

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-256012

(P2010-256012A)

(43) 公開日 平成22年11月11日(2010.11.11)

(51) Int.Cl.

F I

テーマコード (参考)

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 1

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 U

GO 1 N 33/543 5 4 1 Z

審査請求 未請求 請求項の数 8 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号 特願2007-225657 (P2007-225657)
 (22) 出願日 平成19年8月31日 (2007. 8. 31)

(71) 出願人 000250100
 湧永製薬株式会社
 大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号
 (74) 代理人 110000084
 特許業務法人アルガ特許事務所
 (74) 代理人 100068700
 弁理士 有賀 三幸
 (74) 代理人 100077562
 弁理士 高野 登志雄
 (74) 代理人 100096736
 弁理士 中嶋 俊夫
 (74) 代理人 100117156
 弁理士 村田 正樹
 (74) 代理人 100111028
 弁理士 山本 博人

最終頁に続く

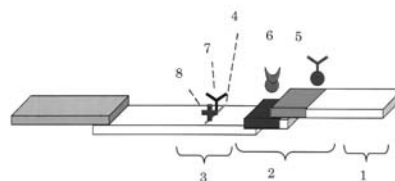
(54) 【発明の名称】 免疫クロマトデバイス

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】判定部において、被検物質の有無と試験が正常に行われたことを共に確認できる免疫クロマトデバイスの提供。

【解決手段】試料導入部、展開部及び判定部とからなる免疫クロマトシステムにおいて、展開部に着色粒子を担持してなる特異結合性物質（又は被検物質）と、前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質と被検物質（又は特異結合性物質）とが混在して固相化されているか又はコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質（又は特異結合性物質）が固相化されていることを特徴とする免疫クロマトデバイス。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料導入部、展開部及び判定部とからなる免疫クロマトシステムにおいて、展開部に着色粒子を担持してなる特異結合性物質（又は被検物質）と、前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質と被検物質（又は特異結合性物質）とが混在して固相化されているか又はコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質（又は特異結合性物質）が固相化されていることを特徴とする免疫クロマトデバイス。

【請求項 2】

着色粒子が金属コロイド、着色ラテックス、染料及び顔料から選ばれる請求項 1 記載の免疫クロマトデバイス。

10

【請求項 3】

コントロール物質とコントロール物質を捕獲可能な物質の何れか一方が抗原で、他方が抗体である請求項 1 又は 2 記載の免疫クロマトデバイス。

【請求項 4】

コントロール物質を捕獲可能な官能基がビオチンであり、コントロール物質が抗体若しくはストレプトアビジンであるか、又はコントロール物質を捕獲可能な官能基がジニトロフェニル基若しくは FITC であり、コントロール物質が抗体である請求項 1 又は 2 記載の免疫クロマトデバイス。

【請求項 5】

試料導入部、展開部及び判定部とからなる免疫クロマトシステムにおいて、展開部に着色粒子を担持してなる第一の特異結合性物質と前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質と第二の特異結合性物質とが混在して固相化されているか又はコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した第二の特異結合性物質が固相化されていることを特徴とする免疫クロマトデバイス。

20

【請求項 6】

着色粒子が金属コロイド、着色ラテックス、染料、顔料からなる請求項 5 記載の免疫クロマトデバイス。

【請求項 7】

コントロール物質とコントロール物質を捕獲可能な物質の何れか一方が抗原で、他方が抗体である請求項 5 又は 6 記載の免疫クロマトデバイス。

30

【請求項 8】

コントロール物質を捕獲可能な官能基がビオチンであり、コントロール物質が抗体若しくはストレプトアビジンであるか、又はコントロール物質を捕獲可能な官能基がジニトロフェニル基若しくは FITC であり、コントロール物質が抗体である請求項 5 又は 6 記載の免疫クロマトデバイス。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、検体中の被検物質の有無を検査する免疫クロマトデバイスに関する。

40

【背景技術】**【0002】**

血液や尿など検体中のホルモンや、微生物抗原、炎症性物質などの測定には、抗体などの被検物質特異的な物質を使用した免疫学的アッセイシステムが広く使われている。この中でも、免疫クロマトグラフィー法は、操作が簡便で迅速に結果が得られるため、緊急検査の分野や薬局でも購入できる非医療関係者向け製品として実用化されている。

【0003】

このシステムでは、反応がうまく行われたことを確認できるようにするため、多くの場合は、判定部より下流側に標識物質がうまく展開したことを示すコントロール部を設けて

50

いる。コントロール部は、判定部ラインが出ない結果である場合に、「試験がうまく行われた結果、判定ラインが出ない」、「検体量不足などで試験がうまく行われていないために判定ラインが出ない」のいずれによるものかを確認するために重要である。このコントロール部は、被検物質には反応しないが、着色標識された特異結合性物質に対する結合性物質、または、着色標識されたコントロール物質を捕獲可能な物質が固相化されている。これにより、「標識物質がコントロール部に到達し、コントロール部での反応がうまく行われたこと」を確認できるが、「標識物質が判定領域を通過したこと」を推察するものに過ぎない。

【0004】

また、従来の免疫クロマトグラフィー法ではプラスチックケースの中で判定領域として広い部分を定義しており、そのどこにラインが現れるかは明確でない。一般には、領域の中央に現れるよう設計されているが、しばしばプラスチックケースへの膜の組み込みのずれなどにより、ずれた部分にラインが現れることも多い。ラインが極薄い場合は見逃してしまうことになる。また、「ラインが無い」という結果の場合でも、時間が経過すると判定領域の固相化部が影のように浮き上がって、ライン状に見える現象（カゲ状発色）（特許文献1）が生じ、判定が不確実になることがある。

