

(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2009-162558

(P2009-162558A)

(43) 公開日 平成21年7月23日(2009.7.23)

(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 13 O L (全 14 頁)

(21) 出願番号 特願2007-340486 (P2007-340486)

(22) 出願日 平成19年12月28日 (2007.12.28)

(71) 出願人 505437907

有限会社バイオデバイステクノロジー

石川県能美市旭台2-13

(74) 代理人 100105809

弁理士 木森 有平

(74) 代理人 100126398

弁理士 浅野 典子

(72) 発明者 由比 光子

石川県能美市旭台クリエイトラボ215号室

(72) 発明者 民谷 栄一

石川県能美市旭台クリエイトラボ215号室

最終頁に続く

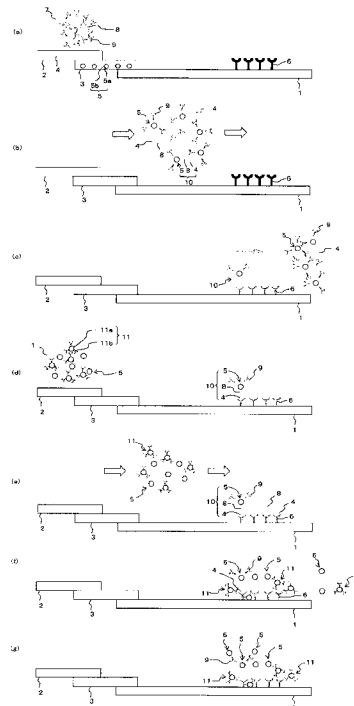
(54) 【発明の名称】 イムノクロマト分析法及びイムノクロマト分析キット

(57) 【要約】

【課題】 発色等を均等に底上げすることができ、共鳴プラズモン効果による増感を確実に発現させることが可能なイムノクロマト分析法を提供する。

【解決手段】 試料中の被検物質を標識物質により標識するとともに固定化された捕捉物質により捕捉して検出するイムノクロマト分析法である。標識物質を含み被検物質を認識して結合する第1標識試薬により被検物質を標識するとともに、標識物質を含み捕捉物質と同様の認識部位若しくは捕捉物質自体を認識する抗体を含む第2標識試薬により増感する。第2標識試薬は、均等に集積され、発色や発光の底上げレベルも均等になる。また、第2標識試薬は、第1標識試薬と近い位置に結合するので、標識物質間の距離も近接し、共鳴プラズモン効果が確実に発揮されて十分な増感効果が得られる。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試料中の被検物質を標識物質により標識するとともに固定化された捕捉物質により捕捉して検出するイムノクロマト分析法であって、

標識物質を含み前記被検物質を認識して結合する第 1 標識試薬により被検物質を標識するとともに、標識物質を含み前記捕捉物質と同様の認識部位若しくは捕捉物質自体を認識する抗体を含む第 2 標識試薬により増感することを特徴とするイムノクロマト分析法。

**【請求項 2】**

前記試料に対して、当該被検物質及び捕捉物質と特異的に結合する特定反応物質を作用させるとともに、第 1 標識試薬を作用させ、

被検物質と結合した特定反応物質を前記捕捉物質と結合させて固定化し、

固定化された前記特定反応物質に対して前記第 2 標識試薬を結合させて増感することを特徴とする請求項 1 記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 3】**

前記試料に対して、前記特定反応物質及び第 1 標識試薬を作用させ、被検物質と結合した特定反応物質を捕捉物質により捕捉した後、第 1 標識試薬と第 2 標識試薬を作用させることを特徴とする請求項 2 記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 4】**

所定の位置に捕捉物質が固定された検出用ストリップに対し、試料を特定反応物質及び第 1 標識試薬とともに流した後、第 1 標識試薬及び第 2 標識試薬を含む増感液を流すことを特徴とする請求項 3 記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 5】**

前記特定反応物質が抗原を含み、前記被検物質が前記抗原に反応する特異的免疫グロブリンであることを特徴とする請求項 1 から 4 のいずれか 1 項記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 6】**

前記試料は、前記抗原に反応する特異的免疫グロブリンと、前記抗原に反応しない非特異的免疫グロブリンを含むことを特徴とする請求項 5 記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 7】**

前記特異的免疫グロブリンが特異的 I g E であり、前記非特異的免疫グロブリンが非特異的 I g E であることを特徴とする請求項 6 記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 8】**

前記抗原の表面にビオチンが固定されており、前記捕捉物質は抗原表面のビオチンと結合することを特徴とする請求項 5 から 7 のいずれか 1 項記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 9】**

前記第 2 標識試薬は、前記抗原表面のビオチンを認識し結合することを特徴とする請求項 8 記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 10】**

前記第 1 標識試薬及び第 2 試薬は、標識物質として金コロイドを含むことを特徴とする請求項 1 から 9 のいずれか 1 項記載のイムノクロマト分析法。

**【請求項 11】**

捕捉物質が所定の位置に固定された検出用ストリップと、標識物質を含み試料中の被検物質を認識して結合する第 1 標識試薬と、標識物質を含み前記捕捉物質と同様の認識部位若しくは捕捉物質自体を認識する抗体を含む第 2 標識試薬とを備えることを特徴とするイムノクロマト分析キット。

