

(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2009-186359

(P2009-186359A)

(43) 公開日 平成21年8月20日(2009.8.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569	L

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2008-27582 (P2008-27582)	(71) 出願人	000217228 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20年2月7日(2008.2.7)	(74) 代理人	100080609 弁理士 大島 正孝
		(72) 発明者	木谷 佳子 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
		(72) 発明者	岩本 久彦 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
		(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】 免疫学的測定用の検体処理試薬組成物

(57) 【要約】

【課題】感度を低下させずに非特異的反応を抑制して免疫学的測定を正確に行うための検体処理試薬組成物の提供。

【解決手段】片末端にアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体を含有する免疫学的測定用の検体処理試薬組成物。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

片末端にアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体を含有することを特徴とする免疫学的測定用の検体処理試薬組成物。

## 【請求項 2】

片末端に炭素数が 1 ~ 18 のアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体を含有することを特徴とする免疫学的測定用の検体処理試薬組成物。

## 【請求項 3】

片末端にアルキル基を有しそしてポリオキシエチレンのオキシエチレン繰り返し単位に対するポリオキシプロピレンのオキシプロピレン繰り返し単位のモル比が 0.1 ~ 1.5 の範囲である、ポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体を含有することを特徴とする免疫学的測定用の検体処理試薬組成物。

10

## 【請求項 4】

片末端に炭素数が 1 ~ 18 のアルキル基を有しそしてポリオキシエチレンのオキシエチレン繰り返し単位に対するポリオキシプロピレンのオキシプロピレン繰り返し単位のモル比が 0.1 ~ 1.5 の範囲である、ポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体を含有することを特徴とする免疫学的測定用の検体処理試薬組成物。

## 【請求項 5】

片末端にアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体の濃度が 0.05 ~ 2 重量%である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の検体処理試薬組成物。

20

## 【請求項 6】

牛血清アルブミンを 1 重量%以上の濃度で含有する請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の検体処理試薬組成物。

## 【請求項 7】

免疫学的測定用の検体が鼻汁、痰またはぬぐい液である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の検体処理試薬組成物。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

30

## 【0001】

本発明は免疫学的測定用の検体処理試薬組成物に関する。さらに詳しくは、インフルエンザウイルス検体の如き免疫学的に測定される検体を測定前に処理するための処理試薬組成物に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

インフルエンザウイルス検体の如き鼻汁・痰・咽頭拭い液などの粘膜成分を検体として用いる場合、被検体中に被検出物質が存在していない場合でも、被検出物質が存在しているかのごとく判定してしまうことがある。

このような偽陽性が起こる原因として、鼻汁・痰・咽頭拭い液などの粘膜成分に含まれる、被検出物質以外のタンパク成分などが、金コロイドやラテックス、酵素等で標識された抗体などと、非特異的に結合することが挙げられる。

40

このような、検体中に含まれる被検出物質以外のタンパク成分などの夾雑物と標識された抗体などとの間で生じる、免疫反応ではない、非特異的な反応を抑える方法として、非イオン性界面活性剤と 0.3 M 以上のアルカリ金属イオンとの両方を含んだ検体前処理液および水溶性ポリオキシアルキレンアルコールと高級アルコール系非イオン性界面活性剤を含有する免疫分析用洗浄液が知られている（特許文献 1 および特許文献 2 参照）。

しかしながら、上記検体前処理液を用いても、非特異的な反応を抑制できないことがあったり、粘膜成分の濃度によっては対応が困難となったり、1 回の測定に大量の前処理液量を必要とすることがあったりした。また、後述するようにインフルエンザウイルス以外

50

の被検出物質においても同様の問題があった。

【特許文献1】特開2005-24323号公報

【特許文献2】特開平9-80048号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

本発明の目的は、上記従来技術に鑑み、測定感度を低下させることなく、非特異的反応を抑制できる、免疫学的測定用の検体処理試薬組成物を提供することにある。

【0004】

本発明の他の目的は、特定の非イオン性界面活性剤を含有し、そしてアルカリ金属イオンを0.3Mより少なく含有する、上記の如き優れた利点を示す、免疫学的測定用の検体処理試薬組成物を提供することにある。

【0005】

本発明のさらに他の目的および利点は以下の説明から明らかとなる。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明によれば、本発明の上記目的および利点は、片末端にアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体を含有することを特徴とする免疫学的測定用の検体処理試薬組成物によって達成される。