【0005】

更に、免疫クロマトグラフィー法には、サンドイッチ法及び競合法という異なる原理に基づくものがある。このうち、サンドイッチ法は、妊娠検査薬をはじめ最も一般に使用されている。この原理では、たとえば、被検物質に特異結合性の第二の物質を判定領域にライン状に固相化しておき、ここに被検物質に反応性の着色標識された第一の物質と被検物質の複合体が結合することでラインとして検出されるようになる。すなわち、「ラインが有る」ことは「被検物質が存在する」ことを示す。

【0006】

一方、測定対象物が低分子である場合や、検体中の濃度が高い場合には、競合法が使用される。この原理では、たとえば被検物質に特異的に結合する物質に対する反応性が測定対象物と同じもの（競合性物質）を判定領域にライン状に固相化している。検体中の被検物質と固相化された物質が着色標識された特異結合性物質に対し競合する。検体中に被検物質が存在しない場合には着色標識された特異結合性物質が固相化された競合性物質と結合し、ラインとして検出される。検体中に被検物質が存在すると特異結合性物質は検体中の被検物質と結合し、固相化された競合性物質とは結合しないためラインが検出されない。固相化に被検物質に特異反応性物質を用い、標識側に競合性物質を使用しても同様である。この原理においては、「ラインが有る」ことは「被検物質が存在しない」ことを示す。

すなわち、サンドイッチ法と競合法では、肉眼で観察される結果と試験結果の判定が全く逆の関係にある。

【0007】

かように、免疫クロマトグラフィー法による検査においては、従来のコントロールラインでは、標識物質が判定部を通り過ぎたことの指標にはなるが、判定部の成分が活性を保持した状態で正しく固相化されていることを示すものではなく、判定部自体での反応がうまく行われていることを直接示すものではないという問題がある。また、判定領域のどの部分にラインが現れるかが明確でなく、薄いラインを見逃すことによる誤判定、ラインが現れない場合においても時間の経過に従い、固相化部にカゲ状のラインが出ることによる誤判定が起こりやすいという問題がある。更に、「ラインが有る」場合、サンドイッチ法では「被検物質が存在する」ことを意味するが、競合法では「被検物質が存在しない」ことを意味し、視覚的結果とその解釈が混乱する結果をもたらし、誤判定が起こりやすいという問題がある。現在使用されているものの殆どがサンドイッチ法に基づくものであるため、競合法の場合で特に問題となる。

【特許文献1】特開2002-350443号公報

【発明の開示】

10

20

30

40

50

【発明が解決しようとする課題】**【0008】**

本発明は、判定部において、試験が正常に行われたことと被検物質の有無を共に確認できる免疫クロマトデバイスの提供に関する。

【課題を解決するための手段】**【0009】**

本発明者らは、上記課題に鑑み、免疫クロマトの検出システムについて検討したところ、判定領域にコントロール物質を被検物質検出用の物質と混在させて固相化しておく、または、コントロール物質を捕獲可能なように修飾した被検物質検出用の物質を固相化し、着色標識を被検物質検出用とコントロール物質で異なる色とすることにより、判定部と同じ位置にコントロール部の機能を持つ検出システムを提供でき、被検物質の有無を色調の変化により検出できることを見出した。

10

【0010】

すなわち、本発明は以下の1)～8)に係るものである。

1) 試料導入部、展開部及び判定部とからなる免疫クロマトシステムにおいて、展開部に着色粒子を担持してなる特異結合性物質(又は被検物質)と、前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質と被検物質(又は特異結合性物質)とが混在して固相化されているか又はコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質(又は特異結合性物質)が固相化されていることを特徴とする免疫クロマトデバイス。

20

2) 着色粒子が金属コロイド、着色ラテックス、染料及び顔料から選ばれる上記1)に記載の免疫クロマトデバイス。

3) コントロール物質とコントロール物質を捕獲可能な物質の何れか一方が抗原で、他方が抗体である上記1)又は2)に記載の免疫クロマトデバイス。

4) コントロール物質を捕獲可能な官能基がビオチンであり、コントロール物質が抗体若しくはストレプトアビジンであるか、又はコントロール物質を捕獲可能な官能基がジニトロフェニル基若しくはFITCであり、コントロール物質が抗体である上記1)又は2)に記載の免疫クロマトデバイス。

5) 試料導入部、展開部及び判定部とからなる免疫クロマトシステムにおいて、展開部に着色粒子を担持してなる第一の特異結合性物質と前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質と第二の特異結合性物質とが混在して固相化されているか又はコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した第二の特異結合性物質が固相化されていることを特徴とする免疫クロマトデバイス。

30

6) 着色粒子が金属コロイド、着色ラテックス、染料、顔料からなる上記5)に記載の免疫クロマトデバイス。

7) コントロール物質とコントロール物質を捕獲可能な物質の何れか一方が抗原で、他方が抗体である上記5)又は6)に記載の免疫クロマトデバイス。

8) コントロール物質を捕獲可能な官能基がビオチンであり、コントロール物質が抗体若しくはストレプトアビジンであるか、又はコントロール物質を捕獲可能な官能基がジニトロフェニル基若しくはFITCであり、コントロール物質が抗体である上記5)又は6)に記載の免疫クロマトデバイス。

