

(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2012-58058

(P2012-58058A)

(43) 公開日 平成24年3月22日(2012.3.22)

(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 0 1 M	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/53 M	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	

審査請求 有 請求項の数 13 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2010-200793 (P2010-200793)	(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9月8日(2010.9.8)	(74) 代理人	100078662 弁理士 津国 肇
(11) 特許番号	特許第4638555号 (P4638555)	(74) 代理人	100116919 弁理士 齋藤 房幸
(45) 特許公報発行日	平成23年2月23日(2011.2.23)	(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

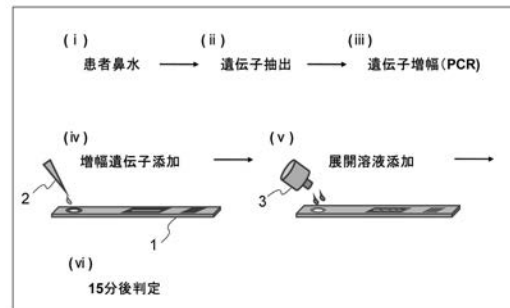
(54) 【発明の名称】 核酸又は免疫クロマトグラフィー用試薬組成物、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定方法及び核酸又は免疫クロマトグラフィー測定用キット

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】核酸又は免疫クロマトグラフィー測定を行うにあたり、分析対象物以外の成分の非特異的反応による結合を低減し、且つ分析対象物の分散能を高め、クロマト担体上の展開性を良化するとともに、特異的反応を促進することで、低濃度の分析対象物を用いても正確且つ迅速な判断ができる試薬組成物の提供。

【解決手段】重量平均分子量8000以上の水溶性高分子化合物、2価又は3価の金属の塩、非イオン性界面活性剤、及び、水溶性非プロトン性有機化合物を含有する核酸又は免疫クロマトグラフィー用試薬組成物。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

重量平均分子量 8000 以上の水溶性高分子化合物、2 価又は 3 価の金属の塩、非イオン性界面活性剤、及び、水溶性非プロトン性有機化合物を含有する核酸又は免疫クロマトグラフィー用試薬組成物。

【請求項 2】

重量平均分子量 8000 以上の水溶性高分子化合物が、ポリアルキレングリコール類、セルロース類、ビニル系高分子類、アミド系高分子類及びポリアニオンからなる群から選択される 1 種以上である、請求項 1 に記載の試薬組成物。

【請求項 3】

ポリアニオンが多糖アニオンである、請求項 2 に記載の試薬組成物。

【請求項 4】

多糖アニオンが、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン及びその塩からなる群から選択される 1 種以上である、請求項 3 に記載の試薬組成物。

【請求項 5】

水溶性非プロトン性有機化合物が、スルホキシド類及び N, N' - ジアルキルアミド類からなる群から選択される 1 種以上である、請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

【請求項 6】

2 価又は 3 価の金属の塩が、マグネシウム塩、カルシウム塩及びアルミニウム塩からなる群から選択される 1 種以上である、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

【請求項 7】

非イオン性界面活性剤が、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、トリステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン及びモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンからなる群から選択される 1 種以上である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

【請求項 8】

核酸クロマトグラフィー用である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

【請求項 9】

免疫クロマトグラフィー用である、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

【請求項 10】

核酸又は免疫クロマトグラフィーが金コロイド粒子を標識物質として使用する、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

【請求項 11】

核酸又は免疫クロマトグラフィーにおける展開液として使用する、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物を用いて測定検体を展開する工程を含む、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定方法。

【請求項 13】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の試薬組成物を測定検体の展開液として含む、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定用キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、核酸又は免疫クロマトグラフィーに使用される試薬組成物、それを使用する核酸又は免疫クロマトグラフィー測定方法、及びそれを含む核酸又は免疫クロマトグラフィー測定用キットに関する。

【背景技術】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 2 】

従来、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定において感度を上げるためには、固相に塗布する抗体や核酸の量を増加させるか、標識物質に結合させる抗体や核酸の量を増加させることが常套手段であった。

【 0 0 0 3 】

しかし、抗体や核酸などの反応体を増加させると、非特異的な反応が生じやすくなり、また、少量であると十分な感度が得られないという問題点があった。

【 0 0 0 4 】

核酸又は免疫クロマトグラフィーにおいて、種々の目的で各種の試薬成分が使用されている。ポリアニオン等の水溶性高分子化合物、無機塩類、界面活性剤などの添加物を加えて、非特異的な反応を抑えたり、感度を向上させたりする試みが行われてきた（特許文献 1～11）。

しかし、いずれの添加物の組み合わせも、未だ、非特異的な反応の抑制や感度、クロマト担体上の展開性の向上は十分には達成されていない。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 0 5 】

【 特許文献 1 】 特開 2 0 0 1 - 2 1 5 6 0 号公報

【 特許文献 2 】 特開 2 0 0 6 - 2 1 5 0 4 4 号公報

【 特許文献 3 】 特開 2 0 0 6 - 3 1 7 2 2 6 号公報

【 特許文献 4 】 特開 2 0 0 7 - 1 2 1 2 0 4 号公報

【 特許文献 5 】 特開 2 0 0 7 - 1 2 1 2 0 5 号公報

【 特許文献 6 】 特開 2 0 0 7 - 3 2 2 3 1 0 号公報

【 特許文献 7 】 特開 2 0 0 9 - 5 2 9 4 5 号公報

【 特許文献 8 】 特開 2 0 1 0 - 1 4 5 0 7 号公報

【 特許文献 9 】 特開 2 0 1 0 - 1 9 7 9 4 号公報

【 特許文献 1 0 】 特開 2 0 1 0 - 4 4 0 9 4 号公報

【 特許文献 1 1 】 特表 2 0 1 0 - 5 0 0 5 5 号パンフレット

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 6 】

本発明は、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定を行うにあたり、分析対象物以外の成分の非特異的反応による結合を低減し、且つ分析対象物の分散能を高めクロマト担体上の展開性を良化するとともに、特異的反応を促進することで、低濃度の分析対象物を用いても正確且つ迅速な判断ができるようにすることを課題とする。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 7 】

本発明者は、上記の課題が、特定の添加剤の組合せを使用することにより解決されることを知見して本発明を達成した。

【 0 0 0 8 】

本発明は、重量平均分子量 8 0 0 0 以上の水溶性高分子化合物、2 価又は 3 価の金属の塩、非イオン性界面活性剤、及び、水混和性非酸化性有機化合物を含有する核酸又は免疫クロマトグラフィー用試薬組成物である。

