

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2013 年 12 月 19 日(19.12.2013)



(10) 国際公開番号

WO 2013/186885 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2012/065150
- (22) 国際出願日: 2012 年 6 月 13 日(13.06.2012)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 旭化成株式会社 (ASAHI KASEI KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒5308205 大阪府大阪市北区中之島三丁目 3 番 2 3 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 前花 浩志 (MAEHANA Koji) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 1 0 5 番地 Tokyo (JP). 松山 健二 (MATSUYAMA Kenji) [JP/JP]; 〒1018101 東京都千代田区神田神保町一丁目 1 0 5 番地 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & Co.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR DETECTING SPECIFIC SUBSTANCES IN MILK

(54) 発明の名称: 乳汁中の特定物質を検出する方法

(57) Abstract: An immunochromatographic method for detecting specific substances in milk, wherein the method comprises: (1) a step of making the milk contact a test piece, having a first portion in which a first antibody tagged for the specific substance or the labeled specific substance is stored, a second portion that is connected downstream of the first portion and to which a second antibody for the specific substance is fixed, and a third portion that is connected upstream of the first portion or the second portion and that has an aperture capable of removing milk fat globules in the milk, said milk contacting the test piece at the third portion or further upstream of the same; and (2) a step of having the milk flow to the second portion or further downstream of the same and providing a detectable signal by the tag at the second portion or further downstream of the same.

(57) 要約: 乳汁中の特定物質を検出するためのイムノクロマトグラフ方法であって、(1) 該特定物質に対する標識された第一の抗体または標識された該特定物質が保持された第 1 部分と、該第 1 部分の下流に連結され、かつ該特定物質に対する第二の抗体が固定化された第 2 部分と、該第 1 部分又は該第 2 部分の上流に連結され、かつ該乳汁中の乳脂肪球を除去できる空隙を有する第 3 部分とを有する試験片に対して、該乳汁を該第 3 部分又はそれより上流部に接触させる工程; 及び (2) 該乳汁を該第 2 部分又はそれより下流部まで流し、該第 2 部分又はそれより下流部で該標識による検出可能な信号を得る工程: を含む、上記方法。

WO 2013/186885 A1

明 細 書

発明の名称：乳汁中の特定物質を検出する方法

技術分野

[0001] 本発明は、抗原抗体反応を利用して乳汁中の物質を検出するためのイムノクロマトグラフ方法及びイムノクロマトグラフ装置に関する。

背景技術

[0002] 牛、羊、ヤギに代表される家畜の乳汁は無菌なものではなく、疾患や環境が原因で何らかの微生物が混入している場合がある。特に微生物の感染による疾患ではしばしば乳汁中に多くの微生物を排菌することが知られている。微生物の感染が原因で引き起こされる代表的な家畜の疾患に乳房炎がある。

[0003] 乳房炎とは、乳管系、乳腺組織の炎症であり、主に微生物が乳房内に侵入・定着し、増殖することによって引き起こされる。乳房炎は多くの動物が罹患するが、特に乳牛における牛乳房炎は乳牛全体の15～40%が罹患すると言われ、酪農家にとって極めて重要な疾患の一つである。乳牛が乳房炎に罹患すると、乳汁の合成機能が阻害され、泌乳量の減少や場合によっては泌乳の停止が起こるだけでなく、治療費や、乳価のペナルティーなど多大な経済的損失を酪農家に与える。さらには、伝染防止のために乳房炎罹患分房を個別に搾乳するなど、酪農家にかかる労働負担も増加する。

[0004] 乳房炎は様々な微生物の感染によって引き起こされるが、原因菌によって効果を示す抗生物質が異なる、また、特定の微生物では他の分房や個体に伝染するなど性質やその後の対応が異なることから、乳汁中に存在する原因菌を迅速・簡便に同定することが極めて重要となる。

[0005] 感染症の原因菌の同定方法としては、培養法、遺伝子による同定法、および抗原抗体反応による同定法が知られている。現在行われている家畜の乳房炎の原因菌の同定法は培養法が中心であるが、操作が煩雑なうえ、結果が得られるのに数日間を要するという問題がある。また、遺伝子増幅法（PCR法）による特定遺伝子の検出に基づく同定方法も報告されている（非特許文献1

）。この方法では約1日で結果が得られるものの、やはり特別な機器や手技を要するという問題がある。近年では、抗原抗体反応に基づいて表面プラズモン共鳴（SPR）により、乳房炎の原因菌の一つである黄色ブドウ球菌や大腸菌を検出する装置が開発されている（非特許文献2）。これは、それぞれの細菌に特異的な抗原に対する抗体を作製し、この抗体をSPRチップ上に固定して使用する。この方法では、迅速に特定の原因菌を検出できるものの、特別な装置が必要なため、酪農現場等での測定が困難である。

[0006] 一方、血液や尿などの生体試料に対して、家庭や診察室で迅速・簡便に測定できるイムノクロマトグラフ法を用いた簡易測定装置（イムノクロマトグラフ装置）が普及している（例えば、特許文献1参照）。この方法は、金コロイドなどの着色粒子を標識した抗体であって測定対象物質（抗原）に特異的な第一の抗体を含有した試験紙と、測定対象物質を捕捉する第二の抗体を固定化した多孔性のメンブレンとが連結した試験片を用いる。測定対象物質を含む検体を滴下すると、測定対象物質は着色粒子を標識した抗体及び／または多孔性メンブレン上に固定化した抗体と結合し、メンブレン上に目視で判別可能なライン等が出現する。したがって、このライン等の有無を確認することで測定物質の有無を検出することができる。

[0007] 特許文献1には、上記の方法が、血液（全血）のほか、血漿、血清、尿、唾液、喀痰、汗などに適用できることが教示されているが、上記の方法を家畜の乳汁に適用することは教示されておらず、その適用に際して生じる問題点についても何ら教示ないし示唆がない。また、血液（全血）などの生体試料を検体としてイムノクロマトグラフ法を適用する方法は特許文献2ないし4にも開示されているが、これらの特許文献にもイムノクロマトグラフ法を家畜の乳汁に適用することは示唆ないし教示されていない。

[0008] 家畜の乳汁を検体として用いてイムノクロマトグラフ法により酪農現場で迅速・簡便に測定できる簡易測定装置として、特許文献5には乳汁を検体として家畜の乳房炎の原因菌を検査する目的でイムノクロマトグラフ法を用いる方法が提案されている。この文献には、乳汁中に含まれる乳脂肪球とカゼイ

ンがイムノクロマトグラフ法による検出を阻害すること、及び検査に先だってこれらを事前に除去することが好ましいことが教示されている。この文献には、乳脂肪球とカゼインの除去に際して乳汁を静置してクリーム層を分離し、界面活性剤で処理する手法が開示されているが、フィルターを用いて乳脂肪球を除去するとの教示はない。

[0009] なお、イムノクロマトグラフ法を適用するにあたり夾雑物を物理的なフィルターや化学的な親和性を有する膜により除去する手法は特許文献2ないし4に教示されているが、上述のとおりこれらの文献に記載された方法はイムノクロマトグラフ法を全血などの生体試料に適用する方法であり、家畜の乳汁に適用する方法ではない。特許文献1ないし4には、イムノクロマトグラフ法を家畜の乳汁に適用するに際して生じる問題点についての教示ないし示唆はなく、その問題点を解決するための手段についても全く教示がない。

先行技術文献

特許文献

- [0010] 特許文献1：特開平 1-2 4 4 3 7 0 号公報
特許文献2：特表 2 0 0 3-5 1 2 6 2 4 号公報
特許文献3：特表平 1 1-5 0 5 3 2 7 号公報
特許文献4：特開 2 0 0 2-2 1 4 2 3 6 号公報
特許文献5：国際公開 W O 0 2 / 0 7 5 3 1 0 号パンフレット

非特許文献

- [0011] 非特許文献1：J.Dairy.Sci. 84: 74-83
非特許文献2：JRA先進的家畜管理システム実用化報告書（平成18-20年度）p5
8-65

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0012] 本発明は、抗原抗体反応を利用して家畜の乳汁中の物質を検出するためのイムノクロマトグラフ方法及びイムノクロマトグラフ装置を提供することを

解決すべき課題とした。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者は、乳房炎の原因菌をイムノクロマトグラフ装置を用いて抗原抗体反応により同定することを検討した。しかしながら、実際に本発明者が、乳汁を試料としたイムノクロマトグラフ法で微生物を検出できるかどうかを検討したところ、イムノクロマトグラフ装置の試験片上で抗原抗体反応が進行しないことが判明した。本発明者は、試験片上で抗原抗体反応が円滑に進行しない原因を調査した結果、乳汁中に含まれる多量の乳脂肪球が多孔性のメンブランが連結したイムノクロマトグラフ装置の試験片に詰まり、展開液が十分に流れないことが原因でないかと考えた。通常、イムノクロマトグラフ装置においては、展開液による輸送と抗原抗体反応の速度を適切にするために、数10～数100nm程度の孔径を有する試験片が使用されている。搾乳直後の乳汁には1～10数 μm 前後の粒径の乳脂肪球が多数存在しており（市販の牛乳等では、生乳中の乳脂肪球を均質化処理することによって粒径1 μm 以下としているが、均質化処理をしていない乳汁には広い範囲の粒径を有する乳脂肪球が存在している。）、乳脂肪球の粒径分布が赤血球に比べて非常に広いことからメンブランの目詰まりが生じて測定が困難になるものと考えられた。