40

【発明の効果】**【0011】**

この方法によれば、判定部がコントロール部の機能を有しており、判定部の成分の固相化の異常など判定部自体の反応性の異常が反映され、試験が正常に行われたか否かをより的確に確認することができる。また、試験が正常に行われた場合は常にラインが現れることで、薄いラインの見逃しやカゲ状発色の影響も受けなため、誤判定を避けることができる。更に、サンドイッチ法、競合法に関わらず、試験が正常に行われた場合は常にラインが出ており、そのラインの色調により被検物質の有無が判定される。これによってサン

50

ドイッチ法、競合法で被検物質の存在によりラインの有無が異なるということに起因する誤判定が回避できる。両法で、被検物質の検出に使用する着色粒子とコントロール用着色粒子の色を逆に用いることにより、サンドイッチ法、競合法の異なる原理のもので被検物質が存在する場合には同一の色調となるよう調整することも可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

本明細書において、「試料導入部」とは、スポイトなどで試料を滴下する部分、またはその部分を液体に浸漬することにより試料を適度な速度で毛細管現象により展開部に移動せしめる部分であり、不活性材質からなる部材が装着されている。

不活性材質としては、一般にろ紙、ガラス繊維ろ紙などが挙げられるが、好ましくはガラス繊維ろ紙である。

【0013】

「展開部」とは、試料導入部に適用された液体を適度な速度で毛細管現象により判定部に移動せしめる部分であり、放出可能な形態で着色粒子を有する各試薬を保持する。

展開部の材質としては、ニトロセルロース、ガラス繊維ろ紙等の多孔質担体が挙げられるが、好ましくは、ガラス繊維ろ紙である。

着色粒子を有する各試薬は、塗布、凍結乾燥することにより乾燥状態で保持させることができる。異なる色の着色粒子は混合して塗布、乾燥することもできるし、それぞれ別の膜に塗布、乾燥することもできる。

【0014】

「判定部」とは、被検物質を検出するための試薬が非可動性に固相化された部分であり、色調が変化を観察することにより被検物質の検出を行う部分である。

判定部の材料としては、適度な速度で試料液が展開するものであれば良く、ニトロセルロース、ナイロン、ガラス繊維ろ紙等の多孔質担体が挙げられるが、好ましくは、ニトロセルロースである。

判定部の色調変化が起こる部分の形状は、ライン、ドット、記号などが挙げられるが、ラインであることが好ましい。

【0015】

「試料」としては、たとえば、血液、血漿、血清、尿、汗、及び涙などの体液、食品抽出液や河川水などの住環境から得られる水が挙げられる。

また、「被検物質」としては、たとえば、タンパク質、糖、酵素、細菌、ウイルス、細胞が挙げられる。

【0016】

「着色粒子」とは、被検物質、被検物質と特異的に結合する物質、又はコントロール物質を肉眼で見える状態に標識できるものであれば良く、例えば、金コロイドなどの金属コロイド、着色ラテックス、染料、顔料などが挙げられる。その粒径は $0.03 \sim 0.5 \mu\text{m}$ であることが好ましい。

【0017】

「特異結合性物質」としては、被検物質と特異的に結合する抗体、レクチン、受容体、タンパク質などが挙げられるが、好ましくは抗体である。

【0018】

「異なる色調の着色粒子」とは、「被検物質」を検出するための着色粒子の色と肉眼で異なる色であると認識できるものであれば良く、赤色に対して青色、緑色、黒色などが挙げられるが、コントロール物質に担持される着色粒子の色は被検物質を検出するための着色粒子の色より薄い色調のものが好ましい。

【0019】

本発明の免疫クロマトディバイスは、試料導入部、展開部及び判定部とからなり、競合法及びサンドイッチ法の何れにも対応可能な免疫クロマトシステムを提供するものである。

第一の態様は、競合法を採用する場合の免疫クロマトディバイスであり、展開部に着色

10

20

30

40

50

粒子を担持してなる特異結合性物質（又は被検物質）と、前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質が被検物質（又は特異結合性物質）と混在して固相化されているか又はコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質（又は特異結合性物質）が固相化されているものである（図1及び図2参照）。

【0020】

本態様において、被検物質を検出するために判定部に固相化されるものが被検物質である場合は、展開部の着色粒子を担持する物質には被検物質と特異的に結合する物質（「特異結合性物質」）を使用し、判定部に固相化されるものが特異結合性物質である場合は、展開部の着色粒子を担持する物質には被検物質を使用する（図1）。

固相化された被検物質または着色粒子を担持してなる被検物質と試料液中の被検物質が競合的に反応することにより、被検物質が検出され、その濃度に依存して、着色粒子を担持してなる特異結合性物質（又は被検物質）による着色が起こる。

【0021】

更に、展開部には、前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質が被検物質（又は特異結合性物質）と混在して固相化されているか又はコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質（又は特異結合性物質）が固相化されている。

ここで、コントロール物質としては、被検物質及び特異結合性物質に対して反応性を持たないタンパク質や糖などの抗原、抗体、レクチンなどが挙げられるが、好ましくはタンパク質抗原である。

これにより、試験が正常に行われた場合、すなわち、検査に十分な検体量が添加され、これにより標識物質が溶解され、判定部まで展開し、判定部に固相化されている物質と反応した場合に、着色粒子を担持してなるコントロール物質による一定の着色が必ず起こる。結果として、試験が正常に行われると必ず呈色し、被検物質の有無により色調の変化が起こる。

【0022】

被検物質あるいは特異結合性物質と、コントロール物質を捕獲可能な物質を混在して固相するには、被検物質あるいは特異結合性物質とコントロール物質を捕獲可能な物質とを任意の比で混合したものをを用いて同時に塗布、乾燥する方法が挙げられる。