【 0 0 0 9 】

本発明は、上記の核酸又は免疫クロマトグラフィー用試薬組成物を用いて測定検体を展開する工程を含む、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定方法である。

【 0 0 1 0 】

本発明は、上記のクロマトグラフィー用試薬組成物を測定検体の展開液として含む、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定用キットである。

【 発明の効果 】

10

20

30

40

50

【0011】

本発明によれば、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定を行うにあたり、分析対象物以外の成分の非特異的反応による結合を低減し、且つ分析対象物の分散能を高めるとともに、特異的反応を促進することで、低濃度の分析対象物を用いても正確且つ迅速な判断を行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0012】

【図1】核酸クロマトグラフィー測定の概略工程図である。

【図2】核酸クロマトグラフィー測定用キットの概略図である。

【図3】核酸クロマトグラフィー測定の測定原理を示す概略図である。

10

【発明を実施するための形態】

【0013】

本発明の核酸又は免疫クロマトグラフィー用試薬組成物は、重量平均分子量8000以上の水溶性高分子化合物、2価又は3価の金属の塩、非イオン性界面活性剤、及び、水溶性非プロトン性有機化合物を含有する。

【0014】

(重量平均分子量8000以上の水溶性高分子化合物)

重量平均分子量8000以上の水溶性高分子化合物は、重量平均分子量が8000以上であり、かつ、水溶性を有する化合物であれば特に限定されない。重量平均分子量は、10000以上であるのが好ましい。前記水溶性高分子は重量平均分子量8000以上であれば重量平均分子量既知の市販の化合物を用いることができる。合成したものを用いる場合は、高分子の分子量測定に汎用されるゲル浸透クロマトグラフィー(以下GPC)により測定された重量平均分子量が8000以上のものを使用する。重量平均分子量が8000未満の場合、核酸のハイブリダイゼーションや抗原抗体反応に見られる分析対象物との特異的複合体を形成させる結合力が低下し、クロマトグラフィーによる検出感度が低下してしまう。より好ましくは重量平均分子量2万~100万の水溶性高分子が用いられる。重量平均分子量8000以上の水溶性高分子化合物における「水溶性」とは、20の水1Lに対して、化合物が10g以上、好ましくは50g以上溶解することをいう。

20

【0015】

重量平均分子量8000以上の水溶性高分子化合物は、たとえば、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、ポリエチレングリコール/ポリプロピレングリコールブロック共重合体等のポリアルキレングリコール類;メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロース等のセルロース類;ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコール、ポリビニルメチルエーテル等のビニル系高分子類;ポリメタクリルアミド、ポリアクリルアミド等のアミド系高分子類;及びポリアニオンからなる群から選択される1種以上である。

30

【0016】

ポリアニオンとしては、多糖アニオン、ポリグルタミン酸やポリアスパラギン酸等の合成ペプチド系アニオン、合成核酸系ポリアニオンが挙げられ、多糖アニオンが好ましい。

40

【0017】

多糖アニオンとしては、例えば、デキストラン硫酸、ヘパラン硫酸、コンドロイチン硫酸、デルマタン硫酸、ケラタン硫酸、ヒアルロン酸、ヘパリン及びその塩からなる群から選択される1種以上が挙げられる。塩として、ナトリウム、カリウム、マグネシウム塩などがある。中でも、入手の容易性と経済性からデキストラン硫酸及びその塩がより好ましい。

【0018】

重量平均分子量8000以上の水溶性高分子化合物の量は、試薬組成物に対して、好ましくは0.1~5重量%、より好ましくは0.5~3重量%である。

【0019】

50

分子量 8000 以上の水溶性高分子化合物は、分析対象物との特異的複合体を形成させる結合力を高め、特異的反応を促進する。

【0020】

(2価又は3価の金属の塩)

2価又は3価の金属は、2価又は3価の金属であれば特に限定されないが、例えば、マグネシウム、カルシウム等のアルカリ土類金属(2価)、ホウ素、アルミニウム等のアルミニウム族金属(3価)が挙げられ、好ましくはマグネシウム、カルシウム又はアルミニウムであり、特に好ましくはマグネシウム又はカルシウムであり、最も好ましくはマグネシウムである。アルカリ金属(1価)を用いた場合、展開速度が低下し、かつ、非特異反応も増大してしまう。

10

【0021】

2価又は3価の金属の塩のアニオンは、特に限定されないが、例えば、塩化物、臭化物等のハロゲン化物；硫酸塩；リン酸塩；炭酸塩；ホウ酸塩が挙げられる。好ましくは塩化物や臭化物等のハロゲン化物が用いられる。

【0022】

2価又は3価の金属の塩は、塩化マグネシウム、硫酸マグネシウム、リン酸マグネシウム、炭酸マグネシウム等のマグネシウム塩；塩化カルシウム、硫酸カルシウム、リン酸カルシウム等のカルシウム塩及び塩化アルミニウム、硫酸アルミニウム、炭酸アルミニウム等のアルミニウム塩からなる群から選択される1種以上であるのが好ましい。

20

【0023】

2価又は3価の金属の塩の量は、試薬組成物に対して、好ましくは0.1~100mM、より好ましくは0.5~50mM、さらに好ましくは1~10mMである。

2価又は3価の金属の塩は、免疫複体の非特異反応を起こさず毛細管現象の展開速度を高める。

【0024】

(非イオン性界面活性剤)

非イオン性界面活性剤は、例えば、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アルキルフェノールエーテル、アルキルグルコシド、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ショ糖脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、脂肪酸アルカノールアミドが挙げられる。非イオン性界面活性剤のHLBは、10~18が好ましく、13~18がより好ましい。非イオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルが好ましく、例えば、モノラウリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、モノステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン、トリステアリン酸ポリオキシエチレンソルビタン及びモノオレイン酸ポリオキシエチレンソルビタンからなる群から選択される1種以上が特に好ましい。

30

【0025】

非イオン性界面活性剤の量は、試薬組成物に対して、好ましくは0.1~5重量%、より好ましくは0.5~2.5重量%、さらに好ましくは0.5~1重量%である。

【0026】

(水溶性非プロトン性有機化合物)

水溶性非プロトン性有機化合物は、水溶性であり、プロトン性を有しない有機化合物であれば特に限定されない。「水溶性」とは、相分離することなく、水と任意の比率で混合されうる性質を意味し、好ましくは、20の水1Lに対して、化合物が10g以上、好ましくは50g以上溶解する有機化合物である。「非プロトン性」とは、酸性水素を含まず、水素結合供与体として作用しない性質を意味する。

