

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4895727号
(P4895727)

(45) 発行日 平成24年3月14日(2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 33/569 (2006.01) GO 1 N 33/569 H
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 U

請求項の数 13 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2006-231247 (P2006-231247)	(73) 特許権者	390014960 シスメックス株式会社
(22) 出願日	平成18年8月28日(2006.8.28)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(65) 公開番号	特開2008-51780 (P2008-51780A)		1号
(43) 公開日	平成20年3月6日(2008.3.6)	(72) 発明者	山田 美穂 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
審査請求日	平成21年8月27日(2009.8.27)	(72) 発明者	宮地 峰輝 神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
		審査官	山村 祥子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗H I V抗体検出試薬、試薬キット、試薬の製造方法、及び抗H I V抗体の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒト免疫不全ウイルス(H I V)に対する抗体を検出する試薬であって、
ビオチンが感作された1型ヒト免疫不全ウイルス(H I V - 1)のenv領域のgp41リコンビナント抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記gp41リコンビナント抗原が磁性粒子に担持された第1粒子と
 、
ビオチンが感作された2型ヒト免疫不全ウイルス(H I V - 2)のenv領域のgp36抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記gp36抗原が磁性粒子に担持された第2粒子と、
ビオチンが感作された1型ヒト免疫不全ウイルス(H I V - 1)のenv領域のgp41合成ペプチド抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記gp41合成ペプチド抗原が磁性粒子に担持された第3粒子と、を含み、
 前記第1粒子の磁性粒子が、前記gp41リコンビナント抗原以外のH I V抗原を実質的に担持しておらず、
 前記第2粒子の磁性粒子が、前記gp36抗原以外のH I V抗原を実質的に担持しておらず、
 前記第3粒子の磁性粒子が、前記gp41合成ペプチド抗原以外のH I V抗原を実質的に担持していない、抗H I V抗体検出試薬。

10

20

【請求項 2】

前記アビジンがストレプトアビジンである、請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 3】

前記 g p 3 6 抗原が、g p 3 6 合成ペプチド抗原である、請求項 1 または請求項 2 記載の試薬。

【請求項 4】

前記第 1 粒子、前記第 2 粒子および前記第 3 粒子が容器内で緩衝液中に分散している、請求項 1 ~ 3 の何れか 1 項に記載の試薬。

【請求項 5】

前記第 1 粒子、前記第 2 粒子および前記第 3 粒子の磁性粒子の粒径が 0 . 5 ~ 5 μ m である、請求項 1 ~ 4 の何れか 1 項に記載の試薬。

10

【請求項 6】

試薬中の第 1、第 2 および第 3 粒子の濃度が 0 . 5 ~ 2 0 m g / m L である、請求項 1 ~ 5 の何れか 1 項に記載の試薬。

【請求項 7】

前記第 1 粒子、前記第 2 粒子および前記第 3 粒子に用いられた磁性粒子が同じ磁性粒子である、請求項 1 ~ 6 の何れか 1 項に記載の試薬。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 7 の何れかに記載の試薬と、1 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 1) に対する抗体及び 2 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 2) に対する抗体に結合可能な標識抗体を含む標識抗体試薬と、を備える抗 H I V 検出試薬キット。

20

【請求項 9】

前記標識抗体が、酵素により標識された抗体であり、

前記酵素に対する基質を含む基質試薬をさらに備える、請求項 8 記載の試薬キット。

【請求項 10】

ヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対する抗体を検出する試薬を製造する方法であって、

ビオチンが感作された 1 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 1) の e n v 領域の g p 4 1 リコンビナント抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記 g p 4 1 リコンビナント抗原が磁性粒子に担持された第 1 粒子を用意する工程、

30

ビオチンが感作された 2 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 2) の e n v 領域の g p 3 6 抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記 g p 3 6 抗原が磁性粒子に担持された第 2 粒子を用意する工程、

ビオチンが感作された 1 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 1) の e n v 領域の g p 4 1 合成ペプチド抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記 g p 4 1 合成ペプチド抗原が磁性粒子に担持された第 3 粒子を用意する工程、及び