**【請求項 12】**

前記第 1 標識試薬と第 2 標識試薬を混合した増感液を備えることを特徴とする請求項 11 記載のイムノクロマト分析キット。

**【請求項 13】**

前記検出用ストリップに対して、被検物質及び捕捉物質と特異的に結合する特定反応物

10

20

30

40

50

質を保持する第1パッドと、第1標識試薬を保持する第2パッドが結合されていることを特徴とする請求項11または12記載のイムノクロマト分析キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、捕捉物質を固定化した支持体（ストリップ）の一端から毛細管現象を利用して試料を含む溶液を展開し、標識した被検物質を捕捉して検出するイムノクロマト分析法及びイムノクロマト分析キットに関するものである。

【背景技術】

【0002】

イムノクロマト分析法は、妊娠検査やインフルエンザ検査において、簡易検査キットとして広く用いられる技術であり、目視のみで検出可能という簡便性を有することから利用分野も拡大する傾向にある。例えば、アレルギー患者のアレルゲンを決定するための一次スクリーニングへの適用等もその一例である。

【0003】

前記イムノクロマト分析法としては、いわゆるサンドイッチ法を利用したイムノクロマトが代表的である。サンドイッチ法を利用したイムノクロマトでは、先ず、被検物質の異なる部位を認識する2種類の抗体とストリップとを用意し、一方の抗体（捕捉抗体）はストリップのテストラインと呼ばれる領域に固定化しておき、他方の抗体は例えば金コロイド粒子を標識して金コロイド標識抗体とする。そして、試料溶液を金コロイド標識抗体と混合した後、ストリップの一端に吸収させ、展開する。試料溶液中に被検物質が含まれる場合、被検物質と金コロイド標識抗体とが反応して被検物質 - 金コロイド標識抗体複合体が形成され、この複合体がテストライン上を通過する際に捕捉抗体に捕捉され、捕捉抗体 - 被検物質 - 金コロイド標識抗体複合体が形成される。その結果、テストラインにおいて、金コロイド標識抗体の赤色の発色が観察される。

【0004】

ただし、前述の金コロイド標識抗体等を用いたイムノクロマト法では、被検物質の濃度が低い場合、その検出が困難となることがある。試料溶液中の被検物質濃度が低いと、テストラインに集積する金コロイド標識抗体量も少なくなるため、捕捉抗体が固定化された領域における金コロイド標識抗体由来のシグナル（発色）強度が例えば肉眼で認識可能なレベルに到達しないからである。

【0005】

このような状況から、イムノクロマト法の検出感度を高めることを目的とした研究が各方面で進められており、例えば特許文献1において、テストラインにおける発色強度を増強する方法が提案されている。特許文献1記載の発明では、前記テストラインに予め標識物質（例えば金コロイド）を固定化しておくことで、発色強度や発光強度の底上げを図り、低濃度の被検物質の検出を可能にしている。

【特許文献1】WO/2007/061098

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

しかしながら、特許文献1記載の技術では、金コロイド等の標識物質を各ストリップに均等に固定することが難しく、底上げレベルのバラツキに繋がって誤検出の原因となるおそれがある。また、特許文献1記載の技術の場合、必ずしも十分な増感効果が得られないことがある。その原因としては、予め固定化された標識物質と、被検物質を標識する標識物質の間にある程度の距離があり、そのため共鳴プラズモン効果が十分に発揮されないのではないかと推測される。

【0007】

本発明は、このような従来の実情に鑑みて提案されたものであり、発色等を均等に底上げすることができ、また共鳴プラズモン効果による増感を確実に発現させることが可能な

10

20

30

40

50

イムノクロマト分析法を提供することを目的とし、さらにはイムノクロマト分析キットを提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

前述の課題を解決するために、本発明に係るイムノクロマト分析法は、試料中の被検物質を標識物質により標識するとともに固定化された捕捉物質により捕捉して検出するイムノクロマト分析法であって、標識物質を含み前記被検物質を認識して結合する第1標識試薬により被検物質を標識するとともに、標識物質を含み前記捕捉物質と同様の認識部位若しくは捕捉物質自体を認識する抗体を含む第2標識試薬により増感することを特徴とする。

10

【0009】

また、本発明に係るイムノクロマト分析キットは、捕捉物質が所定の位置に固定された検出用ストリップと、標識物質を含み試料中の被検物質を認識して結合する第1標識試薬と、標識物質を含み前記捕捉物質と同様の認識部位若しくは捕捉物質自体を認識する抗体を含む第2標識試薬とを備えることを特徴とする。

【0010】

例えば捕捉物質として捕捉抗体が固定化されたストリップを用いてイムノクロマト分析を行う場合、捕捉抗体が固定化された領域(判定部)においては、捕捉抗体と被検物質、第1標識試薬が複合体を形成することで、標識物質が判定部に集積される。そして、判定部に集積された標識物質が一定量を超えた場合、発色又は発光を肉眼で認識可能又は機器で検出可能となり、被検物質の存在を知ることができる。ただし、被検物質が極めて低濃度である場合、標識物質の集積も不十分となるため、発色又は発光が弱くなり、肉眼で認識できないことや、機器分析で検出できないことがある。

20

【0011】

本発明においては、第2標識試薬を前記判定部に集積させることで増感を行いこれを解消している。前記第2標識試薬は、捕捉抗体と同様の認識部位、あるいは捕捉抗体自体と結合することで、判定部に集積される。これにより、判定部における発色又は発光の強度は、判定部に集積した第1標識試薬由来の標識物質の発色又は発光の強度と、第2標識試薬由来の標識物質の発色又は発光の強度との和となる。すなわち、判定部における発色強度又は発光強度が底上げされる。したがって、被検物質の濃度が低濃度であっても、容易に識別される。例えば、標識物質が100個以上集積することでその発色が検出可能となる場合(目視による検出の閾値が100個である場合)、80個の標識物質を第2標識試薬の結合により集積することができれば、被検物質を標識する第1標識試薬による標識物質が20個以上集積することで前記閾値を越え、目視により発色を検出できることになる。

