

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4229943号
(P4229943)

(45) 発行日 平成21年2月25日(2009.2.25)

(24) 登録日 平成20年12月12日(2008.12.12)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 9 7

GO 1 N 33/569 (2006.01)

GO 1 N 33/569 L

請求項の数 8 (全 13 頁)

| | |
|---|--|
| <p>(21) 出願番号 特願2005-503524 (P2005-503524)</p> <p>(86) (22) 出願日 平成16年3月9日(2004.3.9)</p> <p>(86) 国際出願番号 PCT/JP2004/003025</p> <p>(87) 国際公開番号 W02004/081568</p> <p>(87) 国際公開日 平成16年9月23日(2004.9.23)</p> <p>審査請求日 平成18年12月26日(2006.12.26)</p> <p>(31) 優先権主張番号 特願2003-63832 (P2003-63832)</p> <p>(32) 優先日 平成15年3月10日(2003.3.10)</p> <p>(33) 優先権主張国 日本国(JP)</p> <p>早期審査対象出願</p> <p>前置審査</p> | <p>(73) 特許権者 390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋3丁目13番5号</p> <p>(74) 代理人 110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所</p> <p>(72) 発明者 小堀 樹一郎 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番1号 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内</p> <p>(72) 発明者 川本 道子 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番1号 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内</p> <p>(72) 発明者 牛澤 幸司 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番1号 第一化学薬品株式会社診断薬研究所内</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p> |
|---|--|

(54) 【発明の名称】 検体の検査方法及びその検査方法に用いる検体収容用容器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

検体収容容器内に収容された希釈検体液が通過可能な構造であって標識抗体を含浸させたフィルターを内蔵したキャップと、当該キャップが装着可能であって標識抗体と反応する前の希釈検体液を収容するための容器本体とを含み、希釈検体液が標識抗体を含浸させたフィルターを通過することによって希釈検体液中の対象物と前記標識抗体の免疫複合体を形成する検体収容容器。

【請求項2】

標識抗体が金コロイド標識抗体である請求項1に記載の検体収容容器。

【請求項3】

検体中の対象物がインフルエンザウイルスである請求項1又は2に記載の検体収容容器。

【請求項4】

以下を含む簡易診断用キット。

(a) 検体収容容器内に収容された希釈検体液が通過可能な構造であって標識抗体を含浸させたフィルターを内蔵したキャップと、当該キャップが装着可能であって標識抗体と反応する前の希釈検体液を収容するための容器本体とを含み、希釈検体液が標識抗体を含浸させたフィルターを通過することによって希釈検体液中の対象物と前記標識抗体の免疫複合体を形成する検体収容容器

(b) 抗体を固定化したテストデバイス

【請求項5】

標識抗体を含浸させたフィルターを内蔵したキャップを、標識抗体と反応する前の希釈検体液を収容した容器本体に装着し、検体収容容器内に収容された希釈検体液が、標識抗体を含浸させたフィルターを通過することによって希釈検体液中の対象物と前記標識抗体の免疫複合体を形成する方法。

【請求項 6】

標識抗体が金コロイド標識抗体である請求項 5 に記載の免疫複合体を形成する方法。

【請求項 7】

検体中の対象物がインフルエンザウイルスである請求項 5 又は 6 に記載の免疫複合体を形成する方法。

【請求項 8】

標識抗体を含浸させたフィルターを内蔵したキャップを、標識抗体と反応する前の希釈検体液を収容した容器本体に装着し、検体収容容器内に収容された希釈検体液が、標識抗体を含浸させたフィルターを通過することによって希釈検体液中の対象物と前記標識抗体の免疫複合体を形成し、その後、形成された免疫複合体を、抗体が固定化されたテストデバイスを用いて、検体中の対象物の有無を検査する方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

本発明は、抗原抗体反応を用いる免疫学的な検査方法において、検体中の対象物の有無を検査する方法及びその検査方法に用いる検体収容用容器に関する。詳しくは、抗原抗体による免疫反応を応用した検査方法において、検体中の対象物の有無を簡易かつ迅速に検査できる新規な検査方法及びその検査方法に用いる新規な検体収容用容器に関する。

【背景技術】

抗原抗体反応を用いる免疫学的な検査方法は、各種の臨床検査に広く応用されている。その一般的な方法は、血液、尿、痰、唾液、鼻汁などの検体又はその希釈検体液を、酵素、貴金属コロイド、着色ラテックス、色素などの呈色識別物質で抗体を標識した標識抗体液と接触させ、検体中の抗原と標識抗体とを特異的に反応させて抗原抗体の免疫複合体を形成させ、免疫複合体の量を目視により又は光学的な変化として測定し、検体中の抗原の定性測定又は定量測定をおこなっている。

上記の検査方法を応用して、ウイルス感染の有無、妊娠の判定、ガン疾患の罹病確認などを簡易かつ迅速に検査・診断する器具としてさまざまな簡易診断用キットが開発され、市販されている。その一例として、インフルエンザウイルス感染の有無を検査・診断する簡易診断用キットの現状について説明する。

