

(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 - 350443

(P2002 - 350443A)

(43)公開日 平成14年12月4日 (2002.12.4)

(51) Int.Cl ⁷	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543	521		G 0 1 N 33/543	521
33/531			33/531	B

審査請求 未請求 請求項の数 5 O L (全 10数)

(21)出願番号 特願2001 - 153672(P2001 - 153672)

(22)出願日 平成13年5月23日(2001.5.23)

(71)出願人 000003964

日東電工株式会社

大阪府茨木市下穂積1丁目1番2号

(72)発明者 森岡 量子

大阪府茨木市下穂積1 - 1 - 2 日東電工株式
会社内

(72)発明者 岡田 研一

大阪府茨木市下穂積1 - 1 - 2 日東電工株式
会社内

(74)代理人 100095832

弁理士 細田 芳徳

(54)【発明の名称】 免疫測定法

(57)【要約】

【課題】カゲ状発色を抑制し、試験開始からの時間にかかわらず被検物質の有無を高い確実性で判定するための免疫測定法を提供すること。

【解決手段】免疫クロマトグラフ法において、多価アルコールの存在下に、

(a) 吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合しうる第 1 の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片

上で、被検試料中における被検物質の有無を、下記

(b) と (c) :

(b) 試験片の固定相における第 1 の特異的結合物質に捕捉される被検物質、

(c) 担体に、被検物質に特異的に結合しうる第 2 の特異的結合物質と標識物質とを固定化した標識複合体、との複合体

の有無により検出する免疫測定法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 免疫クロマトグラフ法において、多価アルコールの存在下に、

(a) 吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合しうる第1の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片上で、被検試料中における被検物質の有無を、下記(b)と(c)：

(b) 試験片の固定相における第1の特異的結合物質に捕捉される被検物質、

(c) 担体に、被検物質に特異的に結合しうる第2の特異的結合物質と標識物質とを固定化した標識複合体、との複合体

の有無により検出する免疫測定法。

【請求項2】 被検試料を滴下するステップの後に、多価アルコールを含有した展開組成液を滴下して展開するステップを含む、請求項1記載の免疫測定法。

【請求項3】 試験片が、展開組成液を滴下するための展開組成液受領部及び/又は該展開組成液受領部と固定相との間に、展開組成液との接触により、多価アルコールを脱離可能に保持した多価アルコール相を有するもの

である、請求項1記載の免疫測定法。

【請求項4】 固定相を通過する多価アルコールの量が固定相の面積10mm²当たり2～60mgである請求項1～3いずれかに記載の免疫測定法。

【請求項5】 担体がラテックス粒子である請求項1～4いずれかに記載の免疫測定法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、カゲ状発色が抑制されうる免疫測定法に関する。

【0002】

【従来の技術】感染性病原体等の検査、または感染症をはじめとする種々の疾患の診断分野において、被検物質を高感度かつ再現性よく測定するために、酵素免疫法(EIA法)、ラジオイムノアッセイ(RIA法)等の免疫測定法が汎用されている。しかしながら、かかる方法は、特別な設備が必要である。さらに、免疫測定法は、操作時間、反応時間または検出時間が長く、洗浄工程も有するため、結果が出るまでに時間がかかるという欠点を有する。

【0003】近年、迅速かつ簡便に免疫化学的検査が行なえる方法として、免疫クロマトグラフ法が注目されている。当該方法は、例えば以下の工程を経る。被検試料中に被検物質が存在する場合、試験片上に被検物質と結合しうる特異的結合物質を固定化した固定相に、該被検物質に特異的に結合しうる特異的結合物質と標識物質とを含有した標識複合体と該被検物質との複合体を形成させる。続いて固定相にて結合した標識物質を検出することにより、被検試料中に被検物質の存在を確認することができる。被検試料中に被検物質が存在しない場合は、

固定相で複合体が形成されないため、標識複合体は検出されず、被検試料中に被検物質が存在しないことを確認することができる。この測定にかかる時間は10～20分であり、測定開始から10～20分後に被検物質の有無を判定するように規定されているものがほとんどである。

【0004】免疫クロマトグラフ測定法を構築するにあたりよく問題となるのは、被検試料中に被検物質が存在しない場合に固定相と標識複合体とが非特異的に結合する現象である。この非特異的な結合は、標識複合体の量を減らしたり、非特異抑制物質を添加することで改善可能である。

