

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6371808号  
(P6371808)

(45) 発行日 平成30年8月8日(2018.8.8)

(24) 登録日 平成30年7月20日(2018.7.20)

(51) Int.Cl. F I  
**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 33/543 5 4 1 Z  
 GO 1 N 33/53 D

請求項の数 17 (全 14 頁)

<p>(21) 出願番号 特願2016-156287 (P2016-156287)                  (22) 出願日 平成28年8月9日(2016.8.9)                  (65) 公開番号 特開2018-25426 (P2018-25426A)                  (43) 公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)                  審査請求日 平成29年12月4日(2017.12.4)</p> <p>早期審査対象出願</p>	<p>(73) 特許権者 390037327                  積水メディカル株式会社                  東京都中央区日本橋二丁目1番3号                  (74) 代理人 110000774                  特許業務法人 もえぎ特許事務所                  (72) 発明者 奥山 慎也                  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                  (72) 発明者 東 加奈子                  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                  (72) 発明者 齋藤 和典                  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</p> <p style="text-align: right;">最終頁に続く</p>
---	---

(54) 【発明の名称】 イムノクロマトグラフィー検出キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

以下を含むイムノクロマトグラフィーを利用した検出キット。

(1) 被検出物質に対して免疫学的に反応する第一の抗体が標識体に固定化されたコンジュゲート試薬

(2) サンプルを展開させることによりサンプル中の被検出物質を検出する不溶性担体を備えた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、

前記不溶性担体は、上流から順に

糖類並びに被検出物質又は被検出物質及びコンジュゲートの複合体と結合する第三の抗体が溶出可能に担持された担持部、

サンプルを供給するサンプル供給部、および

被検出物質に対して免疫学的に反応する第二の抗体が固定化された検出部、

を含む、前記テストストリップ

【請求項2】

糖類が、単糖類及び2糖類からなる群から選ばれるいずれか1以上である請求項1に記載の検出キット。

【請求項3】

糖類および第三の抗体の担持部は、不溶性担体上にサンプルの展開方向と直交するようにライン状に形成されている請求項1または2に記載の検出キット。

【請求項4】

不溶性担体は、少なくともサンプルパッドおよびサンプルパッドとは別体のメンブレンパッドを含み、

サンプルパッドは、糖類もしくは第三の抗体の担持部およびサンプル供給部を有し、メンブレンパッドは、検出部を有する請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の検出キット。

【請求項 5】

(1) の標識体が着色ラテックス粒子又は金属コロイド粒子である請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の検出キット。

【請求項 6】

被検出物質がヘモグロビンであり、第一 ~ 第三の抗体が抗ヘモグロビン抗体である請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の検出キット。

10

【請求項 7】

糖類および第三の抗体の担持部が、サンプル供給部よりも上流側に配置されている請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の検出キット。

【請求項 8】

糖類および第三の抗体の担持部が、サンプルパッドの上流側端部に形成されている請求項 1 ~ 7 のいずれかに記載の検出キット。

【請求項 9】

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、以下の工程を含む検出方法。

(A) 被検出物質に対して免疫学的に反応する第一の抗体が標識体に固定化されたコンジュゲート試薬、検体および検体希釈液を混合し、これらの混合物からなるサンプルを得る工程

20

(B) 下記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 (A) で得られたサンプルを滴下し、不溶性担体中を展開させる工程

イムノクロマトグラフィー用テストストリップ；

前記不溶性担体を備え、上流から順に

糖類並びに被検出物質又は被検出物質及びコンジュゲートの複合体と結合する第三の抗体が溶出可能に担持された担持部、

サンプルを供給するサンプル供給部、および

被検出物質に対して免疫学的に反応する第二の抗体が固定化された検出部、を含む、前記テストストリップ

30

(C) サンプル中の被検出物質とコンジュゲートの複合体、を検出部において検出する工程

【請求項 10】

糖類が、単糖類及び 2 糖類からなる群から選ばれるいずれか 1 以上である請求項 9 に記載の検出方法。

【請求項 11】

糖類および第三の抗体の担持部は、不溶性担体上にサンプルの展開方向と直交するようにライン状に形成されている請求項 9 または 10 に記載の検出方法。

【請求項 12】

不溶性担体は、少なくともサンプルパッドおよびサンプルパッドとは別体のメンブレンパッドを含み、

40

サンプルパッドは、糖類もしくは第三の抗体の担持部およびサンプル供給部を有し、メンブレンパッドは、検出部を有する請求項 9 ~ 11 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 13】

(1) の標識体が着色ラテックス粒子又は金属コロイド粒子である請求項 9 ~ 12 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 14】

被検出物質がヘモグロビンであり、第一 ~ 第三の抗体が抗ヘモグロビン抗体である請求項 9 ~ 13 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 15】

50

糖類および第三の抗体の担持部が、サンプル供給部よりも上流側に配置されている請求項 9 ~ 14 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 16】

