

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6601932号

(P6601932)

(45) 発行日 令和1年11月6日(2019.11.6)

(24) 登録日 令和1年10月18日(2019.10.18)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 O 1 J
GO 1 N 33/566 (2006.01) GO 1 N 33/566
GO 1 N 33/531 (2006.01) GO 1 N 33/531 B

請求項の数 16 (全 31 頁)

(21) 出願番号	特願2019-509859 (P2019-509859)	(73) 特許権者	000229519
(86) (22) 出願日	平成30年3月27日 (2018. 3. 27)		日本ハム株式会社
(86) 国際出願番号	PCT/JP2018/012330		大阪府大阪市北区梅田二丁目4番9号
(87) 国際公開番号	W02018/181263	(73) 特許権者	501203344
(87) 国際公開日	平成30年10月4日 (2018. 10. 4)		国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構
審査請求日	令和1年5月10日 (2019. 5. 10)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(31) 優先権主張番号	特願2017-61335 (P2017-61335)	(74) 代理人	100189131
(32) 優先日	平成29年3月27日 (2017. 3. 27)		弁理士 佐伯 拓郎
(33) 優先権主張国・地域又は機関	日本国 (JP)	(74) 代理人	100182486
			弁理士 中村 正展
(出願人による申告) 平成27年度、農林水産省、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業委託事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願		(74) 代理人	100147289
			弁理士 佐伯 裕子
早期審査対象出願		(74) 代理人	100158872
			弁理士 牛山 直子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液による抗原抗体反応阻害を防止する物質

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

免疫測定法における試料中の生体粘膜由来の体液に由来する抗原抗体反応における偽陽性及び／又は偽陰性を抑制する免疫反応阻害抑制剤であって、以下の(1)及び(2)のいずれかの化合物を含むことを特徴とする免疫反応阻害抑制剤；

(1) 「 R^1-SO_3H 」で表されるスルホン酸化合物又はその塩

(式中、 R^1 は、直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基、直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基を少なくとも1つ有する炭素環式芳香族基で置換された直鎖状の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル基、又は直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基を少なくとも1つ有する炭素環式芳香族基を表し、これらの基は置換基を有していてもよい。)、

(2) 「 $N^+-R^2R^3R^4R^5$ 」で表される第四級アンモニウムイオン又はその塩

(式中、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して直鎖状の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル基、又は少なくとも1つの直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基により置換されている炭素環式芳香族基を表し、これらの基は置換基を有していてもよい。))。

【請求項2】

(1)の式中、 R^1 は、未置換の直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ のアルキル基であるか、直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ のアルキル基を有するフェニル基で置換された直鎖状の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基であるか、又は直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ のアルキル基で置換されたフェニル基である、請求項1に記載の免疫反応阻害抑制剤。

【請求項3】

(2) の式中、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して、炭素環式芳香族基で置換されていてもよい直鎖状の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、又は少なくとも 1 つの直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ アルキル基で置換されている炭素環式芳香族基である、請求項 1 に記載の免疫反応阻害抑制剤。

【請求項 4】

(2) の式中、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して、未置換もしくはフェニル基で置換されている直鎖状の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、又は直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ アルキル基で置換されているフェニル基である、請求項 1 に記載の免疫反応阻害抑制剤。

【請求項 5】

(2) の式中、 $R^2 \sim R^5$ が下記の (a) ～ (e) のいずれかの場合である、請求項 4 に記載の免疫反応阻害抑制剤；

(a) $R^2 \sim R^5$ のいずれか 1 つが、フェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基であって、他の 3 つがメチル基もしくはエチル基である場合、

(b) $R^2 \sim R^5$ のいずれか 1 つが、メチル基もしくはエチル基であって、他の 3 つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基である場合、

(c) $R^2 \sim R^5$ のすべてが、フェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基である場合、

(d) $R^2 \sim R^5$ のいずれか 1 つがベンジル基であって、他の 3 つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基である場合、又は

(e) $R^2 \sim R^5$ のいずれか 2 つがメチル基もしくはエチル基であって、他の 2 つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_6 \sim C_{20}$ アルキル基である場合。

【請求項 6】

(2) の式中、 $R^2 \sim R^5$ が下記の (a) ～ (e) のいずれかの場合である、請求項 5 に記載の免疫反応阻害抑制剤；

(a) $R^2 \sim R^5$ のいずれか 1 つが直鎖の $C_3 \sim C_{16}$ アルキル基であって、他の 3 つがメチル基である場合、

(b) $R^2 \sim R^5$ のいずれか 1 つがメチル基であって、他の 3 つが直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、

(c) $R^2 \sim R^5$ のすべてが直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、

(d) $R^2 \sim R^5$ のいずれか 1 つがベンジル基であって、他の 3 つが直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、又は

(e) $R^2 \sim R^5$ のいずれか 2 つがメチル基であって、他の 2 つが直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合。

【請求項 7】

(2) がアンモニウムイオンの塩であって、ハロゲン化水素、硝酸、ヘキサフルオロリン酸、三フッ化二水素、及び過塩素酸なる群から選択された化合物との塩である、請求項 1、3 ～ 6 のいずれか一項に記載の免疫反応阻害抑制剤。

【請求項 8】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の免疫反応阻害抑制剤を使用することを特徴とする、免疫測定方法。

【請求項 9】

被験体の生体粘膜由来の体液を含有する試料中の被検物質を測定する ELISA、イムノクロマト法、ウエスタンブロット法、イムノブロット法、免疫沈降法、及びラテックス凝集法から選択されたいずれかの免疫測定法において、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の免疫反応阻害抑制剤を使用することを含む、抗原抗体反応における偽陽性及び／又は偽陰性が抑制された免疫測定方法。

【請求項 10】

被験体の生体粘膜由来の体液を含有する試料が、唾液、喀痰、喉拭い液、鼻拭い液、鼻腔吸引液、及び角結膜拭い液から選択された生体粘膜由来の体液を少なくとも 1 種含有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 1 1】

被検物質が、病原体、病原微生物、ホルモン、炎症関連物質、プロスタグランジン、及びメタボリックシンドローム関連物質からなる群から選択された物質である、請求項 8 ～ 10 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記病原体又は病原微生物が、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、コロナウイルス、狂犬病ウイルス、百日咳菌、溶血性連鎖球菌、大腸菌、食中毒細菌、クラミジア・トラコマテス及びマイコプラズマから選択された病原体又は病原微生物である、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の免疫反応阻害抑制剤を含むことを特徴とする免疫測定用キット。

【請求項 1 4】

免疫測定用キットが、ELISA、イムノクロマト法、ウエスタンブロット法、イムノブロット法、免疫沈降法、及びラテックス凝集法から選択されたいずれかの免疫測定法のためのキットである、請求項 1 3 に記載のキット。

【請求項 1 5】

被験体が病原性疾患に罹患しているか否かを、被験体の生体粘膜由来の体液を用いて免疫反応により診断するためのキットであって、
被検体液試料の希釈剤、展開液、ブロッキング液の少なくとも 1 つに請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の免疫反応阻害抑制剤が添加されていることを特徴とする、キット。

【請求項 1 6】

病原性疾患が、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、コロナウイルス、狂犬病ウイルス、百日咳菌、溶血性連鎖球菌、大腸菌、食中毒細菌、クラミジア・トラコマテス及びマイコプラズマから選択された病原体又は病原性微生物により引き起こされる疾患であることを特徴とする、請求項 1 5 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫測定法における体液成分、特に唾液など生体粘膜由来成分による抗原抗体反応阻害を抑制する阻害抑制物質の提供、及び当該阻害抑制物質を用いた迅速、簡便かつ正確な免疫測定法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト、動物の疾病等の診断には現在様々な簡易検査法が開発されている。簡易診断法は、検出したい対象物質（病原体等）に対する特異的抗体の結合反応（抗原抗体反応）を用いて診断する方法が主流であり、ELISA、イムノクロマト法、ラテックス凝集法などが広く知られている。患者、患畜より検体を採取後、迅速かつ簡便に結果を得ることができるため、症状が早期のうちに治療を開始できることから、簡易検査試薬およびキットの重要性は、医療、畜産の現場において年々高まっている。

現在ヒトや家畜の疾病の診断では、一部の病原体で患者から採取した咽頭拭い液などを検体として迅速診断をする方法など簡易診断法の実用化が進んでいる。しかし、これはインフルエンザの迅速診断など一部場面に限られており、未だ診断できる対象が限られている。

その要因の一つとして、検体に混入するヒト・動物由来の唾液などの体液成分が抗原抗体反応に悪影響（偽陽性化、偽陰性化）を及ぼし、診断結果が正確に得られない現象が生じる場合があることがあげられる。例えば、家畜生産に重大な被害をもたらす口蹄疫においては、現場での迅速な診断が重要であるため大きな機器を必要としないイムノクロマトが必要とされているが、ウシ唾液など生体粘膜由来成分が検体に混入することによりイムノクロマトの反応異常が起これば正確な診断ができないという問題点があった。

体液検体のうちでも特に唾液などの生体粘膜由来検体の場合、粘膜免疫系に由来する生体防御成分を多く含んでおり、イムノアッセイによる被検出物質の検出において、偽陰性や偽陽性の原因となることが知られていた（特許文献1、2）。

【0003】

このような、唾液など体液成分による抗原抗体反応の阻害を抑制するための阻害抑制物質の研究開発も活発化してきており、主として、各種界面活性剤など界面活性作用を有する物質、又はスルホン酸基、カルボキシル基もしくは硫酸基などイオン性官能基を分子中に多数有する分子量の大きなポリマーを用いる技術が注目されている。例えば、非イオン性又は両性界面活性剤により唾液中のムチンによるミュータンス連鎖球菌の凝集を可溶化する技術（特許文献3）、スルホン酸基及び／又はカルボキシル基を有する陽イオン交換樹脂を用いて咽頭由来検体を前処理する技術（特許文献4）スルホン酸基、カルボン酸基などを有する疎水性環式モノマーの重合ポリマーからなるイオン性界面活性剤により血清中の妨害物質の作用を抑制する技術（特許文献5）、スルホン酸基又はその塩を含有する共役ジエン系共重合体により血液中の妨害物質作用を抑制する技術（特許文献6）、硫酸基を2個以上有する平均分子量5,000～500,000のデキストラン硫酸塩を用いて生体粘膜由来成分中のIgA等の妨害作用を抑制する技術（特許文献1）などが提案されている。また、低分子化合物を用いた例では、便、唾液などの検体中のヘモグロビンの免疫学的測定における妨害物質を、SH基を有する化学物質により抑制する技術（特許文献7）や、う蝕原因細菌の測定、同定検査時の唾液など口腔内検体をドデシル硫酸ナトリウム等陰イオン界面活性剤で処理する方法（特許文献2）が提案されている。そして、HCVなどウイルス含有血液由来検体中のウイルス抗原の測定に際し、検体を陰イオン性、両イオン性又は非イオン性界面活性剤含有処理液を用いることで、ウイルス粒子からの抗原抽出の効率化と共に血清中成分の測定阻害が抑制できることが記載されている（特許文献8）。

しかし、いずれも、特定の病原体など限られた対象抗原に対しては一定の効果を上げているものの、唾液など体液成分による広範な抗原抗体反応の阻害に対しての強力な抑制剤を提供するには至っておらず、広くタンパク質抗原、及び当該抗原を含む各種病原体全般に適用できる強力な反応阻害抑制剤の提供が強く望まれていた。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】特開2014-149189号公報

【特許文献2】特開2009-52945号公報

【特許文献3】特開2002-357599号公報

【特許文献4】特許第4969245号公報

【特許文献5】特開2005-241415号公報

【特許文献6】特開平9-304384号公報

【特許文献7】特開2010-117244号公報

【特許文献8】特許第3171827号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、体液試料、特に唾液などの生体粘膜由来試料を用いて、特定の病原体のみならず、広く一般的なタンパク質抗原の簡便で正確な免疫測定法を提供するものであり、また、その際に用いる唾液など体液成分による抗原抗体反応阻害に対する抑制剤を提供するものである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明では、この問題の解決のため、体液成分のうちでも免疫反応阻害作用の強い唾液に着目し、唾液成分由来の広範なタンパク質抗原に対する強い免疫反応阻害作用を抑制で

