

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3853317号
(P3853317)

(45) 発行日 平成18年12月6日(2006.12.6)

(24) 登録日 平成18年9月15日(2006.9.15)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 33/576 (2006.01)	GO 1 N 33/576	B
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/576	Z
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/531	B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/532	Z
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 Z
請求項の数 5 (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2003-521370 (P2003-521370)	(73) 特許権者	503160607
(86) (22) 出願日	平成13年10月30日(2001.10.30)		上海数康生物科技有限公司
(65) 公表番号	特表2004-538489 (P2004-538489A)		中華人民共和国上海市欽州北路1089号
(43) 公表日	平成16年12月24日(2004.12.24)		51号楼4楼
(86) 国際出願番号	PCT/CN2001/001519	(74) 代理人	100081422
(87) 国際公開番号	W02003/016914		弁理士 田中 光雄
(87) 国際公開日	平成15年2月27日(2003.2.27)	(74) 代理人	100096079
審査請求日	平成16年4月27日(2004.4.27)		弁理士 大角 美佐子
(31) 優先権主張番号	01 1 26500.0	(74) 代理人	100126778
(32) 優先日	平成13年8月17日(2001.8.17)		弁理士 品川 永敏
(33) 優先権主張国	中国 (CN)	(72) 発明者	胡 ▲げん▼熙
			中華人民共和国上海市欽州北路1089号
			51号楼4楼
		審査官	竹中 靖典
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数感染症の同時検出診断キットおよびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

金標識免疫ろ過試験装置、緩衝液、金コロイド標識物の混合液からなる、複数感染症の同時検出診断キットであって、

(1) 上記金標識免疫ろ過試験装置が、一定の距離を置いて、HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原、HIV抗原および品質管理の対照としてのヒツジ抗-マウスIgG抗体が膜上に分離して点在するニトロセルロース膜を含み；

(2) 金コロイド標識物の混合液が、HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原の金コロイド標識物を含む4種の金コロイド標識物を含み；金コロイド標識物を形成するために用いられるとき、HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原、およびHIV抗原の蛋白質濃度が、それぞれ、20～50μg/ml、90～120μg/ml、90～120μg/ml、および80～120μg/mlであり；また各金コロイド標識物の製造に用いる金コロイド粒子の直径が、20～30nmであり；これら4種の標識物が、1：1：1.2～2.5：1.2～2.5の容量比で混合されて、上記金コロイド標識物の混合液が形成されていることを特徴とするキット。

【請求項2】

上記梅毒抗原が、単一の梅毒抗原または複数の梅毒抗原の混合物であり；上記HIV抗原が、HIV-1抗原、HIV-2抗原またはHIV-1抗原とHIV-2抗原の混合物である、請求項1記載の複数感染症の同時検出診断キット。

【請求項3】

10

20

上記緩衝液が、0.03～0.05%ツイーン20を含むpH7.2～8.8のPBS緩衝液である、請求項1記載の複数感染症の同時検出診断キット。

【請求項4】

請求項1に記載の複数感染症の同時検出診断キットの製造方法であって、上記方法が下記：

A. 金標識免疫ろ過試験の分析装置の製造であって、下記の工程を含む：

1) 膜上に点在させる標本の調製

HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原をそれぞれPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ；4で一夜透析し；透析した各蛋白質をそれぞれ、PBS(0.02M, pH8.0)で0.2～1.0mg/mlに希釈し；

10

2) 膜上に標本を塗布

上記HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原のそれぞれをピペットで採取し、注意深くそれらをニトロセルロース膜の特定の位置に、各蛋白質の点ごとに0.3～3μlの容量の点をつけ；同じニトロセルロース膜上の上記各点から離れた位置に、点、線または他の形態であってもよいが、ヒツジ抗-マウスIgG抗体をピペットで採取し目印の点をつけ；

3) 膜の後処理

このニトロセルロース膜を37のオーブンで30分間乾燥させ；20分間室温にて放置し；5～10分間室温にて洗浄液中で洗浄・振盪させ；上記洗浄工程を数回反復し；上記膜を空気乾燥させ；