40

【0027】

水溶性非プロトン性有機化合物としては、スルホキシド類、N,N'-ジアルキルアミド類、ケトン類、ニトリル類、環状エーテル類等が挙げられる。

【0028】

スルホキシド類として、ジメチルスルホキシド、メチルエチルスルホキシド、ジエチル

50

スルホキシド、ブチルエチルスルホキシド等が挙げられる。

【0029】

N, N' - ジアルキルアミド類として、ジメチルアセトアミド等のジアルキルアセトアミド、ジメチルホルムアミド等のジアルキルホルムアミド、N - メチル - ピロリドン、N - エチル - ピロリドン、N - (2 - ヒドロキシエチル) - 2 - ピロリドン等のN - アルキルピロリドンなどが挙げられる。

【0030】

ケトン類として、アセトン、アセチルアセトン、ジエチルケトン、メチルエチルケトン、メチルプロピルケトン、イソブチルメチルケトン、 - 、ブチロラクトン、 - パレロラクトン等が挙げられる。

10

【0031】

ニトリル類として、アセトニトリル、プロピオニトリル、ブチロニトリル等が挙げられる。

【0032】

環状エーテル類として、テトラヒドロフラン、2 - メチルテトラヒドロフラン、1, 4 - ジオキサン等が挙げられる。

【0033】

水溶性非プロトン性有機化合物としては、スルホキシド類、N, N' - ジアルキルアミド類が好ましく、スルホキシド類が特に好ましい。

【0034】

水溶性非プロトン性有機化合物の量は、試薬組成物に対して、好ましくは0.2 ~ 5重量%、より好ましくは0.5 ~ 3重量%である。

20

【0035】

水溶性非プロトン性有機化合物は、毛細管現象による展開中に分析対象物以外のものが融着、凝集することによって起こる展開液の不均一性を改善し、非特異的反応を引き起こしにくくする。

【0036】

本発明の試薬組成物は、通常、水を溶媒として含むものであり、上記の成分を水、例えば超純水に混和して得ることができる。

【0037】

(核酸又は免疫クロマトグラフィー)

本発明の試薬組成物は、核酸又は免疫クロマトグラフィーに用いられるものである。

核酸クロマトグラフィーは、核酸のハイブリダイゼーションに基づくものである。

30

【0038】

免疫クロマトグラフィーは、抗原抗体反応に基づくものであれば、特に限定されず、例えば、競合法、サンドイッチ法があり、その中でもサンドイッチ法が汎用されている。

【0039】

核酸又は免疫クロマトグラフィーは、分析対象物である核酸や抗原等を標識するために、金、銀又は白金などの貴金属コロイド粒子、酸化鉄などの金属酸化物コロイド粒子、ラテックス粒子等を標識物質として使用することができ、金コロイド粒子を使用するのが好ましい。これらのコロイド状金属粒子の平均粒径は1 ~ 500 nm、特に強い色調が得られる10 nm ~ 150 nmであることが好ましく、より好ましくは40 ~ 100 nmの範囲内である。標識物質は分析対象物に結合能を有する蛋白質、特異的な結合能を有する相補的な核酸や抗体との複合体を形成し、分析対象物を標識するための標識試薬として使用され、クロマトグラフ媒体上で標識試薬を展開する際は分析対象物を含む試料と同時、あるいは、後に展開できる態様であれば良い。標識試薬はクロマトグラフ媒体の任意の部位に乾燥保持させて後、展開液や試料希釈液をその上流のサンプルパッド (試料添加部分) などに供給・滴下し展開させ、標識試薬保持部位から溶出させて展開させることができる。また、展開液や希釈液中に分散させて分散液とし、クロマトグラフ媒体上に展開させ使用することもできる。保存の観点から、標識試薬を予めクロマトグラフ媒体の任意の部位

40

50

に乾燥保持させることが好ましい。

【0040】

本発明の試薬組成物は、ブロッキング剤、例えばウシ血清アルブミン、牛乳由来たんぱく質、スキムミルク、カゼイン、ゼラチン等の蛋白質の他、Blocking Peptide Fragment (TOYOBO)、変性魚DNA、酵母由来tRNA、CE510 (JSR Corporation)などの市販の親水性高分子ポリマー等のブロッキング剤を含むことが好ましい。ブロッキング剤を共存させることにより、感度を低下させることなくバックグラウンドを低下できるので、S/N比を改善できる。

本発明の試薬組成物は、本発明の効果を奏する限り、リン酸塩、トリスヒドロキシメチルアミノメタン塩酸塩、炭酸塩、グリシンなどのアミノ酸、グッドバッファーなどの緩衝剤、核酸又は免疫クロマトグラフィー用の試薬組成物として慣用の成分を含むことができる。

【0041】

本発明の試薬組成物は、核酸又は免疫クロマトグラフィーにおける展開液として使用できる。展開液としては、通常、溶媒として水を用い、これに重量平均分子量8000以上の水溶性高分子化合物、2価又は3価の金属の塩、非イオン性界面活性剤、及び、水溶性非プロトン性有機化合物を加える。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。展開液として用いる場合には、検出する分析対象物を含む試料と展開液を予め混合したものを、クロマトグラフ媒体、標識試薬保持部位、あるいは、サンプルパッド上に供給・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上に供給・滴下した後、展開液をサンプルパッド上に供給・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クロマトグラフ媒体、標識試薬保持部位、あるいはサンプルパッド上に供給・滴下することにより使用できる。その他に、本発明の試薬組成物は、核酸又は免疫クロマトグラフィーにおいて、サンプルパッドや標識試薬の乾燥保持部位に予め保持させることもできる。希釈剤として使用された本発明の試薬組成物やサンプルパッドあるいは標識試薬の乾燥保持部位に保持された本発明の試薬組成物は、その後の工程で、展開液又はその一部として使用される。標識試薬の乾燥保持部位に保持させる場合、展開の際に多少の凝集が乗じることがあるため、展開液、希釈液又はそれらの一部、あるいはサンプルパッドに予め保持させる態様が好ましい。