きる物質であれば、広範な病原体、アレルゲンの検出、測定技術に適用できる反応阻害抑制剤となり得るのでは、と考えた。

そこで、大量に分泌されるウシ唾液を多数の個体から集めて各々の免疫反応阻害活性を調べ、最も阻害活性の高い唾液試料を用い、簡便に効果が確認できるイムノクロマトを用いてスクリーニング実験を行うこととした。その際の検出対象抗原としてはカンピロバクター抗原を選択し、市販のカンピロバクター検出キットを用いた。

まず、以前に、唾液など体液試料で特定の病原体などの免疫反応において一定の効果が確認されている各種の界面活性剤を試したが、いずれの界面活性剤の効果も十分ではなかった。次いで、各種カラム樹脂を試したところ、特にスルホン酸基を有する強酸性陽イオン交換樹脂の効果が高かったが、乾燥により性能が劣化するなど、効果が安定しない欠点があった。

10

次にスルホン酸基を有する強酸性陽イオン交換樹脂の効果安定化を検討するため、樹脂の不純物をイムノクロマト用展開液で洗浄し、口蹄疫抗原検出イムノクロマトを用いて唾液検体に対するコントロールラインの反応性を計測した。同時に、比較のために洗浄後の洗浄液についても同様の計測を行った。その結果、驚くべきことに、洗浄液の方が洗浄後の樹脂の10倍近い強い反応性を示した。すなわち、スルホン酸基を有する強酸性陽イオン交換樹脂において観察された高い免疫阻害抑制効果は、強酸性陽イオン交換樹脂製造過程で生成され不純物として混在していたスルホン酸基を有する低分子化合物であったと解される。

【0007】

20

そこで、不純物として混在している可能性の高い種々の低分子のスルホン酸塩について、唾液検体に対するコントロールラインの反応性及び口蹄疫ウイルス検出感度を測定してその反応阻害抑制効果を評価したところ、少なくとも1つの炭素数5以上の直鎖アルキル基を有する脂肪族又は芳香族のスルホン酸塩が、各種のタンパク質抗原の免疫測定法において、高い反応阻害抑制効果を示し、偽陽性、偽陰性を防止できることを見いだした。

また、スルホン酸塩と同様に強いイオン性官能基を有する低分子化合物を検索し、各種第四級アンモニウム塩についても同様の反応阻害抑制効果を確認した。

以上のことから、少なくとも1つの直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基を有する脂肪族又は芳香族スルホン酸もしくはその塩、及び第四級アンモニウムイオンもしくはその塩は、免疫測定法における唾液など体液の混入による免疫反応阻害の抑制剤として使用できることがわかった。

30

以上の知見を得たことで、本発明を完成することができた。

【0008】

すなわち、本発明は以下の通りである。

〔1〕 免疫測定法における試料中の体液、特に生体粘膜由来の体液に由来する免疫反応阻害作用を抑制する免疫反応阻害抑制剤であって、以下の(1)及び(2)のいずれかの化合物を含むことを特徴とする免疫反応阻害抑制剤；

(1) 「 $R^1 - SO_3H$ 」で表されるスルホン酸化合物又はその塩

(式中、 R^1 は、直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基、直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基を少なくとも1つ有する炭素環式芳香族基で置換された直鎖状の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル基、又は直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基を少なくとも1つ有する炭素環式芳香族基を表し、これらの基は置換基を有していてもよい。)、

40

(2) 「 $N^+ - R^2 R^3 R^4 R^5$ 」で表される第四級アンモニウムイオン又はその塩

(式中、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して直鎖状の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル基、又は少なくとも1つの直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基により置換されている炭素環式芳香族基を表し、これらの基は置換基を有していてもよい。))。

ここで、本発明の「免疫反応阻害抑制剤」とは、被検試料中に存在する可能性がある標的抗原を検出又は測定するための抗原抗体反応を利用した免疫測定法において、被検試料中に含まれるか又は含まれる可能性がある体液に由来する免疫反応阻害作用を有意に抑制する化合物又は当該化合物を有効成分として含む組成物を指す。

50

〔2〕 (1) の式中、 R^1 は、未置換の直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ のアルキル基であるか、直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ のアルキル基を有するフェニル基で置換された直鎖状の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基であるか、又は直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ のアルキル基で置換されたフェニル基である、前記〔1〕に記載の免疫反応阻害抑制剤。

〔3〕 (2) の式中、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して、炭素環式芳香族基で置換されていてもよい直鎖状の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、又は少なくとも1つの直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ アルキル基で置換されている炭素環式芳香族基である、前記〔1〕に記載の免疫反応阻害抑制剤。

〔4〕 (2) の式中、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して、未置換もしくはフェニル基で置換されている直鎖状の $C_1 \sim C_{20}$ アルキル基、又は直鎖状の $C_5 \sim C_{20}$ アルキル基で置換されているフェニル基である、前記〔1〕に記載の免疫反応阻害抑制剤。

10

〔5〕 (2) の式中、 $R^2 \sim R^5$ が下記の (a) ～ (e) のいずれかの場合である、前記〔4〕に記載の免疫反応阻害抑制剤；

(a) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つが、フェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基であって、他の3つがメチル基もしくはエチル基である場合、

(b) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つが、メチル基もしくはエチル基であって、他の3つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基である場合、

(c) $R^2 \sim R^5$ のすべてが、フェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基である場合、

(d) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つがベンジル基であって、他の3つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基である場合、又は

20

(e) $R^2 \sim R^5$ のいずれか2つがメチル基もしくはエチル基であって、他の2つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_6 \sim C_{20}$ アルキル基である場合。

〔6〕 (2) の式中、 $R^2 \sim R^5$ が下記の (a) ～ (e) のいずれかの場合である、前記〔5〕に記載の免疫反応阻害抑制剤；

(a) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つが直鎖の $C_3 \sim C_{16}$ アルキル基であって、他の3つがメチル基である場合、

(b) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つがメチル基であって、他の3つが直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、

(c) $R^2 \sim R^5$ のすべてが直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、

30

(d) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つがベンジル基であって、他の3つが直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、又は

(e) $R^2 \sim R^5$ のいずれか2つがメチル基であって、他の2つが直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合。

〔7〕 (2) がアンモニウムイオンの塩であって、ハロゲン化水素、硝酸、ヘキサフルオロリン酸、三フッ化二水素、及び過塩素酸なる群から選択された化合物との塩である、前記〔1〕、〔3〕～〔6〕のいずれかに記載の免疫反応阻害抑制剤。

〔8〕 前記〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の免疫反応阻害抑制剤を使用することを特徴とする、免疫測定方法。

より具体的には、標的抗原特異的抗体を用いて被検試料中に存在するか又は存在する可能性がある標的抗原を検出又は測定する方法であって、

40

(a) 前記〔1〕～〔7〕のいずれかに記載の免疫反応阻害抑制剤を添加する工程、及び
(b) 被検試料と標的抗原特異的抗体とを接触させる工程
を含み、

ここで前記工程 (a) は前記工程 (b) と同時、またはそれに先だって行われるものであり、前記工程 (a) が前記工程 (b) に先だって行われる場合は、前記添加する工程は、被検試料希釈液、抗体希釈液、ブロッキング液、及び反応バッファー溶液からなる群から選択される少なくとも1つに対して行われるものである、方法とすることができる。

〔9〕 被験体由来の体液、特に生体粘膜由来の体液を含有する試料中の被検物質を測定する ELISA、イムノクロマト法、ウェスタンブロット法、イムノブロット法、免疫沈

50

降法、及びラテックス凝集法から選択されたいずれかの免疫測定法において、前記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の免疫反応阻害抑制剤を使用することを含む、偽陽性及び／又は偽陰性が抑制された免疫測定方法。

より具体的には、下記の〔９ a〕、〔９ b〕又は〔９ c〕の方法ということができる。

〔９ a〕 イムノクロマト法を用いた標的抗原の検出又は測定方法であって、

（a）前記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の免疫反応阻害抑制剤を添加する工程、及び

（b）メンブレン上で被検試料と標的抗原検出用抗体とを接触させる工程、

を含み、

ここで前記工程（a）は前記工程（b）と同時、またはそれに先だって行われるものであり、前記工程（a）が前記工程（b）に先だって行われる場合は、前記添加する工程は、被検試料希釈液、イムノクロマト展開液、抗体希釈液、ブロッキング液、イムノクロマト用メンブレンの前処理液、コンジュゲートパッド固定用溶液、及びサンプルパッド固定用溶液からなる群から選択される少なくとも１つに対して行われるものである、方法。

10

〔９ b〕 E L I S Aを用いた標的抗原の検出又は測定方法であって、

（a）前記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の免疫反応阻害抑制剤を添加する工程、及び

（b）被検試料と標的抗原検出用抗体とを接触させる工程、

を含み、

ここで前記工程（a）は前記工程（b）と同時、または異時に行われるものであり、前記工程（a）が前記工程（b）と異時に行われる場合は、前記添加する工程は、被検試料希釈液、ブロッキング液、一次抗体希釈液、二次抗体希釈液、及び洗浄用緩衝液からなる群から選択される少なくとも１つに対して行われるものである、方法。

20

〔９ c〕 ウエスタンブロット法、イムノブロット法、免疫沈降法、及びラテックス凝集法から選択されたいずれかの方法を用いた標的抗原の検出又は測定方法であって、

（a）前記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の免疫反応阻害抑制剤を添加する工程、及び

（b）被検試料と標的抗原検出用抗体とを接触させる工程、

を含み、

ここで前記工程（a）は前記工程（b）と同時、またはそれに先だって行われるものであり、前記工程（a）が前記工程（b）に先だって行われる場合は、前記添加する工程は、被検試料希釈液、ブロッキング液、抗体希釈液、及び反応バッファーからなる群から選択される少なくとも１つに対して行われるものである、方法。

30

〔１０〕 被験体由来の体液を含有する試料が、唾液、喀痰、喉拭い液、鼻拭い液、鼻腔吸引液、及び角結膜拭い液から選択された生体粘膜由来の体液を少なくとも１種含有する、前記〔９〕に記載の方法。

〔１１〕 被検物質が、病原体、病原微生物、ホルモン、炎症関連物質、プロスタグランジン、及びメタボリックシンドローム関連物質からなる群から選択された物質である、前記〔８〕～〔１０〕のいずれかに記載の方法。

〔１２〕 前記病原体又は病原微生物が、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、ＲＳウイルス、コロナウイルス、狂犬病ウイルス、百日咳菌、溶血性連鎖球菌、大腸菌、食中毒細菌、クラミジア・トラコマテス及びマイコプラズマから選択された病原体又は病原微生物である、前記〔１１〕に記載の方法。

40

〔１３〕 前記〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の免疫反応阻害抑制剤を含むことを特徴とする免疫測定用キット。

〔１４〕 免疫測定用キットが、E L I S A、イムノクロマト法、ウエスタンブロット法、イムノブロット法、免疫沈降法、及びラテックス凝集法から選択されたいずれかの免疫測定法のためのキットである、前記〔１３〕に記載のキット。

〔１５〕 被験体が病原性疾患に罹患しているか否かを、被験体由来の体液、特に生体粘膜由来の体液を用いて免疫反応により診断するためのキットであって、被検体液試料の希釈剤、展開液、ブロッキング液の少なくとも１つに前記〔１〕～〔７〕のいずれか項に記載の免疫反応阻害抑制剤が添加されていることを特徴とする、キット。

〔１６〕 病原性疾患が、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、

50

R S ウイルス、コロナウイルス、狂犬病ウイルス、百日咳菌、溶血性連鎖球菌、大腸菌、食中毒細菌、クラミジア・トラコマテス及びマイコプラズマから選択された病原体又は病原性微生物により引き起こされる疾患であることを特徴とする、前記〔15〕に記載のキット。

【発明の効果】

【0009】

本発明の免疫反応阻害抑制剤を、各種免疫測定方法において前処理液又は展開液に用いることにより、唾液などの体液試料又は唾液などが混入する可能性のある被検試料に対しても、抗原抗体反応の低下を効率的に抑制できる。従来、唾液などの体液の影響を除くために前処理等が必要であったが、本発明により前処理等がなく唾液などの体液が混入する可能性がある検体を測定することができるようになったため、医療や畜産の現場での迅速で的確な対応が可能となり、検査品質の向上、生産性の向上に貢献することが期待される。