20

4) 装置の集成

上記ニトロセルロース膜の下に2層の吸水ろ紙を敷き；ろ紙と膜と一緒にプラスチック反応装置中に入れ固定する；

B. 金コロイド標識物の混合液の調製

1) 金コロイド粒子の製造

0.01%クロロ金酸溶液を沸点まで加熱し；1%クエン酸ナトリウム溶液をすばやく添加し；煮沸を5分間続け、金コロイド粒子の大きさを20～30nmとし；

2) 金コロイド標識物の製造

2.1) HBsAgモノクローナル抗体の金コロイド標識物の製造

粒径が20～30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が20～50μg/mlになるように、HBsAgモノクローナル抗体を磁気攪拌下ゆっくりと添加し；室温にて30分間攪拌し；10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2～1.0%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し；10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.1～0.5%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し、混合物を12000～15000r/minで60分間遠心分離し；上澄液を捨て；沈殿物を保存液に溶解させ；0.45μmのろ紙でろ過し；混合物を将来の使用のために4で保存し；

30

2.2) HCV抗原の金コロイド標識物の製造

粒径が20～30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が抗原90～120μg/mlになるように、HCV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加し；室温にて30分間攪拌し；10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2～1.0%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し；10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1～0.5%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し、混合物を12000～15000r/minで60分間遠心分離し；上澄液を捨て；沈殿物を保存液に溶解させ；溶液を0.45μmのろ紙でろ過し；混合物を将来の使用のために4で保存し；

40

2.3) 梅毒抗原の金コロイド標識物の製造

粒径が20～30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90～120μg/mlになるように、梅毒抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加し；室温にて30分間攪拌し；10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2～1.0%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し；10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1～0.5%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し、混合物を12000～15000r/minで60分間遠心分離し；上

50

澄液を捨て；沈殿物を保存液に溶解させ；溶液を0.45 μmのろ紙でろ過し；混合物を将来の使用のために4 で保存し；

2.4) HIV抗原の金コロイド標識物の製造

粒径が20～30 nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が80～120 μg/mlになるように、HIV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加し；室温にて30分間攪拌し；10% BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2～1.0%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し；10% PEG 20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1～0.5%とし；混合物を室温にて5分間攪拌し、混合物を12000～15000 r/minで60分間遠心分離し；上澄液を捨て；沈殿物を保存液に溶解させ；溶液を0.45 μmのろ紙でろ過し；混合物を将来の使用のために4 で保存し；

10

3)金コロイド標識物の製造

上記で別々に製造した金コロイド標識物を、HBsAgモノクローナル抗体：HCV抗原：梅毒抗原：HIV抗原を、1：1：1.2～2.5：1.2～2.5の容量比で混合し；

C. 緩衝液の調製

PBS (pH 7.2～8.8)中に、最終濃度が0.03～0.05%になるようにツイーン20を添加する

工程を含むことを特徴とする請求項1に記載の複数感染症の同時検出診断キットの製造方法。

【請求項5】

B型肝炎、C型肝炎、梅毒およびAIDSの同時検出のための請求項1に記載の複数感染症の同時検出診断キットの使用。

20

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明はバイオテクノロジー分野に関する。より具体的には、複数感染症の同時検出診断キットおよびその製造方法に関する。

【0002】

発明の背景

B型肝炎、C型肝炎、梅毒およびAIDSは4つとも世界的な感染症である。中国衛生部の2000年統計年報によると、これらの4つの感染症は、感染症の総罹病率の約27.57%であり、社会と人民の生活にきわめて大きい危害を与えている。

30

【0003】

B型肝炎は薬物、毒物およびウイルスにより引き起こされる肝臓の炎症である。中国では人口総数の約10～15%がB型肝炎ウイルス(HBV)の感染者である。HBVは、輸血、血漿、血液製剤または注射針、注射筒および血液採取および血液透析用の器具に接触することによって感染する。中でも、輸血による感染経路は、高い罹病率、短い潜伏期間から特に重視されてきた。

【0004】

C型肝炎の伝染源は主として急性臨床患者と症状のない無症候性患者、慢性患者およびウイルス保有者である。ウイルスは疾患発病12日前に検出され、12年以上保有される。C型肝炎の伝染源は主として輸血によって引き起こされる。大多数の先進国で、C型肝炎は輸血後に感染する肝炎中の最もよくある種類の1つである。輸血によって引き起こされる肝炎の30～90%は外国ではC型肝炎であるが、中国では、輸血後に感染した肝炎中の3分の1はC型肝炎である。

40

【0005】

梅毒患者は、梅毒トレポネーマの感染が唯一の感染源である。梅毒の伝染の約95%は性的接触によるものである。輸血する場合、供血者が梅毒患者であると、受血者に梅毒が伝染する。献血者が梅毒にかかり、また梅毒トレポネーマ血症の段階にあると梅毒が伝播する。梅毒トレポネーマは体外での生存の能力は低く、4 で48～72時間生存し、40 で感染力はなく、100 ですぐ死滅する。近年中国で性病が増加しているために、輸