インフルエンザウイルスを簡易かつ迅速に診断する試薬や器具は、近年、従来の抗生物質や鎮痛薬のむやみな投与を回避することに加えて、治療可能な抗ウイルス性の医薬品が適用可能となったことから、実用化が急速に進み、各社により E L I S A (e n z y m e - l i n k e d i m m u n o s o r b e n t a s s a y) をベースにした簡易診断用キットが開発され、市販されている。特開 2 0 0 1 - 1 2 4 7 7 5 号公報や特開 2 0 0 0 - 2 3 0 9 3 1 号公報にはこれらの一例が開示されている。また、A 型インフルエンザウイルス又は B 型インフルエンザウイルスにそれぞれ効果がある薬剤が登場して以来、A 型・B 型を鑑別・測定することが可能な試薬や器具が開発されている。その代表例として、金コロイド標識抗体液を用いたインフルエンザ感染の簡易診断用キットの使用方法について説明すると、以下のとおりである。

(参考例 1)

< 従来の金コロイド標識抗体液を用いたインフルエンザ感染の簡易診断用キットの使用方法 (フロースルー法によるサンドイッチタイプ簡易型測定方法) >

イ．まず、緩衝液に界面活性剤などを添加して製した希釈液に鼻汁や鼻腔拭い液などとして採取した検体を加えて攪拌し、希釈検体液 (前処理検体液) とし、先端にフィルター付きキャップを取り付けたチューブ状第 1 容器に充填する。

ロ．この希釈検体液をキャップのフィルターを通してチューブ状第 1 容器からチューブ状第 2 容器に移し、その中に金コロイド標識抗インフルエンザ抗体懸濁液 (金コロイド標識

10

20

30

40

50

抗体液)を数滴滴下し、十分に混和して反応させ、検体中のインフルエンザウイルスと金コロイド標識抗インフルエンザ抗体との複合体を形成させる。チューブ状第2容器には、上記イ.工程で用いたものとは別のフィルター付きキャップを取り付けて、2～5分間ほど静置する。

ハ.チューブ状第2容器内の混和液の全量を抗インフルエンザ抗体を固定化してある担体(メンブレンなどの多孔性膜材)と吸収材(脱脂綿や吸収紙など)を充填してあるテストデバイス(免疫測定デバイス)に注入して担体に検体中のインフルエンザウイルスと金コロイド標識抗インフルエンザ抗体との複合体を吸着させた後、テストデバイスに洗浄液を注入して担体を洗浄する。

ニ.次いで、テストデバイス上の反応を観察してインフルエンザウイルス感染の有無及びインフルエンザウイルスの種別(A型かB型か)を鑑別・診断する。

上記従来のインフルエンザ感染の有無の簡易診断用キットは、簡便な検査器具であるが、改良すべき点がいくつかある。

すなわち、希釈検体液と金コロイド標識抗体とを反応させるには、上記のとおり、検査者が希釈検体液に金コロイド標識抗体液を滴下する必要があるが、第1容器から第2容器へ移し替えるなどの煩雑な操作が必要である。また、検査者の個人差により金コロイド標識抗体液の滴下量の変動しやすいため、測定結果の再現性に難がある。その上、金コロイド標識抗体液は、温度によって単独で凝集しやすくなり、フィルター付キャップを通過しなくなることがあることをはじめ、検査時にテストデバイス上に金コロイド標識抗体が洗浄・濾過されずに残存して、担体全体を着色したり、担体に固定化されている抗体と非特異的に結合して、誤った呈色が生じて偽陽性と判断される原因となりやすい。特に低温条件や薄い溶液の場合、1年を超える長期保存は困難であると推測される。

従来市販の免疫学的な検査方法を応用した簡易診断用キットでは、上記インフルエンザウイルス感染の診断用キットの例に見るとおり、希釈検体液に標識抗体液を混和して免疫複合体を形成する方法を採るものが多い。したがって、インフルエンザウイルス感染の有無の診断用キットの改良すべき点は、そのまま市販の簡易診断用キット全般にも妥当する。

すなわち、従来市販の簡易診断用キットにおいて、検体と標識抗体とを反応させるには、希釈検体液と標識抗体液とを混和する必要があるが、多くの場合、検査者が希釈検体液に数滴の標識抗体液を滴下する方法を採っている。しかし、この方法では、検査者の個人差によって標識抗体液の滴下量の変動しやすい。例えば1滴滴下したときと3滴滴下したときでは滴下量が大きく相違することになる。標識抗体液の滴下量が少ないと感度が不足して十分な反応が起こらず、滴下量が多いと非特異的な反応が発生する確率が高くなるなど、検査結果について標識抗体の滴下量に起因する誤差を生じやすい。その上、標識抗体は液状のまま長期保存すると正確な測定が困難になることがある。本発明は、これら従来の検査方法及び検査用器具の問題点を全て解決するものである。

