

(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
2018年4月5日(05.04.2018)



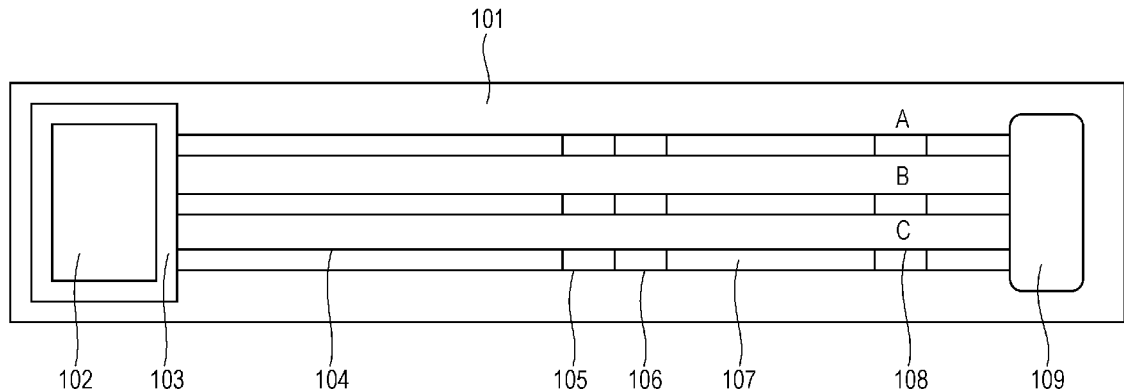
(10) 国際公開番号

WO 2018/062191 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2017/034764
- (22) 国際出願日: 2017年9月26日(26.09.2017)
- (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 2016-193554 2016年9月30日(30.09.2016) JP
- (71) 出願人: キヤノン株式会社 (CANON KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 竹内 達夫 (TAKEUCHI Tatsuo); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 杉田 賢(SUGITA Masaru); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 水澤 圭吾(MIZUSAWA Keigo); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 東 隆司(HIGASHI Ryuji); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内 Tokyo (JP). 鈴木 幸一(SUZUKI Koichi); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 阿部 琢磨, 外 (ABE Takuma et al.); 〒1468501 東京都大田区下丸子3丁目30番2号 キヤノン株式会社内 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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH,

(54) Title: DETECTING KIT, DETECTING METHOD

(54) 発明の名称: 検出キット、検出方法



(57) **Abstract:** This detecting kit for detecting an object of detection is provided, on a supporting body (101), with: an introducing portion (102) into which a sample containing the object of detection is introduced; a plurality of mixing portions (105) for obtaining a mixture of the sample, which has been introduced into the introducing portion and has been distributed, and a signal transmitting substance capable of transmitting a signal; and a binding portion (108) provided with a binding substance capable of binding selectively to the object of detection and the signal transmitting substance in each mixture obtained by the plurality of mixing portions (105). The amounts or concentrations of the signal transmitting substance provided in each of the plurality of mixing portions (105) differ from one another.

(57) 要約: 検出対象物を含む試料が導入される導入部(102)と、導入部に導入され、分配された試料と、信号を発信可能な信号発信物質との混合物を得る複数の混合部(105)と、複数の混合部(105)で得られた各々の混合物中の、検出対象物及び信号発信物質に対して、選択的に結合可能な結合物質が設けられた結合部(108)と、が支持体(101)上に設けられた、検出対象物の検出キットであって、複数の混合部(105)に設けられた信号発信物質の量または濃度が互いに異なる。

CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO,
DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT,
HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, KE, KG, KH,
KN, KP, KR, KW, 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, 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, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, 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, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))

明 細 書

発明の名称： 検出キット、検出方法

技術分野

[0001] 本発明は検出対象物の検出キット、検出対象物の検出方法を提供するものである。

背景技術

[0002] これまで、血液、尿、涙などに含まれる生体代謝物としてのバイオマーカーの有無や、その量を計測することで、生体のバイタルサインを得るための方法や装置の開発が行われてきた。従来、このようなバイタルサインを得るために、生体より採取されたさまざまな試験試料に対して化学分析を行い、その組成並びに量を計測することが一般的であり、液体クロマトグラフィー等の手法が用いられてきた。しかし、これらの装置は非常に大型であり、簡便に検出する手法や装置が求められていた。

[0003] 特開2008-32494号公報（特許文献1）では、被験試料に含まれる標的物質を簡便に測定する測定用キットが開示されている。特許文献1に開示の測定用キットは、標的物質を含む被試験試料に競合物質を混合させた混合液を、キットに固定された競合的捕捉物質、キットに固定された判定物質の順に接触させる。そして、判定物質に結合・捕捉された競合物質から得られる反応物の量を測定することで、標的物質の量を測定している。すなわち、競合物質を標的物質に結合しうる抗体、競合的捕捉物質を標的物質もしくはその類似物質とすると、標的物質が少ない場合、競合物質は固定された競合的捕捉物質に結合・捕捉されて、判定物質に到達する競合物質の量は少ない。その結果、判定物質に結合・捕捉される競合物質から得られる反応物の量は少ない。一方、標的物質の量が増えるにつれ、固定された競合的捕捉物質に結合せずに標的物質に結合する競合物質が増えるため、判定物質に到達する競合物質の量が増える。その結果、判定物質に結合・捕捉される競合物質から得られる反応物の量は増える。したがって、標的物質の量に関する

