

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2012年4月5日(05.04.2012)



(10) 国際公開番号
WO 2012/043746 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/072427
- (22) 国際出願日: 2011年9月29日(29.09.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-222418 2010年9月30日(30.09.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 積水メディカル株式会社(SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目13番5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 結城 久美子(YUKI, Kumiko) [JP/JP]; 〒3010852 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3番1号 積水メディカル株式会社つくば研究所内 Ibaraki (JP). 佐々木由佳(SASAKI, Yuka) [JP/JP]; 〒1030027 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 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人 もえぎ特許事務所(MOEGI PATENT OFFICE); 〒1050001 東京都港区虎ノ門二丁目7番7号 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

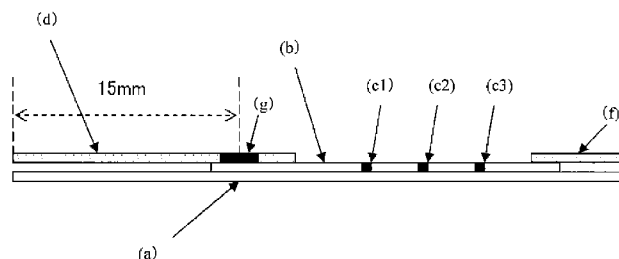
添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: TEST STRIP FOR IMMUNOCHROMATOGRAPHY, AND PROCESS FOR PRODUCTION THEREOF

(54) 発明の名称: イムノクロマトグラフィー用テストストリップおよびその製造方法

[図1]



(57) Abstract: Provided is a test strip for immunochromatography, which requires a reduced time for the completion of a reaction and has excellent sensitivity. The test strip for immunochromatography comprises (1) a conjugated pad and (2) an insoluble membrane carrier as mentioned below, and is characterized in that the lower surface of a sample supply section in the conjugated pad is not in contact with the upper surface of the insoluble membrane carrier and the lower surface of a conjugate section in the conjugated pad is in contact with the upper surface of the insoluble membrane carrier: (1) the conjugated pad which comprises the sample supply section and the conjugate section, wherein the sample supply section supplies a sample that is suspected of containing a substance to be detected, and wherein the conjugate section is arranged downstream from the sample supply section, contains a conjugate composed of a label and an antibody or antigen capable of immunologically reacting with the substance and immobilized onto the label, and has a linear shape; and (2) the insoluble membrane carrier having at least one detection section onto which the antibody or antigen capable of immunologically reacting with the substance is immobilized.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2012/043746 A1

反応完了時間が短く、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の提供。以下の(1)および(2)を含み、かつ、コンジュゲートパッドの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、コンジュゲートパッドの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していることを特徴とするイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。(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、被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するライン状のコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド(2)被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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

明 細 書

発明の名称：

イムノクロマトグラフィー用テストストリップおよびその製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、インフルエンザウイルス等の被検出物質を検出するためのイムノクロマトグラフィー用テストストリップおよびその製造方法に関する。

背景技術

[0002] サンプル中の検出すべき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測定方法が従来から行われている。イムノクロマトグラフィーは、被検出物質である抗原または抗体に対する抗体または抗原を、クロマトグラフ媒体である不溶性メンブレン担体上に固定化して、固定相である検出部を作成し、コンジュゲート（検出試薬）である上記被検出物質と結合可能な抗体または抗原によって感作された標識体を移動相として用い、被検出物質と移動相であるコンジュゲートとを特異的に反応させ、さらに固定相である検出部において、コンジュゲートと結合した被検出物質を、検出部に固定化された抗体または抗原に特異的に反応させるものである。そして、通常、標識体として、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るので、検出部における色から、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検出する。

[0003] イムノクロマトグラフィー用テストストリップの構成としては、特許文献1に示されている通り、サンプルを供給するためのサンプルパッド、移動相であるコンジュゲートを配置させるためのコンジュゲートパッド、サンプルとコンジュゲートの複合体を展開するとともに、検出のための検出部を有する不溶性メンブレン担体、及び不溶性メンブレン担体を展開してきたサンプルを吸収するための吸収パッドが配置されているのが一般的である。

しかしながら、従来の上記構成のイムノクロマトグラフィー用テストスト

リップは、コンジュゲートパッドからコンジュゲートがリリースされ難いため、反応が完了するまでに時間がかかったり、或いは、バックグラウンドが上昇し易いといった問題点がある。

また、コンジュゲートパッドは、コンジュゲートを均一に含浸させ、乾燥させたものであるが、コンジュゲートを含浸させる工程を経るため、製造の自動化が難しく、さらに、コンジュゲートの含浸が不均一になり易く、性能にばらつきが生じる恐れがあるといった問題点がある。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：米国特許第6352862号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 本発明の目的は、反応完了時間が短く、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提供することにある。また、本発明の他の目的は、液を含浸させる工程を含まず、自動化が容易であり、かつ、均一な性能を有する上記イムノクロマトグラフィー用テストストリップが得られる製造方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0006] 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、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ものであって、以下の(1)および(2)を含み、かつ、コンジュゲートパッドの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、コンジュゲートパッドの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していることを特徴とする。

(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、被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有する

ライン状のコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド

(2) 被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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

イムノクロマトグラフィー用テストストリップを上記構成とすることで、コンジュゲートパッドからのコンジュゲートのリリース性が優れたものとなり、短時間で反応が完了するとともに、感度にも優れたものとなる。