なお、非特許文献であるが、金澤実・菅谷憲夫編集「インフルエンザ診療マニュアル」(株式会社南江堂2001年2月20日第1刷発行110～115頁)の説明も参考となる。

【発明の開示】

上記の状況に鑑み、本発明は、抗原抗体反応を用いる免疫学的な検査方法において、検査者の個人差による影響を少なくすると共に非特異的な反応の発生を防止し、診断結果の再現性と試薬の保存安定性に富んだ検査方法を提供すること及びその検査方法に用いる検体収容用容器を提供することを第1の課題とする。また、本発明は、インフルエンザウイルス感染の有無の検査方法において、検査者の個人差による影響を少なくすると共に非特異的な反応の発生を防止し、診断結果の再現性と試薬の保存安定性に富んだ検査方法を提供すること及びその検査方法に用いる検体収容用容器を提供することを第2の課題とする。さらに、本発明は、免疫学的検査方法を応用した簡易診断用キットについて、その使用方法をさらに簡便化し、検査者の個人差による影響を少なくすると共に非特異的な反応の発生を防止し、診断結果の再現性と試薬の保存安定性に富んだ検査方法を提供すること及

10

20

30

40

50

びその検査方法に用いる検体収容用容器を提供することを第3の課題とするものである。

上記の諸課題を解決するための本発明のうち、請求項1に記載する発明は、検体の免疫学的検査方法において、標識抗体を含浸させてあるフィルターを内蔵したキャップを希釈検体液を収容した容器本体に装着し、その容器から希釈検体液をテストデバイスに注入して反応を観察し、検体中の対象物の有無を検査することを特徴とする検体の検査方法である。

また、本発明のうち請求項2に記載する発明は、標識抗体が金コロイド標識抗体である請求項1に記載の検査方法である。

また、本発明のうち請求項3に記載する発明は、検体中の対象物がインフルエンザウイルスである請求項1又は2に記載の検査方法である。

また、本発明のうち請求項4に記載する発明は、簡易診断用キットにおいて検体と標識抗体とを反応させる方法として用いる請求項1から3のいずれかに記載の検査方法である。

また、本発明のうち請求項5に記載する発明は、希釈検体液を収容するための容器本体に標識抗体を含浸させてあるフィルターを内蔵したキャップを装着してあり、請求項1から4のいずれかに記載の検査方法に用いるための検体収容用容器である。

また、本発明のうち請求項6に記載する発明は、標識抗体が金コロイド標識抗体である請求項5に記載の検体収容用容器である。

また、本発明のうち請求項7に記載する発明は、検体中の対象物がインフルエンザウイルスである請求項5又は6に記載の検体収容用容器である。

また、本発明のうち請求項8に記載する発明は、簡易診断用キットの構成器具として用いる請求項5から7のいずれかに記載の検体収容用容器である。

【図面の簡単な説明】

図1は、本発明に係る検体の検査方法及びその検査方法に用いる検体収容用容器の一例の模式図である。図1において、符号の1は検体収容用容器の容器本体を、11は希釈検体液を、12は容器本体の口端部をそれぞれ示す。また、1AはインフルエンザA型ウイルス抗原を、1BはインフルエンザB型ウイルス抗原を示す。さらに、2はキャップを、21は金コロイド標識抗体を含浸させてあるフィルターを、22と23は他のフィルターを、24はキャップの嵌合部を、25はキャップのノズル部を、3は容器本体にキャップを取り付けた検体収容用容器を示す。また、4はテストデバイスを、41はその開口部を、42はその表面をそれぞれ示す。

【発明を実施するための最良の形態】

本発明では、検体と標識抗体を接触させる方法として、従来のように希釈検体液に標識抗体液を滴下するなどの方法で希釈検体液と標識抗体液とを混和するのではなく、標識抗体を含浸させたフィルターを作り、そのフィルターをキャップに内蔵させ、希釈検体液を収容した容器本体にそのキャップを装着して、キャップのフィルターを通して希釈検体液をテストデバイスに注入する際に、希釈検体液中の検体とフィルターに含浸させてある標識抗体とを接触させて免疫複合体を形成させる方法を採用するものである。フィルターとしては、高密度ポリエチレン重合体濾布、ガラス繊維系濾紙、セルロース系濾紙などの一般に濾布又は濾紙として使用されている部材を用いて差し支えない。

なお、本発明において、キャップとは、少なくとも希釈検体液などを充填・収容した容器に装着可能なものであって、液体が通過可能な構造及びフィルターを内蔵可能な構造を有するものをいう。キャップの形状は、円錐様、円盤様、円筒様と円錐様の組み合わせなどの所望の形状を選択することができる。

