



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106461651 A

(43)申请公布日 2017.02.22

(21)申请号 201580029641.2

(22)申请日 2015.06.04

(30)优先权数据

2014-116036 2014.06.04 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.12.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2015/066268 2015.06.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/186812 JA 2015.12.10

(71)申请人 田中贵金属工业株式会社

地址 日本东京

(72)发明人 铃木启太 岩本久彦

(74)专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112

代理人 张苏娜 常海涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

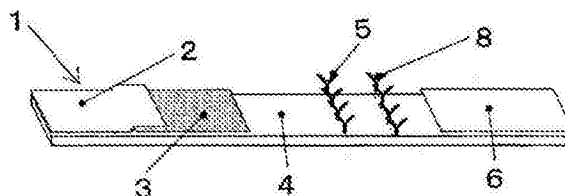
权利要求书1页 说明书16页 附图1页

(54)发明名称

免疫学的测定试剂的前带现象的消除法

(57)摘要

本发明以提供在大量过剩存在抗原的检体中,抑制/消除夹心法引起的前带现象的免疫层析检测方法及免疫层析试剂盒作为课题,通过在免疫层析装置的试样添加部中保持HLB值为14至18的非离子性且亲水性表面活性剂,且作为层析介质使用的膜,使用流速快的膜来解决。



1. 一种用于检测检体中的检测对象物的免疫层析装置,其由试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质以及吸收部构成,其中,

在所述试样添加部中保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂,且作为所述层析介质中使用的膜,使用流速快的膜。

2. 一种用于检测检体中的检测对象物的免疫层析试剂盒,其由试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质以及吸收部构成,其中,

在所述试样添加部中保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂,且作为层析介质中使用的膜,使用流速快的膜。

3. 根据权利要求2所述的免疫层析试剂盒,其中,

膜的流速以高流率(sec/40mm)表示且为75以下。

4. 根据权利要求2或3所述的免疫层析试剂盒,其中,

在试样添加部及标记物质保持部两者中保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂。

5. 根据权利要求2至4中任一项所述的免疫层析试剂盒,其中,

对于非离子性且亲水性表面活性剂的含量,单位面积的免疫层析试剂盒的试样添加部或试样添加部及标记物质保持部两者为0.1至 $5\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 。

6. 根据权利要求2至5中任一项所述的免疫层析试剂盒,其中,

在标记物质保持部中干燥保持有利用金纳米粒子进行了修饰的标记物质。

7. 根据权利要求6所述的免疫层析试剂盒,其中,

金纳米粒子的平均粒径为20至60nm。

8. 一种免疫层析检测法,其包括:在试样添加部添加检体的工序、通过保持在标记物质保持部的利用金纳米粒子进行了修饰的标记物质识别检测对象物的工序、使标记物质和检测对象物的复合体作为移动相展开的工序以及在检测部检测所展开的移动相中的检测对象物的工序,其中,至少在试样添加部中保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂,且作为层析介质中使用的膜,使用流速快的膜。

9. 根据权利要求8所述的免疫层析检测法,其中,

金纳米粒子的平均粒径为20至60nm。

10. 根据权利要求8或9所述的免疫层析检测法,其中,

检体为生物体试样。

11. 根据权利要求8至10中任一项所述的免疫层析检测法,其中,

检测对象物为肽类激素。

12. 根据权利要求8至11中任一项所述的免疫层析检测法,其中,

在试样添加部及标记物质保持部两者中保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂。

免疫学的测定试剂的前带现象的消除法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫层析试剂盒、其使用的试剂组合物或检测方法,其中所述免疫层析试剂盒作为利用免疫学的抗原抗体反应,迅速、简便且正确地检测大量过剩存在被检测物(抗原等)的检查试样中的被检测物(抗原等)的体外诊断试剂盒或便携用诊断装置,重要性高。

[0002] 特别是涉及通过消除在检测大量过剩存在被检测物(抗原等)的检查试样(例如尿、血液之类的检查试样)中的被检测物(抗原等)时发生的前带现象,从而提高检查效率及检查精度的检查方法及其使用的诊断试剂盒。

背景技术

[0003] 近年来,在免疫层析法用条带形式的免疫测定中,作为利用抗体具有的特有的反应性来检测试样液体中的被检测物(抗原等)的简便的体外诊断试剂盒或便携用诊断装置,通用性日益提高。

[0004] 然而,在通过抗体把被检测物(抗原等)夹在中间进行检测的免疫层析检测法中,在检查试样中存在大量过剩的被检测物(抗原等)的情况下,表面上看,会引起被检测物少或完全不存在这样的假阴性现象(也被称为前带现象或高剂量钩状效应),不仅降低检测时的S/N比,而且造成错误的检查结果,这样的问题点是众所周知的,用于消除该前带现象的研究一直在进行。

[0005] 为了克服该问题点,在利用亲和层析的原理的免疫层析法中,开发了将被检测物(抗原等)用其抗体和与微粒结合的抗体夹在中间进行检测的夹心法;通过使被检测物(抗原等)或同等物在色谱载体上固定化,使其与被检测物(抗原等)互相竞争而抑制上述夹心法中特有的前带现象,从而确保判定的客观性这样的方法,除此之外,开发了通过具备自由的抗体而消除前带现象的技术。

[0006] 例如,在免疫学的定量装置中,通过设定试样添加部、在其下游设定标记化反应体涂敷部、在其更下游设定将目标物质(被检测物)或其同等的物质固定化的部位、在其更下游设定将多个抗体以阶梯状固相化的部位,而在色谱载体上进行竞争反应,并且通过以阶梯状具备多个自由的抗体,从而抑制/消除了前带现象。而且,提案有通过根据固相化抗体中的反应线的条数或其显色图形进行判定,可以客观且用一步就迅速地测定的定量装置(参照专利文献1)。

[0007] 另外,在亲合层析检测法中,提案有下述方法:在展开载体上设置固定有与检测对象物质特异性结合的物质第一检测区域及固定有检测对象物质竞争物质的第二检测区域,使含有由标记物质标记且与检测对象物质特异性结合的物质和试样的展开液体从这些检测区域通过并展开,基于第一及第二检测区域的信号而检测物质,由此,不易产生假阴性,避免了前带的出现(参照专利文献2)。

[0008] 而且,作为用于消除前带现象的另外的方法,提案有提供具有扩大的动态范围的试验条及使用它的检测方法,由此,不必将样本稀释就可以进行前带样本的检测。

[0009] 例如,在专利文献3中,提案有下述方法:一种层析条,其具备第1末端及第2末端,所述层析条至少包含第1反应区域和第2反应区域,各反应区域含有特异性结合分析物的捕获剂,且在第1末端含有吸收垫,通过该吸收垫,可进行样本的侧方流动,由此,基于第1反应区域的信号强度,或由第1反应区域、第2反应区域或它们的组合的信号强度而检测测定捕获剂能够结合分析物的至少一部分的试验条及分析物的存在(参照专利文献3)。

[0010] 但是,在利用不溶性载体(金胶体粒子、着色乳胶粒子等)标记抗体的免疫层析法(也称为“粒子免疫层析法”)的情况下,作为消除前带现象的现有技术的方法,具有以下这样的优点:通过阶梯状加入多个自由的抗体或设置第2或其以上的检测区域,由此,对于检测对象物质(抗原等)大量过剩存在的高浓度检体试样,根据反应线的条数或其显色图形可以进行定量判定,另一方面,存在低浓度检体的显色变弱、或自由的抗体改性、前带现象对策效果经时性地削弱这样的问题点。