尚、本発明において、抗原または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原または抗体を担持させることである。

また、上記コンジュゲート部は、サンプル展開方向、即ち、コンジュゲートパッドのサンプル供給部の中心と不溶性メンブレン担体の上流側端部の中心を結ぶ線に対して直行する方向にライン状に配置されているのが好ましい。

さらに、本発明でいう検出とは、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も含む。

[0007] 上記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、標識体に固定化された被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原と、検出部に固定化された被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原とは、別のものであることが好ましい。即ち、標識体に固定化された被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原と、検出部に固定化された被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原とは、各々被検出物質の別の部位を認識する抗体または抗原であることが好ましい。標識体及び検出部に別の抗体または抗原を固定させることで、感度がより優れたものとなる。

[0008] 上記ライン状のコンジュゲート部のラインの中心線は、不溶性メンブレン担体の上流側端部よりも下流側に配置されていることが好ましい。コンジュゲート部の中心線を不溶性メンブレン担体の上流側端部よりも下流側に配置することで、コンジュゲート部の下面の半分以上が不溶性メンブレン担体と

接触し、コンジュゲートのリリース性がより優れたものとなる。さらに、上記ライン状のコンジュゲート部の全ての下面が不溶性メンブレン担体の上面と接触していることが好ましい。

[0009] 上記ライン状のコンジュゲート部のラインの中心線は、コンジュゲートパッドの上流側端部よりも10～20mm下流側に配置されていることが好ましい。

[0010] また、上記イムノクロマトグラフィー用テストストリップの製造方法も本発明の一つである。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製造方法は、コンジュゲートパッドとなるパッド状の多孔質材料の一部に、被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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液をライン状に塗布し、乾燥させてコンジュゲート部を形成し、多孔質材料のコンジュゲート部以外の一部をサンプル供給部として、コンジュゲートパッドを作成した後、コンジュゲートパッドを、被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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の上流側に、サンプル供給部の下面は不溶性メンブレン担体に接触せず、かつ、コンジュゲート部の下面は不溶性メンブレン担体と接触するように積層することを特徴とする。

上記製造方法は、コンジュゲートを多孔質材料に含浸させる工程を含有せず、自動化が容易な液の塗布によりコンジュゲート部を形成しているため、全体として製造の自動化が可能であり、かつ、液の塗布料は制御が比較的容易であり、得られるイムノクロマトグラフィー用テストストリップの性能を均一に維持し易い。

発明の効果

[0011] 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、コンジュゲート部がライン状に形成されており、かつ、コンジュゲート部と不溶性メンブレン担体が特定の位置関係にあるため、イムノクロマトグラフィー用テストストリップをコンジュゲートパッド及び不溶性メンブレン担体とから構成す

ることができ、また、コンジュゲートパッドからのコンジュゲートのリリース性が優れたものとなり、短時間で反応が完了するとともに、感度にも優れたものとなる。

また、ライン状のコンジュゲート部のラインの中心線を不溶性メンブレン担体の上流側端部よりも下流側に配置することにより、上記リリース性及び感度がより優れたものとなる。

本発明の製造方法は、従来のコンジュゲートパッドのようにコンジュゲート液をパッド全体に含浸させる工程を含まないことから、コンジュゲートパッドの製造の自動化が容易となる。また、コンジュゲートがライン状に塗布されて形成されることから、コンジュゲートの量および塗布位置の調整がし易く、これらを均一とすることができ、その結果均一な性能を有する上記イムノクロマトグラフィー用テストストリップが得られる。

図面の簡単な説明

[0012] [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を示す（デバイス作製例2，3，4）

[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を示す（デバイス作製例7）

[図3]参考例のイムノクロマトグラフィー用テストストリップを示す（デバイス作製例5）

[図4]従来のイムノクロマトグラフィー用テストストリップを示す（デバイス作製例1）

発明を実施するための形態

[0013] （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、及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。

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箇所形成して、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い。

[0014] (サンプル)

本発明において、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。上記の生体（生物）由来物質やその抽出液は、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てサンプルとしてもよい。また、適宜濾過したものをサンプルとして用いてもよい。

[0015] (被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原)

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抗体または抗原は、被検出物質に結合可能な抗体または抗原であり、被検出物質がウイルスや抗原の場合は抗体、被検出物質が抗体の場合は抗原が好ましい。被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原は、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または抗原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または抗原とで、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または抗原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ー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、抗体の場合は異なるエピトープを認識する抗体であり、抗原の場合は異なるエピトープを有する抗原をいう。

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、標識体及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。本発明ではこのうちでも特に、標識体に固定化される抗体として $F(ab')_2$ を用いるのが好ましい。標識体に機能性断片化抗体である $F(ab')_2$ を用いることにより、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及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。

[0016] (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、カラーラテックス粒子、磁性粒子などが好ましく、特に金コロイド粒子が好ましい。

標識体の粒径は、用いる標識体に応じて適当な粒径の標識体を用いるのが好ましい。例えば、標識体として金コロイド粒子を用いる場合、その粒径としては20～60 nmが好ましく、特に45～55 nmが好ましい。上記の金コロイド粒子は、一般に知られている方法、例えば、加熱したテトラクロロ金（III）酸水溶液にクエン酸三ナトリウム水溶液を滴下攪拌することによって製造することができる。

[0017] (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または抗原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、金コロイド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。

