

(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 - 116120

(P2002 - 116120A)

(43)公開日 平成14年4月19日(2002.4.19)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
G 0 1 N 1/10 33/53		G 0 1 N 1/10 33/53	C 2 G 0 5 2 D M N S

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 9 数) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2001 - 115968(P2001 - 115968)

(22)出願日 平成13年4月13日(2001.4.13)

(31)優先権主張番号 特願2000 - 112555(P2000 - 112555)

(32)優先日 平成12年4月13日(2000.4.13)

(33)優先権主張国 日本(JP)

(71)出願人 000004178

ジェイエスアール株式会社

東京都中央区築地2丁目11番24号

(71)出願人 501317788

有限会社ティーアイティー

埼玉県北葛飾郡鷺宮町桜田3丁目1番1 - 3 -
106

(72)発明者 佐藤 功栄

茨城県猿島郡総和町大字下大野字高谷2965
- 37

(74)代理人 100084308

弁理士 岩見谷 周志

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 標的物質の検出方法

(57)【要約】

【課題】複数試料から作成されたプール中に含有される標的物質が極く低濃度であっても検出することができる方法を提供すること。

【解決手段】複数の検体が混合された、標的物質を含有する可能性のある試料に、標的物質を吸着することのできる吸着体を接触させた後、前記試料中から前記水不溶性固体を分離し、次に水不溶性固体に結合した標的物質の検出を行うことを特徴とする標的物質検出方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 複数の検体が混合された、標的物質を含有する可能性のある試料に、標的物質を吸着することのできる吸着体を接触させた後、前記試料中から前記吸着体を分離し、次に吸着体に結合した標的物質の検出を行うことを特徴とする標的物質検出方法。

【請求項2】 検体が体液であることを特徴とする請求項1に記載の標的物質検出方法。

【請求項3】 標的物質がウイルス、核酸、抗原、抗体またはタンパク質であることを特徴とする請求項1または2に記載の標的物質検出方法。

【請求項4】 標的物質を吸着することのできる吸着体が、粒子状、フィルター状、繊維状、シート状、チューブ状または板状であることを特徴とする請求項1、2または3に記載の標的物質検出方法。

【請求項5】 標的物質を吸着することのできる吸着体が、有機ポリマー、無機ポリマー、無機化合物または天然高分子からなることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項に記載の標的物質検出方法。

【請求項6】 標的物質の検出を核酸増幅方法または免疫化学測定法で行うことを特徴とする請求項1～5のいずれか1項に記載の標的物質検出方法。

【請求項7】 請求項1～6のいずれかの検出方法に用いることを特徴とする吸着体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、複数の試料中に低濃度に含有される標的物質の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】ウイルスはヒトや動植物のさまざまな病気の原因の一つであり、その検査・診断のためには原因ウイルスの確認が非常に重要である。従来のウイルス検査・診断法としては、ウイルス抗原あるいは抗ウイルス抗体の免疫学的測定が一般的である。しかしながら、ウイルス感染から数週間～数ヶ月間は、ウイルス量あるいは抗ウイルス抗体量が少ないため、これらの免疫学的測定法では検出できない期間がある。この検出不可能な期間はウインドウ・ピリオド（空白期間）と呼ばれており、このような患者が献血を行った場合、その献血液は感染源となることが多く、不特定多数の輸血患者・血液製剤利用患者に危険をおよぼす可能性がある。したがって、ウインドウ・ピリオドをできる限り短縮するため、免疫学的測定限界以下のウイルスを高感度に検出できる技術の開発が急務とされている。

【0003】近年、ポリメラーゼチェーンリアクション法（以下PCR法）に代表される、核酸増幅技術により、極微量のウイルスでも検出できる可能性が開けてきた。しかしながら、PCR法などによっても極微量のウイルス検出は特殊な設備と高度な技術が必要とされ、一般的な施設で簡便に実施することはきわめて困難であ

る。また、使用可能なサンプル量も機器により制限されており、少量のため、PCR法によってもウイルス濃度が低いとウイルスを検出出来ないことがある。そこで、これらの問題解決のため、検体中のウイルスを濃縮する手法が用いられている。

【0004】標的物質の検出率が低い多数の検体中の被検査物質を効率よく検査するために、複数の検体から少量、例えば数ミリリットルずつ試料を採取しひとつに集めたプールをつくり、このプール中のウイルスを検出するという手法が検討されている。しかしながら、現在の方法ではプール中のウイルス濃度が非常に低いために、検出が困難な場合がある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】本発明の課題は、上記のウイルス検出法の問題点を解決し、複数試料から作成されたプール中に含有される標的物質が極く低濃度であっても検出することができる方法を提供することにある。

【0006】

【発明を解決するための手段】本発明は、上記の課題を解決するものとして、複数の検体が一定量ずつ混合された、標的物質を含有する可能性のある試料に、標的物質を吸着することのできる吸着体を接触させた後、前記試料中から前記吸着体を分離し、次に吸着体に結合した標的物質の検出を行うことを特徴とする標的物質検出方法を提供するものである。

