

(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2001 - 289849

(P2001 - 289849A)

(43)公開日 平成13年10月19日(2001.10.19)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/531			G 0 1 N 33/531	B
	33/543	501	33/543	501 M
				501 H
				501 B
	33/569		33/569	G

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L ( 全 4 数 )

(21)出願番号 特願2000 - 103557(P2000 - 103557)

(22)出願日 平成12年4月5日(2000.4.5)

(71)出願人 000170565

国際試薬株式会社

兵庫県神戸市中央区浜辺通2丁目1番30号

(72)発明者 日裏 久英

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1 - 2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(72)発明者 柳原 收

兵庫県神戸市西区室谷1丁目1 - 2 国際試薬株式会社研究開発センター内

(74)代理人 100088904

弁理士 庄司 隆 ( 外 1 名 )

(54)【発明の名称】 免疫学的測定方法

(57)【要約】

【課題】試料中の被検物質を免疫学的に測定する方法において、試料の前処理に使用した界面活性剤を除去するための、効率が良くかつ少量の試料にも適用しうる手段を提供することであり、該手段を含む免疫学的測定方法を提供すること。

【解決手段】試料の前処理に使用した界面活性剤を、該界面活性剤の溶解度を变化させて沈殿除去する手段を導入した免疫学的測定方法および該測定方法に使用する測定試薬を提供する。とくにウイルスまたはウイルス由来の抗原の測定方法であって、試料を陰イオン界面活性剤で前処理し、その後該陰イオン界面活性剤をカウンターイオンの交換反応を行うことによりその溶解度を变化させて除去し、ウイルスまたはウイルス由来の抗原測定する免疫学的測定を提供する。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 試料中の被検物質を免疫学的に測定する方法において、該試料の前処理に使用した界面活性剤を、該界面活性剤の溶解度を変化させて、沈殿除去する手段を導入した免疫学的測定方法。

【請求項2】 試料中の被検物質が、ウイルスまたはウイルス由来の抗原である請求項1記載の免疫学的測定方法。

【請求項3】 界面活性剤が、陰イオン界面活性剤である請求項1または2に記載の免疫学的測定方法。

【請求項4】 界面活性剤の溶解度を変化させる手段が、該界面活性剤のカウンターイオンの交換反応を行うことである請求項1～3に記載のいずれか1項に記載の免疫学的測定方法。

【請求項5】 界面活性剤の溶解度を変化させて沈殿除去する手段に用いる試薬を含む、請求項1～4に記載のいずれか1項に記載の免疫学的測定方法に使用する免疫学的測定試薬。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明はウイルス感染症の診断、経過観察、治療方針決定、治療効果判定を目的とするウイルスの同定および定量に関するものである。

## 【0002】

【従来の技術】ウイルス感染の診断としては、通常、血中のウイルスに対する抗体の測定が行われる。例えば、C型肝炎の診断は、C型肝炎ウイルス(HCV)の非構造領域とコア領域の蛋白を抗原として用いる酵素免疫測定法(EIA)で、これらの抗原と反応する生体試料中に存在する抗体を測定することにより行う。この抗体測定によるウイルスの同定および定量の方法は臨床検査ならびに献血スクリーニングに利用されている。しかし、この抗体測定によるウイルスの同定および定量の方法は、ウイルスに感染してから血中の抗体価が測定可能な力価に到達するまでに時間の差、いわゆるウインドウピリオドが存在するため、感染の有無を的確に捉えられないという問題がある。

【0003】感染の有無を的確に捉えるにはウイルスそのものを同定または定量することが望ましい。その方法として、遺伝子学的検査によるウイルスの同定および定量が挙げられる。この方法は、ウイルス感染の診断、経過観察、治療方針決定、治療効果判定に用いられるが、操作が煩雑で難易度が高い、検査に要する時間が長い、検査コストが高い、検査結果の再現性が必ずしも良くないなどの問題がある。

【0004】また、ウイルス表面蛋白をウイルス抗原として測定する方法が、いくつかのウイルスに関して臨床検査ならびに献血スクリーニングに利用されている。しかし、多くのウイルス感染の場合、宿主の免疫応答により産生されたウイルス表面蛋白抗原に対する内因性抗体

により測定が妨害されたり、宿主の免疫応答から逃れるためにウイルス側の表面抗原の変異が起こるため、表面抗原の測定もウイルスの同定または定量には適していない場合が多い。