[0014] 本発明者は上記課題を解決するために鋭意検討した結果、イムノクロマトグラフ法で使用する試験片の上流側で乳汁中の乳脂肪球の一部をサイズ処理によりトラップすることによって、乳汁中の特定の物質をイムノクロマトグラフ法にて測定することが可能になることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は、以下の通りである。

[0015] [1] 乳汁中の特定物質を検出するためのイムノクロマトグラフ方法であって、

(1) 該特定物質に対する標識された第一の抗体または標識された該特定物質が保持された第1部分と、該第1部分の下流に連結され、かつ該特定物質に

対する第二の抗体が固定化された第2部分と、該第1部分又は該第2部分の上流に連結され、かつ該乳汁中の乳脂肪球を除去できる空隙を有する第3部分とを有する試験片に対して、該乳汁を該第3部分又はそれより上流部に接触させる工程；及び

(2) 該乳汁を該第2部分又はそれより下流部まで流し、該第2部分又はそれより下流部で該標識による検出可能な信号を得る工程：

を含む、上記方法。

[0016] [2] イムノクロマトグラフ方法がラテラルフロー型である、[1]に記載の方法。

[3] 該第1部分に、該特定物質に対する標識された第一の抗体が保持されている、[1]又は[2]に記載の方法。

[4] 特定物質が、細菌の成分又は該細菌が分泌する物質である、[1]から[3]の何れかに記載の方法。

[5] 第一の抗体、及び第二の抗体の少なくとも片方が、モノクローナル抗体である、[1]から[4]の何れかに記載の方法。

[0017] [6] 第一の抗体及び第二の抗体が、それぞれモノクローナル抗体である、[5]に記載の方法。

[0018] [7] 第3部分の空隙の保持粒子サイズが1～3.5 μm である、[1]から[6]の何れかに記載の方法。

[8] 第3部分がそれぞれ異なる粒子サイズの乳脂肪球を除去できる空隙を有する2種以上の部材により構成される、[1]から[7]の何れかに記載の方法。

[9] 第3部分が下流に配置された第一の部材、及び上流に配置された第二の部材により構成され、第二の部材の保持粒子サイズが第一の部材の保持粒子サイズより大きい、[8]に記載の方法。

[10] 第一の部材の保持粒子サイズが1.0～2.0 μm であり、第二の部材の保持粒子サイズが3.0～3.5 μm である、[9]に記載の方法。

[0019] [11] 溶菌酵素による処理を経た該乳汁を第2部分又はそれより下流部まで流す工程を含む、[1]から[10]の何れかに記載の方法。

[12] 溶菌酵素が自己溶菌酵素である、[11]に記載の方法。

[13] 溶菌酵素としてリゾスタフィンを用いて該乳汁中のブドウ球菌を検出する、[11]に記載の方法。

[14] 家畜の乳房炎の原因菌がブドウ球菌であるか否かを診断する方法であって、

乳房炎に罹患した家畜から原因菌を含む乳汁を得る工程、該乳汁中に溶菌酵素を混合することにより該原因菌の菌体内に存在する特定物質を菌体外に放出させる工程、及び該特定物質を抗原とする抗体を用いた免疫学的方法によって外特定物質の存在の有無または存在量を測定する工程を含む診断方法。

[15] 溶菌酵素としてリゾスタフィンを用いて原因菌がブドウ球菌であるか否かを診断する、[14]に記載の方法。

[16] 該特定物質に対する標識された第一の抗体または標識された該特定物質が保持された第1部分と、該第1部分の下流に連結され、かつ該特定物質に対する第二の抗体が固定化された第2部分と、該第1部分又は該第2部分の上流に連結され、かつ該乳汁中の乳脂肪球を除去できる空隙を有する第3部分とを有する試験片を含む、乳汁中の特定物質を検出するためのイムノクロマトグラフ装置。

[17] 第1部分または第2部分に、溶菌酵素または界面活性剤が保持されてなる、[16]記載のイムノクロマトグラフ装置

[18] 溶菌酵素または界面活性剤を含む添加液と、[16]記載のイムノクロマトグラフ装置とからなる検出キット。

発明の効果

[0020] 本発明によれば、乳汁中の特定の物質の有無を迅速・簡便に、かつその場で検出することができる。特に、牛乳房炎を診断する場合において、標識が視認できるものである場合には装置等を用いずに酪農場で実施することができ、クリーム層分離処理も不要であることから、病状の更なる悪化の前に迅

速に原因菌を特定し、適切な抗生物質の選択などの的確な治療方針や、感染拡大防止のための措置を早期に決定することができる。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]実施例1で用いたイムノクロマトグラフ装置の試験片の断面模式図を示す。1：標識抗体含浸部材（第1部分）、2：クロマト展開用膜担体（第2部分）、3：捕捉部位、4：試料添加用部材、5：吸収用部材、6：基材、及び7：脂肪球除去用部材（第3部分）

[図2]イムノクロマトグラフ装置の試験片の別の一例の断面模式図を示す。

[図3]イムノクロマトグラフ装置の試験片の別の一例の断面模式図を示す。

[図4]自己溶菌酵素を用いた場合の検出感度改善効果を示す。

[図5]アクロモペプチダーゼおよびリゾスタフィンを用いて牛乳汁中に添加した黄色ブドウ球菌のELISAによる測定結果を示す。

[図6]実施例6で用いたイムノクロマトグラフ装置の試験片の断面模式図を示す。1：標識抗体含浸部分（第1部分）、2：クロマト展開用膜担体（第2部分）、3：補足部位、4：試料添加用部材、5：吸収用部材、6：基材

[図7]溶菌酵素としてリゾスタフィンを用いてイムノクロマトグラフ法により乳汁中の黄色ブドウ球菌を検出した結果を示す。

発明を実施するための形態

[0022] 以下、本発明について更に詳細に説明する。

本発明のイムノクロマトグラフ装置は、イムノクロマトグラフ法によって乳汁中の特定物質を検出するための装置であって、該特定物質に対する標識された第一の抗体または標識された該特定物質が保持された第1部分と、該第1部分の下流に連結され、かつ該特定物質に対する第二の抗体が固定化された第2部分と、該第1部分又は該第2部分の上流に連結され、かつ該乳汁中の乳脂肪球を除去できる空隙を有する第3部分とを有する試験片を含む装置である。具体的な試験片の構成としては、図1、図2、図3に断面模式図を示した試験片が挙げられる。図1においては、試料添加用部材4と脂肪球除去用部材（第3部分）7とは一体となって、標識抗体含浸部材（第1部分）1

の上流に設置されている。図2においては、脂肪球除去用部材（第3部分）7は、標識抗体含浸部材（第1部分）1の下流、かつクロマト展開用膜担体（第2部分）2の上流に設置されている。図3においては、脂肪球除去用部材（第3部分）7は、試料添加用部材4の下流、かつ標識抗体含浸部材（第1部分）1の上流に設置されている。

[0023] イムノクロマトグラフ装置は公知の方法にて市販の材料を用いて作製することができる。

[0024] 第1部分に使用する材料は、イムノクロマトグラフを行えるものであれば特に限定されないが、好ましくは、セルロース誘導体等の繊維マトリックス、濾紙、ガラス繊維、布、綿等である。

[0025] 第2部分に使用する材料は、イムノクロマトグラフを行えるものであれば特に限定されないが、好ましくは、ニトロセルロース、混合ニトロセルロースエステル、ポリビニリデンフロライド、ナイロン等である。

[0026] 第3部分に使用する材料は、乳汁中に含まれる直径1～10数 μm の乳脂肪球を除去できる空隙を有していることが好ましい。第3部分は、試料溶液が孔径数10～数100nmの多孔性のメンブレンからなる上記第2部分の上流側に配置されている必要があり、試料溶液が最初に接触・通過できる位置である、上記第1部分の上流側に配置されていることが好ましい。

[0027] 第3部分が有する空隙は乳脂肪球を分離できる大きさであればよく、保持粒子サイズは好ましくは0.1から10 μm であり、より好ましくは1から3.5 μm である。材料は上記の範囲の空隙を有するものであれば特に限定されないが、好ましくはセルロース誘導体等繊維マトリックス、濾紙、ガラス繊維、布、綿等である。保持粒子サイズとは、そのサイズ以上の粒子サイズを有する乳脂肪球が空隙を通過できずに第3部分に保持される乳脂肪球の粒子サイズのことであり、第3部分の空隙の平均ポアサイズに実質的に対応しているが、そのサイズ以上の粒子サイズを有する乳脂肪球の50%以上、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、特に好ましくは90%以上、最も好ましくは98%以上が空隙を通

過でせずに第3部分に保持される。保持される乳脂肪球の割合は当業者に周知の方法で測定することができる。例えば、GEヘルスケアバイオサイエンス社から提供されているGF/Bは保持粒子サイズが $1.0\mu\text{m}$ であることが同製品カタログにおいて明らかにされているが、当業者に周知の方法で上記の粒子サイズを確認することが可能である。