【0007】

【発明の実施の形態】以下、本発明をより具体的に詳しく説明する。

〔吸着体〕本発明で使用することのできる吸着体（以下、単に「標的物質吸着体」という）は、素材そのものを示すのではなく、種々の材料、例えば有機ポリマー、無機ポリマー、無機化合物および天然高分子化合物など、またはこれらの組合せたものからなり、形状も後述のように種々の形状をとり得る。該吸着体は標的物質を容易に分離することができることから、水不溶性であることが必要である。試料となる水性物質、例えば血液、尿、タンパク質水溶液などに不溶の物質からなる。

【0008】標的物質吸着体を構成する有機ポリマーとしては、例えば芳香族ビニル化合物、アクリル酸エステル、メタクリル酸エステル、不飽和カルボン酸などのラジカル重合性モノマーの（共）重合体、ポリエステル、ポリオレフィン、ポリエーテル、ポリカーボネート、ポリイミド、ポリアミド、陽イオン交換樹脂、陰イオン交換樹脂、ポリエチレンイミン、ポリプロピレンイミン、ポリリジン、グルコサミン、ポリアルリルアミンなどが挙げられる。

【0009】無機ポリマーとしては、例えばアルコキシシラン、オルガノアルコキシシランなどの加水分解縮合物を挙げることができる。無機化合物としては、例えば

シリカ、アルミナ、リン酸カルシウムなどを挙げることができる。天然高分子としては、例えばデキストラン、セルロース、アガロース、グルコマンナンなどを挙げることができる。

【0010】材料が、例えば有機ポリマーの場合などでは、水溶性のものもあるが、標的物質吸着体は水不溶性である必要があるので、その場合架橋させたり、水不溶性基材に保持させるなどの処理が必要である。

【0011】本発明において、標的物質吸着体はその表面がイオン性であることが標的物質の吸着能を上げるために好ましい。ここで、表面がイオン性であるとは、標的物質吸着体の表面がアニオン性およびカチオン性の少なくともいずれか一方の荷電を有する、または特定の条件下で荷電を有する状態となりうることを示す。

【0012】標的物質吸着体の表面がアニオン性を有するものとしては、例えば、標的物質吸着体がアニオン性を有するモノマーを共重合した重合体からなるもの、重合体をアニオン化してなるもの、合成高分子にスルホン酸含有単量体をシード結合又はグラフト重合してなる重合体、陽イオン交換樹脂からなるもの、硫酸化した天然高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたもの、無機ポリマーまたは無機粒子の表面に、アニオン性を有する重合体または硫酸化した天然高分子を有するもの、などである。ここで、アニオン性基としては、スルホン基、カルボキシル基などを挙げることができる。

【0013】上記の例として次のものを挙げることができる。

アニオン性を有するモノマーを共重合した重合体の例：カルボン酸含有単量体の(共)重合体をあげることができる。ここで、カルボン酸含有単量体(以下「カルボン酸単量体」という。)とは、付加重合性の不飽和結合およびカルボキシル基を分子中に有する重合性単量体である。具体例としては、アクリル酸、メタクリル酸、クロトン酸、イタコン酸、フマル酸、マレイン酸などをあげることができる。

【0014】重合体をアニオン化(スルホン化)してなるものの例：少なくともその表面にスルホン化可能な官能基、例えば主鎖または側鎖に不飽和二重結合、芳香族基、第一級または第二級アミノ基、第一級ハロゲン化アルキル基、脂肪族アルデヒド、脂肪族ケトン、脂肪族カルボン酸、脂肪族カルボン酸無水物、水酸基等をもつ(共)重合体からなり、その表面の少なくとも一部がスルホン化されているもの。表面スルホン化可能な(共)重合体の例として、スチレン、 α -メチルスチレン、ピニルナフタレン、ジビニルベンゼン、ブタジエン、イソプレン、ビニルアルコール等のスルホン化可能な単量体の(共)重合体、およびこれら単量体と他の重合性単量体との(共)重合体等の付加重合系高分子化合物；ポリカーボネート、ポリエステル、ポリエステルエーテル、

ポリアリールエーテル、ポリアルキレンオキシド、ポリスルホン、ポリエーテルスルホン、ポリアミド、ポリイミド、ポリエーテルイミド、ポリエーテルケトン、ポリウレタン、芳香族化合物のアセトアルデヒド縮合物、ポリエーテル等の縮合重合系高分子化合物等があげられる。