30

【0012】

また、前記判定部においては、捕捉物質(捕捉抗体)の数により、概ね捕捉される被検物質等の数(すなわち捕捉物質が認識する認識部位の数)が決まる。前記第2標識試薬は、捕捉物質が認識する認識部位の数や捕捉物質の数に応じて集積するので、固定化された捕捉物質の数が一定であれば、均等に集積され、発色や発光の底上げレベルも均等になる。さらに、第2標識試薬は、第1標識試薬と近い位置に結合するので、標識物質間の距離も近接し、共鳴プラズモン効果が確実に発揮されて十分な増感効果が得られる。

40

【発明の効果】

【0013】

本発明によれば、イムノクロマト分析において、発色等を均等に底上げ(増感)することができ、また共鳴プラズモン効果による増感を確実に実現することが可能である。したがって、簡単な操作により確実に被検物質の検出を行うことが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0014】

以下、本発明を適用したイムノクロマト分析法及びイムノクロマト分析キットについて

50

、図面を参照しながら詳細に説明する。

【0015】

本発明のイムノクロマト分析法は、前述の通り、試料中の被検物質を標識物質により標識するとともに捕捉物質により固定化して検出するイムノクロマト分析法であり、例えばサンドイッチ法による免疫分析等、イムノクロマト分析全般に適用することが可能である。

【0016】

サンドイッチ法による免疫分析においては、被検物質（抗原）上の異なる部位をそれぞれ認識する2種類の抗体を用いる。2種類の抗体のうち一方の抗体（捕捉物質）は、支持体であるストリップ上に固定する。捕捉物質が固定化された領域が、判定部となる。他方の抗体（標識抗体）は、ストリップには固定化せず、標識物質で標識して第1標識試薬とする。サンドイッチ法では、第1標識試薬で標識された被検物質を捕捉物質で捕捉し、検出を行う。

10

【0017】

あるいは、単に標識試薬と捕捉物質とでサンドイッチした状態の複合体を形成して検出を行うのではなく、被検物質と特定反応物質とを結合させるとともに、被検物質に標識試薬を結合させ、前記特定反応物質に捕捉物質を結合させることで、標識された被検物質の捕捉及び検出を行うイムノクロマト分析（以下、改良イムノクロマト分析と称する。）にも適用可能である。

【0018】

この場合、試料に対して、被検物質及び捕捉物質とそれぞれ特異的に結合する特定反応物質と、標識物質を含み前記被検物質の前記特定反応物質の結合部位とは異なる部位に特異的に結合する第1標識試薬とを作用させるとともに、被検物質と結合した特定反応物質を前記捕捉物質と結合させるようにする。これにより、第1標識試薬 - 被検物質 - 特定反応物質複合体が形成され、さらに、この第1標識試薬 - 被検物質 - 特定反応物質複合体が捕捉物質と結合して、第1標識試薬 - 被検物質 - 特定反応物質 - 捕捉物質複合体が形成される。前記捕捉物質は、支持体であるストリップ等にストライプ状に固定され、先のサンドイッチ法の場合と同様、この捕捉物質が固定された部分が判定部となる。判定部に前記第1標識試薬 - 被検物質 - 特定反応物質 - 捕捉抗体複合体が集積することで標識物質が視認され、試料中における被検物質の存在が検出される。

20

30

【0019】

前記改良イムノクロマト分析では、被検物質に応じて特定反応物質を選択することで、多様な被検物質に対応することが可能になる。例えば、アレルゲン等の抗原を認識する抗体を被検物質とする分析も可能である。

【0020】

本発明において、検出対象となる被検物質としては、免疫反応性物質を含有するものであれば任意の物質に適用することができ、例えば各種抗体や抗原等を挙げることができる。ここで、抗体（IgG、IgM、IgE、IgD、IgA等）としては、抗DNA抗体、抗ENA抗体、抗カルジオリピン抗体、抗ミトコンドリア抗体、抗平滑筋抗体等に代表される自己抗体や各種免疫グロブリン等を挙げることができ、例えばアレルゲンを特異的に認識する特異的免疫グロブリン（特異的IgE等）の分析等にも適用することが可能である。また、抗原としては、糖タンパク質や複数のサブユニットから構成される特定タンパク質、前立腺特異的抗原（PSA）等のタンパク質複合体等を挙げることができる。

40

【0021】

サンドイッチ法では、前記被検物質の種類に応じて、第1標識試薬の標識抗体や捕捉物質（捕捉抗体）を選定すればよい。改良イムノクロマト分析では、前記被検物質の種類に応じて、特定反応物質を選定すればよく、例えば被検物質が前記自己抗体（例えば抗DNA抗体）である場合には、当該抗DNA抗体が認識する特定のDNAを特定反応物質として用いれば良い。被検物質がグロブリンクラスがIgGである自己抗体である場合には、特定反応物質として当該IgGが認識する特定のタンパク質やタンパク質複合体等の抗

50

原を用いればよい。被検物質がアレルゲンを特異的に認識する免疫グロブリン（I g E や I g G 等）である場合には、アレルゲンを特定反応物質とすればよい。被検物質が、糖タンパク質や特定タンパク質、タンパク質複合体等の抗原である場合には、所定のタンパク質部分を認識する抗体を特定反応物質として用いれば良い。特定反応物質としては、前記各抗原自体や抗体自体を用いても良いし、それらの断片（フラグメント）を用いても良い。これら被検物質と特定反応物質の組み合わせにより、多様な被検物質についてイムノクロマト分析が可能となる。