定性的な情報を得ることが可能である。

[0004] しかし、特許文献 1 に開示の測定用キットには競合的捕捉物質だけでなく、判定物質も固定しなくてはならず構成が複雑である。また、競合物質は、標的物質と判定物質の両方と結合しうるものに限られるため、キットの設計自由度に関する制約が多くなる。したがって、従来より構成がより単純で、設計自由度がより高い、検出対象物の検出キットが求められていた。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特開 2 0 0 8 - 3 2 4 9 4 号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は上記従来例に鑑みなされたものであり、従来に比べて、構成がより単純で、設計自由度がより高い検出対象物の検出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

[0007] 本発明に係る検出キットは、検出対象物を含む試料が導入される導入部と、前記導入部に導入され、分配された前記試料と、信号を発信可能な信号発信物質との混合物を得る複数の混合部と、前記複数の混合部で得られた各々の前記混合物中の、前記検出対象物及び前記信号発信物質に対して、選択的に結合可能な結合物質が設けられた結合部と、が支持体上に設けられた、前記検出対象物の検出キットであって、前記複数の混合部に設けられた前記信号発信物質の量または濃度が互いに異なる検出キット。

図面の簡単な説明

[0008] [図1]本発明の実施形態及び実施例 1 に係る検出キットを説明するための上面図。

[図2]本発明の実施形態及び実施例 1 に係る検出キットを説明するための断面図（図 1 の上面図の断面）。

[図3]本発明の実施例2に係る検出キットを説明するための断面図。

[図4]本発明の実施例1、2における検出対象物の分子構造の一例。

[図5]本発明の実施例1、2における信号発信物質の分子構造の一例。

発明を実施するための形態

[0009] (検出キット)

本発明の実施形態に係る検出キットについて説明するが、本発明はこれらに限られない。

[0010] 本実施形態に係る検出キットの一例について図1、2を用いて説明する。

図1は本実施形態に係る検出キットの上面図、図2は図1の断面図を示す。

[0011] 本実施形態に係る検出キットは、支持体101上に導入部102、混合部105、結合部108を少なくとも有する。導入部102には半定量を行う対象となる検出対象物を含む試料が導入される。混合部105は、導入部102に導入されて、分配された各々の試料と、信号を発信可能な信号発信物質との混合物を得るために、支持体101上に複数設けられる。複数の結合部108には、各々、検出対象物及び信号発信物質に対して、選択的に結合可能な結合物質が設けられている。複数の結合部108は、各々に結合物質が固定して設けられ、各々の結合物質が、複数の混合部105で得られた各々の混合物と、接触するような構成となっている。

[0012] このように本実施形態に係る検出キットは、少なくとも結合物質が支持体上に固定されていればよく、構成が単純である。また、結合物質は、検出対象物や信号発信物質に結合可能なものであればよく、設計自由度も高い。

[0013] 本実施形態に係る検出キットについてより詳細に説明する。導入部102を上流、確認部109を下流とし、上流から下流に向けて試料が移動していく。

[0014] 導入部102に導入された試料は、吸収部103に吸収され、複数の第一の搬送部104に分配される。導入部102に導入された試料は複数の第一の搬送部104に等量ずつ分配される構成が好ましい。但し、複数の第一の搬送部104に互いに同じ量だけ分配されていなくても、複数の混合部10

5に到達する試料の量が互いに同じであればよい。吸収部103は、複数の第一の搬送部104に分配される試料の量が互いに同一にしやすいのみならず、導入部からあふれた試料を吸収して拡散を抑制する役割を担う。ここで、試料の量が互いに同一とは、完全同一の場合だけでなく、一方の試料の量の0.95倍から1.05倍の範囲に、他方の試料の量の値が入る場合も含む。好ましくは、一方の試料の量の値の0.99倍から1.01倍の範囲に、他方の試料の量の値が入る場合である。

[0015] 複数の第一の搬送部104を経た各々の試料は、複数の混合部105に到達する。複数の混合部105に設けられた信号発信物質と試料とが混合され、混合物が得られる。

[0016] ここで、複数の混合部105の各々に設けられた信号発信物質は互いにその量または濃度が異なる。以下では量が異なる場合について説明するが、信号発信物質が溶媒に含まれる形で設けられる場合等は、濃度を調整する方が便利である。

[0017] 信号発信物質の量が互いに異なるため、複数の混合部105で得られる各々の混合物における、検出対象物と信号発信物質との比率が異なる。例えば、後述の結合部108のAにつながる混合部105に設けられた信号発信物質が最も多く、Bにつながる混合部105に設けられた信号発信物質が次に多く、Cにつながる混合部105に設けられた信号発信物質が最も少ない、とする。

[0018] 混合部105から展開部106を経て第二の搬送部107に移動する中で、混合物中の検出対象物と信号発信物質とが、分散するように混じり合う。複数の展開部106を経た各々の混合物は、複数の第二の搬送部を経て、結合部108に到達する。複数の結合部108（A、B、C）の各々に設けられた結合物質に、混合物中の検出対象物と信号発信物質とが選択的に結合される。複数の結合部108のA、B、Cに到達する混合物における、検出対象物と信号発信物質との比率が異なる。本例では、結合部108に到達する試料のうち、検出対象物に対する信号発信物質の比率が多い順にA、B、C