【0015】陽イオン交換樹脂の例としては、ジビニルベンゼン架橋スルホン化ポリスチレンがあげられ、粒径は、中心粒径が0.1mmから1mm程度のもので良い。

硫酸化した天然高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたものの例：硫酸化多糖類としては、ヘパリン、デキストラン硫酸、セルロース硫酸、ガードラン硫酸、コンドロイチン硫酸、ヘパラン硫酸、デキストラン硫酸、キチン硫酸、キトサン硫酸、デルマタン硫酸、アミロペクチン硫酸、ケタラン硫酸、キシラン硫酸、カロニン硫酸、ペクチン硫酸、イヌリン硫酸、アルギン酸硫酸、グリコーゲン硫酸、ポリラクトース硫酸、カラゲニン硫酸、デンプン硫酸、ポリグルコース硫酸、ラミナリン硫酸、ガラクトサン硫酸、レバン硫酸、メベサルフェート、フコイダン、硫酸化グリチルリチンなどの抗ウイルス性を有する多糖類を挙げることができる。

【0016】硫酸化多糖類は、エポキシ基、アミノ基、アルデヒド基、カルボキシル基、水酸基、酸クロライド基などの官能基を持つ重合体に直接もしくはカップリング剤やスパーサーを介して担持させることができる。

【0017】標的物質吸着体の表面がカチオン性を有するものとしては、例えば、標的物質吸着体がカチオン性を有するモノマーを共重合した重合体からなるもの、カチオン性を有する重合開始剤を用いてラジカル重合させて得た重合体からなるもの、カチオン性を有する化合物を重合体担体に結合してなるもの、陰イオン交換樹脂からなるもの、カチオン性基含有水溶性高分子を水不溶性ポリマー担体に担持させたもの、無機ポリマーまたは無機粒子の表面に、カチオン性基を有する重合体またはカチオン性基含有水溶性高分子を有するものなどである。

【0018】本明細書においてカチオン性基とは、それ自体カチオンを形成している基及びそれ自体カチオンを形成していないが中性付近(約pH6~8)においてプロトンの結合により容易にカチオンを形成するアミン系及びイミン系の基を意味する。例えば1級アミノ基、2級アミノ基、3級アミノ基、4級アンモニウム基、並びにイミノ基(-NH-基及び=NH基)があげられる。これらのカチオン性基の存在形態は多様であって何ら制限されず、例えば化合物中に、アミジノ基、イミジノ基、ヒドラジノ基、ピリジル基などの状態で存在していてもよい。

【0019】上記の例としては、次のものを挙げることができる。

カチオン性基を有するモノマーを共重合した重合の例：カチオン性基を有するモノマーとしては、2-ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、2-ジエチルアミノエチル(メタ)アクリレート、2-ジメチルアミノプロピル(メタ)アクリレート、3-ジメチルアミノプロピル(メタ)アクリレート等のアミノアルキル基含有(メタ)アクリル酸エステル類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩；2-(ジメチルアミノエトキシ)エチル(メタ)アクリレート、2-(ジエチルアミノエトキシ)エチル(メタ)アクリレート、3-(ジメチルアミノエトキシ)プロピル(メタ)アクリレート等のアミノアルコキシアルキル基含有(メタ)アクリル酸エステル類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩；N-(2-ジメチルアミノエチル)(メタ)アクリルアミド、N-(2-ジエチルアミノエチル)(メタ)アクリルアミド、N-(2-ジメチルアミノプロピル)(メタ)アクリルアミド、N-(3-ジメチルアミノプロピル)(メタ)アクリルアミド等のN-アミノアルキル基含有(メタ)アクリルアミド類及びこれらの塩化メチレン、硫酸ジメチル、硫酸ジエチル等による4級塩等が挙げられる。なかでも、2-ジメチルアミノエチル(メタ)アクリレート、N-(2-ジメチルアミノエチル)(メタ)アクリルアミド、及びこれらの塩化メチレンによる4級塩が好ましい。これらは、他の重合性モノマーと共重合させてもよい。

【0020】カチオン性モノマーと共重合するモノマーとしては、下記に示すような架橋性モノマーならびに非架橋かつ非イオン性モノマーを挙げることができる。

【0021】架橋性モノマーとしては、ジビニルベンゼン、ジビニルピフェニル、エチレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、テトラエチレングリコールジ(メタ)アクリレート、プロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、ジプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、トリプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、テトラプロピレングリコールジ(メタ)アクリレート、1,4-ブタンジオールジ(メタ)アクリレート、1,6-ヘキサジオールジ(メタ)アクリレート、ネオペンチルグリコールジ(メタ)アクリレート、2,2'-ビス〔4-(メタ)アクリロイルオキシプロピオキシフェニル〕プロパン、2,2'-ビス〔4-(メタ)アクリロイルオキシジエトキシフェニル〕プロパン、グリセリントリ(メタ)アクリレート、トリメチロールプロパントリ(メタ)アクリレート、ペンタエリスリトールテトラ(メタ)アクリレート等のジビニル系モノマー、トリビニル系モノマー及びテトラビニル系モノマーが挙げられる。なかでも、ジビニルベンゼン、エチレングリコールジメタクリレートおよびトリメチロール

プロパントリメタクリレートが好ましい。

【0022】共重合可能な非架橋性かつ非イオン性モノマーは、カチオン性モノマーあるいは架橋性モノマーのいずれかと共重合可能であって、非架橋性かつ非イオン性のモノマーである。