前記第 1 粒子と前記第 2 粒子と前記第 3 粒子を混合する工程、を含み、

前記第 1 粒子の磁性粒子が、前記 g p 4 1 リコンビナント抗原以外の H I V 抗原を実質的に担持しておらず、

40

前記第 2 粒子の磁性粒子が、前記 g p 3 6 抗原以外の H I V 抗原を実質的に担持しておらず、

前記第 3 粒子の磁性粒子が、前記 g p 4 1 合成ペプチド抗原以外の H I V 抗原を実質的に担持していない、抗 H I V 抗体検出試薬の製造方法。

【請求項 11】

検体中のヒト免疫不全ウイルス (H I V) に対する抗体を検出する方法であって、

前記検体と、請求項 1 ~ 7 の何れか 1 項に記載の試薬とを混合する工程、および

前記第 1 粒子上に形成された 1 型ヒト免疫不全ウイルス (H I V - 1) に対する第 1 抗体と前記 g p 4 1 リコンビナント抗原との第 1 複合体と、前記第 2 粒子上に形成された 2

50

型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-2）に対する第2抗体と前記gp36抗原との第2複合体と、前記第3粒子上に形成された第1抗体と前記gp41合成ペプチド抗原との第3複合体とを検出する工程、を含む、抗HIV抗体の検出方法。

【請求項12】

前記検出工程において、前記混合工程において得られた混合液に前記第1抗体及び前記第2抗体に結合可能な標識抗体を添加し、この標識抗体の標識に基づいて前記第1複合体と前記第2複合体と前記第3複合体とを検出する、請求項1記載の方法。

【請求項13】

前記検出工程において、前記第1複合体と前記第2複合体と前記第3複合体とを定量することにより、前記検体中の抗HIV抗体を検出する、請求項12記載の方法。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、検体に含まれる抗HIV抗体を検出するための試薬、試薬キット、試薬の製造方法及び抗HIV抗体を検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

ヒト免疫不全ウイルス（Human Immunodeficiency Virus: HIV）は、エンベロープ（env）を有する一本鎖RNA（+鎖）ウイルスであり、レトロウイルス科に属する。HIVには、1型HIV（Human Immunodeficiency Virus type1: HIV-1）及び2型HIV（Human Immunodeficiency Virus type2: HIV-2）が存在する。生体にHIVが侵入すると、生体内ではHIVを排除するためにHIVに結合可能な複数種類の抗体が産生される。この生体から血液などの検体を採取し、抗HIV抗体を検出することにより、この生体がHIVに感染しているか否かを検査することができる。

20

【0003】

検体中の抗HIV抗体を検出する方法としては、例えば特許文献1に記載の方法が知られている。この方法によると、HIV-1のgag領域p24リコンビナント抗原をHIV抗原として感作したヒト赤血球と、CKS（CTP: CMP-3-デオキシ-マンノオクチュロソネート・シチジル・トランスフェラーゼ又はCMP-KDOシンセターゼ）とを含む試薬を用いることにより抗HIV抗体の検出が行われる。

30

【0004】

【特許文献1】特開平7-301633号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明の目的は、検体中の抗HIV抗体を従来よりも高感度に検出することのできる試薬、試薬の製造方法及び抗HIV抗体の検出方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明は、ビオチンが感作された1型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）のenv領域のgp41リコンビナント抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記gp41リコンビナント抗原が磁性粒子に担持された第1粒子と、ビオチンが感作された2型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-2）のenv領域のgp36抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記gp36抗原が磁性粒子に担持された第2粒子と、ビオチンが感作された1型ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1）のenv領域のgp41合成ペプチド抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、ビオチンとアビジンの結合により前記gp41合成ペプチド抗原が磁性粒子に担持された第3粒子と、を含み、前記第1粒子の磁性粒子が、前記gp41リコンビナント抗原以外のHIV抗原を実質的に担持しておらず、前記第2粒子の磁性粒子が、前記gp36抗原以外のHIV抗原を実質的に担持し

40

50

ておらず、前記第3粒子の磁性粒子が、前記gp41合成ペプチド抗原以外のHIV抗原を實質的に担持していない、抗HIV抗体検出試薬を提供する。

【0007】

また、本発明は、上記の抗HIV抗体検出試薬と、1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)に対する第1抗体及び2型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-2)に対する第2抗体に結合可能な標識抗体を含む標識抗体試薬とを備える抗HIV検出試薬キットを提供する。