【0042】

本発明の分析対象物としては、それと特異的に結合する物質が存在するもしくは製造できるものであればよく、特に限定されない。「特異的に結合する」とは、生体分子が持つ親和力に基づいて結合することを意味する。このような親和力に基づく結合としては、抗原と抗体との結合が代表的なものであり、免疫測定法で広く利用されるが、このような結合のみならず、本発明では、糖とレクチンとの結合、ホルモンと受容体との結合、酵素と阻害剤との結合、核酸と相補的な核酸、核酸と核酸との結合能を有する蛋白質との結合なども利用できる。分析対象物が完全抗原といったそれ自体が抗原性を有するものであっても、もしくはハプテン(不完全抗原)といったそれ自体が抗原性を有しなくても化学的変成物とすることにより抗原性を持つに至るものであってもよい。これらの分析対象物と特異的に結合する検出物質が存在するもしくは製造できるものであればよく、検出物質としては分析対象物の核酸に相補的な核酸若しくは核酸結合蛋白質、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体等が挙げられる。本発明の分析対象物を例示すれば、培養細胞株、末梢血あるいは細菌、ウイルス等の微生物等に含まれる核酸(一本鎖核酸あるいは二本鎖核酸)若しくはその増幅物、癌胎児性抗原(CEA)、HER2タンパク、前立腺特異抗原(PSA)、CA19-9、 α -フェトプロテイン(AFP)、免疫抑制酸性タンパク(IPA)、CA15-3、CA125、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、便潜血、トロポニンI、トロポニンT、CK-MB、CRP、ヒト絨毛性ゴナドトロピン(HCG)、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、梅毒抗体、インフルエンザウイルス、クラミジア抗原、A群溶連菌抗原、HBs抗体、HB

10

20

30

40

50

s 抗原、ロタウイルス、アデノウイルス、アルブミン、糖化アルブミン、及び、花粉、ダニ、室内塵、食品などのアレルゲン、アレルゲン特異的 I g E 等が挙げられる。好ましくは、培養細胞株、末梢血あるいは細菌、ウイルス等の微生物等に含まれる核酸が用いられ、具体的には、DNA、RNA、オリゴヌクレオチド、ポリヌクレオチド、それらの増幅物などが挙げられる。それらは、核酸そのものを分析対象物としても良いし、標識試薬との結合能を有する結合基や結合蛋白質で修飾された核酸であっても良い。

上記被検出物質を含む試料としては、例えば、生体試料、即ち、全血、血清、血漿、尿、唾液、喀痰、鼻腔又は咽頭拭い液、髄液、羊水、乳頭分泌液、涙、汗、皮膚からの浸出液、組織や細胞及び便からの抽出液等の他、牛乳、卵、小麦、豆、牛肉、豚肉、鶏肉などやそれらを含む食品等の抽出液等が挙げられる。また、培養細胞株、末梢血あるいは細菌、ウイルス等の微生物等に含まれる核酸の抽出液、抽出された核酸の増幅物を含む液、あるいはそれら核酸と結合能を有する結合基や結合蛋白質で修飾された核酸を含む液が挙げられるがこれらに限定されない。

【0043】

以下に、核酸クロマトグラフィーについて、検出方法、判定方法及び検出原理の例についてサンドイッチ法を用いて説明する。

【0044】

(検出方法の例)

検出方法の例を図1に示す。(i)分析試料(例えば、鼻水)を採取する。(ii)分析試料からウイルス等の遺伝子等を抽出する。(iii)必要に応じて、抽出した遺伝子等をPCR法等により遺伝子増幅装置を用いて増幅する。(iv)遺伝子等を免疫測定用キットに添加する。(v)展開液を添加して遺伝子等を展開する。(vi)例えば15分後に、陽性又は陰性を判定する。

【0045】

(判定方法)

判定方法を図2に示す。陽性又は陰性の判定は、赤いラインの有無で決定する。Testライン(T位置)に赤いラインが現れれば、対象ウイルス等陽性(図2(a))、出現しなければ、対象ウイルス等陰性(図2(b))となる。この時internalコントロールライン(I位置)は、患者の鼻等からウイルス等の検体を採取する際に一緒に含まれる患者自身の正常ヒト細胞を検出する。そのため検体採取の際の分析試料の採取が不適切な場合(例えば、鼻腔ぬぐいが不十分な場合)や、あるいは遺伝子等の増幅(PCR)に不具合が生じた場合には、internalコントロールラインが出現せず、検査のやり直しとなる。またFlowコントロールライン(C位置)が出現しない場合は、測定に不具合が生じたこととなり、再検査となる。

【0046】

(検出原理)

図3に測定原理を示す。免疫測定用キットに添加された増幅遺伝子(例えばビオチン修飾され増幅された一本鎖DNA)等は、標識物質(例えば、金コロイド)に、例えばビオチン-ストレプトアビジンを介して結合する。その後、展開液を添加すると、増幅遺伝子-金コロイド複合体は毛細管現象によりTライン及びIラインに固定されたDNA上を移動する。Tラインには対象ウイルス等由来のDNAにのみ結合する相補DNAが、Iラインには正常ヒト細胞由来のDNAにのみ結合する相補DNAがあらかじめ固定されているため、陽性の場合には金コロイドによる赤いラインを形成する。

【0047】

Cラインには、標識物質(例えば、ストレプトアビジン結合金コロイド)と結合する例えばビオチン標識タンパク質が固定されており、展開が良好に行われた場合には、Cラインに金コロイドによる赤いラインが生じる。

【0048】

本発明は、さらに、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定方法であり、この方法は、前記の試薬組成物を用いて測定検体を展開する工程を含む。この工程は、前記の試薬組成物

10

20

30

40

50

を測定試料の希釈剤として用い、あるいは、サンプルパッドに予め保持させ、これをその後の展開に際して、展開液の少なくとも一部とする態様を包含する。

本発明は核酸又は免疫クロマトグラフィー測定キットであり、このキットは、前記の試薬組成物を測定検体の展開液として含む。このキットは、前記の試薬組成物を測定検体の希釈剤として含むか、あるいは、サンプルパッド等に予め保持し、希釈後に、これが展開液として使用される態様も含む。すなわち、展開液は、検出する分析対象物を含む試料と予め混合するために使用でき、この混合液をクロマトグラフ媒体、標識試薬保持部位、あるいは、サンプルパッド上に供給・滴下して展開させることもできる。また、先に試料をサンプルパッド上に供給・滴下した後、展開液をサンプルパッド上に供給・滴下して展開させてもよい。展開液を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クロマトグラフ媒体、標識試薬保持部位、あるいはサンプルパッド上に供給・滴下することにより使用できる。その他に、展開液は、核酸又は免疫クロマトグラフィーにおいて、サンプルパッドや標識試薬の乾燥保持部位に予め保持させることもできる。希釈剤として使用された展開液やサンプルパッドあるいは標識試薬の乾燥保持部位に保持された展開液は、その後の展開工程における展開液の全部又はその一部として使用される。標識試薬の乾燥保持部位に保持させる場合、展開の際に多少の凝集が乗じることがあるため好ましくなく、前記の試薬組成物を展開液（希釈液としての使用を含む）又はその一部、あるいはサンプルパッドに予め保持させる態様が好ましい。