50

血による梅毒の感染の予防に細心の注意を払うべきである。

【0006】

H I VウイルスはA I D Sの病原体であり、主として血液、精液、膺分泌液、母乳によって感染する。H I Vを保有する血液が輸血されると、患者はH I Vに感染する可能性が90%を超えるとみられている。これに対して、一度の性交によるリスクは1%以下である。さらに、輸血は大量のH I Vウイルスを送り込む。3～5年(児童では約2年)の間に急速にA I D Sが蔓延する。

【0007】

従って、輸血によって感染し得るH I V、梅毒、H B VおよびH C Vを含む血液および血液製剤のウイルスを厳格に検査する必要がある。1998年に中国衛生部が発表した「献血者の健康検査の準則」に規定されている、検査されるべき9項目は、B型肝炎ウイルス表面抗原(H B s H g)、C型肝炎抗体(H C V抗体)、A I D S抗体(H I V抗体)および梅毒抗体を含む。現在、梅毒の検出には、一般に迅速な血漿反応抗体試験(R P R法)または梅毒血清学試験(T R U S T法)が採用されている。H I V、H B VとH C Vの検査には、酵素標識免疫吸着試験法(E L I S A法)が採用されている。この方法は一度の検査に、血清400 μ lが必要であり、1～2時間がかかる。現在、献血者の血液について迅速、完璧かつ同時に複数の疾患を検出する検査方法がないため、多くの人々が輸血によって、肝炎、A I D Sおよび梅毒など感染症に感染している。これが受血者の身心の健康と社会の安定に大きな影響を及ぼしている。

【0008】

金コロイド標識免疫ろ過試験法は酵素標識免疫吸着試験法(E L I S A)に基づいている。まず、複合物は酵素によってラベルされ、この試験法は酵素免疫ろ過試験法と呼ばれている。90年代の初め、金コロイドが標識として採用され、この方法は金標識免疫ろ過試験法(immuno gold filtration assay: I G F A)と称される。

【0009】

金標識免疫ろ過試験法の原理は、ニトロセルロース膜を担体とし、微孔性濾膜の毛管現象と透過性を利用し、特殊なる過装置の上で、抗原と抗体を反応させて洗浄する。反応は膜を通過するろ液と同様に急速に完結する。

【0010】

この試験法は簡単で、迅速、試薬以外の器械設備も必要ではなく、結果が数分間で肉眼で観察し得るため、臨床的に広く用いられている。この方法は、免疫学の検査の殆どすべての方面に応用でき、特に、正常な体液中に存在しない抗原性物質、例えば感染症の抗原または抗体、および物質、例えば、その量が正常では低いが特定の症状では異常に増加するH C G、アルファ-フェトプロテインの検査に用いられる。近年来、試剤の原料の精選と調製技術の改良によって、この方法の適用範囲はさらに広がっている。しかし、複数の感染症の抗原または抗体の同時検出のための金コロイド標識免疫ろ過試験法は未だ報告されていない。

【0011】

発明の要約

本発明の目的は、金コロイド標識免疫ろ過試験法技術を利用する複数の感染症の同時検出のための、感度が高く、正確で、迅速な、多目的診断キットの提供である。

【0012】

本発明によれば、複数の感染症の同時検出のための診断キットは、金標識免疫ろ過試験装置、緩衝液および金コロイド標識物の混合液からなり、上記金標識免疫ろ過試験装置が、一定の距離を置いて、H B s A gモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)、H C V抗原、梅毒抗原、H I V抗原および品質管理の対照としてのヒツジ抗-マウスI g G抗体がその膜上に点在するニトロセルロース膜を含み；各標本点の容量は0.3 - 3 μ lである。

【0013】

上記金コロイド標識物の混合液は、金コロイド標識H B s A gモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)、H C V抗原、梅毒抗原およびH I V抗原を含む4種の金コロイド標識物を含

10

20

30

40

50

み；金コロイド標識HBsAgモノクローナル抗体の濃度は20～50 µg/mlであり、金コロイド標識HCV抗原の濃度は90～120 µg/mlであり、金コロイド標識梅毒抗原の濃度は90～120 µg/ml、および金コロイド標識HIV抗原の濃度は80～120 µg/mlである。上記金コロイド粒子の直径は、20～30 nmであり；これら4種の標識物は、1：1：1.2～2.5：1.2～2.5の容量比で混合される。