10

特に、ウシ、ブタなどの家畜の疾病診断において口蹄疫、インフルエンザウイルスなどの重要疾病の診断を、唾液や鼻喉拭い液などの免疫反応阻害活性の強い被検試料であっても迅速かつ簡便なイムノクロマトキットを用いて、正確に診断を行うことが可能となった。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】イムノクロマトに対するウシ唾液での阻害活性の検証。カンピロバクター検出イムノクロマトであるNHイムノクロマトカンピロバクターにおいてカンピロバクター陽性検体を試験した際のテストラインへの影響（抗カンピロバクター抗体でカンピロバクター菌検出の際の反応阻害）とコントロールラインへの影響（抗IgG抗体で抗口蹄疫抗体を検出する際の反応阻害）

20

【図2】カンピロバクター検出用イムノクロマト（NHイムノクロマトカンピロバクター）においてウシ唾液検体を希釈することにより反応性の回復可能性の検証。

【図3】口蹄疫抗原検出用イムノクロマトを用いた直鎖アルキルスルホン酸塩の免疫反応阻害の抑制効果の検証。直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを0.3（w/v）%添加したウシ唾液49検体での口蹄疫ウイルス検出試験結果。

【発明を実施するための形態】

30

【0011】

1. 本発明の免疫反応阻害抑制剤

（1-1）本発明の免疫反応阻害抑制剤として用いられる化合物

本発明で「免疫反応阻害抑制剤」というとき、被検試料中に存在する可能性がある標的抗原を検出又は測定するための抗原抗体反応を利用した免疫測定法において、被検試料中に含まれる（又は含まれる可能性がある）体液、特に生体粘膜由来の体液に由来する免疫反応阻害作用を抑制する化合物又は当該化合物を有効成分として含む組成物を指す。

本発明の免疫反応阻害抑制剤の1つは、分子中に置換されていてもよいC₅以上の直鎖アルキル基を有する脂肪族又は芳香族スルホン酸又はそれらの塩である。

他の1つは分子中に置換されていてもよいC₃以上の直鎖アルキル基を有する第四級アンモニウムイオンもしくはその塩であって、いずれも分子内に大きな電荷の偏りがある低分子化合物であることを特徴としている。

40

【0012】

（1-2）直鎖アルキル基含有スルホン酸化合物又はその塩

本発明の免疫反応阻害抑制剤のうち、直鎖アルキル基含有スルホン酸化合物は、分子中に置換されていてもよいC₅～C₃₀直鎖状アルキル基を少なくとも1つ有しており、下記（式1）で表されるスルホン酸化合物もしくはその塩である。

（式1）



（式中、R¹は、直鎖状のC₅～C₃₀アルキル基、直鎖状のC₅～C₃₀アルキル基を

50

少なくとも1つ有する炭素環式芳香族基で置換された直鎖状の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル基、又は直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基を少なくとも1つ有する炭素環式芳香族基を表し、これらの基は置換基を有していてもよい。）

【0013】

すなわち、

(a) 置換されていてもよい直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ 、好ましくは $C_7 \sim C_{20}$ 、より好ましくは $C_8 \sim C_{15}$ 、特に好ましくは $C_{10} \sim C_{12}$ アルキルスルホン酸又はその塩、

(b) 置換されていてもよい直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ 、好ましくは $C_7 \sim C_{20}$ 、より好ましくは $C_8 \sim C_{15}$ 、特に好ましくは $C_{10} \sim C_{12}$ アルキル基を有する炭素環式芳香族(アリール)スルホン酸又はその塩、

(c) 置換されていてもよい直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ 、好ましくは $C_7 \sim C_{20}$ 、より好ましくは $C_8 \sim C_{15}$ 、特に好ましくは $C_{10} \sim C_{12}$ アルキル基を有する炭素環式芳香族(アリール)基を有する直鎖状の $C_1 \sim C_{30}$ 、好ましくは $C_1 \sim C_{20}$ 、より好ましくは $C_1 \sim C_{15}$ 、特に好ましくは $C_1 \sim C_{12}$ アルキルスルホン酸又はその塩である。

直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基としては、炭素数が大きいほど反応阻害抑制効果が高い傾向が見られるが、製造のしやすさ、測定用試料への溶解のしやすさから炭素数の長さが制限される。

炭素環式芳香族基(アリール基)としては、フェニル基又はナフチル基が好ましく、フェニル基が特に好ましい。

【0014】

これらの直鎖アルキル基含有スルホン酸化合物は、直鎖アルキル基以外の置換基を有していてよく、例えば、ハロゲン分子、ヒドロキシ基、アルケニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルコキシ基、アシル基、アセチル基、ホルミル基、カルボニル基、カルボキシ基、アミノ基、イミノ基、シアノ基、アゾ基、ニトロ基、チオール基、ケトン基、などアルキル基を置換し得る官能基であればどのような置換基でもよいが、直鎖アルキル基含有スルホン酸化合物全体の分子内の電荷の偏りを損なわない官能基が好ましい。具体的には正の電荷を有するか、又は電荷を有さない官能基が好ましい。

【0015】

これらの直鎖アルキル基含有スルホン酸化合物の代表的な例として、1-ペンタンスルホン酸、1-ヘキサンスルホン酸、1-ヘプタンスルホン酸、1-オクタンスルホン酸、1-ノナンスルホン酸、1-デカンスルホン酸、1-ウンデカンスルホン酸及び1-ドデシルスルホン酸などの直鎖アルキルスルホン酸；並びに1-ドデシルベンゼンスルホン酸、p-オクチルベンゼンスルホン酸、及びp-トルエンスルホン酸などの直鎖アルキルベンゼンスルホン酸；が例示できるが、これら化合物には限定されない。

【0016】

また、直鎖アルキル基含有スルホン酸の塩としては、スルホ基(スルホン酸基)をアルカリ金属化合物、アルカリ土類化合物、アンモニウムなどの塩基化合物で中和した塩を指す。好ましくは、ナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩、アンモニウム塩などがあり、特にナトリウム塩が好ましい。

【0017】

(2) 第四級アンモニウムイオン又はその塩

本発明の免疫反応阻害抑制剤のうち、第四級アンモニウムイオン又はその塩は、分子中に置換されていてもよい直鎖アルキル基又は置換されていてもよいアリール基のいずれか1つの基を少なくとも1つ有している、下記(式2)で表される常に正電荷を有する第四級アンモニウムカチオン、又はハロゲンなどアニオンとの塩である第四級アンモニウム塩である。

(式2)

「 $N^+ - R^2 R^3 R^4 R^5$ 」で表される第四級アンモニウムイオン又はその塩

(式中、 $R^2 \sim R^5$ は、それぞれ独立して直鎖状の $C_1 \sim C_{30}$ アルキル基、又は少なくとも1つの直鎖状の $C_5 \sim C_{30}$ アルキル基により置換されている炭素環式芳香族基を表

10

20

30

40

50

し、これらの基は置換基を有していてもよい。) 。

【0018】

ここで、独立した $R^2 \sim R^5$ のうち少なくとも1つの基は、

(i) 直鎖状の $C_3 \sim C_{30}$ 、好ましくは $C_3 \sim C_{20}$ 、より好ましくは $C_5 \sim C_{15}$ の直鎖アルキル基であるか、又は

(ii) 直鎖状の $C_3 \sim C_{30}$ 、好ましくは $C_3 \sim C_{20}$ 、より好ましくは $C_5 \sim C_{15}$ のアルキル基で置換された炭素環式芳香族基（アリール基）を置換基として有している $C_1 \sim C_{30}$ 、好ましくは $C_3 \sim C_{20}$ 、より好ましくは $C_5 \sim C_{15}$ の直鎖アルキル基であることが好ましい。

また、炭素環式芳香族基（アリール基）としては、フェニル基又はナフチル基が好ましく、フェニル基が特に好ましい。

【0019】

本発明の望ましい態様では、 $R^2 \sim R^5$ が下記の (a) ～ (e) のいずれかの場合として表記することができる。

(a) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つが、フェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ 、好ましくは $C_3 \sim C_{16}$ アルキル基であって、他の3つがメチル基もしくはエチル基、好ましくはメチル基である場合、

(b) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つが、メチル基もしくはエチル基、好ましくはメチル基であって、他の3つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ 、好ましくは $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、

(c) $R^2 \sim R^5$ のすべてが、フェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基、好ましくは未置換の直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、

(d) $R^2 \sim R^5$ のいずれか1つがベンジル基であって、他の3つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_3 \sim C_{20}$ アルキル基、好ましくは未置換の直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合、又は

(e) $R^2 \sim R^5$ のいずれか2つがメチル基もしくはエチル基、好ましくはメチル基であって、他の2つがフェニル基で置換されていてもよい直鎖状の $C_6 \sim C_{20}$ アルキル基、好ましくは未置換の直鎖の $C_3 \sim C_{12}$ アルキル基である場合。

【0020】

本発明の免疫反応阻害抑制剤として用いられる第四級アンモニウムイオン又はその塩は、直鎖アルキル基以外の置換基を有していてもよく、例えば、ハロゲン分子、ヒドロキシ基、アルケニル基、シクロアルキル基、シクロアルケニル基、アルコキシル基、アシル基、アセチル基、ホルミル基、カルボニル基、カルボキシル基、アミノ基、イミノ基、シアノ基、アゾ基、ニトロ基、チオール基、ケトン基、などアルキル基を置換し得る官能基であればどのような置換基でもよいが、第四級アンモニウムイオン全体の分子内の電荷の偏りを損なわない官能基が好ましい。具体的には負の電荷を有するか、又は電荷を有さない官能基が好ましい。

【0021】

これらの第四級アンモニウムイオンの代表的な例として、n-オクチルトリメチルアンモニウム、ラウリルトリメチルアンモニウム、ミリスチルトリメチルアンモニウム、ステアリルトリメチルアンモニウム、ドデシルトリメチルアンモニウム；メチルトリオクチルアンモニウム、メチルトリブチルアンモニウム；テトラブチルアンモニウム、テトラメチルアンモニウム；及びベンジルトリブチルアンモニウム；を例示することができるが、これらアンモニウムイオンには限定されない。

【0022】

本発明の免疫反応阻害抑制剤として用いられる第四級アンモニウムイオンは、常に正電荷を有し反応性が高いため、安定なアンモニウム塩として用いることが好ましい。安定なアンモニウム塩を形成するアニオンは、ハロゲン、硝酸、ヘキサフルオロリン酸、三フッ化二水素、もしくは過塩素酸などであり、好ましくは Cl 、 Br 、又は I 等のハロゲン化物である。

【0023】

2. 本発明の免疫測定法における検出、測定対象

(2-1) 検出、測定対象

本発明における検出物質は、イムノアッセイなど抗原抗体反応を利用した免疫測定法で測定し得る抗原又は抗体である。抗原としては抗体を作製し得るものなら如何なる抗原でもよいが、タンパク質、糖タンパク質又はペプチドが好ましく、これらの物質を含む原生動物、真菌、細菌、マイコプラズマ、リケッチア、クラミジア、ウイルス等も検出し得る。特に、口蹄疫ウイルス、インフルエンザウイルス、アデノウイルス、RSウイルス、コロナウイルス、狂犬病ウイルス、百日咳菌、溶血性連鎖球菌、又はカンピロバクター、サルモネラ、病原性大腸菌等の食中毒細菌のような病原性のウイルスや細菌を迅速かつ正確に検出又は定量する際に適用することが好ましい。

10

さらに、唾液試料からのプロスタグランジンなどのエイコサノイド、コルチゾール等ストレスホルモン、テストステロン、エストラジオールなどの性ホルモン、メラトニン、インシュリンなどの各種ホルモン、TNF- α 、IL-1 β 等炎症関連物質、 α -アミラーゼなど消化酵素、アディポネクチンなどのメタボリックシンドローム関連物質のELISA、イムノアッセイ(EIA)などによる検出、測定(高知県大学紀要 看護学部編第64巻、第73~83頁、2014)の際にも有用である。

また、飲食品、飼料などの品質管理において、保存時にヒトや動物の体液が混入するおそれがある場合、飲食品、飼料中のアレルゲンタンパク質抗原の検出又は定量にも適用することができる。

20

【0024】

前記抗原を検出するための抗体は、測定対象とする抗原と特異的に反応して結合する抗体であれば、モノクローナル抗体でなくても、ポリクローナル抗体、抗血清を用いることもできる。