となる。そのため、結合部108の各々における信号発信物質から発信される信号の大きさは、信号が大きい順に、A、B、Cとなる。検出対象物が少ない場合、結合部108に設けられた結合物質には多くの信号発信物質が結合するため、発信される信号は大きい。一方、結合物質に対する結合のしやすさ（結合定数）が、検出対象物と信号発信物質とで同一の場合、検出対象物が多くなるにつれて、結合物質に結合する検出対象物が増えるため、発信される信号は小さくなる。ここで、結合定数が同一とは、完全同一の場合だけでなく、一方の結合定数の値の0.95倍から1.05倍の範囲に、他方の結合定数の値が入る場合も含む。好ましくは、一方の結合定数の値の0.99倍から1.01倍の範囲に、他方の結合定数の値が入る場合である。

[0019] このようにして、導入部102に導入された試料に含まれる、検出対象物の量の定性的な情報が得られる。なお、結合定数が同じとは、本発明の効果をえられる程度、すなわち、結合物質に対して、検出対象物と信号発信物質とが競合して結合するものであれば良い。

[0020] 次に、本実施形態に係る検出キットが、試料中の検出対象物を半定量的に検出できる理由について、一例を挙げて説明する。ここで挙げる各数値は本実施形態を理解しやすくするために、わかりやすい数値を挙げている。また、信号の大きさは定性的な関係を示すための一例であるため、単位は示していない。

[0021] 結合部108のA、B、Cにつながる混合部105に設けられた信号発信物質を、それぞれ、1000個、100個、10個とする。そして、結合部108のA、B、Cにそれぞれ、10個の結合物質が設けられているとする。また、結合物質に対する結合のしやすさ（結合定数）が、検出対象物と信号発信物質とで同じ、と仮定する。

[0022] まず、検出対象物が10個の場合、結合部108のA、B、Cの結合物質にはそれぞれ、約10個、約10個、約5個の信号発信物質が結合するため、信号の大きさは概ね、Aは100、Bは10、Cは5という比率となる。

[0023] 次に、検出対象物が100個の場合、結合部108のA、B、Cの結合物

質にはそれぞれ、約 10 個、5 個、0～1 個の信号発信物質が結合するため、信号の大きさは概ね、A は 10、B は 5、C は 0～1、という比率となる。

[0024] 最後に、検出対象物が 1000 個の場合、結合部 108 の A、B、C の結合物質にはそれぞれ、5 個、0～1 個、0～1 個の信号発信物質が結合するため、信号の大きさは概ね、A は 5、B は 0～1、C は 0～1、という比率となる。

[0025] したがって、検出対象物が少ない場合は、A、B、C のいずれからも信号が発信される。検出対象物が多くなると、結合部 108 の C からの信号がほとんど発信されなくなり、次いで、結合部 108 の B からの信号が発信されなくなる。検出対象物が非常に多くなると、結合物質に結合するものは、ほとんどが検出対象物となり、結合部 108 の A からの信号も発信されなくなる。検出対象物が多いことが生体の疾病の兆候である場合や、ストレスが大きい可能性が高いことを意味する場合、本実施形態に係る検出キットからの信号が大きいほど、疾病に罹患していることやストレスが大きい可能性があることを示すことになる。

[0026] さらに、混合部 105 の A、B、C の各々に設ける信号発信物質の量や濃度を、例えば 10 のべき乗で異なる（1桁ずつ異なる）ようにすれば、A、B、C から発信される信号の大きさの変化から、検出対象物の量の 1桁程度の変化を、検出することができる。つまり、本実施形態に係る検出キットは、検出対象物が多い、少ないという定性的な情報だけでなく、ある程度の定量性を備えた、半定量のシステムと言える。なお、混合部 105 の A、B、C の各々に設ける信号発信物質の量や濃度が互いに 1桁以上異なるようにすることで、測定できる検出対象物の量の範囲を広げることができる。結合部 108 を経た、余りの混合物（試料）は、確認部 109 に到達する。確認部 109 は、試料が検出キット内の各部位を経由したことを確認するとともに、余った試料が外に漏れないようにすることができる。

[0027] なお、本実施形態に係る検出キットにおいて、第一の搬送部、混合部、展

開部、第二の搬送部、結合部は3つ設けられているが、3つに限らず2個の形態や、4個以上の形態であっても良い。

[0028] 次に、本実施形態に係る検出キットを構成する各部位、及びそれらを構成する各部材の材料等の具体例について説明する。

[0029] (検出対象物)

本実施形態における検出対象物の例として、生体の疾病、体調、生体にかかっているストレスの程度などに関わるバイオマーカーを挙げることが出来る。例えば、生体内より代謝されるホルモン系物質の内、分子量が1000以下の低分子物質がその対象となる。具体的には、ステロイド系ホルモン類、アミン系ホルモン類、ヌクレオシド、及びこれらの類縁体等が挙げられる。また、抗原や抗体であってもよい。この場合、検出対象物と結合物質とはいずれか一方が抗原であり、いずれか他方が抗体となる。