[0011] 另外,作为消除前带现象的现有技术的方法,主要是对于大量过剩存在的检测对象物质,阶梯状加入多个自由的抗体,或除了标准的第1检测区域之外,还设有第2或其以上的检测区域,通过综合判断这些信号,能够客观地进行检测对象物质的判定/测定。

[0012] 但是,由于检测线有多条,检测区域至少有两个,因此存在判定基准不简单,怎么都比较复杂,无论是谁都容易出差错这样的问题点,渴望可以简单地进行判定的方法。

[0013] 现有技术文献

[0014] 专利文献

[0015] 专利文献1:日本特开平10-185921号公报

[0016] 专利文献2:日本特开2004-85425号公报

[0017] 专利文献3:日本特表2012-524277号公报

发明内容

[0018] 发明所要解决的课题

[0019] 本发明的目的涉及免疫层析试剂盒、其使用的试剂组合物或检测方法,其中在利用免疫学的抗原抗体反应,通过抗体将大量过剩存在被检测物(抗原等)的检查试样(也称为“检体”)中的被检测物(抗原等,以下也称为检测对象物)夹在中间进行检测的方法中,所述免疫层析试剂盒作为可以抑制/消除前带现象而迅速、简便且正确地进行检测的体外诊断试剂盒或便携用诊断装置,其重要性高。

[0020] 另外,本发明的目的在于,提供一种免疫层析装置,其中对于在免疫层析试剂中大量过剩存在抗原的检体,通过使用改良的部件,从而抑制/消除在夹心法中引起的前带现象。

[0021] 另外,更详细而言,本发明的目的涉及通过抑制/消除在检测大量过剩存在被检测物(抗原等)的检查试样(例如尿、血液之类的生物体试样)中的被检测物(抗原等)时引起的前带现象,从而提高检查效率及检查精度的检查方法及其使用的诊断试剂盒。

[0022] 用于解决课题的技术方案

[0023] 众所周知,对于在免疫层析试剂中大量过剩存在抗原的检体,不与显色载体结合的抗原会被涂敷在膜上的测试线抗体捕获,引起测试线不显色而被判断为假阴性的现象(前带现象)。

[0024] 本发明人等初次发现,通过至少在试样添加部干燥保持特定的非离子性表面活性剂,且使用流速(展开速度)快的膜作为层析介质使用的膜,可以抑制/消除该现象。

[0025] 本发明的检测系统提供免疫测定用试剂、免疫测定方法及免疫层析试剂盒等,其中,通过使用含有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂作为特定的非离子性表面活性剂的部件,且使层析介质中使用的膜的高流率(High Flow Rate:将水吸取4cm所花费的时间(sec/40mm))为75(sec/40mm)以下,由此消除了前带现象,可以正确、容易且迅速地检查大量过剩存在抗原的检体。

[0026] 本发明提供下述(1)至(12)的使用免疫层析法的免疫层析装置、免疫层析试剂盒及使用其的免疫层析检测法。

[0027] 本发明的免疫层析装置具有如下特征。

[0028] (1) 本发明的第1特征在于,一种用于检测检体中的检测对象物的免疫层析装置,其由试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质及吸收部构成,其中,至少在试样添加部保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂,且作为层析介质中使用的膜,使用流速快的膜。

[0029] 作为使用本发明的免疫学的检测法的检测试剂盒(也称为“免疫层析试剂盒”)具有如下特征。

[0030] (2) 本发明的第2特征在于,一种用于检测检体中的检测对象物的免疫层析试剂盒,其由试样添加部、标记物质保持部、具有检测部的层析介质及吸收部构成,其中,至少在试样添加部保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂,且作为层析介质中使用的膜,使用流速快的膜。

[0031] (3) 本发明的第3特征在于免疫层析试剂盒,其中,膜的流速以高流率(sec/40mm)表示且为75以下。

[0032] (4) 本发明的第4特征在于免疫层析试剂盒,其中,在试样添加部及标记物质保持部两者中保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂。

[0033] (5) 本发明的第5特征在于免疫层析试剂盒,其中,对于非离子性且亲水性表面活性剂的含量,每单位面积的免疫层析试剂盒的试样添加部或试样添加部及标记物质保持部两者为0.1至5 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 。

[0034] (6) 本发明的第6特征在于免疫层析试剂盒,其中,在标记物质保持部干燥保持有利用金纳米粒子进行了修饰的标记物质。

[0035] (7) 本发明的第7特征在于免疫层析试剂盒,其中,金纳米粒子的平均粒径为20至60nm。

[0036] 作为本发明的免疫层析检测法,具有如下的特征。

[0037] (8) 本发明的第8特征在于,一种免疫层析检测法,其包括:在试样添加部添加检体的工序、通过保持在标记物质保持部的利用金纳米粒子进行了修饰的标记物质识别检测对象物的工序、使标记物质和检测对象物的复合体作为移动相展开的工序以及在检测部检测展开的移动相中的检测对象物的工序,其中,至少在试样添加部保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂,且作为层析介质中使用的膜,使用流速快的膜。

[0038] (9) 本发明的第9特征在于免疫层析检测法,其中,金纳米粒子的平均粒径为20至60nm。

[0039] (10) 本发明的第10特征在于免疫层析检测法,其中,检体是生物体试样。

[0040] (11) 本发明的第11特征在于免疫层析检测法,其中,检测对象物为肽类激素。

[0041] (12) 本发明的第12特征在于免疫层析检测法,其中,在试样添加部及标记物质保持部两者中保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂。

[0042] 本发明通过具有以上的特征,可以实现上述的课题。

[0043] 发明效果

[0044] 在本发明中,在利用免疫学的抗原抗体反应,通过抗体将大量过剩存在被检测物(抗原等)的检查试样(也称为“检体”)中的被检测物(抗原等)夹在中间进行检测的方法中,通过至少在试样添加部(也称为“样本垫”)保持HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂,且作为层析介质中使用的膜,使用流速(展开速度)快的膜,由此,可以明显消除前带现象(尽管抗原存在,但测试线不显色,判断为假阴性的现象)。

[0045] 因此,本发明可以提供在利用免疫学的抗原抗体反应,通过抗体将大量过剩存在被检测物(抗原等)的检查试样(也称为“检体”)中的被检测物(抗原等)夹在中间进行检测的方法中,能够迅速、简便且正确地进行检测的免疫层析装置以及作为体外诊断试剂盒或便携用诊断装置重要性高的免疫层析试剂盒,进而提供其检测方法。

[0046] 即,在本发明中,通过保持在试样添加部(也称为“样本垫”)或试样添加部及标记物质保持部(也称为“结合垫”)两者中的HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂的作用,可以使被检测物(抗原等)和标记物质快速结合。

[0047] 另外,通过使用流速(展开速度)快的膜作为层析介质中使用的膜,并且通过使用修饰抗体并用作标记物质的金胶体的粒径为20至60nm这种比较小的金胶体,虽然它们共同作用的结果、作用机制尚不明确,但被检测物(抗原等)和标记物质的复合体的形成极其迅速,且该复合体在层析介质中的移动展开非常顺畅且迅速,没有任何障碍,而且能够与测试线抗体快速结合并显色。