本発明において、標識抗体をフィルターに含浸させる方法としては、フィルター部材（濾布又は濾紙）を標識抗体液に浸漬するか又は部材に標識抗体液を塗布ないし滴下するなど任意の方法を採用することができる。フィルターを工業的に生産するときは、塗布機を用いて一定量を塗布すればよい。標識抗体を含浸させてあるフィルターの作り方の一例を示すと、希釈検体液を収容した容器本体に装着するキャップの内側の形状・寸法に合わせて切り出した適宜の濾布又は濾紙に標識抗体液を十分に滴下して含浸させた後、35 ~ 38

10

20

30

40

50

で30～40分間程度乾燥させて製する。なお、常温で自然乾燥させても差し支えない。

標識抗体を含浸させてあるフィルターをキャップへ内蔵する方法は任意であるが、例えば、キャップのノズル側（吐出口側）から、標識抗体を含浸させたガラス繊維系濾紙からなるフィルター、他のガラス繊維系濾紙からなるフィルター、高密度ポリエチレン重合体濾布からなるフィルターというように、標識抗体を含浸させてあるフィルターとその他のフィルターを組み合わせて多層構造に装填しても差し支えない。

本発明において、抗体を標識する呈色物質としては、酵素、貴金属コロイド、色素、着色ラテックスなど任意のものを用いて差し支えないが、貴金属コロイド粒子を用いるのが好ましく、貴金属コロイド粒子の中でも、特に、広く知られている金コロイド調製法により調製した金コロイド粒子を用いるのが好ましい。

以下、本発明に係る検体の検査方法及びその検査方法に用いる検体収容用容器について、図面に基いてさらに説明する。

図1は、本発明の一例として、インフルエンザウイルスの検査方法及びその検査方法に用いる希釈検体液を収容する容器の説明のための模式図である。図1において、1は、希釈検体液11を収容してあるプラスチック製の容器本体で、試験管型をしている。希釈検体液11は、インフルエンザA型ウイルス抗原1A（図中、菱形で示す。）とインフルエンザB型ウイルス抗原1B（図中、四角形で示す。）とを含む患者の鼻汁から採取した検体を緩衝液に界面活性剤などを添加して製したものである。

図1において、2は、容器本体1の口端部12と嵌合する嵌合部24とノズル部25を有するプラスチック製のキャップであり、キャップ2の胴部には、ノズル部25に近い方から、ガラス系繊維からなる濾紙に金コロイド標識抗体を含浸させてあるフィルター21、ガラス系繊維の濾紙からなるフィルター22、高密度ポリエチレン重合体の濾布からなるフィルター23の順に3層構造に装填・内蔵させてある。（図中、フィルター21の黒丸は、金コロイドを示す。また、金コロイド標識抗体液などの調製法は後記の実施例1に示す。）

3は、希釈検体液11を収容した容器本体1にキャップ2を嵌合させて検体収容用容器とした状態を示す。4は、プラスチック製のテストデバイスであり、表面に開口部41を有する。テストデバイスの中には、底側から、脱脂綿、吸収紙、インフルエンザウイルスA型及びB型抗体を固定化させたメンブレンを収納してある。希釈検体液11は、検体収容用容器3内にて5分間ほど静置した後、キャップ2のノズル部25からテストデバイス4の開口部41へ全量を滴下する。その後、洗浄液にてメンブレンを洗浄した後、目視観察により、開口部41へ現れるスポットの状況を検査し、インフルエンザウイルス感染の有無などを診断する。

【実施例】

以下、本発明を実施例をもってさらに詳細に説明する。なお、以下の説明中、図1の説明に対応する符号は〔 〕で括って記すことにする。

【実施例1】

<本発明に基づくインフルエンザウイルス感染の有無の検査方法>

1. 試薬類の調製

(1) 抗体固定化メンブレンの作製

マウス抗インフルエンザA型ウイルス抗体液(A)、マウス抗インフルエンザB型ウイルス抗体液(B)、抗マウスIgG抗体液(R)のそれぞれ1μLを、図1に示す配置でニトロセルロースメンブレン(ポアサイズ60μm)上にそれぞれ独立して滴下し、乾燥させた。これにより直径およそ2mmの点状に3種類の抗体をメンブレンに固定化した。さらにメンブレンを0.1%マリアリムAFB-1521(日本油脂製)及び2.5%スクロースを含むトリス-塩酸緩衝液(pH7.4)によりブロッキングし、抗体固定化メンブレンとした。

(2) テストデバイスの作製

図1に示すように、表面に希釈検体液を添加するための開口部〔41〕が設けてあるプ

10

20

30

40

50

ラスチックケース〔42〕内に、底側から脱脂綿、コットン製吸収紙、抗体固定化メンブレンの順に重ね、固定されている3種類の抗体が前記開口部の中央付近に位置するように収納してテストデバイス〔4〕を製した。

なお、図1において、テストデバイス〔4〕に表示されているA・R・Bは、それぞれマウス抗インフルエンザA型ウイルス抗体、抗マウスIgG抗体、マウス抗インフルエンザB型ウイルス抗体が点状に固定化されている部位を示している。