被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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。例えば、抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を金コロイド粒子へ固定化させる場合、通常緩衝液に金コロイド粒子及び抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体を添加し、物理吸着によって固定化させ。この際、抗体濃度は20～100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に調製されるのが好ましい。緩衝液とそのpHは、例えば、0.5～5 mMリン酸緩衝液（pH 6～7）、0.5～5 mMホウ酸緩衝液（pH 8～9.5）等が好ましい。

また、金コロイド粒子などの標識体上の、抗体または抗原が結合していない領域は、BSAなどでブロッキングするのが好適である。

[0018] (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、その一部にサンプル供給部とライン状のコンジュゲート部とを有する。また、サンプル供給部とコンジュゲート部との間には、コンジュゲートを含まない多孔質材料部分が存在しており、サンプル供給部に供給されたサンプルは、多孔質材料を展開してコンジュゲート部に到達するようにされているのが好ましい。

上記サンプル供給部は、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部位であり、多孔質材料の一部に形成されており、サンプル供給部がコンジュゲートパッドの上流側となる。

上記コンジュゲート部は、コンジュゲートを含有する部位であり、上記サンプル供給部よりも下流側の多孔質材料上にライン状に形成される。ライン状のコンジュゲート部は、サンプル展開方向、即ち、コンジュゲートパッドのサンプル供給部の中心と後述する不溶性メンブレン担体の上流側端部の中心を結ぶ線に対して直行する方向にライン状に配置されているのが好ましい。また、ライン状のコンジュゲート部は、コンジュゲートパッドのサンプル展開方向の長さの中央よりも下流側に配置されることが望ましい。イムノクロマトグラフィー用テストストリップの一般的な大きさを考慮すると、ライン状のコンジュゲート部のラインの中心線が、コンジュゲートパッドの上流側端部よりも10～20mm下流側に配置されているのが好ましく、12～18mm下流側に配置されているのがより好ましい。

尚、コンジュゲートパッドのコンジュゲート部よりも下流側の全てがコンジュゲート部である必要はなく、コンジュゲート部のさらに下流側にはコンジュゲートを含まない多孔質材料部分が存在していてもよい。

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。

[0019] 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。コンジュゲート部の下面と不溶性メンブレン担体の上面との接触部分は、コンジュゲート部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、コンジュゲート部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。半分以上の接触とは、換言すれば、ライン状のコンジュゲート部のラインの中心線が不溶性メンブレン担体の上流側端部よりも下流側に配置されることである。なお、コンジュゲート部の下面と不溶性メンブレン担体の上面とが全く接触しない場合には、コンジュゲート部からのコンジュゲートのリリース性及びコンジュゲートの展開性が悪くなってバックグラウンドが上昇し、検出部の視認性が低下する。

コンジュゲートパッドのコンジュゲート部よりも上流側の部分には、サンプル供給部が形成されており、この部分はいわゆる従来のイムノクロマトグラフィ用テストストリップに設けられている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。コンジュゲート部では、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金コロイド粒子）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。

[0020] 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、ニトロセルロース、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。

[0021] （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または抗原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または抗原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ー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。上記の抗体または抗原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。

上記液の抗体または抗原の濃度は0.1～5 mg/mLが好ましく、0.5～2 mg/mLがさらに好適である。また、抗体または抗原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、0.5～2 μ 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グラフィー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、上記の抗体または抗原を所定の濃度で含有する液は、緩衝液に抗体または抗原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がより好ましく、7.0～8.0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、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または抗原を固定化した後、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または抗原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ー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。

[0022] 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ー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、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。

[0023] (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。

[0024] (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、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しておらず、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、好ましくは半分以上は、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。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。

[0025] (イムノクロマトグラフィー用テストストリップの製造方法)

上記イムノクロマトグラフィー用テストストリップの製造方法は特に限定されないが、パッド状の多孔質材料の一部（コンジュゲート部となる部分）にコンジュゲート液をライン状に塗布し、乾燥させてコンジュゲートパッドを作成した後、このコンジュゲートパッドと検出部を有する不溶性メンブレン担体とを接触させてイムノクロマトグラフィー用テストストリップとすることが好ましい。

例えば、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製造方法は、以下の（１）～（３）の工程を有するものである。

（１）コンジュゲートパッドとなるパッド状の多孔質材料の一部に、被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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液をライン状に塗布し、乾燥させてコンジュゲート部を形成し、前記コンジュゲート部以外の一部をサンプル供給部とする、コンジュゲートパッドを作成する工程

（２）被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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を準備する工程

（３）（２）で準備した不溶性メンブレン担体の上流側に、（１）で得られたコンジュゲートパッドを、サンプル供給部の下面は不溶性メンブレン担体に接触せず、かつ、コンジュゲート部の下面は不溶性メンブレン担体と接触するように積層する工程

上記コンジュゲート液は、通常用いられる緩衝液にコンジュゲートを含有させたものであり、コンジュゲートの濃度はコンジュゲート部に含有させる

コンジュゲート量に応じて適宜調整される。

上記コンジュゲート液は、液を一定速度で吐出することのできるノズル等を用いて、コンジュゲートパッドとなるパッド状の多孔質材料の一部（コンジュゲート部となる部分）に、塗布される。塗布は、含浸等よりも塗布量の制御が行い易く、コンジュゲート液を塗布することで、コンジュゲートの量を制御し易くなり、得られるコンジュゲートパッドのコンジュゲート量も均一性に優れたものとなる。その後、加熱乾燥、自然乾燥等により乾燥させてコンジュゲートパッドが得られる。