【0014】

この緩衝液は、0.03～0.05%ツイーン20およびのPBS緩衝液(pH7.2～8.8、これは、燐酸二水素カリウム、または燐酸二水素ナトリウムおよび燐酸水素二ナトリウムから調製される)を含む。

【0015】

本発明によれば、上記梅毒抗原は、単一の梅毒抗原または複数の梅毒抗原の混合物である。上記HIV抗原は、HIV-1(I型HIV)抗原、HIV-2(II型HIV)抗原、またはHIV-1抗原とHIV-2抗原の混合物である。

【0016】

本発明の他の目的は、上記診断キットの製造方法の提供である。

【0017】

本発明によれば、複数の感染症を同時検出する診断キットは下記の工程を含む：

【0018】

工程A)金標識免疫ろ過試験装置の製造であって、下記の工程を含む：

1)膜上に添加する標本の調製

HBsAgモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ、4 で一夜透析する。ついで、HBsAgモノクローナル抗体をPBS(0.02M, pH8.0)で0.2～2.0 mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

【0019】

HCV抗原をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ；4 で一夜透析する。ついで、HCV抗原をPBS(0.02M, pH8.0)で0.2～2.0 mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

【0020】

梅毒抗原をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ、4 で一夜透析する。ついで、梅毒抗原をPBS(0.02M, pH8.0)で0.2～2.0 mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

【0021】

HIV抗原をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ、4 で一夜透析する。ついで、HIV抗原をPBS(0.02M, pH8.0)で0.2～2.0 mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

【0022】

ヒツジ抗-マウスIgG抗体をPBS(0.02M, pH8.0)に溶解させ、4 で一夜透析する。ついで、ヒツジ抗-マウスIgG抗体を、PBS(0.02M, pH8.0)で0.2～2.0 mg/mlに希釈し、将来の使用のために保存する。

【0023】

2)膜上に標本の点をつける

上記HBsAgモノクローナル抗体、HCV抗原、梅毒抗原およびHIV抗原のそれぞれをピペットで採取し、注意深くそれらをニトロセルロース膜の特定の位置に、各蛋白質の点ごとに0.3～3 µlの容量の点をつける。

【0024】

さらに、ニトロセルロース膜上の上記各点から離れた位置に、ヒツジ抗-マウスIgG抗体をピペットで採取し、目印の点をつける。上記目印は点、線またはなんらかの他の形式であってもよい。

【0025】

3)膜の後処理

10

20

30

40

50

上記ニトロセルロース(NC)膜を37のオーブンで30分間乾燥させ、20分間室温にて放置する。37にて20分間遮断液中に浸漬し、洗浄液中で5-10分間室温にて洗浄・振盪させる。洗浄液を換えた後、上記洗浄工程を数回反復する。ついで、膜を取り出し、室温にて空気乾燥させ、将来の使用のために、乾燥状態で4にて保存する。

【0026】

上記遮断液は0.01~0.03%ツイーン20および0.05MPBS緩衝液(pH7.2~8.0)を含む。上記洗浄液は0.03~0.05%ツイーン20および0.01MPBS緩衝液(pH7.2~8.0)を含む。

【0027】

4)装置の集成

上記ニトロセルロース膜の下に2層の吸水ろ紙を敷く。ろ紙と膜と一緒にプラスチック反応装置中に入れ固定する。

【0028】

工程B)金コロイド標識物の混合液の調製

1)金コロイド粒子の製造

0.01%クロロ金酸溶液を沸点まで加熱し、1%クエン酸ナトリウム溶液をすばやく添加する。溶液の煮沸を5分間続け、金コロイド粒子の大きさを20~30nmにする。

【0029】

2)金コロイド標識物の製造

2.1)金コロイド標識HBsAgモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が20~50μg/mlになるように、HBsAgモノクローナル抗体を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2~1.0%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.1~0.5%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離する。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させる。溶液を0.45μmのろ紙でろ過し、将来の使用のために4で保存する。

【0030】

2.2)金コロイド標識HCV抗原の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90~120μg/mlになるように、HCV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2~1.0%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1~0.5%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離する。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させる。溶液を0.45μmのろ紙でろ過し、将来の使用のために4で保存する。