[0030] さらに人工的に合成される低分子化合物の内、生体から代謝されるうるものも挙げられる。また、貝毒の代表されるテトロドトキシンなどの低分子毒物のように生体外部からの取り込みにより重大な疾患を引き起こす物質も挙げられる。

[0031] 検出対象物は後述する尿、血液、汗、涙等に含まれるものであることが好ましい。

[0032] 本実施形態に係る検出対象物の例として、図4に示される構造をもつ、8-Oxo-2'-deoxyguanosine (8オキソ2'デオキシグアノシン、以下8OHdGと略すことがある) が挙げられる。

[0033] (試料)

検出対象物を含有する試料としては尿、血液、汗、涙およびこれらをもとにする、液体状の試料が挙げられる。これらの試料には、バイオマーカーが含まれその量を計測することで、生体のバイタルサインを得る。

[0034] また、低分子毒物であればこれらを含むと考えられる粘膜、粘液、海水とこれらの内、含有する水の量を増減させた希釈、濃縮液が挙げられる。

[0035] (支持体)

支持体 101 の材質は、プラスチック、ガラス、フィルム等が用いられ、試料の種類、検出対象物の種類等により適宜選択できる。支持体 101 の寸法や形状については、取り扱いの簡便さからは試料が移動する方向の長さ 3 cm ～ 5 cm、幅 2 cm ～ 3 cm の方形が好ましいが、検出対象物の種類、信号発信物質の量や濃度や、第一の搬送部 104 の本数により幅を広くしてもよい。すなわち、支持体は、使いやすさの観点から、手に平サイズのスティック形状であることが好ましい。

[0036] (導入部)

試料の導入部 102 を構成する部材の材質は、セルロース濾紙、ガラス繊維、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロン、綿布等の均一な特性を有するものが挙げられる。特に連泡ポリウレタンフォームは親水性、疎水性の調整が容易であり、試料の溶媒に合わせて適宜選択することが可能である。なお、水系の試料の場合、親水性が強い導入部を用いるとこれらに吸着してしまい後段の結合部 108 への試料の移動がスムーズに行われない可能性がある。試料が親水性の場合は、疎水性の導入部、試料が疎水性の場合は、親水性の導入部、のように、試料が親水性か疎水性かを見極めて、導入部の材料を選択することが好ましい。また、導入部 108 に、検出対象物に含まれる構造と、水素結合可能な部位を有する場合、非特異的な吸着を抑制する処理をすることが特に好ましい。非特異的な吸着を抑制する処理の例として、界面活性剤を設ける場合、不活性蛋白を設ける場合等があげられるが、試料中の検出対象物の特性に合わせて処理方法を選択すればよい。

[0037] (吸収部)

吸収部 103 は、導入部 102 に導入された試料が、第一の搬送部 104 に等量分配されやすくするために、導入部 102 の周囲に設けられる。但し、導入部 102 そのものが第一の搬送部 104 に等量ずつ分配されやすいものであれば、吸収部 103 は必ずしも必要ない。

[0038] (第一の搬送部、第二の搬送部)

第一の搬送部 104 は、試料を導入部 102、または吸収部 103 から混合部 105 へ搬送するために、第二の搬送部 107 は、混合物を混合部 105 または展開部 106 から結合部 108 へと搬送するための部位である。第一の搬送部 104 と第二の搬送部 107 とは互いに同じ材料や構成であっても、異なってもよい。以下では、第一の搬送部 104 と第二の搬送部 107 とを単に搬送部と称して説明することがある。

[0039] 搬送部は多孔性ニトロセルロース膜、多孔性セルロース膜、ナイロン膜、ガラス繊維、不織布、布等を用いることができ、好適であるものはいわゆる濾紙である。この搬送部の表面も前述した導入部 102 と同様に、試料が親水性であるか疎水性であるか、を見極めて適宜選択することができる。さらに、搬送部が、検出対象物に含まれる構造と水素結合可能な部位を有する場合、非特異的な吸着を防止する処理をすることが特に好ましい。非特異的な吸着を防止する処理の例として、界面活性剤を設ける場合、不活性蛋白を設ける場合等があげられるが、試料中の検出対象物の特性に合わせて選択すればよい。

[0040] 本実施形態では、この搬送部を複数持つことからそれぞれの搬送部に対応するストリップを導入部の下部に等間隔に並べるとともに、それぞれのストリップ間をポリエチレン、フッ素樹脂等の疎水性樹脂で仕切る。あるいは一本のストリップに前述の樹脂からなる溶液を線上に塗布する。それにより、等間隔でかつ隣接するストリップ間での試料である液体の干渉を防止することができる。

[0041] (混合部)

複数の混合部 105 には、各々、互いに量の異なる信号発信物質が設けられる。混合部 105 は、流入してくる試料と信号発信物質とが均一に分散されるような構成であることが好ましい。

[0042] (信号発信物質)

信号発信物質はそれ自体が後述の結合物質に選択的に結合され、かつ、信号を発信することができるのであれば、そのような材料を用いることができ

る。それ自体が信号を発信することが出来ない場合、本実施形態における信号発信物質は前述した検出対象物あるいはこの類型物に、外部からの刺激に対して信号を発信可能な標識化材料を付加されたものを用いることが出来る。具体的に、信号発信物質は、結合物質との水素結合部位を損なうことなく、あるいは、結合物質に対する結合部位のみを最小限残した化合物であることが好ましい。さらに信号発信物質が、検出対象物が溶解あるいは分散している溶媒に同程度の溶解性、分散性をもつことが好ましく、かつ検出対象物と会合性をもたないような材料を選択することが好ましい。