10

【実施例】

【0049】

20

実施例及び比較例により本発明をより詳しく説明する。％は、重量基準である。

【0050】

1. 核酸クロマトグラフィー

〔1. 捕獲プローブ用希釈液の作成〕

塩化ナトリウムを87.7g、及びクエン酸ナトリウム2水和物を44.1g秤量し、精製水800mLに溶解し、pH7.0に調整した。この溶液を1000mLにメスアップして、オートクレーブ滅菌を行って捕獲プローブ用希釈液を作成した。

【0051】

〔2. クロマトグラフ媒体上への反応部位の作製〕

インフルエンザAウイルス捕獲プローブをプローブ用希釈液で2.0μMの濃度になるように希釈した。この液を、塗布機(BioDot社製)を用いて、25×2.5cmのニトロセルロース膜(ミリポア社製)に塗布し、50で5分間乾燥させた後、さらに80で1時間乾燥させてクロマトグラフ媒体上の反応部位を作製した。

30

【0052】

〔3. 標識試薬溶液の作製〕

金コロイド懸濁液(田中貴金属工業社製:平均粒子径40nm)20mLに40mMのリン酸緩衝液(pH8.5)1mLを加えて攪拌した。次に、リン酸緩衝液(pH8.5)で0.01mg/mLの濃度になるように希釈したストレプトアビジンを4mL加え、室温で15分間静置した。次いで、CE510(JSRCorporation)を1mL加え、室温で15分間静置した。8000×gで15分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清を除去し、1重量%の牛血清アルブミン(BSA)を含む緩衝液(pH7.4)4mLを加えて標識試薬溶液を作成した。

40

【0053】

〔4. クロマトグラフ媒体の作製〕

上記3で作製した標識試薬溶液400μLをグラスファイバー製パッド(16mm×100mm)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、標識試薬保持部材とした。次いで、パッキン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、標識試薬保持部材、試料を添加する部分に用いるサンプルパッド(ミリポア社製:300mm×30mm)、及び展開した試料、余剰の標識試薬を吸収するための吸収パッドを貼り合わせた。最後に裁断機で幅が5mmとなるように裁断し、クロマトグラフ媒体とした

50

。

【 0 0 5 4 】

〔 5 . 展 開 液 の 調 製 〕

(実 施 例 1 ~ 8 及 び 比 較 例 1 ~ 4)

表 1 に 記 載 の 量 で、 超 純 水 に、 1 0 % T w e e n 2 0、 0 . 1 M 硫 酸 マ グ ネ シ ウ ム、 ジ メ チ ル ス ル ホ キ シ ド、 2 0 % デ キ ス ト ラ ン 硫 酸 ナ ト リ ウ ム (重 量 平 均 分 子 量 : 5 0 万)、 及 び 2 % と な る よ う に C E 5 1 0 (J S R C o r p o r a t i o n) を 加 え て 混 和 し た 。 さ ら に 防 腐 剤 と し て 1 0 % ア ジ 化 ナ ト リ ウ ム を 0 . 0 5 % と な る よ う に 加 え て 混 和 し て 試 薬 組 成 物 を 得 た。

【 0 0 5 5 】

【 表 1 】

10

実施例/ 比較例	デキストラン硫酸 ナトリウム (%)	硫酸マグネシウム (mM)	ジメチルスルホキシド (%)	Tween 20 (%)
比較例 1	0	5	0.95	1
実施例 1	0.5	5	0.95	1
実施例 2	3	5	0.95	1
比較例 2	2	0	0.95	1
実施例 3	2	1	0.95	1
実施例 4	2	20	0.95	1
比較例 3	2	5	0	1
実施例 5	2	5	0.5	1
実施例 6	2	5	3	1
比較例 4	2	5	0.95	0
実施例 7	2	5	0.95	0.5
実施例 8	2	5	0.95	2.5

20

30

【 0 0 5 6 】

(実 施 例 9 ~ 1 4 及 び 比 較 例 5 ~ 9)

超 純 水 に、 表 2 に 示 す よ う な 種 類 で、 重 量 平 均 分 子 量 8 0 0 0 以 上 の 水 溶 性 高 分 子 を 2 %、 2 価 又 は 3 価 の 金 属 の 塩 を 5 m M、 非 イ オ ン 性 界 面 活 性 剤 を 1 %、 水 溶 性 非 プ ロ ト ン 性 有 機 化 合 物 を 0 . 9 5 %、 及 び C E 5 1 0 (J S R C o r p o r a t i o n) を 2 % と な る よ う に 加 え て 混 和 し た 。 さ ら に 防 腐 剤 と し て 1 0 % ア ジ 化 ナ ト リ ウ ム を 0 . 0 5 % と な る よ う に 加 え 混 和 し て 実 施 例 9 ~ 1 4 の 試 薬 組 成 物 を 得 た。

【 0 0 5 7 】

超 純 水 に、 表 2 に 示 す よ う な 種 類 で、 水 溶 性 高 分 子 を 2 %、 金 属 塩 を 5 m M、 界 面 活 性 剤 を 1 %、 イ ソ プ ロ パ ノール 0 . 9 5 %、 C E 5 1 0 を 2 % 及 び ア ジ 化 ナ ト リ ウ ム を 0 . 0 5 % と な る よ う に 加 え 混 和 し て 比 較 例 5 ~ 9 の 試 薬 組 成 物 を 得 た。

40

【 0 0 5 8 】

【表 2】

成分		実施例						比較例				
		9	10	11	12	13	14	5	6	7	8	9
水溶性高分子	デキストラン硫酸ナトリウム (重量平均分子量：50万)	○			○	○	○			○	○	○
	ヒアルロン酸ナトリウム (重量平均分子量：15万)		○									
	ポリエチレングリコール (重量平均分子量：20000)			○								
	ポリエチレングリコール (重量平均分子量：6000)							○				
	デキストラン (重量平均分子量：6000)								○			
2価又は3価の 金属の塩	硫酸マグネシウム	○	○	○			○	○	○		○	○
	塩化カルシウム				○							
	炭酸アルミニウム					○						
	塩化リチウム、塩化ナトリウム、 塩化カリウム又はリン酸ナトリウム									○		
水混和性非酸化 性有機化合物	DMSO	○	○	○	○	○		○	○	○		○
	NMP						○					
	イソプロパノール										○	
非イオン性界面 活性剤	モノラウリン酸ポリオキシエチレ ンソルビタン	○	○	○	○	○		○	○	○	○	
	モノステアリン酸ポリオキシエチ レンソルビタン						○					
	コール酸ナトリウム (陰イオン性 界面活性剤)											○