【0025】

(2-2) 被検試料

本発明の免疫測定法に付される被検試料は、標的抗原もしくは標的抗体を有しているか、又は有している可能性がある試料であり、特に限定されないが、妨害物質の影響を抑制するという本発明の効果を大いに発揮できる生体試料、特に唾液などの生体粘膜由来試料が好ましく、典型的には、ヒトや動物(ブタ、ウシ、鶏、ヤギ、ヒツジなどの家畜、イヌ、ネコなどの愛玩動物など)から採取する生体粘膜由来の体液、例えば、唾液、口腔拭い液、喀痰、咽頭拭い液、鼻腔拭い液、鼻腔吸引液、及び角結膜拭い液などから選択される検体又はその希釈液などが挙げられる。その他、これら体液が混入するおそれのある飲食品、飼料なども被検試料となり得る。特に、唾液試料は、最も非侵襲的な採取方法であるため好ましい。

30

【0026】

3. 本発明の免疫測定法及び本発明の免疫反応阻害抑制剤の使用法

(3-1) 本発明抗原抗体反応を用いた検出系、測定系

本発明の免疫反応阻害抑制剤は、抗原抗体反応を用いた検出系、測定系であれば全て適用できる。具体的には、イムノクロマト、ELISA、ウエスタンブロット、イムノブロット、免疫沈降、ラテックス凝集法などに適用すると、偽陰性及び偽陽性が抑えられ好ましい。とりわけ、唾液など粘膜由来物質の影響を受けやすいイムノクロマト法に適用すると効果が高い。

40

以下、各免疫測定法について本発明の典型的な使用方法を例示して簡単に説明するが、本発明の使用方法はこれらの方法には限定されない。

【0027】

(a) イムノクロマト法における使用方法

イムノクロマト法においては、ニトロセルロース膜等の適当なメンブレン上にあらかじめ被検試料中の標的抗原特異的な抗体(キャプチャー抗体)を固定化しておき、検体滴下部に準備した金属コロイドなどで標識した抗体と、検体中の抗原と形成した免疫複合体を

50

、該メンブレンの毛細管現象を利用して移動展開させる。キャプチャー抗体上に免疫複合体がトラップされた場合の標識量（テストライン）を目視で定性判定できる。読み取り装置としてイムノクロマトリーダー（以下、ICリーダーともいう。）を用いれば、反応性を数値化することもできる。固定化したキャプチャー抗体の下流には金属コロイドで標識した抗体を認識する抗IgG抗体等が固定化されており、余剰の金属コロイド標識抗体が結合する位置がコントロールラインとして目視あるいはイムノクロマトリーダーで確認される。

【0028】

イムノクロマト法では、被検試料を緩衝液などで希釈して用いるが、本発明の免疫反応阻害抑制剤をあらかじめ希釈液中に添加しておくか、又は被検試料と同時に希釈液中に添加することができる。

10

その際、希釈液として、一般的なイムノクロマト法の展開液として用いられているトリス緩衝液やリン酸緩衝液等（必要に応じて界面活性剤やアルブミン等のタンパク質を添加してもよい）を用いれば、そのままイムノクロマト法の展開液として使用できる。

また、金属コロイド標識抗体、ラテックス粒子標識抗体などの希釈液中に添加しておくこともできる。ラテックス粒子のブロッキングに用いてもよい。

さらに、イムノクロマト法で用いるニトロセルロース膜等のメンブレンをブロッキングするためのメンブレン前処理液や、コンジュゲートパッド、サンプルパッドへの固定のための溶液中にも用いることができる。

すなわち、本発明の免疫測定法のうちイムノクロマト法を用いた標的抗原の検出又は測定方法は、

20

（a）本発明の免疫反応阻害抑制剤を添加する工程、及び

（b）メンブレン上で被検試料と標的抗原検出用抗体とを接触させる工程、

を含み、

ここで前記工程（a）は前記工程（b）と同時、またはそれに先だって行われるものであり、前記工程（a）が前記工程（b）に先だって行われる場合は、前記添加する工程は、被検試料希釈液、イムノクロマト展開液、抗体希釈液、ブロッキング液、イムノクロマト用メンブレンの前処理液、コンジュゲートパッド固定用溶液、及びサンプルパッド固定用溶液からなる群から選択される少なくとも1つに対して行われるものである、方法とい

30

【0029】

イムノクロマト法などの免疫測定法において、希釈液、前処理液など中に添加する本発明の免疫反応阻害抑制剤の最適な濃度範囲は、免疫反応阻害抑制剤の種類によっても、被検対象生物の種類、年齢、混入する体液の種類、検出対象となる標的抗原の種類などによっても異なるが、一般的に0.01～10（w/v）%であり、好ましくは0.02～5.0（w/v）%、さらに好ましくは0.05～3.0（w/v）%、特に好ましくは0.1～1.0（w/v）%である。

【0030】

（b）ELISA

ELISAは、直接吸着法であれば、被検試料溶液をマイクロプレート、ガラスビーズなど固相に吸着させ、抗原抗体反応及び酵素反応に関与しないタンパク質（スキムミルク、アルブミンなど）で固相をブロッキングした後、標的抗原特異的抗体を反応させて、抗原抗体反応を起こさせ、余分な抗体を洗い流す。（抗体が標識されていない場合は、酵素標識二次抗体を反応させて二次抗体の洗浄工程が付加される。）次いで標識した酵素の基質を加えて酵素反応生成物を検出する。

40

サンドイッチ法であれば、標的抗原に特異的な捕獲抗体を固相に吸着させ、ブロッキング工程後、被検試料溶液及び捕獲抗体とは別のエピトープを認識する抗原特異的抗体（一次抗体）を反応させ、一次抗体が標識されていない場合はさらに標識二次抗体を反応させる。

【0031】

50

直接吸着法であってもサンドイッチ法であっても、E L I S Aにおける被検試料希釈液、ブロッキング用のスキムミルクなど溶解液、及び／又は標的抗原特異的抗体、二次抗体等の抗体用希釈液中に添加して使用することができる。

すなわち、本発明の免疫測定法のうちE L I S Aを用いた標的抗原の検出又は測定方法は、

(a) 本発明の免疫反応阻害抑制剤を添加する工程、及び

(b) 被検試料と標的抗原検出用抗体とを接触させる工程

を含み、

ここで前記工程(a)は前記工程(b)と同時、または異時に行われるものであり、前記工程(a)が前記工程(b)と異時に行われる場合は、前記添加する工程は、被検試料希釈液、ブロッキング液、一次抗体希釈液、二次抗体希釈液、及び洗浄用緩衝液からなる群から選択される少なくとも1つに対して行われるものである、方法ということができる。

【0032】

(c) その他の免疫測定法での使用方法

他に、本発明の免疫反応阻害抑制剤が好ましく用いられる免疫測定法に免疫凝集法がある。免疫凝集法は、抗原抗体反応により生じる、反応液の濁度や吸光度のような光学的性质の変化に基づいて、被検試料中の抗原又は抗体を検出又は定量する方法であり、免疫比濁法及びラテックス粒子を用いるラテックス凝集法も包含される。標識した抗血清を含む反応液、又は標的抗原に特異的な抗体をコーティングしたラテックス粒子を懸濁した反応液中に被検試料を添加し、免疫複合体の形成により抗血清又はラテックス粒子が凝集することで、濁度や吸光度が変化するのを観察、測定する。

その際の被検試料希釈液等に添加する他、ラテックス粒子のブロッキング用溶液や反応液中にも用いることができる。

その他、ウエスタンブロット法では、被検試料希釈液の他、抗体希釈液、ブロッキング液に添加でき、免疫沈降法でも、被検試料希釈液の他、抗体希釈液、反応バッファー溶液中に添加する。

すなわち、他の免疫測定法においても、被検試料希釈液、抗体希釈液、ブロッキング液及び反応バッファー溶液を調製する工程の少なくともいずれか1つの工程、及び／又は被検試料と標的抗原特異的抗体とを反応させる工程で、本発明の免疫反応阻害抑制剤を添加する工程を含むことを特徴とする。

より具体的には、

ウエスタンブロット法、イムノブロット法、免疫沈降法、及びラテックス凝集法から選択されたいずれかの方法を用いた標的抗原の検出又は測定方法であって、

(a) 本発明の免疫反応阻害抑制剤を添加する工程、及び

(b) 被検試料と標的抗原検出用抗体とを接触させる工程

を含み、

ここで前記工程(a)は前記工程(b)と同時、またはそれに先だって行われるものであり、前記工程(a)が前記工程(b)に先だって行われる場合は、前記添加する工程は、被検試料希釈液、ブロッキング液、抗体希釈液、及び反応バッファーからなる群から選択される少なくとも1つに対して行われるものである、方法ということができる。

【0033】

(3-2) 免疫測定用キット

本発明の免疫反応阻害抑制剤は、通常の各種免疫測定法用のキットと組み合わせて、本発明の免疫反応阻害抑制剤キットとすることが可能である。また、これら各種免疫測定法用キットにおいて用いる希釈用緩衝液、展開液、反応液、ブロッキング液などの少なくとも1つの溶液中に、あらかじめ本発明の免疫反応阻害抑制剤を所定の濃度に溶解して容器詰めしたものを、キットに含めることでより利便性を高めることができる。

【実施例】

【0034】

以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例により限

10

20

30

40

50

定されるものではない。

本発明におけるその他の用語や概念は、当該分野において慣用的に使用される用語の意味に基づくものであり、本発明を実施するために使用する様々な技術は、特にその出典を明示した技術を除いては、公知の文献等に基づいて当業者であれば容易かつ確実に実施可能である。また、各種の分析などは、使用した分析機器又は試薬、キットの取り扱い説明書、カタログなどに記載の方法を準用して行った。

なお、本明細書中に引用した先行技術文献、特許公報及び特許出願明細書中の記載内容は、本発明の記載内容として参照されるものとする。

【0035】

(実施例1) 唾液による免疫反応阻害

(1-1) 唾液によるカンピロバクター抗原の検出阻害

本実施例では、カンピロバクター検出イムノクロマトにおける抗原抗体反応阻害を見るために、ウシ唾液を展開液で希釈した検体に対してカンピロバクター (*Campylobacter jejuni*; ATCC29428) 死菌液を 8×10^6 cfu/mL となるように添加して攪拌した検体を、カンピロバクター検出イムノクロマト (NHイムノクロマトカンピロバクター (日本ハム (株) 製)) に滴下し、テストラインおよびコントロールラインをイムノクロマトリーダー (浜松ホトニクス製 C10066) により測定した (図1)。テストラインは抗カンピロバクター抗体が、コントロールラインは抗マウスIgG抗体がそれぞれ塗布してあり、それぞれカンピロバクター菌体、抗カンピロバクター抗体に反応する。

【0036】

その結果、検討したウシ唾液のうち由来する個体ごとに各検体の阻害度合いは異なるものの、ウシ唾液を検体とした場合コントロールのPBSを検体とした場合と比較して反応が下がることが確認された。さらに、全く異なる組合せの抗原抗体反応に対しても発揮する阻害度合いはほとんど変わらないことが観察された。

したがって、本検体にて強い阻害作用を示した唾液を、阻害活性抑制物質検索のための検討試料として選択した。

【0037】

(1-2) カンピロバクター抗原に対するウシ・ブタ唾液による阻害状況

この実施例では、(1-1)と同様のカンピロバクター抗原タンパクの免疫測定に対する唾液による阻害状況が、ウシ唾液のみならず、ブタの唾液でもあることを確認する。

具体的には、ウシ・ブタ唾液をPBSで10倍希釈して、NHイムノクロマトカンピロバクター (日本ハム (株) 社製) に供試した。ウシ唾液では、20検体中、コントロールラインが阻害された偽陰性検体が2例、偽陽性が1例であったのに対し、ブタ唾液では、54検体中偽陰性は0例であったが、偽陽性となる唾液検体が12例も存在した (表1)。

なお、口腔内に高濃度でカンピロバクターが存在する可能性は低いため、テストラインで高い測定値を示した場合は偽陽性とカウントした。また、コントロールラインが阻害された唾液についてはテストラインも偽陰性となる可能性が高いと考えた。

結果の詳細の一部を (表2) として示す。

【0038】

【表1】

	供試 検体数	コントロール ラインが阻害 された唾液	テストライン に(偽)陽性ライン が現れた唾液
ウシ唾液	20	2	1
ブタ唾液	54	0	12

【0039】

【表 2】

※結果の詳細(一部)