[0028] 上記第3部分は、特定の保持粒子サイズを有する材料のみを用いてもよく、乳脂肪球の分離効率を高めるために保持粒子サイズが大きいものから小さいものを段階的に張り合わせて用いてもよい。上記第3部分がそれぞれ異なる粒子サイズの乳脂肪球を除去できる空隙を有する2種以上の部材により構成される場合は本発明の好ましい態様であり、第3部分が下流に配置された第一の部材、及び上流に配置された第二の部材により構成され、第二の部材の保持粒子サイズが第一の部材の保持粒子サイズより大きい場合は本発明のさらに好ましい態様である。第3部分を2種の部材により構成する場合には、下流に配置された第一の部材の保持粒子サイズが $1.0\sim 2.0\mu\text{m}$ であり、上流に配置された第二の部材の保持粒子サイズが $3.0\sim 3.5\mu\text{m}$ であることが好ましい。高濃度で広い粒径分布を有する乳脂肪球を含む乳汁、好ましくは搾乳後の未希釈の乳汁から特定物質を高感度に検出するためは、第3部分を保持粒子サイズの小さな部材と保持粒子サイズの大きな部材との組み合わせにより構成することが好ましい。

[0029] 上記第1部分には、特定物質に対する標識された第一の抗体、または標識された特定物質が保持されている。第1部分に、特定物質に対する標識された第一の抗体が保持されている場合には、サンドイッチアッセイ法により特定物質を検出することができる。また、第1部分に標識された特定物質が保持されている場合には、競合法により特定物質を検出することができる。本発明においては、検出感度が高く、陽性で抗体検出ラインが出現するサンドイッチアッセイ法の方が好ましいことから、第1部分には、特定物質に対する標識された第一の抗体が保持されていることが好ましい。

[0030] 第1部分に特定物質に対する標識された第一の抗体を保持させる場合には

、特定物質に対する第一の抗体と、特定物質に対する第二の抗体の、2種類の抗体を用いる。サンドイッチアッセイ法により特定物質を検出することができるように、上記第一の抗体と上記第二の抗体は、当該特定物質に同時に結合することができる抗体であり、上記第一の抗体が認識する当該特定物質のエピトープは、上記第二の抗体が認識する当該特定物質のエピトープとは異なることが好ましい。

[0031] 本発明において、検出可能な信号を得るために、第1部分に保持される第一の抗体又は特定物質は標識されている。本発明で用いる標識としては、着色粒子、酵素、ラジオアイソトープなどが挙げられるが、特殊な設備不要で目視によって検出可能な着色粒子を使用することが好ましい。着色粒子としては、金や白金などの金属微粒子、非金属粒子、ラテックス粒子などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。着色粒子は、試験片の空隙内を通過して下流に輸送されることができるサイズであればいかなるサイズでもよいが、直径が1 nmから10 μ mが好ましい。より好ましくは、5 nmから1 μ mであり、さらに好ましくは10 nmから100 nmである。

[0032] 本発明で測定される特定物質は、イムノクロマトグラフ法で測定できる物質であれば何れでも可能であるが、細菌の成分または細菌が分泌する物質であることが好ましい。さらに好ましくは、細菌のL7/L12リボソームタンパク質である。L7/L12リボソームタンパク質は、細胞内に多コピー存在するために検出感度が高い。また、後の実施例で示すように、以下に記載の公知の方法により、乳房炎の原因となる特定の細菌を他の細菌と種または属で識別可能な抗体を実際に取得可能である。細菌の種類は特に限定されず、グラム陽性菌又はグラム陰性菌のいずれであってもよい。例えば、ブドウ球菌（スタフィロコッカス属に属する細菌）、好ましくは黄色ブドウ球菌などのグラム陽性菌、又は大腸菌やクレブシエラ属に属する細菌などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

[0033] 上記の抗体は、国際公開第00/06603号パンフレットに記載の方法で作製することができる。細菌リボソームタンパク質L7/L12を抗原とす

る場合は、細菌リボソームタンパク質L7／L12の全長タンパク質あるいはその部分ペプチドを抗原として用いて作製することができるが、全長タンパク質を抗原として作製することが好ましい。この部分ペプチドあるいは全長タンパク質をそのまま、またはキャリアタンパク質と架橋した後必要に応じてアジュバントとともに動物へ接種せしめ、その血清を回収することでL7／L12リボソームタンパク質を認識する抗体（ポリクローナル抗体）を含む抗血清を得ることができる。また抗血清より抗体を精製して使用することもできる。接種する動物としてはヒツジ、ウマ、ヤギ、ウサギ、マウス、ラット等であり、特にポリクローナル抗体作製にはヒツジ、ウサギなどが好ましい。また、抗体としてはハイブリドーマ細胞を作製する公知の方法により取得したモノクローナル抗体を適用することがより好ましいが、この場合はマウスが好ましい。当該モノクローナル抗体として、乳房炎の原因となる特定の細菌のリボソームタンパク質L7／L12と反応し、前記特定の細菌以外の乳房炎の原因となる細菌のリボソームタンパク質L7／L12とは反応しないモノクローナル抗体をスクリーニングすることにより、当該細菌による感染症にかかっているかどうかの診断に役立てることが可能となる。

[0034] 抗体が乳房炎の原因となる特定の細菌の成分または該細菌が分泌する物質と反応し、前記特定の細菌以外の乳房炎の原因となる細菌の成分または該細菌が分泌する物質とは反応しないモノクローナル抗体であれば、リボソームタンパク質L7／L12以外を抗原として認識する抗体であっても使用することができる。

[0035] また、モノクローナル抗体としては、乳汁中に含まれる特定物質以外の夾雑物により抗原抗体反応が阻害されないモノクローナル抗体を用いることが好ましい。例えば、乳汁中にはカゼインなどのタンパク質が大量に含まれており、特定物質とモノクローナル抗体との反応を阻害する場合がある。特定物質に対するモノクローナル抗体を常法により製造するにあたり、例えばカゼインなどにより抗原抗体反応が阻害を受けないモノクローナル抗体や、抗原抗体反応への影響が少ないモノクローナル抗体を適宜選択して用いること

が好ましい場合がある。このようなモノクローナル抗体は、通常の方法に従って抗原に対して特異的に反応するモノクローナル抗体を製造した後に、カゼインなどの夾雑物の存在下で抗原抗体反応が阻害されるか否かを調べて、実質的に反応の阻害を受けないモノクローナル抗体を選択することにより容易に取得することができる。

[0036] 本発明においては、上述した試験片をそのまま使用してイムノクロマトグラフ装置としてもよいし、ケースに収納して、イムノクロマトグラフ装置としてもよい。前者の場合は、試料となる乳汁の量が多い場合に、容器に入った試料に直接試験片の一端を浸して使用することが好ましい。また、後者の場合は、試料となる乳汁の量が少ない場合に、ピペット等で所定量を計量して試験片に滴下して使用することが好ましい。後者の場合のケースの形状は、試験片を収納できればいかなる形状でもよい。ケースの材料はいかなる材料でもよく、ポリプロピレンやポリカーボネートなどが好ましいものとしてあげられる。

[0037] 本発明のイムノクロマトグラフ装置は、容器、たとえばマイクロチューブ、及び添加液、例えば細菌を溶菌させてリボゾームタンパク質L7/L12を溶液内に溶出させるための、溶菌酵素または界面活性剤を含む添加液を組合せたキットとして提供することもできる。

[0038] 本発明によるイムノクロマトグラフ方法は、乳汁中の特定物質を検出するためのイムノクロマトグラフ方法であって、

(1) 該特定物質に対する標識された第一の抗体または標識された該特定物質が保持された第1部分と、該第1部分の下流に連結され、かつ該特定物質に対する第二の抗体が固定化された第2部分と、該第1部分又は該第2部分の上流に連結され、かつ該乳汁中の乳脂肪球を除去できる空隙を有する第3部分とを有する試験片に対して、該乳汁を該第3部分又はそれより上流部に接触させる工程；及び

(2) 該乳汁を該第2部分又はそれより下流部まで流し、該第2部分又はそれより下流部で該標識による検出可能な信号を得る工程；

を含む方法である。

[0039] 乳汁はそのまま、または添加液を加えた混合溶液として、上記第3部分又はそれより上流部に位置する試料添加用部材に接触させる。上記特定物質が細菌の細胞内に存在する物質である場合は、界面活性剤成分を乳汁に直接添加するか、又は上記添加液に含有させ、あるいは上記第2部分より上流、好ましくは上記第1部分の上流側に該界面活性剤成分を保持させることで、該細菌を溶菌することができる（界面活性剤による溶菌処理については特開昭61-111464号公報を参照のこと）。これらの手法を適宜組み合わせてもよい。該添加液の他の成分としては、抗原抗体反応を阻害しない成分であれば特に限定されないが、適当な緩衝液（例えば、MOPS0など）を用いることができる。

[0040] 別の態様として、溶菌酵素を乳汁に直接添加するか、又は上記添加液に含有させ、あるいは上記第2部分より上流、好ましくは上記第1部分の上流側に溶菌酵素を固定化することにより、溶菌酵素による処理を経て菌体内に含まれる特定物質が菌体外に露出した該乳汁を第2部分又はそれより下流部まで流すことができ、細菌の細胞内に存在する特定物質を高感度に検出することができる。これらの手法を適宜組み合わせてもよい。好ましい態様では、溶菌酵素を乳汁に直接添加するか、及び/又は上記添加液に含有させることができ、特に好ましい態様では溶菌酵素を含む上記添加液を乳汁に添加することができる。