【0008】

また、本発明は、ビオチンが感作された1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)のenv領域のgp41リコンビナント抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、
ビオチンとアビジンの結合により前記gp41リコンビナント抗原が磁性粒子に担持された第1粒子を用意する工程、
ビオチンが感作された2型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-2)のenv領域のgp36抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、
ビオチンとアビジンの結合により前記gp36抗原が磁性粒子に担持された第2粒子を用意する工程、
ビオチンが感作された1型ヒト免疫不全ウイルス(HIV-1)のenv領域のgp41合成ペプチド抗原、および、アビジンが感作された磁性粒子からなり、
ビオチンとアビジンの結合により前記gp41合成ペプチド抗原が磁性粒子に担持された第3粒子を用意する工程、
及び前記第1粒子と前記第2粒子と前記第3粒子を混合する工程、
を含み、前記第1粒子の磁性粒子が、前記gp41リコンビナント抗原以外のHIV抗原を實質的に担持しておらず、
前記第2粒子の磁性粒子が、前記gp36抗原以外のHIV抗原を實質的に担持しておらず、
前記第3粒子の磁性粒子が、前記gp41合成ペプチド抗原以外のHIV抗原を實質的に担持していない、
抗HIV抗体検出試薬の製造方法を提供する。

【発明の効果】

【0010】

本発明によると、検体中の抗HIV抗体を高感度に検出することができ、生体へのHIV感染の有無をより正確に診断することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0011】

本実施形態の試薬は、検体中の抗HIV抗体を検出するために用いられる試薬であり、
 第1担体粒子と第2担体粒子とを含む。第1担体粒子は、検体中のHIVに対する第1抗体を特異的に検出するためのものであり、第1抗体に結合可能な第1抗原が感作されている。第1担体粒子には、實質的に、第1抗原以外のHIV抗原は感作されていない。第2担体粒子は、検体中のHIVに対する第2抗体を特異的に検出するためのものであり、第2抗体に結合可能な第2抗原が感作されている。第2担体粒子には、實質的に、第2抗原以外のHIV抗原は感作されていない。即ち、第1担体粒子は、第1抗体を検出するための担体粒子であり、第2担体粒子は第2抗体を検出するための担体粒子である。第1担体粒子及び第2担体粒子は、容器内の緩衝液中で分散状態にあることが好ましい。

【0012】

抗原の担体粒子への感作方法としては特に限定されず、担体粒子に直接抗原を感作してもよいし、間接的に感作してもよい。ここで、間接的に感作する、とは、担体粒子と抗原との間に特定の物質(以下、介在物質とする)を介在させて担体粒子に抗原を固定化することを意味する。介在物質は互いに結合可能な二種類の物質(第1介在物質及び第2介在物質)であることが好ましく、且つ抗HIV抗体とは實質的に結合しない物質であることが好ましい。第1介在物質としてハプテンを用い、第2介在物質としてこのハプテンに結合する物質(以下、ハプテン結合物質とする)を用いることが好ましい。ハプテンとしては、ビオチン、2,4-ジニトロフェノール、2,4,6-トリニトロフェノール、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)などを用いることができる。ハプテン結合物質としては、ハプテンを2分子以上同時に結合できる物質であることが好ましく、例えば上記ハプテンに対する抗体を用いることができる。ハプテンとしてビオチンを用いる場合

10

20

30

40

50

はアビジンやストレプトアビジンを用いることもできる。

【0013】

第1介在物質及び第2介在物質の例として、アビジン及びビオチンの組み合わせを用いる場合、例えば、担体粒子にアビジン（又はビオチン）を固定化し、抗原にビオチン（又はアビジン）を結合させると、担体粒子に固定化されたアビジン（又はビオチン）と抗原に結合したビオチン（又はアビジン）が結合し、これによって担体粒子に抗原を固定化することができる。ビオチン等のハプテンを結合させた抗原や、アビジン等のハプテン結合物質を固定化した担体粒子は例えば市販のものを用いることができる。

【0014】

ハプテンを結合させた抗原は、上記のハプテンと抗原とを架橋剤を用いて結合することにより調製することもできる。架橋剤は、ハプテンとポリペプチドとの結合に通常用いられる架橋剤であれば特に限定されない。具体的には、ハプテンに架橋剤を用いて官能基を導入し、この官能基を抗原が有する官能基と反応させることによりハプテンとタンパク質とを結合させることができる。抗原が有する官能基に架橋剤を用いてさらに別の官能基を導入することもできる。

例えば、抗原の末端のアミノ基に架橋剤を用いて導入したスルフヒドリル基を、ハプテンに架橋剤を用いて導入した、スルフヒドリル基と反応性が高い官能基（例えばマレイミド基）と反応させることにより、ハプテンと抗原とを結合させることができるが、この形態に限定されない。