【0005】上記のようなウイルスの同定および定量方法に代わる方法として、近年、HCVのコア抗原をEIA法で測定するキットが開発されている。このHCVのコア抗原を測定する方法は、試料中のHCVからHCVコア抗原を放出させるため、および試料中にもともと存在するHCVコア抗原に対する内因性抗体を失活させるための、試料の前処理工程と、この前処理した試料中のHCVコア抗原を、HCVコア抗原に対するモノクローナル抗体を用いるEIAで測定する工程よりなる。試料の前処理工程は、非イオン性界面活性剤、陰イオン界面活性剤、アルカリ、カオトロピックイオンおよび酸性化剤を適宜組み合わせ用いて行われる。

【0006】その前処理法の1例として、5%SDS(ドデシル硫酸ナトリウム)、0.75%CHAPS(3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸)、0.75%トリトンX-100および6M尿素を含む溶液と試料である血清とを等量混合して、56℃で30分間処理する方法が開示されている(特開平11-108932)。この方法は陰イオン界面活性剤であるSDSの濃度が最終濃度で2.5%と非常に高く、抗原抗体反応が阻害されるため、その後の測定に通常の抗体は適用できなかった。

【0007】さらに本発明者らの前出願、特願平11-278651には、界面活性剤で前処理した試料から、合成吸着剤であるダイアイオンHPシリーズ(HP10、HP20、HP21、HP30、HP40、HP50)、ダイアイオンSP800シリーズ(SP800、SP825、SP850、SP875)、ダイアイオンSP200シリーズ(SP205、SP206、SP207)、ダイアイオンHPM1GおよびHP2MG、アンバーライトXADシリーズ(XAD-2、XAD-4、XAD-16、XAD-2000、XAD-7HP)および合成高分子吸着マットを利用して、界面活性剤を除去する方法が開示されている。この方法によれば、非イオン性界面活性剤(商品名 トゥイーン20、トゥイーン80、トリトンX-100、ブリージ35など)、陰イオン界面活性剤(ドデシル硫酸ナトリウムなど)、両イオン性界面活性剤(CHAPSなど)さらに陽イオン界面活性剤(セチルトリメチルアンモニウムブロミドなど)が除去できる。しかし、この方法は大量に処理する場合に適用するのが有利であり、分析に用いるような1mL以下の少量試料では操作が困難であった。

## 【0008】

【発明が解決しようとする課題】本発明の目的は、試料中の被検物質を免疫学的に測定する方法において、試料の前処理に使用した界面活性剤を除去するための、効率

が良くかつ少量の試料にも適用しうる手段を提供することであり、該手段を導入した免疫学的測定方法を提供することである。詳しくは本発明は、該手段を導入した、試料中のウイルスを免疫学的に測定する方法を提供することを目的とする。

#### 【0009】

【課題を解決するための手段】本発明は試料中の被検物質を免疫学的に測定する方法において、該試料の前処理に使用した界面活性剤を、該界面活性剤の溶解度を变化させて沈殿除去する手段を導入した免疫学的測定方法を提供する。本発明の免疫学的測定方法では、試料中の被検物質が、ウイルスまたはウイルス由来の抗原でありうる。また本発明の免疫学的測定方法では、界面活性剤が、陰イオン界面活性剤でありうる。さらに本発明の免疫学的測定方法では、界面活性剤の溶解度を变化させる手段が、該界面活性剤のカウンターイオンの交換反応を行うことであってもよい。さらにまた、本発明は、本発明の免疫学的測定方法に使用する、測定試薬を提供する。本発明の測定試薬は、界面活性剤の溶解度を变化させる手段に用いる試薬を含む。ここで、測定試薬は1以上の試薬よりなり、また、測定に使用する試薬キットも意味する。また、試薬は1以上の物質よりなる。

#### 【0010】

【発明の実施の形態】本発明は、試料中の被検物質を免疫学的に測定する方法において、該試料の前処理に使用した界面活性剤を、該界面活性剤の溶解度を变化させて沈殿除去する手段を導入した免疫学的測定方法、および該免疫学的測定方法に用いる測定試薬である。本発明の免疫学的測定方法は、試料を界面活性剤で前処理する工程と、前処理後に該界面活性剤をその溶解度を变化させて除去する工程と、ついで試料中の被検物質を測定する工程とを含む。