[0043] (標識化材料)

本実施形態における標識化材料は電氣的、光学的に信号発信物質の存在が計測、観測可能であればよい。標識化材料それ自体がこの電氣的あるいは光学的に計測、観測できる特性をもっているだけでなく、必要に応じて後段に標識化工程を付加する場合、標識化が可能な反応基を付加するだけでもその目的を達することが可能となる。

[0044] 信号発信物質を光学的に検出する場合、金属コロイド、染料、顔料、蛍光物質等の発光物質を標識化材料として用いることが可能である。電氣的に計測する場合、同様の金属コロイド、カーボン系材料等の導電性が変化するもの、あるいは磁氣的性質が付与可能なものであっても良い。

[0045] (展開部)

展開部106は、混合部105から流入した混合物が第二の搬送部107へと移動する間に、混合物中の検出対象物と信号発信物質とが、均一に分散するように混じり合わせるために設けられる。

[0046] 展開部106は、第一の搬送部104で使用する濾材よりも目を粗くすることが好ましい。さらに、第一の搬送部104<混合部105<展開部106の順に濾材の目の粗さが大きいことが好ましい。濾材の目の粗さについてはJIS P-3810で示す濾水時間を基準に選択すれば良く、例えば第一の搬送部104の濾水度が250秒であるとした場合、混合部105が160秒、展開部106が100秒以下の素材を選択すればよい。これは前述

の展開部 106 において試料中の検出対象物と信号発信物質が均一に混ざる
為に、一旦試料の流速を落とし、混合度合を適正化するためである。

[0047] また、均一に混合された混合物を速やかに結合部 108 へ搬送するために、
第二の搬送部 107 に用いる濾材は反対に、展開部 106 よりも濾水時間
が大きい材料を選択することが好ましい。

[0048] (結合部)

結合部 108 は、結合物質が結合部から他の部位に流出しないよう強固に
接着できる材質であれば良く、かつ、結合物質が検出対象物や信号発信物質
を捕捉するための補足部位に対する吸着性をもたない材料から選択すること
が好ましい。例えば結合物質が分子認識可能な樹脂である場合この樹脂に対
して接着性を有しかつ、溶融しない接着剤を用いることが必要で、カゼイン
系の接着剤を用いることが好適である。

[0049] (結合物質)

本実施形態における結合物質は、少なくとも検出対象物と信号発信物質と
に選択的に結合可能な物質である。本明細書において結合とは、水素結合、
共有結合、イオン結合等の化学結合だけでなく、化学結合よりは結合力の弱
い物理的な吸着を含む概念である。具体的には、合成ポリマー、抗原、抗体
、タンパク質等が挙げられる。

[0050] 本実施形態にかかる結合物質は、その分子構造に検出対象物や信号発信物
質である低分子物質と水素結合が可能な部位を有し、それぞれの持つ部位が
水素結合を補完しあうように、原子の配列と空間的配置が少なくとも 2 か所
以上で一致しているものが好ましい。また、結合物質が検出対象物や信号発
信物質を空間的に取り囲む形状であれば、検出対象物や信号発信物質を捕捉
する能力をより向上させることが可能である。

[0051] 水素結合が可能な部位としては、電気陰性度が大きいフッ素、酸素、窒素
と、これらの原子に共有結合した水素等が挙げられる。また、検出対象物や
信号発信物質と、結合物質との両者が水素結合を補完しあうとは、検出対象
物と結合物質の部位のいずれか一方が、電気陰性度が大きい原子をもつ場合

、他方がそれらの原子に共有結合した水素をもつ状態を示している。

[0052] 以上では、結合物質については水素結合を中心に説明したがこの水素結合を共有結合、イオン結合に部分的にあるいは全部置き換えても説明することができる。

[0053] (確認部)

本実施形態において確認部 109 は、導入部に導入された試料が結合部に達したか否かを確認可能なように構成されている。

[0054] 確認部 109 は、導入部 102 に導入された試料が、クロマト移動により物理的に吸収されると共に結合部 108 に吸着されない未反応の信号発信物質を吸収除去する部位である。確認部 109 の材料として、セルロース濾紙、不織布、布、セルロースアセテート等の吸水性材料が用いられる。

[0055] なお、試料の流路が確認部まで別れている構成であれば、確認部において、検出対象物の半定量を行っても良い。

[0056] (添加物質)

また、信号発信物質に加えて、界面活性剤や pH 調整剤、有機溶剤、バッファー塩などが合わせて塗布または予め添加されていてもよい。検出対象物と信号発信物質の結合を調整する材料であれば、信号発信物質と合わせて塗布していてもよい。

[0057] (検出方法)

本実施形態に係る検出方法は、以下の(1)から(4)の工程を少なくとも有する。

(1) 検出対象物を含む試料を互いに等量に分配する工程。

(2) 互いに等量に分配された試料と、信号発信物質とを混合して混合物を得る工程。

(3) 得られた混合物と、検出対象物と信号発信物質に選択的に結合可能な結合物質とを接触させる工程。

(4) 結合物質に結合した信号発信物質から発信される信号を測定する工程。

[0058] 本実施形態にかかる検出方法を用いれば、簡便に検出対象物を検出できる。

実施例

[0059] (実施例 1)

