

(19) 日本国特許庁(JP)

## 再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02015/080286

発行日 平成29年3月16日(2017.3.16)

(43) 国際公開日 平成27年6月4日(2015.6.4)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
<b>GO 1 N 33/543 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/543 5 2 1	2 G 0 5 9
<b>GO 1 N 33/569 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/569 L	
<b>GO 1 N 33/531 (2006.01)</b>	GO 1 N 33/531 B	
<b>GO 1 N 21/47 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/47 B	
<b>GO 1 N 21/59 (2006.01)</b>	GO 1 N 21/59 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 24 頁)

出願番号 特願2015-525659 (P2015-525659)	(71) 出願人 390037327 積水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋3丁目13番5号
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/081753	
(22) 国際出願日 平成26年12月1日(2014.12.1)	
(11) 特許番号 特許第5831918号 (P5831918)	(74) 代理人 110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所
(45) 特許公報発行日 平成27年12月9日(2015.12.9)	
(31) 優先権主張番号 特願2013-247279 (P2013-247279)	(72) 発明者 西谷 公良 東京都中央区日本橋三丁目13番5号 積水メディカル株式会社内
(32) 優先日 平成25年11月29日(2013.11.29)	Fターム(参考) 2G059 AA05 BB06 BB12 CC17 CC20 DD13 EE01 EE02 EE13
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法

## (57) 【要約】

いわゆる白抜け現象の発生が抑制され、正確かつ感度にも優れたイムノクロマトグラフィー用テストストリップを使用した検出方法の提供。

本発明は、イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法であって、以下の(1)および(2)を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップを使用し、かつ、

下記(A)および(B)の工程を有する前記検出方法を提供する。

(1) 被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2) 被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(A) メタノール、および被検出物質を含有する可能性のあるサンプルとをサンプル供給部に供給する工程

(B) 不溶性メンブレン担体上の免疫反応生成物としての被検出物質を検出する工程を含む、前記検出方法。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法であって、以下の(1)および(2)を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップを使用し、かつ、下記(A)および(B)の工程を有する前記検出方法。

(1)被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲート含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2)被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(A)メタノール、および被検出物質を含有する可能性のあるサンプルをサンプル供給部に供給する工程

(B)不溶性メンブレン担体上の免疫反応生成物としての被検出物質を検出する工程を含む、前記検出方法。

## 【請求項 2】

(A)の工程が、あらかじめメタノールを含むサンプル希釈液によって希釈されたサンプルを、サンプル供給部に供給する工程である請求項1に記載の検出方法。

## 【請求項 3】

(A)の工程が、メタノールを含むサンプル希釈液によりサンプルを希釈して、希釈されたサンプルを、サンプル供給部に供給する工程である請求項1に記載の検出方法。

## 【請求項 4】

被検出物質がインフルエンザB型ウイルスであり、標識体に固定化された被検出物質に対する抗体および検出部に固定化された被検出物質に対する抗体が、抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体である、請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

## 【請求項 5】

以下の(a)および(b)を含むイムノクロマトグラフィー用検出キット。

(a)被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを展開させることにより被検出物質を検出するイムノクロマトグラフィー用テストストリップであって以下の(1)および(2)を含むテストストリップ。

(1)被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲート含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2)被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(b)メタノールを含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液

## 【請求項 6】

被検出物質がインフルエンザB型ウイルスであり、標識体に固定化された被検出物質に対する抗体および検出部に固定化された被検出物質に対する抗体が抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体である、請求項5に記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

## 【請求項 7】

(b)が、メタノールを0.1～20%(v/v)含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液である、請求項5または6に記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

## 【請求項 8】

(b)が、pH6.0～10.0の緩衝液中にメタノールを0.1～20%(v/v)含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液である、請求項5～7のいずれかに記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

## 【請求項 9】

インフルエンザB型ウイルス検出のためのイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液で

10

20

30

40

50

あって、メタノールを0.1～20% (v/v) 含有する前記サンプル希釈液。

【請求項10】

pH6.0～10.0の緩衝液中にメタノールを0.1～20% (v/v) 含有する請求項9に記載のサンプル希釈液。

【請求項11】

インフルエンザB型ウイルスを含有する可能性のあるサンプルを展開させることにより当該ウイルスを検出する下記(a)のイムノクロマトグラフィー用テストストリップを含む、インフルエンザB型ウイルス検出キットの製造における、下記(b)のイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液の使用

(a)以下の(1)および(2)を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。

(1)インフルエンザB型ウイルスを含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、抗インフルエンザB型ウイルス抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2)抗インフルエンザB型ウイルス抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(b)メタノールを0.1～20%含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法に関する。また、インフルエンザB型ウイルスを検出するための前記方法に関する。

【背景技術】

【0002】

サンプル中の被検出物質を抗原抗体反応により検出する方法の一つとして、イムノクロマトグラフィー用テストストリップを用いた検出方法が知られている。イムノクロマトグラフィーは、被検出物質に対する抗体が固定化された標識体接合物(上記接合物をコンジュゲートということがある)と被検出物質とによって形成された免疫複合体を、被検出物質に対する抗体を捕捉試薬として固定化した検出部を有する不溶性メンブレン担体を固定相として、緩衝液などの移動相とともに展開させ、該捕捉試薬により捕捉された該免疫複合体を検出する方法である。上記標識体としては、金コロイドなどのコロイド状金属粒子やカラーラテックス粒子が用いられ、検出部の着色度合いから、サンプル中の被検出物質の存在や、場合によってはその量を求めることができる。

【0003】

イムノクロマトグラフィー用テストストリップの典型的な構成としては、サンプルを供給するためのサンプル供給部(以下、サンプルパッドともいうことがある)、コンジュゲートを配置するためのコンジュゲートパッド、抗体などの捕捉試薬がライン状に固定化された検出部を有し、上記免疫複合体を移動相により展開させて捕捉する不溶性メンブレン担体、および不溶性メンブレン担体を展開してきたサンプルを検出部よりも下流で吸収するための吸収パッドが配置された構成をあげることができる。

【0004】

上記構成のイムノクロマトグラフィー用テストストリップにおける検出部において、被検出物質とコンジュゲートとの複合体を検出する方法として、標識体に由来する反射光の強度を測定して吸光度(反射吸光度)を算出する方法がある。反射吸光度は、検出部における被検出物質の検出ラインとその近傍の2部位の反射光強度を測定し、その比を用いて算出するが、該方法を使用する際、上記免疫複合体が検出される検出ラインの上流側および下流側(特に下流側)付近の反射光強度が非特異的に上昇して測定波形に乱れがみられることがある。被検出物質が低濃度のサンプルにおける上記複合体の検出時には、測定波形の乱れを無視してベースラインを引くことができないため、特異的シグナル(ピーク)を正確に検出することができず、測定自体が不可能となることがある。このような測定波

10

20

30

40

50

形の乱れの発生頻度と測定波形の乱れの程度は一定ではないため、測定の再現性が低下したり、測定の都度適切な測定値への補正を行うこと（いいかえれば測定波形の確認）が必要であった。

白色のメンブレンを用いる通常のイムノクロマトグラフィーにおいて、前記測定波形の乱れは、メンブレンにおける該当部位の色がその周辺の色よりも相対的に白く、色が抜けているように見える現象（いわゆる、白抜け現象、以下単に白抜け現象または白抜けということがある）として目視でも観察することができる。