糖類および第三の抗体の担持部が、サンプルパッドの上流側端部に形成されている請求項 9 ~ 15 のいずれかに記載の検出方法。

【請求項 17】

検体が、糞便である、請求項 9 ~ 16 のいずれかに記載の検出方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、コンジュゲート試薬とイムノクロマトグラフィートテストストリップを含む検出キットに関する。特に、前記テストストリップが、コンジュゲート試薬に含まれる第一の抗体及びイムノクロマトグラフ検出用の第二の抗体とは別に、検出対象物に対する第三の抗体及び糖類が溶出可能に保持されたテストストリップである検出キットに関する。また、前記検出キットを用いた検出方法に関する。

【背景技術】

【0002】

イムノクロマトグラフィートテストストリップを用いて試料中の被検出物質である抗原を検出する方法は次のとおりである。まず、第一の抗体が標識体に固定化されたコンジュゲートと、サンプルとを接触させる。これらの接触によりサンプル中の被検出物質である抗原とコンジュゲートとの複合体が形成される。イムノクロマトグラフィートテストストリップは、第二の抗体が固定化された捕捉部位（検出部位）を有し、前記複合体を担体に提供すると複合体は、担体中を展開しながら、捕捉部位に捕捉され、目視あるいは光学的手段などにより複合体標識物質の有無や強度を検出することができる。

ここで、イムノクロマトグラフィートを利用した検出におけるコンジュゲートの存在様式としては、テストストリップの一部に、典型的にはサンプルパッド上に、サンプル供給部より下流側にコンジュゲート部として存在する様式がある。あるいは、テストストリップとは別にコンジュゲートチップなど、コンジュゲート試薬として存在する様式がある（特許文献 1）。コンジュゲートチップとは、検体液を濾過するフィルターにコンジュゲートが塗布されたものである。

前者の、コンジュゲートがテストストリップの一部として存在する場合には、サンプル供給部にサンプルが滴下されると、サンプルは、サンプル供給部の下流のコンジュゲート部に到達したときから、サンプル中の被検出物質である抗原とコンジュゲートとの結合反応が開始することになる。したがって、コンジュゲート部のコンジュゲートがすべて流れてしまうことにより、捕捉部位（検出部位）における発色強度の増強は停止することになる。

一方、サンプルをコンジュゲートチップで濾過した液体をテストストリップのサンプルパッドに滴下すると、サンプルおよびコンジュゲートの混合物である液体がサンプルパッドの全体に一気に分散することになる。したがって、滴下直後からサンプル中の抗原とコンジュゲートの結合反応が開始し、混合物の液体の流れが平衡に達するまで捕捉部位（検出部位）の発色強度は増強し続けることになる。

イムノクロマトグラフィートを利用した検出における感度の調節方法としては、例えば特許文献 2 が知られている。特許文献 2 には、分析対象成分を減らすために、分析対象試料を感度調節物質と反応させる方法が開示されている。具体的には、感度調節物質は、識別可能物質で標識した抗体とは別の、識別不能標識（例えば、テストストリップと区別できないような白色物質）で標識した抗体であり、これを、標識可能物質で標識した抗体の固定化部よりも上流に保持させて、分析を行う。分析対象成分は、一部は感度調節物質と反応しながらクロマトグラフ担体を移動し、感度調節物質と反応しない分析対象成分は、標識物質と反応し、検出部で固定されることになる。

本方法では、分析対象物を減らすという一定の効果は期待できるものの、標識抗体の存

10

20

30

40

50

在様式は、上記存在様式のテストストリップの一部として存在する場合に相当し、そもそも発色強度の増強が液体サンプルの流れが平衡に達するまで続くという問題は生じない。

また、特許文献3には、糞便潜在血液のような被検体のイムノクロマトグラフィー検出において、あらかじめ所定量の被検体をサンプルパッドに固定化された抗体と接触させて結合させてから、未結合の検体を着色ラテックスに結合された抗体と結合させ、検出する方法が開示されている。

本方法も、特許文献2と同様に、標識抗体の存在様式は、上記存在様式のテストストリップの一部として存在する場合に相当し、そもそも発色強度の増強が液体サンプルの流れが平衡に達するまで続くという問題は生じない。

【先行技術文献】

10

【特許文献】

【0003】

【特許文献1】国際公開WO2004/081568号パンフレット

【特許文献2】特開平10-48210号公報

【特許文献3】特開平8-101197号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

コンジュゲートを液体サンプルと混合した状態で、テストストリップに供給する場合に、検出部位における発色強度が長時間上がり続けることを抑制し、一定時間で複合体の検出部位における捕捉を完了させ、発色強度の増強が停止するようなイムノクロマトグラフィーを利用した検出キットおよび検出方法の提供を課題とする。