10

20

30

【0059】

〔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インフルエンザAウイルスの存在の有無を測定した。すなわちインフルエンザウイルス感染患者の鼻水から抽出したインフルエンザAウイルスの遺伝子を増幅する際にビオチンで修飾され一本鎖DNAとして増幅し、 2.0×10^6 copies/ μ L (copy = 複製物1分子)の陽性検体を得た。この15 μ Lを試料添加孔に添加した。その後、ただちに展開液100 μ Lを試料添加孔に添加した。15分後にラインの形成の有無を目視で確認した。尚、インフルエンザAウイルスに感染していない正常人から採取した陰性検体も、鼻水から抽出し同様に作成及び測定した。

40

【0060】

〔7. 試験例1〕

分析対象物 (DNA量) とラインの色の濃さ (すなわち発色強度) との間に、 $y = M$ の関係が成り立つとして考えた (表4)。その理由は、金コロイドおよびニトロセルロース膜に固定された相補DNAは十分量用意されているため、添加したDNAの量に応じてニトロセルロース膜のTラインあるいはIライン上に形成される複合体の量が増加し、強

50

い発色強度が得られることになるからである。分析試料にDNAが入っていない場合は金コロイドのみが展開液とともに展開されるが、この金コロイドは膜に固定されたDNAと反応することはなく、ラインが形成されることはない。

【0061】

実施例1～8及び比較例1～4の試薬組成物を展開液として用いて、陽性検体（ 2.0×10^6 copies/ μ L）の4倍希釈液、6倍希釈液及び8倍希釈液並びに陰性検体のそれぞれの発色及び展開ムラを試験した。

【0062】

発色は、以下の基準で試料展開10分後に目視で発色強度を評価した。

- +++：非常に強く標識物質の赤色が確認されるもの。
- ++：強く標識物質の赤色が確認されるもの。
- +
- ±
-

10

展開ムラは、展開中の赤色金コロイドの先端流形を目視する方法で評価した。

【0063】

試験結果を表3に示す。

【表3】

実施例／ 比較例	陰性検体	陽性検体			展開ムラ
		8倍希釈	6倍希釈	4倍希釈	
比較例1	—	—	—	—	無
実施例1	—	+	+	++	無
実施例2	—	+	++	+++	無
比較例2	+	+	++	+++	有
実施例3	—	+	++	+++	無
実施例4	—	+	+	++	無
比較例3	+	+	++	+++	有
実施例5	—	+	++	+++	無
実施例6	—	+	++	+++	無
比較例4	—	—	±	±	無
比較例7	—	+	++	+++	無
比較例8	—	+	++	+++	無

20

30

【0064】

〔8．試験例2〕

実施例9～14及び比較例5～9の試薬組成物を展開液として用いて、陽性検体の4倍希釈液、6倍希釈液及び8倍希釈液並びに陰性検体のそれぞれの発色及び展開ムラを試験した。その結果を表4に示す。

40

【0065】

【表 4】

発色強度		実施例						比較例				
		9	10	11	12	13	14	5	6	7	8	9
陰性検体		-	-	-	-	-	-	-	-	+	±	-
陽性検体	8倍希釈	+	+	±	+	+	+	-	-	+	+	-
	6倍希釈	++	++	+	++	+	++	-	-	++	++	±
	4倍希釈	+++	++	++	++	++	++	-	±	+++	+++	±
展開ムラ		無	無	無	無	無	無	有	無	有	有	無

10

【0066】

2. 免疫クロマトグラフィー

〔1. 捕獲抗体用希釈液の作成〕

イソプロピルアルコールを50mMリン酸緩衝液(pH7.4)で5%となるように混和希釈し捕獲抗体用希釈液を作成した。

【0067】

〔2. クロマトグラフ媒体上への反応部位の作製〕

インフルエンザAウイルス捕獲抗体(マウス由来抗インフルエンザAモノクローナル抗体(第一抗体))を抗体用希釈液で1.0mg/mlの濃度になるように希釈した。この液を、塗布機(BioDot社製)を用いて、25×2.5cmのニトロセルロース膜(ミリポア社製)に塗布し、50℃で5分間乾燥させた後、さらに室温で1時間乾燥させてクロマトグラフ媒体上の反応部位を作製した。

20

【0068】

〔3. 標識物質溶液の作製〕

金コロイド懸濁液(田中貴金属工業社製:平均粒子径40nm)0.5mlに、リン酸緩衝液(pH7.4)で0.05mg/mlの濃度になるように希釈したマウス由来抗インフルエンザAモノクローナル抗体(第二抗体)を0.1ml加え、室温で10分間静置した。次いで、1重量%の牛血清アルブミン(BSA)を含むリン酸緩衝液(pH7.4)を0.1ml加え、更に室温で10分間静置した。その後、十分攪拌した後、8000×gで15分間遠心分離を行い、上清を除去した後、0.5重量%のBSAを含むリン酸緩衝液(pH7.4)を2ml加えた。以上の手順で標識試薬溶液を作製した。

30

【0069】

〔4. クロマトグラフ媒体の作製〕

上記作製した標識試薬溶液を15mm×300mmのグラスファイバーパッド(ミリポア社製)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、標識試薬保持部材を作製した。次に、パッキングシートから成る基材に、上記作製したクロマトグラフィー媒体、標識試薬保持部材、試料を添加する部分に用いるサンプルパッド(ミリポア社製:300mm×30mm)、及び展開した試料、余剰の標識試薬を吸収するための吸収パッド

40

【0070】

〔5. 展開液の調製〕

(実施例15及び比較例10~13)

表5に記載するように、超純水に、10%Tween20を1%、0.1M硫酸マグネシウムを5mM、ジメチルスルホキシドを0.95%、20%デキストラン硫酸ナトリウム(重量平均分子量:50万)を2%、及びCE510(JSRCorporation)を2%となるように加えて混和した。さらに、防腐剤として10%アジ化ナトリウムを0.05%となるように加えて混和して、実施例15及び比較例10~13の試薬組成

50

物を得た。

【 0 0 7 1 】

【 表 5 】

成分	添加量	実施例 1 5	比較例 1 0	比較例 1 1	比較例 1 2	比較例 1 3
デキストラン硫酸 ナトリウム	2%	○		○	○	○
硫酸マグネシウム	5 mM	○	○		○	○
DMSO	0. 9 5%	○	○	○		○
Twee n 2 0	1%	○	○	○	○	