【0031】

2.3)金コロイド標識梅毒抗原の製造

粒径が20~30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90~120μg/mlになるように、梅毒抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2~1.0%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1~0.5%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。混合物を12000~15000r/minで60分間遠心分離する。ついで、上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させる。溶液を0.45μmのろ紙でろ過し、将来の使用のために4で保存する。

【0032】

金コロイド標識液中の梅毒抗原が複数の梅毒抗原の混合物であるとき、各金コロイド標識梅毒抗原は別々に製造しなければならない。ついで将来の使用のためにそれらを混合し保存する。

【0033】

10

20

30

40

50

2.4) 金コロイド標識HIV抗原の製造

粒径が20～30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が80～120 μ g/mlになるように、HIV抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗原0.2～1.0%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。ついで、10%PEG20000溶液を添加し、最終濃度を抗原0.1～0.5%とし、混合物を室温にて5分間攪拌する。混合物を12000～15000r/minで60分間遠心分離する。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させる。溶液を0.45 μ mのろ紙でろ過し、将来の使用のために4℃で保存する。

【0034】

3)金コロイド標識物の製造

別々に製造した各金コロイド標識物を、HBsAgモノクローナル抗体：HCV抗原：梅毒抗原：HIV抗原を1：1：1.2～2.5：1.2～2.5の容量比で十分に混合する。

【0035】

工程C)緩衝液の調製

PBS(pH7.2～8.8)中に、最終濃度が0.03～0.05%になるようにツイーン20を添加する。

【0036】

本発明のもう1つの目的は、B型肝炎、C型肝炎、梅毒およびAIDSの同時検出のために上記診断キットの使用である。

【0037】

本発明に述べたキットの検査方法は次のとおりである：

1. 金標識免疫ろ過試験装置をテーブル上に水平に置く；
2. 装置のサンプルウェルに緩衝液を2滴添加し、膜の表面をぬらす；
3. サンプルウェルに血清試料を50 μ l添加し、それが完全に膜内に浸透するまで待つ；
4. 緩衝液を3滴添加し、それが完全に浸透するまで待ち、ついで金コロイド標識液を2滴添加する；
5. 緩衝液を3滴添加する；
6. 1分間後、サンプルウェル内に赤い斑点が現れるかどうかを観察する。赤い斑点が現れると、対応するウイルスが陽性であるという結果を示し、赤い斑点がないと、対応するウイルスが陰性であることを示す。

【0038】

HBsAg、HCV抗体、梅毒抗体、HIV抗体からの1種または数種が含まれている血清試料が、ニトロセルロース膜と接触するとき、膜上の抗原(または抗体)は血清中の対応する抗体(または抗原)と反応する。ついで複合体が対応する金コロイド標識物と反応し、呈色する。したがって、呈色によって、患者がどんなウイルスに感染しているか判断することができる。ヒツジ抗-マウスIgG抗体は、ヒト血清の抗体と反応しないが、金コロイド標識液中のHBsAgモノクローナル抗体(マウス抗-ヒト)はヒツジ抗-マウスIgG抗体と反応することができ、ヒツジ抗-マウスIgG抗体の対応する位置が発色して肉眼で識別できる。したがってある種の構成要素の質的問題でキットを用いることができないとき、膜上にヒツジ抗-マウスIgG抗体に対応する位置が発色しない。従って、ヒツジ抗-マウスIgG抗体はキットについての品質管理の対照として役立つ。

【0039】

本発明の検査キットは、金コロイド標識免疫ろ過試験法の原理を利用し、複数の感染症に対応する抗原または抗体を同じろ過装置(ニトロセルロース膜)の上で反応させ、洗浄後肉眼で各点の発色を観察して検出する。

【0040】

従来の金標識キット、PRP診断キット、TRUST診断キットと比較して、本発明のキットには下記の優れた利点がある。

- (1)複数の疾患を同時に検査する。

10

20

30

40

50

1つの装置で、同時に4種の感染症を検査できる。

(2)複数の抗原および抗体を同時に検出する。

1つの装置で、複数の抗原または抗体を検出でき、異なる蛋白質の検出条件の統一を実現した。

【0041】

E L I S Aキットと比べたら、本発明のキットには下記の優れた利点がある。

(1)複数の疾患を同時に検査する。

1つの装置で、同時に4種の感染症を検査する。

(2)複数の抗原または抗体を同時に検出できる。

1つの装置で、複数の抗原および抗体を検出でき、異なる蛋白質の検出条件の統一を実現した。 10

(3)反応時間が短い。

試験全体が2工程：試料の添加および反応からなり、全試験はる過によって行われ、3～5分間しかかからない。大規模に迅速に血液検体を検出するのにふさわしい。検査のすべての工程は数分間しかかからない。しかし、感度は、反応に1～2時間かかるE L I S A試験と同じである。