【0023】このようなモノマーとして、スチレン、-メチルスチレン、p-メチルスチレン、ハロゲン化スチレン等の芳香族ビニル単量体；アクリロニトリル等の不飽和ニトリル；メチルアクリレート、メチルメタクリレート、エチルアクリレート、エチルメタクリレート、ブチルアクリレート、ブチルメタクリレート、シクロヘキシルメタクリレート、2-エチルヘキシルアクリレート、2-エチルヘキシルメタクリレート、ラウリルアクリレート、ラウリルメタクリレート、グリシジルアクリレート、グリシジルメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート等のアクリル酸エステルおよびメタクリル酸エステル；ブタジエン、イソプレン等のジオレフィン；酢酸ビニル等のカルボン酸ビニルエステル；塩化ビニル、塩化ビニリデン等のハロゲン化ビニリデン等を挙げることができる。なかでも、スチレン、-メチルスチレン、アクリロニトリル、メチルメタクリレート、ブチルメタクリレート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、シクロヘキシルメタクリレートが好ましい。

【0024】カチオン性基を有する重合開始剤を使用してモノマーを重合して得た重合体の例：カチオン性基を有するラジカル重合開始剤は、これを用いたラジカル重合により得られたポリマーがその末端に該ラジカル重合開始剤に由来するカチオン性基を有するようになるものである。好ましいカチオン性基を有するラジカル重合開始剤としては、アミジノ基、イミジノ基あるいはピリジウム基を有するアゾビス型の開始剤が挙げられる。また、10時間半減期温度が40～95の範囲にあるものが温和な条件下で重合を行うことができるので好ましい。

【0025】カチオン性基を有する化合物を重合体担体に結合させてなる重合体

粒子表面にカルボキシル基、ハイドロキシル基、エポキシ基、アミノ基、アミド基などを共重合やシード重合などにより導入し、それらの基を結合部として反応させることにより、カチオン性基を有する化合物を重合体表面に導入することができる。カチオン性基を有する化合物としては、ポリエチレンイミン、ポリプロピレンイミン、ポリアリルアミン、ポリビニルアミン、ポリプロピレンアミンなどのポリアミン化合物、ポリリジン、ポリアルギニン、ポリヒスチジンなどの遊離アミノ酸類、前述のカチオン性基を有するモノマーを共重合したポリマーなどを挙げることができる。

【0026】陰イオン交換樹脂
ジビニルベンゼン架橋ポリスチレンに第4級アンモニウ

ム基 - $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ (I型) あるいは - $\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3(\text{C}_2\text{H}_4\text{OH})$ (II型) を導入した強塩基性陰イオン交換樹脂、- $\text{NH}(\text{CH}_3)_2$ 、- $\text{NH}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH})_n\text{H}$ 、- $\text{CONH}(\text{CH}_2)_3\text{N}(\text{CH}_3)_2$ を導入した弱塩基性陰イオンなど。

【0027】無機ポリマーまたは無機化合物の表面にカチオン性基を有する重合体またはカチオン性基含有水溶性高分子を有するもの。

さらにキレート樹脂といわれる供与体原子(O, N, S)を有する樹脂も挙げることができる。キレート樹脂としては、イミノ二酢酸型、イミノプロピオン酸型、エチレンジアミン三酢酸型、キノリン型、アミノカルボン酸型、アミンリン酸型、アミドキシム型、クリプタント型、ポリアミン型、ピリジン型、ピコリルアミン型、チオール型、リン酸型、多価フェノール型、ジチオカルバミン酸型、チオ尿素型、イソチウロニウム型およびジチゾン型などが挙げられる。

【0028】また、本発明において標的物質吸着体には検査の自動化、分離操作の自動化のための有効な強磁性体、超常磁性体などの磁性体を含有させることができる。標的物質吸着体の形状は特に限定されず種々有り得る。例えば、粒子状、フィルター状、繊維状、シート状、チューブ状、板状などである。標的物質吸着体の形状が粒子状の場合、粒径は試料中に分散して使用する場合には0.08~300 μm 程度、カラムに充填して使用する場合には0.1~1mm程度の粒径を有することが好ましい。

【0029】フィルターの場合には、好ましくは、平均孔径が0.1~50 μm の範囲にあるフィルターであり、平膜、中空糸膜、不織布、織布などを例示できる。血漿や培養液などを対象とした場合は、平均孔径が0.1 μm ~10 μm が好ましい。平均孔径が0.1 μm 以下だと、孔径が小さくなるため十分な濾過量が得られなくなる。平均孔径は、ASTM-F316に記載されたパームポロメーター(ポラスマテリアル社製)を用いて求めた値であり、実際の透過孔を反映する値である。また、フィルターの通水量は、0.7kg/cm²の圧力下で、25 \pm 2で測定した値で、10mL/min/m²/mmHg以上、好ましくは100mL/min/m²/mmHg以上であることが、濾過圧を低くできるため好ましい。また、不織布状の基材の場合、フィルター材を形成するフィラメントは、モノフィラメントであってもマルチフィラメントであってもよいが、平均直径(走査型電子顕微鏡で観察したフィラメントの長径と短径の平均値)が100 μm 以下、好ましくは、50 μm 以下であると、膜の表面積が大きくなり吸着部位が増加することとなるため好ましい。さらに、異形フィラメントであっても多孔質フィラメントであっても良い。さらに、フィルターの空孔部の割合(空孔率)は、20%以上、好ましくは50%以上である。