【0015】

上記の架橋剤として用い得る化合物としては、限定されないが、例えば1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド(EDAC)、N-ヒドロキシスクシンイミド(NHS)、2-イミノチオラン、N,N'-o-フェニレンジマレイミド、N-スクシンイミジル S-アセチルチオアセテート(SATA)、N-スクシンイミジル S-アセチルチオプロピオネート(SATP)、N-スクシンイミジル 3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、N-スクシンイミジル 4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート、N-スクシンイミジル 6-マレイミドヘキサノエート、N-スクシンイミジル 4-ヨードアセチルアミノベンゾエート、N-スクシンイミジル 3-(p-ヒドロキシフェニル)プロピオネート、N-スクシンイミジル m-マレイミドベンゾエート、N-スクシンイミジル 4-マレイミドブチレート、N-スクシンイミジル (p-マレイミドフェニル)アセテート、N-スクシンイミジル 4-(p-マレイミドフェニル)ブチレートなどが挙げられ、これらの1種を用いてもよいし、2種以上を用いてもよい。

【0016】

HIVにはHIV-1及びHIV-2が存在するため、偽陰性を回避するためにも、第1抗原及び第2抗原は一方が抗HIV-1抗体に対する抗原であり他方が抗HIV-2抗体に対する抗原であることが好ましい。抗原は、HIVのenv領域やgag領域などに対応することが好ましく、具体的にはHIV-1のgag領域p24抗原、HIV-1のenv領域gp41抗原、HIV-2のenv領域gp36抗原などが例示される。第1抗原はHIV-1のenv領域gp41抗原であり、第2抗原はHIV-2のenv領域gp36抗原であることが好ましい。また、本実施形態の試薬は、上記以外のHIV抗原を感作した担体粒子をさらに含んでもよい。

【0017】

第1抗原及び第2抗原としては、公知の方法によって調製したものをを用いることができる。例えば、抗原をコードするDNAを適当なプラスミドに組み込み、この組み換えプラスミドを大腸菌や酵母などの宿主にトランスフォームし、プラスミドに組み込まれたDNAから抗原(リコンビナント抗原)を発現させることができる。また、ペプチド自動合成装置(例えば、Applied Biosystems社 モデル430A等)を用いて抗原(ペプチド抗原)を化学的に合成することもできる。第1抗原及び第2抗原はリコンビナント抗原及びペプチド抗原の何れであってもよい。

10

20

30

40

50

【0018】

第1抗原としてリコンビナント抗原及びペプチド抗原の何れかを感じた第1担体粒子、及び第2抗原としてリコンビナント抗原及びペプチド抗原の何れかを感じた第2担体粒子の他に、第1抗原とは異なる方法で調製した同種の抗原を感じた第3担体粒子を試薬に含有させてもよい。

【0019】

例えば、第1抗原としてHIV-1 env領域gp41のリコンビナント抗原を感じた第1担体粒子と、第2抗原としてHIV-2 env領域gp36のペプチド抗原を感じた第2担体粒子の他に、HIV-1 env領域gp41のペプチド抗原を感じた担体粒子や、HIV-2 env領域gp36のリコンビナント抗原を感じた担体粒子を試薬に含有させてもよい。検体中には、リコンビナント抗原には反応しにくい抗HIV-1抗体が稀に含まれていることがあるため、上記のように第1担体粒子だけでなく、HIV-1 env領域gp41のペプチド抗原を感じた担体粒子を試薬に含有させることにより、偽陰性を回避し、より精度良く抗HIV抗体の検出を行うことができる。

10

【0020】

担体粒子としては、抗原を感じることができるものであれば特に限定されず、例えば、ニトロセルロースやカルボキシルセルロースなどのセルロースエステル類、ラテックス、ゴム、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、スチレン-ブタジエン共重合体、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリアクリルアミド、ポリメタクリレート、スチレン-メタクリレート共重合体、ポリグリシジルメタクリレート、アクロレイン-エチレングリコールジメタクリレート共重合体などの天然又は合成の樹脂及びその誘導体、ガラス(例えば活性化ガラス)、シリカゲル、カオリン、タルク、シリカ-アルミナ、アルミナ、硫酸バリウム、コバルト、鉄などの無機材料からなる粒子や、金などの金属コロイドを挙げることができる。

20

【0021】

また、担体粒子は磁気を有する粒子(磁性粒子)であることが好ましい。磁性粒子が反応容器内で液中に分散している場合、反応容器外から磁石を近づけることによって迅速且つ簡便に集磁することができ、反応容器内の液体成分を廃棄し新たに別の液体を添加することができる。従って、B/F分離やバッファの置換などを迅速且つ容易に行うことができる。