#### 【0022】

改良イムノクロマト分析において、前記被検物質と結合しこれを標識する第1標識試薬としては、例えば被検物質を抗原として認識する標識抗体と標識物質とが結合したものを  
10  
用いることができる。改良イムノクロマト分析においては、被検物質を抗原として認識する標識抗体が、被検物質の前記特定反応物質との反応部位とは異なる部位を認識するものであれば、特定反応物質と結合した被検物質に対してさらに結合することが可能である。係る標識試薬を用いれば、被検物質に対して標識物質が標識抗体を介して結合し、これを標識する。

#### 【0023】

前記標識物質としては、発色物質や発光物質等を標識物質として用いることができるが、迅速且つ簡便な検出を可能とするためには、発色物質を用いることが好ましい。ここで、  
20  
発色物質としては、金属微粒子、ラテックス微粒子、有機高分子微粒子、無機微粒子、発色剤を包含したリポソーム等の発色微粒子等を用いることができる。金属微粒子としては、金微粒子、銀微粒子、白金微粒子等の貴金属微粒子、チタン微粒子、鉄微粒子、ニッケル微粒子等が例示される。金属微粒子は、粒径1nm~100nmのコロイド状の金属微粒子であってもよい。すなわち、金コロイド粒子、銀コロイド粒子、白金コロイド粒子等の貴金属コロイド粒子や、チタンコロイド粒子、鉄コロイド粒子、ニッケルコロイド粒子を用いてもよい。ラテックス微粒子としては、ポリスチレン、スチレン-スチレンスルホン酸塩共重合体、メタクリル酸重合体、アクリル酸重合体、アクリロニトリル-ブタジエン-スチレン共重合体、塩化ビニル-アクリル酸エステル共重合体、酢酸ビニル-アクリル酸エステル共重合体等から選ばれる少なくとも1種を含む微粒子が例示される。有機高分子微粒子としては、不溶性アガロース、セルロース、不溶性デキストラン等から選ばれる  
30  
少なくとも1種を含む微粒子が例示される。無機微粒子としては、シリカ、アルミナ等が例示される。これらの中でも、汎用性の高い貴金属コロイド粒子、ラテックス微粒子等を用いることが好ましく、特に、明瞭な発色が得られることから、金コロイド粒子を用いることが好ましい。

#### 【0024】

第2標識試薬も、第1標識試薬と同様の標識物質を含有するが、第1標識試薬とは異なり、捕捉物質や特定反応物質を認識する抗体を標識抗体として固定化したものを用いる。当該第2標識試薬は、捕捉物質や特定反応物質に均等に結合し、第1標識試薬に含まれる標識物質による標識の底上げを図る。

#### 【0025】

支持体であるストリップに固定される捕捉物質としては、例えばサンドイッチ法の場合  
40  
、被検査物質を抗原として認識する捕捉抗体が用いられる。あるいは、捕捉抗体に代えて、被検物質（抗体）に特異的に結合する捕捉抗原を捕捉物質としてストリップに固定しておくことも可能である。改良イムノクロマト分析の場合には、前記特定反応物質及び標識試薬が結合した標識試薬-被検物質-特定反応物質複合体を捕捉するものであり、前記特定反応物質を抗原と認識して結合する抗体が使用可能である。この場合、前記捕捉抗体が直接的に特定反応物質を認識するものであってもよいし、特定反応物質表面に固定された抗原を認識するものであってもよい。

#### 【0026】

例えば、特定反応物質が抗原（例えばアレルゲン）である場合、前記捕捉抗体はアレル  
50  
ゲンを抗原として認識する抗体であってもよいし、アレルゲン表面に付着されたビオチン

を抗原として認識する抗体であってもよい。後者の場合、ビオチンが付着したアレルゲンが特定反応物質に相当することになる。アレルゲン表面にビオチンを付着し、アレルゲン表面の認識部位をビオチンとした場合、ビオチンをアレルゲンに複数個付着することで確実に固定する部分を確保でき、感度を上げることもできる。アレルゲン自体を捕捉抗体で固定すると、捕捉抗体の認識部位と近い部位を認識する被検物質（例えばIgE）の測定を阻害することになり、感度の低下を招くおそれがある。アレルゲン表面の認識部位をビオチンとすれば、これを防ぐことができ、感度を上げることができる。

【0027】

被検物質を含む試料溶液としては、例えば血液、血清、尿等の生体由来の溶液や、自然環境から採取した水や土壌等を含む溶液、さらにはこれらを用いて調製して得た溶液等、任意のものを用いることができる。そして、生体物質や合成物質等、あらゆる物質を被検物質とすることができる。

10

【0028】

試料溶液中の被検物質を検出するには、例えばサンドイッチ法においては、先ず、試料溶液と標識抗体を混合し、被検物質と標識抗体との複合体を形成させた後、捕捉物質を固定したストリップの一端側から浸透させる。イムノクロマトグラフィー法では、毛細管現象を利用して試料溶液を展開する。なお、試料溶液と標識抗体を含む溶液は、この順に個別にストリップに流すようにしてもよい。試料溶液中に被検物質が存在する場合、ストリップに固定された捕捉物質と標識抗体とがサンドイッチ状に被検物質に対して結合し、結果として被検物質に応じた量の標識抗体が判定部に集積する。