【0023】

尚、コントロール物質を捕獲可能な物質とは、被検物質及び特異結合性物質には結合せず、コントロール物質に特異的に結合する抗体、タンパク質や糖などの抗原、レクチンなどが挙げられるが、好ましくは抗体である。

尚、コントロール物質を捕獲可能な物質を、更に判定部より下流に同様に固相化しておくことで、着色したコントロール物質由来の基本色の参照部を設けることもできる。この色と比較することで判定がより容易に行える。

【0024】

また、判定部においては、コントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質（又は特異結合性物質）が固相化されていてもよい（図2）。

この場合において、判定部に固相化されるものが、コントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質である場合には、展開部の着色粒子を担持する物質として特異結合性物質を使用し、判定部に固相化されるものがコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した特異結合性物質である場合は、展開部の着色粒子を担持する物質には被検物質を使用する。固相化されたコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質または着色粒子を担持してなる被検物質と試料液中の被検物質が競合的に反応することにより被検物質が検出され、被検物質の濃度に依存して、着色粒子を担持してなる特異結合性物質（又は被検物質）による着色が起こる。

そして、前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持されていることから、試験が正常に行われた場合には、判定部に固相化

10

20

30

40

50

されている被検物質又は特異結合性物質におけるコントロール物質を捕獲可能な官能基と結合し、判定部に着色粒子を担持してなるコントロール物質による一定の着色が必ず起こる。結果として、試験が正常に行われると必ず呈色し、被検物質の有無により色調の変化が起こる。

ここで、コントロール物質を捕獲可能な官能基とは、被検物質及び被検物質特異的結合物質に対して反応性を持たないビオチン、ジニトロフェニル基、FITCなどであり、ビオチンに対するコントロール物質はストレプトアビジン、抗ビオチン抗体であり、ジニトロフェニル基、FITCに対するコントロール物質はそれぞれに対する抗体である。

官能基の導入は、スルフォNHSビオチン、フルオセレイン-4-イソチオネート、2,4-ジニトロベンゼンスルホン酸ナトリウムの各試薬を用いて、タンパク質などのアミノ基と反応させることにより行うことができる。

【0025】

第二の態様は、サンドイッチ法を採用する場合の免疫クロマトデバイスであり、展開部に着色粒子を担持してなる第一の特異結合性物質と前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質が第二の特異結合性物質と混在して固相化されているか又はコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した第二の特異結合性物質が固相化されているものである（図3及び図4参照）。

【0026】

本態様においては、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質が第二の特異結合性物質と混在して固相化されていてもよく（図3）、またコントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した第二の特異結合性物質が固相化されていてもよい（図4）。

コントロール物質を捕獲可能な物質が、第二の特異結合性物質と混在して固相化されている場合には、被検物質を検出するために判定部に固相化されるものは、第二の特異結合性物質であり、展開部の着色粒子を担持する物質は、第一の特異結合性物質である。固相化された第二の特異結合性物質と被検物質、第一の特異結合性物質がサンドイッチ複合体を形成することにより被検物質が検出され、被検物質の濃度に依存して、着色粒子を担持してなる第二の特異結合性物質による着色が起こる。

【0027】

そして、展開部には、前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持され、判定部において、コントロール物質を捕獲可能な物質が第二の特異結合性物質と混在して固相化されていることから、試験が正常に行われた場合、すなわち、検査に十分な検体量が添加され、これにより標識物質が溶解され、判定部まで展開し、判定部に固相化されている物質と反応した場合に、着色粒子を担持してなるコントロール物質による一定の着色が必ず起こる。結果として、試験が正常に行われると必ず呈色し、被検物質の有無により色調の変化が起こる。

【0028】

ここで、第一の特異結合性物質とは、被検物質と特異的に結合する第一の物質を意味し、例えば、被検物質と特異的に結合する抗体、レクチン、受容体などが挙げられ、好ましくは抗体である。

また、第二の特異結合性物質とは、被検物質と特異的に結合する第二の物質を意味し、例えば、被検物質または第一特異結合性物質に結合した被検物質に対して特異的に結合できる抗体、レクチン、受容体などが挙げられ、好ましくは抗体である。

【0029】

ここで、コントロール物質としては、被検物質並びに「第一の特異結合性物質及び第二の特異結合性物質」に対して反応性を持たないタンパク質や糖などの抗原、抗体、レクチンなどが挙げられるが、好ましくはタンパク質抗原である。また、コントロール物質を捕獲可能な物質とは、被検物質、並びに「第一の特異結合性物質及び第二の特異結合性物質」には結合せず、コントロール物質に特異的に結合する抗体、タンパク質や糖などの抗原、レクチンなどが挙げられるが、好ましくは抗体である。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 0 】

第二の特異結合性物質と、コントロール物質を捕獲可能な物質を混在して固相化する方法としては、第二の特異結合性物質とコントロール物質を捕獲可能な物質を任意の比で混合したものを用いて同時に塗布、乾燥することによる固相化方法が挙げられる。

【 0 0 3 1 】

また、判定部においては、コントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した第二の特異結合性物質が固相化されていてもよいが、この場合は、展開部の着色粒子を担持する物質は、第一の特異結合性物質である。固相化された第二の特異結合性物質と被検物質、第一の特異結合性物質がサンドイッチ複合体を形成することにより、被検物質が検出され、被検物質の濃度に依存して、着色粒子を有する第一の特異結合性物質による着色が起こる。