30

【0022】

担体粒子は小粒径のものを好むことが好ましい。また、担体粒子が小粒径であるほど、担体粒子の単位質量当たりの表面積が増大し、多くの抗原を担体粒子に感作することができる。担体粒子の粒径は、具体的には、0.5~5µmが好ましく、0.5~3µmがより好ましい。試薬中の担体粒子の濃度は、0.5~20mg/mL(0.05~2w/v%)が好ましく、より好ましくは2~15mg/mL(0.2~1.5w/v%)である。特に担体粒子が磁性粒子の場合、上記濃度範囲の担体粒子を用いることによって、迅速に集磁を行うことができる。

【0023】

上記の試薬を、抗HIV抗体を含む検体と混合すると、第1担体粒子上では第1抗原と抗HIV抗体との複合体が形成され、第2担体粒子上では第2抗原と抗HIV抗体との複合体が形成される。これらの複合体の有無の検出又は複合体の定量的検出によって、検体に抗HIV抗体が含まれているかを判定することができる。

40

【0024】

担体粒子上に形成された複合体を検出する方法としては、特に限定されないが、標識抗体(標識物質が結合された抗体)を用いることが好ましい。この標識抗体は複合体を構成する抗原、抗体、又は両者に特異的に結合することが好ましく、特に抗HIV抗体に結合する標識抗IgG抗体又は標識抗IgM抗体であることが好ましい。標識物質としては、検出可能なシグナル(例えば、蛍光、発光、発色、放射線)を発する物質(例えば、蛍光物質、発光物質、発色物質、放射性同位体など)や酵素などが挙げられる。酵素としては

50

、特に限定されないが、アルカリフォスファターゼ (ALP)、ペルオキシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、ルシフェラーゼ、 α -ガラクトシダーゼなどが好適に用いられる。

【0025】

酵素標識抗体を用いた場合、担体粒子上の複合体に酵素標識抗体を結合させ、さらにここにこの酵素に対応する基質を添加する。基質の添加前には、未反応の標識抗体を含む反応容器内の液体成分を除去しておくことが好ましい。基質は、上述の酵素による酵素反応で化学変化を起こす。この基質の化学変化に起因する反応液の光学的状態の変化(発光強度、蛍光強度、吸光度などの変化)を検出することによって、複合体を検出することができる。

【0026】

例えば、酵素としてALPを用い、基質としてp-メトキシフェニルリン酸、p-ニトロフェニルリン酸、チモールフタレインリン酸、フェノールフタレインリン酸、ジオキセタン類縁体、これらの塩や類縁体などを用いた場合は、酵素反応によって基質からシグナル(発光や発色)が発せられる。このシグナルを検出することによって、標識酵素の存在量、即ち担体粒子上の複合体の存在量を測定することができる。

【0027】

本実施形態のように実質的に一種類の抗原を感作した担体粒子を複数種類含む試薬を用いることによって、複数の抗原を感作した担体粒子を含む試薬(従来試薬)を用いるよりも高感度に複数種類の抗体を検出することができる。即ち、抗HIV-1抗体に対する抗原と抗HIV-2抗体に対する抗原を感作した担体粒子を含む試薬を用いるよりも、実質的に抗HIV-1抗体に対する抗原のみを感作した担体粒子、及び実質的に抗HIV-2抗体に対する抗原のみを感作した担体粒子の両方を含む試薬を用いた方が高感度に抗HIV抗体を検出することができる。さらに、本実施形態の試薬を用いると、検出の際のバックグラウンドノイズが比較的低い。よって、従来試薬に比べて本実施形態の試薬の方がシグナルとバックグラウンドノイズとの比(S/N比)が高く、より高感度であると言える。

【0028】

本実施形態の試薬は、以下のようにして製造することができる。

まず、第1担体粒子を適当な緩衝液中で分散させ、そこに第1抗体に結合可能な第1抗原を含む第1抗原溶液を添加する。攪拌などの操作によって、第1担体粒子に第1抗原を感作させる。第1抗原溶液には実質的に第1抗原以外のHIV抗原は含まれていないため、第1担体粒子には実質的に第1抗原以外のHIV抗原は感作されない。従って、第1抗原が感作された第1担体粒子は、検体中の第1抗体を特異的に検出する担体粒子となる。