10

【 0 0 7 2 】

〔 6 . 測定 〕

上記で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インフルエンザ A ウィルスの存在の有無を測定した。吸引トラップの片方の管を吸引ポンプに、もう片方の管をインフルエンザ A に感染していない人の鼻腔の奥部まで挿入し、吸引ポンプを陰圧にして鼻汁を採取した。採取した鼻汁を上記作成した展開液で 2 0 倍に希釈し、これを陰性検体試料とした。また、陰性検体試料に、蛋白濃度が 2 5 n g / m L、5 0 n g / m L となるように市販の不活化インフルエンザ A ウィルスを加えたものを陽性検体試料とした。

20

【 0 0 7 3 】

〔 7 . 試験例 1 〕

陰性検体試料、陽性検体試料とも 1 5 0 μ L をイムノクロマトグラフィー用試験片のサンプルパッド上に載せて展開させ、1 5 分後に目視判定をした。発色強度及び展開ムラの基準は核酸クロマトグラフィーと同様の基準とした。

試験結果を表 6 に示す。

【 0 0 7 4 】

【 表 6 】

発色強度	実施例 1 5	比較例 1 0	比較例 1 1	比較例 1 2	比較例 1 3
陰性検体	—	—	±	±	—
陽性検体	8 倍希釈	+	±	+	±
	6 倍希釈	++	+	++	+
	4 倍希釈	++	+	++	++
展開ムラ	無	無	無	有	無

30

【 産業上の利用可能性 〕

【 0 0 7 5 】

本発明によれば、核酸又は免疫クロマトグラフィー測定において、分析対象物以外の成分の非特異的反応による結合を低減し、且つ分析対象物の分散能を高めるとともに、特異的反応を促進することで、低濃度の分析対象物を用いても正確且つ迅速な判断を行うことができる。