[0041] 溶菌酵素の種類は特に限定されず、任意の2種以上の溶菌酵素を適宜組み合わせて用いてもよい。乳房炎の起炎菌として大腸菌(*Escherichia coli*)、クレブシエラ(*Klebsiella*)属に属する細菌、又は黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)による感染が多発することから、これらの微生物に対して溶菌作用を発揮できる溶菌酵素を1種又は2種以上組み合わせて用いることも好ましい。例えばリゾチーム、リゾスタフィン、ペプシン、グルコシダーゼ、ガラクトシダーゼ、アクロモペプチダーゼ、 β -N-アセチルグルコサミニダーゼなどから選ばれる1種又は2種以上の溶菌酵素を用いることができる。例え

ば、溶菌酵素としてリゾチームと細胞膜溶解剤とを用いる方法が提案されている（特開昭63-167799号公報）。

[0042] 溶菌酵素としては、自己溶菌酵素が溶菌効果の高いものが多く好ましい（図4参照）。自己溶菌酵素とは、細菌自身が生産し、自己を融解する酵素をいう。このような自己融解がなぜ起こるのか詳細は不明であるが、菌が伸張・分裂する際に、菌体を溶解して切り離す役割を果たすものと考えられている。細菌の自己溶菌酵素としては、リゾスタフィン、アセチルグルコタミナーゼ、アクロモペプチダーゼなどが知られている。

[0043] 乳房炎の起炎菌として黄色ブドウ球菌の存在が特に疑われる場合には、黄色ブドウ球菌に対しては界面活性剤による溶菌率が低いことから、黄色ブドウ球菌に対して特異的に溶菌作用を発揮するリゾスタフィンを単独で、又は他の溶菌酵素と組み合わせて用いることが好ましい場合がある。リゾスタフィンにより黄色ブドウ球菌を溶菌する方法については特開平11-28099号公報に開示があり、当業者は溶菌酵素としてリゾスタフィンを容易に入手することができる。上記特許公報の開示の全てを参照により本明細書の開示として含める。

[0044] 天然型リゾスタフィンは、*Staphylococcus simulans* が生産する亜鉛プロテアーゼであり、黄色ブドウ球菌またはその同属菌の細胞壁ペプチドグリカンのグリコペプチド鎖中のグリシルグリシン結合を加水分解することによりこれらの菌を溶菌することが知られている。本明細書において、リゾスタフィンの用語には、上記天然型リゾスタフィン以外に、上記加水分解活性を失わない範囲で、天然型リゾスタフィンのアミノ酸配列中の1または複数のアミノ酸に付加、欠失、及び/又は置換等の変異が導入された変異型リゾスタフィンが包含される。また、加水分解活性を失わない範囲で、該天然型リゾスタフィンまたは変異型リゾスタフィンに他の化合物、例えば、糖類やポリエチレングリコール等を結合させた修飾型リゾスタフィンも包含される。これらのリゾスタフィンは、特開平11-28099号公報に記載された培養方法または遺伝子工学的手法で得るか、市販品の購入

により入手することが可能である。リゾスタフィンを溶菌酵素として用いる場合には、例えば黄色ブドウ球菌のリボソームL7／L12蛋白質からなる抗原をイムノクロマトグラフ法により検出することができ、あるいはイムノクロマトグラフ法とともに、又はイムノクロマトグラフ法に代えて他の免疫学的測定方法により上記抗原を検出することもできる。イムノクロマトグラフ以外の免疫学的測定方法としては、例えば、凝集反応法、酵素免疫測定法（ELISA法）、放射能免疫測定法（RIA法）、又は蛍光免疫測定法（FIA法）などを挙げることができるが、これらに限定されることはない。

[0045] 抗原抗体反応は、第1部分に保持されている「特定物質に対する標識された第一の抗体」と、第2部分に固定化された「特定物質に対する第二の抗体」を用いて、サンドイッチアッセイ法により検出することができる。あるいは抗原抗体反応は、第1部分に保持されている標識された特定物質と、第2部分に固定化された特定物質に対する抗体を用いて競合法にて検出してもよい。但し、本発明においては、検出感度が高く、陽性で抗体検出ラインが出現するサンドイッチアッセイ法が好ましい。

[0046] イムノクロマトグラフ方法は、試験片を横方向に配置して毛細管現象により液が移動することを利用したラテラルフロー型と、縦方向に配置して主に重力により上から下へ液を通過させるフロースルー型に大別される。本発明においてはラテラルフロー型またはフロースルー型のいずれでもよいが、より好ましくはラテラルフロー型である。

[0047] 以下の実施例により本発明をさらに説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

実施例

[0048] 実施例1：イムノクロマトグラフ法による乳汁サンプルの液流れの確認

（1）イムノクロマトグラフ装置の作製

図1に断面模式図で示されるイムノクロマトグラフ装置を以下のように作製した。

（a）リボゾームタンパク質L7／L12抗体の作製

金コロイド標識する抗体には、Staphylococcus aureus（黄色ブドウ球菌）リボソームタンパク質L7/L12モノクローナル抗体を使用した。国際公開WO 00/06603号パンフレットの実施例5に記載の方法に準じて、黄色ブドウ球菌Staphylococcus aureusのL7/L12リボソームタンパク質を取得し、同タンパク質を用いてモノクローナル抗体を作製した。当該モノクローナル抗体は、上記L7/L12リボソームタンパク質の別のサイトに同時に結合しうる2種（SA-1およびSA-2）の組合せを選択した。

[0049] モノクローナル抗体SA-1及びSA-2の組み合わせが、黄色ブドウ球菌のリボソームタンパク質L7/L12と反応し、黄色ブドウ球菌以外の乳房炎の原因となる細菌のリボソームタンパク質L7/L12とは反応せず、かつ乳汁の成分による反応阻害を受けない抗体であることを以下のように確認した。

[0050] 10 µg/mlのモノクローナル抗体SA-1とPBS溶液100 µlを96穴ELISAプレート（Nunc社Maxsorp ELISAプレート）に分注し4℃で一晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液（PBS中）200 µl添加し室温で1時間反応させてブロッキングした。上澄み除去後洗浄液（0.02% Tween20、PBS）で数回洗浄し、表1に示す各種細菌（約 1×10^8 cells/ml）を0.5% TritonX-100、PBSにて10倍に希釈したものを100 µl添加し室温にて1時間反応させた。さらに上澄み除去後、パーオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体SA-2を0.02% Tween20、PBSにて最終濃度1 µg/mlになるように希釈してそれぞれ100 µl添加し室温にて1時間反応させた。上澄み除去後さらに洗浄液で数回洗浄したのち、TMB溶液（KPL社製）を100 µlずつ加え室温10分間反応させた後1mol/lの塩酸を100 µl添加して反応を停止したのち450nmの吸光度を測定し、陰性コントロール（細菌を除いた溶液）シグナルとの差により反応性を評価した。結果を表1に示す。ここで陽性（+）はELISAでの吸光度と陰性コントロールの吸光度の差が少なくとも0.5以上、陰性（-）は吸光度と陰性コントロールの吸光度の差が0.1以下である。

[0051]

[表1]

菌種	結果	菌種	結果
<i>Bacillus subtilis</i>	—	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	—
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	—	<i>Serratiamarcescens</i>	—
<i>Enterococcus faecalis</i>	—	<i>Staphylococcus aureus</i>	+
<i>Escherichia coli</i>	—	<i>Staphylococcus hominis</i>	—
<i>Haemophilus influenzae</i>	—	<i>Staphylococcus chromogenes</i>	—
<i>Haemophilus parahaemoliticus</i>	—	<i>Staphylococcus xylosus</i>	—
<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	—	<i>Streptococcus agalactiae</i>	—
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	—	<i>Streptococcus intermedius</i>	—
<i>Legionella pneumophila</i>	—	<i>Streptococcus mitior</i>	—
<i>Moraxella catarrhalis</i>	—	<i>Streptococcus mitis</i>	—
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	—	<i>Streptococcus mutans</i>	—
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	—	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	—
<i>Neisseria lactamica</i>	—	<i>Streptococcus pyogenes</i>	—
<i>Propionibacterium acens</i>	—	<i>Streptococcus salivarius</i>	—
<i>Proteus mirabilis</i>	—		

[0052] 10 µg/mlのモノクローナル抗体SA-1とPBS溶液100 µlを96穴ELISAプレート（Nunc社Maxsorp ELISAプレート）に分注し4℃で一晩吸着させた。上澄み除去後、1%牛血清アルブミン溶液（PBS中）200 µl添加し室温で1時間反応させてブロッキングした。上澄み除去後洗浄液（0.02% Tween20、PBS）で数回洗浄し、黄色ブドウ球菌（約1×10⁸ cells/ml）を0.5% TritonX-100、PBS にて10倍に希釈したものを20 µlと牛乳（市販の飲用牛乳）80 µlとを添加し室温にて1時間反応させた。さらに上澄み除去後、パーオキシダーゼ標識したモノクローナル抗体SA-2を0.02% Tween20、PBSにて最終濃度1 µg/mlになるように希釈してそれぞれ100 µl添加し室温にて1時間反応させた。上澄み除去後さらに洗浄液で数回洗浄したのち、TMB溶液（KPL社製）を100 µlずつ加え室温10分間反応させた後1mol/lの塩酸を100 µl添加して反応を停止したのち450 nmの吸光度を測定し、陽性コントロール（牛乳汁を除いた溶液）シグナルとの差により反応性を評価し、牛乳による反応性低下がないものであることを確認した。