【0005】また、被検試料中に被検物質が存在しない場合において、規定の判定時間を経過すると、固定相が浮き上がって見える現象(以下、カゲ状発色という)が生じ、判定の確実性が低下するといった問題も頻繁に見受けられる。しかしながら、これは標識複合体量を減らしたり、非特異抑制物質を添加することでは改善不可能である。

【0006】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、前記従来技術に鑑みてなされたものであり、本発明の目的は、カゲ状発色を抑制し、試験開始からの時間にかかわらず被検物質の有無を高い確実性で判定するための免疫測定法を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】すなわち、本発明は、免疫クロマトグラフ法において、多価アルコールの存在下に、

(a) 吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合しうる第1の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片

上で、被検試料中における被検物質の有無を、下記

(b)と(c)：

(b) 試験片の固定相における第1の特異的結合物質に捕捉される被検物質、

(c) 担体に、被検物質に特異的に結合しうる第2の特異的結合物質と標識物質とを固定化した標識複合体、との複合体

の有無により検出する免疫測定法に関する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明者らは検討の結果、カゲ状発色は吸水性基材の乾燥に起因することを見出した。従って、本発明によれば、多価アルコールの存在下に被検試料を展開することで多価アルコールの乾燥防止作用により試験片の乾燥が防止される。これにより、免疫クロマトグラフ法におけるカゲ状発色が抑制される。

【0009】本発明の免疫測定法において、多価アルコールとしては、乾燥防止作用を有し、免疫クロマトグラフ測定を阻害しないものであれば良く、中でも炭素数が

3～10で、価数が2～5の多価アルコールが好適である。例えば、ヘキサントリオール、グリセロール、プロパンジオール等が挙げられる。なかでも、免疫クロマトグラフ測定を阻害せずカゲ状発色抑制効果が高いという観点から、ヘキサントリオール、プロパンジオールが好ましい。

【0010】多価アルコールの存在下に免疫測定を行なう方法は特に限定されない。具体的には、被検試料を滴下するステップの後に、多価アルコールを含有した展開組成液を滴下して展開するステップを含む免疫測定を行なってもよい。また、展開組成液を滴下するための展開組成液受領部及び/又は該展開組成液受領部と固定相との間に、展開組成液との接触により、多価アルコールを脱離可能に保持した多価アルコール相を有する試験片を用いて、免疫測定を行なってもよい。多価アルコール相を有する試験片を用いる場合、展開組成液には多価アルコールを含有させなくてもよいが、含有させていてもよい。また、展開組成液を滴下した後に、多価アルコールを含む洗浄液を展開させてもよいし、多価アルコールを含む液に試験片を浸漬してもよい。

【0011】固定相を通過する多価アルコールの量は、カゲ状発色を抑制し、かつ免疫測定を阻害しないという観点から、固定相の面積10mm²あたり2～60mgが好ましく、4～50mgがより好ましい。従って、このような多価アルコール量になるように、展開組成液中に多価アルコールを含有させる場合は、展開組成液100重量部に対して好ましくは0.5～140重量部、さらに好ましくは1～55重量部を混合し、また、多価アルコール相を設ける場合は、展開組成液との接触により脱離する量が前記の量になるように試験片に保持させる。多価アルコール相を設けると共に展開組成液中にも多価アルコールを含有させる場合は、合計量が前記の量となるように調整される。

【0012】本発明によれば、被検試料中における被検物質の有無を、下記(b)と(c)：

(b) 試験片の固定相における第1の特異的結合物質に捕捉される被検物質、

(c) 担体に、被検物質に特異的に結合しうる第2の特異的結合物質と標識物質とを固定化した標識複合体、との複合体

の有無により検出することができる。

【0013】本発明の免疫測定法により検出されうる被検物質としては、免疫化学的反応(すなわち抗原抗体反応)によりサンドイッチ免疫複合体を形成し得るものであれば特に制限されない。例えば、細菌(特にO157、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌等の病原性大腸菌)、放線菌、酵母、かび、ウイルス(特にHIV、HBV、HCV等)等の微生物またはそれらに対する抗体、細菌等が産生する毒素等の細菌由来の物質、あるいは腫瘍マーカー抗原等の生体試料中の抗原性ペプチド等

が挙げられる。

【0014】本発明の免疫測定法において、被検試料としては、前記被検物質を含有する疑いがある試料が挙げられる。前記被検試料は、液体試料であってもよく、固体試料であってもよい。固体試料の場合、該固体試料を、例えば、緩衝液、生理食塩水、培養液等の溶媒に溶解または希釈して得られた溶液として用いてもよい。