10

【 0 0 3 2 】

展開部には、前記着色粒子と異なる色調の着色粒子を担持してなるコントロール物質が移動可能な状態で保持されていることから、試験が正常に行われた場合には、判定部に固相化されている第二の特異結合性物質におけるコントロール物質を捕獲可能な官能基と結合し、判定部に着色粒子を担持してなるコントロール物質による一定の着色が必ず起こる。結果として、試験が正常に行われると必ず呈色し、被検物質の有無により色調の変化が起こる。

【 0 0 3 3 】

ここで、コントロール物質と特異的に結合する官能基とは、被検物質並びに「第一の特異結合性物質及び第二の特異結合性物質」に対して反応性を持たないビオチン、ジニトロフェニル基、FITCなどであり、ビオチンに対するコントロール物質はストレプトアビジン、抗ビオチン抗体であり、ジニトロフェニル基、FITCに対するコントロール物質はそれぞれに対する抗体である。

20

【 0 0 3 4 】

また、本態様においても様においては、「コントロール物質を捕獲可能な物質」を判定部より下流に同様に固相化しておくことで、「着色したコントロール物質」由来の基本色の参照部を設けることもできる。この色と比較することで判定がより容易に行える。

【実施例】

【 0 0 3 5 】

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

30

実施例 1 第一の態様による検出 (1)

(1) 検出領域の膜の作製

ニトロセルロース膜 (Hi-Flow Plus ミリポア社製) にヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) 及び抗ウサギF(ab')₂マウスモノクローナル抗体 (MRF1) の混合溶液をディスペンサーにてライン状に塗布、25℃で乾燥後、カゼイン溶液でブロッキングし25℃にて乾燥した。最終的に5mm×25mmのストリップに切断した。一部の膜は固相化したラインに故意に傷をつけ、不良サンプルとした。

【 0 0 3 6 】

(2) 金コロイド標識検出用物質の作製

金コロイド溶液はBBI社のgold-sol G40を使用し、メーカー推奨プロトコールに従って、抗HCGマウスモノクローナル抗体 (SH19) を標識化した。金コロイド標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上の一部に塗布し、凍結乾燥した。最終的に5mm×25mmのパッドとした。

40

【 0 0 3 7 】

(3) 青色ラテックス標識コントロール用物質の作製

青色ラテックス溶液はBangs社のPS-LATEX (サファイアブルー 0.32 μm) を使用した。メーカー推奨プロトコールに従って、ウサギF(ab')₂を標識化した。青色ラテックス標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上の一部に塗布し、凍結乾燥した。最終的に5mm×10mmのパッドとした。

50

【 0 0 3 8 】

(4) テストストリップの作製

粘着剤の塗布されたポリエチレンフィルム上に判定部をもつニトロセルロース膜を貼りつけ、その一端に5mm×22mm幅に切断したセルロース膜を端3mmを重ねて貼り付けた。反対の端に5mm×5mmに切断したガラス繊維ろ紙を端1mmを重ねて張り合わせ、ガラス繊維ろ紙の反対側の端に3mm重ねて青色ラテックス標識試薬を塗布したコンジュゲートパッド、更にその反対の端に3mm重ねて金コロイド標識試薬を塗布したコンジュゲートパッドを貼り付けた。

【 0 0 3 9 】

(5) 試験

0.2% BSA / PBSをコンジュゲートパッドに70 μ Lまたは30 μ L添加し、15分後の検出領域中のラインの色調を観察した。赤色ラインを確認したものを「赤（陰性）」、中間色のものを「紫（陰性）」、青色ラインを確認したものを「青（陽性）」と判定した。

【 0 0 4 0 】

(6) 結果

結果を表1に示した。明らかな検体量不足の30 μ Lでは、標識物質が十分展開せず、ラインは認められなかった。また、固相化部に傷をつけた不良サンプルでは傷の部分でラインが途切れ、不良状態を反映した。検体量70 μ Lでは被検物質の濃度に応じて色調が赤色から青色に変化し、被検物質の有無を正確に検出できた。

【 0 0 4 1 】

【 表 1 】

HCG 濃度 (ng/mL)	検体量	結果
0	30 μ L	ライン無し
0 (固相部に傷)	70 μ L	部分的に欠けた赤
0	70 μ L	赤 (陰性)
100	70 μ L	赤 (陰性)
200	70 μ L	紫 (陰性)
300	70 μ L	紫 (陰性)
400	70 μ L	青 (陽性)
500	70 μ L	青 (陽性)

【 0 0 4 2 】

実施例 2 第一の態様による検出 (2)

(1) ビオチン化ヒト絨毛性ゴナドトロピン (HCG) の調製

PBSに溶解したHCG(1mg/mL)溶液1mLにモル比1:100となるようSulfo-LHS-Biotin試薬 (PIERCE社製) を添加し、室温で30分反応させた。分子量カット10000の限外ろ過により未反応のビオチン化試薬を除去した。

【 0 0 4 3 】

(2) 検出領域の膜の作製

ニトロセルロース膜 (Hi-Flow Plus ミリポア社製) にビオチン化HCGをディスペンサーにてライン状に塗布、25℃で乾燥後、カゼイン溶液でブロッキングし25℃にて乾燥した。最終的に5mm×25mmのストリップに切断した。一部の膜は固相化したラインに故意に傷をつけ、不良サンプルとした。

【 0 0 4 4 】

(3) 金コロイド標識検出用物質の作製

金コロイド溶液はBBI社のgold-sol G40を使用し、メーカー推奨プロトコールに従って、抗HCGマウスモノクローナル抗体（SH19）を標識化した。金コロイド標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上の一部に塗布し、凍結乾燥した。最終的に5mm×10mmのパッドとした。