次に、第2担体粒子を適当な緩衝液中で分散させ、そこに第2抗体に結合可能な第2抗原を含む第2抗原溶液を添加する。攪拌などの操作によって、第2担体粒子に第2抗原を感作させる。第2抗原溶液には実質的に第2抗原以外のHIV抗原は含まれていないため、第2担体粒子には実質的に第2抗原以外のHIV抗原は感作されない。従って、第2抗原が感作された第2担体粒子は、検体中の第2抗体を特異的に検出する担体粒子となる。

介在物質を介して抗原を担体粒子に感作する場合は、抗原の感作前に上述の架橋剤等を用いて介在物質を抗原及び/又は担体粒子に結合させることができる。

【0029】

第1抗原が感作された第1担体粒子と、第2抗原が感作された第2担体粒子とを混合し、適当な緩衝液中でこれらの粒子を分散させることにより、本実施形態の試薬とすることができる。

なお、第1抗原及び第2抗原とは異なる種類のHIV抗原を感作させた担体粒子を調製し、これを試薬に含有させてもよい。

【0030】

本発明の一実施形態の試薬キットは、上記の第1担体粒子と第2担体粒子とを含む抗HIV抗体検出試薬と、上記の標識抗体を含む標識抗体試薬とを含む。さらに、標識抗体として酵素標識抗体を用いる場合は、この酵素に対する基質を含む基質試薬を含むことが好

10

20

30

40

50

ましい。

【0031】

(実施例)

1) 検体

HIV非感染者1名から血液を採取して調製した血清を陰性検体とし、HIV感染者2名からそれぞれ血液を採取して調製した血清を陽性検体1及び陽性検体2とした。また、ブランク用検体として精製水を用意した。

【0032】

2) 試薬の調製

R1 試薬 (反応緩衝液)

0.1 M トリエタノールアミン (pH 7.6)、0.1 w/v % BSA、及び0.1 w/v % NaN_3 を含む溶液を調製し、R1 試薬とした。

【0033】

R2 - 1 試薬 (抗原感作粒子試薬)

緩衝液 A (20 mM NaPB (pH 7.5) を含む) に市販のストレプトアビジンが感作された磁性粒子 (平均粒径 2 μm) (以下、ストレプトアビジン感作磁性粒子とする) を 0.5 w/v % の濃度となるように添加し、さらにここに第1リコンビナント抗原溶液 (ピオチン有感作した HIV-1 env 領域 gp41 ペプチド抗原 (15 kDa を 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む) を添加した。この混合液を室温で1時間攪拌した。攪拌後、遠心して磁性粒子を沈降させ、溶液成分を廃棄した。ここに緩衝液 B (2 w/v % BSA、0.01 M GTA (pH 8.0)、及び 50 mM MgCl_2 を含む) を添加し、BSAブロッキングを行った。遠心して磁性粒子を沈降させ、溶液成分を廃棄し、緩衝液 C (0.1 M GTA 緩衝剤 (pH 7.7)、2.0 w/v % BSA、及び 0.1 % NaN_3 を含む) を添加した。これを第1抗原感作粒子試薬 A とした。

【0034】

緩衝液 A (20 mM NaPB (pH 7.5) を含む) に市販のストレプトアビジン感作磁性粒子 (平均粒径 2 μm) を 0.5 w/v % の濃度となるように添加し、さらにここに第1ペプチド抗原溶液 (ピオチン有感作した HIV-1 env 領域 gp41 ペプチド抗原 (4 kDa を 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む) を添加した。この混合液を室温で1時間攪拌した。攪拌後、遠心して磁性粒子を沈降させ、溶液成分を廃棄した。ここに緩衝液 B を添加し、BSAブロッキングを行った。遠心して磁性粒子を沈降させ、溶液成分を廃棄し、緩衝液 C を添加した。これを第1抗原感作粒子試薬 B とした。

【0035】

第1ペプチド抗原溶液ではなく、第2抗原溶液 (ピオチン有感作した HIV-2 env 領域 gp36 ペプチド抗原 (4 kDa) を 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 含む) を用いること以外は第1抗原感作粒子試薬と同様にして第2抗原感作粒子試薬を調製した。

前記第1抗原感作粒子試薬 A と前記第1抗原感作粒子試薬 B と前記第2抗原感作粒子試薬とを 6 : 3 : 1 の比率で混合し、この混合液を R2 - 1 試薬とした。混合液中の粒子濃度は 0.5 w/v % であった。

【0036】

R3 試薬 (ALP 標識抗体試薬)