このような白抜け現象が発生する原因は定かではないが、イムノクロマトグラフィー用テストストリップを長期間（例えば、1年以上）保管した後に使用した場合に観察されることが多い。このような白抜け現象を解消するための方法は今までに知られていない。

【0005】

一方、イムノクロマトグラフィーは迅速臨床検査（Point-of-care-testing）で多数実用化され、特にインフルエンザなどの感染症診断で汎用されているが、L T I A など他の免疫学的測定法と同様にインフルエンザ B 型ウイルスの検出感度が低いという問題があり、これもまた解消するための方法が知られていなかった。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0006】

【特許文献1】国際公開2012/043746号パンフレット

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明の目的は、イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法において、テストストリップにおけるいわゆる白抜け現象の発生が抑制され、より正確な検出ができる方法を提供することにある。また、イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法において、特にインフルエンザ B 型ウイルスの検出感度を向上させる方法を提供することも本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決するために鋭意研究を行ったところ、驚くべきことに、イムノクロマトグラフィー用テストストリップを使用した免疫反応において、メタノールをテストストリップ上に存在させることにより、テストストリップのいわゆる白抜け現象の発生が抑えられ、良好な検出ができることを見出した。また、さらに驚くべきことに、前記メタノールの共存により、インフルエンザ B 型ウイルスの検出感度が向上することをも見出し、本発明を完成させるに至った。すなわち、本発明は以下の構成を有する。

〔1〕 イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法であって、

以下の（1）および（2）を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップを使用し、かつ、下記（A）および（B）の工程を有する前記検出方法。

（1）被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含むコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

（2）被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

（A）メタノール、および被検出物質を含有する可能性のあるサンプルをサンプル供給部に供給する工程

（B）不溶性メンブレン担体上の免疫反応生成物としての被検出物質を検出する工程を含む、前記検出方法。

〔2〕（A）の工程が、あらかじめメタノールを含むサンプル希釈液によって希釈されたサンプルを、サンプル供給部に供給する工程である〔1〕に記載の検出方法。

〔3〕（A）の工程が、メタノールを含むサンプル希釈液によりサンプルを希釈して、希

10

20

30

40

50

積されたサンプルを、サンプル供給部に供給する工程である〔1〕に記載の検出方法。

〔4〕被検出物質がインフルエンザB型ウイルスであり、標識体に固定化された被検出物質に対する抗体および検出部に固定化された被検出物質に対する抗体が、抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体である、〔1〕～〔3〕のいずれかに記載の検出方法。

〔5〕以下の(a)および(b)を含むイムノクロマトグラフィー用検出キット。

(a)被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを展開させることにより被検出物質を検出するイムノクロマトグラフィー用テストストリップであって以下の(1)および(2)を含むテストストリップ。

(1)被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2)被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(b)メタノールを含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液

〔6〕被検出物質がインフルエンザB型ウイルスであり、標識体に固定化された被検出物質に対する抗体および検出部に固定化された被検出物質に対する抗体が抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体である、〔5〕に記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

〔7〕(b)が、メタノールを0.1～20%(v/v)含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液である、〔5〕または〔6〕に記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

〔8〕(b)が、pH6.0～10.0の緩衝液中にメタノールを0.1～20%(v/v)含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液である、〔5〕～〔7〕のいずれかに記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

〔9〕インフルエンザB型ウイルス検出のためのイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液であって、メタノールを0.1～20%(v/v)含有する前記サンプル希釈液。

〔10〕pH6.0～10.0の緩衝液中にメタノールを0.1～20%(v/v)含有する〔9〕に記載のサンプル希釈液。

〔11〕インフルエンザB型ウイルスを含有する可能性のあるサンプルを展開させることにより当該ウイルスを検出する下記(a)のイムノクロマトグラフィー用テストストリップを含む、インフルエンザB型ウイルス検出キットの製造における、下記(b)のイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液の使用。

(a)以下の(1)および(2)を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップ

(1)インフルエンザB型ウイルスを含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、抗インフルエンザB型ウイルス抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2)抗インフルエンザB型ウイルス抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(b)メタノールを0.1～20%含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液。

【0009】

なお、本発明において、抗体を固定化させるとは、標識体または不溶性メンブレン担体に物理的あるいは化学的に抗体を担持させることである。

また、本発明でいう検出とは、目視あるいは分析装置を使用した場合を問わず、また、定性的な検出だけでなく、定量が可能な被検出物質については定量的な検出、すなわち測定も含む。

また、本発明において上流(上流側)、下流(下流側)とは、サンプルが供給された後、移動相が展開して行く方向を下流(下流側)としている。

10

20

30

40

50

## 【発明の効果】

## 【0010】

本発明により、イムノクロマトグラフィー用テストストリップのいわゆる白抜け現象の発生を抑制し、正確な測定を実現することができる。また、インフルエンザウイルスの検出において、特にこれまで検出感度が低いことが問題になっていたB型ウイルスを感度良く検出することができる。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0011】

【図1】本発明のイムノクロマトグラフィー用テストストリップの構造模式図の一態様を示す。

10

【図2】本発明のイムノクロマトグラフィー用テストストリップの構造模式図の別の態様を示す。

【図3】本発明のイムノクロマトグラフィー用テストストリップの構造模式図のさらに別の態様を示す。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0012】

(イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法)

本発明の検出方法は、少なくとも下記(1)および(2)の構成を有するイムノクロマトグラフィー用テストストリップを使用し、

(1)被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲート含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

20

(2)被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

かつ、下記(A)および(B)の工程を有することを特徴とする。

(A)メタノール、および被検出物質を含有する可能性のあるサンプルとをサンプル供給部に供給する工程

(B)不溶性メンブレン担体上の免疫反応生成物としての被検出物質を検出する工程

## 【0013】

(メタノールのサンプル供給部への添加)

30

本発明は、イムノクロマトグラフィー用テストストリップのサンプル供給部にメタノールを添加することを特徴とする。メタノールは、100%メタノールとして、あるいは他の溶媒で希釈したメタノール溶液として添加することができる。他の溶媒としては、水溶性の溶媒が好ましく、具体的には、精製水、生理食塩水、pH6.0~10.0の低濃度の緩衝液等が挙げられる。なお、これらの水溶性の溶媒は、サンプル希釈液の成分とも共通するため、希釈サンプルを使用する場合は、メタノールをサンプル希釈液に添加し、サンプルとともにサンプル供給部に添加する態様が好ましい。

なお、イムノクロマトグラフィー用テストストリップが、ラテラルフロー式ではなく、ディップスティック式で設計されている場合には、テストストリップをメタノールを含む溶液に浸漬することによりメタノールの添加に代えることができる。

40

## 【0014】

メタノールを水溶性溶媒で希釈してサンプル供給部に添加する場合、水溶性溶媒中のメタノール濃度としては、0.1~20.0%(v/v)が好ましく、0.5~18.0%(v/v)、0.7~16.0%(v/v)、1.0~15.0%(v/v)、1.5~13.0%(v/v)、1.8~12.0%(v/v)、2.0~11.0%(v/v)がさらに好ましく、2.0~10%(v/v)がよりいっそう好ましい。また、3.0~10.0%(v/v)、4.0~10.0%(v/v)、5.0~10.0%(v/v)が好ましい場合もある。