20

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を解決するために、本発明者らは、抗原の検出には、一定時間内に一定量の複合体が必要であり、それ以外の複合体の検出を抑制するためにはどうすればよいか鋭意検討を行った。その結果、コンジュゲートおよび検出部位における抗体とは別に、検出対象の抗原に対する遊離の抗体をサンプルパッド上に存在させることで、抗原をマスキングすることで、不要な複合体の形成を抑制し、また、不要な複合体の検出部位での捕捉を抑制できるのではないかと考えた。さらに、遊離の抗体を単独でサンプルパッド上に存在させると、すぐに溶出して、検出に本来必要な複合体をもマスキングしてしまうおそれがあるため、糖類と共に存在させることにより、徐放性を付与し、少し遅れて複合体をマスキングすることで、遅れた複合体の補足を選択的に抑制することに成功し、本発明を完成するに至った。

30

すなわち、本発明は以下の構成を有する。

< 1 >

以下を含むイムノクロマトグラフィーを利用した検出キット。

(1) 被検出物質に対して免疫学的に反応する第一の抗体が標識体に固定化されたコンジュゲート試薬

(2) サンプルを展開させることによりサンプル中の被検出物質を検出する不溶性担体を備えた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、前記不溶性担体は、上流から順に

40

糖類および第三の抗体が溶出可能に担持された担持部、

サンプルを供給するサンプル供給部、および

被検出物質に対して免疫学的に反応する第二の抗体が固定化された検出部、を含む、前記テストストリップ

< 2 >

糖類が、単糖類及び2糖類からなる群から選ばれるいずれか1以上である<1>に記載の検出キット。

< 3 >

50

糖類および第三の抗体の担持部は、不溶性担体上にサンプルの展開方向と直行するようにライン状に形成されている< 1 >または< 2 >に記載の検出キット。

< 4 >

不溶性担体は、少なくともサンプルパッドおよびサンプルパッドとは別体のメンブレンパッドを含み、

サンプルパッドは、糖類もしくは第三の抗体の担持部およびサンプル供給部を有し、メンブレンパッドは、検出部を有する< 1 > ~ < 3 >のいずれかに記載の検出キット。

< 5 >

( 1 ) の標識体が着色ラテックス粒子又は金属コロイド粒子である< 1 > ~ < 4 >のいずれかに記載の検出キット。

10

< 6 >

被検出物質がヘモグロビンであり、第一 ~ 第三の抗体が抗ヘモグロビン抗体である< 1 > ~ < 5 >のいずれかに記載の検出キット。

< 7 >

糖類および第三の抗体の担持部が、サンプル供給部よりも上流側に配置されている< 1 > ~ < 6 >のいずれかに記載の検出キット。

< 8 >

糖類および第三の抗体の担持部が、サンプルパッドの上流側端部に形成されている< 1 > ~ < 7 >のいずれかに記載の検出キット。

< 9 >

20

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、以下の工程を含む検出方法。

( A ) 被検出物質に対して免疫学的に反応する第一の抗体が標識体に固定化されたコンジュゲート試薬、検体および検体希釈液を混合し、これらの混合物からなるサンプルを得る工程

( B ) 下記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 ( A ) で得られたサンプルを滴下し、不溶性担体中を展開させる工程

イムノクロマトグラフィー用テストストリップ；

前記不溶性担体を備え、上流から順に

糖類および第三の抗体が溶出可能に担持された担持部、

サンプルを供給するサンプル供給部、および

30

被検出物質に対して免疫学的に反応する第二の抗体が固定化された検出部、を含む、前記テストストリップ

( C ) サンプル中の被検出物質とコンジュゲートの複合体、を検出部において検出する工程

< 1 0 >

糖類が、単糖類及び2糖類からなる群から選ばれるいずれか1以上である< 9 >に記載の検出方法。

< 1 1 >

糖類および第三の抗体の担持部は、不溶性担体上にサンプルの展開方向と直行するようにライン状に形成されている< 9 >または< 1 0 >に記載の検出方法。

40

< 1 2 >

不溶性担体は、少なくともサンプルパッドおよびサンプルパッドとは別体のメンブレンパッドを含み、

サンプルパッドは、糖類もしくは第三の抗体の担持部およびサンプル供給部を有し、メンブレンパッドは、検出部を有する< 9 > ~ < 1 1 >のいずれかに記載の検出方法。