(3) 標識抗体の作製

沸騰した蒸留水にテトラクロロ金(III)酸水溶液、クエン酸三ナトリウム水溶液を加えて攪拌しながら加熱した。その後、氷水中で冷却して金コロイドを製した。金コロイドの粒径はおよそ60nmであった。得られた金コロイドとマウス抗インフルエンザA型ウイルス抗体及びマウス抗インフルエンザB型ウイルス抗体(それぞれニトロセルロースメンブレンに固定した抗体とは別のエピトープを認識する抗体)をホウ酸緩衝液(pH9.0)中で混合し、室温で攪拌して標識をおこなった。前記混合液に、さらに10%BSA水溶液を添加してブロッキングをおこなった後、遠心により沈殿させて2種類の金コロイド標識抗体を得た。

10

(4) 標識抗体液の調製

2種類の金コロイド標識抗体を、0.2%Tween20、1.0%スクロース及び0.2%BSAを含むPBSと一緒に懸濁させ、インフルエンザA型ウイルスに対する金コロイド標識抗体及びインフルエンザB型ウイルスに対する金コロイド標識抗体の両方を含有する金コロイド標識抗体液を調製した。

20

(5) 標識抗体を含浸させてあるフィルターの作製

表1に示す部材から、ガラス繊維系濾紙F075-14を選択し、キャップの内側の形状・寸法に合わせて円盤状切片(直径7.5mm)を切り出した。この円盤状切片の各々に、金コロイド標識抗体液60μLを滴下して自然乾燥させ、金コロイド標識抗体を含浸させてあるフィルター〔21〕を作製した。

(6) 標識抗体を含浸させてあるフィルターを内蔵したキャップの作製

図1に示すように、希釈検体液を供給する側から順に、高密度ポリエチレン重合体濾布からなるフィルター〔23〕、ガラス繊維系濾紙からなるフィルター〔22〕、金コロイド標識抗体を含浸させてあるフィルター〔21〕を重ねてキャップ〔2〕内に収納し、金コロイド標識抗体を含浸させてあるフィルターを内蔵したキャップ(以下「本発明のキャップ」という。)を作製した。得られた本発明のキャップは、図1に示すように、希釈検体液〔11〕を収容した容器本体〔1〕に装着して使用した。

30

2. ウイルスの検出方法

(1) 希釈液

2%BSAを含むPBS(pH7.4)を使用した。

(2) 洗浄液

12%尿素を含むPBS(pH7.4)を使用した。

(3) 検出操作

イ. インフルエンザ精製抗原(A型ウイルス: Kitakyusyu/159/93株由来、B型ウイルス: Lee/40株由来)を含む希釈検体液は、それぞれのウイルスをTCID₅₀/test単位で $2 \times 10^6 \sim 1 \times 10^5$ になるように希釈液に添加して調製した。

40

ロ. 鼻汁検体を含む希釈検体液は、鼻汁を採取した綿体を希釈検体液1.2mLが収容された容器に入れ、鼻汁成分を希釈検体液中に溶出させることで調製した。

ハ. 前記イ.の工程又はロ.の工程で調製したインフルエンザ精製抗原又は鼻汁検体を含む希釈検体液1.2mLを収容した容器本体〔1〕に、本発明のキャップ〔2〕を装着し、その全量をテストデバイス〔4〕の開口部〔41〕内に滴下した。

ニ. 希釈検体液〔11〕が、抗体固定化メンブレン上に認められなくなった後、洗浄液500μLを開口部内に滴下し、抗体固定化メンブレンを洗浄した。

ホ. 洗浄後の抗体固定化メンブレンを目視で観察し、赤色の検出スポットの有無を観察し

50

た。具体的な判定は、以下の4段階でおこなった。当該検出スポットの赤色が観察された場合、その強さにより、+（陽性）、++（強陽性）の2段階に区別し、検出スポットが明瞭でない場合は、±（判定保留）、検出スポットが観察されない場合は、-（陰性）とした。

試験例

以下、本発明を試験例をもってさらに詳細に説明する。

（試験例1）

<部材の選択試験>

（1）試験方法

表1に示す部材を使用し、実施例1の方法にしたがって本発明のキャップを調製した。インフルエンザ精製抗原、鼻汁検体のいずれも含まない希釈検体液1.2mLを収容した容器本体に本発明のキャップを装着し、試験管に全量を滴下した。得られた濾液の537nmにおける吸光度より濾液中の金コロイド標識抗体量を算出し、含浸した金コロイド標識抗体の量と比較して回収率を求めた。試験の結果を表1に示す。

（2）試験結果

試験結果を表1に示す。

表1 (mm) (μm) (%)

| 濾過フィルター | 商品名（会社名） | 部材の厚さ | ポアサイズ* | 回収率 |
|--------------|------------------|-------|--------|------|
| 高密度ポリエチレン重合体 | LG20（フロン工業） | 1.9 | 20 | 96.7 |
| ガラス繊維系濾紙 | F075-14（アドバンテック） | 0.355 | 23 | 95.4 |
| ガラス繊維系濾紙 | GB-140（アドバンテック） | 0.56 | 0.4 | 71.2 |
| セルロース系濾紙 | 17chr（ワットマン） | 0.92 | 表示なし | 57.7 |