[0053] (b) 金コロイド標識含浸部材

BBInternational社製金コロイド溶液(粒径60nm)0.9mLに0.1M リン酸カリウム pH7.5を混合し、金コロイド標識するモノクローナル抗体SA-2を100 μ g/mL 加え室温で5分間静置し、この抗体を金コロイド粒子表面に結合させた後、金コロイド溶液における最終濃度が1%となるようにウシ血清アルブミン (BSA) 10%水溶液を加え、この金コロイド粒子の残余の表面をBSAでブロッキングして、金コロイド標識したモノクローナル抗体SA-2 (以下、「金コロイド標識抗体」と記す) 溶液を調製した。この溶液を遠心分離 (15000 $\times$ rpm、5分間) して金コロイド標識抗体を沈殿せしめ、上清液を除いて金コロイド標識抗体を得た。この金コロイド標識抗体を0.25%BSA、2.5%スクロース、35mm NaClを含有する20mmトリス塩酸緩衝液 (pH8.2) に懸濁して金コロイド標識抗体溶液を得た。10mm $\times$ 300mmの帯状のグラスファイバーパットに、金コロイド標識抗体溶液2mLを含浸せしめ、これを室温で減圧乾燥させて金コロイド標識抗体含浸部材1 (第1部分) とした。

[0054] (c) 抗原および金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位

幅25mm、長さ300mmのニトロセルロース膜をクロマトグラフ媒体のクロマト展開用膜担体2 (第2部分) として用意した。

[0055] モノクローナル抗体SA-1 1.5mg/mLが含有されてなる溶液を、このクロマト展開用膜担体2におけるクロマト展開開始点側の末端から10mmの位置に1 μ L/cmでライン状に塗布して、これを50 $^{\circ}$ Cで30分間乾燥し、その後、0.5%スクロース溶液に30分浸し、一晚室温で乾燥させた。Staphylococcus aureus リボソームタンパク質 L7/L12抗原と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位3とした。

[0056] (d) イムノクロマトグラフ装置の作製

上記標識抗体含浸部材1、上記クロマト展開用膜担体2の他に、試料添加用部材4と脂肪球除去用部材 (第3部分) 7とを兼ねる部材として綿布と、吸収用部材5として濾紙を用意した。そして、これらの部材を基材6 (厚さ254 μ m、ポリスチレン製で部材を貼り合わせるための粘着材がついたもの) に貼り合せた後、5mm幅に切断し、図1に断面図を示したイムノクロマトグラフ

装置を作成した。試料添加用部材4には表2に示す部材を用いた。

[0057] [表2]

試料添加用部材 (メーカー)	保持粒子サイズ (μm)	材料	厚み (μm)
GF/B (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	1.0	ガラス繊維	980
GF/AVA (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	1.7	ガラス繊維	299
MF1 (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	2	ガラス繊維	357
VF1 (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	2.5	ガラス繊維	701
VF2 (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	3	ガラス繊維	764
GF/DVA (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	3.5	ガラス繊維	776
NE107 (旭化成せんい)	数 10～数 100	セルロース	410
UR601 (旭化成せんい)	数 10～数 100	セルロース	520

[0058] (2) 試験

イムノクロマトグラフ装置による牛の乳汁の測定は、マイクロチューブに黄色ブドウ球菌が検出された生乳サンプルを $100\mu\text{l}$ 分取し、添加液（終濃度 1% Tween20、0.05M NaCl、0.1M MOPS0 pH7.5） $150\mu\text{l}$ を加えて混合した。同混合溶液に上記（1）で得られたイムノクロマトグラフ装置を試料添加用部材4から浸漬してラテラルフロー方式でクロマト展開し、展開液が吸収用部材5まで流れるか検討した。

[0059] 結果を表3に示す。+は展開液が吸収用部材5まで流れたことを示し、-は途中で停止したことを示す。保持粒子サイズが $3.5\mu\text{m}$ までの部材のみ液が吸収用部材5まで流れた。それ以外はクロマト展開用膜担体2の途中で液流れが停止した。

[0060] [表3]

試料添加用部材 (メーカー)	結果
GF/B (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	+
GF/AVA (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	+
MF1 (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	+
VF1 (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	+
VF2 (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	+
GF/DVA (GE ヘルスケアバイオサイエンス)	+
NE107 (旭化成せんい)	-
UR601 (旭化成せんい)	-

[0061] 実施例2：イムノクロマトグラフ法による乳汁中の黄色ブドウ球菌*Staphylococcus aureus*の検出

(1) イムノクロマトグラフ装置の作製

実施例1に記載の方法により、図1記載のイムノクロマトグラフ装置を作製した。試料添加用部材4と脂肪球除去用部材（第3部分）7とを兼ねる部材としては表2に記載のGF/DVAを用いた。

[0062] (2) 試験

イムノクロマトグラフ装置による牛乳汁の測定は、マイクロチューブに生乳サンプル1～6を100 μ l分取し、添加液（終濃度1% Tween20、0.05M NaCl、0.1M MOPS0 pH7.5）150 μ lを加えて混合した。同混合溶液に上記イムノクロマトグラフ装置を試料添加用部材4から浸漬して、ラテラルフロー方式で室温で15分静置して展開後、上記捕捉部位3で捕捉されたリボソームタンパク質L7/L12抗原と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉の有無を捕捉量に比例して増減する赤紫色のラインの有無により目視で判定した。

[0063] 一方、乳汁中の*Staphylococcus aureus*の有無を確認するために、培養法にて検出を行った。トリプチケースソイII5%ヒツジ血液寒天培地（日本ベクトンデッキンソン社製）および*Staphylococcus aureus*選択培地X-SA寒天培地（ニッスイ社製）に乳汁を100 μ l播種後、37℃で24時間培養し、出現したコロニーを確認した。

[0064] 目視判定結果および培養結果を表4に示す。培養結果においては、+は黄色ブドウ球菌のコロニーが認められたことを示し、-は認められなかったことを示す。また、キット判定結果においては、+は赤紫色のラインが目視できたことを示し、-は目視できなかったことを示す。

[0065]

[表4]

サンプル番号	培養結果 (検出菌)	キット判定結果
1	—	—
2	—	—
3	— (レンサ球菌)	—
4	— (レンサ球菌)	—
5	＋ (黄色ブドウ球菌)	＋
6	＋ (黄色ブドウ球菌)	＋

[0066] 乳汁中から何も細菌が検出されなかった2検体についてはラインが出現しなかった。また、レンサ球菌が検出された2検体についてもラインが出現しなかった。一方、黄色ブドウ球菌 *Staphylococcus aureus* が検出された検体についてはラインが出現し、黄色ブドウ球菌を検出することができた。

[0067] 以上のように、本発明のイムノクロマトグラフ装置を使用することで、乳脂肪球が存在する乳汁において、メンブレンが目詰まりすることなく乳汁サンプルを展開させ、正確に測定を行うことが可能となった。

[0068] 実施例3：イムノクロマトグラフ法による高濃度乳汁の測定

実施例1に記載の方法により、図1記載のイムノクロマトグラフ装置を作製し、乳汁の割合を変えた場合の液流れを確認した。試料添加用部材は表3に記載のものを使用した。生乳サンプルと添加液を割合を変えて混合し（添加液終濃度 1% Tween 20、0.05M NaCl、0.1M MOPS O pH7.5、総液量250 μ l）、イムノクロマトグラフ装置を試料添加用部材から浸漬してラテラルフロー方式でクロマト展開し、液が全量展開されるか否かを検討した。

[0069] 結果を表5に示す。＋は展開液が吸収用部材5まで流れたことを示し、－は途中で停止したことを示す。乳汁割合が50%の場合は、VF1以外の試料添加

用部材で液が吸収用部材 5 まで全量流れた。乳汁割合を70%にした場合は、いずれの試料添加用部材を用いてもクロマト展開用膜担体 2 の途中で液流れが停止、または、吸収用部材5まで到達した場合でも、液流れが停止し、正しく測定できない結果となった。

[0070] [表5]

試料添加用部材（メーカー）	結果（乳汁割合、%）	
	50	70
GF/AVA（GE ヘルスケアバイオサイエンス）	+	—
MF1（GE ヘルスケアバイオサイエンス）	+	—
VF1（GE ヘルスケアバイオサイエンス）	—	—
VF2（GE ヘルスケアバイオサイエンス）	+	—
GF/DVA（GE ヘルスケアバイオサイエンス）	+	—

[0071] つぎに、試料添加用部材を2枚重ね合わせ、同様の検討を行った。図3に示すように2枚の試料添加用部材を重ね合わせた。試料添加用部材としてGF/AVAおよびGF/DVAを使用した。GF/ DVAを上流側（試料添加用部材 4）GF/AVAを下流側（脂肪球除去用部材 7）に配置し、使用する長さを変えて検討した。乳汁割合は80%とし、液量は250 μ lとした。結果を表6に示す（表中の「長さ」及び「重なり」は図3を参照）。+は展開液が吸収用部材 5 まで流れたことを示す。乳汁割合を80%にしても、液流れが停止せずに正しく測定することができた。さらに、2枚の試料添加用部材の長さを変えても正しく測定することができた。

