをヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 3】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されている請求項2に記載のイムノクロマトグラフィー検出装置。

【請求項 4】

試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚イムノグロブリンGをヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標

識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【請求項5】

標識抗体と検出部に固定した抗体が、同一の方法でヤギに免疫して得られる請求項4に記載のイムノクロマトグラフィー検出用キット。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0017

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0017】

本発明は、下記の(a)～(e)のイムノクロマトグラフ検出法およびそれに使用する抗体ならびに検出用装置および検出用キットを提供するものである。

(a)本発明の第1の特徴は、豚イムノグロブリンGをヤギに免疫して得られる、豚生肉に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を、検出抗体とする豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出法にある。

(b)本発明の第2の特徴は、豚イムノグロブリンGをヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出装置にある。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0018

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0018】

(c)本発明の第3の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されている前記(b)に記載のイムノクロマトグラフィー検出装置にある。

(d)本発明の第4の特徴は、試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体、検出部および吸収部から実質的に構成されており、且つ豚イムノグロブリンGをヤギに免疫して得られる、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を標識物質により標識した標識抗体を保持させた標識物質保持部と、豚生肉中に含まれるイムノグロブリンGを特異的に認識するポリクローナル抗体を固定した検出部を備えた豚生肉由来蛋白質のイムノクロマトグラフィー検出用キットにある。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0019

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0019】

(e)本発明の第5の特徴は、標識抗体と検出部に固定した抗体が、同一の方法でヤギに免疫して得られる前記(d)に記載のイムノクロマトグラフィー検出用キットにある。

フロントページの続き

(72)発明者 芝井 勇亮

神奈川県平塚市新町2番73号
センター内

田中貴金属工業株式会社技術開発

(72)発明者 岩本 久彦

神奈川県平塚市新町2番73号
センター内

田中貴金属工業株式会社技術開発

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 生猪肉检测方法及其检测试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | JP2011174836A | 公开(公告)日 | 2011-09-08 |
| 申请号 | JP2010039631 | 申请日 | 2010-02-25 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 田中贵金属工业股份有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 田中贵金属工业株式会社 | | |
| [标]发明人 | 榊原雄広 望月一芳 芝井勇亮 岩本久彦 | | |
| 发明人 | 榊原 雄広 望月 一芳 芝井 勇亮 岩本 久彦 | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/543 G01N33/12 | | |
| CPC分类号 | G01N33/6854 C07K16/4241 G01N33/12 G01N2333/70503 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.N G01N33/543.521 G01N33/543.501.A G01N33/12 | | |
| 其他公开文献 | JP4686639B1 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：制备检测抗体，最适合通过免疫测定特异性地对未加热食品中的生猪肉进行高性能和高灵敏度检测，而不会引起非特异性反应；并且使用检测抗体和用于该方法的检查试剂盒提供简单，准确的检测方法。ZSOLUTION：用于检测来自未加热食品中的生猪肉的蛋白质的免疫层析检测方法，使用特异性识别未加热食品中的生猪肉中含有的免疫球蛋白G的抗体作为检测抗体。还提供了用于实施检测方法的免疫层析检测装置和免疫层析检测试剂盒。Z

| Fab'2化ウサギ抗体使用(金コロイド側) | | | |
|-----------------------|-------|------|------|
| | 浜ホト | 目視判定 | SN比 |
| Buffer | 8.9 | - | |
| 豚肉 | 152.9 | +++ | 17.2 |
| 牛肉 | 3.5 | - | |
| ラム | 4.7 | - | |
| 鶏肉 | 4.9 | - | |