【0015】特異的結合物質としては、被検物質に特異的に結合し得る物質であればよく、例えば、抗原、ハプテン、抗体、オリゴヌクレオチド、エフェクター、レセプター、酵素、酵素補助因子、酵素阻害剤等が挙げられる。前記特異的結合物質は、被検物質に応じて、サンドイッチ法等の通常の検出方法で用いられる公知の物質を少なくとも1種選択すればよい。なお、被検物質が核酸の場合、核酸を除く特異的結合物質が用いられる。

【0016】前記特異的結合物質が抗原またはハプテンの場合、当該抗原およびハプテンとしてはクラミジア・トラコマティス、溶連菌、百日咳菌、ヘリコバクター・ピロリ、レプトスピラ、トレポネーマ・パリダム、トキソプラズマ・ゴンディ、ボレリア等の各種微生物抗原、マイコプラズマ脂質抗原、HA抗原、HBc抗原、HBe抗原、HBs抗原、HCV抗原、HIV抗原および前記抗原に由来するハプテン等があげられる。

【0017】前記特異的結合物質が抗体の場合、当該抗体としてはモノクロナール抗体やポリクロナール抗体を使用することができる。具体的には、抗大腸菌抗体、抗リステリア菌抗体、抗サルモネラ菌抗体、抗カンピロバクター菌抗体、抗ウェルシュ菌抗体、抗腸炎ピブリオ菌抗体、抗ベロトキシン抗体、抗ヒトトランスフェリン抗体、抗ヒトアルブミン抗体、抗ヒト免疫グロブリン抗体、抗マイクログロブリン抗体、抗CRP抗体、抗トロポニン抗体、抗HGC抗体、抗クラミジア・トラコマティス抗体、抗ストレプトリジンO抗体、抗ヘリコバクター・ピロリ抗体、抗-グルカン抗体、抗HBe抗体、抗HBs抗体、抗アデノウイルス抗体、抗HIV抗体、抗口タウイルス抗体、抗RF抗体等が挙げられる。

【0018】前記特異的結合物質が核酸の場合、該核酸としては前記抗原として例示された各種微生物、マイコプラズマ、各種ウイルスに由来する核酸成分に相補的なオリゴヌクレオチド等が挙げられる。

【0019】本発明においては、被検物質の検出に際して、抗原、ハプテンまたは抗体からなる群より選ばれた特異的結合物質を有し、かつ標識物質による標識を有する担体からなる標識複合体を用いることが、高感度検出という観点から好ましい。

【0020】なお、本明細書において、「特異的結合物質」には、標識複合体に用いられる特異的結合物質(第2の特異的結合物質)、および展開した被検物質を試験片上で捕捉するための固定相に用いられる特異的結合物質(第1の特異的結合物質)のいずれもが包含される。

したがって、単に「特異的結合物質」と記載する場合、第1または第2のいずれか、あるいは第1および第2の特異的結合物質を総称することを意図する。

【0021】標識複合体に用いられる担体としては、その表面上に、特異的結合物質および標識物質を固定することができる担体であればよく、金属コロイド粒子、水分散型高分子粒子、シリコン、ガラスケイソウ土粒子等が挙げられる。

【0022】金属コロイド粒子としては、金コロイド粒子やセレンウムコロイド粒子等が例示される。

【0023】水分散型高分子粒子としては、粒径コントロール、分散安定性、結合容易性の観点から、ラテックス粒子が好ましい。前記水分散型高分子粒子は、例えば、不飽和二重結合を有する少なくとも1種の単量体の乳化重合によって調製される。かかる単量体としては、例えば、エチレン、プロピレン等のオレフィン系単量体、酢酸ビニル、塩化ビニル等のビニル系単量体、スチレン、メチルスチレン、クロロスチレン等のスチレン系単量体、メタアクリル酸メチル等のメタアクリル酸エステル系単量体、ブタジエン等のジエン系単量体等が挙げら

れる。【0024】前記担体は、色を有する粒子（着色粒子という）であってもよい。前記着色粒子によれば、被検物質の濃度が高い場合、酵素反応を行なう前に着色の程度により判定が可能となる。ここで用いる着色粒子としては、肉眼で色を検出することが可能な粒子であれば特に限定されないが、例えば、スダンブルーやスダンレッドIV、スダンIII、オイルオレンジ、キニザリングリーン等に代表される顔料や染料等で着色された水分散型高分子粒子等が挙げられる。目視確認性の点からは、青色、赤色、緑色またはオレンジ色に着色した水分散型高分子粒子を用いることが望ましく、分散安定性や被検物質の検出感度の調整し易さ等の観点から、青色または赤色等に着色したラテックス粒子がより望ましい。