20

【0029】

分析者は、前記判定部の発色の有無を目視により確認することで、あるいはデンシトメーター等の機器を用いて発色を検出することで、被検物質の有無を簡単に判定することができるが、被検物質の濃度が低濃度であると、必ずしも十分な発色強度が得られない場合がある。そこで、本発明では、被検物質の捕捉の後、第2標識試薬を流して、いわゆる増感を行う。第2標識試薬は、ストリップ上に固定されている捕捉物質と結合し、やはり判定部に集積する。その結果、判定部に集積した第1標識試薬の標識物質と第2標識試薬の標識物質の共鳴プラズモン効果により発色が増強され、検出感度が向上する。第2標識試薬は、前記の通り、捕捉物質と結合して第1標識試薬と近接した位置に捕捉されるので、前記共鳴プラズモン効果が確実に発揮される。また、第2標識試薬の集積量は、固定される捕捉物質の数によって概ね決まるので、発色が均等に底上げされ、増感のバラツキを抑えることができる。

30

【0030】

改良イムノクロマト分析の場合には、先ず、試料溶液と特定反応物質及び標識試薬を混合し、第1標識試薬-被検物質-特定反応物質複合体を形成させた後、捕捉物質を固定した支持体（検出用ストリップ）に供給する。供給された試料溶液（混合液）は検出用ストリップに浸透し、毛細管現象により展開される。試料溶液中に被検物質が存在する場合、検出用ストリップに固定された捕捉物質が前記複合体の特定反応物質と結合し、結果として被検物質に応じた量の標識物質が判定部（捕捉物質が固定された部分）に集積されて可視化される。

40

【0031】

改良イムノクロマト分析においても、被検物質の濃度が低濃度である場合には、第2標識試薬により増感を図り、発色強度を増強することが可能である。すなわち、第1標識試薬-被検物質-特定反応物質複合体を捕捉物質で捕捉した後、第2標識試薬を流して増感する。第2標識試薬は、前記捕捉物質や、捕捉物質に捕捉された第1標識試薬-被検物質-特定反応物質複合体の特定反応物質を認識して結合し、判定部に集積する。したがって、サンドイッチ法の場合と同様、判定部に集積した第1標識試薬の標識物質と第2標識試薬の標識物質の共鳴プラズモン効果により発色が増強され、検出感度が向上する。

【0032】

なお、改良イムノクロマト分析においては、試料によっては阻害効果によって感度が低

50

下する場合がある。例えば、被検物質が特定のアレルゲンを認識する特異的免疫グロブリンである場合、試料（検体）中には当該特異的免疫グロブリンの他、非特異的免疫グロブリンも含まれる。このように非特異的免疫グロブリンと分析対象である特異的免疫グロブリンが混在している場合、第1標識試薬が非特異的免疫グロブリンとも結合してしまい、特異的免疫グロブリンの検出感度が低下する。そのような場合には、阻害効果を避けるための対策を講ずることが好ましい。

#### 【0033】

前記非特異的免疫グロブリンの混在による阻害効果を回避するためには、第1標識試薬が非特異的免疫グロブリンと結合するのを避ける方法（以下、回避法と称する。）や、捕捉物質で捕捉された被検物質を再度第1標識試薬で標識する方法（以下、再標識法と称する。）等を挙げることができる。

10

#### 【0034】

ここで、前記回避法は、前記の通り、第1標識試薬が非特異的免疫グロブリンと結合するのを避ける方法であり、特定反応物質と結合した被検物質を捕捉物質で固定化した後に、第1標識試薬を作用させる方法である。回避法では、試料に対して特定反応物質を作用させ、被検物質と結合した特定反応物質を捕捉物質により捕捉した後、第1標識試薬を作用させて被検物質を標識する。これを実現するためには、所定の位置に捕捉物質が固定された検出用ストリップに対し、試料を特定反応物質とともに流した後、展開液により第1標識試薬を流せばよい。

#### 【0035】

前記回避法では、阻害物質（例えば非特異的免疫グロブリン）が流れてしまった後に第1標識試薬を作用させ、捕捉された被検査物質に第1標識試薬を選択的に結合するようにしているので、阻害物質による阻害効果を受けることなく被検物質を検出することができ、感度を向上することができる。この時、第1標識試薬に第2標識試薬を混合して作用させれば、被検物質の標識における阻害回避と前述の第2標識試薬による増感を併せて実現することが可能である。

20

#### 【0036】

一方、再標識法は、展開時に第1標識試薬で標識されなかった被検物質を再度標識し、発色を増強する方法である。再標識法では、試料に対して、前記特定反応物質及び第1標識試薬を作用させ、被検物質と結合した特定反応物質を捕捉物質により捕捉した後、前記第1標識試薬を再度作用させる。これを実現するためには、所定の位置に捕捉物質が固定された検出用ストリップに対し、試料を特定反応物質及び第1標識試薬とともに流した後、展開液により再度第1標識試薬を流せばよい。

30

#### 【0037】

前記再標識法では、阻害物質（例えば非特異的免疫グロブリン）の影響で第1標識試薬と結合できなかった被検物質も再度の標識で第1標識試薬と結合し、発色が増強される。したがって、検出感度を高めることが可能である。さらに、再度の標識の際に、第1標識試薬に第2標識試薬を混合して作用させれば、再標識による発色の増強と前述の第2標識試薬による増感を併せて実現することが可能である。