< 1 3 >

( 1 ) の標識体が着色ラテックス粒子又は金属コロイド粒子である< 9 > ~ < 1 2 >のいずれかに記載の検出方法。

< 1 4 >

被検出物質がヘモグロビンであり、第一 ~ 第三の抗体が抗ヘモグロビン抗体である< 9

50

> ~ < 13 > のいずれかに記載の検出方法。

< 15 >

糖類および第三の抗体の担持部が、サンプル供給部よりも上流側に配置されている < 9 > ~ < 14 > のいずれかに記載の検出方法。

< 16 >

糖類および第三の抗体の担持部が、サンプルパッドの上流側端部に形成されている < 9 > ~ < 15 > のいずれかに記載の検出方法。

< 17 >

検体が、糞便である、 < 1 > ~ < 16 > のいずれかに記載の検出方法。

【発明の効果】

10

【0006】

検体をあらかじめコンジュゲート試薬と接触させた状態でイムノクロマトグラフィーテストストリップのサンプル供給部に提供し、検体中の被検出物質である抗原を検出する方法において、コンジュゲートおよび検出用の抗体とは別に、テストストリップに、糖類および遊離の抗体を存在させることにより、検出部位における発色強度の増強を一定時間内に抑えることができ、短時間で正確な検出が可能となった。

さらには、遊離の抗体及び糖類を保持させる部位を、サンプル供給部より流れ方向の上流側に配置することで、サンプル供給部より上流に流れ込んでしまうようなコンジュゲートやコンジュゲートと抗原との複合体を効果的にマスキングすることが可能となり、より効果的に検出部位における検出強度の制御が可能となった。

20

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】抗体を一定濃度とし、糖類の濃度を变化させて保持した場合のテストラインにおける発色強度の経時変化を示す図である（実施例1）。

【図2】糖類を一定濃度とし、抗体の濃度を变化させて保持した場合のテストラインにおける発色強度の経時変化を示す図である（実施例2）。

【図3】糖類のみを保持した場合のテストラインにおける発色強度の経時変化を示す図である（比較例）。

【図4】本発明のイムノクロマトグラフィーテストストリップの構成模式図である。

【発明を実施するための形態】

30

【0008】

（サンプル）

本発明において、サンプルとしては、血液、尿、痰、唾液、鼻汁、その他の体液、糞便等の生体試料を用いる。生体試料は、そのままサンプルとして用いてもよく、適宜希釈液によって希釈したり、ろ過してサンプルとしてもよい。

【0009】

（被検出物質）

本発明の被検出物質としては、サンプルである生体試料便中に含まれ、抗原抗体反応を利用して検出し得るものであればいずれでもよく、ウイルス、寄生虫、タンパク質などが挙げられる。

40

被検出物質となるウイルスとしてインフルエンザウイルス、被検出物質となるタンパク質としては、糞便潜在血液中のヒトヘモグロビン、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。

【0010】

（キット）

本発明のイムノクロマトグラフィーを利用した検出キットは、以下の

（1）被検出物質に対して免疫学的に反応する第一の抗体が標識体に固定化されたコンジュゲート試薬、及び

（2）サンプルを展開させることによりサンプル中の被検出物質を検出する不溶性担体を備えた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、

50

前記不溶性担体は、上流から順に糖類および第三の抗体が溶出可能に担持された担持部、サンプルを供給するサンプル供給部、および被検出物質に対して免疫学的に反応する第二の抗体が固定化された検出部、を含む、前記テストストリップ、

を含むものであればよい。

本検出キットは、他に検出に必要な試薬、サンプルの希釈液、試験用チューブ、便採取用の綿棒、取扱い説明書、テストストリップ格納用のハウジングなどを含んでもよい。

#### 【0011】

(イムノクロマトグラフィー用テストストリップ)

本発明のテストストリップにおいて、上記サンプルを供給するサンプル供給部は、サンプルパッドとして、検出部を備えた不溶性メンブレンと別個に存在する場合、または、前記不溶性メンブレンと同一メンブレン上に、検出部の上流側のサンプル供給部として存在する場合等がある。このうちでもサンプルパッドとして存在する場合が望ましい。

本発明のテストストリップには、コンジュゲートパッドが存在せず、コンジュゲートはテストストリップとは別に、コンジュゲート試薬として存在する。コンジュゲート試薬は、例えば、フィルター中にコンジュゲートが含浸されたコンジュゲートチップの形態、凍結乾燥試薬の形態、凍結試薬の形態、乾燥試薬の形態等、検体希釈液等の液体にあらかじめ添加されている液状試薬の形態が挙げられる。コンジュゲートチップは、フィルターそのままであってもよいし、ハウジングに内蔵されていてもよい。このようなコンジュゲートチップを使って、検体希釈液を濾過して通過させることでチップ内のコンジュゲートと被検出物質が結合し、複合体を形成することができる。凍結乾燥試薬の形態、凍結試薬の形態、乾燥試薬の形態の場合は、使用直前に、被検出物質、又は検体希釈液に添加して使用することができる。

#### 【0012】

(サンプルパッド)

本発明のイムノクロマトグラフィーテストストリップがサンプルパッドを含む場合、サンプルパッドとはサンプルを受け入れる部位を有するパッドであればよく、パッドに成型された状態で液体のサンプルを吸収し、液体と検出対象物とが通り抜けることができるような物質及び形態をも含む。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。サンプルパッドには、後述する抗体固定化メンブレンにおける非特異的反応(吸着)を防止・抑制する目的で、通常使用されるブロッキング試薬を含ませることができる。