以下の物質を含む溶液を調製し、R3 試薬とした。

3.5 ng/mL ALP 標識マウス抗ヒト IgG モノクローナル抗体
0.1 M MES (2-(N-Morpholino) ethanesulfonic acid) pH 6.5
0.15 M NaCl
1 mM MgCl_2
0.1 mM ZnCl_2
0.1 w/v % NaN_3

【0037】

R4 試薬 (分散試薬)

10

20

30

40

50

以下の物質を含む溶液を調製し、R 4 試薬とした。

0.1 M 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール (AMP) pH 9.6

1 mM MgCl₂

0.1 w/v % NaN₃

【0038】

R 5 試薬 (基質試薬)

以下の物質を含む溶液を調製し、R 5 試薬とした。

CDP-Star with Sapphirine-II (ジオキセタンの類縁体 (ALPの発光基質)、アプライドバイオシステムズ社製)

【0039】

洗浄試薬

以下の物質を含む溶液を調製し、洗浄試薬とした。

20 mM トリス pH 7.4

0.1 w/v % Tween 20

0.1 w/v % NaN₃

0.8 w/v % NaCl

【0040】

3) 測定

R 1 試薬 120 μL と、検体 10 μL とを混合し、42 ± 2.25 分間反応させた。次に、ここに R 2 - 1 試薬 30 μL を添加し、42 ± 1.5 分間反応させた。

反応後、遠心分離により磁性粒子を沈降させ、溶液を廃棄した。ここに洗浄試薬を添加し、遠心分離により磁性粒子を沈降させ、溶液を廃棄した。これを三度繰り返した後、R 3 試薬 100 μL 添加し、42 ± 2.75 分間反応させた。

反応後、遠心分離により磁性粒子を沈降させ、溶液を廃棄した。ここに洗浄試薬を添加し、遠心分離により磁性粒子を沈降させ、溶液を廃棄した。これを三度繰り返した後、R 4 試薬 30 μL 及び R 5 試薬 100 μL を添加し、42 ± 5 分間反応させた。

反応液の発光強度を発光測定装置で測定し、発光強度をカウント値として算出した。

【0041】

(比較例 1)

以下のように R 2 - 2 試薬を調製し、R 2 - 1 試薬ではなく R 2 - 2 試薬を用いること以外は、実施例と同様にして発光強度のカウント値を算出した。

緩衝液 A にストレプトアビジン感作磁性粒子を 0.5 w/v % の濃度となるよう添加し、さらにここに混合抗原溶液 (ピオチン感作した HIV - 1 env 領域 gp 41 リコンビナント抗原 (15 kDa) 3 μg/mL、ピオチン感作した HIV - 1 env 領域 gp 41 ペプチド抗原 (4 kDa) 0.375 μg/mL、及びピオチン感作した HIV - 2 env 領域 gp 36 ペプチド抗原 (4 kDa) 0.125 μg/mL を含む) を添加した。この混合液を室温で 1 時間攪拌した。攪拌後、遠心して磁性粒子を沈降させ、溶液成分を廃棄し、緩衝液 C を添加した。これを R 2 - 2 試薬とした。

【0042】

(比較例 2)

以下のように R 2 - 3 試薬を調製し、R 2 - 1 試薬ではなく R 2 - 3 試薬を用いること以外は、実施例と同様にして発光強度のカウント値を算出した。

緩衝液 A にストレプトアビジン感作磁性粒子を 0.5 w/v % の濃度となるよう添加し、さらにここに混合抗原溶液 (ピオチン感作した HIV - 1 env 領域 gp 41 リコンビナント抗原 (15 kDa) 10 μg/mL、ピオチン感作した HIV - 1 env 領域 gp 41 ペプチド抗原 (4 kDa) 0.75 μg/mL、及びピオチン感作した HIV - 1 env 領域 gp 36 ペプチド抗原 (4 kDa) 0.25 μg/mL を含む) を添加した。この混合液を室温で 1 時間攪拌した。攪拌後、遠心して磁性粒子を沈降させ、溶液成分を廃棄し、緩衝液 C (0.1 M GTA 緩衝剤 (pH 7.7)、2.0 w/v % BSA、及び 0.1 % NaN₃ を含む) を添加した。これを R 2 - 3 試薬とした。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

検出結果を表 1、図 1 及び図 2 に示す。

【 0 0 4 4 】

【表 1】

	実施例	比較例 1	比較例 2
ブランク用検体	4591	4087	4528
陰性検体	65822	63425	90972
陽性検体 1	322866	106130	117738
陽性検体 2	188088	154536	172583