【0030】標的物質吸着体がシート状、チューブ状ま

たは板状である例としては、採血管、真空採血管、試験管、ウェルプレート、マイクロプレート、マイクロテストチューブ、エッペンドルフチューブ(商品名)などを挙げることができる。

【0031】これらの形状の標的物質吸着体を得るには、上記に例示された有機ポリマーのうちポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ノルボルネン系樹脂などの熱可塑性樹脂はそのまま所望の形状に成形することができる。

【0032】また、ガラス、ポリスチレン、ポリメチルメタクリレートなどからなる汎用の採血管などの表面をイオン化することにより、本発明に適した標的物質吸着体とすることもできる。

【0033】[試料]本発明の検出方法の適用対象は、複数の検体が混合された、標的物質を含有する可能性のある試料である。検体としては、例えば血液、血漿、血清、尿、唾液等の各種体液、細胞破砕液、培養細胞破砕液などである。

【0034】上記の複数の検体から一定量ずつ採取され、混合されたものを「プール」と称し、このプール作成の1回目を1次プールと称する。1次プールの作成において集められる検体の数は通常5~500、好ましくは10~50であり、一つの検体から採取される試料の量は0.01~1ミリリットル、好ましくは0.1~0.5ミリリットルである。

【0035】必要に応じ、さらに複数の1次プールから試料を集め、2次プールを作成することもできる。同様に3次以上のプールもあり得る。2次プールの作成において集められるプールの数は通常2~100、好ましくは5~20であり、一つの検体から採取される試料の量は0.01~1ミリリットル、好ましくは0.1~0.5ミリリットルである。

【0036】このようにして、1次または2次以上のプールを作成するが、ここで各検体またはプールから採取する試料の量および集める検体またはプールの数を適宜調整することにより、複数の被験者からの検体が場合により一定量ずつ含まれ、かつ後述する標的物質検出手段に適した量に試料を調製することができる。

【0037】[接触・結合]本発明では、前記のとおり調製された試料に前記の標的物質吸着体を接触させる。接触の方法は種々有り得、特に限定されない。不溶性担体の形状、大きさなどに応じて適切な方法をとればよい。

【0038】例えば、標的物質吸着体が粒径200 μm 未満の粒子の場合には、標的物質吸着体を試料中に分散させ試料と不溶性担体を接触させる。この分散及び接触は場合によっては振とうすることにより行う。標的物質吸着体が粒径200 μm を超える粒子の場合には、カラムに充填し、その中に試料を通過させる。また、標的物質吸着体が直径5~6mmのプラスチックビーズなど大

きなもの場合は、1～数个を試験管に入れ、試料と接触させる。標的物質吸着体がフィルター状または繊維状の場合には、フィルターまたは繊維表面と試料が充分接触するように、フィルターまたは繊維で試料を濾過する。標的物質吸着体が試験管やウェルプレートなどの試験器具である場合には、該試験器具の中に試料を入れ振とうする。

【0039】標的物質吸着体に試料を接触させる際には、必要に応じて多価金属イオンなどをさらに添加することもできる。標的物質吸着体に試料を接触させる際の試料の温度は通常5～37℃、接触時間は長すぎるとフィブリン等の析出がおきるため、対象によって調整する事が好ましい。

【0040】[分離]標的物質吸着体と試料を接触させた後、標的物質吸着体を試料から分離する。この際、標的物質吸着体が粒径200μm未満の粒子の場合には、例えば遠心により分離する。また、標的物質吸着体に磁性体を含有させておくことにより、試料から磁気により容易に分離することができる。

【0041】試料から分離された標的物質吸着体上の標的物質は濃縮されている。こうして濃縮された標的物質は次に検出に供される。但し、検出に供する前に必要に応じて標的物質吸着体を緩衝液で洗浄したり、および/または標的物質を標的物質吸着体から分離した後に検出に移行してもよい。例えば、標的物質がウイルスまたは細菌である場合にはこれを分離し、核酸である場合には抽出することができる。あるいは、標的物質が標的物質吸着体上に結合したままで検出に移ることもできる。標的物質の種類、標的物質吸着体の材質等に応じて適宜の方法を選択すればよい。