ウシ唾液 (検体名、品種、性別、年齢)	テストライン		コントロール ライン	ブタ唾液 (検体名)	テストライン		コントロール ライン
	目視	リーダー			目視	リーダー	
BS-K1 交雑 去勢♂ 2歳3か月	-	5.3	99.9	BS-K1	-	0.0	211.8
BS-K2 交雑 ♀2歳3か月	-	6.0	82.7	BS-K3	-	0.0	220.4
BS-K3 交雑 ♀2歳5か月	-	6.1	103.1	BS-K5	-	1.9	238.0
BS-K7 黒毛 去勢♂ 2歳6か月	-	6.8	84.2	BS-K10	-	1.3	234.4
BS-K8 交雑 ♀ 1歳4か月	-	1.5	224.8	BS-K44	+	150.8	264.7
BS-K9 黒毛 去勢♂ 2歳4か月	-	0.6	7.0	BS-K49	-	1.9	266.4
BS-K10 黒毛 去勢♂ 2歳7か月	+	43.7	178.5	BS-K53	+	114.7	303.2
BS-K14 黒毛 去勢♂ 1歳4か月	-	3.4	245.9	BS-K55	-	1.6	269.3
BS-K15 黒毛 ♀ 1歳4か月	-	2.2	377.7	BS-K61	+	210.2	205.8
BS-K16 交雑 ♀ 1歳5か月	-	0.0	0.0	BS-K83	-	3.4	296.3

10

【0040】

(1-3) 各種イムノクロマトに対する唾液による反応阻害

本実施例では、実施例(1-1)で得られた最も阻害活性が高い唾液試料(G)を用い、検出対象の抗原タンパク質が異なる各種イムノクロマトに対する唾液成分の混入による免疫反応阻害の程度を観察した。

具体的には、異なる抗原タンパク質検出用イムノクロマトのモデルとして、食品のアレルゲンタンパク質である卵、牛乳、小麦タンパク質、また病原菌の検出モデルとして腸管出血性大腸菌O157、病原ウイルスの検出モデルとして口蹄疫ウイルスを選択し、それぞれ「FASTKITスリム卵」、「FASTKITスリム小麦」(日本ハム(株)製)、並びに「NHイムノクロマトO157」(日本ハム(株)製)、「口蹄疫抗原検出イムノクロマト」(開発品)を用いて実験を行った。

20

食品のアレルゲンタンパク質の検出実験には、唾液試料(G)を10倍希釈した希釈唾液試料を作製し、これに対して、アレルゲンタンパク質の卵タンパク質、及び小麦タンパク質をそれぞれ約25ng/mLとなるよう混和した試料100μLをイムノクロマトに供試した。

一方、腸管出血性大腸菌O157検出実験には、唾液試料(G)を10倍希釈した希釈唾液試料を作製し、「O157」(野外株)(1×10^6 cfu/mL)を希釈唾液試料で26倍希釈した試料100μLをイムノクロマトに供試した。口蹄疫ウイルス検出試験には、実施例(1-1)とは別の検討で得られた阻害活性の高い唾液試料(R)を使用した。唾液試料(R)を10倍希釈した希釈唾液試料を作製し、これに対して口蹄疫ウイルス(O/JPN/2010株)を $10^{4.75}$ TCID₅₀/mLとなるように混和した試料60μLをイムノクロマトに供試した。

30

さらに各試験においてウシ唾液の代わりにPBSを添加した対照試験を設け、ウシ唾液を添加した試験との反応性の違いを比較した。

【0041】

その結果、特に卵、小麦、口蹄疫の検出用イムノクロマトでは、唾液によりほぼ100%近い反応性の低下が観察された。また、「O157」の検出用イムノクロマトでは、約40%近い反応性の低下となった。このことから実施例(1-1)で検討したウシ唾液はIgG、細菌、アレルゲンタンパク、ウイルス等幅広い抗原に対して反応阻害を示すことが分かった(表3)。

40

【0042】

【表 3】

		陽性試験	
		テストライン	コントロールライン
卵 検出イムノクロマト	PBS	27.4	45.5
	ウシ唾液	0.0	0.0
小麦 検出イムノクロマト	PBS	15.6	189.1
	ウシ唾液	0.0	39.9
O157 検出イムノクロマト	PBS	22.5	294.5
	ウシ唾液	13.0	75.3
口蹄疫 検出イムノクロマト	PBS	199.4	382.6
	ウシ唾液	0.0	43.3

10

【0043】

(1-4) 唾液成分による反応阻害への希釈による影響

ヒトの診断キット等では検体への唾液の混入による反応阻害を回避するために検体を希釈することが推奨されている例がある。

そこで実施例(1-3)で用いたものと同じ唾液試料を用い、カンピロバクター検出イムノクロマト(NHイムノクロマトカンピロバクター)でのテストライン及びコントロールラインの消失が、希釈により回復するか否か、また何倍希釈で回復するかを検討するために、希釈率を変えて複数回行った。

20

その結果、テストライン、コントロールラインとも5倍希釈で若干回復したものの、50倍まで希釈しても反応は完全には回復しなかった。テストラインについては、50倍希釈によっても56%程度しか回復しなかった(図2)。

【0044】

(実施例2) 免疫反応阻害抑制剤のスクリーニング

(2-1) 界面活性剤からのスクリーニング

まず、免疫反応阻害抑制剤の候補として、従来、唾液など体液中の免疫反応阻害物質の抑制に効果があるとされた各種の界面活性剤を試した。

30

界面活性剤として、特許文献1で唾液中のムチンの可溶化効果が確認された各種非イオン性界面活性剤及び両性界面活性剤を用いて、陰性試験及び陽性試験を行った。

陰性試験及び陽性試験は、実施例(1-2)等と同様、唾液試料(G)を用い、実施例(1-1)と同様の条件でNHイムノクロマトカンピロバクター及びカンピロバクター希釈液を用いて行った。

【0045】

その結果、ほとんどの界面活性剤で十分な効果が確認できなかった(data not shown)。比較的効果の高かったものを下記(表4)として示す。

陰イオン界面活性剤のタウロコール酸ナトリウム水和物(濃度2%)の場合、コントロールラインは回復したが、テストラインが回復しなかった。同じく陰イオン界面活性剤である、デオキシコール酸(濃度1~5%)、及びラウロイルサルコシン(濃度1~5%)の場合も同様に、コントロールラインは回復したが、テストラインの回復が十分でなかった(表4)。ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)の場合は、テストラインもわずかに回復したが、検体に添加しているカンピロバクター菌体量から考えればライン強度は十分でなく反応は回復していないと判断した。

40

結局、コントロールラインと共にテストラインも回復し、かつ偽陽性反応も示さない十分な界面活性剤を見出すことはできなかった。

【0046】

【表 4】

		カンピロバクター検出用イムノクロマト	
		(NHイムノクロマトカンピロバクター)	
		テストライン	コントロールライン
界面活性剤無し		0.0	0.0
タウロコール酸ナトリウム水和物	0.1%	12.3	11.1
	0.5%	8.2	38.0
	1.0%	9.5	50.9
	2.0%	8.7	191.7
	5.0%	6.9	326.8
ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)	0.1%	17.2	15.4
	0.5%	29.4	147.7
	1.0%	0.0	124.5
	2.0%	0.0	73.6
	5.0%	0.0	45.9
デオキシコール酸ナトリウム	0.1%	10.0	22.2
	0.5%	0.0	33.8
	1.0%	0.0	146.3
	2.0%	0.0	199.7
	5.0%	0.0	214.6
ラウロリルサコシン	0.1%	10.4	26.9
	0.5%	17.5	139.2
	1.0%	0.0	150.0
	2.0%	0.0	161.7
	5.0%	0.0	165.5

【0047】

(2-2) カラム樹脂からのスクリーニング

次いで、特許文献2で咽頭由来検体の前処理に用いてインフルエンザウイルス検出に効果のあったスルホン酸基又はカルボキシル基を有する陽イオン交換樹脂など各種カラム樹脂からのスクリーニングを行った。

6種の強酸性陽イオン交換樹脂、2種の弱酸性陽イオン交換樹脂、8種の強塩基性陰イオン交換樹脂、4種の弱塩基性陰イオン交換樹脂の他、2種のキレート樹脂及び4種の合成吸着剤のカラム、あわせて26種類について、それぞれの回復率を測定した。その際、陽性コントロールとしては、PBSに懸濁したカンピロバクター菌液の反応性を100%とし、その回復率を測定した。

詳細には、ウシ唾液2.36mLに1%BSA含有ホウ酸緩衝液(pH8.0)21.24mLを加えた唾液希釈液にカンピロバクター死菌750μLを加えた試料を用意し、上記の各樹脂を約0.5mLずつ充填したカラムに対して試験用試料500μLを通液した。

得られた各カラム通過液を、カンピロバクター検出イムノクロマト(NHイムノクロマトカンピロバクター(日本ハム(株)社製)に供して、テストライン及びコントロールラインでの反応性を測定した(表5)。

その際、阻害除去の陽性コントロールとしてPBS23.6mLに上記カンピロバクター死菌750μLを懸濁した液をNHイムノクロマトカンピロバクターに供した際の反応性を100%とし、その他のカラムを通液させたときのテストラインの値から回復率を算出した。

【0048】

【表5】

			テストライン	コントロールライン	テストラインの 回収率	
処理無し			8.9	31.5		
陽性コントロール			289.1	339.7	100%	
イオン交換樹脂	強酸性陽イオン	1	92.9	83.5	32%	
		2	7.9	16.4	2%	
		3	9.9	22.7	9%	
		4	9.9	26.3	9%	
		5	98.8	184.1	34%	
		6	66.8	82.4	23%	
	弱酸性陽イオン	7	4.0	33.1	1%	
		8	13.0	15.6	4%	
	強塩基性陰イオン	9	11.0	11.8	4%	
		10	13.1	11.4	5%	
		11	13.9	15.3	5%	
		12	9.6	22.7	3%	
		13	83.6	158.5	29%	
		14	16.4	17.9	6%	
		15	6.4	41.2	2%	
		16	11.5	24.1	4%	
	弱塩基性陰イオン	17	16.4	19.6	6%	
		18	34.8	34.8	12%	
		19	18.4	17.2	6%	
		20	11.9	12.7	4%	
キレート樹脂			21	6.9	7%	
			22	48.8	44.5	17%
合成吸着剤			23	38.6	13%	
			24	18.6	15.2	6%
			25	6.4	11.1	2%
			26	19.7	8.2	4%

【0049】

これらのカラムによる一回目の結果（表5）では、強酸性陽イオン交換樹脂及び強塩基性陰イオン交換樹脂の中に、回復効果の高い結果を示す樹脂が複数見いだされたものの、再度追試を行うと実験の再現性が乏しく、安定した効果が得られなかった。(Data not shown)

イオン交換樹脂などをカラムに詰めた後、静置状態での時間の経過と共に樹脂の乾燥が進んでしまうが、その進み方はカラムへの詰め方、そのときの室内環境など種々の要因により一定しない。そのようなカラム内の樹脂の乾燥状態のばらつきが、結果が安定しない原因であると考えられた。

【0050】

（2-3）強酸性陽イオン交換樹脂の安定性

以下の実験では、（2-2）の実験中で最も効果が高かったスルホン酸基を有する強酸性陽イオン交換樹脂No. 5（三菱化学製PK220）を一応の免疫阻害抑制剤候補として選択し、その安定性を試験する。

強酸性陽イオン交換樹脂の場合、カラムに詰めた後放置しておく、時間の経過と共に樹脂が乾燥してしまう。そのようなカラム内の樹脂の乾燥状態のばらつきにより、結果が安定しない傾向があった。そこで、強酸性陽イオン交換樹脂PK220（三菱化学社製）を0.1%BSA含有ホウ酸緩衝液に懸濁し、内径約0.8cm、長さ約1.0cmの円錐状のカラムに0.3g詰め、密封あるいは封をせずに1週間通常の実験室環境に放置し、その安定性を試験した。具体的には唾液試料（R）を10倍希釈した希釈唾液試料を作製し、これに対して口蹄疫ウイルス（0/JPN/2010株）を 10^4 TCID₅₀/mLとなるように混和した試料60μLを口蹄疫抗原検出イムノクロマトに供試した。その結果、（表6）に示すように、樹脂の乾燥により唾液中の口蹄疫ウイルスへの反応性が低下することが判明した。