【発明の効果】

【0007】

本発明によれば、鼻汁・痰・咽頭拭い液などの粘膜成分を、片末端にアルキル基を持つポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体を含んだ検体処理液に分散させることによって、感度を低下させることなく非特異的な反応を抑制して免疫学的測定を正確に行うことができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

本発明の検体処理試薬組成物は、片末端にアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体を含有する。片末端のアルキル基は、直鎖状であっても分岐鎖状であってもよく、好ましくは炭素数1~18のアルキル基であり、より好ましくは炭素数10~18のアルキル基である。両末端が水酸基のポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体では非特異的反応の要因となる糖タンパク等の夾雑物の変性が阻害される、処理液中への可溶性や分散性が落ちる、あるいは標識抗体や検出抗体との静電的または疎水結合的な親和力を制御できないなどの理由のため、非特異的反応を抑制できず正確な判定が行えない。また、炭素数18を超える片末端のアルキル基の場合では、測定に必要な被検出物質と標識抗体との反応による複合体生成が阻害され、十分な感度が得られないため適当でない。さらに、ポリオキシエチレンブロックのオキシエチレン繰返し単位とポリオキシプロピレンブロックのオキシプロピレン繰返し単位の割合は、前者対後者のモル比で0.1~1.5が好ましく、0.15~1.1がより好ましい。片末端のアルキル基はポリオキシエチレンブロックに結合しているのが好ましい。前述の繰返し単位のモル比が0.1未満では非特異的反応の要因となる糖タンパク等の夾雑物の変性が阻害される、処理液中への可溶性や分散性が落ちる、あるいは標識抗体や検出抗体との静電的または疎水結合的な親和力を制御できないなどの理由のため、非特異的反応を抑制できず正確な判定が行えない。また、1.5を超えると測定に必要な被検出物質と標識抗体との反応による複合体生成が阻害され、十分な感度が得られないため適当でない。

【0009】

片末端にアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体は、好ましくは0.05~2重量%、より好ましくは0.3~1.5重量%で検体処

10

20

30

40

50

理試薬組成物に含有させることができる。

本発明の検体処理試薬組成物は、片末端にアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体以外の非イオン界面活性剤を実質的に含有しないことが望ましい。

【0010】

本発明の検体処理試薬組成物は、片末端にアルキル基を有するポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレンブロック共重合体の他、当業者が通常使用しうる成分を含有することができる。

例えば、1重量%以上の濃度で牛血清アルブミンや、至適pHの5~9に保持しうる緩衝液を構成する成分や、その他の適切な有機酸などを含有することができる。検体の処理は、通常の方法に従えば良く、例えば検体処理試薬組成物0.5~1.0mLに対して検体を0.1~0.2mLを加え、よく振り混ぜて混和することにより行うことができる。同様に鼻汁などの検体を採取した綿棒を検体処理試薬組成物に浸し、検体処理試薬組成物と検体をよく混和することにより行うことができる。

【0011】

本発明で処理の対象とする検体としては、例えば咽頭あるいは鼻腔拭い液を本発明検体処理試薬組成物に浮遊させた溶液、鼻腔吸引液、便懸濁液、血漿、血清、尿、唾液、涙液、涙腺分泌液、角膜擦過物、腔内容物、又は子宮内容物、前立腺液、精液、羊水、髄液、膿、臓器抽出液、各種組織抽出液等の生体試料が挙げられる。

また、検体から検出する被検出物質としては、例えばインフルエンザウイルス抗原、アデノウイルス抗原、RSウイルス抗原、HA抗原、HBc抗原、HCV抗原、HIV抗原、EBV抗原、NLV抗原等のウイルス抗原、クラミジア・トラコマティス抗原、溶連菌抗原、百日咳菌抗原、ヘリコバクター・ピロリ抗原、レプトスピラ抗原、トレポネマ・パリダム抗原、トキソプラズマ・ゴンディ抗原、ボレリア抗原、炭疽菌抗原、MRSA抗原等の細菌抗原、PSA、CEA、AFP等の腫瘍マーカー、抗HIV抗体、抗HBV抗体、抗HCV抗体、抗ダニアレルゲン抗体、抗スギ花粉アレルゲン抗体等の免疫グロブリン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。これらの検体は、それ自体公知の方法により採取することができる。

【0012】

本発明に係る検体処理試薬組成物によって処理して得られた試料について、従来の免疫クロマトグラフィーを用いた抗原抗体反応によりウイルス等の同定・定量等の検査をすることができる。

免疫クロマトグラフィーの手法は公知であるが、その原理を模式的に図1に示す。

図1の標識物質保持部位(2)に酵素、金属コロイド粒子、ラテックス粒子等で標識された抗原や抗体(標識抗原、標識抗体)を保持させ、検出部位(4)に抗原または抗体を固定する。