（3）考察

表1から、本実施例の方法を採れば、金コロイド標識抗体の回収率を基準として、標識抗体の大きさ、含浸量等と部材の材質、厚さなどを勘案して標識抗体を含浸させたフィルターの作製に使用可能な部材（濾布又は濾紙）を適宜選択できることが判明した。

（試験例2）

<基本性能の確認試験>

（1）試験方法

LG20を濾過フィルター部材として本発明のキャップを作製し、表2に示す濃度のインフルエンザ精製抗原（A型及びB型）を含む希釈検体液1.2mLを収容した容器本体に装着して実施例1の方法にしたがって試験をおこなった。対照方法として、インフルエンザ精製抗原を含む希釈検体液を収容した容器本体にさらに金コロイド標識抗体液60μLを加えた後、本発明のキャップに内蔵させた標識抗体を含浸させてあるフィルターを、標識抗体を含浸させてないフィルターに交換したキャップを装着し、試験をおこなった。試験の結果を表2に示す。

（2）試験結果

試験結果を表2に示す。

（3）考察

表2から、本発明の方法（標識抗体を含浸させてあるフィルターから希釈検体液を滴下

させる方法)と対照方法(希釈検体液と標識抗体液とを混和させる従来の方法)とでは、検査精度に何ら相違がないことが確認された。したがって、本発明の方法は、対照方法と同様の性能を保持していることが判明した。

表2

a. インフルエンザA型ウイルスの検出

| ウイルス量 | 2×10^6 | 8×10^5 | 4×10^5 | 2×10^5 | 1×10^5 | ブランク |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| 本発明の方法 | ++ | ++ | ++ | + | + | - |
| 対照方法 | ++ | ++ | ++ | + | + | - |

10

(ウイルス量はTCID₅₀/test単位で示した。)

b. インフルエンザB型ウイルスの検出

| ウイルス量 | 2×10^6 | 8×10^5 | 4×10^5 | 2×10^5 | 1×10^5 | ブランク |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| 本発明の方法 | ++ | ++ | ++ | + | + | - |
| 対照方法 | ++ | ++ | ++ | + | + | - |

20

(ウイルス量はTCID₅₀/test単位で示した。)

30

(試験例3)

<本発明の方法の効果確認試験>

(1) 試験方法

LG20を濾過フィルター部材として、含浸させる金コロイド標識抗体液量を表3に示すように変動させて本発明のキャップを作製した。PCR法によりインフルエンザA型ウイルス及びインフルエンザB型ウイルスが存在しないことが確認されている鼻汁検体(陰性検体)を含む希釈検体液1.2mLを収容した容器本体に前記本発明のキャップを装着して、実施例1の方法にしたがって試験をおこなった。対照方法として、インフルエンザ精製抗原を含む希釈検体液を収容した容器本体に、さらに金コロイド標識抗体液を滴瓶により1~3滴滴下した後、本発明のキャップに内蔵させた標識抗体を含浸させてあるフィルターを標識抗体を含浸させてないフィルターに交換したキャップを装着し、試験をおこなった。試験の結果を表3に示す。

40

(2) 試験結果

試験結果を表3に示す。

表 3

20例中「+」と判定された例数

| | | 陰性検体 | |
|--------|--------------------|--------|--------|
| | | A型 | B型 |
| 対照方法 | 1滴 (30 μ Lに相当) | 0 / 20 | 0 / 20 |
| | 2滴 (60 μ Lに相当) | 0 / 20 | 0 / 20 |
| | 3滴 (90 μ Lに相当) | 1 / 20 | 1 / 20 |
| 本発明の方法 | 54 μ L含浸 | 0 / 20 | 0 / 20 |
| | 60 μ L含浸 | 0 / 20 | 0 / 20 |
| | 66 μ L含浸 | 0 / 20 | 0 / 20 |

(3) 考察

表3から、標識抗体液を3滴滴下した場合において、非特異的反応を起こす検体の存在が確認された。これに対し、本発明の方法では標識抗体の量が一定しているため、前記検体でも非特異的反応は観察されなかった。この試験から、本発明の方法によれば、標識抗体の量に起因する検出誤差を解消できることが確認された。

(試験例4)