メタノールは、揮発性であるため、使用時に溶媒に添加して用いることもできるし、あらかじめ前記濃度に調整したメタノール含有溶媒を気密性の高い容器に入れて保存したも

50

のを用いることもできる。

【0015】

(サンプル希釈液)

サンプル希釈液は、サンプル中の被検出物質の濃度に応じて、サンプルの希釈をするために用いられるものであるため、抗原抗体反応を著しく阻害したり、または反対に著しく反応を促進して標識体が過凝集するために毛細管現象における展開不良を起こしたり、抗原濃度に応じた抗原抗体反応のシグナル検出が不可能にさえならなければ、いずれの組成の希釈液を用いても良い。

例えば、精製水、生理食塩水、pH 6.0 ~ 10.0 の低濃度の緩衝液が望ましい。緩衝液のpHは、6.5 ~ 9.5、7.0 ~ 9.0、7.5 ~ 8.5 がよりいっそう望ましい。

10

また、緩衝液としては、例えば10 ~ 20 mmol / L リン酸緩衝液や10 ~ 20 mmol / L Tris - HCl 緩衝液、10 ~ 20 mmol / L Bis - Tris 緩衝液が挙げられる。また、サンプルのストリップでの展開速度を制御する目的で、これらの希釈液に界面活性剤を添加することも可能である。

【0016】

(サンプルの添加)

本発明において、サンプルは、希釈されずに直接、あるいはサンプル希釈液により希釈して、また適宜濾過したものがサンプルとしてサンプル供給部に供給される。

被検出物質を含有する可能性のあるサンプルとしては、体液などの主に生体(生物)由来の物質やそれらから被検出物質を抽出した抽出液等が挙げられる。生体(生物)由来の物質としては、具体的には、血液、尿、便、鼻孔・鼻腔・咽頭・鼻咽頭などを由来とする鼻汁液や鼻汁吸引液、喀痰やスワブ検体として収集された分泌液、唾液等が挙げられる。中でも、被検出物質をインフルエンザウイルスとする場合、サンプルとしては、鼻孔・鼻腔・咽頭・鼻咽頭などを由来とする鼻汁液や鼻汁吸引液、喀痰やスワブ検体として収集された分泌液等が好ましい。

20

【0017】

(被検出物質)

本発明において、被検出物質としては、ウイルス、および一般に抗原抗体反応を利用して測定し得るタンパク質などの生理活性物質等が挙げられる。

30

上記ウイルスとしては、例えば、インフルエンザA型ウイルスやインフルエンザB型ウイルスなどのインフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス等が挙げられ、上記タンパク質としては、例えば、ヒトヘモグロビン、B型肝炎ウイルス抗体、C型肝炎ウイルス抗体、ヒト免疫不全ウイルス抗体等が挙げられる。中でも、インフルエンザウイルスを被検出物質とするのが好ましく、後述する検出部を複数個所形成して、インフルエンザA型ウイルスおよびインフルエンザB型ウイルスを被検出物質とするのがより好ましく、インフルエンザB型ウイルスがもっとも好ましい。特に、その理由は明らかではないが、本発明によりインフルエンザB型ウイルスを従来に比べて高い検出感度で検出することができるようになった。

【0018】

(検出)

不溶性メンブレン担体上の免疫反応生成物としての被検出物質を検出する方法としては、標識体に由来するシグナルを検出できる方法であればいずれの方法でもよく、公知の方法が挙げられる。例えば標識体が金コロイドの場合は、吸光度あるいは反射光強度を検出すればよく、標識体がカラーラテックスの場合は、着色強度を検出すればよい。

本発明によれば、白色の不溶性メンブレンを用いて光学的に検出する場合においても、いわゆる、白抜け現象の発生が抑えられるため、乱れのない波形が得られ、正確な検出および測定を行うことができる。

40

【0019】

(被検出物質に対する抗体)

50

本発明において、被検出物質に対する抗体は、被検出物質に免疫学的に特異的な結合が可能な抗体である。被検出物質に対する抗体は、後述する標識体および検出部に固定化される。標識体および検出部に固定化される抗体は同一であってもよいが、標識体と検出部とで別のものであることが好ましい。標識体に固定化される抗体または抗原と、検出部に固定化される抗体とで、別のものを用いることにより、得られるイムノクロマトグラフィ用テストストリップにおいて、コンジュゲートと結合した被検出物質と検出部の抗体または抗原との反応と、コンジュゲートと結合した被検出物質と未反応のコンジュゲートとの反応とが競合するのを抑制することができるとともに、コンジュゲートと結合した被検出物質と検出部の抗体との反応性を上げることができ、結果としてイムノクロマトグラフィ用テストストリップの感度が良好になる。なお、別のものとは、種類が異なることをいい、具体的には異なるエピトープを認識する抗体をいう。

10

さらに、標識体および検出部に固定化される抗体はモノクローナル抗体が好ましい。モノクローナル抗体を用いることで、反応の特異性を上げることができる。

被検出物質がインフルエンザウイルスの場合、標識体および検出部に固定化される抗体は、インフルエンザウイルスを検出できる抗体であればいずれでもよいが、抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体、抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体等の抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体が好ましい。

また、これらの抗体の分子全体のほかに、抗原抗体反応活性を有する抗体の機能性断片も本発明では同じく抗体として取り扱う。抗体の機能性断片としては、動物への免疫工程を経て得られたもののほか、遺伝子組み換え技術を使用して得られたものや、キメラ抗体が挙げられる。抗体の機能性断片としては、例えば、 $F(ab')_2$ 、 $Fab'$ などが挙げられる。これらの機能性断片は前記抗体をタンパク質分解酵素（例えば、ペプシンやパパインなど）で処理することにより製造できる。標識体に機能性断片化抗体である $F(ab')_2$ を用いた場合、例えば、標識体に抗体が結合されたコンジュゲートの大きさを小さくすることができ、コンジュゲートパッドおよび不溶性メンブレン担体中における展開性に優れたものとなる。また、被検出物質によっては、機能性断片化抗体を用いることにより、反応の特異性を上げることが可能となる。

20

#### 【0020】

(標識体)

これらの抗体に標識する標識体としては、金コロイド粒子、白金コロイド粒子、カラーラテックス粒子、磁性粒子などが好ましく、特にカラーラテックス粒子が好ましい。

30

カラーラテックス粒子は、例えば特開平6-306108号公報の〔0022〕記載の方法に従い、乳化剤を使用しないソープフリー重合によりポリスチレン系粒子を作製し、同〔0025〕から〔0035〕までに記載された方法に準じて作製可能であり、Seradyn社やMagsphere社などから市販されている着色粒子を用いることも出来る。以下の説明では、標識体としてカラーラテックス粒子を用いた場合について詳述する。

#### 【0021】

(コンジュゲート)

本発明で用いられるコンジュゲートは、上記のような標識体に被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体が固定化されたものである。被検出物質がインフルエンザウイルスの場合、コンジュゲートは、カラーラテックス粒子に抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体が固定化されたものが好ましい。