[0048] 作为其结果,可以提供不引起前带现象、正确且能够展开速度快地迅速、简便及高灵敏度地进行结果判定的检查试剂。例如,在检测用作检体的尿中的LH或hCG等时,不会增加结合抗体量,且没有改变被检测物(抗原等)在低浓度下的显色强度,灵敏度不会降低,并且,显著地抑制/消除了前带现象,因此判定基准易了解,能够正确地进行检查结果的判定。

附图说明

[0049] 图1是表示本发明的免疫层析装置的图。

[0050] 图2是将本发明的[表5]的数据以坐标图形式表示的图。

具体实施方式

[0051] 以下,详细地说明本发明。

[0052] 本发明的实施方式是基于如下的免疫层析法或应用它的检测法的实施方式,即,通过使各种检体中的被检测物质即检测对象物(抗原)与附加了各种标记的特异性结合的结合物质(抗体)在层析介质上进行反应的抗原-抗体反应而形成复合体,使其在免疫层析介质上向吸收部的方向展开,并通过各种检测方法对其进行确认。作为与该抗原进行最特异性反应而结合的抗体,可以任意使用与其特异性结合的例如单克隆抗体及多克隆抗体或

其它公知的抗体。

[0053] 作为其标记,可以任意使用酶、显色物质、荧光物质或放射性物质等,只要考虑操作简单、检测时间也短这样的可显出免疫层析法的特色的理由或抗体、抗原的种类确定即可。

[0054] 另外,检测方法的特征在于,为了表现操作简单、用较短时间就可以判定这样的免疫层析法的特色,具有用肉眼判定就可以正确地进行判定这样的性能,在要求时间、精度等的情况下,也可以附带分光光度检测、放射线检测等各种检测方法进行检测。

[0055] 依次说明本发明的免疫层析法可使用的免疫层析装置、免疫层析试剂盒、用于实施免疫测定法或免疫层析检测方法的最佳方式。

[0056] 所谓本发明的免疫层析装置,是在免疫测定时使用的装置,作为其一种方式,包括免疫层析试剂盒。在该免疫层析装置中,至少使试样添加部(2)含有保持有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂。

[0057] 但是,除此之外,也可以在标记物质保持部(3)以及层析介质即膜(4)中的一个以上的部位含有保持上述表面活性剂。在使试样添加部含有该非离子性且亲水性表面活性剂的情况下,具备依次移动到标记物质保持部(3)、层析介质(4)、检测部(以下,也称为判定部)(5)及吸收部(6)并进行展开的性质。

[0058] 作为本发明的免疫层析装置,在试样添加部(2)或在试样添加部(2)及标记物质保持部(3)两者中干燥保持含有HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂。

[0059] 作为本发明中可使用的特定的非离子性表面活性剂,为HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂,更优选HLB值为14至17的非离子性且亲水性表面活性剂。

[0060] 作为可使用的非离子性表面活性剂,可列举市售的Triton X100(商品名)、Brij 35(商品名)、Tween 20(商品名)、NP 40(商品名)等商品。作为特别适合的非离子性表面活性剂,可列举Brij 35(商品名)、Tween 20(商品名)等。HLB值小于13时,由于可溶化作用不充分,灵敏度变差。另一方面,HLB值超过18时,虽然可溶化作用充分,但亲水性过大,灵敏度降低。

[0061] 如果还考虑表面活性剂的浸透、可溶化的特性等,则发现HLB值为13至18左右的非离子性表面活性剂最适于本发明的免疫层析装置。本发明的非离子性表面活性剂的行为与层析介质的膜的高流率特性、进而也与金纳米粒子的特性相互协同作用,可以表现出在其它阴离子表面活性剂、阳离子表面活性剂、两性表面活性剂中未看到的特有的性质及性能。

[0062] 使本发明的试样添加部(也称为“样本垫”)或试样添加部及标记物质保持部(也称为“结合垫”)两者保持的、HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂的含量为0.10至5.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$,优选为0.15至3.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$,特别优选为0.20至1.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 。

[0063] 为小于0.10 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的含量时,流动变差,而超过5.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 时,在装置制造时的裁断或包装的收纳时,有时产生样本垫的剥离,或检测线的显色产生不匀,成为无用的。只要在0.10至5.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的范围使用,则可以和层析介质的膜的高流率特性相互协同发挥作用,进一步抑制前带现象。

[0064] 作为本发明的层析介质中使用的膜,使用流速(展开速度)快的膜。可使用高流率(High Flow Rate:将水吸取4cm所花费的时间(sec/40mm))(HFR)为75(sec/40mm)以下的膜,优选为60(sec/40mm)以下的膜,特别优选45(sec/40mm)以下的膜。

[0065] 在高流率(HFR)(High Flow Rate:将水吸取4cm所花费的时间(sec/40mm))超过75(sec/40mm)的展开速度慢的膜中,被检测物(抗原等)和标记物质的复合体与被检测物(抗原等)相比,不能在膜中快速移动,因此在大量过剩存在被检测物(抗原等)的检体的检查中,不能抑制前带现象。

[0066] 如果考虑检测需要的测定时间或精度等,可以任意设计HFR直至20(sec/40mm)左右。优选为30(sec/40mm)以上,特别优选为36(sec/40mm)以上。

[0067] 作为该膜载体的特性,推荐能够通过毛细管现象等吸收试样检体并使其移动的材料。该移动现象需要从构成膜载体的原料具有的性质、及表现膜的毛细管现象的多孔质这样的构造面仔细研究。在进行该膜载体的构造设计时,需要从原料和构造两方面仔细研究。

[0068] 不管怎样,只要是流速(展开速度)快的膜就没有特别限定。选定高流率(HFR)为75(sec/40mm)以下的载体材料,尤其是在实现抑制/消除前带现象这种目标中适合。

[0069] 例如,可以是由硝化纤维素、醋酸纤维素、纤维素等天然原料、尼龙、聚醚砜、聚乙烯醇、聚酯、聚烯烃等合成聚合物、玻璃纤维、碳纤维等无机纤维等材料制造的材料,也可以是由混合纤维构成的材料。该膜载体的使用状态例如可以从纤维、织布、无纺布、布、膜、纸、通气海绵、薄板、泡沫体、垫等任意形式中来选定,但可以考虑HFR的性能进行设计。

[0070] 该膜载体的尺寸没有特别限定,可以利用适用于这类制品的一般的尺寸,若例示,宽度3至10mm、长度2至6cm、厚度100至150 μm 的尺寸为标准尺寸。由于膜为多孔性,因此也可以是通过将不透水性的聚酯、聚乙烯等薄膜贴在一起进行裱贴或事先在不透水性的聚酯、聚乙烯等塑料薄膜上层叠硝化纤维素膜而形成的膜。该不透水性薄膜的厚度没有特别限定,100 μm 左右在处置上较理想。

[0071] 在本发明的免疫层析装置中,作为标记物质使用的金纳米粒子,优选平均粒径为10至60nm、更优选为20至60nm左右的红色金纳米粒子和/或蓝色金纳米粒子。当然,还可使用铂、银、铑、钯、锆等贵金属粒子、钛、锌、铁等平均粒径为10至60nm、优选为20至60nm左右的金属纳米粒子。