#### 【0038】

前述のイムノクロマト分析法は、前記第1標識試薬や特定反応物質を含むパッドや、捕捉物質を固定した検出用ストリップ、さらには展開液等から構成されるイムノクロマト分析キットを用いることにより、簡便に実施することが可能である。第1標識試薬と第2標識試薬は、別途添付してもよく、この場合、イムノクロマト分析キットは、捕捉物質が所定の位置に固定された検出用ストリップと、標識物質を含み試料中の被検物質を認識して結合する第1標識試薬と、標識物質を含み前記捕捉物質と同様の認識部位若しくは捕捉物質自体を認識する抗体を含む第2標識試薬とを備えていればよい。第1標識試薬と第2標識試薬は、展開液に混合して増感液として供することも可能である。

40

#### 【0039】

改良イムノクロマト分析を行うためのイムノクロマト分析キットの構成としては、捕捉

50

物質が所定の位置に固定された検出用ストリップと、被検物質及び捕捉物質とそれぞれ特異的に結合する特定反応物質を保持する第1パッドと、第1標識物質を含み前記被検物質の前記特定反応物質の結合部位とは異なる部位に結合する標識試薬を保持する第2パッド、さらには第2標識試薬を含む増感液を備えていればよい。例えば、第1パッド、第2パッド、検出用ストリップの順に配列してこれらを結合し、イムノクロマト分析キットとすれば、前記一連の分析を当該イムノクロマト分析キットに試料溶液を第1パッドに滴下するだけで、迅速に行うことができる。

【0040】

前記構成のイムノクロマト分析キットの第1パッドに試料溶液を滴下すると、第1パッドに浸透し、試料溶液に含まれる被検物質が第1パッドに含まれる特定反応物質と反応する。さらに、試料溶液は第2パッドへと浸透し、特定反応物質が結合した被検物質は、第2パッドに含まれる第1標識試薬と反応する。これにより、第1標識試薬 - 被検物質 - 特定物質複合体が形成される。この複合体を含む溶液は、検出用ストリップへと浸透し展開される。検出用ストリップでは、固定された捕捉物質により前記複合体が捕捉され、標識物質が集積されることにより可視化される。前記複合体の捕捉の後、増感液を流せば、第2標識試薬による増感が行われ、発色強度が増強される。

10

【0041】

なお、前記回避法を実施するためのイムノクロマト分析キットでは、第2パッド、第1パッド、検出用ストリップの順に配列する必要がある。イムノクロマト分析キットは、前記第1パッド、第2パッド及び検出用ストリップをプラスチック等からなる容器内に収容した状態で提供されることが多いが、この場合、当該容器には、第1パッド及び第2パッドに対応した位置にそれぞれ溶液供給孔を形成しておく。分析に際しては、第1パッドに対応する溶液供給孔から試料溶液を滴下した後、第2パッドに対応する溶液供給孔から展開液を滴下する。第1パッドに対応する溶液供給孔から試料溶液を滴下すれば、試料に対して特定反応物質のみが反応し、被検物質と結合した特定反応物質が捕捉抗体により捕捉される。次いで、第2パッドに対応する溶液供給孔から展開液を滴下すれば、捕捉された被検物質と標識試薬が接触し標識される。その後、第2標識試薬を含む増感液を流せば、第2標識試薬による増感が行われる。

20

【0042】

再標識法を実施するためのイムノクロマト分析キットでは、前記回避法の場合とは異なり、第1パッド、第2パッド、検出用ストリップの順に配列されていればよい。これら第1パッド、第2パッド及び検出用ストリップを容器内に収容し、容器の第1パッドに対応した位置に溶液供給孔を形成する。また、第1標識試薬及び第2標識試薬を含む展開液を添付する。分析に際しては、先ず、前記溶液供給孔から試料溶液を滴下して通常通り展開を行い、第1標識試薬 - 被検物質 - 特定物質複合体を捕捉抗体で固定化した後、第1標識試薬及び第2標識試薬を含む展開液を滴下する。これにより、第1標識試薬による前記複合体の標識の増強、及び第2標識試薬による発色の底上げが行われる。

30

【0043】

次に、アレルゲンを認識する特異的IgEを被検物質とする改良イムノクロマト分析(再標識法)を例に挙げて、本発明のイムノクロマト分析法及びイムノクロマト分析キットをより具体的に説明する。

40

【0044】

図1は、本実施形態のイムノクロマト分析法及びイムノクロマト分析キットを説明する模式図である。本実施形態では、被検物質がアレルゲンを認識する特異的IgEであり、したがって、アレルゲン(ここではビオチンが付着したアレルゲン)が特定反応物質に相当する。標識試薬は、金コロイド標識抗IgE抗体である。アレルゲンの表面にはビオチンが付着されており、捕捉物質(捕捉抗体)としてビオチンを認識する抗ビオチン抗体を用いる。

【0045】

イムノクロマト分析キットは、短冊状の検出用ストリップ1と、当該検出用ストリップ

50

1の端部に結合された第1パッド2及び第2パッド3とから構成されており、さらに増感液が添付されている。第1パッド2や第2パッド3の配列順序は、上流側から第1パッド2、第2パッド3、検出用ストリップ1の順である。なお、検出用ストリップ1の下流側に、展開後の試料溶液を吸収する吸収パッドを備えていてもよい。

【0046】

前記第1パッド2や第2パッド3には、例えばガラスウール等の上面に吸水性に優れたろ紙等が積層されたもの等が用いられ、第1パッド2には特定反応物質(ビオチンが付着したアレルゲン4)が保持されている。第2パッド3には第1標識試薬である金コロイド標識抗IgE抗体5が保持されている。金コロイド標識抗IgE抗体5は、発色物質である金コロイド5aの表面に抗IgE抗体5bが固定されたものである。したがって、この