< 標識抗体液の保存安定性の確認試験1 >

(1) 試験方法

LG20を濾過フィルター部材として、実施例1にしたがって本発明のキャップを作製し、30 (湿度30%)、37 (湿度30%)に保存した。保存開始0カ月、6カ月、9カ月の時点で当該キャップをインフルエンザ精製抗原(A型ウイルス: Kitakyusyu / 159 / 93株由来、B型ウイルス: Lee / 40株由来)を含む希釈検体液(それぞれのウイルスTCID₅₀ / test単位で 2×10^6 を含む希釈検体液)1.2mLを収容した容器本体に装着して実施例1の方法にしたがって試験をおこなった。対照方法として、インフルエンザ精製抗原を含む希釈検体液を収容した容器本体に、30 (湿度30%)、37 (湿度30%)で0カ月、6カ月、9カ月保存した金コロイド標識抗体液を滴瓶により3滴滴下した後、本発明のキャップに内蔵した標識抗体を含浸させてあるフィルターを、標識抗体を含浸させてないフィルターに交換したキャップを装着し、試験をおこなった。試験の結果を表4に示す。

(2) 試験結果

試験結果を表4に示す。

(3) 考察

表4に示すように、標識抗体を37℃（湿度30%）に保存した場合、溶液状態の保存では6カ月の保存で正確な測定が不能になるのに対して、本発明の方法で製したフィルターは9カ月保存後も正確な測定が可能であることが判明した。

表4

| 保存 温度 | 保存期間 | 0カ月 | | 6カ月 | | 9カ月 | |
|----------|-------------|-----|----|-----|----|-----|----|
| | インフルエンザ精製抗原 | A型 | B型 | A型 | B型 | A型 | B型 |
| 37 ℃ | 対照方法 | + | + | ± | ± | - | - |
| | 本発明の方法 | + | + | + | + | + | + |
| 30 ℃ | 対照方法 | + | + | + | + | + | + |
| | 本発明の方法 | + | + | + | + | + | + |

(試験例5)

< 標識抗体液の保存安定性の確認試験2 >

(1) 試験方法

LG20をフィルター部材として、実施例1の方法にしたがって本発明のキャップを作成した。当該本発明のキャップと金コロイド標識抗体液が収容された滴瓶を乾燥剤と一緒に気密容器に入れ、-30℃に一昼夜保存した。室温に戻した本発明のキャップを、PCR法によりインフルエンザA型ウイルス及びインフルエンザB型ウイルスが存在しないことが確かめられている鼻汁検体（陰性検体）を含む希釈検体液或いはインフルエンザ精製抗原（A型ウイルス：Kitakyusu/159/93株由来、B型ウイルス：Lee/40株由来、それぞれのウイルスをTCID₅₀/test単位で2×10⁶を含む）希釈検体液1.2mLを収容した容器に装着して実施例1の方法にしたがって試験をおこなった。対照方法として、室温に戻した金コロイド標識抗体液を、陰性検体或いはインフルエンザ精製抗原を含む希釈検体液を収容した容器本体内に2滴滴下した後、本発明のキャップに内蔵された標識抗体を含浸させてあるフィルターを、標識抗体を含浸させてないフィルターに交換したキャップを装着し、試験をおこなった。基準方法として、-30℃に保存した金コロイド標識抗体液に代えて、室温に保存した金コロイド標識抗体液を用い、前記対照方法と同様の操作により試験をおこなった。試験の結果を表5に示す。

(2) 試験結果

試験結果を表5に示す。

表 5

| 保存 温度 | | 陰性検体 | | | インフルエンザ精製抗原 | | |
|------------|--------|------|-----|-----|-------------|-----|-----|
| | | A 型 | B 型 | R 部 | A 型 | B 型 | R 部 |
| - 3 0 ℃ | 対照方法 | + | + | + | + | + | + |
| | 本発明の方法 | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 室温 | 基準方法 | - | - | ++ | ++ | ++ | ++ |

(3) 考察

まず、金コロイド標識抗体液を - 3 0 に保存後使用した対照方法では、金コロイド標識抗体液と希釈検体液の混液を、テストデバイスの開口部へ滴下する時点で、本発明のキャップに内蔵させた標識抗体を含浸させてあるフィルターを標識抗体を含浸させてないフィルターに交換したキャップが赤色に着色し、金コロイド標識抗体がフィルターに捕捉されていることが確認された。次に、対照方法では、本来「++」に呈色すべきR部の呈色が「+」となる一方、本来呈色の観察されるべきでない陰性検体でも呈色「+」が確認された。このことは、金コロイド標識抗体液を - 3 0 で保存すると、金コロイド標識抗体の凝集が起こること、及び非特異的な反応が発生することを示していると考えられた。これに対して、本発明の方法では、基準方法と同様の結果が得られ、- 3 0 での保存でも影響を受けないことが判明した。

このようにして、試験例 4 及び試験例 5 により、本発明のキャップは標識抗体保存の安定性にすぐれているので、輸送時等の温度管理を厳密にしなくても済むことが判明した。