[0072] 可列举这样的金属纳米粒子处于分散状态的例如抗体、抗原形成的致敏金属胶体、致敏金胶体、致敏铂-金胶体、致敏金-银胶体、铁胶体等,但由于金胶体获得及处置容易,因此尤其推荐。平均粒径可以基于惯用的测定法来确定,即求得用动态光散射法粒度分布仪测定胶体的粒度分布后的平均粒径。

[0073] 作为本发明的检查试样(检体),没有特别限定,例如主要有生物体试样,具体而言,不仅可以列举血液、血清、血浆、尿液、唾液、汗液、脊髓液、泪液、羊水、乳头分泌液、鼻涕、痰、鼻吸液、咽拭子、洗肺胞液、来自皮肤的浸出液、直肠拭子、粪便及自组织或细胞提取的提取物等,还可以列举食品提取液、清洁水、废水、培养液等之类的试样等。在这些检体中大量过剩含有被检测物(抗原等)的情况下,特别有用,不会引起前带现象,可以简单且正确地进检查。

[0074] 作为本发明的检测对象物,没有特别限定,只要是存在或可以制造与之特异性结合的例如像抗原-抗体反应那样特异性结合的物质即可。检测对象物既可以是完全抗原这样的本身具有抗原性的检测对象物,也可以是半抗原(不完全抗原)这样的即使本身没有抗原性,通过形成为化学上的改性物而达到持有抗原性的检测对象物。和这些检测对象物特异性结合的物质只要是存在或可以制造即可,可以设定为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0075] 如果例示本发明的检测对象物,则可列举:肽类激素(生长激素(GH)、促肾上腺皮质激素(ACTH)、促黑素细胞激素(MSH)、催乳素、甲状腺刺激激素(TSH)、黄体化激素(LH)、促卵泡激素(FSH)、垂体激素、钙代谢调节激素、胰岛素、消化道激素、血管活性激素、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、雌酮等卵泡激素、孕酮等天然或合成促黄体激素、睾酮等雄性激素、皮质醇等肾上腺皮质激素、二碘甲状腺氨酸等甲状腺激素等激素、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、前列腺特异性抗原(PSA)、碱性磷酸酶、转氨酶、胰蛋白酶、胃蛋白酶原、 α -甲胎蛋白(AFP)、癌胚抗原(CEA)等的癌特异性物质、免疫球蛋白G(IgG)等血清蛋白成分、类风湿因子、血清素、尿激酶、铁蛋白、P物质、粪便隐血、梅毒抗体、流感病毒、腺病毒、轮状病毒、支原体、HBs抗原、HBs抗体、衣原体抗原、A组B链球菌抗原、胆固醇、胆汁酸、强心类固醇、皂角苷配基等其它类固醇类、肾上腺素、多巴胺、生物活性生物碱、含氨基精神治疗药、TRH等低分子肽类、前列腺素类、维生素类、青霉素等抗菌素类、其它生物体内成分、生物体内投与药物及其代谢产物等。

[0076] 作为优选的检测对象物,尤其列举黄体化激素(LH)、促卵泡激素(FSH)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、雌酮等卵泡激素、孕酮等天然或合成促黄体激素等,作为含有本发明的检测对象物的试样(检体),例如使用尿、血液等。

[0077] 本发明的免疫层析用的标记物质溶液等优选含有缓冲剂或表面活性剂,特别优选含有非离子性表面活性剂。

[0078] 作为含有的缓冲剂,没有特别限制,只要是具有以下作用(缓冲作用)的缓冲剂即可,即,即使由于试样的添加或试样的蒸发或稀释而带来的浓度的变化、以及来自外部的一些异物的混入,也不会产生致命的影响。

[0079] 在本发明中,作为缓冲剂,例如列举醋酸缓冲液(醋酸+醋酸钠)、磷酸缓冲液(磷酸+磷酸钠)、柠檬酸缓冲液(柠檬酸+柠檬酸钠)、硼酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液(三(羟甲基)氨基甲烷+盐酸)、TE缓冲液(Tris+乙二胺四乙酸)、TAE缓冲液(Tris+醋酸+乙二胺四乙酸)、TBE缓冲液(Tris+硼酸+乙二胺四乙酸)或HEPES缓冲液(2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸)等。

[0080] 优选的是HEPES缓冲液、磷酸缓冲液、醋酸缓冲液、Tris-盐酸缓冲液等,更优选的是磷酸缓冲液、HEPES缓冲液。另外,在不会带来不利影响的范围内,还可以配合使用其它缓冲剂。

[0081] 作为在本发明中使用的缓冲剂的浓度,优选10至500mM的范围,更优选10至300mM的范围,进一步优选30至100mM的范围。浓度比10mM低时,缓冲作用不充分,抑制蛋白质成分的析出或抑制标记粒子的凝聚也不充分。超过500mM时,为必要以上的浓度,不经济,造成浪费。另外,作为缓冲液,最理想的是制造pH范围7.1至9.8的缓冲液。

[0082] 有效且没有任何妨碍的是,还可以在本发明的免疫层析装置的各部位,特别是层析介质的膜上,添加保持能够抑制基于生物学上的亲和性的副反应、或抑制非特异性反应的公知的添加剂,例如用于促进抗原抗体反应或抑制非特异性反应的蛋白质(例如,牛血清白蛋白、明胶等)、高分子化合物(例如,聚乙二醇、甲基纤维素、聚乙烯基吡咯烷酮、聚乙烯醇、葡聚糖等)、离子性表面活性剂或聚阴离子(例如硫酸葡聚糖、肝素、聚苯乙烯磺酸、硫酸软骨素等)或抗菌剂等的1种或2种以上而使用。

[0083] 另外,有效且没有任何妨碍的是,还可以在构成固定相的层析介质上的移动相的

移动路径上,保持这些用于促进抗原抗体反应或抑制非特异性反应的蛋白质、高分子化合物、离子性表面活性剂或聚阴离子、或抗菌剂等1种或2种以上。

[0084] 作为在本发明的免疫层析装置的样本垫(SP)或样本垫(SP)及结合垫(CP)中所含有的上述添加剂的含量,涂敷或含浸0.01至20质量%的浓度范围(优选为0.1至10质量%的浓度范围、更优选为0.5至5质量%的浓度范围)的水溶液后,进行干燥,使每单位面积的含量为0.10至10.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$,优选为0.15至5.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$,特别优选为0.20至1.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 。

[0085] 为小于0.10 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的含量时,不能抑制非特异性反应且不能进行正确的判定。另一方面,超过10.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 时,为必要以上的浓度,不经济,造成浪费。只要在每单位面积的含量为0.10至10.0 $\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的范围使用,则能够与层析介质的膜的高流率特性相互协同作用,从而进一步抑制前带现象。

[0086] 在使本发明的免疫层析用标记物质溶液保持在固相中时,作为标记物质溶液中含有的保护稳定化物质或溶解促进物质,可以使用糖类,即,单糖、二糖、三糖、低聚糖或多糖。

[0087] 作为单糖,可列举葡萄糖、半乳糖、木糖、果糖等,作为二糖,可列举海藻糖、蔗糖、乳糖、麦芽糖,作为三糖或低聚糖,可列举棉子糖等,作为多糖,列举葡萄糖酸、葡聚糖等,可以没有问题地使用一种或混合2种以上使用。