【0011】本発明の免疫学的測定方法および測定試薬は、試料中に存在する物質の測定に用いられ、とくに抗原または抗体の測定に好適であり、とりわけウイルスのコア抗原の測定に好適である。被検物質の具体例としては、例えばウイルスであれば、ヘルペスウイルス(HSV)、CMV、ZVZ、EBV、HHVなど)、インフルエンザウイルス、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)、ヒト成人T細胞白血病ウイルス(HTLV)、肝炎ウイルス(HBV、HCV、HDV、HGV)、その他カゼ症候群、消化器系疾患、中枢神経系疾患、呼吸器系疾患、出血熱などの様々な疾患の病因ウイルス、これらに対する抗体、およびこれらのウイルスのコア抗原が挙げられる。とくに、HCVのコア抗原の測定に好適であるが、これに限らず、コア抗原を測定するために、その測定においてウイルスエンベロープ膜の破壊および/または遊離の抗体の失活に界面活性剤が使用されるウイルスに適用できる。またウイルス以外であっても、内部抗原を測定するために界面活性剤を使用する、細菌(黄色ブドウ

球菌、表皮ブドウ球菌、緑膿菌、大腸菌群)などの各種微生物にも応用できる。

【0012】測定の対象となる試料は、全血、血漿、血清、尿、髄液、精液、唾液、母乳、汗、粘液などの体液や糞便、病変部組織およびその抽出液、膿、喀痰、およびウイルスをはじめとする微生物培養系試料などである。

【0013】本発明において、試料の前処理に用いる界面活性剤は格別限定されず、陰イオン界面活性剤、陽イオン界面活性剤、非イオン性界面活性剤、および/または両イオン性界面活性剤が利用できるが、とくに微生物のエンベロープ膜を破壊するおよび/または遊離の抗体を失活させるために一般に使用されるものが用いられる。また、界面活性剤の使用時と除去時とでその溶解度を变化させられるもの、除去時にその溶解度が有意に減少できるものが好ましく、とくに、微生物のエンベロープ膜破壊時と除去時とでその溶解度を变化させられるもの、除去時にその溶解度が有意に減少できるものが好ましい。微生物、例えばHCV、のエンベロープ膜を破壊する場合、陰イオン界面活性剤を用いるのが好ましく、さらに加えて非イオン界面活性剤、アルカリ、カオトロピックイオンおよび酸性化剤を適宜組み合わせ使用することがより好ましい。界面活性剤の代表的な例としては、硫酸エステルアルカリ金属塩、石鹸、硫酸化油、スルホン化油、各種アミン類、第4アンモニウム塩およびエチレンオキシドとの縮合生成物がある。また、陰イオン界面活性剤の具体例として、ドデシル硫酸ナトリウム等のドデシル硫酸アルカリ塩、セチル硫酸ナトリウムや他のアルキル化硫酸エステル、ドデシルスルホン酸ナトリウムのようなアルキル化スルホン酸塩、アルキルアリルスルホン酸塩、(スルホベタイン、デオキシコール酸塩、ラウロイルサルコシン)などが例示される。

【0014】本発明においては、試料の前処理に使用した界面活性剤を、前処理後に該界面活性剤の溶解度を变化させることにより、その後の被検物質の免疫学的測定に影響が無い程度にまで、除去することが特徴である。

【0015】本発明において、界面活性剤の溶解度を变化させる手段として、自体公知の化学的手段を用いることができる。その簡便な方法としては、例えば、塩を形成している界面活性剤のカウンターイオンを別なイオンに変更する、すなわちカウンターの交換反応を行う方法が有用である。具体的には、例えばドデシル硫酸ナトリウム(SDS)のカウンターイオンをナトリウムからカリウムに変更することにより、その溶解度を減少できる。すなわち、試料の前処理に使用したSDSを、前処理後にカリウム塩を添加することによりドデシル硫酸カリウム(PDS)に変換すると、生成したPDSはその溶解度が極端に低いために析出する。その結果、溶液中のドデシル硫酸濃度が、その後の測定における免疫反応に実質的に影響が無い程度にまで下がり、試料中の

被検物質の測定が可能となる。添加するカリウム塩の濃度は、簡単な実験的繰り返しにより求められるが、好ましくはSDS濃度の1～30倍（モル比）、より好ましくはSDS濃度の3～20倍濃度（モル比）である。また、SDSの溶解度を変えるためには、カリウム塩の他に、バリウム塩、カルシウム塩などの金属塩も用いることもできる。