【産業上の利用可能性】

以上詳細に説明のとおり、本発明に係る検体の検査方法は、標識抗体を含浸させてあるフィルターを内蔵したキャップを希釈検体液を収容した容器本体に装着し、その容器から希釈検体液をテストデバイスに注入して反応を観察するので、従来の検査方法のように標識抗体液を希釈検体液に滴下する必要がなく、また、希釈検体液を第 1 の容器から第 2 の容器へ移しかえる必要がない。すなわち、すこぶる簡便な検査方法となった。その上、標識抗体液を希釈検体液に滴下する必要がないので、標識抗体液の滴下量に起因する誤差の発生を防止できる。すなわち、滴下量の個人差による反応不十分や非特異的な反応の発生を解消でき、検査精度が向上する。さらに、本発明の検査方法では、標識抗体を溶液状で長期間保存する必要がないので、標識抗体液の変質防止について配慮する必要がない。

また、本発明に係る検体収容用容器は、希釈検体液を収容するための容器本体に標識抗体を含浸させてあるフィルターを内蔵したキャップを装着したものであるから、きわめて簡単な構造でありながら、使いやすく、検査者によって検査精度が左右されないので、免疫反応を応用した検体の簡易診断用キットの構成器具として用いるのに最適である。

したがって、本発明に係る検体の検査方法及びその検査方法に用いる検体収容用器具は、インフルエンザウイルスなどのウイルス感染の有無、妊娠の判定など様々な症状の検査・診断に活用できるものである。

10

20

30

40

【 図 1 】

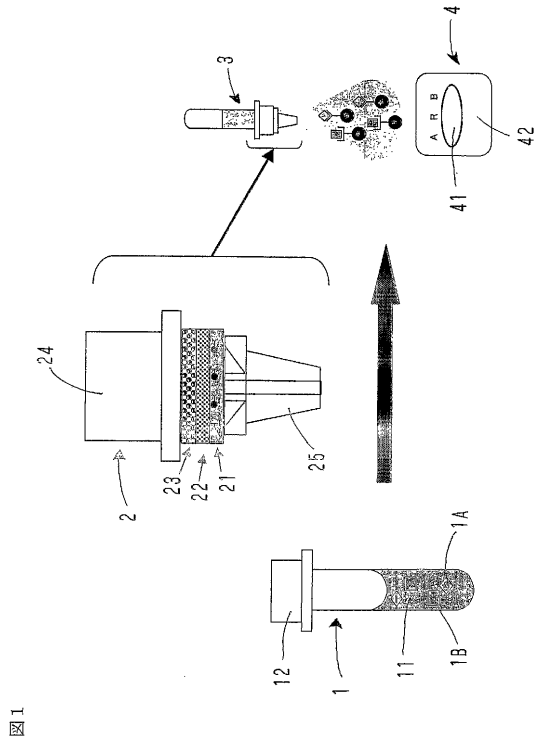


図1

フロントページの続き

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 特開平01-229969(JP,A)
特開2001-124775(JP,A)

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于检查样本的方法和用于容纳用于该方法的样本的容器 | | |
| 公开(公告)号 | JP4229943B2 | 公开(公告)日 | 2009-02-25 |
| 申请号 | JP2005503524 | 申请日 | 2004-03-09 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 积水医疗株式会社 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 第一化学薬品株式会社 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 积水医疗有限公司 | | |
| [标]发明人 | 小堀樹一郎 川本道子 牛澤幸司 | | |
| 发明人 | 小堀 樹一郎 川本 道子 牛澤 幸司 | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/569 B01L3/14 G01N33/53 | | |
| CPC分类号 | B01L3/50825 B01L2300/046 B01L2300/0681 G01N33/5304 G01N2333/11 | | |
| FI分类号 | G01N33/543.597 G01N33/569.L | | |
| 优先权 | 2003063832 2003-03-10 JP | | |
| 其他公开文献 | JPWO2004081568A5 JPWO2004081568A1 | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

在用于免疫测试样本的方法中，将包含浸渍有标记抗体的过滤器的盖子附着到包含稀释样本液体的容器主体上，将稀释的样本液体从容器注入测试装置中以观察反应并检查样品中是否存在物体。它是一种检查方法，可以减少检查员之间个体差异的影响，防止非特异性反应的发生，并且具有丰富的诊断结果的再现性和试剂的储存稳定性。一种用于上述测试方法的样品容纳容器，其具有盖子，该盖子在容器体中包含浸渍有标记抗体的过滤器，用于容纳稀释的样品液体。它适用于简易诊断试剂盒的组成工具。

| 透過フィルター | 商品名(会社名) | 孔径の大きさ | 孔径のサイズ | 固率 |
|-------------|-------------------|--------|--------|------|
| 高純度ポリエチレン濾紙 | LG20 (フロン工業) | 1.9 | 20 | 96.7 |
| ガラス繊維系濾紙 | F075-14 (アドバンテック) | 0.355 | 23 | 95.4 |
| ガラス繊維系濾紙 | GB-140 (アドバンテック) | 0.56 | 0.4 | 71.2 |
| セルロース系濾紙 | 17chr (ワットマン) | 0.92 | 表示なし | 57.7 |

) 考察