図1の試料添加部位(1)に上記の処理した検体を試料として滴下し、クロマトグラフィー媒体(3)を介して吸収部位(5)の方向に試料を展開させる。検体中に対象とする被検出物質が混入している場合には、被検出物質と標識抗体あるいは標識抗原が反応し、これらの複合体が検出部位(4)に補足され、着色のバンドが現れる。(4)に現れたバンドの色調等により、検体中に含まれる被検出物質の量を概略的に把握することができる。

標識物質保持部位(2)に使用する抗原または抗体、及び検出部位(4)に使用する抗原または抗体は、被検出物質の異なる部位を結合するものであれば良い。

【0013】

抗体としては、被検出物質と特異的に結合する抗体が用いられる。抗体は、その産生動物種としてヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ウマ等があり、それぞれに所定範囲の免疫グロブリンがある。IgG、IgM、IgA、IgE、IgDのいずれでも良く、また、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、及びこれらの断片(抗原と結合能を有するもの;例えば、H鎖、L鎖、Fab、F(ab')<sub>2</sub>等)等のいずれでも良い。)が挙げられる。

10

20

30

40

50

具体的には、抗 P S A 抗体、抗 A F P 抗体、抗 C E A 抗体、抗アデノウイルス抗体、抗インフルエンザウイルス抗体、抗 H C V 抗体、抗 I g G 抗体、抗ヒト I g E 抗体等、及びこれらの断片（抗原と結合能を有するもの；例えば F ( a b ) ' 2 又は F a b ' など）等のいずれでも良い。）が挙げられる。

また、抗原としても、被検出物質と特異的に結合する抗原が用いられる。例えば H I V 抗原、H B V 抗原、H C V 抗原、ダニアレルゲン、スギ花粉アレルゲン等が挙げられる。

#### 【 0 0 1 4 】

さらに、抗原や抗体を標識する不溶性担体としては、例えば金コロイド粒子等の金属コロイド粒子、セレンウムコロイド粒子等の非金属コロイド粒子、ラテックス粒子等の着色樹脂粒子、染料コロイド粒子及び着色リボソーム等の不溶性粒状物質等が挙げられる。

10

抗原や抗体を標識する酵素としては、例えばペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ、グルコースオキシダーゼ等が挙げられる。

また、クロマトグラフィー媒体のための膜担体としては、毛細管現象により試料検体を吸収し流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、ニトロセルロース、酢酸セルロース、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、セルロース、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。

#### 【 実施例 】

#### 【 0 0 1 5 】

以下、実施例により本発明をさらに詳述する。本発明は実施例により何ら限定されるものではない。

20

#### 【 0 0 1 6 】

##### 実施例 1

#### ( 1 ) クロマトグラフィー媒体上への判定部の作製

メンブレンとしてニトロセルロースからなるシート（ミリポア社製、商品名：H F 1 2 0、3 0 0 m m × 2 5 m m）を用いた。5 重量%のイソプロピルアルコールを含むリン酸緩衝液（p H 7 . 4）で 1 . 0 m g / m L の濃度になるように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）を希釈した。この溶液 1 5 0 μ L をメンブレン上に 1 m m の幅で塗布し、5 0 で 3 0 分間乾燥させた。乾燥後、0 . 5 重量%のカゼイン（和光純薬工業（株）製）を含むリン酸緩衝液（p H 7 . 4）1 0 0 m L に室温で 3 0 分間浸漬し、ブロッキングを行った。ブロッキング後、0 . 0 5 重量%の T w e e n 2 0 を含有するリン酸緩衝液（p H 7 . 4）で洗浄し、室温で一晩乾燥させ、クロマトグラフィー媒体を作製した。

30

#### 【 0 0 1 7 】

#### ( 2 ) 標識物質溶液の作製

金コロイド分散液（田中貴金属工業（株）製：L C 4 0 n m）0 . 5 m L に、リン酸緩衝液（p H 7 . 4）で 0 . 1 m g / m L 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 . 1 m L 加え、室温で 1 0 分間静置した。次いで、1 0 重量%の牛血清アルブミン（以下 B S A）を含むリン酸緩衝液（p H 7 . 4）を 0 . 1 m L 加え、更に室温で 1 0 分間静置した。その後、十分攪拌した後、8 , 0 0 0 × g で 1 5 分間遠心分離を行い、上清を除去した後、1 重量%の B S A を含むリン酸緩衝液（p H 7 . 4）を 0 . 1 m L 加えた。以上の手順で標識物質溶液を作製した。