[0088] 另外,在免疫层析装置的区域部内设置本发明的标记物质保持部时,优选通过以下方式担持或保持或形成:在试样添加部的端部和判定部之间的区域内,涂敷、吸附或含浸含有标记物质保护稳定化试剂的组合物后,利用各种干燥方法(通气干燥、真空干燥、自然干燥、冷冻干燥等)使其干燥,所述组合物是通过用分子量1000至30000的具有1个以上的巯基的亚烷基二醇和/或其衍生物(保护试剂)对标记物质进行保护处理,并根据需要进一步混合精氨酸及酪蛋白(稳定化试剂)而得到的。

[0089] 作为设置含有本发明的免疫层析用标记物质溶液或其它试剂组合物的部位的方法,例如可以通过在向免疫层析装置中的玻璃纤维垫(标记物质保持部件)涂敷或含浸免疫层析用标记物质溶液后,利用各种干燥方法使其干燥的方法,由此形成为使其向玻璃纤维垫中担持或保持的形态。

[0090] 在实施本发明的免疫层析检测法时,成为将检体直接滴在试样添加部或将试样添加部浸渍在检体中的形态。但是,在检体例如像痰一样为固体形状的情况下,也可以使用检体稀释液。

[0091] 该检体稀释液另外也可以作为展开液使用,通常,使用水作为溶剂,在其中添加缓冲液、盐及非离子性表面活性剂,再添加用于促进上述抗原抗体反应或抑制非特异反应的蛋白质、高分子化合物(PVP等)、离子性表面活性剂或聚阴离子、或者抗菌剂、螯合剂等1种或2种以上。

[0092] 添加的顺序没有特别特定,即使同时添加也无妨碍。在作为展开液使用的情况下,也可以向样本垫(试样添加部)上供给、滴下事先将检测试样和展开液混合而成的液体并使其展开,也可以首先向样本垫上供给、滴下试样后,向样本垫上供给、滴下展开液并使其展开。在作为试样稀释液使用的情况下,在通过试样稀释液将试样调整或稀释为适于测定的浓度后,通过供给、滴下在样本垫上即可使用。

[0093] 以下,对免疫层析装置及规格进行说明。

[0094] 免疫层析装置或免疫层析试剂盒(1)由试样添加部(2)(也称为“样本垫”)、标记物

质保持部(3)(也称为“结合垫”)、层析介质(4)、判定部(5)、根据需要还有控制部(8)、吸收部(6)(也称为“展开速度控制部”)及背板(7)构成。这些各部位的构造、规格及形态如下。

[0095] 1) 参考图1时,试样添加部(2)(“样本垫”)由试样迅速被吸收但保持力弱,试样迅速移动到反应部这样的性质的多孔质片材构成。作为多孔质片材,可列举纤维素滤纸、玻璃纤维滤纸、聚氨酯、聚醋酸酯、醋酸纤维素、人造纤维、尼龙、棉布等。作为本发明的多孔质片材,优选使用玻璃纤维滤纸、人造纤维。在本发明中,为了抑制/消除前带现象,可以设定为以下形态:通过至少在样本垫(2)中事先含浸含有HLB13至18的非离子性且亲水性表面活性剂及根据需要的缓冲液的免疫层析用试剂组合物后,使其干燥等方法而进行担持。

[0096] 作为在本发明的免疫层析试剂盒的样本垫中保持的非离子性表面活性剂,可使用HLB(Hydrophile Lipophile Balance=亲水基的重量% \times 0.2=0至20)为13至18的非离子性表面活性剂。

[0097] 例如,可以列举聚氧化烯烷基醚、聚氧乙烯烷基醚(例如,注册商标“Brij”系列)、聚氧乙烯/聚氧丙烯烷基醚(例如,ナカラ イテスク社制,商品名:NP40)、聚氧乙烯芳基醚、聚氧乙烯脱水山梨醇脂肪酸酯(例如,商品名“Tween”系列)、聚氧乙烯对叔辛基苯基醚(例如,商品名“Triton”系列)(例如聚氧乙烯(10)对叔辛基苯基醚(Triton X100(商品名)、HLB=13.7)、聚氧乙烯对叔壬基苯基醚(例如,商品名“Triton N”系列)、聚氧化烯芳基醚、聚氧化烯多环苯基醚、聚氧乙烯烷基胺醚、氢化聚氧乙烯蓖麻油等HLB值为13至18的非离子性表面活性剂。另外,在不会带来不利影响的范围内,也可以将这些非离子性表面活性剂混合在一起使用。

[0098] 2) 在标记物质保持部(3)担持或保持有通过标记成分标记了试剂成分的标记试剂。作为标记成分,可以使用金胶体粒子、银胶体粒子等金属胶体粒子、将使各种单体(共)聚合而合成的合成高分子进行染色所得到的着色乳胶粒子、酶、荧光化合物、其它。作为试剂成分,为具有识别分析物的能力的粒子或分子,优选为单克隆抗体或多克隆抗体或其片段(第二试剂)。

[0099] 另外,在本发明中,为了抑制/消除前带现象,优选设定为以下形态:通过不仅在样本垫(2)中,而且在标记物质保持部(3)中也事先含浸含有HLB13至18的非离子性且亲水性表面活性剂及根据需要的缓冲液的免疫层析用试剂组合物后,使其干燥等方法而进行担持。

[0100] 3) 层析介质(4)是在膜载体上制作有判定部(也称为检测部)(5)的部分。作为膜载体,是可以通过毛细管现象吸收试样检体且使其移动的膜载体,只要是流速(展开速度)快的膜,就没有特别限定。高流率HFR为75(sec/40mm)以下,优选HFR为20至60(sec/40mm)适于抑制/消除前带现象。

[0101] 更优选为30至60(sec/40mm),特别优选为36至60(sec/40mm)。例如,其选自由硝化纤维素、醋酸纤维素、尼龙、聚醚砜、聚乙烯醇、聚酯、玻璃纤维、聚烯烃、纤维素、由这些混合纤维形成的人工聚合物构成的组。由这些纤维、织布、无纺布、布、膜等任意一种构成。

[0102] 4) 在判定部(5),单克隆抗体或多克隆抗体或其片段(第一试剂)担持固定在硝化纤维素的片材上。

[0103] 对于该判定部(5)所用的试剂成分(第一试剂)及标记试剂所用的试剂成分(第二试剂),其一者或两者可以是单克隆抗体,也可以是多克隆抗体,在保持特异性方面,考虑制

造成本或抗体的稳定供应时,优选至少一者为多克隆抗体。

[0104] 另外,标记试剂所用的试剂成分(第二试剂)从测定灵敏度等方面来看,更优选特异性高的单克隆抗体。但是,从反应的正确性和有效性的观点来看,最优选第一试剂及第二试剂两者都使用单克隆抗体。

[0105] 单克隆抗体、多克隆抗体及其片段是公知的,可以获得,且可以通过公知的方法进行调整。作为产生抗体的动物种类,为人、小鼠、大鼠、兔、山羊等。作为免疫球蛋白,可以为IgG、IgM、IgA、IgE、IgD的任一种。

[0106] 关于单克隆抗体,按照通常的方法,使利用抗原进行了免疫的小鼠的脾细胞和骨髓瘤细胞杂交,选择产生目标抗体的杂交瘤,取得由该杂交瘤产生的单克隆抗体。例如,可以参照科勒和米尔斯坦的方法(Nature 256(1975)495-497)。