本実施例は、試料の導入部にはウレタン製の連泡スポンジを用い、その大きさは 18 mm × 10 mm の方形で厚さが 3 mm のものを用い、その底面に幅 5 mm でニトロセルロースからなる 3 本の濾紙ストリップ（第一に搬送部）104 を並列に配置している。このストリップに用いた濾紙は J I S P-3810 で計測できる濾水度をもとに選択する。本実施例では濾水時間 200 秒の濾紙を用いた。この濾紙の繊維表面は試験液の染み込みによる検出対象物の付着を防止するために、界面活性剤に依る撥水処理を行う。また、本実施例では第一の搬送を 3 本設け、それぞれの搬送部間は、試料が導入される導入部のスポンジ下部から確認部までポリエチレンワックスを用いて埋められている。次に、標識剤が付与された試料中の検出対象物の信号発信物質を濾水時間 180 秒のメンブレンに含浸させたパッド（混合部）105 を第一の搬送部 104 のストリップに重なるように設置する。さらに濾水時間 100 秒のメンブレン（展開部）106 をこれに重ねる。次に、第一の搬送部 104 と同様の濾水時間 200 秒のメンブレン 106 をさらに下方に敷く、これら第一の搬送部 104、混合部 105、展開部 106、第二の搬送部 107 のメンブレンは接着することなく重ね合わせる。その後、上部からテープなどによって密着性がたもたれるように固定する。

[0060] 各部位の濾水時間は、第一の搬送部 104 > 混合部 105 > 展開部 106 かつ第二に搬送部 107 > 展開部 106 のように設定する。特に展開部 106 に比べて、第二に搬送部 107 の濾水時間が長いことで、信号発信物質と検出対象物が均一に混合されることを促進し、後段における結合部における、検出対象物と信号発信物質との競合的な吸着を正確に行うことができる。

[0061] 次に混合された検出対象物と信号発信物質を含む試料は、毛細管現象によってストリップ（第二の搬送部）107 に運ばれ、結合部 108 に到達する

。結合部 108 は検出対象物並びに信号発信物質と特異的に吸着可能な水素結合部位を含む樹脂粒子あるいは薄膜が担持されており、これに検出対象物並びに信号発信物質がその混合比率によって結合することになる。信号発信物質の標識化材料として後述する水溶性染料を用いると、検出対象物の量が少ない場合、信号発信物質の付着が多くなり、結合部は着色し、逆の場合は着色が見られないまたは見づらくなる。

[0062] ここで、検出対象物が生体内から排出される場合、その濃度の範囲が生体の状態によってどの程度変化することは既知である。そこで、複数の混合物 105 の各々に設ける信号発信物質は、正常濃度を基準として 2 倍、4 倍のようにべき乗でその量や濃度を変えておくことが良く、好ましくは 10 倍、100 倍というように 10 のべき乗で増加させておく。

[0063] また、試料が人の尿でありこれに含まれる低分子化合物として DNA の酸化代謝物である図 4 に示す 8OHdG (8-Oxo-2'-deoxyguanosine) を検出する場合、信号発信物質にこの 8OHdG に水溶性染料を結合したものが用いられる。これをパッド (混合物) 105 に浸漬させ、乾燥したものをを用いる。本実施形態では着色材として直径 40 nm の金ナノコロイド粒子を用い前述 8OHdG に通常の方法で結合させたものをを用いる。次に用意した前述 3 本のストリップに対応するように前述した信号発信物質のモル濃度が 3 μ M、300 nM、30 nM になるように調整しそれぞれ信号発信物質の溶液 0.18 ml をそれぞれ用意する。そして、A, B, C のライン毎にそれぞれのパッド (混合物) 105 に浸漬させ、乾燥したものをを用意する。

[0064] 次に結合部に設ける結合物質として、図 5 に示すフェノキサジンの誘導体をアクリル酸モノマーと共重合したポリマーを用いる。このポリマーをニトロセルロースベースで濾水時間 200 秒のメンブレンにカゼインを用いて固定し結合部 108 を形成する。この結合部における前記吸着可能な分子の数は使用する信号発信物質に含まれる標識化材料のカバーリングパワーによって決められる。本実施例では直径 40 nm の金コロイド粒子を用いるので、

結合部 108 の単位面積当たり 10^7 (個/ μm^2) の結合物質を設ければ良い。本実施例では単位面積当たり 2×10^9 (個/ μm^2) になるように調整したポリマーを用いる。このポリマーは第二の搬送部 107 のストリップの途中に含浸させる形で設定する。さらにこの結合部 108 の下流に結合部以上の結合物質が設けられたポリマーを用意し確認部 9 とする。

[0065] このように低分子化合物の半定量計測システム（検出キット）に PH6.8 に調整した人工尿に 8 OH d H の濃度が 10 nM, 200 nM, 1500 nM になるように試料を作成し、導入部に総量 0.6 ml 投入し、検出キットを水平に保つ。水平に保ったままで、数分後に、この時、10 nM の試料を投入した場合 C のラインの結合部のみ着色せず、A, B のラインの結合部のみが青色に着色し、試料が 10 nM の濃度であることがわかる。次に 200 nM の試料の場合は A ラインのみが着色し、1500 nM では B ラインがわずかに着色する。次に 1000 nM の試料を投入したところ、1500 nM の場合より A ラインのみが濃く染色し、濃度の桁が同じ場合、検出対象物の量が少ないほど濃く染色することが確認できた。