[0072]

[表6]

試料添加用部材			測定結果
長さ (mm)		重なり (mm)	
GF/DVA	GF/AVA		
25	10	5	+
20	15	5	+
15	20	5	+
10	25	5	+
30	25	25	+
21	25	16	+
16	25	11	+
25	10	5	+
25	15	10	+
25	20	15	+

[0073] 以上のように、保持粒子サイズの異なる2種類の試料添加用部材を組み合わせることで、高濃度の乳汁を用いた場合でも乳脂肪球を除去でき、メンブレンが目詰まりすることなく乳汁サンプルを展開させ、高感度かつ正確に測定を行うことが可能となった。

[0074] 実施例4：酵素免疫測定法（ELISA）による黄色ブドウ球菌の検出における溶菌酵素の効果

（a）リボゾームタンパク質L7／L12に対するモノクローナル抗体の作製
実施例1記載のモノクローナル抗体SA-1とSA-2とを使用した。

（b）ELISAによる溶菌酵素の効果の確認

溶菌酵素の効果については以下のように確認した。

黄色ブドウ球菌を表7に示す界面活性剤または溶菌酵素を用いて10 mM Tris-HCl (pH 8.0) により調整し、37℃で20分間処理した後、実施例1（a）と同様のELISAにて吸光度を測定した。黄色ブドウ球菌は生理食塩水にて調整し、終濃度は 2.5×10^5 (cells/ml) とした。陰性コントロールとしてリン酸生理緩衝溶液（PBS）を用いた。陽性コントロールとしては非イオン性界面活性剤Triton X-1

〇〇を用いた。終濃度は１％とし、室温で一晩処理した。

[0075] [表7]

界面活性剤または溶菌酵素	種類	メーカー	使用濃度（終濃度）
PBS	緩衝溶液	和光純薬工業	—
TritonX-100	界面活性剤	SIGMA	1.0%
リゾチーム	溶菌酵素	和光純薬工業	5 (μg/ml)
アクロモペプチダーゼ	溶菌酵素	和光純薬工業	5 (μg/ml)
リゾスタフィン	溶菌酵素	和光純薬工業	5 (μg/ml)

[0076] 結果を図4に示す。

陰性コントロールとして用いたPBSと比べて、界面活性剤、及び何れの溶菌酵素においても吸光度が高くなった。一般的な溶菌剤として用いられる界面活性剤TritonX-100と比べると、自己溶菌酵素であるアクロモペプチダーゼおよびリゾスタフィンを用いた場合において吸光度が約2倍高くなった。

[0077] 実施例5：乳汁を用いた溶菌酵素の効果

実施例4において高い溶菌効果が見られたアクロモペプチダーゼ（和光純薬工業）およびリゾスタフィン（和光純薬工業）を用いて、牛乳汁中に添加した黄色ブドウ球菌のELISAによる測定を行った。牛乳汁は市販の飲用品を用い、0～80％の割合（残部は10 mM Tris-HCl (pH 8.0)）とし、黄色ブドウ球菌は生理食塩水にて調整し、終濃度 1×10^5 (cells/ml)とした。アクロモペプチダーゼおよびリゾスタフィンは10 mM Tris-HCl (pH 8.0)を用いて調整し、終濃度5 (μg/ml)となるように黄色ブドウ球菌溶液と混合した。ELISAによる測定は実施例4に準じた。

[0078] 結果を図5に示す。アクロモペプチダーゼを用いた場合は、乳汁割合の増加に伴い吸光度が低下した。一方、リゾスタフィンを用いた場合は、乳汁割合に関係なく吸光度が一定となり、アクロモペプチダーゼは高濃度の乳汁存在下では十分な効果が見られない結果となった。

[0079] 実施例6：イムノクロマトグラフ法による乳汁中の黄色ブドウ球菌の検出

(1) イムノクロマトグラフ装置の作製

イムノクロマトグラフ装置は以下のように作製した。

(a) 金コロイド標識含浸部材

実施例1記載の金コロイド標識含浸部材を使用した。

(b) 抗原および金コロイド標識抗体との複合体の捕捉部位

実施例1と同様に作製した。

[0080] (c) イムノクロマトグラフ装置の作製

上記標識抗体含浸部材1、上記クロマト展開用膜担体2の他に、試料添加用部材4と脂肪球除去用部材(第3部分)7とを兼ねる部材としてGF/DVA(GEヘルスケアバイオサイエンス製:ガラス繊維からなる、厚み776 μ m、保持粒子サイズ3.5 μ mのフィルター部材)と、吸収用部材5として濾紙を用意した。そして、これらの部材を基材6(厚さ254 μ m、ポリスチレン製で部材を貼り合わせるための粘着材がついたもの)に貼り合せた後、5mm幅に切断し、図6に断面図を示したイムノクロマトグラフ装置を作製した。

[0081] (2) 試験

イムノクロマトグラフ装置による牛乳汁の測定は以下のように行った。

マイクロチューブに既知量の黄色ブドウ球菌を添加した乳汁を100 μ l分取し、添加液(終濃度1% Triton X-100、5 μ g/ml リゾスタフィン、0.1M MOPSO pH7.5)150 μ lを加えて室温で混合した。牛乳汁は市販の飲用品を用いた。比較としてリゾスタフィンを混合していない添加液(終濃度1% Triton X-100、0.1M MOPSO pH7.5)についても検討に用いた。同混合溶液に上記イムノクロマトグラフ装置を試料添加用部材4から浸漬して、ラテラルフロー方式で室温で30分静置して展開後、上記補足部位3で補足されたりボソームタンパク質L7/L12抗原と金コロイド標識抗体との複合体の捕捉の有無を捕捉量に比例して増減する赤紫色のラインを装置FASTKITイムノクロマトリーダー DiaScan 20-A(日本ベクトンデッキンソン

社製)により定量した。

[0082] 結果を図7に示す。リゾスタフィンを添加した添加液を用いた場合、リゾスタフィンにかえてTriton X-100を添加した添加液と比べて、低濃度側に曲線がシフトする結果となり、約10倍高感度に黄色ブドウ球菌を検出できることが明らかとなった。

[0083] 実施例7：イムノクロマトグラフ法による乳汁サンプルの測定

イムノクロマトグラフ装置は実施例6に準じて作製した。

マイクロチューブに黄色ブドウ球菌が検出された生乳サンプルを100 μ l分取し、添加液150 μ lを加えて室温で混合した。添加液は実施例6に記載の2種類を用いた。実施例6に準じて測定後、出現した赤紫色のラインを目視により判定した(陽性+、陰性-)。

[0084] 一方、乳汁中の黄色ブドウ球菌の数を確認するために、培養法にて定量を行った。トリプチケースソイ115%ヒツジ血液寒天培地(日本ベクトンデッキンソン社製)およびStaphylococcus aureus選択培地X-SA寒天培地(ニッスイ社製)に乳汁を100 μ l播種後、37℃で24時間培養し、出現したコロニーを計数した。

[0085] 培養法によって算出した黄色ブドウ球菌の数およびイムノクロマト法による判定結果を表8に示す。リゾスタフィンを添加していない場合、 1×10^4 (cfu/ml)以下では黄色ブドウ球菌を検出できなかったが、リゾスタフィンを添加することによって 5×10^3 まで検出することが可能となった。

[0086]

[表8]

サ ン プ ル 番 号	黄色ブドウ球菌数 (cfu/ml)	キット測定結果	
		リゾスタフィン 有り	リゾスタフィン なし
1	5×10^3	+	-
2	1×10^4	+	-
3	1×10^4	+	-
4	1×10^4	+	-
5	1×10^4	+	-
6	1×10^5	+	+

産業上の利用可能性

[0087] 本発明は、家畜の感染症診断に利用することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 乳汁中の特定物質を検出するためのイムノクロマトグラフ方法であって、
- (1) 該特定物質に対する標識された第一の抗体または標識された該特定物質が保持された第1部分と、該第1部分の下流に連結され、かつ該特定物質に対する第二の抗体が固定化された第2部分と、該第1部分又は該第2部分の上流に連結され、かつ該乳汁中の乳脂肪球を除去できる空隙を有する第3部分とを有する試験片に対して、該乳汁を該第3部分又はそれより上流部に接触させる工程；及び
- (2) 該乳汁を該第2部分又はそれより下流部まで流し、該第2部分又はそれより下流部で該標識による検出可能な信号を得る工程；を含む、上記方法。
- [請求項2] イムノクロマトグラフ方法がラテラルフロー型である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 該第1部分に、該特定物質に対する標識された第一の抗体が保持されている、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 特定物質が、細菌の成分又は該細菌が分泌する物質である、請求項1から3の何れかに記載の方法。
- [請求項5] 第一の抗体、及び第二の抗体の少なくとも片方が、モノクローナル抗体である、請求項1から4の何れかに記載の方法。
- [請求項6] 第一の抗体及び第二の抗体が、それぞれモノクローナル抗体である、請求項5に記載の方法。
- [請求項7] 第3部分の空隙の保持粒子サイズが1～3.5 μm である、請求項1から6の何れかに記載の方法。
- [請求項8] 第3部分がそれぞれ異なる粒子サイズの乳脂肪球を除去できる空隙を有する2種以上の部材により構成される、請求項1から7の何れかに記載の方法。
- [請求項9] 第3部分が下流に配置された第一の部材、及び上流に配置された第二