【0025】担体の粒子径は、分散性、ならびに酵素、特異的結合物質等の固定化量の調整を良好にする観点から、好ましくは3 μ m以下、さらに好ましくは2 μ m以下であり、得られた標識複合体の精製の容易性の観点から、好ましくは0.01 μ m以上、さらに好ましくは0.1 μ m以上であることが望ましい。

【0026】標識複合体に用いられる標識物質としては、酵素、蛍光物質等が挙げられる。かかる標識物質は、単独でまたは2種以上を混合して用いることができる。

【0027】前記酵素としては、公知の標識に用いられる酵素を用いることができる。具体的にはペルオキシダーゼ、 α -D-ガラクトシダーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、エステラーゼ、 α -D-グルクロニダーゼ等が挙げられる。

より高感度で安定な検出を達成することが可能なペルオ

キシダーゼまたはアルカリホスファターゼが好ましい。

【0028】前記蛍光物質としては、フルオレセインイソチオシアネート、テトラメチルローダミンイソチオシアネート等が挙げられる。

【0029】担体に、特異的結合物質および標識物質を固定させる方法としては、疎水結合（物理的吸着）、イオン結合、共有結合等が利用できる。安定性の観点から、共有結合を介して結合させる際に、必要に応じて、特異的結合物質等の当該高分子粒子上での自由度を高めるために、スパーサー基を介在させることができる。

【0030】このようにして得られた標識複合体中に含まれる特異的結合物質および標識物質の総固定量は、担体の乾燥重量1gあたり好ましくは5~200mgであり、その量は上記の範囲内で、使用する特異的結合物質、標識物質の種類等によって適宜変更し得る。例えば、担体が水分散型高分子粒子の場合、当該粒子の表面積に鑑みると、前記総固定量は、水分散型高分子粒子の乾燥重量1gあたり、好ましくは200mg以下であり、さらに好ましくは150mg以下であり、被検物質の検出の迅速性、感度、再現性の観点から、好ましくは5mg以上であり、さらに好ましくは10mg以上であることが望ましい。

【0031】ここで、担体の「乾燥重量」とは、一定量の担体を120 $^{\circ}$ Cで2時間乾燥した後の重量をいう。

【0032】本発明において、標識物質として、酵素を用いる場合は、標識量はその活性としても表わすことができる。勿論、用いる酵素の種類、その基質、温度等種々の条件によって異なる。用いる酵素がペルオキシダーゼである場合には、活性は以下の方法で測定する：基質である、TMB（3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン）0.2mg/mlと過酸化水素0.01重量%を含む0.1M-クエン酸緩衝液（pH4.5）3.3mlに、標識複合体0.0125重量%懸濁液を100 μ l混合して、25 $^{\circ}$ Cで反応、580nmの波長での吸光度を経時的に測定し、1分間に当該吸光度を1増加させる酵素活性を1U（ユニット）として換算する。

【0033】例えば、ペルオキシダーゼの場合、標識複合体が、水分散型高分子粒子の乾燥重量1gあたり、5,000~300,000U、好ましくは10,000~300,000U、より好ましくは50,000~300,000Uの酵素活性を有するように該ペルオキシダーゼが固定されていることが望ましい。

【0034】特異的結合物質がペプチドを有する物質、例えば、抗体、抗原もしくはハプテンである場合、または標識物質が酵素である場合、その固定量の測定は、色素結合法等の慣用のタンパク質定量法により測定し、タンパク質の量として算出する。特異的結合物質がオリゴヌクレオチドの場合は、固定後の遊離のオリゴヌクレオチドを260nmの吸光度を測定することにより算出

る。

【0035】このように担体に特異的結合物質および標識物質を固定させた後、例えば膜分離法や濾過、遠心分離法等の慣用の分離法によって、標識複合体を分離精製することができる。標識複合体は、水中に浸漬して保存してもよく、または凍結乾燥して保存してもよい。

【0036】本発明において試験片としては、吸水性基材上に、被検物質に特異的に結合し得る第1の特異的結合物質が固定化された固定相を有する試験片が挙げられる。試験片に用いられる吸水性基材は、被検試料を吸収できる基材、またはこれらを緩衝液によって希釈した希釈液を吸収する基材であればよい。本発明においては、被検試料中の被検物質と標識複合体中の第2の特異的結合物質や固定相の第1の特異的結合物質との十分な反応を行なうための時間を確保できるような吸水性基材が用いられる。好ましい具体例としては、適度な吸水速度を有する観点から、例えば、不織布、濾紙、ガラス繊維布、ガラスフィルター、ニトロセルロース、多孔質材料等が挙げられる。