40

上記抗体のカラーラテックス粒子への固定化は、通常化学結合によって行うが、この際の抗体濃度は $1\text{ mg/mL} \sim 5\text{ mg/mL}$ に調製されるのが好ましく、緩衝液およびpHは、 $20\text{ mmol/L}$  MES緩衝液(pH 5.5 - 6.5)または $50\text{ mmol/L}$  ホウ酸緩衝液(pH 8 - 9)が好ましく、さらに好ましくは $20\text{ mmol/L}$  MES緩衝液(pH 6.5)である。また、カラーラテックス粒子上の抗体が結合していない領域は、BSAなどを結合させブロッキングするのが好適である。このようにして作製されたカラーラテックス粒子標識抗体は、変性を阻止するための保存試薬中に分散され保存される

50

。この変性阻止剤としては、BSAなどの蛋白質、グリセリン、糖などが用いられる。

#### 【0022】

##### (サンプルパッド)

本発明において、「サンプルパッド」とは、サンプルを受け入れるサンプル供給部を担う部位であり、後述するコンジュゲートパッドの上流に、前記パッドと接して配置される。サンプルパッドは液体のサンプルを吸収し、液体と検出対象物の成分とが通り抜けることができる物質および形態であればいずれのものをも含む。

サンプルパッドに適した材料の具体例として、ガラス繊維（グラスファイバー）、アクリル繊維、親水性ポリエチレン材、乾燥紙、紙パルプ、織物等が含まれるが、これらに限定されない。好適には、グラスファイバー製パッドが用いられる。

該サンプルパッドは、コンジュゲートパッドの上流であって、コンジュゲートパッドと接触可能に配置されるが、サンプルパッドにコンジュゲートパッドの機能を併せ持たせることも可能である。すなわち、サンプルパッドはコンジュゲートパッドでもあり、サンプルパッドは独立している必要はない。この場合、同一パッド内で上流側がサンプルパッドの機能、下流側がコンジュゲートパッドの機能を有する構成であるがこれについてはコンジュゲートパッドの段落にて説明する。

また、サンプルパッドには、本発明の目的を逸脱せず、反応系に影響のない範囲において、必要に応じ通常使用されるブロッキング試薬、緩衝液成分、サンプルが血液の場合には、血液凝集剤等を含ませることもできる。その場合、サンプルパッドの少なくとも一部に含まれていればよく、全部に含ませることもできる。

#### 【0023】

##### (コンジュゲートパッド)

本発明で用いられるコンジュゲートパッドは、サンプルパッドを通過した、サンプルが展開可能であり、かつ、コンジュゲートを保持可能なパッド状の多孔質材料からなり、その一部あるいは全部にコンジュゲートを保持する。

コンジュゲートパッドは、コンジュゲートを含有しており、その一部に含有する場合は例えば、サンプルの展開方向に直行するようにライン状にコンジュゲートが保持されるのが好ましい。

また、ライン状のコンジュゲート部のライン幅は、被検出物質の検出に必要な量のコンジュゲートを含有させられる程度の幅があればよく、3～5mmが望ましい。

#### 【0024】

コンジュゲートパッドは、その下流側の端部の下面が後述する不溶性メンブレン担体の上面に接触するように不溶性メンブレン担体と積層される。コンジュゲートパッドは、サンプル供給部の下面は不溶性メンブレン担体の上面と接触せず、コンジュゲート部の下面は不溶性メンブレン担体の上面と接触するように、不溶性メンブレン担体と積層される。積層は、コンジュゲートパッドの下面と不溶性メンブレン担体の上面とが接触していればよく、固定化する必要はない。コンジュゲートパッドの下面と不溶性メンブレン担体の上面との接触部分は、コンジュゲートパッド下面の一部分であってもよいが、望ましくは半分以上である。また、コンジュゲートパッド下面の全面が不溶性メンブレン担体の上面と接触することも望ましい態様である。コンジュゲートパッドでは、サンプル中の被検出物質（インフルエンザウイルス）とコンジュゲート（抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体が固定化されたカララテックス粒子）とが複合体（凝集体）を形成する。その後、サンプルはコンジュゲート部の下面に接触して配置されている不溶性メンブレン担体へと展開される。

なお、上述のように同一パッド内でサンプルパッドの機能およびコンジュゲートパッドの機能を有する構成とした場合、パッドの下流側の部分にコンジュゲート部、上流側の部分に、サンプル供給部が形成されており、このサンプル供給部は前記サンプルパッドの役割を担う部分に相当する。被検出物質を含有する可能性のあるサンプルがコンジュゲートパッドのサンプル供給部に供給されると、サンプルは、上流側のサンプル供給部から、コンジュゲートを含まない多孔質材料部分を通して下流側のコンジュゲート部へと流れる。

## 【0025】

上記コンジュゲートパッドを構成する多孔質材料としては、紙、セルロース混合物、トロセルロース、ポリエステル、アクリロニトリルコポリマー、ガラス、レーヨン等のような不織繊維からなるパッドが挙げられる。中でもガラス繊維からなるパッド（グラスファイバー製パッド）が好ましい。

## 【0026】

（不溶性メンブレン担体）

本発明で用いられる不溶性メンブレン担体は、被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体が固定化された少なくとも1つの検出部を有する。被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体の不溶性メンブレン担体への固定化は、従来公知の方法で実施することができる。ラテラルフロー式のイムノクロマトグラフィ用テストストリップの場合には、次のように固定化を行う。上記の抗体を所定の濃度で含有する液を調製し、次に、ノズルから液を一定の速度で吐出しながら水平方向に移動させることのできる機構を有する装置などを用いて、上記液をライン状に不溶性メンブレン担体に塗布し、乾燥させることにより固定化させることができる。

上記液の抗体の濃度は0.1～5mg/mLが好ましく、0.5～2mg/mLがさらに好適である。また、抗体の不溶性メンブレン担体への固定化量は、ラテラルフロー式の場合には上記の装置のノズルからの吐出速度を調節することによって最適化でき、0.5～2μL/cmが好適である。

なお、上記ラテラルフロー式のイムノクロマトグラフィ用テストストリップを用いた測定方法は、コンジュゲートパッドの、不溶性担体と接触する部分から供給されるサンプルが、毛細管現象により不溶性メンブレン担体に対して並行方向に移動するように展開する方式の測定方法である。

また、上記の抗体を所定の濃度で含有する液は、緩衝液に抗体を添加することにより調製することができる。該緩衝液の種類としては、リン酸緩衝液、トリス緩衝液、グッド緩衝液など通常使用される緩衝液をあげることができる。緩衝液のpHは6.0～9.5の範囲が好ましく、6.5～8.5がより好ましい。緩衝液には、さらに塩化ナトリウムなどの塩類、スクロースなどの安定剤や保存剤、プロクリンなどの防腐剤等を含んでもよい。塩類は塩化ナトリウムなどのようにイオン強度の調整のために含ませるもののほか、水酸化ナトリウムなど緩衝液のpHを調整する目的で添加するものも含まれる。

不溶性メンブレン担体に抗体を固定化した後、さらに、通常使用されるブロッキング剤を溶液あるいは蒸気状にして抗体を固定化した部位以外を被覆し、ブロッキングを行うこともできる。

なお、不溶性メンブレン担体には、従来からイムノクロマトグラフィ用テストストリップで用いられているコントロール捕捉試薬を固定化してもよい。該コントロール捕捉試薬は、アッセイの信頼性を担保するための試薬であって、コンジュゲートパッドに含ませたコントロール試薬を捕捉するものである。例えば、コンジュゲートパッドに標識されたKLHをコントロール試薬として含む場合には、抗KLH抗体などがコントロール捕捉試薬に該当する。コントロール捕捉試薬を固定化する位置は、アッセイ系の設計に適合するよう適宜選択することができる。