の部材により構成され、第二の部材の保持粒子サイズが第一の部材の保持粒子サイズより大きい、請求項 8 に記載の方法。

[請求項10] 第一の部材の保持粒子サイズが 1.0～2.0 μm であり、第二の部材の保持粒子サイズが 3.0～3.5 μm である、請求項 9 に記載の方法。

[請求項11] 溶菌酵素による処理を経た該乳汁を第 2 部分又はそれより下流部まで流す工程を含む、請求項 1 から 10 の何れかに記載の方法。

[請求項12] 溶菌酵素が自己溶菌酵素である、請求項 11 に記載の方法。

[請求項13] 溶菌酵素としてリゾスタフィンを用いて該乳汁中のブドウ球菌を検出する、請求項 11 に記載の方法。

[請求項14] 家畜の乳房炎の原因菌がブドウ球菌であるか否かを診断する方法であって、

乳房炎に罹患した家畜から原因菌を含む乳汁を得る工程、該乳汁中に溶菌酵素を混合することにより該原因菌の菌体内に存在する特定物質を菌体外に放出させる工程、及び該特定物質を抗原とする抗体を用いた免疫学的方法によって外特定物質の存在の有無または存在量を測定する工程を含む診断方法。

[請求項15] 溶菌酵素としてリゾスタフィンを用いて原因菌がブドウ球菌であるか否かを診断する、請求項 14 に記載の方法。

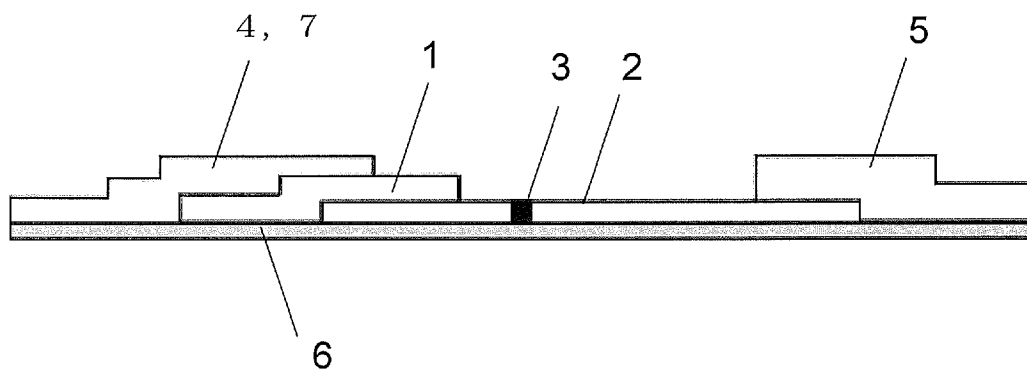
[請求項16] 該特定物質に対する標識された第一の抗体または標識された該特定物質が保持された第 1 部分と、該第 1 部分の下流に連結され、かつ該特定物質に対する第二の抗体が固定化された第 2 部分と、該第 1 部分又は該第 2 部分の上流に連結され、かつ該乳汁中の乳脂肪球を除去できる空隙を有する第 3 部分とを有する試験片を含む、乳汁中の特定物質を検出するためのイムノクロマトグラフ装置。

[請求項17] 第 1 部分または第 2 部分に、溶菌酵素または界面活性剤が保持される、請求項 16 に記載のイムノクロマトグラフ装置

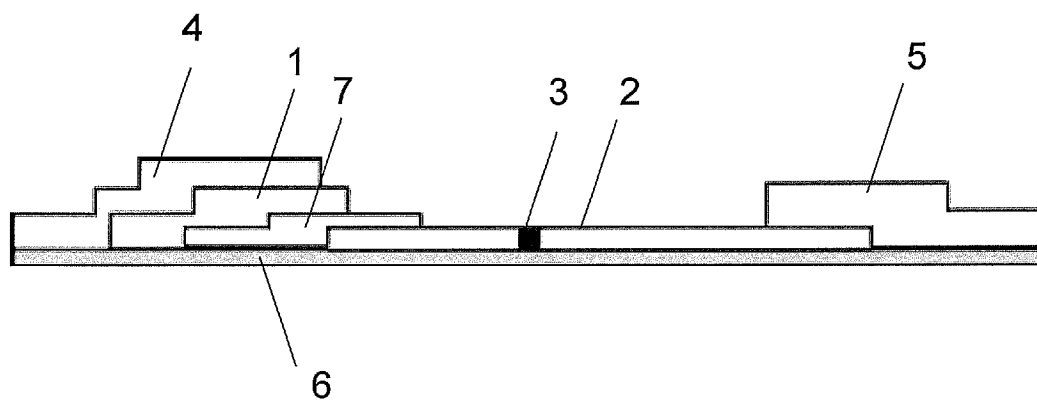
[請求項18] 溶菌酵素または界面活性剤を含む添加液と、請求項 16 に記載のイム

ノクロマトグラフ装置とからなる検出キット。

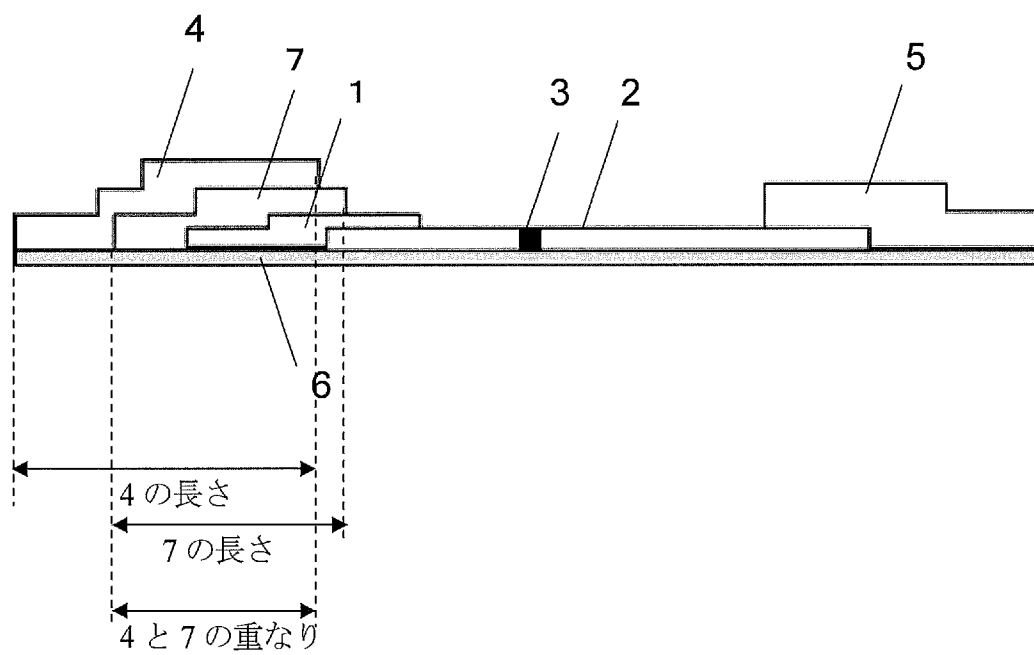
[図1]



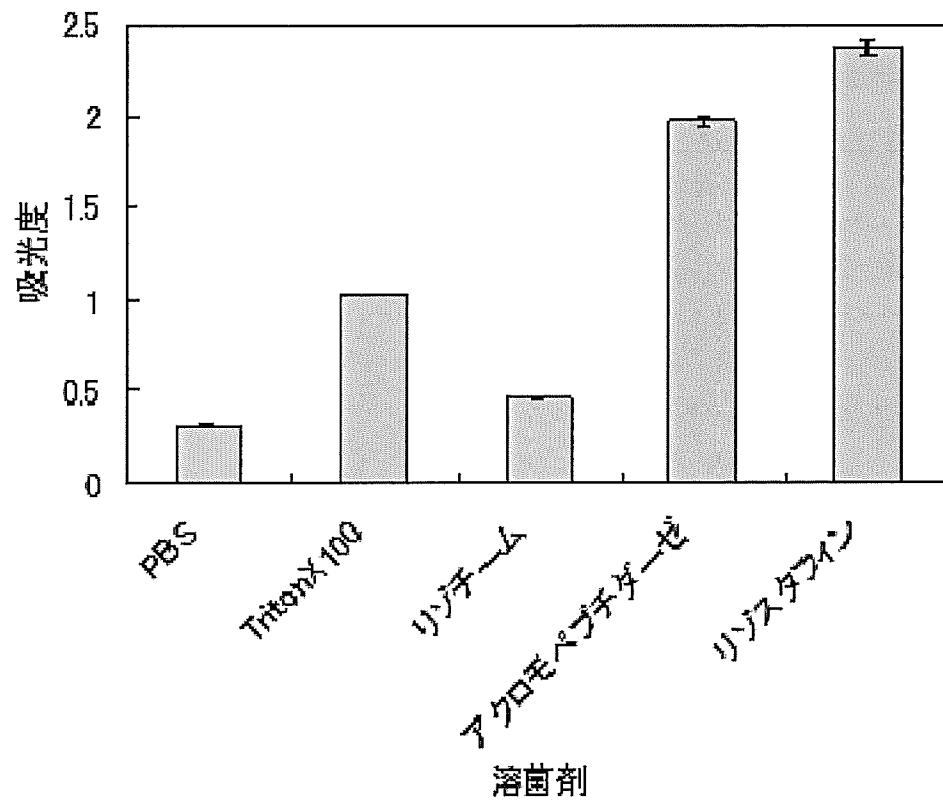
[図2]