【0051】

【表6】

保存状況 (1週間)	樹脂の外見	唾液中の口蹄疫ウイルスへの反応性 (OJPN/2010 10 ⁵ TCID ₅₀ /唾液1mL)	
		目視	ICリーダー
密封	変化なし	+	37.4
封をせず放置	乾燥し、体積減少	-	0.0

【0052】

10

(2-4) 強酸性陽イオン交換樹脂の洗浄液での阻害抑制効果

樹脂の乾燥状態のばらつきを均一化することを当初の目的として、強酸性陽イオン交換樹脂PK220(三菱化学社製)6gを、イムノクロマト用0.1%BSA含有ホウ酸緩衝液18mLに懸濁して4℃で一晩静置した後の樹脂を洗浄後の樹脂としてその性能を確認した。さらに洗浄後の上澄みを回収した。洗浄後の樹脂と共に、比較例として洗浄後の上澄み液での唾液検体に対する口蹄疫抗原検出イムノクロマトのコントロールラインの反応性を計測した。

その結果、驚くべきことに、洗浄後の上澄み液の方が洗浄後の樹脂の10倍近い強い反応性を示した(表7)。

洗浄後の上澄み液の方が高い阻害除去活性を示した原因としては阻害除去物質が樹脂カラムに含まれる0.1%BSA含有ホウ酸緩衝液に可溶なものであったことが推察され、このことからスルホン酸基を有する強酸性陽イオン交換樹脂による免疫阻害の高い抑制効果は、強酸性陽イオン交換樹脂製造過程で生成され不純物として混在していたスルホン酸基を有する低分子化合物によるものであった可能性が高い。

20

【0053】

【表7】

樹脂の処理	唾液検体に対するコントロールラインの反応性	
	目視	ICリーダー
展開液洗浄(上澄)	+	164.0
展開液洗浄後の樹脂	WW+	17.9

30

【0054】

(実施例3) スルホン酸基を有する化合物の免疫反応阻害の抑制効果の検討

(3-1) 唾液検体による反応性阻害の回復効果

実施例(2-4)の結果から免疫反応阻害の抑制効果が高いことが期待される直鎖アルキル基を有する各種のスルホン酸基含有低分子化合物について、実施例1(1-1)で用いた口蹄疫抗原検出イムノクロマトでのウシ唾液検体によるコントロールラインの反応性への阻害が回復するかどうかを観察した。

40

その結果、最も低濃度でコントロールラインの反応阻害を回復させたものが、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸塩であった。このため、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸が最も阻害除去効果が高いと推測した(表8)。

さらに、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸塩以外の各種アルキルスルホン酸塩では、直鎖アルキル基の炭素数が大きいほど低濃度で効果を示し、その効果が高いことが確認できた。直鎖アルキルスルホン酸ナトリウムでは炭素数5以上でコントロールラインが回復した。直鎖アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムでは、炭素数8及び11のアルキル基を有する場合にコントロールラインが回復することを確認した(表8)。

【0055】

50

【表 8】

●アルキル

	添加濃度	テストライン		コントロールライン	
		目視	リーダー	目視	リーダー
1-ウンデカンスルホン酸ナトリウム(C11)	0.50%	-	0.0	+	175.9
	0.25%	-	0.0	+	193.5
	0.13%	-	0.0	+	130.7
	0.06%	-	0.0	+	35.4
	0.03%	-	0.0	-	0.0
	0.00%	-	0	-	0.0
1-デカンスルホン酸ナトリウム(C10)	10.00%	N.T			
	5.00%	-	0.0	+	198.1
	2.50%	-	0.0	+	99.9
	1.25%	-	0.0	+	202.0
	0.63%	-	0.0	+	104.9
	0.31%	-	0.0	+	261.4
	0.16%	-	0.0	+	84.4
	0.00%	-	0.0	-	0.0
1-オクタンスルホン酸ナトリウム(C8)	10.00%	-	0.0	+	173.7
	5.00%	-	0.0	+	198.4
	2.50%	-	0.0	+	302.1
	1.25%	-	0.0	-	62.9
	0.63%	-	0.0	-	0.0
1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム(C7)	10.00%	-	0.0	+	284.1
	5.00%	-	0.0	+	275.1
	2.50%	-	0.0	+	80.7
	1.25%	-	0.0	-	0.0
1-ヘキサンスルホン酸ナトリウム(C6)	10.00%	-	0.0	+	247.2
	5.00%	-	0.0	+	27.7
	2.50%	-	0.0	-	0.0
	1.25%	-	0.0	-	7.9
	0.63%	-	0.0	-	0.0
1-ペンタンスルホン酸ナトリウム(C5)	10.00%	-	0.0	+	117.2
	5.00%	-	0.0	-	0.0
	2.50%	-	0.0	-	0.0
	1.25%	-	0.0	-	0.0
	0.63%	-	0.0	-	0.0

●芳香族

	添加濃度	テストライン		コントロールライン	
		目視	リーダー	目視	リーダー
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム(芳香環+C12)	0.63%	-	0.0	+	232.0
	0.31%	-	0.0	+	205.6
	0.16%	-	0.0	+	170.6
	0.06%	-	0.0	+	73.6
	0.04%	-	0.0	-	27.6
	0.00%	-	0.0	-	0.0
p-オクチルベンゼンスルホン酸ナトリウム(芳香環+C8)	0.50%	-	0.0	+	320.0
	0.13%	-	0.0	+	298.5
	0.63%	-	0.0	+	152.5
	0.03%	-	0.0	-	0.0
	0.00%	-	0.0	-	0.0
p-トルエンスルホン酸ナトリウム(芳香環+C1)	2.00%	-	0.0	+	309.3
	1.00%	-	0.0	-	70.7
	0.50%	-	0.0	-	0.0
	0.25%	-	0.0	-	0.0

10

20

【0056】

(3-2) 最適な添加濃度の検討

そこで、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸塩を含有するイムノクロマト用展開液に対し、口蹄疫ウイルス(0/JPN/2010株)を 10^6 TCID₅₀/mLとなるように添加した唾液を添加して、攪拌した。この試験液を口蹄疫抗原検出用イムノクロマトに供した。

直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸塩の添加濃度を変化させて検討したところ、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸塩の添加濃度は0.05～1.0(w/v)%の範囲であればウシ唾液中の口蹄疫ウイルスの検出が可能であり、0.1～0.8(w/v)%の範囲が好ましいことがわかった(表9)。

30

【0057】

【表 9】

直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸塩 添加濃度	目視	リーダー測定値
0.625 %	ww+	21.2
	+	57.3
0.3125 %	+	40.7
	+	36.3
0.15625 %	+	35.4
	+	57.2
0.078125 %	www+	14.5
	±	5.2
0%	-	0.0

40

【0058】

(実施例 4) 脂肪族又は芳香族アルキルスルホン酸塩による免疫反応阻害抑制効果

(4-1) 口蹄疫ウイルスの検出効果-1

阻害活性の強いウシ唾液を用い、本発明のスルホン酸ナトリウム化合物による阻害の抑

50

制効果を調べた。

詳細には、ウシ唾液検体 $10 \mu\text{L}$ に口蹄疫ウイルス (0/JPN/2010株) を $10^6 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ となるように添加後、通常組成 (T r i t o n X-100 含有) の展開液、又は直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム $0.3 (\text{w}/\text{v}) \%$ もしくはオクタンスルホン酸ナトリウム $2.5 \text{w}/\text{v} \%$ を添加した展開液に 10 倍希釈となるように懸濁し、実施例 1 (1-1) で用いた口蹄疫抗原検出イムノクロマトにより測定した。

その結果、展開液のみの場合、口蹄疫ウイルスは、唾液による阻害のため目視で検出できず、テストラインのリーダー測定値でも 0.0 を示したのに対し、本発明のスルホン酸ナトリウム化合物を唾液検体中に添加しておくことで阻害作用が抑制され、目視でもリーダー測定値でも検出可能となった (表 10)。

さらに、あわせて、口蹄疫ウイルス含有唾液検体を含まない場合に、偽陽性とならないことも確認した (表 10)。

この結果は、同時に、展開液中の非イオン性界面活性剤である T r i t o n X-100 には、免疫活性阻害が強い場合には抑制効果がほとんど期待できないことを示している。

【0059】

【表 10】

唾液+口蹄疫ウイルス		目視	リーダー測定値
通常展開液		-	0.0
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム添加展開液	0.3%	+	125.3
		+	143.4
オクタンスルホン酸ナトリウム添加展開液	2.5%	+	52.9
		+	20.6

展開液のみ		目視	リーダー測定値
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム添加展開液	0.3%	-	0.0
		-	0.0
オクタンスルホン酸ナトリウム添加展開液	2.5%	-	0.0
		-	0.0

【0060】

(4-2) 口蹄疫ウイルスの検出効果-2

この実験では、実施例 1 (1-1) と同様の唾液の検体数を増やし、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを添加して行い、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの免疫阻害抑制効果を確認する。

具体的には、口蹄疫陰性のウシ 49 頭から採取した唾液を (株) ジャパン・バイオシーラムより購入し、 0.1% BSA 含有ホウ酸緩衝液 ($\text{pH} 8.0$) で 10 倍希釈した展開液を作成し、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを $0.3 (\text{w}/\text{v}) \%$ 添加した。次いで、口蹄疫ウイルス (0/JPN/2010株) を $10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ となるように添加して、攪拌した。各 $140 \mu\text{L}$ を、口蹄疫抗原検出イムノクロマトに滴下し、目視及びリーダーにより測定した (図 3)。なお、検体番号は、(図 1) とは一致していない。

その結果、 $47/49$ 検体で正しく陽性と判定でき、(実施例 1-1) で正しく判定できたのは $4/17$ 検体のみであることからみて、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの免疫阻害抑制効果が確認できた。

【0061】

(4-3) アルキルベンゼンスルホン酸塩による偽陽性の改善

本実施例では、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの偽陽性抑制効果を確認する。

具体的には、(4-2) で採取したウシ唾液のうち口蹄疫陰性にも関わらず口蹄疫抗原検出イムノクロマトで陽性となる偽陽性を示す唾液を、通常展開液で 10 倍に希釈したもの、及び当該希釈液に直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを $0.3 (\text{w}/\text{v}) \%$ 添加したものにそれぞれ加え、実施例 1 (1-1) と同様の口蹄疫抗原検出イムノクロマトで測定した。

その結果、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの使用で、反応阻害のみならず

10

20

30

40

50

偽陽性も抑制されることを確認した（表 1 1）。

【 0 0 6 2 】

【表 1 1】

ウシ唾液	テストライン		展開液
	目視	ICリーダー	
E-4日目	+	23.0	通常展開液
	+	15.4	
E-5日目	W+	8.3	
	+	21.9	
F-1日目	±	0.0	
	+	23.5	直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸 ナトリウム添加展開液
E-4日目	-	3.9	
	-	0.0	
E-5日目	-	0.0	
	-	0.0	
F-1日目	-	0.0	
	-	0.0	

10

【 0 0 6 3 】

（実施例 5）アレルゲンタンパク抗原の検出効果

本実施例では、実施例 1（1-3）で唾液検体によりほぼ 100% の阻害活性が観察された小麦タンパク質検出イムノクロマト（FASTKIT スリム 小麦、日本ハム製）を用い、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムにより、反応性が回復するかどうかを確認する。

20

その結果、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムを使用することで、目視でも、ICリーダー結果でも、検出可能な程度に回復した（表 1 2）。

【 0 0 6 4 】

【表 1 2】

FASTKIT スリム 小麦 ポリクローナル抗体使用

唾液+小麦タンパク質(100ng/mL)	目視	リーダー測定値
通常展開液	-	0.0
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 0.25% 添加展開液	+	33.2
小麦タンパク質(100ng/mL)	目視	リーダー測定値
通常展開液	+	43.1

30

【 0 0 6 5 】

（実施例 6）食中毒細菌 O 1 5 7 の検出

本実施例では、実施例 1（1-2）で唾液検体により 40% 近い阻害活性が観察された腸管出血性大腸菌 O 1 5 7 の検出イムノクロマト（NHイムノクロマト O 1 5 7、日本ハム製）を用い、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムにより、反応性が回復するかどうかを確認する。