## 【0027】

本発明で用いられる不溶性メンブレン担体を構成するメンブレンとしては、従来からイムノクロマトグラフィ用テストストリップの不溶性メンブレン担体として用いられている公知のメンブレンが使用できる。例えば、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ナイロン類、ガラス、セルロースやセルロース誘導体などの多糖類、セラミックス等からなる繊維から構成されるメンブレンがあげられる。具体的には、ザルトリウス社、ミリポア社、東洋濾紙社、ワットマン社などから市販されているガラス繊維ろ紙やセルロースろ紙などが挙げられる。中でも、ザルトリウス社、Uni Sart CN140が好ましい。また、この不溶性メンブレン担体の孔径と構造を適宜選択することにより、コンジュゲートとサンプル中の被検出物質との複合体が不溶性メンブレン担体中を流れる速度を制

10

20

30

40

50

御することが可能である。

【0028】

(吸収パッド)

本発明のイムノクロマトグラフィー用テストストリップにおいては、上記不溶性メンブレン担体の下流側端部に吸収パッドを設置するのが好ましい。吸収パッドとは、不溶性メンブレン担体を移動・通過したサンプルを吸収することにより、サンプルの展開を制御する液体吸収性を有する部位である。吸収パッドとしては、従来からイムノクロマトグラフィー用テストストリップに用いられている公知の吸収パッドが用いられ、例えば、ろ紙を用いることができる。好適には、Whatman社、740-Eが用いられる。

【0029】

(イムノクロマトグラフィー用テストストリップ)

本発明のイムノクロマトグラフィー用テストストリップは、少なくとも上記コンジュゲートパッドと不溶性メンブレン担体を含む。コンジュゲートパッドおよび不溶性メンブレン担体は、コンジュゲートパッドの下面と不溶性メンブレン担体の上面とが接触するように積層されている。ここで、コンジュゲートパッドのコンジュゲート部の下面の一部または全部は、不溶性メンブレン担体の上面と接触するように配置されている。また、上記で述べた通り、不溶性メンブレン担体の下流側端部には、さらに吸収パッドが配置されていることが好ましい。

上記イムノクロマトグラフィー用テストストリップは、プラスチック製粘着シートのような固相支持体上に配置させることが好ましい。該固相支持体は、サンプルおよびコンジュゲートの毛管流を妨げない物質で構成する。また、イムノクロマトグラフィー用テストストリップを固相支持体上に接着剤等で固定化してもよい。この場合、接着剤の成分等においてもサンプルおよびコンジュゲートの毛管流を妨げない物質で構成する。なお、不溶性メンブレン担体の機械的強度を上げ且つアッセイ中の水分の蒸発(乾燥)を防ぐ目的でポリエステルフィルムなどをラミネートすることも可能である。該イムノクロマトグラフィー用テストストリップは、イムノクロマトグラフィー用テストストリップの大きさ、サンプルの添加方法や添加位置、不溶性メンブレン担体の検出部の形成位置、シグナルの検出方法などを考慮した適当な容器(ハウジング)に格納・搭載して使用することができ、このように格納・搭載された状態を「デバイス」という。

また、本発明のイムノクロマトグラフィー用テストストリップは、コンジュゲートパッドと不溶性メンブレン担体を含み、さらに測定条件、サンプルに応じて他の試薬や構成を含み得る。他の試薬としては、例えば非特異反応を防止するブロッキング剤が挙げられ、他の構成としては、例えば、試料中における測定に不要な成分を除去するための3rd padが挙げられる。

【0030】

本発明のイムノクロマトグラフィー用テストストリップの典型的な構造の模式図を図1に示す。

プラスチック製粘着シート(a)に上記抗体固定化メンブレン(b)を貼り、次いで、上記コンジュゲートパッド(d)を配置装着し、さらにこのコンジュゲートパッドに重なるようにサンプルパッド(e)を配置装着し、反対側の端には吸収パッド(f)を配置装着する。抗体固定化メンブレン(b)には、(c1)抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体、(c2)抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体、(c3)コントロール抗体がライン状に固定化されており、サンプルの通過により、それぞれAライン、Bライン、コントロールラインが現れるように構成されている。

このような構造を有するイムノクロマトグラフィー用テストストリップとしては、ラピッドテスト(登録商標)FLUII、積水メディカル株式会社製)等が挙げられる。

また、図1の構造のテストストリップにおいて、コンジュゲートパッド(d)がサンプルパッド(e)の役割を担った場合の構造を図2に示す。また、サンプルパッドのごく一部にコンジュゲート部(g)が形成されている場合の構造を図3に示す。

このような構造を有するイムノクロマトグラフィー用テストストリップとしては、ラピ

10

20

30

40

50

ッドテスト(登録商標)カラーFLUスティック(積水メディカル株式会社製)等が挙げられる。

【0031】

(キット)

本発明のイムノクロマトグラフィー用検出キットは、少なくとも上記ノクロマトグラフィー用テストストリップとメタノールを含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液とを含む。

【0032】

本発明について、ここまで抗原を被検出物質とするサンドイッチ型の検出について説明をしたが、本発明は、被検出物質が抗体である場合や、競合型の検出にも適用可能であり、さらに被検出物質と特異的な結合ができることを限度として、抗体に代えレクチン、レセプター、核酸鎖も使用することができる。

10

【実施例】

【0033】

次に実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、これらは本発明の範囲を限定するものではない。

【0034】

実施例1(白抜け評価試験)

添付文書記載の温度で、2年間、未開封のまま保存したイムノクロマトグラフィー用テストストリップ(積水メディカル製、ラピッドテスト(登録商標)カラーFLUスティック、Lot.K1221221077P)を用いて白抜けの評価を行った。上記テストストリップ付属の検体希釈液(トリス緩衝液(pH8.5))に、グリセリンまたはメタノールを加え、全体の体積に対して、1%、5%および10%のグリセリンを含有する検体希釈液、または1%、5%および10%のメタノールを含有する検体希釈液をそれぞれ調製した。各群n=3でそれぞれの検体希釈液にイムノクロマトグラフィー用テストストリップを浸漬させ、10分間クロマトグラフ上で検体希釈液を展開させた。その後、それぞれのテストストリップで起きる白抜け発生を目視で確認した。その結果を表1に示す。

20

同様に1%、5%および10%のエタノールを含む検体希釈液に浸漬させ、同様の試験を行った。その結果を表2に示す。

なお、表中の「A line」および「B line」は抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体、抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体をそれぞれ固定化した部位であり、各ウイルスが検出されるとライン状に着色する部分である。また「Cont.」はコントロール捕捉試薬である抗KLH抗体が固定化された部位であり、コンジュゲート中のKLHを検出するとライン状に着色する。また表中の評価結果は、「-」は「白抜けなし」、「+」は「白抜けがごく細く、わずかにある。」、「++」は「白抜けのラインは細く、判定に影響を与えないレベル」、「+++」は「白抜けのラインはやや太いが、判定に影響を与えないレベル」、「++++」は「白抜けのラインは太く、判定に影響を与えるレベル」という基準で評価した。これらの表記は以降の試験でも共通のものとする。