(4)採血量が少ない。

本発明のキットは50μlの血清しか必要でなく、指先または耳たぶから得られる。しかし、E L I S Aは1回の試験に100μl、4種類の試験には400μlの血清が必要である。従って、本発明のキットは子供または幼児に都合が良い。さらに、E L I S A法は、 20

(5)検査結果は器械または反応環境の影響を受けない。

(6)金コロイド標識物を添加すると、すぐ発色し得る。操作は簡単であり、またキットは室温にて長期に保存できる。

【0042】

本発明のキットは金コロイド免疫ろ過試験法の原理を利用し、1つの担体上で複数の抗原および抗体の同時検査を実現する。それは操作が簡単、迅速、正確かつ、種々の血液検体の複数の感染症の検査、特に大規模な血液検査に適している。それは感染症の検査に新しい構想を提供するものである。

【0043】

実施例

A. 材料

本発明を実施するための好ましい方法では、マウス抗 - ヒトH B s A gモノクローナル抗体(Mab)S 1およびS 2は、Beieerle Biotech Co. Ltd.により提供された。H C V抗原、T P 4 7梅毒抗原、T P 1 5梅毒抗原、T P 4 7 / T P 1 5梅毒混合抗原、H I V - 1抗原、H I V - 2抗原、H I V - 1 / 2混合抗原は、Biodesign(Saco, Maine USA)により提供された。ニトロセルロース膜がSchleicher & Schuell(Germany)により提供された。血清検体が上海市疾病控制中心により提供された。

【0044】

B. 金標識免疫ろ過試験装置の製造方法は次の通りである： 40

(1)マウス抗 - ヒトH B s A gモノクローナル抗体S 2(マウス抗 - ヒト)をP B S(0.02 M、pH 8.0)に溶解し、4 で一夜透析した。透析したH B s A gモノクローナル抗体S 2(マウス抗 - ヒト)をP B S(0.02 M、pH 8.0)で0.5 mg/mlに希釈し、4 で保存した。

(2)H C V抗原をP B S(0.02 M、pH 8.0)に添加し、4 で一夜透析した。透析したH C V抗原をP B S(0.02 M、pH 8.0)で0.4 mg/mlに希釈し、4 で保存した。

(3)T P 4 7 / T P 1 5梅毒混合抗原をP B S(0.02 M、pH 8.0)に添加し、4 で一夜透析した。透析したT P 4 7 / T P 1 5混合抗原をP B S(0.02 M、pH 8.0)で0.5 mg/mlに希釈し、将来の使用のために4 で保存した。

(4)H I V - 1 / 2混合抗原をP B S(0.02 M、pH 8.0)に溶解し、4 で一夜透析し 50

た。透析したH I V - 1 / 2 混合抗原をP B S (0 . 0 2 M、p H 8 . 0) によって0 . 6 mg / mlに希釈し、将来の使用のために4 で保存した。

(5)ヒツジ抗 - マウスI g G 抗体をP B S (0 . 0 2 M、p H 8 . 0) に溶解し、4 で一夜透析した。透析したヒツジ抗 - マウスI g G 抗体をP B S (0 . 0 2 M、p H 8 . 0) で0 . 6 mg / mlに希釈し、将来の使用のために4 で保存した。

(6)図1に示すように、ニトロセルロース膜の上に、1、2、3および4の位置にそれぞれT P 4 7 / T P 1 5 梅毒混合抗原、H I V - 1 / 2 混合抗原、H B s A gモノクローナル抗体(マウス抗 - ヒト)S 2、H C V 抗原の4種の蛋白質をマイクロピペットを用いて塗布した。点ごとの容量は1 . 0 μ lであった。ヒツジ抗 - マウスI g G 抗体を0 . 2 mm絵筆で吸い取り、ニトロセルロース膜の上のCで示される2点の間に横線を描いた。

10

(7)このニトロセルロース膜を37 のオーブに30分間におき、取り出した後それを室温にて25分間放置した。ついで、それを37 の遮断液に20分間浸漬し、ついで、それを洗浄液中で室温にて5分間、洗浄・振動させた。洗浄工程を数回繰り返した後、室温にて空気乾燥した。