40

#### 【 0 0 1 8 】

#### ( 3 ) 免疫クロマトグラフィー用試験片の作製

上記作製した標識物質溶液 3 0 0 μ L に 3 0 0 μ L の 1 0 重量%トレハロース水溶液と 1 . 8 m L の蒸留水を加えたものを 1 5 m m × 3 0 0 m m 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、標識物質保持部材、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：3 0 0 m m × 3 0 m m）、展開した試料や反応の余剰標識物質を吸収するための吸収パッド

50

を貼り合わせた。そして、裁断機で幅が5mmとなるように裁断し、免疫クロマトグラフィー用試験片とした。

【0019】

(4) 検体処理試薬の作製

1重量%のBSAと150mMのNaClを含むTris-HCl緩衝液(pH8.0)10mLに0.3重量%となるように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(日本油脂(株)製:商品名ノニオン(登録商標)MN-811、アルキル基の炭素数=14、オキシプロピレンのモル比/オキシエチレンのモル比=1.1)を加え、鼻汁・痰・咽頭ぬぐい液等の検体を処理するための試薬とした。

【0020】

(5) 測定

上記作製した免疫クロマトグラフィー用試験片を用いて、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。

即ち、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検体処理試薬で100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2ng/mL、5ng/mL、10ng/mLとなるように不活化処理したインフルエンザAウイルスを加えたものを陽性検体試料とした。陰性検体試料、陽性検体試料とも150μLを免疫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、15分後に目視判定をした。テストラインの赤い線を確認できるものを「+」、赤い線は確認できるが、非常に色が薄いものを「±」、赤い線を確認できないものを「-」とした。表1に結果を示す。

【0021】

比較例1

ノニオンMN-811の代わりに両末端が水酸基であるポリオキシエチレン/ポリオキシプロピレン-ブロック共重合体の界面活性剤(旭電化工業(株)製:商品名ブルロニックL-44)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして測定を行った。結果を表1に示す。

【0022】

実施例2

ノニオンMN-811の代わりにノニオンTA-411(日本油脂(株)製:アルキル基の炭素数=11~18の混合物、オキシプロピレンのモル比/オキシエチレンのモル比=0.15)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして測定を行った。結果を表1に示す。

【0023】

実施例3

ノニオンMN-811の代わりにアデカトールLB-53B(旭電化工業(株)製:アルキル基の炭素数=12、オキシプロピレンのモル比/オキシエチレンのモル比=0.3)を使用したこと以外は、実施例1と同様にして測定を行った。結果を表1に示す。

【0024】

実施例4

ノニオンMN-811の濃度を1.5重量%としたこと以外は、実施例1と同様にして測定を行った。結果を表1に示す。

【0025】

10

20

30

40

【表 1】

抗原濃度 (ng/mL)	実施例 1	実施例 2	実施例 3	実施例 4	比較例 1
0	—	—	—	—	+
2	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+

10

## 【図面の簡単な説明】

【0026】

【図 1】免疫クロマトグラフィー用試験片の概略図。

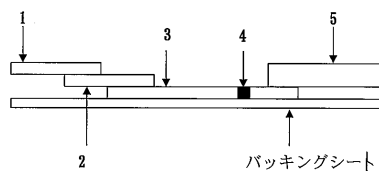
【符号の説明】

【0027】

- 1 試料添加部位
- 2 標識物質保持部位
- 3 クロマトグラフィー媒体
- 4 検出部位
- 5 吸収部位

20

【図 1】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 柘植 理公  
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
- (72)発明者 伊藤 大輔  
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

专利名称(译)	用于免疫学测量的样品处理试剂组合物		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009186359A</a>	公开(公告)日	2009-08-20
申请号	JP2008027582	申请日	2008-02-07
[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	木谷佳子 岩本久彦 望月一芳 柘植理公 伊藤大輔		
发明人	木谷 佳子 岩本 久彦 望月 一芳 柘植 理公 伊藤 大輔		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/5306 G01N33/531 G01N33/569		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/569.L		
代理人(译)	大岛正孝		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种样品处理试剂组合物，其通过抑制非特异性反应而不降低灵敏度来准确地进行免疫学测量。用于免疫学测量的样品处理试剂组合物，其包含在一端具有烷基的聚氧乙烯/聚氧丙烯嵌段共聚物。  
[选择图]无

抗原濃度 (ng/mL)	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	比較例1
0	-	-	-	-	+
2	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+