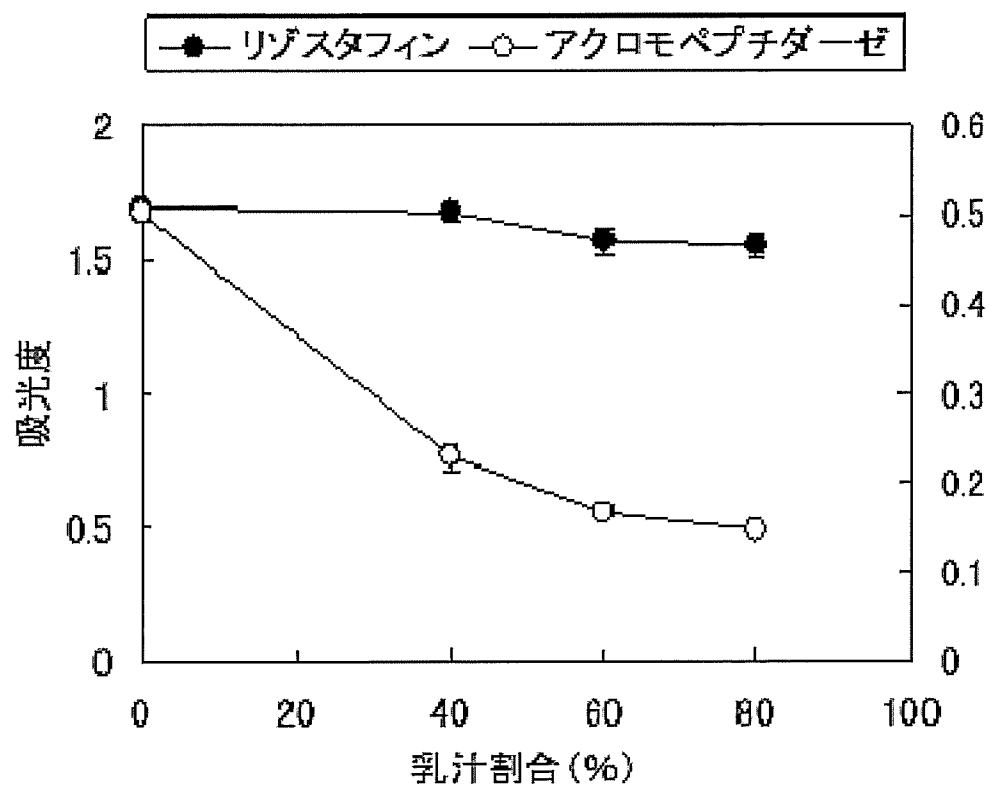
[図3]



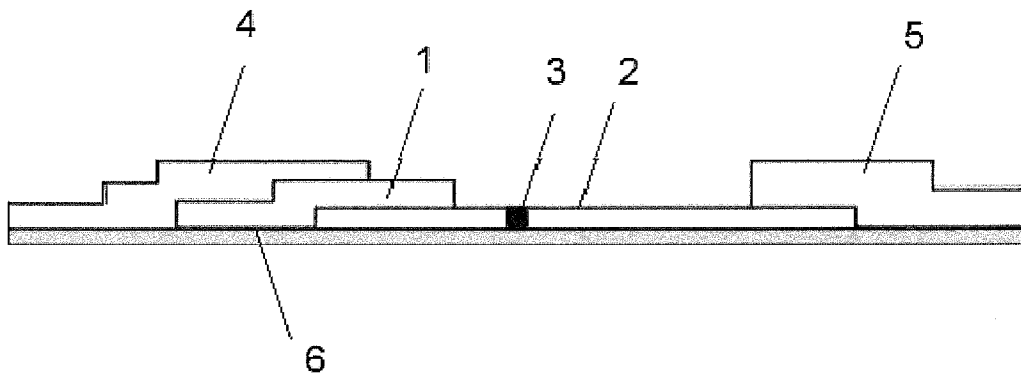
[図4]



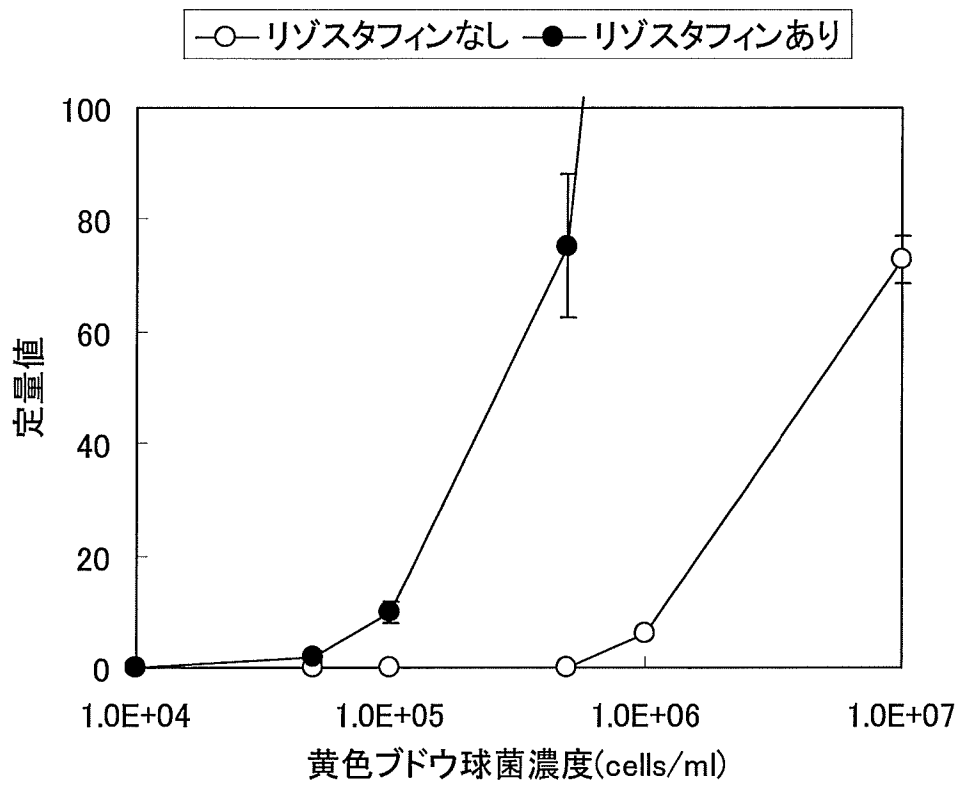
[図5]



[図6]



[図7]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/065150

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01) i, G01N33/569(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543, G01N33/569

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2012
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2012	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2012

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/121794 A1 (Denka Seiken Co., Ltd.), 22 December 2005 (22.12.2005), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0005], [0039] to [0050] & JP 4758341 B & US 2008/0194013 A1 & EP 1767941 A1 & EP 2063269 A2 & DE 602005024965 D & KR 10-2007-0026782 A & CN 101002095 A & AT 489625 T	1-18
A	JP 11-028099 A (Kikkoman Corp.), 02 February 1999 (02.02.1999), entire text (Family: none)	1-18

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 August, 2012 (21.08.12)

Date of mailing of the international search report
28 August, 2012 (28.08.12)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2012/065150

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2008-524582 A (Kimberly-Clark Worldwide, Inc.), 10 July 2008 (10.07.2008), entire text; all drawings & US 2006/0127886 A1 & EP 1825266 A & WO 2006/065314 A1 & KR 10-2007-0090190 A & CN 101076731 A & MX 2007007119 A	1-18

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（I P C））
Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（I P C））

Int.Cl. G01N33/543, G01N33/569

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 2 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 2 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 2 年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	WO 2005/121794 A1 (デンカ生研株式会社) 2005.12.22, 全文・全図、特に、 【特許請求の範囲】、段落【0005】、【0039】-【0050】等参照 & JP 4758341 B & US 2008/0194013 A1 & EP 1767941 A1 & EP 2063269 A2 & DE 602005024965 D & KR 10-2007-0026782 A & CN 101002095 A & AT 489625 T	1-18
A	JP 11-028099 A (キッコーマン株式会社) 1999.02.02, 全文等参照（ファミリーなし）	1-18

☒ C 欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

2 1 . 0 8 . 2 0 1 2

国際調査報告の発送日

2 8 . 0 8 . 2 0 1 2

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁（I S A / J P）

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官（権限のある職員）

草川 貴史

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2

2 J

4 0 7 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2008-524582 A (キンバリー クラーク ワールドワイド インコーポ レイテッド) 2008.07.10, 全文・全図等参照 & US 2006/0127886 A1 & EP 1825266 A & WO 2006/065314 A1 & KR 10-2007-0090190 A & CN 101076731 A & MX 2007007119 A	1-18