【0042】標的物質を標的物質吸着体から分離する方法としては、塩溶液および界面活性剤あるいは両者の混合物を作用させて標的物質を標的物質吸着体から解離させる方法がある。塩溶液としては高濃度の、例えば2～8Mの臭化カリウム、臭化ナトリウム、ヨウ化ナトリウム、グアニジンイソチオシアネート、グアニジンチオシアネート、塩酸グアニジン、硫酸グアニジン、チオシアン酸ナトリウム、チオシアン酸カリウムおよびその塩の水溶液、1.5～6M塩化ナトリウム水溶液、0.5～5mMリンタングステン酸水溶液等を用いることができる。

【0043】界面活性剤としては、SDS、トライトンX-100、Tween20、80、NP-40などがある。

【0044】また、核酸抽出は、標的物質が標的物質吸着体に結合したままでも行うことができる。標的核酸を効果的に増幅して検出するためには、通常、その核酸を細胞やその他の被検体残渣から単離しなければならない。様々な分離方法が知られており、凍結法、プロテアーゼ(例、プロテイナーゼK)などの消化酵素による処理法、煮沸法、各種洗剤を使用する方法(例えば、1988年

4月6日出願のHiguchiの米国特許出願第178,202号明細書および1991年5月22日発行の欧州特許出願公開第07828197号公報参照)、溶剤析出法並びに加熱プロトコルがある。分離された標的物質吸着体に少量の緩衝液を加え、加熱することで直接、標的物質の核酸を抽出することも可能であるし、市販されている核酸抽出試薬を直接添加して標的物質の核酸を抽出することも可能である。

【0045】[標的物質の検出]上記のようにして標的物質吸着体上に濃縮され、場合によってはさらに濃縮された状態で分離、抽出された標的物質の検出が行われる。検出方法は、標的物質の種類に応じて公知の方法を採用することができ、例えば核酸増幅検査、免疫化学測定法等が挙げられる。

【0046】ウイルスの核酸増幅検査(NAT; nucleic acid amplification test)の方法は特に限定されず、例えば、ロシユ社のPCR(Polymerization chain reaction)法、ジェン・プローブ社のTMA(Transcription Mediated amplification-hybridization protection assay)法、アボット社のLCR(Ligase chain reaction)法、NASBA(Nucleic Acid Sequence-based Amplification)(RNAをターゲット、温度一定が特徴)、CPT(Cyclic Probe Tech)(DNAをターゲット、DNA/RNAキメラprobeを使用し、ビオチン標識probeを増幅)、Q-Replicase Amplification(RNAをターゲット、ストレプトアビジン粒子でRNAを単離)、Invader Assay等を利用することができる。

【0047】免疫化学測定法としては、例えば酵素免疫反応(EIA)法、化学発光法(CLTA)、蛍光法(FIA)などを挙げることができる。本発明の標的物質検出方法で検出することのできる標的物質は、ウイルス、核酸、抗原、抗体、タンパク質などである。

【0048】ウイルスとしては、例えばヘパドナウイルス(B型肝炎ウイルス等)、アデノウイルス、フラビウイルス(日本脳炎ウイルス等)、ヘルペスウイルス(単純ヘルペスウイルス、水痘-帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス、EBウイルス等)、ポックスウイルス、パルボウイルス(アデノ関連ウイルス等)、オルソミクソウイルス(インフルエンザウイルス等)、ラブドウイルス(狂犬病ウイルス等)、レトロウイルス(後天性免疫不全症候群ウイルス等)、C型肝炎ウイルス、ヒトT細胞白血病ウイルス(HTLV-1)、ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1、HIV-2)、ヒトパルボウイルスB-19等のウイルスなどである。

【0049】核酸としては、DNA、RNA、mRNA、tRNAなどである。抗原、抗体としてはフェリチン、ASO、T₃、T₄、 α -フェトプロテイン、HBs抗原、CEA(癌胎児性抗原)、HCV表面抗原、HIV表面抗原、抗トレポネーマパリダム、抗カルピオライピン抗原、抗HBC抗体、抗HIV抗体など免疫反応で測定されるすべての物が挙げられる。タンパク質として

は、 - リポ蛋白、 - リポ蛋白などである。

【0050】

【実施例】以下、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。以下の記載においては、特記しない限り「部」は「重量部」を意味する。

【0051】参考例1

(1) 油性磁性流体フェリコロイドHC50 [商品名、タイホー工業(株)製] にアセトンを加えて粒子を析出沈殿させた後、これを乾燥することにより、親油化処理された表面を有するフェライト系の超常磁性体(粒子径: 0.01 μm)を得た。ついで、上で得た超常磁性体40部にシクロヘキサメタクリレート90部、トリメチルアミノエチルメタクリレートの塩化物10部およびベンゾイルペルオキシド(重合開始剤)3部を添加し、この系を混合攪拌することにより超常磁性体を均一に分散させてモノマー組成物を調製した。