[0107] 多克隆抗体是利用常规方法,通过对产生动物(例如,人、小鼠、大鼠、兔、山羊、马等)进行抗原免疫所得到的抗血清中分离目标抗体来获得。

[0108] 5)吸收部(6)广泛应用由具有迅速吸收过剩试样的能力的材料即玻璃纤维、纤维素纤维等构成的滤纸,另外,如果使用还具有保持所吸收的液体不使其逆流的能力的材料,则更优选。特别优选的形态是如(日本特开2012-189346号公报)中公开的形态。

[0109] 6)背板(7)为基材。通过在单面涂敷粘接剂或贴上胶带,而使单面具有粘接性,在该粘接面上以密接的方式设置有试样添加部(2)、标记物质保持部(3)、具有检测部(5)的层析介质(4)及吸收部(6)的一部分或全部。背板(7)作为基材没有特别限定,只要通过粘接剂使其对于试样液体成为非透过性、非透湿性的材料即可。

[0110] 以下,举出各规格的实施例及实施方式说明本发明的有效性,但本发明不限于这些实施例及实施方式。

[0111] 实施例

[0112] 以下,举出实施例及比较例说明本发明的意义。其实施方式如下。

[0113] [实施例1]

[0114] 1.在层析介质上制作判定部

[0115] 使用抗体涂敷机(BioDot社制)在由 2.5×25 cm的纤维素构成的膜上,涂敷用含有5质量%的异丙醇的磷酸缓冲液(pH7.5)稀释后的浓度为1.8mg/ml的抗LH(黄体化激素)单克隆抗体并使其干燥,在层析介质上制作判定部。

[0116] 2.标记试剂溶液的制作

[0117] 在金胶体悬浊液(田中贵金属工业(株)制:40nm)0.9ml中加入0.1ml磷酸缓冲液(pH7.5)进行混和,再加入0.05ml用磷酸缓冲液(pH7.5)稀释后的 $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗LH单克隆抗体,在室温静置10分钟。接着,加入0.1ml含有0.01质量%的PEG-SH(日本油脂株式会社制,商品名:SUNBRIGHT ME-200SH,分子量20000)的Tris缓冲液(pH7.5),充分搅拌后,以 $8000 \times g$ 进行15分钟离心分离。去除上清液后,加入1ml磷酸缓冲液(pH7.5)。使用超声波破碎机,使胶体状的标记试剂很好地分散后,以 $8000 \times g$ 进行15分钟离心分离。去除上清液,加入0.15ml前述磷酸缓冲液,在超声波破碎机中使其很好地分散,制成标记试剂溶液。

[0118] 3.样本垫(试样添加部)的制作

[0119] 向 3.0×25 cm的人造纤维制垫均匀地涂敷作为非离子性表面活性剂的Tween20(シグマアルドリッチ社制,商品名:Tween(注册商标)20、HLB(Hydrophile-Lipophile Balance)

值:16.7)的2质量%水溶液并使其达到表中记载的每单位面积的含量后,在真空干燥机中进行干燥,制成样本垫。

[0120] 4.层析介质的制作

[0121] 在0.78ml的10%海藻糖水溶液中加入上述制作的标记试剂溶液0.22mL并进行混和,均匀添加到 1.6×25 cm的玻璃纤维制垫上后,在真空干燥机中进行干燥,制成标记试剂保持部件。接着,在由背板构成的基材上,粘贴上述制作了判定部的硝化纤维素膜、标记试剂保持部件、上述制作的样本垫及用于吸收展开的试样或标记试剂等的纤维素纤维的吸收垫。最后,用切割机切割成宽度为5mm,制作层析介质。

[0122] 5.测定

[0123] 使用通过上述3.制作的层析介质,进行被检物质即LH的检测试验。作为阴性检体,使用LH为0mIU/mL的男性尿液150 μ L作为阴性检体试样。另外,在表1至3中,作为阳性检体试样,使用150 μ L以40mIU/mL浓度包含LH的男性尿液的稀释试样,另外,在表4中,作为阳性检体试样,使用150 μ L以 20×10^6 mIU/mL的浓度包含LH的男性尿液的稀释试样进行试验。在表5中,使用LH为0至 2×10^7 mIU/mL的浓度范围的试样,另外,使用HFR的值为45及75的膜进行试验。阴性检体试样、阳性检体试样都在免疫层析用试验片的样本垫上添加150 μ L使其展开,15分后进行肉眼判定。

[0124] 关于流动:测定开始后,在试样液在膜上展开时,用肉眼确认该液体的展开和标记试剂的红色的展开。

[0125] 展开的液体和标记试剂以相同或大致相同的速度展开的情况设为“○”,

[0126] 标记试剂在展开的液体中稍慢地展开的情况设为“△”,

[0127] 标记试剂在展开的液体中慢慢展开的情况设为“×”。

[0128] 关于灵敏度:

[0129] 可以确认判定部的红线的情况设为“○”,

[0130] 可以确认红线,但颜色非常淡的情况设为“△”,

[0131] 不能确认红线的情况设为“×”。

[0132] 肉眼判定基准:

[0133] 可以确认判定部的红线的情况设为“+”,

[0134] 可以清楚地确认的情况设为“++”,

[0135] 可以更强烈地清楚地确认的情况设为“+++”,

[0136] 可以确认红线,但颜色非常淡的情况设为“±”,

[0137] 不能确认红线的情况设为“-”。

[0138] 将其试验结果示于表中。

[0139] 另外,表1至4中使用的非离子性表面活性剂如下所述。

[0140] [关于非离子性表面活性剂]

[0141] MN811:日油社制,商品名:ノニオンMN811

[0142] Triton X100:シグマアルドリッチ社制,商品名:Triton X100

[0143] Brij35:lCl Americas Inc.的注册商标,商品名:Brij35

[0144] Tween20:lCl Americas Inc.的商品名:聚氧乙烯(20)脱水山梨醇单月桂酸酯

[0145] NP40:ナカライテスク社制,商品名:ノニデットP40

[0146] 在通过上述3.制作的层析介质中,代替向样本垫(SP)中添加的非离子性表面活性剂Tween20,使用HLB值不同的各种非离子性表面活性剂,进行被检物质即LH的检测试验,并进行由HLB值的差异引起的非离子性表面活性剂的评价研究。向样本垫(SP)中添加的非离子性表面活性剂的含量为 $0.2\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 。作为阴性检体,使用 $150\mu\text{L}$ 以 $0\text{mIU}/\text{mL}$ 的浓度含有LH的男性尿液的稀释试样,或者,作为阳性检体,使用 $150\mu\text{L}$ 以 $40\text{mIU}/\text{mL}$ 的浓度含有LH的男性尿液的稀释试样进行试验。将试验结果示于表1。

[0147] [表1]

[0148] 表1

[0149]

表面活性剂	MN811	Triton X100	Brij35	Tween20	NP40
HLB值	9.3	13.7	15.3	16.7	17.7
流动	×	○	○	○	○
灵敏度	△	×	○	○	×
含量($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