尚、コンジュゲートパッドはサンプル供給部を有するが、サンプル供給部はコンジュゲートを含まない多孔質材料部分であり、サンプルの展開性、イムノクロマトグラフィー用テストストリップを格納する容器等に応じて、適切な位置に配置することができる。

不溶性メンブレン担体の形成方法、コンジュゲートパッドと不溶性メンブレン担体との積層方法等は上記で述べた通りである。

[0026] (その他)

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。

コンジュゲートに由来するシグナルを測定する方法としては、公知の方法に従って行えばよく、例えば、吸光度あるいは反射光の強度を測定すればよい。

実施例

[0027] 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。

[0028] [抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体の調整]

以下の試験に用いた抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体 (Clone # 622212、Clone # 62241A) および抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体 (Clone # 612108、Clone # 614216) は、抗原としてリコンビナ

ントインフルエンザ核タンパクを用い、マウスに免疫し、当業者がモノクローナル抗体を製造するために通常行う方法を用いて得られた。

[0029] [デバイス作製例1] 従来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 (3 padタイプ)

1) 金コロイド粒子標識抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体 (コンジュゲート) の作製

抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体および抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体を以下に示す抗体濃度と緩衝液条件に調製した。1 OD/mLの金コロイド粒子 (粒径50nm) 溶液20mLに対し各抗体溶液を1mL添加し、室温で10分間攪拌した。該金コロイド粒子-抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体混合液および該金コロイド-抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体混合液、に対し、10%ウシ血清アルブミン (BSA) 水溶液を2mL添加し、さらに5分間攪拌後、10°Cにて、10,000rpmで45分間遠心し、沈渣 (コンジュゲート) を得た。得られたコンジュゲートに対し、Conjugate Dilution Buffer (Scripps社製) を1.2mL添加しコンジュゲートを懸濁させた。各コンジュゲートの吸光度を531nm (使用した金コロイド粒子の最大吸収波長) で測定した。吸光度の測定は、以下の試験においても同様に行った。

- i) マウス抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体
Clone #622212 (25 μ g/mL)、2mMリン酸緩衝液
- ii) マウス抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体
Clone #612108 (35 μ g/mL)、2mMリン酸緩衝液

[0030] 2) コンジュゲートパッドの作製

上記1) で調製したコンジュゲートを、8~20 OD/mLとなるように、1.33%カゼイン、4%スクロース溶液 (pH7.5) と混合してコンジュゲート液を作製し、一定体積のグラスファイバー製パッド (日本ポール社、No. 8964) に該パッド体積の1.2倍容量しみこませた。ドライオーブン内で70°C、30分間加温することにより乾燥させ、コンジュゲートパッドとした。また、増感剤

などの添加剤を添加する場合には、前記検出試薬に必要量を添加した後、同様の操作を行った。

[0031] 3) 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不溶性メンブレン担体（抗体固定化メンブレン）の作製

ニトロセルロースメンブレン（ザルトリウス社、Unisart CN140）の短辺の一端に、2.0mg/mLに調製した下記抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体及び2.5%スクロースを含む20mM TBS (pH8.0) を、イムノクロマト用ディスペンサー「XYZ3050」（BIO DOT社）を用いて1.0 μ L/cmとなるよう設定し、ライン状に塗布した。また、同様に、1.0mg/mLに調製した下記抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体及び2.5%スクロースを含む20mM TBS (pH8.0) をイムノクロマト用ディスペンサーを用いて1.0L/cmとなるよう設定し、ライン状に塗布した。コントロール抗体としては、0.75mg/mLに調整したヤギ抗マウスIgG及び2.5%スクロースを含む10mM TBS (pH8.0) をイムノクロマト用ディスペンサーを用いて1.0 μ L/cmとなるよう設定し、ライン状に塗布した。ラインは、テストストリップを組み立てた際に上流側から、インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体（c1）、抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体（c2）、コントロール抗体（c3）の順になるように塗布した。

ドライオープン内で70 $^{\circ}$ C、45分乾燥し、抗体固定化メンブレンとした。前記ヤギ抗マウスIgGは抗体のF(ab')₂部分の特異的に認識するものである。

i) マウス抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体（コンジュゲートに用いた抗体とは異なるエピトープを認識する抗体）

Clone # 62241A

ii) マウス抗インフルエンザB型ウイルス抗体（同上）

Clone # 614216

iii) ヤギ抗マウスIgG

[0032] 4) サンプルパッドの作製

グラスファイバー製パッド（Lydall社）をサンプルパッドとして用いた。

[0033] 5) イムノクロマトグラフィー用テストストリップの作製

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2) で作製した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) (Whatman社、740-E) を配置装着した。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。該イムノクロマトグラフィー用テストストリップは、アッセイの際、プラスチック製の専用のハウジング (サンプル供給窓部及び検出窓部を有する、図4中図示せず) に格納・搭載し、イムノクロマトグラフィー用テストデバイスの形態にした。図4に従来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。

[0034] [デバイス作製例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作製 (2 padタイプ)

1) 金コロイド粒子標識抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体 (コンジュゲート) の作製