(8)上述ニトロセルロース膜の下に2層の吸水ろ紙を敷き、ろ紙と膜と一緒にプラスチック反応装置内に入れて固定した。

【0045】

C . 緩衝液は等容量の0 . 1 0 M P B S (p H 7 . 8) および0 . 3 0 % ツイーン20を混合して得られた溶液であった。

【0046】

D . 金コロイド標識液は、金コロイド標識H B s A g M a b S 1 (マウス抗 - ヒト)、金コロイド標識H C V 抗原、金コロイド標識T P 4 7 / T P 1 5 梅毒混合抗原、および金コロイド標識H I V - 1 / 2 混合抗原を容量比1 : 1 : 1 . 2 ~ 2 . 5 : 1 . 2 ~ 2 . 5 で混合して調製した。各金コロイド標識物の製造に用いる金コロイドの平均粒径はおよそ30nmであった。金コロイド標識物の製造方法は次の通りであった。

20

【0047】

(1)金コロイド標識H B s A g M a b S 1 (マウス抗 - ヒト)の製造

粒径が30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が20μg/mlになるように、H B s A g M a b S 1 (マウス抗 - ヒト)を磁気攪拌下ゆっくりと添加した。室温にて30分間攪拌後、10% B S A 溶液を添加し、最終濃度を抗体0.6%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。10% P E G 2 0 0 0 0 溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。混合物を12000 ~ 15000 r / minで60分間遠心分離した。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させた。溶液を0.45μmのろ紙でろ過し、将来の使用のために4 で保存した。

30

【0048】

(2)金コロイド標識H C V 抗原の製造

粒径が30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90μg/mlになるように、H C V 抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加した。室温にて30分間攪拌後、10% B S A 溶液を添加し、最終濃度を抗体0.6%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。ついで、10% P E G 2 0 0 0 0 溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。混合物を12000 ~ 15000 r / minで60分間遠心分離した。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させた。溶液を0.45μmのろ紙でろ過し、将来の使用のために4 で保存した。

40

【0049】

(3)金コロイド標識T P 4 7 / T P 1 5 梅毒抗原の混合物の製造

粒径が30nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が90μg/mlになるように、T P 4 7 梅毒抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加した。室温にて30分間攪拌後、10% B S A 溶液を添加し、最終濃度を抗体0.6%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。ついで、10% P E G 2 0 0 0 0 溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。混合物を12000 ~ 15000 r / minで60分間遠心分離した。上澄

50

液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させた。溶液を0.45 μmのろ紙でろ過し、将来の使用のために4 で保存した。

【0050】

金コロイド標識TP15抗原の製造は、TP47標識物の製造と同じである。

【0051】

金コロイド標識TP47抗原を、同容量の金コロイド標識TP15抗原と混合し、将来の使用のために保存した。

【0052】

(4)金コロイド標識HIV-1/2抗原の製造

粒径が30 nmである金コロイドの溶液に、最終濃度が100 μg/mlになるように、HIV-1抗原を磁気攪拌下ゆっくりと添加する。室温にて30分間攪拌後、10%BSA溶液を添加し、最終濃度を抗体0.6%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。ついで、10%PEG2000溶液を添加し、最終濃度を抗体0.2%とし、混合物を室温にて5分間攪拌した。混合物を12000~15000 r/minで60分間遠心分離した。上澄液を捨て、沈澱物を保存液に溶解させた。溶液を0.45 μmのろ紙でろ過し、将来の使用のために4 で保存した。

10

【0053】

金コロイド標識HIV-2抗原の製造は、HIV-1標識物の製造と同じである。

【0054】

金コロイド標識HIV-1抗原を、同容量の金コロイド標識HIV-2抗原と混合し、将来の使用のために保存した。

20

【0055】

金コロイド標識液中のHIV抗原が、数種のHIV抗原の混合物であるとき、各金コロイド標識HIV抗原は別々に製造しなければならず、その後、ある一定の比率で希釈し、混合し、将来の使用のために保存する。

【0056】

上記の分析キットは種々の血清検査に用いられた。病院からの結果は下記のようなものであった。血清検体No.1の提供者は上記4種類の感染症のいずれの感染症にもかかっていなかった。血清検体No.2の提供者はC型肝炎のみにかかっていた。血清検体No.3の提供者はAIDSおよび梅毒にかかっていた。血清検体No.4の提供者はB型肝炎および梅毒にかかっていた。図2、図3、図4および図5にそれぞれ上記の検査結果を示す。