[0150] 从表1的结果显而易见的是,在使用HLB值为13至18的非离子性且亲水性表面活性剂的情况下,LH和标记物质的复合体的从样本垫朝向吸收部流动的速度与展开的液体相同或大致相同的速度展开,为良好。另外,可知在使用HLB值为14至17的非离子性且亲水性表面活性剂的情况下,检测线的灵敏度也良好。在流动及灵敏度两方面,优选Brij35、Tween20,特别是Tween20在保存稳定性方面也理想。

[0151] 在通过上述3.制作的层析介质中,除作为仅在样本垫(SP)中添加的非离子性表面活性剂,使用Tween20及Brij35并改变其含量以外,与前述相同的工序方式实施,进行被检物质LH的检测试验,并进行由非离子性表面活性剂的含量差异引起的评价研究。在进行检查设备的阴性、阳性检体的评价时,作为阴性检体,使用 $150\mu\text{L}$ 以 $0\text{mIU}/\text{mL}$ 的浓度含有LH的男性尿液的稀释试样,或者作为阳性检体,使用 $150\mu\text{L}$ 以 $40\text{mIU}/\text{mL}$ 的浓度含有LH的男性尿液的稀释试样进行试验。而且,按照相同的肉眼判定基准进行判定。将试验结果示于表2。

[0152] [表2]

[0153] 表2

[0154]

非离子性表面活性剂 含量($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	Tween 20							
	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
流动	×	△	△	○	○	○	○	○
灵敏度	○	○	○	○	○	○	○	○

[0155]

非离子性表面活性剂 含量($\mu\text{g}/\text{mm}^2$)	Brij 35							
	0.05	0.10	0.15	0.20	0.30	0.40	0.50	0.60
流动	×	△	△	○	○	○	○	○
灵敏度	○	○	○	○	○	○	○	○

[0156] 从表2的结果可知,如果仅在样本垫(SP)中添加的非离子性表面活性剂的Tween20及Brij35的含量为 0.20 至 $0.60\mu\text{g}/\text{mm}^2$ 的范围,则在流动及灵敏度的两方面都良好。在含量过多的情况下,有时在装置制造时或包装收纳时产生剥离等损伤,或有时因为干燥状态的

不均匀,检测线的显色产生不匀。

[0157] 在通过上述3.制作的层析介质中,除在样本垫(SP)及结合垫(CP)两者添加非离子性表面活性剂Tween20以外,以与前述相同的工序方式实施。而且,改变Tween20的含量,进行被检物质即LH的检测试验,并进行由含量差异引起的评价研究。在进行检查设备的阴性、阳性检体的评价时,作为阴性检体,使用150 μ L以0mIU/mL的浓度含有LH的男性尿液的稀释试样,或者,作为阳性检体,使用150 μ L以40mIU/mL的浓度含有LH的男性尿液的稀释试样进行试验。将试验结果示于表3。

[0158] [表3]

[0159] 表3

[0160]

非离子性表面活性剂	Tween 20											
	0.0005		0.001		0.003		0.004		0.005	0.025	0.005	
CP												
SP	0.100	0.150	0.100	0.150	0.100	0.150	0.100	0.150	0.100	0.200	0.300	
流动	×	×	×	×	×	○	△	○	○	○	○	
灵敏度	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	

[0161] 从表3的结果可知,非离子性表面活性剂Tween20可以仅在样本垫(SP)中添加,但如果在样本垫(SP)及结合垫(CP)两者中添加则更好。与仅在样本垫(SP)中添加相比,可知,反而是在样本垫(SP)及结合垫(CP)两者中添加时,即使非离子性表面活性剂的总含量是少量,也能在流动及灵敏度两方面良好地发挥作用。

[0162] 在通过上述1.制作的层析介质中,对于使用的膜的流速(High Flow Rate:将水吸取4cm所花费的时间sec/40mm)特性差异造成的前带现象的抑制效果进行了评价研究。作为仅在样本垫(SP)中添加的非离子性表面活性剂,使用Tween20及Brij35,其含量为0.2 μ g/mm²。作为阳性检体,除使用150 μ L以20 \times 10⁶mIU/mL的浓度含有LH的男性尿液的稀释试样以外,以与前述相同的操作工序及方式实施。而且,按照相同的肉眼判定基准进行了判定。将其判定结果示于表4。

[0163] [表4]

[0164] 表4

[0165]

非离子性表面活性剂	Tween 20					
High Flow Rate	36	45	60	75	120	180
流动	○	○	○	○	○	○
灵敏度	+++	+++	+	±	-	-

[0166]

非离子性表面活性剂	Brij 35					
High Flow Rate	36	45	60	75	120	180
流动	○	○	○	○	○	○
灵敏度	+++	+++	+	±	-	-

[0167] 从表4的结果显而易见的是,膜的高流率为75(sec/40mm)以下时,可得到抑制前带现象的效果。

[0168] 以下,针对被检测物质的浓度范围,对前带现象的抑制效果进行评价研究,进一步通过使用HFR为45及75的膜,对被检测物质浓度为0至 2×10^7 mIU/mL的浓度范围的被检测物质,测定显色强度(吸光度)。

[0169] 在通过上述1.制作的层析介质中,对于使用的膜的流速(HFR:sec/40mm)特性,使用2种(HF45、HF75)膜。HF45是在仅于样本垫(SP)中添加非离子性表面活性剂(Tween20、 $0.4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$)的情况和在样本垫(SP)中添加了非离子性表面活性剂(Tween20、 $0.2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$)且在结合垫(CP)中也添加了非离子性表面活性剂(Tween20、 $0.2 \mu\text{g}/\text{mm}^2$)的情况下进行测定。HF75是仅在样本垫(SP)中添加非离子性表面活性剂(Tween20、 $0.4 \mu\text{g}/\text{mm}^2$)进行测定。

[0170] 作为阳性检体,使用150 μL 以3至 2×10^7 mIU/mL的浓度含有LH的男性尿液的稀释试样,且在上述的条件下进行,除此以外,以与前述相同的操作工序及样式实施,对前带现象的抑制效果进行评价研究。而且,按照相同的肉眼判定基准进行判定。其判定结果示于表5。

[0171] 显色强度(吸光度)小于10时,不可能进行肉眼判定,在10以上才可以进行肉眼判定。

[0172] [表5]

mIU/mL	HF45(CP+SP)	HF45(SP)	HF75	
0	0	0	0	
3	0	0	0	
20	15	17.5	8.3	↓
50	34	39.5	26.9	
1000	259.6	232.1	275.3	吸
10000	352.1	300	385.1	光
[0173] 100000	298.5	450.7	100	度
250000	288.2	386.6	75	
500000	294.2	218.4	22	
1000000	197.9	108.8	8.4	↑
2000000	120.5	57.4	0	
5000000	52.7	27.6	0	
10000000	23.5	11.3	0	
20000000	6.1	4.6	0	

[0174] 从表5的结果可知,在本发明中,可在被检物质量的极宽的浓度范围内,非常显著地发挥抑制/消除前带现象的效果。

[0175] 图2是将表5的数据图表化的图。观察该图表,则可进一步明了本发明起到的抑制/消除前带现象的效果。更明白,在HF45时,直至被检物质浓度为20至 1×10^7 mIU/mL的范围,