上記1. と同様に作製した。

2) コンジュゲートパッドの作製

上記1) で調製したコンジュゲートを、8~20 OD/mLとなるように、1.33%カゼイン、4%スクロース溶液 (pH7.5) と混合してコンジュゲート液を作製し、一定体積のグラスファイバー製パッド (日本ポール社、No. 8964) にパッドの上流端より15mmの位置に幅5mmのラインを形成するようにしみこませた。ドライオープン内で70℃、30分間加温することにより乾燥させ、コンジュゲートパッドとした。また、増感剤などの添加剤を添加する場合には、前記検出試薬に必要量を添加した後、同様の操作を行った。上記1. の従来のイムノクロマトグラフィー用テストストリップでは、コンジュゲートパッドとサンプルパッドが別体であったが、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では、サンプルパッドがなく、コンジュゲートパ

ッドの一部にサンプル供給部（図2中図示せず）とライン状のコンジュゲート部（g）が存在する。

3）抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体固定化メンブレンの作製
上記1.と同様に作製した。

4）イムノクロマトグラフィー用テストストリップの作製

コンジュゲートパッドの上流端より15mmの位置に形成されたライン状のコンジュゲート部（g）は、その上流側端部が抗体固定化メンブレン（b）の上流側端部よりも下流になるように、かつ、下流端部から離れた位置に形成されている。すなわち、コンジュゲート部（g）は全面にわたって、その下面が抗体固定化メンブレンの上面と接触している。該イムノクロマトグラフィー用テストストリップは、デバイス作製例1と同様に、イムノクロマトグラフィー用テストデバイスの形態にした。図1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。

[0035]〔デバイス作製例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作製

用いる抗体をWholeの抗体（すなわち、断片化されていない抗体）からその断片であるF(ab')₂に置き換えた以外は、デバイス作製例2.と同様に作製した。

[0036]〔デバイス作製例4〕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

コンジュゲートパッドの上流端より15mmの位置に形成されたライン状のコンジュゲート部（g）の中心線は、上流側端部は抗体固定化メンブレン（b）の上流側端部よりも下流になるように配置されているが、コンジュゲート部（g）の上流側端部は抗体固定化メンブレン（b）の上流側端部よりも上流になるように配置されている。すなわち、コンジュゲート部（g）は半分以上の下面が抗体固定化メンブレンの上面と接触しているが、抗体固定化メンブレンと接触しない部分がある。該イムノクロマトグラフィー用テストストリップは、デバイス作製例1と同様に、イムノクロマトグラフィー用テスト

デバイスの形態にした。

[0037]〔デバイス作製例5〕（参考例）イムノクロマトグラフィー用テストストリップの作製

コンジュゲート部はコンジュゲートパッドの上流端より12mmの位置に形成され、コンジュゲート部の下流側端部が抗体固定化メンブレンの上流側端部よりも上流に配置されている。すなわち、コンジュゲート部の下面と抗体固定化メンブレンは接触していない。該イムノクロマトグラフィー用テストストリップは、デバイス作製例1と同様に、イムノクロマトグラフィー用テストデバイスの形態にした。図3に本参考例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。

[0038]〔デバイス作製例6〕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

コンジュゲート部はコンジュゲートパッドの上流端より12mmの位置に形成され、中心線が抗体固定化メンブレンの上流側端面よりも上流になるように配置されているが、コンジュゲート部の下流側端部は抗体固定化メンブレンの上流側端部よりも下流になるように配置されている。すなわち、コンジュゲート部の下面は半分未満であるが抗体固定化メンブレンと接触している。該イムノクロマトグラフィー用テストストリップは、デバイス作製例1と同様に、イムノクロマトグラフィー用テストデバイスの形態にした。

[0039]〔デバイス作製例7〕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

コンジュゲート部がコンジュゲートパッドの下流側の最端部すなわち、コンジュゲートパッド上流端から18mmの位置に形成されていること、以外は前記デバイス作製例3.と同様に作製した。図2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。

[0040]

[表1]

各デバイスの仕様

デバイス 作製例	1	2	3	4	5	6	7
	従来技術	本発明	本発明	本発明	参考例	本発明	本発明
図	図4	図1	図1	図示せず	図3	図示せず	図2
構造	3pad	2pad	2pad	2pad	2pad	2pad	2pad
抗体	Whole	Whole	F (ab') 2	F (ab') 2	F (ab') 2	F (ab') 2	F (ab') 2
コンジュゲート 幅 (mm)	(全体)	5	5	10	5	10	5
コンジュゲート パッド上流 端よりコン ジュゲートライ ン中心線ま での距離 (mm)	—	15	15	15	12	12	18
コンジュゲート 中心線の、 メンブレン上 流端部と の位置関 係	—	内側	内側	内側	外側	外側	内側
コンジュゲート 部でメンブレ ンと接触す る部分の 有無	—	有り	有り	有り	無し	有り	有り
コンジュゲート 部の位置	(全体)	下流端部 (最端部 ではない)	下流端部 (最端部 ではない)	下流端部 (最端部 ではない)	下流端部 (最端部 ではない)	下流端部 (最端部 ではない)	下流最端 部

[0041] [実施例1]

上記デバイス作製例1. ~7. で作製したイムノクロマトグラフィー用テストデバイスを用いて、インフルエンザウイルスの検出試験を行った。

1. 試験方法

(1) 試料

以下の抗原を2%BSAを含むPBS (pH7.4) でそれぞれ1/160~1/2560に希釈したものを模擬試料とした。

インフルエンザウイルス A 型抗原 ; Kitakyusyu 159/93株由来

インフルエンザウイルス B 型抗原 ; Lee 40株由来

(2) 手順

上記 (1) で調整した模擬試料115 μ Lをイムノクロマトグラフィー用デバイスのサンプル供給窓部より添加し、15分後に、検出窓部より抗体固定化メンブレン上の赤色の検出スポット有無を観察した。