10

【0047】

検出用ストリップ1には、この種のイムノクロマト法に用いられるメンブレンであれば制限無く使用することができ、例えばニトロセルロース等を用いることができる。検出用ストリップ1の中途位置には、捕捉抗体である抗ビオチン抗体6が固定されており、判定部を構成している。判定部は、検出用ストリップ1における展開方向と直交する方向の線状パターンとして形成されている。

【0048】

以上の構成のイムノクロマト分析キットを用いて特異的IgE(被検物質)の検出を行う場合、図1(a)に示すように、検体である血清を展開液で希釈した試料溶液7を第1

20

【0049】

第1パッド2に試料溶液7を滴下すると、試料溶液7は、第1パッド2、第2パッド3、さらには検出用ストリップ1へと浸透する。この過程において、各パッドからアレルゲン4や金コロイド標識抗IgE抗体5が溶出し、試料溶液7中の特異的IgE8と抗原抗体反応により結合する。すなわち、図1(b)に示すように、特異的IgE8にアレルゲン4や金コロイド標識抗IgE抗体5が結合した複合体10が形成される。なお、金コロイド標識抗IgE抗体5は、非特異的IgE9にも結合する。したがって、アレルゲン4と結合した特異的IgE8の一部は、金コロイド標識抗IgE抗体5と結合することなく

30

【0050】

前記試料溶液7は、前記反応の後、検出用ストリップ1において毛細管現象により図中左から右に向かって展開され、図1(c)に示すように、判定部においてアレルゲン4と抗ビオチン抗体6の結合によって複合体10が捕捉される。この時、複合体10のみならず、金コロイド標識抗IgE抗体5で標識されていないアレルゲン4のみと結合した特異的IgE8や、過剰なアレルゲン4も捕捉される。

【0051】

以上により、検出用ストリップ1の判定部には、特異的IgE8の濃度に依存して金コロイド標識抗IgE抗体5が結合し、金コロイド5aが集積される。この金コロイド5a

40

【0052】

ただし、図1(a)~図1(c)に示す手順によりイムノクロマト分析を行った場合、図1(c)にも示す通り、判定部に金コロイド標識抗IgE抗体5で標識されていない特異的IgE8も捕捉され、検出感度が低下する。特に、非特異的IgE9が試料中に多く存在している場合、試料溶液や展開液の適用後、複合体10形成の際に、標識試薬である金コロイド標識抗IgE抗体5と特異的IgE8の結合を競合的に妨げる。その結果、判定部にトラップされた特異的IgE8のうち、標識されない特異的IgE8の割合が増え、テストラインの発色が抑制される。

50

## 【0053】

そこで、本実施形態では、阻害物質（非特異的 I g E 9）の影響で金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 と結合できなかった特異的 I g E 8 を再度標識するとともに、第 2 標識試薬である金コロイド標識抗ビオチン抗体を作用させることで発色の増強を行う。

## 【0054】

すなわち、複合体 10 のトラップの後、図 1（d）に示すように、金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 及び金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 を含む増感液 12 を第 1 パッド 2 に滴下し、再度の展開を行う。増感液には、第 1 標識試薬である金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 と、第 2 標識試薬である金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 とを含む展開液を用いる。第 2 標識試薬である金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 は、金コロイド 11 a の表面に抗

10

## 【0055】

この時点では、第 1 パッド 2 や第 2 パッド 3 には何も保持されておらず、図 1（e）に示すように、前記展開によって金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 及び金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 のみが流れていく。判定部に流れた金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 は、図 1（f）に示すように、金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 と結合していない特異的 I g E 8 と結合し、これを標識する。また、金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 は、捕捉抗体である抗ビオチン抗体 6 によって捕捉された複合体 10 に含まれるアレルゲン 4 の表面に存在する

20

## 【0056】

このように、試料溶液 7 の展開が終わった後に金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 及び金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 を含む増感液 12 を展開することで、非特異的 I g E 9 の影響で標識されなかった特異的 I g E 8 に金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 が結合し、発色が増強されて検出感度が向上する。また、アレルゲン 4 の表面に金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 が結合して発色の底上げがなされ、より一層検出感度が向上する。この時、金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 は、捕捉されたアレルゲン 4 の数（すなわち固定された抗ビオチン抗体 6 の数）に比例して集積し、均一な発色増強がなされる。加えて、金コロイド標識抗ビオチン抗体 11 の結合位置がアレルゲン 4 表面であり、金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 の結合位置と近いことから、共鳴プラズモン効果も確実に発現され、確実に発

30

## 【0057】

さらに、図 1（g）に示すように、増感液 12 中の金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 は、既に特異的 I g E 8 を介して固定化されている金コロイド標識抗 I g E 抗体 5 と結合する非特異的 I g E 9 にも結合し、テストラインにおける金コロイド 5 a の集積度を上げる効果もあり、これも検出感度を高める効果に寄与している。

## 【実施例】

## 【0058】

以下、本発明の具体的な実施例について、実験結果に基づいて説明する。

## 【0059】

（スギ花粉特異的 I g E の検出）

スギ花粉をアレルゲンとして認識する特異的 I g E を被検物質とし、図 1 に示す再標識法によりイムノクロマト分析を行った。ただし、図 1（c）までの操作によりイムノクロマト分析を行った場合を比較例、図 1（f）までの操作によりイムノクロマト分析を行った場合を実施例とする。