10

【 0 0 4 5 】

表 1 及び図 1 より、ブランク用検体の測定においては、R 2 - 1 試薬、R 2 - 2 試薬及び R 2 - 3 試薬の何れを用いても殆ど発光が検出されなかった。また、陰性検体の測定においては、R 3 - 3 試薬よりも R 2 - 1 試薬又は R 2 - 2 試薬を用いた方が低いカウント値が検出された。

【 0 0 4 6 】

表 1 及び図 2 より、陽性検体 1 及び陽性検体 2 の何れの測定においては、比較例 1 又は比較例 2 よりも実施例 1 の試薬を用いた方が高いカウント値が検出され、高感度に HIV 抗体を検出できたことが示された。

20

【 0 0 4 7 】

また、上記のように陰性検体の測定においては低いカウント値が検出されたことより、比較例 1 及び 2 に比べて実施例の S / N 比（シグナル（S）とバックグラウンドノイズ（N）の比）が高いことが示された。以上より、本実施例の試薬を用いるとより高感度で病原体を検出することができるため、この検出結果を用いて精度良く感染症を診断することができる。

【図面の簡単な説明】

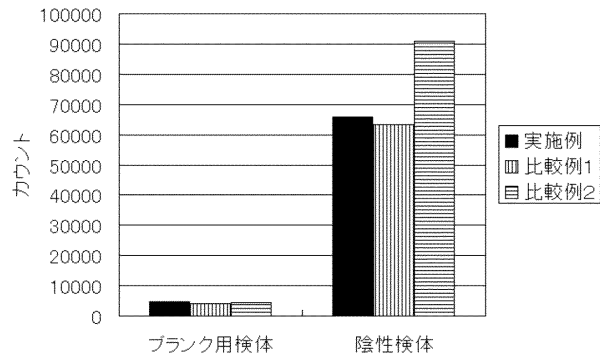
【 0 0 4 8 】

【図 1】ブランク用検体及び陰性検体のカウント値を示すグラフである。

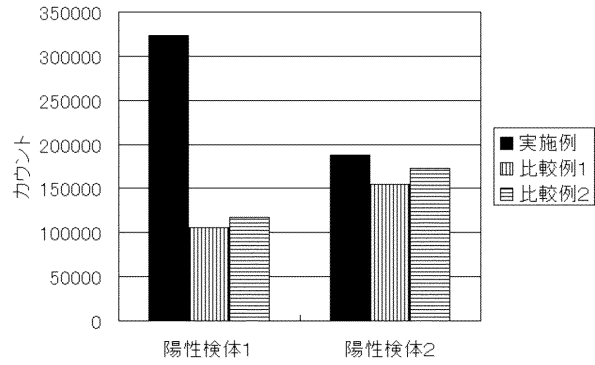
【図 2】陽性検体のカウント値を示すグラフである。

30

【 図 1 】



【 図 2 】



フロントページの続き

- (56)参考文献 特表2002-524738(JP,A)
特開2003-107089(JP,A)
特開昭63-128260(JP,A)
特表平10-502165(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/53 - 33/579

专利名称(译)	抗HIV抗体检测试剂，试剂盒，试剂生产方法和抗HIV抗体检测方法		
公开(公告)号	JP4895727B2	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	JP2006231247	申请日	2006-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	希森美康株式会社		
申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
当前申请(专利权)人(译)	希森美康公司		
[标]发明人	山田美穗 宫地峰輝		
发明人	山田 美穗 宫地 峰輝		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56988 G01N33/54326 G01N33/6854 G01N2469/20		
FI分类号	G01N33/569.H G01N33/53.U G01N33/53.N G01N33/543.525.C G01N33/576.Z		
其他公开文献	JP2008051780A JP2008051780A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供能够比传统技术灵敏地检测样品中的抗体的试剂和检测方法。ZSOLUTION：提供抗HIV抗体检测试剂，其含有第一载体颗粒，用于使第一抗原与第一抗HIV抗体（第一抗体）结合并特异性检测第一抗体，第二载体颗粒用于致敏第二抗体。抗原可与第二抗HIV抗体（第二抗体）结合，并特异性地检测第二抗体。Z

	実施例	比較例1	比較例2
ブランク用検体	4591	4087	4528
陰性検体	65822	63425	90972
陽性検体1	322866	106130	117738
陽性検体2	188088	154536	172583