【0045】

(4) 青色ラテックス標識コントロール用物質の作製

青色ラテックス溶液はBangs社のPS-LATEX（サファイアブルー 0.32 μm）を使用した。メーカー推奨プロトコールに従って、ストレプトアビジンを標識化した。青色ラテックス標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上の一部に塗布し、凍結乾燥した。最終的に5mm×10mmのパッドとした。

10

【0046】

(5) テストストリップの作製

粘着剤の塗布されたポリエチレンフィルム上に判定部をもつニトロセルロース膜を貼り付け、その一端に5mm×22mm幅に切断したセルロース膜を端3mmを重ねて貼り付けた。反対の端に5mm×5mmに切断したガラス繊維ろ紙を端1mmを重ねて張り合わせ、ガラス繊維ろ紙の反対側の端に3mm重ねて青色ラテックス標識試薬を塗布したコンジュゲートパッド、更にその反対の端に3mm重ねて金コロイド標識試薬を塗布したコンジュゲートパッドを貼り付けた。

20

【0047】

(6) 試験

0.2% BSA / PBSをコンジュゲートパッドに70 μLまたは30 μL添加し、15分後の検出領域中のラインの色調を観察した。赤色ラインを確認したものを「赤（陰性）」、中間色のものを「紫（陰性）」、青色ラインを確認したものを「青（陽性）」と判定した。

【0048】

(7) 結果

結果を表2に示した。明らかな検体量不足の30 μLでは、標識物質が十分展開せず、ラインは認められなかった。また、固相化部に傷をつけた不良サンプルでは傷の部分でラインが途切れ、不良状態を反映した。検体量70 μLでは被検物質の濃度に応じて色調が赤色から青色に変化し、被検物質の有無を正確に検出できた。

30

【0049】

【表2】

HCG 濃度 (ng/mL)	検体量	結果
0	30 μL	ライン無し
0 (固相部に傷)	70 μL	部分的に欠けた赤
0	70 μL	赤 (陰性)
100	70 μL	赤 (陰性)
200	70 μL	紫 (陰性)
300	70 μL	紫 (陰性)
400	70 μL	青 (陽性)
500	70 μL	青 (陽性)

40

【0050】

50

実施例 3 第二の態様による検出 (1)

(1) 検出領域の膜の作製

ニトロセルロース膜 (Hi-Flow Plus ミリポア社製) に抗HCGマウスモノクローナル抗体 (SH5) 及び抗ウサギF(ab')₂マウスモノクローナル抗体 (MRF1) の混合溶液をディスペンサーにてライン状に塗布、25℃で乾燥後、カゼイン溶液でブロッキングし25℃にて乾燥した。最終的に5mm×25mmのストリップに切断した。一部の膜は固相化したラインに故意に傷をつけ、不良サンプルとした。

【 0 0 5 1 】

(2) 金コロイド標識検出用物質の作製

金コロイド溶液は B B I 社の gold-sol G40 を使用し、プロトコールに従って、抗HCGマウスモノクローナル抗体 (SH19) を標識化した。金コロイド標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上の一部に塗布し、凍結乾燥した。最終的に5mm×25mmのパッドとした。

10

【 0 0 5 2 】

(3) 青色ラテックス標識コントロール用物質の作製

青色ラテックス溶液は Bangs 社の PS-LATEX (サファイアブルー 0.32 μm) を使用した。メーカー推奨プロトコールに従って、ウサギF(ab')₂を標識化した。青色ラテックス標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上の一部に塗布し、凍結乾燥した。最終的に5mm×10mmのパッドとした。

20

【 0 0 5 3 】

(4) テストストリップの作製

粘着剤の塗布されたポリエチレンフィルム上に検出領域をもつニトロセルロース膜を貼り付け、その一端に5mm×22mm幅に切断したセルロース膜を端3mmを重ねて貼り付けた。反対の端に5mm×5mmに切断したガラス繊維ろ紙を端1mmを重ねて張り合わせ、ガラス繊維ろ紙の反対側の端に3mm重ねて青色ラテックス標識試薬を塗布したコンジュゲートパッド、更にその反対の端に3mm重ねて金コロイド標識試薬を塗布したコンジュゲートパッドを貼り付けた。

【 0 0 5 4 】

(5) 試験

0.2% BSA / PBS をコンジュゲートパッドに70 μL または30 μL 添加し、15分後の検出領域中のラインの色調を観察した。青色ラインを確認したものを「青 (陰性)」、赤色ラインを確認したものを「赤 (陽性)」、中間色のものを「紫 (陽性) 」と判定した。

30

【 0 0 5 5 】

(6) 結果

結果を表3に示した。明らかな検体量不足の30 μL では、標識物質が十分展開せず、ラインは認められなかった。また、固相化部に傷をつけた不良サンプルでは傷の部分でラインが途切れ、不良状態を反映した。検体量70 μL では被検物質の濃度に応じて色調が青色から赤色に変化し、被検物質の有無を正確に検出できた。

【 0 0 5 6 】

【表 3】

HCG 濃度 (ng/mL)	検体量	結果
0	30 μ L	ライン無し
0 (固相部に傷)	70 μ L	部分的に欠けた青
0	70 μ L	青 (陰性)
20	70 μ L	紫 (陽性)
40	70 μ L	紫 (陽性)
100	70 μ L	赤 (陽性)

10

【 0 0 5 7 】

実施例 4 第二の態様による検出 (2)