40

## 【0060】

試料としては陽性血清サンプル 20  $\mu$ L あるいは陰性血清サンプル 20  $\mu$ L を用い、これを希釈溶液（1% BSA リン酸緩衝液）20  $\mu$ L で希釈して試料溶液とした。展開液としては、界面活性剤（Tween）を 0.2% 含むリン酸緩衝液 30  $\mu$ L を用いた。検出用ストリップには、抗ビオチン抗体を固定して線状の判定部を形成し、第 1 パッドにはビ

50

オチンで修飾したアレルゲンを担持させた。第2パッドには、金コロイド標識抗IgE抗体を担持させた。また、実施例においては、10%金コロイド標識抗IgE抗体/0.2%Tween20を含有したPBS30 $\mu$ Lに金コロイド標識抗ビオチン抗体(OD520=0.0006)を30 $\mu$ L加え、増感液とした。

【0061】

試料溶液(陽性コントロール血清サンプル及び陰性コントロール血清サンプル)について15分間展開した後、増感液による増感の有無による判定部の色の濃さ(発色強度)の相違をデンストメーターにより測定した。結果を図2に示す。

【0062】

図2から明らかなように、増感を行った実施例では、増感を行っていない比較例と比べて、陽性である場合と陰性である場合の発色強度の差が大きく、発色の識別が容易であることがわかる。

10

【図面の簡単な説明】

【0063】

【図1】本発明を適用した実施形態(再標識法)におけるイムノクロマト分析法の基本原理解を説明する模式図であり、(a)は試料溶液の滴下、(b)は展開過程、(c)は捕捉抗体による捕捉、(d)は第1パッドへの増感液の滴下、(e)は増感液の展開過程、(f)及び(g)は再標識及び増感状態をそれぞれ示す。

【図2】陽性コントロール血清及び陰性コントロール血清のイムノクロマト分析において、実施例及び比較例における発色強度の差を示す特性図である。

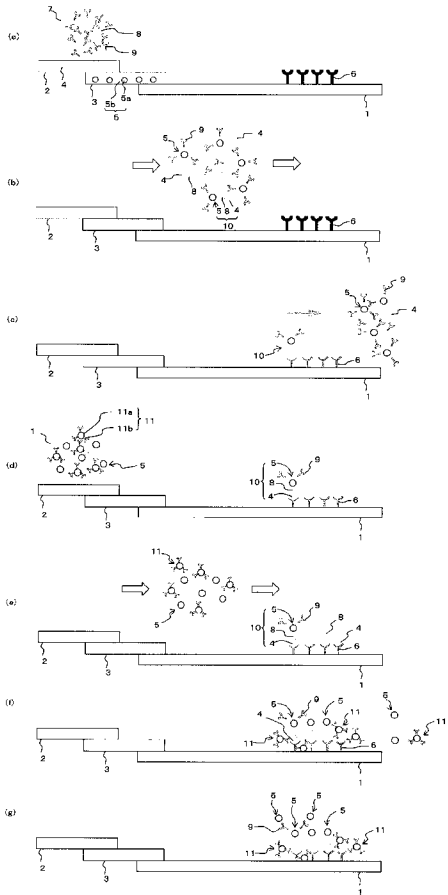
20

【符号の説明】

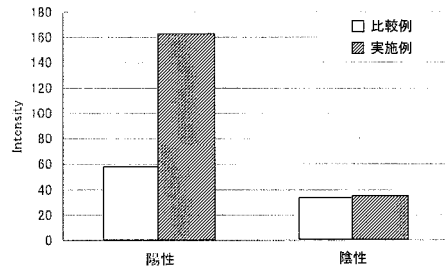
【0064】

1 検出用ストリップ、2 第1パッド、3 第2パッド、4 アレルゲン、5 金コロイド標識抗IgE抗体、5a 金コロイド、5b 抗IgE抗体、6 抗ビオチン抗体、7 試料溶液、8 特異的IgE、9 非特異的IgE、10 複合体、11 金コロイド標識抗ビオチン抗体、11a 金コロイド、11b 抗ビオチン抗体、12 増感液

【 図 1 】



【 図 2 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 牛島 ひろみ  
石川県能美市旭台クリエイトラボ2 1 5号室
- (72)発明者 角谷 悦子  
石川県能美市旭台クリエイトラボ2 1 5号室

专利名称(译)	免疫色谱分析方法和免疫层析分析试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009162558A</a>	公开(公告)日	2009-07-23
申请号	JP2007340486	申请日	2007-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	生物技术设备		
申请(专利权)人(译)	有限公司生物技术设备		
[标]发明人	由比光子 民谷栄一 牛島ひろみ 角谷悦子		
发明人	由比 光子 民谷 栄一 牛島 ひろみ 角谷 悦子		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.U G01N33/543.541.Z		
代理人(译)	浅野纪子		
其他公开文献	JP5118479B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种免疫色谱分析方法，其能够均匀地提高显色性等并且能够通过共振等离子体激元效应可靠地表达敏化。一种免疫色谱分析方法，其中样品中的测试物质用标记物质标记，并用固定的捕获物质捕获以进行检测。第二标记物包含通过识别并结合到测试物质而识别并结合到测试物质的抗体，并且还包含标记物质和识别与捕获物质或捕获物质本身相同的识别位点的抗体用试剂敏化。第二标记试剂被均匀地累积，并且发色和发光的水平也被均衡。此外，由于第二标记试剂结合到靠近第一标记试剂的位置，标记物质之间的距离也很近，因此可以可靠地显示共振等离子体激元效应，并且可以获得足够的敏化效果。[选型图]图1