(3) 評価基準

(3-1) 検出感度

判定は以下の3段階で行った。

+ 陽性

- 陰性

+ / - 判定保留 (わずかに判別できる程度)

(3-2) バックグラウンド強度

判定は以下の3段階で行った。

++ 視認性が低下するくらいにバックグラウンド強度が大きい

+ 判定に支障は無い程度だがバックグラウンド強度が大きい

- バックグラウンドによる影響なし

2. 試験結果

結果を表2に示す。

(1) 3padと2padによる違い

デバイス作製例1と2の結果を比較すると、本発明の2padタイプの方が、A型抗原およびB型抗原のいずれにおいても低濃度での検出が可能であり検出感度が高いことが確認できた。また、バックグラウンドの強度も小さく、視認性に優れていた。

(2) Whole抗体とF(ab')₂抗体による違い

デバイス作製例2と3の結果を比較すると、抗体の断片を用いたデバイス作製例3の方が、A型抗原およびB型抗原のいずれにおいても低濃度での検出が可能であり検出感度が高いことが確認できた。

(3) コンジュゲートパッドラインの位置、不溶性メンブレン担体との重なり
りの関係

デバイス作製例3～7の比較により、以下のことが言える。

(i) コンジュゲート部は従来のようにコンジュゲートパッド全体にコンジュゲートを含浸することなく、パッドの一部にライン状に形成した場合の方が十分な検出感度が得られ、ラインの位置が、コンジュゲートパッド上流端より12～18mmの位置で良好な感度が得られた。

(ii) コンジュゲート部と不溶性メンブレン担体との位置関係については、コンジュゲート部の一部がその下面において不溶性メンブレン担体上面と接触する必要があり、コンジュゲート部の中心線が不溶性メンブレン担体上流側端部よりも下流（内側）に配置されることが望ましい。すなわち、コンジュゲート部下面の半分以上が不溶性メンブレン担体と接触することが望ましい。

[0042]

[表2]

デバイス作製例		1		2		3		4		5		6		7	
構造		3Pad		Whole		Whole		2Pad		F(ab)2		F(ab)2		F(ab)2	
抗体		Whole		Whole		Whole		Whole		Whole		Whole		Whole	
コンジュゲートの位置*		Whole		Whole		Whole		Whole		Whole		Whole		Whole	
抗原	希釈倍率	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
A/Kitakyusu _u	n=1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	n=2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	n=1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	n=2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	n=1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	n=2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	n=1	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	n=2	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
B/Lee	n=1	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-
	n=2	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-	-	+/-
	n=1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	n=2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	n=1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	n=2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	n=1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	n=2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
バックグラウンド強度		+++ 視認性低下		-		-		+		判定に支障なし		+++ 視認性低下		+ 判定に支障なし	

A: マウス抗インフルエンザA型ウイルス抗体、B: マウス抗インフルエンザB型ウイルス抗体
 *: コンジュゲートパッド上流端よりコンジュゲートライン中心線までの距離 (mm)

産業上の利用可能性

[0043] 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よれば反応完了

時間が短く、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提供することができる。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の製造方法を用いれば、コンジュゲート液を含浸させる工程を含まず、自動化が容易であり、かつ、均一な性能を有する上記イムノクロマトグラフィー用テストストリップが得られる。

符号の説明

- [0044] (a) プラスチック製粘着シート
(b) 抗体固定化メンブレン
(c 1) 抗インフルエンザA型ウイルスモノクローナル抗体
(c 2) 抗インフルエンザB型ウイルスモノクローナル抗体
(c 3) 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

請求の範囲

- [請求項1] 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）を含み、かつ、コンジュゲートパッドの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、コンジュゲートパッドの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していることを特徴とするイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。
- （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、被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原が標識体に固定化されたコンジュゲートを含有するライン状のコンジュゲート部とを有する、コンジュゲートパッド
- （２）被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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
- [請求項2] 標識体に固定化された被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原と、検出部に固定化された被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原とは、別のものである、請求項１に記載のイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。
- [請求項3] ライン状のコンジュゲート部のラインの中心線が、不溶性メンブレン担体の上流側端部よりも下流側に配置されている、請求項１または２に記載のイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。
- [請求項4] ライン状のコンジュゲート部の全ての下面が不溶性メンブレン担体の上面と接触している、請求項１～３のいずれかに記載のイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。
- [請求項5] ラテラルフロー式である、請求項１～４のいずれかに記載のイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。
- [請求項6] 被検出物質がインフルエンザウイルスであり、標識体に固定化された

被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原および検出部に固定化された被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原が抗インフルエンザ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イムノクロマトグラフィー用テストストリップ。

[請求項7] 標識体に固定化された抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体が、抗インフルエンザウイルスモノクローナル抗体のF(ab')₂断片である、請求項6に記載のイムノクロマトグラフィー用テストストリップ。