40

その結果、食中毒細菌 O 1 5 7 検出用イムノクロマトについても、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムの使用により、反応が回復し、反応阻害抑制効果が確認できた（表 1 3）。

【 0 0 6 6 】

【表 1 3】

NHイムノクロマト O157 ポリクローナル抗体使用

唾液+O157 10 ⁷ CFU/mL	目視	リーダー測定値
通常展開液	—	0.0
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 0.25% 添加展開液	+	33.0

O157 10 ⁷ CFU/mL	目視	リーダー測定値
通常展開液	+	61.7

10

【0067】

(実施例 7) 第四級アンモニウム塩のスクリーニング

スルホン酸ナトリウムが唾液による阻害や偽陽性を防止することが明らかとなったため、本実施例ではスルホン酸ナトリウム塩と電荷や構造の点で類似することから着目した第四級アンモニウム塩について唾液による阻害や偽陽性防止効果がないか検討した。

具体的には、下記(表 1 4)の(1)～(14)で示された第四級アンモニウム塩について、実施例(3-1)と同様に、実施例(1-1)で選択した最も阻害作用が高いウシ唾液を用い、1% BSA 含有ホウ酸緩衝液(pH 8.0)で10倍希釈した展開液に各化合物を添加し、カンピロバクター検出用イムノクロマト(NHイムノクロマトカンピロバクター)により陰性試験及び陽性試験を行った。

20

【0068】

【表 1 4】

No.	名称	英語名称	メーカー	コード
①	n-オクチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	n-Octyltrimethylammonium Bromide	Wako	323-21122
②	ステアリルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	Stearyltrimethylammonium Bromide	Wako	324-92462
③	硝酸テトラブチルアンモニウム	Tetrabutylammonium Nitrate	Wako	325-42741
④	ヘキサフルオロリン酸テトラブチルアンモニウム	Tetrabutylammonium Hexafluorophosphate	Wako	326-42732
⑤	ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド	Lauryltrimethylammonium Chloride	Wako	328-86992
⑥	テトラブチルアンモニウム＝トリブロミド	Tetrabutylammonium Tribromide	Wako	352-21232
⑦	メチルトリブチルアンモニウム＝ヨード	Methyltributylammonium Iodide	Wako	354-27711
⑧	テトラブチルアンモニウム＝フルオリド三水和物	Tetrabutylammonium Fluoride Trihydrate	Wako	354-28992
⑨	テトラメチルアンモニウムヒドロキシド五水和物	Tetramethylammonium Hydroxide Pentahydrate	Wako	357-23622
⑩	ベンジルトリブチルアンモニウム＝クロリド	Benzyltributylammonium Chloride	Wako	357-26802
⑪	三フッ化二水素テトラブチルアンモニウム	Tetrabutylammonium Dihydrogen Trifluoride	Wako	358-19421
⑫	過塩素酸テトラブチルアンモニウム	Tetrabutylammonium Perchlorate	Wako	358-20852
⑬	ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	Dodecyltrimethylammonium Bromide	Wako	359-21122
⑭	メチルトリオクチルアンモニウム＝クロリド	Methytriocetyl ammonium Chloride	Wako	359-24282

30

【0069】

その結果、(5)のラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、(8)のテトラブチルアンモニウム＝フルオリド、(11)の三フッ化二水素テトラブチルアンモニウム、(13)のドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、及び(14)のメチルトリオクチルアンモニウム＝クロリドが、テストライン及びコントロールラインのいずれも回復させているので、本発明の免疫阻害抑制剤の候補とした。

40

【0070】

次いで、最も回復効果の高かった(14)のメチルトリオクチルアンモニウム＝クロリドについての濃度条件の検討を行った。

その結果、メチルトリオクチルアンモニウム＝クロリドの場合、2.5～5.0(v/w)%でカンピロバクター菌を検出可能となることが判明した(Data not shown)。

【0071】

50

(実施例 8) 第四級アンモニウム塩の免疫反応阻害効果

(8-1) ウシ・ブタ唾液の偽陰性解消についての効果

実施例(1-2)においてコントロールラインが阻害され、偽陰性になると考えられたウシ唾液 BS-K16 にカンピロバクター菌液を 10^8 CFU/mL となるように添加(カンピロバクター添加唾液)した。

カンピロバクター添加唾液を、第四級アンモニウム塩を PBS で溶解した溶液、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩を PBS で溶解した溶液で 10 倍希釈して、NH イムノクロマト カンピロバクターに供試した。

なお、各試薬を PBS に溶解する濃度は、カンピロバクターに対する反応性を阻害しない範囲で一番濃い濃度を選択した。

10

その結果、ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミドなど C12～C14 のアルキル鎖を持つ第四級アンモニウム塩が唾液による偽陰性の解消に対して高い効果を示した(表 15)。

【0072】

【表 15】

添加した試薬、濃度	唾液	テストライン		コントロール ライン	
		目視	リーダー		
PBS(対照)	なし	+	183.9	262.2	←偽陰性
	BS-K16	±	9.5	24.2	
ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド 1%	BS-K16	+	144.7	124.4	←反応回復
ベンザルトリメチルアンモニウム＝クロリド 0.25%	BS-K16	±	12.8	51.3	←偽陰性(効果なし)
ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	BS-K16	+	119.7	112.6	←反応回復
ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	BS-K16	W+	52.8	79.4	←反応回復

20

【0073】

(8-2) ウシ・ブタ唾液の偽陽性解消についての効果

(8-1)において偽陽性を示したウシ・ブタ唾液検体を、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩を PBS で溶解した溶液、又は直鎖アルキル第四級アンモニウム塩を PBS で溶解した溶液で 10 倍希釈して、NH イムノクロマト カンピロバクターに供試した。

30

その結果、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウムと同様に、ラウリルトリメチルアンモニウムクロリド及びドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミドのいずれもが唾液由来の偽陽性を抑制することが確認された(表 16)。

【0074】

以上のことから、第四級アンモニウム塩についても、各種病原菌抗原の測定時に問題となる免疫阻害に対し、直鎖アルキル基を有するスルホン酸化合物と同様の抑制効果が期待できることがわかった。

【0075】

40

【表 1 6】

添加した試薬、濃度	唾液	テストライン		コントロール ライン
		目視	IOリーダー	
PBS(対照)	BS-K10	+	43.7	178.5
	SS-K44	+	150.8	264.7
	SS-K53	+	114.7	203.2
	SS-K61	+	210.2	205.8
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 0.3%	BS-K10	±	7.6	252.6
	SS-K44			
	SS-K53			
	SS-K61			
ラウリルトリメチルアンモニウムクロリド 1%	BS-K10			
	SS-K44	-	0.8	180.7
	SS-K53	-	3.4	161.0
	SS-K61	-	0.0	153.4
ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド 1%	BS-K10			
	SS-K44	-	1.5	176.2
	SS-K53	-	4.2	182.2
	SS-K61	-	9.3	165.8

10

【0076】

(実施例9) O157検出用イムノクロマトにおける唾液の阻害抑制効果

20

(9-1) ウシ・ブタ唾液の偽陰性解消についての効果

まず、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩及び複数の第四級アンモニウム塩に対し、それぞれPBSで溶解した1 (w/v) %溶液をNHイムノクロマトO157に供試したところ、(表17)に示すように、検討したすべての化合物で陰性であったので、以下の実験に用いた。

【0077】

【表 1 7】

添加した試薬、濃度	テストライン		コントロール ライン
	目視	IOリーダー	
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 1%	-	2.4	507.6
ラウリルトリメチルアンモニウムクロリド 1%	-	0.0	710.7
ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド 1%	-	0.0	763.0
ミリスチルトリメチルアンモニウムブロミド 1%	-	3.0	750.6

30

【0078】

実施例(1-2)のNHイムノクロマトカンピロバクターでの検討の結果、偽陰性になると考えられたウシ唾液BS-K16を用い、O157菌液を 10^7 CFU/mLとなるように添加(O157添加唾液)した。

40

次いでO157添加唾液を、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩又は各第四級アンモニウム塩をPBSで溶解した溶液で10倍希釈して、NHイムノクロマトO157に供試した。

その結果、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、並びにラウリルトリメチルアンモニウムクロリド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド及びミリスチルトリメチルアンモニウムブロミドのいずれもが唾液由来の偽陰性の解消に有効であることを確認した(表18)。

【0079】

【表 18】

添加した試薬、濃度	唾液	テストライン		コントロール ライン	
		目視	ICリーダー		
PBS(対照)	なし	+	162.6	741.6	
	BS-K16	W+	97.7	79.6	← 反応減弱
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 1%	BS-K16	+	100.6	407.9	← 反応回復
ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド 1%	BS-K16	+	121.3	413.6	← 反応回復
ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	BS-K16	+	153.6	468.2	← 反応回復
ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	BS-K16	+	113.3	365.2	← 反応回復

【0080】

10

(9-2) ウシ・ブタ唾液の偽陽性解消についての効果

実施例(1-2)のNHイムノクロマトカンピロバクターでの検討の結果、偽陽性を示した唾液(SS-K44)を、(9-1)と同様に、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩又は第四級アンモニウム塩をPBSで溶解した溶液で10倍希釈して、NHイムノクロマトO157に供試した。

その結果、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、並びにラウリルトリメチルアンモニウムクロリド、ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド及びミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミドのいずれもが唾液由来の偽陽性の解消に有効であることを確認した(表19)。

【0081】

20

【表 19】

添加した試薬、濃度	唾液	テストライン		コントロール ライン	
		目視	ICリーダー		
PBS(対照)	SS-K44	+	323.0	619.7	
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 1%	SS-K44	-	4.0	701.2	← 偽陽性
ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド 1%	SS-K44	-	0.0	765.0	
ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	SS-K44	±	6.3	779.3	
ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	SS-K44	±	10.9	746.8	

30

【0082】

(実施例10) 落花生アレルゲン検出用イムノクロマトにおける偽陰性の解消効果

(10-1) ウシ・ブタ唾液の偽陰性解消についての効果

実施例(1-2)のNHイムノクロマトカンピロバクターでの検討の結果、偽陰性になると考えられたウシ唾液BS-K16に落花生タンパクを1μg/mLとなるように添加し、落花生タンパク添加唾液検体を作成した。

まず、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩又は第四級アンモニウム塩をPBSで溶解した溶液が供試濃度にて偽陽性を示さないことをあらかじめ確認した(表20)。

【0083】

40

【表 20】

添加した試薬、濃度	テストライン		コントロール ライン
	目視	ICリーダー	
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 1%	-	0.0	228.6
ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド 1%	-	1.5	194.8
ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	±	20.3	235.2
ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	-	6.3	197.9

50

【0084】

次いで、落花生タンパク添加唾液検体を、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩又は第四級アンモニウム塩をPBSで溶解した溶液で10倍希釈して、FASTKITスリム落花生に供試した。

その結果、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム、ラウリルトリメチルアンモニウムクロリド及びミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミドにより反応性が回復でき、唾液由来の偽陰性の解消に有効であることを確認した（表21）。

【0085】

【表21】

添加した試薬、濃度	唾液	テストライン		コントロールライン
		目視	リーダー	
PBS(対照)	なし	+	152.8	813.7
	BS-K16	-	1.3	5.8
直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム 1%	BS-K16	W+	17.1	186.6
ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド 1%	BS-K16	W+	30.3	130.4
ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	BS-K16	W+	22.8	102.9

←偽陰性
←反応回復
←反応回復
←反応回復

【0086】

（実施例11）各種アレルゲン検出用イムノクロマトにおける偽陰性の解消効果

実施例10などで第四級アンモニウム塩が唾液による偽陰性の解消に有効であることが示されたため、各種アレルゲンキットについてこれらの物質が有効であることを確認した。

具体的には、阻害活性の強いウシ唾液に対して各種アレルゲンタンパクを添加して、その唾液を第四級アンモニウム塩を添加した展開液に10倍希釈をすることで試料液を作製し、この試料液を各種アレルゲン検出用イムノクロマトに供試した。アレルゲン検出用イムノクロマトとしては、卵、小麦、落花生、甲殻類を使用した。

その結果、複数の第四級アンモニウム塩で、免疫反応阻害抑制効果を確認できた（表22）。

【0087】

【表22】

	卵	小麦	落花生	甲殻類
唾液による阻害	あり	あり	あり	あり
展開液に添加することにより唾液による阻害を解消するのに有効であった 第4級アンモニウム塩	ベンジルトリメチルアンモニウム＝クロリド	ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、 ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、 ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、 ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、 ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド

【0088】

（実施例12）カンピロバクター検出用ELISA

本実施例では、ELISAにおいても唾液による偽陽性があるか、また当該偽陽性が、イムノクロマトと同様に本発明の第四級アンモニウム塩化合物で解消されるかを確認する。

具体的には、大阪公衆衛生研究所より分与された抗カンピロバクターモノクローナル抗体（4B4：特開2009-77658号公報参照）を5μg/mLの濃度でプレートに固定化し、固相プレートを作成した。

次いで、固相プレートにカンピロバクターを10⁷CFU/mL含むようにPBS又は各種第四級アンモニウム塩化合物含有PBSを用いて10倍希釈した唾液を添加し、1時間インキュベートし、洗浄した。次に、ビオチン標識4B4を2次抗体として1.6μg/mLの濃度で添加し、1時間インキュベートし、洗浄した。

10

20

30

40

50

続いて、ストレプトアビジン-HRPを添加して、30分間インキュベートし、洗浄後、HRP基質を添加して20分間インキュベートし、希硫酸液を添加して、反応を停止させた。

その後、450nm吸光度を測定（レファレンス波長620nm）した。

その結果、（表23）に示すように、ELISAでも第四級アンモニウム塩の添加により唾液による免疫反応阻害が回復することが確認できた。

【0089】

【表23】

カンピロバクター菌液	唾液	添加試薬、濃度	Well1	Well2	平均	
10 ⁷ CFU/mL	なし	なし	0.949	0.941	0.945	
10 ⁷ CFU/mL	BS-K16	なし	0.290	0.229	0.256	←唾液を添加すると反応性低下
10 ⁷ CFU/mL	BS-K16	ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド 1%	0.691	0.692	0.692	添加により 反応性回復
10 ⁷ CFU/mL	BS-K16	ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	0.642	0.619	0.631	
10 ⁷ CFU/mL	BS-K16	ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド 1%	0.605	0.582	0.594	
10 ⁷ CFU/mL	BS-K16	テトラプチルアンモニウムフルオリド三水和物 1%	0.369	0.365	0.367	添加により 反応性回復
10 ⁷ CFU/mL	BS-K16	ベンジルトリブチルアンモニウム＝クロリド 0.25%	0.551	0.540	0.546	
なし	なし	なし	0.005	0.004	0.005	

10

20

【0090】

（実施例13）アレルゲン検出ELISAキットでの唾液による阻害抑制効果の検証

各種アレルゲン検出用ELISAにおいて唾液による阻害での偽陰性が観察されるか、また、イムノクロマトの場合と同様に本発明の直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩又は第四級アンモニウム塩により回復できるかを確認する。

具体的には、落花生アレルゲン検出用ELISAキットとして「FASTKITエライザ落花生（日本ハム（株）製）」を用い、ウシ唾液BS-K16又はPBSを5μL添加した落花生アレルゲンタンパク50ng/mL又は25ng/mLを50μLを、直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩又は第四級アンモニウム塩のPBS溶解溶液45μLで希釈して、ELISAキットに供試した。

30

その結果、唾液を添加すると反応性低下が見られ、ELISAにおいても唾液による阻害が確認された。そして、反応溶液中に第四級アンモニウム塩のラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド又はミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミドを添加することで反応性が回復することを確認した（表24）。

【0091】

【表 2 4】

添加抗原	唾液	添加化合物	Well1	Well2	Ave.
落花生タンパク 25ng/mL	なし	なし	0.786	0.794	0.79
落花生タンパク 12.5 ng/mL	なし	なし	0.362	0.38	0.371
落花生タンパク 0 ng/mL	なし	なし	0.004	0.003	0.0035
落花生タンパク 25ng/mL	BS-K16	PBS	0.166	0.156	0.161
落花生タンパク 12.5 ng/mL	BS-K16	PBS	0.028	0.024	0.026
落花生タンパク 25ng/mL	BS-K16	(No.3)硝酸テトラブチルアンモニウム	0.074	0.074	0.074
落花生タンパク 12.5 ng/mL	BS-K16	(No.3)硝酸テトラブチルアンモニウム	0.029	0.03	0.0295
落花生タンパク 25ng/mL	BS-K16	(No.5)ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド	0.527	0.538	0.5325
落花生タンパク 12.5 ng/mL	BS-K16	(No.5)ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド	0.294	0.29	0.292
落花生タンパク 25ng/mL	BS-K16	(No.13)ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	0.543	0.566	0.5545
落花生タンパク 12.5 ng/mL	BS-K16	(No.13)ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	0.296	0.296	0.298
落花生タンパク 25ng/mL	BS-K16	(No.30)ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	0.551	0.502	0.5265
落花生タンパク 12.5 ng/mL	BS-K16	(No.30)ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	0.309	0.31	0.3095
なし	なし	(直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム)	0.003	0.003	0.003
なし	なし	(No.3)硝酸テトラブチルアンモニウム	0.004	0.007	0.0055
なし	なし	(No.5)ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド	0.004	0.004	0.004
なし	なし	(No.13)ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	0.004	0.005	0.0045
なし	なし	(No.30)ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	0.004	0.004	0.004

← 唾液を添加すると
反応性低下

反応回復

【0092】

他のアレルゲンタンパク質、具体的には小麦、ごま、大豆アレルゲンタンパク質について、それぞれのアレルゲン検出用ELISAキットである「FASTKITエライザ小麦（日本ハム（株）製）」、「FASTKITエライザごま（日本ハム（株）製）」、「FASTKITエライザ大豆（日本ハム（株）製）」を用いて落花生アレルゲンの場合と同様の検査を行った。

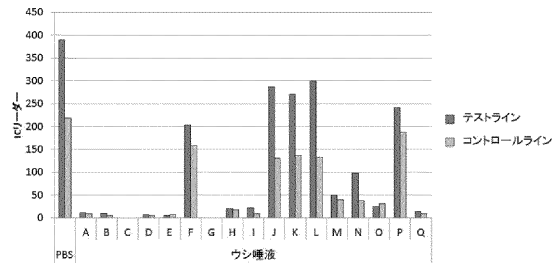
その結果、他のアレルゲンタンパク質においても、落花生アレルゲンタンパク質の場合と同様に、複数の第四級アンモニウム塩又は直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム塩が唾液による免疫反応阻害を抑制できることが確認できた(data not shown：表25)。

【0093】

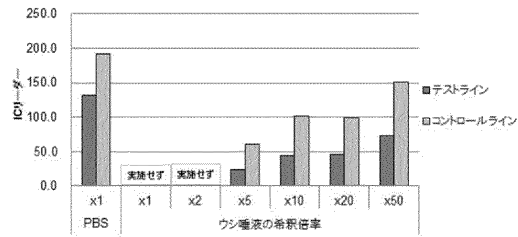
【表 2 5】

	小麦	落花生	ごま	大豆
唾液による阻害	あり	あり	あり	あり
展開液に添加することにより唾液による阻害を解消するのに有効であった化合物	ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、 ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、 ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、 ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、 ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、 直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム	ラウリルトリメチルアンモニウム＝クロリド、 ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、 ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド	ドデシルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、 ミリスチルトリメチルアンモニウム＝ブロミド、 直鎖ドデシルベンゼンスルホン酸ナトリウム

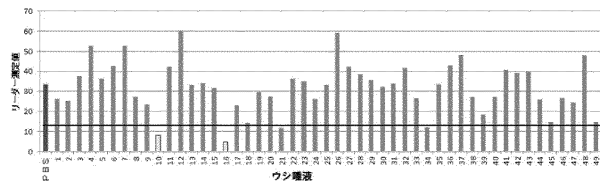
【図 1】



【図 2】



【図 3】



フロントページの続き

- (72)発明者 竹内 江里
茨城県つくば市緑ヶ原三丁目3番地 日本ハム株式会社 中央研究所内
- (72)発明者 浦山 佳那
茨城県つくば市緑ヶ原三丁目3番地 日本ハム株式会社 中央研究所内
- (72)発明者 松本 貴之
茨城県つくば市緑ヶ原三丁目3番地 日本ハム株式会社 中央研究所内
- (72)発明者 森岡 一樹
茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内
- (72)発明者 山川 陸
茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内
- (72)発明者 吉田 和生
茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内
- (72)発明者 菅野 徹
茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内
- (72)発明者 深井 克彦
茨城県つくば市観音台三丁目1番地5 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門内

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特開2017-067513 (JP, A)
特開2011-052971 (JP, A)
特開2011-038903 (JP, A)
特開2010-156576 (JP, A)
国際公開第2011/125873 (WO, A1)
特開2005-241415 (JP, A)
特開平07-012807 (JP, A)
特開2003-344413 (JP, A)
特開2012-025749 (JP, A)
特開2005-291783 (JP, A)
米国特許出願公開第2005/0118595 (US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
Caplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

专利名称(译)	防止体液抑制抗原抗体反应的物质		
公开(公告)号	JP6601932B2	公开(公告)日	2019-11-06
申请号	JP2019509859	申请日	2018-03-27
[标]申请(专利权)人(译)	日本火腿股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	日本火腿公司 国立研究开发法人农业·食品产业技术総合研究机构		
当前申请(专利权)人(译)	日本火腿公司 国立研究开发法人农业·食品产业技术総合研究机构		
[标]发明人	松本貴之 森岡一樹 吉田和生 菅野徹 深井克彦		
发明人	竹内 江里 浦山 佳那 松本 貴之 森岡 一樹 山川 睦 吉田 和生 菅野 徹 深井 克彦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/566 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/543 G01N33/566 G01N1/28 G01N33/56983 G01N2800/26		
FI分类号	G01N33/543.501.J G01N33/566 G01N33/531.B		
代理人(译)	佐伯优子		
优先权	2017061335 2017-03-27 JP		
其他公开文献	JPWO2018181263A1		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的目的是：提供一种试剂，该试剂使用含有体液，特别是来源于生物粘膜的成分例如唾液的样品，在免疫测定中有效抑制抗原-抗体反应的抑制。并抑制免疫测定中的假阳性和假阴性结果。本发明提供了一种抑制免疫反应抑制的试剂，其特征在于该试剂包含以下（1）或（2）的化合物：（1）式R1-SO₃的磺酸化合物（式中，R1选自：直链C5-C30烷基；直链C1-C30烷基被具有至少一个直链C5-C30烷基的芳基取代；和具有至少一个直链C5-C30烷基的芳基取代 这些基团可包括取代基。（2）式为N⁺-R2R3R4R5的季铵离子或其盐。（式中，R2-R5 各自独立地为直链C1-C30烷基或被至少一个直链C5-C30烷基取代的芳基，这些基团可以包括取代基）；其中所述试剂能够抑制由免疫测定样品中的体液引起的免疫反应抑制作用。

(51) Int. Cl.	F I
GO 1 N 33/543 (2006. 01)	GO 1 N 33/543 S O I J
GO 1 N 33/566 (2006. 01)	GO 1 N 33/566
GO 1 N 33/531 (2006. 01)	GO 1 N 33/531 B

請求項の数 16 (全 31 頁)

(21) 出願番号 特願2019-509859 (P2019-509859)	(73) 特許権者 000229519
(86) (22) 出願日 平成30年3月27日 (2018. 3. 27)	日本ハム株式会社
(86) 国際出願番号 PCT/JP2018/012330	大阪府大阪市北区梅田二丁目 4 番 9 号
(87) 国際公開番号 W02018/181263	(73) 特許権者 501203344
(87) 国際公開日 平成30年10月4日 (2018. 10. 4)	国立研究開発法人農林・食品産業技術総合研究機構
審査請求日 令和1年5月10日 (2019. 5. 10)	茨城県つくば市観音台3-1-1
(31) 優先権主張番号 特願2017-61335 (P2017-61335)	(74) 代理人 弁理士 佐伯 拓郎
(32) 優先日 平成29年3月27日 (2017. 3. 27)	100189131
(33) 優先権主張国・地域又は機関 日本国 (JP)	100182486
(出願人による申告) 平成27年度、農林水産省、農林水産省・食品産業科学技術研究推進事業委託事業、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願	(74) 代理人 弁理士 中村 正展
	100147289
	(74) 代理人 弁理士 佐伯 裕子
	100158872
	(74) 代理人 弁理士 牛山 直子
早期審査対象出願	最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液による抗原抗体反応阻害を防止する物質