30

【表 1】

No.	添加なし 検体希釈液			グリセリン 1%			グリセリン 5%			グリセリン 10%			メタノール 1%			メタノール 5%			メタノール 10%		
	A line	B line	Cont.	A line	B line	Cont.	A line	B line	Cont.	A line	B line	Cont.	A line	B line	Cont.	A line	B line	Cont.	A line	B line	Cont.
1	++	++	++	++	++	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-	-	-	-	-
2	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++			
3	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	-	-	-	-	-	-

10

【表 2】

No.	エタノール 1%			エタノール 5%			エタノール 10%		
	A line	B line	Cont.	A line	B line	Cont.	A line	B line	Cont.
1	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
2	++++	++++	++++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

20

## 【0035】

(結果)

グリセリン、メタノールまたはエタノールのいずれの添加もない検体希釈液での成績を対照とした場合、グリセリンが添加された検体希釈液を使用した場合は、白抜けの発生は同程度であったが、メタノールを5%または10%含有する検体希釈液を使用した場合には、白抜けの発生が顕著に抑制された。

一方、エタノールを含有する検体希釈液を使用した場合には、白抜けの発生は抑制されず、むしろ白抜けの程度が増した。

30

なお、色調見本に基づき求めた「Cont.」の着色強度は、いずれの場合も2.5～3.75であり、正常に使用できる範囲内であった。

## 【0036】

実施例2(加速試験)

製造直後のイムノクロマトグラフィー用テストストリップと、60 で10日間、および20日間保存したイムノクロマトグラフィー用テストストリップを、5%および10%のメタノールを含有する検体希釈液に浸漬させ、実施例1と同様に10分間展開させた後、それぞれの白抜け発生を目視で確認した。結果を表3に示す。

【表 3】

No.	添加なし 検体希釈液						メタノール 5%添加						メタノール 10%添加					
	0time		60°C 10日		60°C 20日		0time		60°C 10日		60°C 20日		0time		60°C 10日		60°C 20日	
	A line	B line	A line	B line	A line	B line	A line	B line	A line	B line	A line	B line	A line	B line	A line	B line	A line	B line
1	++	++	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
2	++	++	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
3	+++	+++	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
4	+	+	+	+	++	++	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
5	++	++	++	++	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

40

## 【0037】

50

(結果)

5%および10%のメタノールを含有する検体希釈液を使用した場合、製造直後、60で10日間、および20日間保存したイムノクロマトグラフィー用テストストリップ何れにおいても、白抜け発生の抑制および程度の軽減が認められた。特に10%メタノールを含有する検体希釈液を使用した場合において、顕著な白抜け発生の抑制が確認された。

【0038】

実施例3 (A line、B lineの着色強度比較)

イムノクロマトグラフィー用テストストリップを用いて「A line」、「B line」の着色強度を比較した。5%および10%のメタノールを含有する検体希釈液330μLと、インフルエンザA型およびインフルエンザB型の各株の不活化ウイルス抗原を表4、表5に示す倍率(表中、インフルエンザウイルスの種類の下にそれぞれ記載)で生理食塩水で希釈した試料50μLを混合しサンプルとした。各群n=2で、それぞれの不活化ウイルス抗原を加えたサンプル135μLにテストストリップを浸漬させ、10分間テストストリップ上で検体希釈液を展開させた。その後、それぞれのウイルスの検出部位における着色強度を色調見本に基づき求めた。インフルエンザA型の結果を表4に、インフルエンザB型の結果を表5に示した。

10

【表4】

A H1N1

	No.	現行	メタノール 5%	メタノール 10%
		A line	A line	A line
A/H1 pdm lot.111026 1/20	1	1.75	2	1.75
	2	2	2	2
A/Brisbane/59/2007 lot.090608 1/100	1	1.5	1.5	1.5
	2	1.5	1.25	1.5
A/Solomon Islands/3/2006 lot.070615 1/20	1	2.25	2.5	2.25
	2	2.25	2.25	2.25

A H3N2

	No.	現行	メタノール 5%	メタノール 10%
		A line	A line	A line
A/Kitakyushu/159/93 lot.110614 1/400	1	1.5	1.5	1.5
	2	1.5	1.5	1.5
A/Uruguay/716/2007 lot.090608 1/100	1	1.25	1.5	1.25
	2	1.5	1.25	1.25
A/Wisconsin/67/2005 lot.070615 1/200	1	1	1.25	1.25
	2	1.25	1.25	1.25

20

【表5】

	n=	現行	メタノール 5%	メタノール 10%
		B line	B line	B line
B/Lee/40 lot.110610 1/100	1	1.5	1.75	2
	2	1.75	2	2
B/Florida/4/2006 lot.100521 1/50	1	1.5	1.75	2
	2	1.5	1.75	1.75
B/Shanghai/361/2002 lot.050813-1 1/50	1	2.25	2.75	2.75
	2	2.25	2.75	2.75

30

【0039】

(結果)

インフルエンザA型ウイルスの不活化抗原を用いた場合、何れの株においても、検体希釈液に5%および10%のメタノールを添加させたか否かにかかわらず、着色強度に変化は見られなかった。一方、インフルエンザB型ウイルスの不活化抗原を用いた場合、メタノールを加えたことによって、着色強度の上昇が見られた。

40

【産業上の利用可能性】

【0040】

本発明のイムノクロマトグラフィーを利用した検出方法テストストリップのいわゆる白抜けがなく、正確な検出方法を提供することができる。また、本発明をインフルエンザB型ウイルスの検出に適用した場合には、特に、従来よりも感度に優れた検出方法を提供す

50

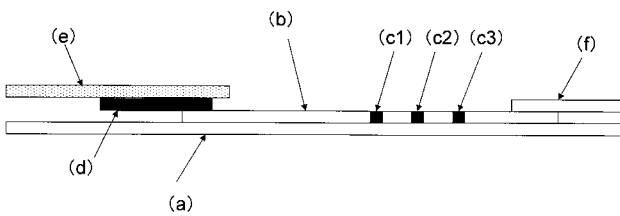
ることができる。

【符号の説明】

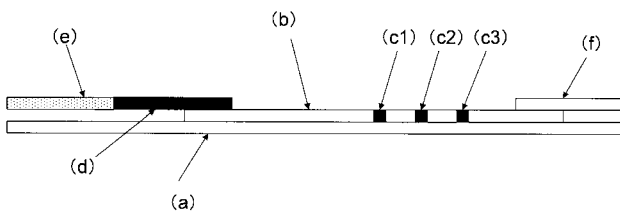
【0041】

- (a) プラスチック製粘着シート
- (b) 抗体固定化メンブレン
- (c1) 抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体
- (c2) 抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体
- (c3) コントロール抗体
- (d) コンジュゲートパッド
- (e) サンプルパッド
- (f) 吸収パッド
- (g) コンジュゲート部

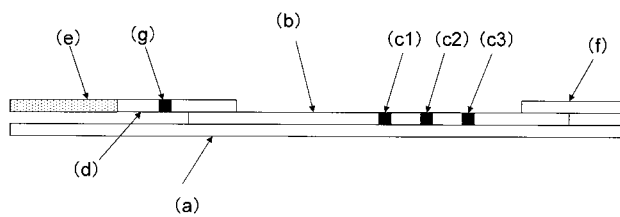
【図1】



【図2】



【図3】



## 【手続補正書】

【提出日】平成27年5月18日(2015.5.18)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法であって、以下の(1)および(2)を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップを使用し、かつ、下記(A)および(B)の工程を有する前記検出方法。