30

【図面の簡単な説明】

【図1】 ニトロセルロース膜上にスポットされた標本の概略図であり、1、2、3、4の符号は標本のそれぞれの位置を示す。2つのスポット(点)の間の"C"は、ヒツジ抗-マウスIgG抗体のための位置を示す。

【図2】 血清検体No.1の検査結果を示す概略図であり、検査結果は全て陰性である。

【図3】 血清検体No.2の検査結果を示す概略図であり、検査結果はC型肝炎抗体が陽性である。

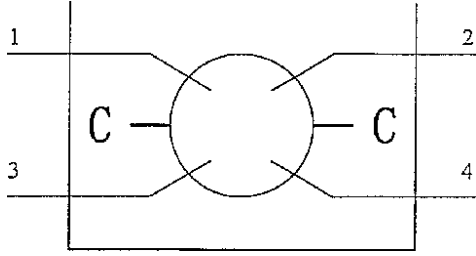
【図4】 血清検体No.3の検査結果を示す概略図であり、検査結果は梅毒抗体、AIDSHIV-1および2抗体が陽性である。

40

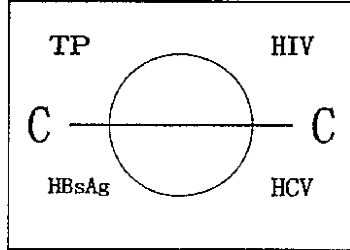
【図5】 血清検体No.4の検査結果を示す概略図であり、検査結果は梅毒抗体、AIDSHIV-1および2抗体、B型肝炎表面抗原が陽性である。

図2~5における、横線"C-C"は、ヒツジ抗-マウスIgG抗体が陽性である。

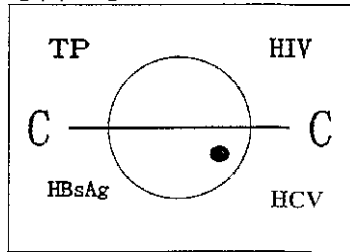
【 図 1 】



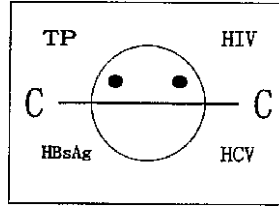
【 図 2 】



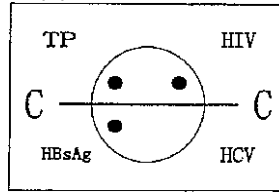
【 図 3 】



【 図 4 】



【 図 5 】



フロントページの続き

(51) Int.Cl. F I
G 0 1 N 33/571 (2006.01) G 0 1 N 33/569 H
G 0 1 N 33/577 (2006.01) G 0 1 N 33/571
G 0 1 N 33/577 B

(56) 参考文献 特開平 0 6 - 2 7 3 4 1 9 (J P , A)
特開 2 0 0 0 - 0 6 5 8 3 2 (J P , A)

(58) 調査した分野(Int.Cl. , D B名)

G01N 33/576

G01N 33/531

G01N 33/532

G01N 33/543

G01N 33/569

G01N 33/571

G01N 33/577

专利名称(译)	用于多种传染病的同时检测诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	JP3853317B2	公开(公告)日	2006-12-06
申请号	JP2003521370	申请日	2001-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海数康生物科技有限公司		
[标]发明人	胡げん熙		
发明人	胡 ▲げん▼熙		
IPC分类号	G01N33/576 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/571 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/5767 G01N33/571 G01N33/5761		
FI分类号	G01N33/576.B G01N33/576.Z G01N33/531.B G01N33/532.Z G01N33/543.541.Z G01N33/569.H G01N33/571 G01N33/577.B		
代理人(译)	田中，三夫 品川EiSatoshi		
优先权	01126500.0 2001-08-17 CN		
其他公开文献	JP2004538489A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及同时检测诊断试剂盒和制造多个感染的方法。所述试剂盒金标记的免疫过滤试验装置，包括的缓冲溶液和胶体金标记物的混合物，金标记的免疫过滤测试装置，在该膜的HBsAg单克隆抗体，HCV抗原，梅毒性抗原，HIV抗原和山羊抗-包括添加了小鼠IgG抗体的硝酸纤维素膜。本发明还公开了一种制备诊断试剂盒的方法。本发明是基于金标记的免疫过滤试验，在一个载波上肝炎，实现了丙型肝炎，梅毒和艾滋病的同时检测。简单的操作，多种疾病的快速和准确的检测，特别是，适合于大规模血液预测试。它还还为传染病的检查提供了新的思路。