(1) ビオチン化抗HCGマウスモノクローナル抗体 (SH5) の調製

PBSに溶解した化抗HCGマウスモノクローナル抗体 (SH19) (1mg/mL) 溶液1mLにモル比1:100となるようSulfo-LHS-Biotin試薬 (PIERCE社製) を添加し、室温で30分反応させた。分子量カット10000の限外ろ過により未反応のビオチン化試薬を除去した。

20

【 0 0 5 8 】

(2) 検出領域の膜の作製

ニトロセルロース膜 (Hi-Flow Plus ミリポア社製) にビオチン化抗HCGマウスモノクローナル抗体 (SH5) をディスペンサーにてライン状に塗布、25℃で乾燥後、カゼイン溶液でブロッキングし25℃にて乾燥した。最終的に5mm×25mmのストリップに切断した。一部の膜は固相化したラインに故意に傷をつけ、不良サンプルとした。

【 0 0 5 9 】

(3) 金コロイド標識検出用物質の作製

金コロイド溶液はBBI社のgold-sol G40を使用し、プロトコルに従って、抗HCGマウスモノクローナル抗体 (SH19) を標識化した。金コロイド標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上の一部に塗布し、凍結乾燥した。最終的に5mm×25mmのパッドとした。

30

【 0 0 6 0 】

(4) 青色ラテックス標識コントロール用物質の作製

青色ラテックス溶液はBangs社のPS-LATEX (サファイアブルー 0.32 μ m) を使用した。メーカー推奨プロトコルに従って、ストレプトアビジンを標識化した。青色ラテックス標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上の一部に塗布し、凍結乾燥した。最終的に5mm×10mmのパッドとした。

【 0 0 6 1 】

(5) テストストリップの作製

粘着剤の塗布されたポリエチレンフィルム上に検出領域をもつニトロセルロース膜を貼り付け、その一端に5mm×22mm幅に切断したセルロース膜を端3mmを重ねて貼り付けた。反対の端に5mm×5mmに切断したガラス繊維ろ紙を端1mmを重ねて張り合わせ、ガラス繊維ろ紙の反対側の端に3mm重ねて青色ラテックス標識試薬を塗布したコンジュゲートパッド、更にその反対の端に3mm重ねて金コロイド標識試薬を塗布したコンジュゲートパッドを貼り付けた。

40

【 0 0 6 2 】

(6) 試験

0.2% BSA / PBSをコンジュゲートパッドに70 μ Lまたは30 μ L添加し、15分後の検出領域中のラインの色調を観察した。青色ラインを確認したものを「青 (陰性)」、赤色ライ

50

ンを確認したものを「赤（陽性）」、中間色のものを「紫（陽性）」と判定した。

【 0 0 6 3 】

（ 7 ） 結果

結果を表4に示した。明らかな検体量不足の30 μ Lでは、標識物質が十分展開せず、ラインは認められなかった。また、固相化部に傷をつけた不良サンプルでは傷の部分でラインが途切れ、不良状態を反映した。検体量70 μ Lでは被検物質の濃度に応じて色調が青色から赤色に変化し、被検物質の有無を正確に検出できた。

【 0 0 6 4 】

【 表 4 】

HCG 濃度 (ng/mL)	検体量	結果
0	30 μ L	ライン無し
0 (固相部に傷)	70 μ L	部分的に欠けた青
0	70 μ L	青 (陰性)
20	70 μ L	紫 (陽性)
40	70 μ L	紫 (陽性)
100	70 μ L	赤 (陽性)

10

20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 6 5 】

【 図 1 】 実施例 1 のデバイスの概念図である。

【 図 2 】 実施例 2 のデバイスの概念図である。

【 図 3 】 実施例 3 のデバイスの概念図である。

【 図 4 】 実施例 4 のデバイスの概念図である。

【 符号の説明 】

30

【 0 0 6 6 】

1 : 試料導入部

2 : 展開部

3 : 判定領域

4 : 判定部

5 : 着色粒子を担持してなる特異結合物質 (又は被検物質)

6 : 着色粒子を担持してなるコントロール物質

7 : コントロール物質を捕獲可能な物質

8 : 被検物質 (又は特異結合性物質)

9 : コントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した被検物質 (又は特異結合性物質)