(1)被検出物質(ただし、水難溶性化合物を除く。以下本請求項において同じ。)を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2)被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(A)メタノール、および被検出物質を含有する可能性のあるサンプルをサンプル供給部に供給する工程

(B)不溶性メンブレン担体上の免疫反応生成物としての被検出物質を検出する工程を含む、前記検出方法。

【請求項2】

(A)の工程が、あらかじめメタノールを含むサンプル希釈液によって希釈されたサンプルを、サンプル供給部に供給する工程である請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】

(A)の工程が、メタノールを含むサンプル希釈液によりサンプルを希釈して、サンプル供給部に供給する工程である請求項1に記載の検出方法。

【請求項4】

被検出物質がウイルス/及び抗原抗体反応を利用して測定し得るタンパク質のいずれか1種以上である、請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

【請求項5】

被検出物質がヒトヘモグロビン、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスのいずれか1種以上である、請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

【請求項6】

被検出物質がインフルエンザB型ウイルスであり、標識体に固定化された被検出物質に対する抗体および検出部に固定化された被検出物質に対する抗体が、抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体である、請求項1～5のいずれかに記載の検出方法。

【請求項7】

(B)の検出工程が、吸光度または反射光強度を検出する工程である請求項1～6のいずれかに記載の検出方法。

【請求項8】

以下の(a)および(b)を含むイムノクロマトグラフィー用検出キット。

(a)被検出物質(ただし、水難溶性化合物を除く。以下本請求項において同じ。)を含有する可能性のあるサンプルを展開させることにより被検出物質を検出するイムノクロマトグラフィー用テストストリップであって以下の(1)および(2)を含むテストストリップ。

(1)被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュ

ゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2) 被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(b) メタノールを含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液

【請求項9】

被検出物質がインフルエンザB型ウイルスであり、標識体に固定化された被検出物質に対する抗体および検出部に固定化された被検出物質に対する抗体が抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体である、請求項8に記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

【請求項10】

(b) が、メタノールを0.1~20%(v/v)含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液である、請求項8または9に記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

【請求項11】

(b) が、pH6.0~10.0の緩衝液中にメタノールを0.1~20%(v/v)含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液である、請求項8~10のいずれかに記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

【請求項12】

インフルエンザB型ウイルス検出のためのイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液であって、メタノールを0.1~20%(v/v)含有する前記サンプル希釈液。

【請求項13】

pH6.0~10.0の緩衝液中にメタノールを0.1~20%(v/v)含有する請求項12に記載のサンプル希釈液。

【請求項14】

インフルエンザB型ウイルスを含有する可能性のあるサンプルを展開させることにより当該ウイルスを検出する下記(a)のイムノクロマトグラフィー用テストストリップを含む、インフルエンザB型ウイルス検出キットの製造における、下記(b)のイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液の使用。

(a) 以下の(1)および(2)を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。

(1) インフルエンザB型ウイルスを含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、抗インフルエンザB型ウイルス抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2) 抗インフルエンザB型ウイルス抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(b) メタノールを0.1~20%含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液

【手続補正書】

【提出日】平成27年8月7日(2015.8.7)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法であって、

以下の(1)および(2)を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップを使用し、かつ、下記(A)および(B)の工程を有する前記検出方法。

(1) 被検出物質(ただし、水難溶性化合物を除く。以下本請求項において同じ。)を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下

流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2) 被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(A) メタノールを1.5～20% (v/v) 含むサンプル希釈液によって希釈された被検出物質を含有する可能性のあるサンプルをサンプル供給部に供給する工程

(B) 不溶性メンブレン担体上の免疫反応生成物としての被検出物質を検出する工程を含む、前記検出方法。

【請求項2】

被検出物質がウイルス/及び抗原抗体反応を利用して測定し得るタンパク質のいずれか1種以上である、請求項1に記載の検出方法。

【請求項3】

被検出物質がヒトヘモグロビン、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、C型肝炎ウイルス、ヒト免疫不全ウイルスのいずれか1種以上である、請求項1または2に記載の検出方法。

【請求項4】

被検出物質がインフルエンザB型ウイルスであり、標識体に固定化された被検出物質に対する抗体および検出部に固定化された被検出物質に対する抗体が、抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体である、請求項1～3のいずれかに記載の検出方法。

【請求項5】

(B)の検出工程が、吸光度または反射光強度を検出する工程である請求項1～4のいずれかに記載の検出方法。

【請求項6】

以下の(a)および(b)を含むイムノクロマトグラフィー用検出キット。

(a) 被検出物質(ただし、水難溶性化合物を除く。以下本請求項において同じ。)を含有する可能性のあるサンプルを展開させることにより被検出物質を検出するイムノクロマトグラフィー用テストストリップであって以下の(1)および(2)を含むテストストリップ。

(1) 被検出物質を含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、被検出物質に対する抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2) 被検出物質に対する抗体が固定化された検出部を少なくとも1つ有する、不溶性メンブレン担体

(b) メタノールを1.5～20% (v/v) 含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液

【請求項7】

被検出物質がインフルエンザB型ウイルスであり、標識体に固定化された被検出物質に対する抗体および検出部に固定化された被検出物質に対する抗体が抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体である、請求項6に記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

【請求項8】

(b)が、メタノールを1.5～20% (v/v) 含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液である、請求項6または7に記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

【請求項9】

(b)が、pH 6.0～10.0の緩衝液中にメタノールを1.5～20% (v/v) 含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液である、請求項6～8のいずれかに記載のイムノクロマトグラフィー用検出キット。

【請求項10】

インフルエンザB型ウイルス検出のためのイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液で

あって、メタノールを 1.5 ~ 20 % ( v / v ) 含有する前記サンプル希釈液。

【請求項 11】

pH 6.0 ~ 10.0 の緩衝液中にメタノールを 1.5 ~ 20 % ( v / v ) 含有する請求項 10 に記載のサンプル希釈液。

【請求項 12】

インフルエンザ B 型ウイルスを含有する可能性のあるサンプルを展開させることにより当該ウイルスを検出する下記 ( a ) のイムノクロマトグラフィー用テストストリップを含む、インフルエンザ B 型ウイルス検出キットの製造における、下記 ( b ) のイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液の使用。

( a ) 以下の ( 1 ) および ( 2 ) を含むイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。

( 1 ) インフルエンザ B 型ウイルスを含有する可能性のあるサンプルを供給するサンプル供給部と、前記サンプル供給部よりも下流側に、抗インフルエンザ B 型ウイルス抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