【0052】一方、ポリビニルアルコール10部、ラウリル硫酸ナトリウム0.05部およびポリエチレンオキシドニルフェニルエーテル0.1部を水1000部に溶解して水性モノマー組成物を調製した。こうして調製した水性モノマー組成物中に上記のモノマー組成物を添加し、ホモジナイザーで予備攪拌した後、超音波分散機で分散処理することにより平均粒子径が1 μmの油滴(油相)が水性媒体に分散した懸濁液(油滴分散体)を調製した。

【0053】次に、得られた懸濁液を容量2リットルの攪拌機付き三口フラスコに仕込み、この系を75 に昇温し、窒素雰囲気下において攪拌しながら5時間にわたり油滴中のモノマーを重合(懸濁重合)させることにより、磁性ポリマー粒子を作製した。得られた粒子を光学顕微鏡で写真撮影し、粒子200個の直径を計測してその平均を求めた結果1.2 μmであった。

【0054】(2) 上記(1)で得られた磁性ポリマー粒子を5 mM水酸化ナトリウム水溶液に分散し、80で12時間処理してカルボキシ変性磁性ポリマー粒子とした。

(3) 得られたカルボキシ変性磁性ポリマー粒子1 gを2.0 mLの10 mM M E S緩衝溶液(pH6.0)に懸*

*濁し、ポリエチレンイミン(和光純薬工業株式会社、数平均分子量7万)30%水溶液、33 μLおよび水溶性カルボジイミド試薬E D C・塩酸塩(1-エチル-3(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミドヒドロクロライド)0.05 gを添加し、2時間室温で反応させて吸着体を得た。

【0055】実施例1

(1) 参考例1で得られた標的物質吸着体の水性懸濁液を精製後、生理食塩水で固形分濃度5%に調整した。

(2) 100コピー/mLのHBV陽性血100 μLと正常ヒト血漿(HBV陰性)の49検体各100 μLとを混合し、合計量5 mLの試料Aを調製した。

(3) この試料A4.9 mLに上記(1)で調製した標的物質吸着体水性懸濁液(5重量%)100 μLを加え、室温で10分間回転攪拌して両者を接触させ、標的物質吸着体にウイルス吸着処理を行った。

【0056】ウイルス吸着処理後、磁気分離スタンドにセットし、標的物質吸着体の粒子と上清を分離し、上清を捨て、Tris-HCl緩衝液(pH7.4)を加え、100 μLの標的物質吸着体粒子分散液を得た。この粒子分散液からDNA Extractor Kit(和光純薬工業株式会社製)を用い、付属の手順書に従い核酸を抽出した。抽出により得られた抽出物(核酸)を試料Bという。得られた抽出物をPCR法により、35回のPCRの増幅過程によりDNAを増幅した。PCRのプライマー配列は、Hiroaki Okamoto, Igakuno ayumi, (1992), 162(9), 544-549.に従った。得られた1st-PCR、2nd-PCRそれぞれの増幅産物を3%アガロースを用いて電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色によりDNAを可視化しポラロイド写真に撮影した。得られた目的DNAの量をバンドの蛍光強度から、-, +, ++, +++の4段階で判定した。

【0057】試料A100 μL、元のHBV陽性血100 μL(試料C)および正常ヒト血漿100 μL(試料D)から上記DNA Extractor Kitにより核酸を抽出し、同様にPCR反応を行い、同様に評価した。以上の結果を表1に示す。

【0058】

【表1】

	試料A	試料B	試料C	試料D
	50検体プール (100 μL)	試料A5 mLの 濃縮	HBV陽性血 (100 μL)	正常ヒト血漿 (100 μL)
PCR判定	+	+	+	-

【0059】実施例2

HCV(C型肝炎ウイルス)を2 x 10⁴コピー/mL含有するヒト血漿1検体と正常ヒト血漿の9検体、49検体、99検体をそれぞれ一定の割合で混合してそれぞ

れ10検体プール、50検体プール、100検体プールの試料を作製した。

【0060】10検体プール試料から0.9 mL、50検体プール試料から4.9 mL、100検体プール試料

から9.9 mLをとり、それぞれに参考例1で製造した吸着体懸濁液(5重量%) 100 μLを加えた後、室温で10分間回転攪拌し吸着体を磁氣的に凝集させ、上澄みをそれぞれ100 μL残して除去した後、磁気を解除し吸着体を上澄み100 mL中に再分散させ濃縮液を得た。

【0061】得られた濃縮液を核酸抽出試薬(商品名スマイライト EX R&D、ゲノムサイエンス研究所製)で吸着体に捕捉されたウイルスを酵素分解した後、磁気により吸着体を凝集させ、濃縮液から吸着体を除去した。次いで、抽出されたHCV核酸を分離し、リアルタイム検出PCR法(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 8

*8, pp7276-7280, 1991)であるTaqMan PCR法によりABI PRISM 7700 Sequence Detection System(PE Biosystem社製)を用いHCV核酸量を定量した。

【0062】DNAの定量は、40回の増幅過程において、蛍光強度が一定の基準値(Threshold:Th)を越えたサイクル数(Thサイクル)をウイルス濃度既知の検体の希釈系列を用いて同時に測定して作成した。DNA量Thサイクルの検量線に外挿して求めた。結果を表2の「濃縮100 μL」の欄に示す。