【0037】吸水性基材の吸水性の程度は、5mm幅の短冊状に裁断した吸水性基材の片端部に水を浸漬し、1分間経過後の吸水距離が0.5~5cm程度のものが好ましい。親水性重合体を使用して吸水性基材の吸水性を調整することもできる。

【0038】本発明において、吸水性基材の形状は、被検試料を展開できる形状であれば特に限定されるものではなく、例えば、矩形のシート状(片状)やロッド状等が好ましい。

【0039】前記試験片の固定相に用いられる第1の特異的結合物質は、前記標識複合体に用いられる第2の特異的結合物質と同様である。例えば、標識複合体に用いられる第2の特異的結合物質が抗体の場合、固定相には、同じ抗体または同一抗原の別のエピトープを認識する抗体を使用することができる。標識複合体に用いられる第2の特異的結合物質が抗原やハプテンの場合、固定相には、同一の抗原、ハプテンあるいは第2の特異的結合物質とは異なるが被検物質と特異的に結合する抗原、抗体、ハプテン等が用いられる。標識複合体に用いられる第2の特異的結合物質がオリゴヌクレオチドの場合、固定相には、配列は異なるが被検物質の他の部分に対するオリゴヌクレオチドが用いられる。

【0040】固定相は、公知の物理吸着法、共有結合法等により作製されうる。また、固定相に使用する第1の特異的結合物質と親水性重合体とを含む溶液を吸水性基材に塗布した後、該親水性重合体を凝固させる凝固溶剤に浸漬することで固定相を作製することもできる。親水性重合体としては、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアルコール、ヒドロキシエチルセルロース等が挙げられる。凝固溶剤としては、アセトン、エタノール、メタノール、エーテル等が挙げられる。

【0041】固定相は、被検試料の吸液によって展開し移動してきた複合体を捕捉するために、吸水性基材上に特異的結合物質を好ましくは0.005~5mg/cm²塗布することが望ましい。

【0042】固定後の吸水性基材は、被検対象でない不活性なタンパク質の基材への非特異的吸着の防止、展開の容易性、固定した第1の特異的結合物質の保存安定性の観点から、ブロッキング剤、界面活性剤および糖を含有する溶液(処理液という)で処理されることが好ましい。ここで、使用するブロッキング剤としては、ウシ血清アルブミン、カゼイン、ゼラチン、スキムミルク等が挙げられる。界面活性剤としては、ポリオキシエチレン(10)オクチルフェニルエーテル、ポリオキシエチレンソルピタンモノラウレート、ポリオキシエチレンアルキルエーテルリン酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル等が挙げられる。前記処理液中のブロッキング剤の含有量は、好ましくは0.1~10重量%である。前記処理液中の界面活性剤の含有量は、好ましくは0.01~1重量%である。前記処理液中の糖の含有量は0.1~10重量%である。

【0043】本発明に用いられる試験片には、試料受領部(被検試料および標識複合体を供するための部分)と、展開組成液受領部(展開組成液を供給するための部分)とを設けてもよい。また、展開組成液、被検試料等に含まれる液体成分の接触により前記標識複合体を展開できるように、該標識複合体を試験片に固定してもよい。

【0044】また、本発明において、多価アルコール相を設けるには、多価アルコールを蒸留水、各種溶剤、緩衝液、生理食塩水等に溶解した溶液を、試験片に含浸させ、次いで乾燥させることで調製することができる。この場合の溶液中の多価アルコールの濃度は前記の各種の溶液100重量部に対して1~280重量部が好ましく、2~110重量部がさらに好ましい。

【0045】また本発明に用いられる試験片において、展開移動距離は、固定相での発色の均一性および発色感度の観点から、0.5cm以上となり、固定相までの被検試料の到達性、発色感度および測定時間の観点から、8cm以下となるように設定されていることが好ましい。

【0046】本発明においては、前記展開移動距離を得るように、試料受領部、固定相等を配置した試験片を用いることができる。

【0047】被検試料、試薬等の展開方法としては、例えば、試験片の一端側から、上記の方法で調製した標識複合体の溶液および展開組成液を加え、毛細管現象によって自然展開させる。また、試料受領部の反対端に吸水パッドを設けてもよく、これにより、試験片を展開する液体成分を吸収するので展開が容易に進行する。