( 2 ) 抗インフルエンザ B 型ウイルス抗体が固定化された検出部を少なくとも 1 つ有する、不溶性メンブレン担体

( b ) メタノールを 1.5 ~ 20 % ( v / v ) 含有するイムノクロマトグラフィー用サンプル希釈液

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP2014/081753
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/543(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/576(2006.01)i  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N33/543, G01N33/531, G01N33/576  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 1996-2015 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2015 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2015  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 10-332699 A (Iatron Laboratories, Inc.), 18 December 1998 (18.12.1998), entire text; particularly, claims; paragraphs [0009], [0026] to [0029], [0047] to [0052] (Family: none)	1-3, 5, 7, 8/4, 6, 9-11
Y	WO 2005/007698 A1 (Fujirebio Inc.), 27 January 2005 (27.01.2005), entire text & HK 1096975 A & KR 10-2006-0054333 A & CN 1826355 A & RU 2006103302 A	4, 6, 9-11
Y	WO 2012/043746 A1 (Sekisui Medical Co., Ltd.), 05 April 2012 (05.04.2012), entire text; all drawings & US 2013/0244314 A1 & EP 2623982 A1 & CN 103314297 A & KR 10-2013-0101071 A	4, 6, 9-11
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> 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 27 February 2015 (27.02.15)		Date of mailing of the international search report 10 March 2015 (10.03.15)
Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2014/081753

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Masataka ICHIKAWA et al., "Immunochromatography-ho to Koso Men'ekiho o Kumiawaseta Genri ni yoru Atarashii Influenza Jinsoku Shindan Kit (Espline Influenza A & B) no Kento", The Journal of Medicine, 2003.03, vol.49, no.3, pages 469 to 478	4, 6, 9-11
A	Nakagawa N et al., Rapid detection and identification of two lineages of influenza B strains with monoclonal antibodies., J Virol Methods., 1999.04, Vol.79, No.1, Page.113-120	1-11

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2014/081753									
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/576(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 (IPC)) Int.Cl. G01N33/543, G01N33/531, G01N33/576											
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 <table border="0"> <tr> <td>日本国実用新案公報</td> <td>1922-1996年</td> </tr> <tr> <td>日本国公開実用新案公報</td> <td>1971-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国実用新案登録公報</td> <td>1996-2015年</td> </tr> <tr> <td>日本国登録実用新案公報</td> <td>1994-2015年</td> </tr> </table>				日本国実用新案公報	1922-1996年	日本国公開実用新案公報	1971-2015年	日本国実用新案登録公報	1996-2015年	日本国登録実用新案公報	1994-2015年
日本国実用新案公報	1922-1996年										
日本国公開実用新案公報	1971-2015年										
日本国実用新案登録公報	1996-2015年										
日本国登録実用新案公報	1994-2015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)											
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/Y	JP 10-332699 A (株式会社ヤトロン) 1998.12.18, 全文、特に、【特許請求の範囲】、段落【0009】、【0026】-【0029】、【0047】-【0052】等参照 (ファミリーなし)	1-3, 5, 7, 8/ 4, 6, 9-11									
Y	WO 2005/007698 A1 (富士レビオ株式会社) 2005.01.27, 全文等参照 & HK 1096975 A & KR 10-2006-0054333 A & CN 1826355 A & RU 2006103302 A	4, 6, 9-11									
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> 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		の日の後に公表された文献									
「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		「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									
「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		「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									
「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)		「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									
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献		「&」同一パテントファミリー文献									
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願											
国際調査を完了した日 27.02.2015		国際調査報告の発送日 10.03.2015									
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 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	2 J 4075								
		電話番号 03-3581-1101 内線 3252									

国際調査報告		国際出願番号 PCT/J P 2 0 1 4 / 0 8 1 7 5 3
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
Y	WO 2012/043746 A1 (積水メディカル株式会社) 2012.04.05, 全文・全図等 参照 & US 2013/0244314 A1 & EP 2623982 A1 & CN 103314297 A & KR 10-2013-0101071 A	4, 6, 9-11
Y	市川正孝、外14名, イムノクロマトグラフィー法と酵素免疫法を組み合わせた原理による新しいインフルエンザ迅速診断キット (エスプライン インフルエンザA&B) の検討, 医学と薬学, 2003.03, Vol. 49, No. 3, Page. 469-478	4, 6, 9-11
A	Nakagawa N、外4名, Rapid detection and identification of two lineages of influenza B strains with monoclonal antibodies., J Virol Methods., 1999.04, Vol. 79, No. 1, Page. 113-120	1-11

---

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(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), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(注) この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。

专利名称(译)	使用免疫层析法的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">JPWO2015080286A1</a>	公开(公告)日	2017-03-16
申请号	JP2015525659	申请日	2014-12-01
[标]申请(专利权)人(译)	积水医疗株式会社		
申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	西谷公良		
发明人	西谷 公良		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/569 G01N33/531 G01N21/47 G01N21/59		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/5761 G01N33/56983 G01N2333/11 G01N2469/10		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/569.L G01N33/531.B G01N21/47.B G01N21/59.Z		
F-TERM分类号	2G059/AA05 2G059/BB06 2G059/BB12 2G059/CC17 2G059/CC20 2G059/DD13 2G059/EE01 2G059/EE02 2G059/EE13		
优先权	2013247279 2013-11-29 JP		
其他公开文献	JP5831918B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

一种使用测试条进行免疫层析的检测方法，该方法可抑制所谓空白区域的发生，并且准确度高且灵敏度高。本发明是一种利用免疫色谱法的检测方法，使用试纸进行免疫层析，包括以下(1)和(2)，以及提供了具有以下步骤(A)和(B)的上述检测方法。(1)样品供应单元，其提供可能包含要检测的物质的样品，并且在样品供应单元的下游设置有缀合物，在所述缀合物中将针对待检测的物质的抗体固定在标签上。具有结合部分的结合垫(2)不溶性膜载体，其具有至少一个检测部，在该检测部上固定有针对被检测物质的抗体。(A)将甲醇和可能包含要检测的物质的样品供应到样品供应部的步骤。(B)在不溶性膜载体上检测作为免疫反应产物检测的物质的步骤 该检测方法包括：

(19) 日本国特許庁(JP)	<b>再公表特許(A1)</b>	(11) 国際公開番号 <b>WO2015/080286</b>
発行日 平成29年3月16日(2017.3.16)	(43) 国際公開日 平成27年6月4日(2015.6.4)	
(51) Int. Cl.	F I	テーマコード(参考) 2G059
<b>GO1N 33/543 (2006.01)</b>	GO1N 33/543 521	
<b>GO1N 33/569 (2006.01)</b>	GO1N 33/569 L	
<b>GO1N 33/531 (2006.01)</b>	GO1N 33/531 B	
<b>GO1N 21/47 (2006.01)</b>	GO1N 21/47 B	
<b>GO1N 21/59 (2006.01)</b>	GO1N 21/59 Z	
	審査請求 有	予備審査請求 未請求 (全 24 頁)
出願番号 特願2015-525659(P2015-525659)	(71) 出願人 390037327	
(21) 国際出願番号 PCT/JP2014/081753	積水メディカル株式会社	
(22) 国際出願日 平成26年12月1日(2014.12.1)	東京都中央区日本橋3丁目1番5号	
(11) 特許番号 特許第5831918号(P5831918)	110000774	
(45) 特許公報発行日 平成27年12月9日(2015.12.9)	特許業務法人 もえぎ特許事務所	
(31) 優先権主張番号 特願2013-247279(P2013-247279)	(72) 発明者 西谷 公良	
(32) 優先日 平成25年11月29日(2013.11.29)	東京都中央区日本橋三丁目1番5号 積水メディカル株式会社内	
(33) 優先権主張国 日本国(JP)	Fターム(参考) 2G059 AA05 BB06 BB12 CC17 CC20 DD13 EE01 EE02 EE13	
		最終頁に続く
(54) 【発明の名称】 イムノクロマトグラフィーを利用した検出方法		