均可进行肉眼判定,在HF75时,直至被检物质浓度为50至 5×10^5 mIU/mL的范围,均可进行肉眼判定。

[0176] 从该结果可知,膜的流速(展开速度)快的HF45一方与流速(展开速度)慢的HF75相比,可进行肉眼判定的被检物质浓度区域扩大为低浓度及高浓度两个区域。即,在高浓度检体中,极其显著地发挥前带现象的抑制/消除效果,另外,证实在低浓度检体中,显色也不会减弱,也发挥前带现象的抑制/消除效果。

[0177] 这样,本发明人等发现,如本发明的图1中所看到的那样的免疫层析试剂盒,至少在试样添加部(样本垫)干燥保持有特定的非离子性表面活性剂,并且作为层析介质使用的膜,使用流速(展开速度)快的膜,由此能够在极宽的被检物质浓度范围内抑制前带现象,并且起到即使在低的被检物质浓度下显色也不减弱,可得到充分的显色强度这样的格外显著的作用。

[0178] 从这些结果可以明确,在通过免疫层析法进行检体中的检测对象物的检查时,至少在试样添加部(样本垫)保持HLB值为13至18的非离子性表面活性剂,更优选HLB值为15至17的非离子性表面活性剂,且作为层析介质使用的膜,使用高流率为75(sec/40mm)以下的膜的本发明中,通过加快检体的流动,在检测对象物(抗原)占满膜上的检测抗体前,显色抗体(检测对象物(抗原)和标记物质的复合体)就可以到达,因此即使是在检体中大量过剩存在检测对象物(抗原)的情况,也起到可显著地抑制前带现象,并可以进行展开速度快的、S/N比高的正确的判定这样的显著效果。

[0179] 工业实用性

[0180] 本发明因具有如下优异的优点,即:能够用于不需要尿、血液等之类的检体提取液等,并且,即使在检体中大量过剩存在检测对象物(抗原等)时,也可抑制/消除前带现象并可进行迅速且简便的检查、诊断这样的免疫学的诊断及装置,因此不仅医院、诊所,而且即使是没有特别的技能的个人,也能够以高灵敏度进行迅速的临床检查,具有与疾病的早期诊断或治疗相关联的利用可能性。

[0181] 另外,能够处置从低浓度到高浓度这样的宽泛范围的检体,另外,也不需要稀释液等,再有,因不会引起前带现象,所以判定基准也简单明了,因此提供容易且正确的免疫学的诊断及装置。因此,不仅提高了本发明的试剂盒的操作、检查效率及检查精度,而且检查的效率方面、省力方面也改进,所以对检查机构的产业领域、医疗领域的产业领域的发展非常有帮助。

[0182] 使用特定的方式详细地说明了本发明,但本领域技术人员显而易见的是,可在不脱离本发明的意图和范围内进行各种变更及变形。此外,本申请基于2014年6月4日所申请的日本专利申请(特愿2014-116036),其全文内容以引用方式并入本文。

[0183] 符号说明

[0184] 1...免疫层析装置(1)

[0185] 2...试样添加部(2)(样本垫、SP)

[0186] 3...标记物质保持部(3)(结合垫、CP)

[0187] 4...层析介质的膜(4)

[0188] 5...检测线(5)(检测部、判定部)

[0189] 6...吸收部(6)(吸收垫)

[0190] 7…背板(7)(图中省略。)

[0191] 8…控制线(8)

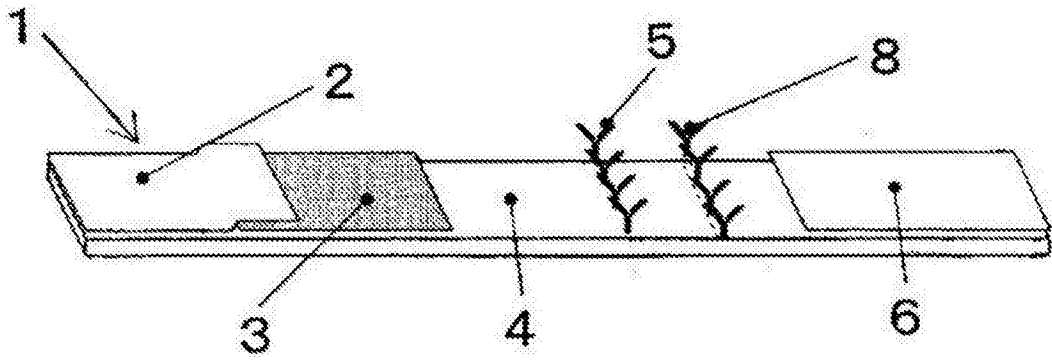


图1

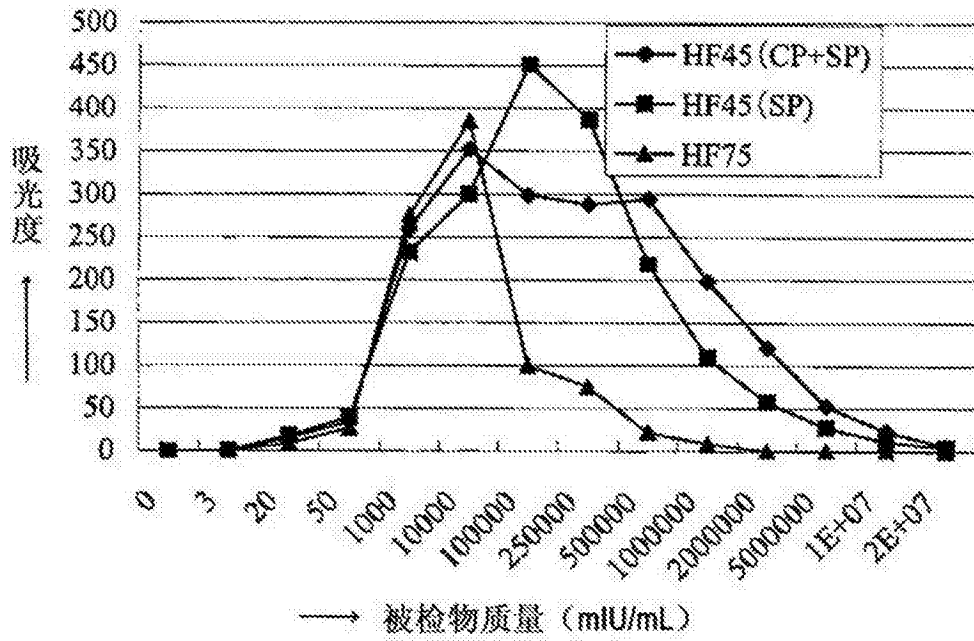


图2

专利名称(译)	免疫学的测定试剂的前带现象的消除法		
公开(公告)号	CN106461651A	公开(公告)日	2017-02-22
申请号	CN201580029641.2	申请日	2015-06-04
[标]申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	田中贵金属工业株式会社		
[标]发明人	铃木启太 岩本久彦		
发明人	铃木启太 岩本久彦		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/54393 G01N33/558 G01N33/54386 G01N33/553 G01N33/74		
代理人(译)	张苏娜 常海涛		
优先权	2014116036 2014-06-04 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明以提供在大量过剩存在抗原的检体中，抑制/消除夹心法引起的前带现象的免疫层析检测方法及免疫层析试剂盒作为课题，通过在免疫层析装置的试样添加部中保持HLB值为14至18的非离子性且亲水性表面活性剂，且作为层析介质使用的膜，使用流速快的膜来解决。