【0048】について、固定相上で〔被検物質 - 標識複合体〕の複合体の形成の有無を検出する。〔被検物質 - 標識複合体〕の複合体の検出は、標識複合体中の標識物質を測定することにより検出することができ、着色粒子を有する標識複合体を用いた場合、固定相における呈色の有無により検出できる。固定相上で前記複合体が検出された場合（例えば、固定相における呈色等）、被検試料中に被検物質が存在することの指標となる。

【0049】

【実施例】調製例1：標識複合体溶液の調製

1) ラテックス粒子懸濁液の作製

スチレン50gと、アクリル酸0.5gと、トリエチレングリコールメタクリレート0.2gと、蒸留水440gとを含む混合液を窒素ガス雰囲気下で75℃に維持し、攪拌しながら、重合開始剤として過硫酸カリウム0.25gを蒸留水10gに溶解した水溶液を加え、10時間重合を行った。その結果、カルボキシル化された水分散性粒子としてカルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子（平均粒子径：0.2μm）を得た。得られたカルボキシル化ポリスチレンラテックス粒子を緩衝液（0.01M - ホウ酸緩衝液、pH8.2）に固形分濃度が5重量%になるよう分散して、ラテックス粒子懸濁液を得た。

【0050】2) 固定化

本実施例では、特異的結合物質として抗体（抗ペロ毒素1型抗体）を、さらに標識物質として酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼ）を、上記1) で作製したラテックス粒子に以下のようにして固定した。

【0051】前記1) で得られたラテックス粒子懸濁液3mlに、水溶性カルボジイミド〔同仁化学研究所製、1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩、10mg/ml、0.01M - ホウ酸緩衝液（pH8.2）〕0.6mlと、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ〔以下HRPと略す；和光純薬社製、56mg/ml（比活性250~350U/mg）、0.01M - ホウ酸緩衝液（pH8.2）〕1.8mlと、抗ペロ毒素1型抗体〔以下、抗VT1抗体と略す；トキシテクノロジー社製、2mg/ml、0.01M - ホウ酸緩衝液（pH8.2）〕2.1mlとを加えて4℃で16時間反応させた。次いで、得られた反応物について、洗浄液として0.01M - ホウ酸緩衝液（pH8.2）を用いて遠心分離洗浄を行い、前記0.01M - ホウ酸緩衝液で固形分濃度2.5重量%に調製し、抗VT1抗体とHRPとを固定化したラテックス粒子の懸濁液（標識複合体懸濁液という）を作製した。

【0052】得られた標識複合体において、標識複合体乾燥重量1gあたりの抗体（分子量約 1.6×10^5 ）固定化量は25.0mg、酵素（分子量約 4×10^4 ）の固定化量は20.0mg、および酵素活性は43300Uであった。

【0053】3) 標識複合体溶液の調製

前記標識複合体懸濁液を緩衝溶液（組成：0.01Mホウ酸緩衝液、pH8.2）で希釈して標識複合体溶液を調製した。希釈比は、標識複合体懸濁液：緩衝液 = 1：150とした。

【0054】調製例2：免疫クロマトグラフィー用試験片の作製

抗VT1抗体（トキシテクノロジー社製、1mg/ml、0.01M - リン酸緩衝液、0.9重量%NaCl含有、pH7.2）をニトロセルロースメンブレン（ワットマン社製、孔径12μm、PET（ポリエチレンテレフタレート）サポート付、6mm×60mm）の一端から30mmの箇所から1.5μm、ディスペンサーを用いてライン状（幅1mm）に塗布し、固定相（面積：6mm²）を配置したメンブレンを得た。得られたメンブレンを、ウシ血清アルブミン（オリエンタル酵母社製、1重量%）と、ブライサーフA212E（第一工業製薬社製、0.1重量%）と、サッカロース（和光純薬工業社製、1重量%）とを含む水溶液中に20分浸漬させた。次いで、得られたメンブレンを、室温で16時間乾燥させた。

【0055】次に、終濃度1重量%となるようにTMBをトルエンで溶解して得られた発色基質溶液1.2μlを、前記ニトロセルロースメンブレン上の固定相から上流5mm離れた箇所に塗布した。その後、得られたメンブレンを乾燥させて発色基質相とした。

【0056】固定相から発色基質相と同じ方向に10~22mmの箇所にポリエステル製不織布（7×7mm、厚さ1mm）を貼り合せ、試料受領部を作製した。また、固定相から試料受領部と同じ方向に27~39mmの箇所にポリエステル製不織布（7×12mm、厚さ1mm）を貼り合せ、展開組成液受領部を作製した。