#### 【0013】

(糖類および抗体)

本発明のテストストリップの担持部において担持させる糖類は、遊離の抗体の溶出速度をコントロールできる作用があるものであればよく、このうち単糖類及び2糖類から選ばれるいずれか1以上が好ましい。具体的には、単糖類としては、グルコース、ガラクトース、フルクトース、マンノース等が挙げられ、2糖類としては、スクロース、ラクトース、マルトース、トレハロース、及びフルクトース等が挙げられる。

本発明のテストストリップの担持部において担持される第三の抗体とは、検出対象に対する抗体であって、検出対象または、検出対象及びコンジュゲートの複合体と結合するような抗体であればよい。したがって、コンジュゲートに含まれる第一の抗体または検出部に固定化される第二の抗体と同一の抗体であってもよいし、異なる抗体であってもよい。また、モノクローナル抗体でもポリクローナル抗体でもよい。第三の抗体は、コンジュゲートのような固相に結合した抗体や、検出用抗体のようにメンブレンに固定化された抗体と異なり、テストストリップに固定化されておらず、サンプルパッドや不溶性メンブレンから溶出可能に保持されている遊離の抗体であることが望ましい。

#### 【0014】

本発明において、糖類および抗体は、テストストリップがサンプルパッドを有する場合には、サンプルパッドのうち、サンプル供給部より上流側に担持されることが望ましい。また、サンプルパッドを有さず、同一の不溶性メンブレン上にサンプル供給部および検出部を有する場合には、不溶性メンブレンのうち、サンプル供給部の上流側に担持されることが望ましい。また、サンプル供給部の上流側でも、最上流部、すなわち、不溶性メンブレンの上流側端部に担持されることがよりいっそう望ましい。

【0015】

糖類および抗体をサンプルパッドや不溶性メンブレンに溶出可能に担持させる方法としては、糖類を含む溶液および抗体を含む溶液をサンプルパッド等に塗布したり、これらの溶液にサンプルパッドを浸漬して乾燥する方法が挙げられる。

糖類と抗体は、それぞれ別々の溶液をそれぞれ塗布して乾燥してもよいし、糖類と抗体を混合した溶液を塗布して乾燥してもよい。

【0016】

上記の糖類または抗体を所定の濃度で含有する液を調製し、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サンプルパッドや不溶性メンブレン担体に塗布し、乾燥させることにより溶出可能に担持させることができる。上記糖類の液の濃度は0.1~10%が好ましく、0.5~8%さらに好ましく、1~5%がよりいっそう好ましい。上記抗体の液の濃度は0.05~5mg/mLが好ましく、0.1~1mg/mLがさらに好ましく、0.1~0.7mg/mLがよりいっそう好ましい。また、糖類または抗体のサンプルパッドまたは不溶性メンブレン担体への担持量は、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、1~20 $\mu$ L/cmが好ましく、5~10 $\mu$ L/cmより好ましい。

また、担持部は、流れ方向に直行するようにライン状に形成されることが望ましく、ラインの幅は、1~10mmが好ましく、2~8mmがより好ましく、3~5mmがよりいっそう好ましい。

【0017】

このようなテストストリップのサンプルパッドに、コンジュゲート試薬、被検出物質、検体希釈液を含有するサンプルが供給されると、被検出物質とコンジュゲートが接触して複合体を形成しながら当該パッドを通過する。その後、複合体は検出用抗体が固定化された不溶性メンブレンへと展開される。

不溶性メンブレンには、その一部に被検出物質に対して免疫学的に反応する第二の抗体が固定化されているため、該複合体は第二の抗体に結合して固定化されることになる。固定化された複合体は、コンジュゲートの標識物質に由来する吸光度、反射光、蛍光、磁気等を検出する手段により検出される。

ここで、本発明の作用について説明する。サンプル供給部に供給されたサンプルはメンブレン上で四方に拡散することから、下流に展開するものと、上流に回り込んでしまうものがある。このうち上流に回り込んでしまうものは、その後遅れて展開し、検出部における発色強度を長く増強させる原因となる。本発明の糖類および第三の抗体の作用は、おそらく、この上流に回り込んでしまうサンプルと反応することで、被検出物質や被検出物質とコンジュゲートとの複合体をマスクングし、検出部での結合を抑制することができると思われる。

【0018】

(サードパッド)

サードパッドは、試料の性状等により必要に応じて配置されることが望ましく、サンプル中の被検出物質とコンジュゲートの複合体を透過させることができるものであればいずれでもよい。具体的には、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、特に、ポリスルホンまたはセルロースアセテートからなる多孔質性の部材であることが望ましい。