【0016】また、免疫学的測定方法に使用する溶媒のpH、塩濃度、温度、および/または種類などを変更することにより、同様に界面活性剤の溶解度を変化させることができる。本発明に適する溶媒のpH、塩濃度、温度、および/または種類などは、界面活性剤の溶解度を指標にして、簡単な実験的繰り返しにより選択することができる。

【0017】本発明の免疫学的測定方法において、試料中の被検試薬を測定する方法は自体公知の免疫学的測定方法を使用できる。例えば、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光イムノアッセイ、ラジオイムノアッセイ（RIA）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0018】さらに本発明は、上記本発明の免疫学的測定方法に使用する測定試薬を提供する。本発明の測定試薬は、上記界面活性剤の溶解度を変化させる手段に用いる試薬を含む。

【0019】本発明の免疫学的測定方法および測定試薬を用いることにより、試料を界面活性剤で前処理する工程を含む免疫学的測定方法において、今まで測定できなかった試料が測定可能となった。

【0020】

【実施例】以下に実施例を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

（実施例1）HCVコア抗原の測定

HCV陽性の3例の血清検体100μLに、5%SDS（ドデシル硫酸ナトリウム）、0.75%CHAPS（3-[(3-コラミドプロピル)-ジメチルアンモニオ]-1-プロパンスルホン酸）、0.75%トリトンX-100および6M尿素を含む溶液100μLを混合した後、56℃で30分間加熱し、前処理を行なった。その後、1.5Mの塩化カリウム溶液を50μL添加してSDSを沈殿させ、遠心分離により上清を得た。対照として、同一の検体を用い、塩化カリウムの代わりに精製水を50μL加えて同一の操作を行った。

\*【0021】得られた上清の100μLと反応緩衝液200μLとを、市販のHCVコア抗原測定キット（国試薬株式会社）の固相チューブに分注し、30～37℃で10分間反応させた。反応後、吸引除去と洗浄を3回行った後、ペルオキシダーゼ標識抗HCVコア抗体液300μLを加え、30～37℃で9分間反応させた。反応後、吸引除去と洗浄を4回行った。次いで、ペルオキシダーゼの基質である過酸化水素と10mmol/Lのp-ヒドロキシフェニルプロピオン酸の混合液300μLを分注し、10分間反応させた後、反応停止液（0.1mol/Lグリシン緩衝液、pH10）1mLを加えて反応を停止し、励起波長320nm、蛍光波長405nmで蛍光強度を測定した。既知濃度のリコンビナントHCVコア抗原標準液を同様に操作して得られた検量線よりHCVコア抗原濃度を求めた。結果を表1に示した。対照の方法では、SDSが測定系から除去されないため、HCVコア抗原が全く測定できないが、本発明の方法では、SDSが除去されるため、HCVコア抗原を測定しうることが実証された。

【0022】

【表1】 HCVコア抗原測定結果

検体番号	HCVコア抗原濃度 (pg/mL)	
	本発明の方法	対照の方法
1	20	0
2	177	0
3	29	0

【0023】

【発明の効果】本発明により、界面活性剤を試料の前処理に用いる試料中被検物質の測定方法において、該界面活性剤を該免疫学的測定系から、実質的に該測定系に影響が無い程度にまで効率が良く除去することができ、その結果、試料中の被検物質の測定を精度良く行うことができ、さらに従来の方法では測定ができなかった試料の測定が可能となった。また、本発明は、少量の試料にも適用しうる。

专利名称(译)	免疫学的测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2001289849A</a>	公开(公告)日	2001-10-19
申请号	JP2000103557	申请日	2000-04-05
申请(专利权)人(译)	国际试剂有限公司		
[标]发明人	日裏久英 柳原收		
发明人	日裏久英 柳原收		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/543.501.M G01N33/543.501.H G01N33/543.501.B G01N33/569.G		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种可以高效且少量地应用于样品的方法，以便在物质的方法中除去用于样品预处理的表面活性剂。待检测的，在样品中免疫测量并提供包含该方法的免疫测定方法。溶液：在所提供的免疫测定方法中，引入了在改变表面活性剂的溶解度之后沉淀和除去用于样品预处理的表面活性剂的方法。提供的测量试剂用于免疫测定方法。在一种方法中，特别是测量病毒或病毒来源的抗原。在提供的免疫测定方法中，用阴离子表面活性剂预处理样品，通过交换改变其溶解度来除去阴离子表面活性剂。测定抗衡离子和病毒或病毒来源的抗原的反应。