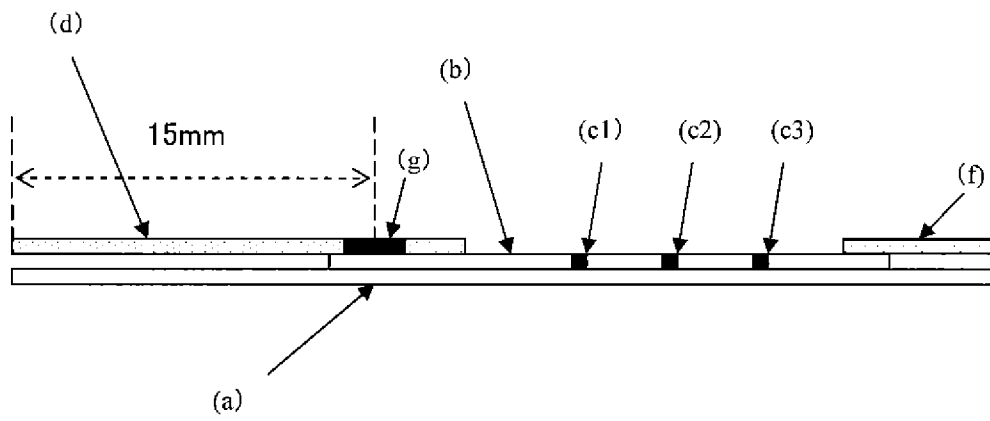
[請求項8] 請求項1～7のいずれかに記載のイムノクロマトグラフィー用テストストリップの製造方法であって、以下の工程を有する製造方法。

(1) コンジュゲートパッドとなるパッド状の多孔質材料の一部に、被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原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液をライン状に塗布し、乾燥させてコンジュゲート部を形成し、前記コンジュゲート部以外の一部をサンプル供給部とする、コンジュゲートパッドを作成する工程

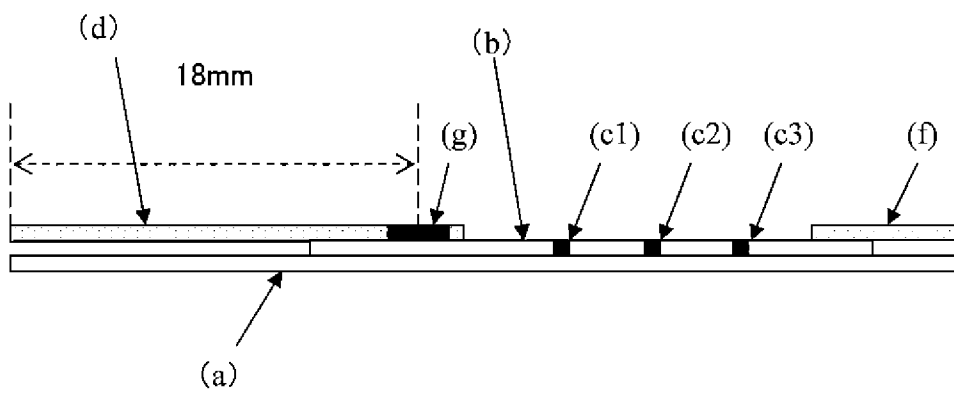
(2) 被検出物質に対して免疫学的に反応する抗体または抗原が固定化された検出部を少なくとも1つ有する不溶性メンブレン担体を準備する工程

(3) (2)で準備した不溶性メンブレン担体の上流側に、(1)で得られたコンジュゲートパッドを、サンプル供給部の下面は不溶性メンブレン担体に接触せず、かつ、コンジュゲート部の下面は不溶性メンブレン担体と接触するように積層する工程

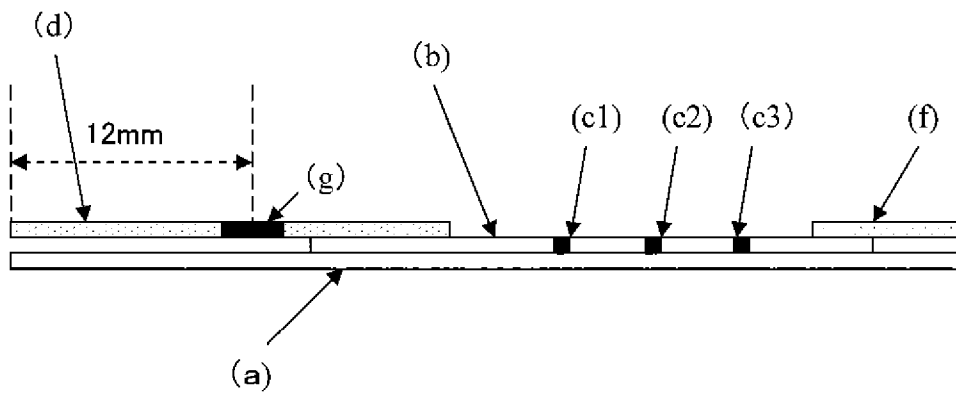
[図1]



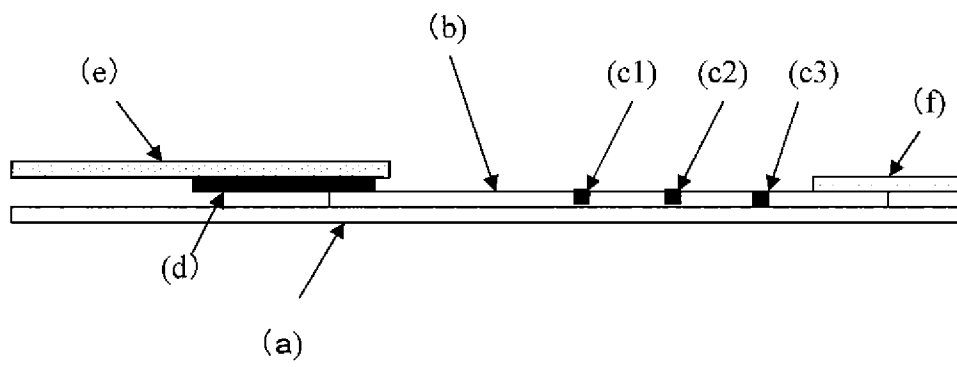
[図2]