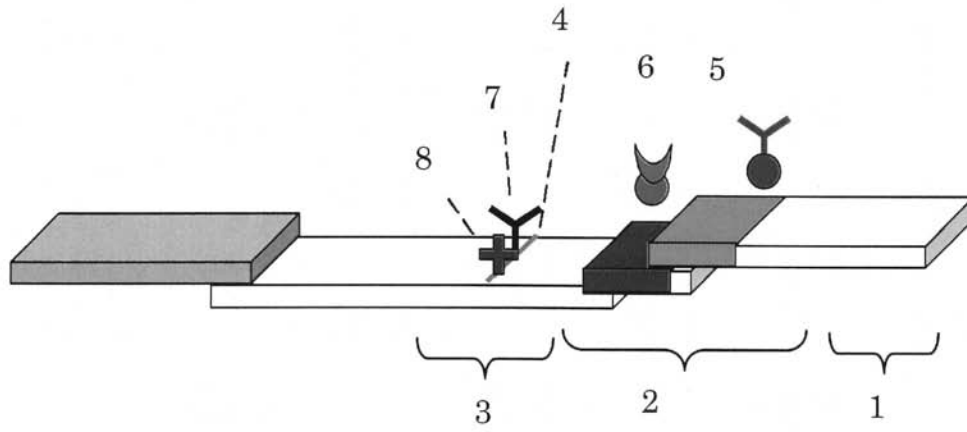
40

10 : 着色粒子を担持してなる第一の特異結合物質

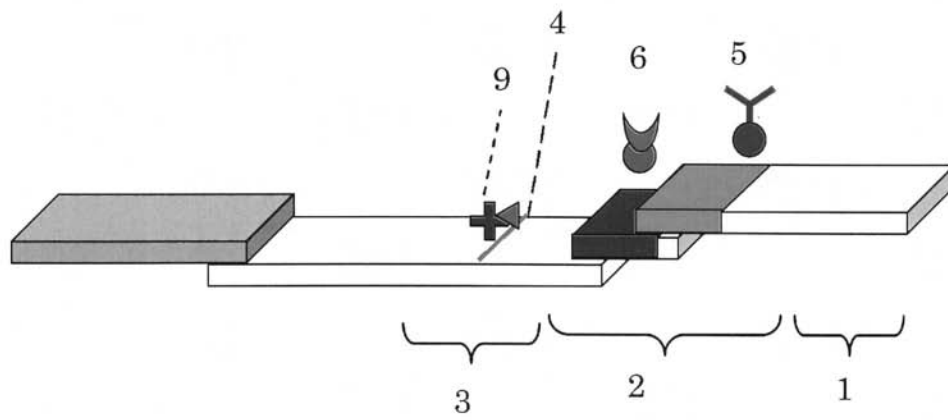
11 : 第二の特異結合性物質

12 : コントロール物質を捕獲可能な官能基を導入した第二の特異結合性物質

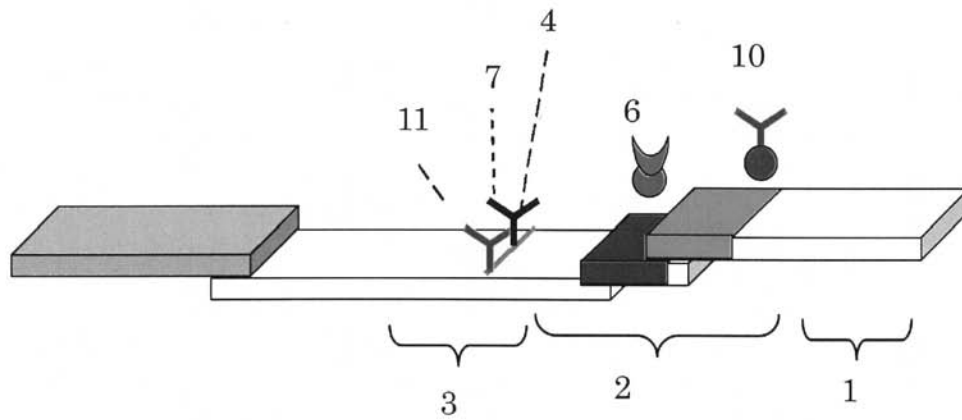
【図 1】



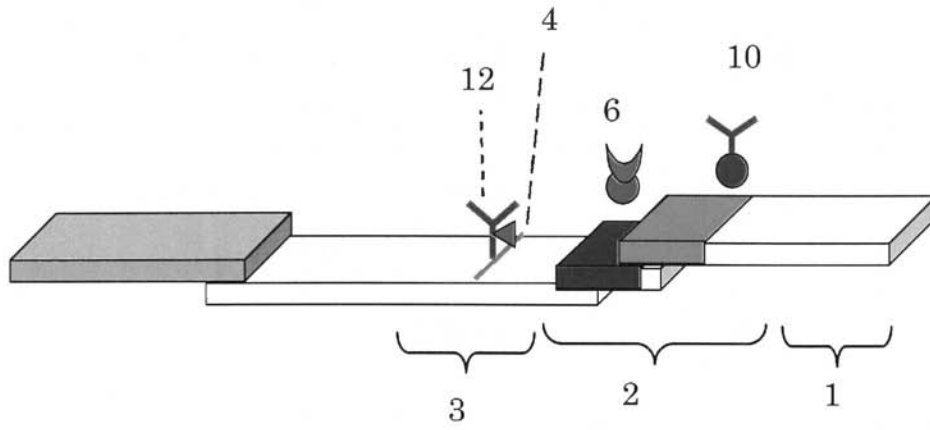
【図 2】



【図 3】



【 図 4 】



フロントページの続き

(72)発明者 兼澤 富士子

広島県安芸高田市甲田町下甲立 1 6 2 4 湧永製薬株式会社内

专利名称(译)	免疫层析装置		
公开(公告)号	JP2010256012A	公开(公告)日	2010-11-11
申请号	JP2007225657	申请日	2007-08-31
申请(专利权)人(译)	Wakunagaseiyaku有限公司		
[标]发明人	兼澤富士子		
发明人	兼澤 富士子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/558 B01L3/5023 B01L2300/0825		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.U G01N33/543.541.Z		
代理人(译)	村田正树		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

解决的问题：提供一种免疫层析装置，其能够在判断区域中确认是否存在被检物质以及是否可以正常进行检查。在包括样品引入部分，显影部分和判断部分的免疫色谱系统中，特异性结合物质（或测试物质）具有携带在显影部分上的着色颗粒和不同于该着色颗粒的色调。支撑有色粒子的对照物质以可移动的状态被保持，并且在确定部分中，将能够捕获对照物质的物质和测试物质（或特定结合物质）混合并固定。一种免疫色谱装置，其中固定了具有能够捕获对照物质或对照物质的官能团的测试物质（或特异性结合物质）。[选型图]图1