[0066] （実施例 2）

導入部 102 のスポンジ層の内部に透過面積が同等になるように仕切り 110 を設けた以外は実施例 1 と同様にシステムを作成した。また、導入部 102 の周囲にはスポンジからあふれた試料を吸収可能な部材（吸収部）103 を設置した。この部材は公知の高分子吸収体などからなり導入部 102 に投入される試料が多い場合、あるいは導入部の縁に残留している場合これを素早く吸収し、導入部 102 の定量性を確保できる。導入部 102 の内部に設けられた仕切り板 110 は、検出対象部の検出のためのラインを 3 つ設ける場合、2 枚設置され上部のスポンジと同様の材料で 3 区分された空間を埋めている。

[0067] さらに実施例 1 において用いた信号発信物質、捕捉ポリマーを同様に設ける。次に実施例 1 と同様に 3 種の試料を用意し計測を行う。

[0068] この場合、検出精度としては同様の結果が得られるが、さらに検出キット

を水平から傾けても、その結果に差異はなく、キットの操作に多少の差異が発生しても、等量分配されていることが確認できる。

[0069] 図3において、仕切り板110は導入部102スポンジ層の高さに対して低くなっているが、スポンジの高さまで設けても何ら問題はない。あるいは仕切り板ではなく、等量となるように設けられた矩形の枠を用意しこれを第の搬送部104の上部に設けることも可能である。

[0070] 本発明に係る検出キットによれば、従来に比べて固定すべきものが少なく、用いられる材料の選択の自由度が上がるため、構成がより単純で、測定対象のキットの設計自由度がより高い。

[0071] 本発明は上記実施の形態に制限されるものではなく、本発明の精神及び範囲から離脱することなく、様々な変更及び変形が可能である。従って、本発明の範囲を公にするために以下の請求項を添付する。

[0072] 本願は、2016年9月30日提出の日本国特許出願特願2016-193554を基礎として優先権を主張するものであり、その記載内容の全てをここに援用する。

請求の範囲

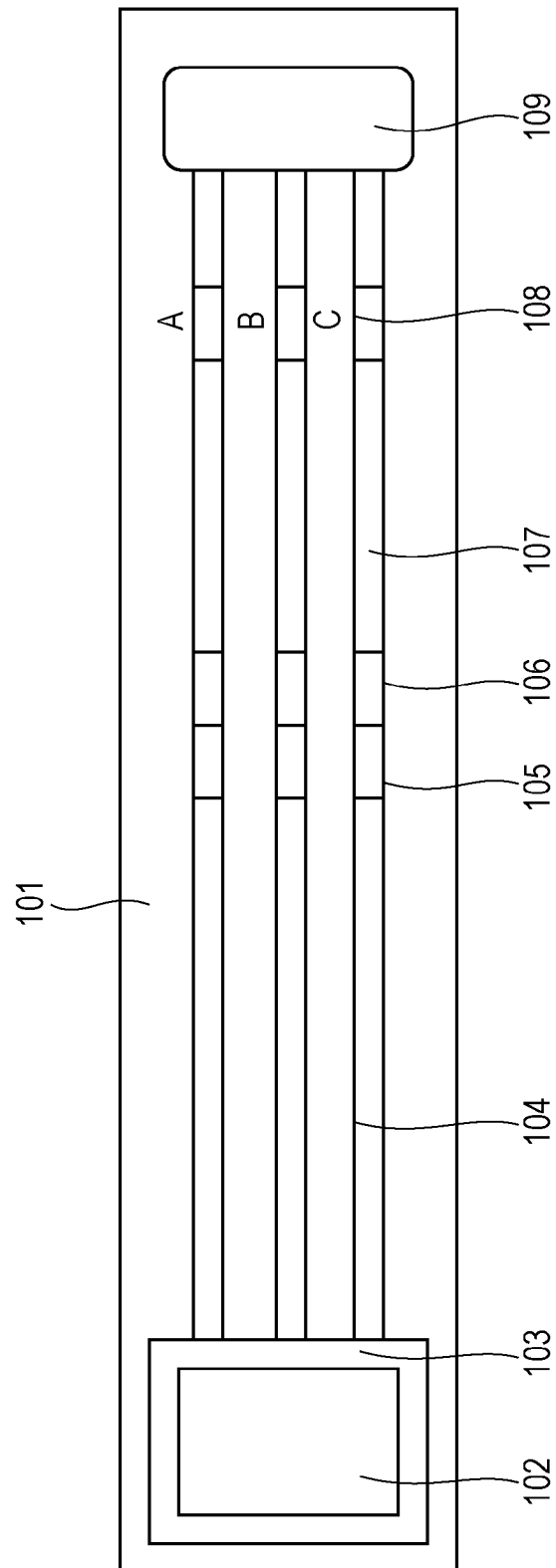
- [請求項1] 検出対象物を含む試料が導入される導入部と、
 前記導入部に導入され、分配された前記試料と、信号を発信可能な
信号発信物質との混合物を得る複数の混合部と、
 前記複数の混合部で得られた各々の前記混合物中の、前記検出対象
物及び前記信号発信物質に対して、選択的に結合可能な結合物質が設
けられた結合部と、が支持体上に設けられた、前記検出対象物の検出
キットであって、
 前記複数の混合部に設けられた前記信号発信物質の量または濃度が
互いに異なる検出キット。
- [請求項2] 前記信号発信物質は、前記検出対象物に、信号を発信可能な標識化
材料が付加されたものである請求項1に記載の検出キット。
- [請求項3] 前記結合物質に対する前記検出対象物と前記信号発信物質の結合定
数が同一である請求項1または2に記載の検出キット。
- [請求項4] 前記導入部の周囲に、前記導入部に導入された試料を吸収する吸収
部が設けられている請求項1乃至3のいずれか一項に記載の検出キッ
ト。
- [請求項5] 前記導入部と前記混合部との間に、前記試料を搬送するための複数
の第一の搬送部が設けられている請求項1乃至4のいずれか一項に記
載の検出キット。
- [請求項6] 前記導入部から前記複数の第一の搬送部に分配される前記試料の量
が互いに同一である請求項4に記載の検出キット。
- [請求項7] 前記混合部と前記結合部との間に、前記混合物を搬送するための複
数の第二の搬送部が設けられている請求項1乃至6のいずれか一項に
記載の検出キット。
- [請求項8] 前記混合部と前記第二の搬送部との間に、前記混合部で得られた混
合物における前記検出対象物と前記信号発信物質とを均一に分散させ
るための展開部が設けられている請求項1乃至7のいずれか一項に記