また、本発明の多孔質性サードパッドの孔径は、平均孔径で1~100 $\mu$ mであること

10

20

30

40

50

が望ましく、より望ましくは $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 、よりいっそう望ましくは $20 \sim 80 \mu\text{m}$ であり $25 \sim 70 \mu\text{m}$ がもっとも望ましい。 $1 \mu\text{m}$ 未満では詰まりの原因となり、検体の流れ自体が不良となるからであり $100 \mu\text{m}$ より大きいと前記非特異反応物質を捕捉することができないためと思われるからである。

#### 【0019】

(不溶性メンブレン)

本発明に用いられる不溶性メンブレンは、被検出物質に対して免疫学的に反応する第一の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試薬の場合には、上記の抗体を所定の濃度で含有する液を調製し、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 $0.1 \sim 5 \text{ mg/mL}$ が好ましく、 $0.5 \sim 2 \text{ mg/mL}$ 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、 $0.5 \sim 2 \mu\text{L/cm}$ 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試薬を用いた測定方法は、サンプルが毛细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 $6.0 \sim 9.5$ の範囲が好ましく、 $6.5 \sim 8.5$ がより好ましく、 $7.0 \sim 8.0$ がさらに好ましい。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、ブ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、不溶性メンブレンには、従来からイムノクロマト試薬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、コンジュゲート試薬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、コンジュゲート試薬に標識された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。

#### 【0020】

本発明で用いられる不溶性メンブレン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試薬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、UniSart 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御することが可能である。

#### 【0021】

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、サンプル及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

10

20

30

40

50

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及びコンジュゲートの毛管流を妨げない物質で構成する。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。

#### 【0022】

（被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体）

本発明で用いられる被検出物質に対して免疫学的に反応する第一～第三の抗体は、被検出物質に結合可能な抗体である。第一および第二の抗体は、後述する標識体および検出部に固定化される。第三の抗体は、糖類とともにサンプルパッドの上流または検出部を有する不溶性メンブレンに溶出可能に保持される。

また、これらの第一～第三の抗体は同一であってもよいが、第一と第二の抗体とは、別のものであることが好ましい。上記抗体は、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよい。また、機能性抗体断片、Fab、Fabプライム等であってもよい。

#### 【0023】

（標識体）

本発明で用いられる標識体は、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標識体を用いることができる。例えば、金コロイド粒子や白金コロイド粒子などのコロイド状金属粒子、着色ラテックス粒子、磁性粒子、蛍光粒子などが好ましく、特に金コロイド粒子、着色ラテックス粒子が好ましい。

#### 【0024】

（コンジュゲート試薬）

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。被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体を標識体へ固定化させる方法としては、物理吸着、化学結合等が挙げられ、物理吸着により固定化させるのが一般的である。本発明におけるコンジュゲートは、テストストリップとは別に、検体と混合されるように個別のコンジュゲート試薬として存在する。コンジュゲート試薬は、コンジュゲートそのままであってもよいし、必要に応じてコンジュゲート以外の他の成分や構成を含むものであってもよい。例えば、フィルター中にコンジュゲートが含浸されたコンジュゲートチップの形態が挙げられる。コンジュゲートチップを使って、検体希釈液を濾過することでコンジュゲートと被検出物質が結合し、複合体を形成することができる。

コンジュゲートチップは、検体希釈液容器と嵌合する開口部及びノズルを備えたキャップに内蔵されていることが望ましい。このようなコンジュゲートチップを特にコンジュゲートキャップということがある。コンジュゲートキャップを使つたる過方法が次の通りである。コンジュゲートキャップを検体希釈液容器の開口部に嵌合し、検体希釈液容器を逆さにして、容器を圧迫することにより、希釈液がコンジュゲートキャップ内のコンジュゲートチップを通過する。その結果、コンジュゲートを含む希釈液がノズルから排出されることとなる。これをイムノクロマトグラフィーテストストリップのサンプル供給部に提供する。

#### 【0025】

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、さらに測定条件やサンプルの種類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る。

他の構成としては、例えば、不溶性メンブレンを移動・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吸収パッドが挙げられる。

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作製は実施例に記載の方法を適宜、修飾・改変して行うことができる。

#### 【0026】

10

20

30

40

50

(その他)

本明細書中、上流または下流という意味は、サンプルの流れる方向の上流側、下流側という意味で用いる。すなわち、本発明のテストストリップで上からサンプルパッド、サードパッド、不溶性メンブレンが一部で重なるように積層されている場合、サンプルパッドがもっとも上流であり、不溶性メンブレンが下流ということになる。また、不溶性メンブレンの下流側端部が重なるように上に吸収パッド(エンドパッドともいう)が積層されることがあるが、この場合、吸収パッドがもっとも下流である。

また、本明細書中の検体希釈液は、検体抽出液ともいう。また、検体希釈液は検体を展開する作用も有することから、展開液と表現されることもある。

【実施例】

【0027】

〔実施例1〕本願発明の効果確認試験(1)