【0057】さらに固定相から試料受領部と逆の方向に20~50mmの箇所に吸水剤基剤としてガラス繊維製不織布（ワットマン社製、GF/B、15×30mm、厚さ1mm）を貼り合せた。

【0058】調製例3：被検試料の調製

ペロ毒素1型（ナカライ社製）を緩衝溶液（pH8.0：0.2M NH₄Cl、0.9重量%NaCl、0.1重量%BSA）で既知濃度（0mg/mlおよび4mg/ml）にして、被検試料を調製した。

【0059】調製例4：展開組成液の調製

展開組成液〔組成：0.01Mリン酸緩衝液（pH7.0）、20mMイミダゾール、0.01重量%H₂O₂、0.12重量%硫酸デキストランNa〕を調製した。

【0060】試験方法

調製例3で調製した被検試料70μlを各試験片の試料受領部に供し、直ちに被検試料を展開させ、次いで、前記試験片の前記試料受領部に調製例1で得られた標識複

合体溶液 25 μl を供した。次いで展開組成液受領部に展開組成液 150 μl を供し、展開させた。展開後、試験片の固定相における 10 ~ 60 分後の発色の有無を目視観察した。

【0061】なお、判定基準は以下の通りである。

- + : 固定相に発色が見られる
- ± : 固定相に弱い発色が見られる
- + : 固定相にカゲ状の発色が見られる
- : 固定相に発色 (カゲ状の発色) が見られない

【0062】実施例 1

固定相を通過するヘキサントリオールの量が表 1 に示される量 (1.2 ~ 48 mg : 固定相の面積 10 mm² 当たり 2 ~ 80 mg) となるように、調製例 4 で得られた展開組成液にヘキサントリオールを添加したものを調製した。得られたヘキサントリオール含有展開組成液および調製例 2 で作製した試験片を用いて、上記の試験方法にてペロ毒素検出試験を行った。展開組成液は 150 μl 滴下するので、展開組成液中のヘキサントリオール濃度は 0.8 ~ 3.2% (w/v) となる。

【0063】比較例 1

調製例 4 で得られた展開組成液を使用して、上記の試験方法にてペロ毒素検出試験を行った。

【0064】実施例 1 および比較例 1 で得られた結果を、表 1 に示す。

【0065】

【表 1】

10

20

30

ヘキサントリオール量	実施例 1				比較例 1			
	12mg		36mg		0 mg		0 mg	
ヘキサントリオール濃度	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml
10分	-	+	-	+	-	+	-	+
20分	-	+	-	+	-	+	-	+
30分	-	+	-	+	-	+	-	+
60分	-	+	-	+	-	+	-	+
測定時間								

40

50

【0066】表 1 に示されるように、被検試料中に被検物質であるペロ毒素 1 型が存在しない場合、比較例 1 では試験開始から 20 分後にカゲ状発色が生じ、測定に支障をきたした。一方、実施例 1 においては、固定相を通過するヘキサントリオール量が 1.2 mg でカゲ状発色の発生を抑制 (20 分後) し、1.2 ~ 4.8 mg では試験開始から 60 分経過してもカゲ状発色は認められないことがわかる。

【0067】被検試料中に被検物質であるペロ毒素 1 型が存在する場合、実施例 1 においては、ヘキサントリオール量が 1.2 ~ 3.6 mg であっても、比較例 1 と同等の発色を示した。しかし、ヘキサントリオール量が 4.8 mg になると比較例 1 と比較して発色がやや低下した。

【0068】したがって、展開組成液にヘキサントリオ

ールを添加することによってカゲ状発色を抑制し、20分経過した後であっても被検物質の有無を高い確実性で判定できることが分かった。

【0069】実施例2

固定相を通過するプロパンジオールの量が表2に示される量(1.2~48mg:固定相の面積10mm²当たり2~80mg)となるように、調製例4で得られた展開組成液にプロパンジオールを添加したものを調製した。得られたプロパンジオール含有展開組成液および調製例2で作製した試験片を用いて、上記の試験方法にて10ベロ毒素検出試験を行った。展開組成液は150μl滴下するので、展開組成液中のプロパンジオール濃度は0.8~32%(w/v)となる。

【0070】実施例2および比較例1で得られた結果を、表2に示す。

【0071】

【表2】

プロパンジオール量 ベロ毒素1型濃度	比較例1				実施例2					
	0mg		1.2mg		12mg		36mg		48mg	
測定時間	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml
10分	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
20分	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
30分	+	+	+	+	-	+	-	+	-	+
60分	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