【0063】
【表2】

	10 ⁹ コピー/mLの陽性血	正常ヒト血漿	計算コピー数 コピー/100 μL	未濃縮 100 μL	濃縮 100 μL
0 検体 プール	100 μL	0	2×10 ⁹	1.6×10 ⁹	2.4×10 ⁴
10 検体 プール	100 μL	100 μL×9 人	2×10 ²	1.8×10 ²	1.5×10 ³
50 検体 プール	100 μL	100 μL×49 人	4×10 ¹	7×10 ¹	5.1×10 ²
100 検体 プール	100 μL	100 μL×99 人	2×10 ¹	4×10 ¹	3.3×10 ²

【0064】(2)別のチューブに(1)と同じ10検体プール、50検体プール、100検体プールから100 μLずつ、核酸抽出試薬(商品名:スマイライト EX R&D、ゲノムサイエンス研究所製)で処理し、上記(1)と同様にしてDNA量を定量した結果を表2「未濃縮100 μL」の欄に示す。この結果、HCVはプール検体そのものより約1桁高いウイルス核酸のコピー数を示し、本粒子による濃縮が有効であることが示された。

【0065】実施例3

HBS抗原が陽性血(試料E)と正常ヒト血漿49人分を用い、各100 μLと試料Aを混合した試料F(5 mL)

	試料E HBS Ag+	試料F 50 検体プール	試料G 50 検体プールの濃縮
S/N比	50	12	50

【0067】

【発明の効果】本発明の標的物質検出法では、核酸増幅検査に供される検体中の標的物質が既に濃縮されている

を作製した。試料Fから100 μLを取り、残りの4.9 mLに参考例の粒子100 μLを加え10分間攪拌し、ウイルス吸着処理を行った。この後、粒子を0.1% BSA、Tween 80(0.01を含む)溶液で4回洗浄し、スチレンスルホン酸ソーダ(0.1%)を加え、ウイルスを解離させた。この後、磁気で粒子を分離し、100 μLのウイルス濃縮液とした(試料G)。これらの試料を富士レピオルシパルスHBS抗原で測定した。

【0066】
【表3】

ので、元の検体または試料に含まれている標的物質が極く微量であっても効率的に標的物質の検出を行うことができる。

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード(参考)
// G 0 1 N 27/447		G 0 1 N 27/26	3 1 5 Z 3 2 5 B
(72)発明者 田中 建志		(72)発明者 日方 幹雄	
東京都世田谷区用賀3-15-14-107		東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイ	
(72)発明者 村田 充弘		エスアール株式会社内	
東京都中央区築地二丁目11番24号 ジェイ		Fターム(参考) 2G052 AA29 AD06 AD54 BA02 BA21	
エスアール株式会社内		ED03 JA13 JA16	

专利名称(译)	检测目标物质的方法		
公开(公告)号	JP2002116120A	公开(公告)日	2002-04-19
申请号	JP2001115968	申请日	2001-04-13
[标]申请(专利权)人(译)	杰瑟股份有限公司 蒂尔加滕易茶		
申请(专利权)人(译)	JSR株式会社 有限公司蒂尔加滕茶毅		
[标]发明人	佐藤功荣 田中建志 村田充弘 日方幹雄		
发明人	佐藤 功荣 田中 建志 村田 充弘 日方 幹雄		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/10 G01N27/447		
FI分类号	G01N1/10.C G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/53.N G01N33/53.S G01N27/26.315.Z G01N27/26.325.B G01N27/447.315.Z G01N27/447.325.B		
F-TERM分类号	2G052/AA29 2G052/AD06 2G052/AD54 2G052/BA02 2G052/BA21 2G052/ED03 2G052/JA13 2G052/JA16		
优先权	2000112555 2000-04-13 JP		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种即使在极低浓度下也能够检测由多个样品制成的游泳池中包含的目标物质的方法。解决方案：该目标物质检测方法的特征在于，在使能够吸附目标物质的吸附剂与可能包含目标物质与多个样品混合的样品接触之后，将水不溶性固体从内部物质中分离出来。然后，检测与水不溶性固体结合的目标物质。

Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., Vol. 8 *

	10 ⁹ コピー mLの陽性血	正常ヒト血漿/ 100 μL	計算コピー数 コピー/100 μL	未濃縮 100 μL	濃縮 100 μL
0検体 プール	100 μL	0	2×10 ⁹	1.6×10 ⁹	2.4×10 ⁴
10検体 プール	100 μL	100 μL×9人	2×10 ⁹	1.8×10 ⁹	1.5×10 ⁹
50検体 プール	100 μL	100 μL×49人	4×10 ⁴	7×10 ⁴	5.1×10 ⁹
100検体 プール	100 μL	100 μL×99人	2×10 ⁴	4×10 ⁴	3.3×10 ⁹