サンプルパッドの上流側端部に各濃度の糖および抗ヘモグロビン抗体を溶出可能に含ませて、ヘモグロビンの検出反応における制御効果を確認した。以下、着色ラテックス標識抗ヘモグロビン抗体は、マウスモノクローナル抗体を、サンプルパッド及びテストストリップの抗ヘモグロビン抗体は、ヤギポリクローナル抗体をそれぞれ使用した。

1. コンジュゲートチップの作成

コンジュゲート(着色ラテックス標識抗ヘモグロビン抗体)及びコントロール試薬としてG S A (Goat Serum Albumin) 感作ラテックスを焼結フィルターに含浸して乾燥し、コンジュゲートチップを作製した。

【0028】

2. テストデバイスの作製

(1) 本発明のサンプルパッドの作製

スクロース0~7%と抗ヘモグロビン抗体0~0.5mg/mLを含む溶液を、10μL/cmでサンプルパッドの端部表面に塗布し乾燥させて、糖類および第三の抗体の担持部を有する本発明のサンプルパッドを作製した。(図中、S1%-0.5mg/mLなどの表記は、サンプルパッドに含ませるスクロースと抗体の濃度を示す。例えば、S1%-0.5mg/mLはスクロース1%、抗体0.5mg/mLを示す。図2,3においても同じ。コントロールはスクロースも抗体も含まない場合を示す。)

(2) テストストリップの作製

図4に、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模式構成図を示した。

プラスチックバックシート(a)に抗体固定化メンブレン(b)を貼り、その上に上記(1)で作製した糖類および第三の抗体の担持部(d)を有する本発明のサンプルパッド(e)を装着し、反対側の端には吸収パッド(f)を配置装着した。抗体固定化メンブレンは、不溶性メンブレンに、抗ヘモグロビン抗体およびコントロール試薬が流れ方向に対して垂直にライン状に固定化されている。各パッドは、上下のパッドとその一部が接するように積層して配置される。抗ヘモグロビン抗体からなるラインをテストライン(c1)、コントロール試薬からなるラインをコントロールライン(c2)という。

このように各構成要素を重ね合わせた構造物を一定幅に切断してイムノクロマトグラフィー用テストストリップを作製した。

テストストリップをサンプル添加窓部及び検出窓部(図示せず)を有するプラスチック製ハウジングに収容し、テストデバイスを作製した。

【0029】

3. 検体希釈液

10mM PBSを含む検体希釈液に、ヒトヘモグロビンを120ng/mLとなるように添加し、測定サンプルとした。

【0030】

4. 試験方法

測定サンプルをコンジュゲートチップでろ過して、テストデバイスのサンプル添加窓部

10

20

30

40

50

よりサンプルパッド上に5滴滴下した。滴下後2, 5, 7, 10, 15, 20, 30分の各時点でラインの発色強度を測定し、数値化した。サンプル中のヘモグロビンは、コンジュゲートチップ内部のフィルターを通過し、通過途中で着色ラテックス標識抗ヘモグロビン抗体と複合体を形成する。複合体は、メンブレンを展開し、テストラインに固定化された抗ヘモグロビン抗体と結合し、検出される。

【0031】

#### 5. 試験結果

結果を図1に示す。

一定濃度の抗体および各濃度のスクロースを含むサンプルパッドを使った場合、いずれのスクロース濃度であっても、ヘモグロビンの検出反応抑制効果が認められた。特に、スクロース濃度1~3%では、良好な結果が確認された。

10

【0032】

〔実施例2〕本発明の効果確認試験(2)

サンプルパッドの上流側端部に糖および各濃度の抗ヘモグロビン抗体を溶出可能に含ませて、ヘモグロビンの検出反応における制御効果を確認した。

【0033】

#### 1. 試験方法

スクロース5%及び抗体を0.1mg/mL、0.3mg/mL、0.5mg/mL若しくは0.7mg/mL含む溶液を、10μL/cmでテストストリップのサンプルパッドの端部表面に塗布し乾燥させた以外は、実施例1と同様にサンプルパッドを作製し、テストストリップを製造した。

20

【0034】

#### 2. 試験結果

結果を図2に示す。一定濃度の糖および各濃度の抗ヘモグロビン抗体を含むサンプルパッドを使った場合、いずれの抗体濃度であっても、ヘモグロビンの検出反応における抑制効果が認められた。

【0035】

〔参考例1〕

本願発明の効果と比較するために、サンプルパッドの上流側端部に糖のみを溶出可能に含ませて、ヘモグロビンの検出反応における制御効果を確認した。

30

【0036】

#### 1. 試験方法

スクロース0, 5%, 10%を含む溶液を、10μL/cmでテストストリップのサンプルパッドの端部表面に塗布し乾燥させた以外は、実施例1と同様にサンプルパッドを作製し、テストストリップを製造した。