40

【 符号の説明 〕

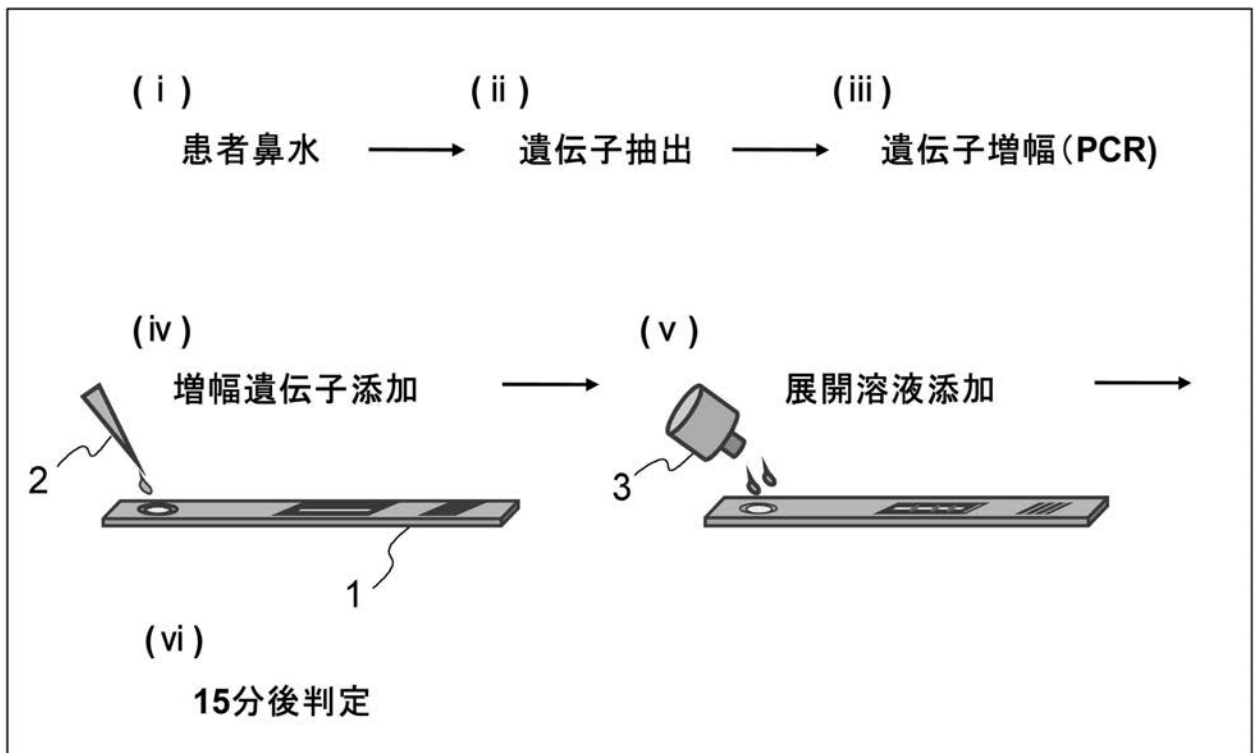
【 0 0 7 6 】

- 1 : クロマトグラフ媒体
- 2 : 増幅した遺伝子
- 3 : 展開液
- 4 : 陰性の発色ストリップ
- 5 : 陽性の発色ストリップ

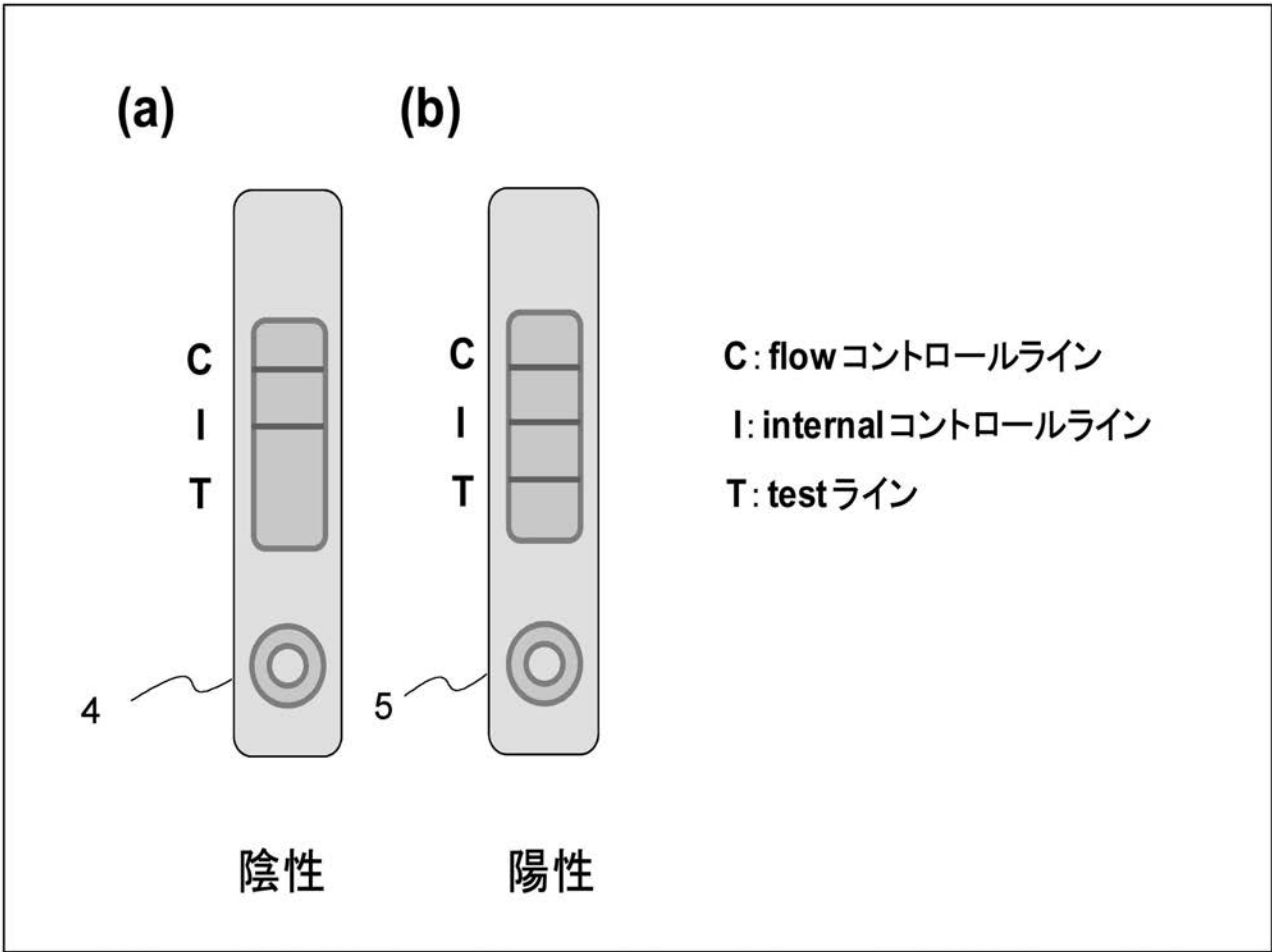
50

- 6 : 増幅した D N A
- 7 : 展開液
- 8 : 金コロイド
- 9 : 膜固定プローブ
- 10 : ニトロセルロース膜

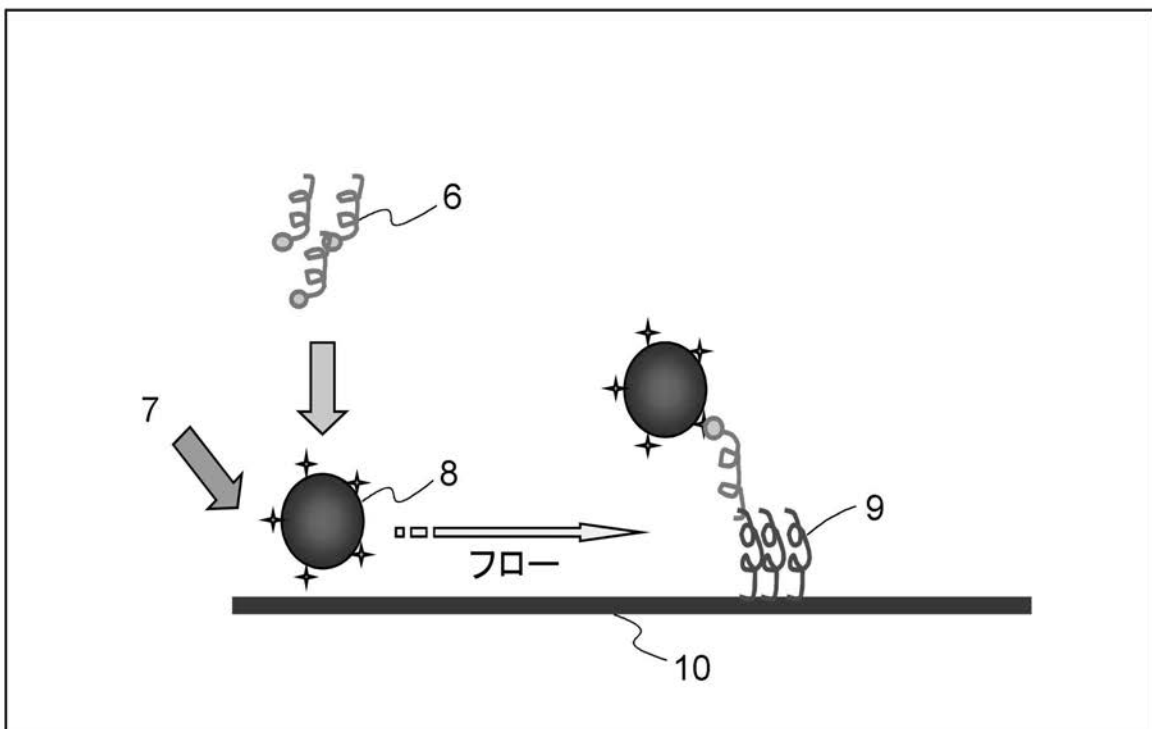
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



专利名称(译)	用于核酸或免疫层析的试剂组合物，用于测量核酸或免疫层析的方法，以及用于测量核酸或免疫层析的试剂盒		
公开(公告)号	JP2012058058A	公开(公告)日	2012-03-22
申请号	JP2010200793	申请日	2010-09-08
[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		
发明人	榊原 雄広		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N30/00 C07K16/1018 C12Q1/6804 G01N33/54393 G01N33/558 G01N2333/11 Y10T436/143333		
FI分类号	G01N33/543.501.M G01N33/543.521 G01N33/53.M G01N33/543.541.Z G01N33/531.B		
代理人(译)	津国 肇		
其他公开文献	JP4638555B1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：减少由于核酸或免疫色谱法测量中的非特异性反应而导致的非分析物成分的结合，增强分析物的分散性并改善在色谱载体上的显影性。同时，提供了一种试剂组合物，即使使用低浓度的分析物，该试剂组合物也能促进特定反应，从而能够准确，快速地进行测定。核酸或免疫色谱，其包含重均分子量为8,000或更高的水溶性高分子化合物，二价或三价金属的盐，非离子表面活性剂和水溶性非质子有机化合物。试剂组成。[选型图]图1