【0072】表2に示されるように、被検試料中に被検物質であるベロ毒素1型が存在しない場合、比較例1では試験開始から20分後にカゲ状発色が生じ、測定に支障をきたした。一方、実施例2においては、固定相を通過するプロパンジオール量が1.2~12mgでカゲ状発色の発生を抑制(20分後)し、36~48mgでは試験開始から60分経過してもカゲ状発色は認められなかった。

【0073】被検試料中に被検物質であるベロ毒素1型が存在する場合、実施例2においては、プロパンジオール量が1.2~36mgであっても、比較例1と同等の発色を示した。しかし、プロパンジオール量が48mgになると比較例1と比較して発色がやや低下した。

【0074】したがって、展開組成液にプロパンジオール

ルを添加することによってカゲ状発色を抑制し、20分経過した後であっても被検物質の有無を高い確実性で判定できることが分かった。

【0075】実施例3

ヘキサントリオールを1.2~4.8% (w/v)となるように蒸留水に溶解して得られた溶液を、調製例2で作製した試験片の展開組成液受領部に100μl含浸させ、次いで80℃で2時間乾燥して、ヘキサントリオール相を有する試験片を調製した。試験片に保持されたヘキサントリオールは、展開組成液受領部内で展開組成液10に溶解するため、表3に示される量(1.2~4.8mg : 固定相の面積10mm² 当たり2~80mg)のヘキサントリオールが固定相を通過することになる。得られた試験片および調製例4で得られた展開組成液を使用して、上記の試験方法にてペロ毒素検出試験を行った。

【0076】実施例3および比較例1で得られた結果を、表3に示す。

【0077】

【表3】

ヘキサントリオール量 ペロ毒素1型濃度 測定時間	実施例3							
	比較例1		1.2mg		36mg		48mg	
	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml	0mg/ml	4mg/ml
10分	-	+	-	+	-	+	-	+
20分	-	+	-	+	-	+	-	+
30分	-	+	-	+	-	+	-	+
60分	-	+	-	+	-	+	-	+

【0078】表3に示されるように、被検試料中に被検物質であるペロ毒素1型が存在しない場合、比較例1では試験開始から20分後にカゲ状発色が生じ、測定に支障をきたした。一方、実施例3においては、固定相を通過するヘキサントリオール量が1.2mgでカゲ状発色の発生を抑制(20分後)し、1.2~4.8mgでは試験開始から60分経過してもカゲ状発色は認められなかった。

【0079】被検試料中に被検物質であるペロ毒素1型が存在する場合、実施例3においては、ヘキサントリオール量が1.2~3.6mgであっても、比較例1と同等の発色を示した。しかし、ヘキサントリオール量が4.8mgになると比較例1と比較して発色がやや低下した。

【0080】したがって、展開組成液受領部にヘキサントリオールをあらかじめ固定することによってカゲ状発

色を抑制し、20分経過した後であっても被検物質の有無を高い確実性で測定できることが分かった。

【0081】

【発明の効果】本発明の免疫測定法によれば、多価アル

コールの存在下に測定を行なうという簡便な方法でカゲ状発色を抑制し、試験開始からの時間にかかわらず被検物質の有無を高い確実性で判定できるという優れた効果を奏する。

专利名称(译)	免疫测定法		
公开(公告)号	JP2002350443A	公开(公告)日	2002-12-04
申请号	JP2001153672	申请日	2001-05-23
[标]申请(专利权)人(译)	日东电工株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东电工株式会社		
[标]发明人	森岡量子 岡田研一		
发明人	森岡 量子 岡田 研一		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/531.B		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种免疫测定方法，通过限制阴影着色，无论测试开始的时间如何，都能确定地确定样本的存在。解决方案：在免疫色谱中，这种免疫分析方法检测试样中试样的存在情况 (a) 试样具有固定相固定第一特定结合物质的样品，该物质特异性地粘附在吸水性基材上的试样上下列 (b) 和 (c) 的复合物：(b) 在样品的固定相中由第一特定结合物质捕获的样品，和 (c) 固定标记物质和第二特异性的标记复合物在多元醇存在下将与样品特异性结合的物质粘合到载体上。

试剂	浓度	测定时间			
		10分	20分	30分	40分
第一试剂	400μg	+	+	+	+
	300μg	+	+	+	+
	200μg	+	+	+	+
	100μg	+	+	+	+
第二试剂	0μg	+	+	+	+
	100μg	+	+	+	+
多元醇	0.5%	+	+	+	+
	1%	+	+	+	+
	2%	+	+	+	+
	5%	+	+	+	+