[図3]



[図4]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072427

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01)i, G01N33/531(2006.01)i, G01N33/569(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543, G01N33/531, G01N33/569

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	1996-2011
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2011	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2011

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2000-321277 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 24 November 2000 (24.11.2000), paragraphs [0024], [0025], [0026]; fig. 1 & EP 1096256 A1 & WO 2000/070346 A1 & CN 1304490 A	1-8
A	WO 2002/037099 A1 (International Reagents Corp.), 10 May 2002 (10.05.2002), example 1; fig. 1, 2 & JP 2008-122410 A & US 2004/0058395 A1 & EP 1336845 A1 & AU 9030901 A	1-8

 Further documents are listed in the continuation of Box C. 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
19 October, 2011 (19.10.11)Date of mailing of the international search report
01 November, 2011 (01.11.11)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072427

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2009-264879 A (Japan Advanced Institute of Science and Technology), 12 November 2009 (12.11.2009), paragraphs [0024], [0026]; fig. 2 (Family: none)	1-8
A	JP 2010-512537 A (Genzyme Corp.), 22 April 2010 (22.04.2010), paragraphs [0053], [0057]; fig. 2 & US 2008/0138842 A1 & EP 2126569 A & WO 2008/073222 A2	1-8
A	JP 2005-308485 A (Sekisui Chemical Co., Ltd.), 04 November 2005 (04.11.2005), paragraphs [0091], [0092] (Family: none)	1-8
A	JP 2001-318100 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 16 November 2001 (16.11.2001), fig. 1 & US 7192784 B2 & EP 1281965 A1 & WO 2001/086300 A1 & DE 60137922 D & CN 1372641 A	1-8
A	WO 2003/085402 A1 (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 16 October 2003 (16.10.2003), fig. 4 & US 2004/0161857 A1 & EP 1491892 A1 & CN 1522368 A	1-8
A	JP 2006-194785 A (Obihiro University of Agriculture & Veterinary Medicine), 27 July 2006 (27.07.2006), fig. 1 (Family: none)	1-8
A	JP 2007-114097 A (Rohto Pharmaceutical Co., Ltd.), 10 May 2007 (10.05.2007), fig. 4 (Family: none)	1-8
A	JP 2010-14507 A (KAINOS Laboratories, Inc.), 21 January 2010 (21.01.2010), fig. 1, 4 (Family: none)	1-8
A	JP 2010-14631 A (The Furukawa Electric Co., Ltd.), 21 January 2010 (21.01.2010), fig. 1 (Family: none)	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/072427

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2010-38797 A (Sumitomo Bakelite Co., Ltd.), 18 February 2010 (18.02.2010), fig. 18 (Family: none)	1-8

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, G01N33/569(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, G01N33/569

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
 日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2011年
 日本国実用新案登録公報 1996-2011年
 日本国登録実用新案公報 1994-2011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	JP 2000-321277 A (松下電器産業株式会社) 2000. 11. 24, 【0024】【0025】【0026】図1 & EP 1096256 A1 & WO 2000/070346 A1 & CN 1304490 A	1-8
A	WO 2002/037099 A1 (国際試薬株式会社) 2002. 05. 10, 実施例1 図1 図2 & JP 2008-122410 A & US 2004/0058395 A1 & EP 1336845 A1 & AU 9030901 A	1-8

C欄の続きにも文献が列挙されている。 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
 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの
 「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
 「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)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献
 「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
 「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
 「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
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 19. 10. 2011	国際調査報告の発送日 01. 11. 2011
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 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) 三木 隆 電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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
A	JP 2009-264879 A (国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学) 2009. 11. 12, 【0024】【0026】図2 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2010-512537 A (ジェンザイム・コーポレーション) 2010. 04. 22, 【0053】【0057】【図2】 & US 2008/0138842 A1 & EP 2126569 A & WO 2008/073222 A2	1-8
A	JP 2005-308485 A (積水化学工業株式会社) 2005. 11. 04, 【0091】【0092】 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2001-318100 A (松下電器産業株式会社) 2001. 11. 16, 【図1】 & US 7192784 B2 & EP 1281965 A1 & WO 2001/086300 A1 & DE 60137922 D & CN 1372641 A	1-8
A	WO 2003/085402 A1 (松下電器産業株式会社) 2003. 10. 16, 図4 & US 2004/0161857 A1 & EP 1491892 A1 & CN 1522368 A	1-8
A	JP 2006-194785 A (国立大学法人帯広畜産大学) 2006. 07. 27, 【図1】 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2007-114097 A (ロート製薬株式会社) 2007. 05. 10, 【図4】 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2010-14507 A (株式会社カイノス) 2010. 01. 21, 【図1】【図4】 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2010-14631 A (古河電気工業株式会社) 2010. 01. 21, 【図1】 (ファミリーなし)	1-8
A	JP 2010-38797 A (住友ベークライト株式会社) 2010. 02. 18, 【図18】 (ファミリーなし)	1-8