#### 2. 試験結果

結果を図3に示す。抗体を含まず、糖のみを含むサンプルパッドを使った場合には、サンプル中のヘモグロビンの検出反応抑制効果は認められなかった。

【産業上の利用可能性】

【0037】

検体をあらかじめコンジュゲート試薬と接触させた状態でイムノクロマトグラフィーテストストリップのサンプル供給部に提供し、検体中の被検出物質である抗原を検出する方法において、コンジュゲートおよび検出用の抗体とは別に、テストストリップに、糖類および遊離の抗体を存在させることにより、検出部位における発色強度の増強を一定時間内に抑えることができ、反応制御が可能となった。

40

【符号の説明】

【0038】

(a) バッキングシート

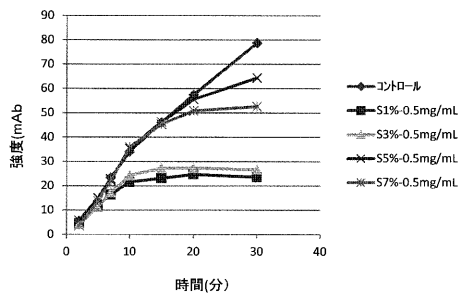
(b) 抗体固定化メンブレン

(c1) テストライン

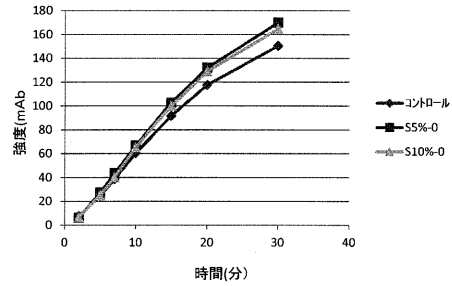
50

- (c2) コントロールライン
- (d) 糖類および第三の抗体の担持部
- (e) サンプルパッド
- (f) 吸収パッド

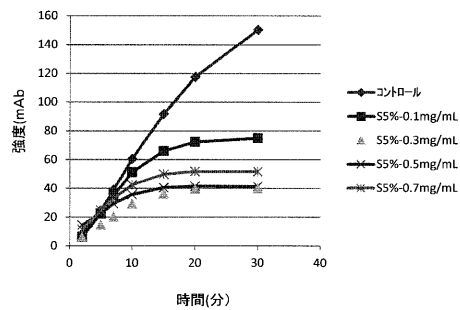
【図1】



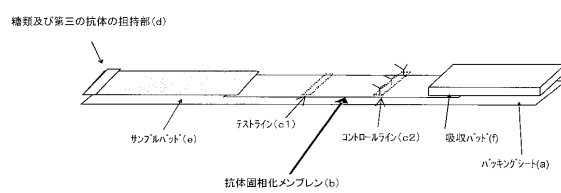
【図3】



【図2】



【図4】



---

フロントページの続き

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特開平10-048210(JP,A)  
特開2000-310639(JP,A)  
特開2016-028241(JP,A)  
特開2012-058058(JP,A)  
特表2012-524277(JP,A)  
米国特許第06080551(US,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	免疫色谱检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP6371808B2</a>	公开(公告)日	2018-08-08
申请号	JP2016156287	申请日	2016-08-09
[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		
当前申请(专利权)人(译)	积水医疗有限公司		
[标]发明人	奥山慎也 東加奈子 齋藤和典		
发明人	奥山 慎也 東 加奈子 齋藤 和典		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.541.Z G01N33/53.D		
其他公开文献	JP2018025426A		

摘要(译)

其中偶联物与液体样品中，当提供给测试条混合，并防止在对检测部位的颜色强度的状态持续上升时间长，在一定的时间来完成的获取复合物的检测部位的，使用免疫色谱法，停止着色强度的增强提供检测试剂盒和检测方法。在免疫层析测试条中，通过在样品垫上保持游离抗体和待检测抗原的糖类来解决问题，与检测位点处的缀合物和抗体分开。背景技术

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特 許 公 報(B2)	(11) 特許番号 特許第6371808号 (P6371808)
(45) 発行日 平成30年8月8日(2018.8.8)	(24) 登録日 平成30年7月20日(2018.7.20)	
(51) Int. Cl. F1 G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/543 521 G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 541Z G01N 33/53 D		
請求項の数 17 (全 14 頁)		
(21) 出願番号 特願2016-156287(P2016-156287)	(73) 特許権者 390037327 积水メディカル株式会社 東京都中央区日本橋三丁目1番3号	
(22) 出願日 平成28年8月9日(2016.8.9)		
(65) 公開番号 特開2018-25426(P2018-25426A)	(74) 代理人 110000774 特許業務法人 もえぎ特許事務所	
(43) 公開日 平成30年2月15日(2018.2.15)	(72) 発明者 奥山 慎也 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	
審査請求日 平成29年12月4日(2017.12.4)	(72) 発明者 東 加奈子 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	
早期審査対象出願	(72) 発明者 齋藤 和典 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	
最終頁に続く		
(54) 【発明の名称】 イムノクロマトグラフィー検出キット		