載の検出キット。

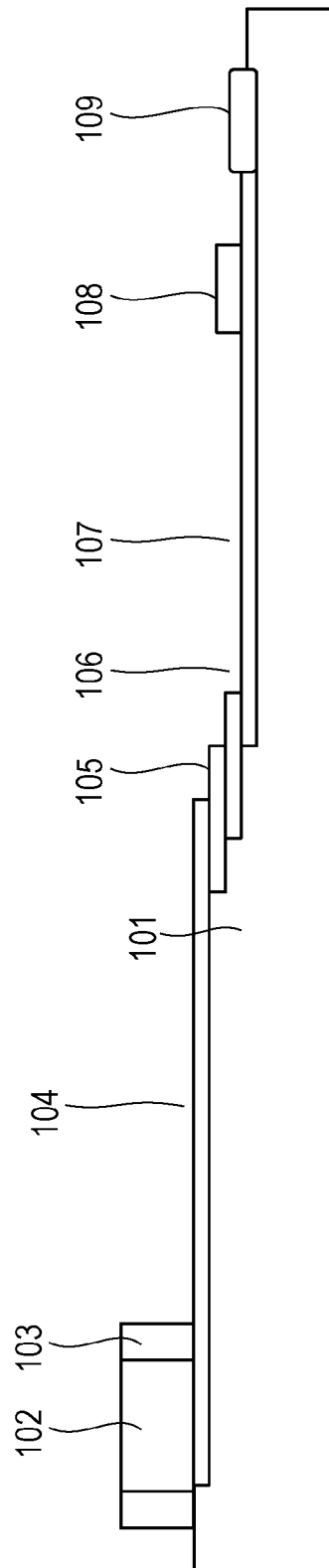
- [請求項9] 前記結合部で結合しなかった、前記検出対象物及び前記信号発信物質を含む試料を検出することで、前記導入部に導入された前記試料が前記結合部に達したか否かを確認可能な確認部を有する請求項1乃至8のいずれか一項に記載の検出キット。
- [請求項10] 前記検出対象物および前記信号発信物質が水素結合可能な部位を有し、前記結合物質は、前記水素結合可能な部位と水素結合可能な部位を有する請求項1乃至9のいずれか一項に記載の検出キット。
- [請求項11] 前記結合物質は合成ポリマーである請求項1乃至10のいずれか一項に記載の検出キット。
- [請求項12] 前記検出対象物は、ステロイド系ホルモン類、アミン系ホルモン類、ヌクレオシド、及びこれらの類縁体の少なくともいずれか1つである請求項1乃至11のいずれか一項に記載の検出キット。
- [請求項13] 前記検出対象物は8オキソ2' デオキシグアノシンである請求項1乃至12のいずれか一項に記載の検出キット。
- [請求項14] 前記検出対象物と前記結合物質とは、いずれか一方が抗原であり、いずれか他方が抗体である請求項1乃至12のいずれか一項に記載の検出キット。
- [請求項15] 前記複数の混合部に設けられた前記信号発信物質の量または濃度が互いに10のべき乗で異なっている請求項1乃至14のいずれか一項に記載の検出キット。
- [請求項16] 検出対象物の検出方法であって、
前記検出対象物を含む試料を分配する工程と、
分配された前記試料と、信号を発信可能な信号発信物質とを混合して複数の混合物を得る工程と、
前記複数の混合物と、前記検出対象物と前記信号発信物質に選択的に結合可能な結合物質と、を接触させる工程と、
前記結合物質に結合した前記信号発信物質から発信される信号を測

定する工程と、
を有する検出方法。

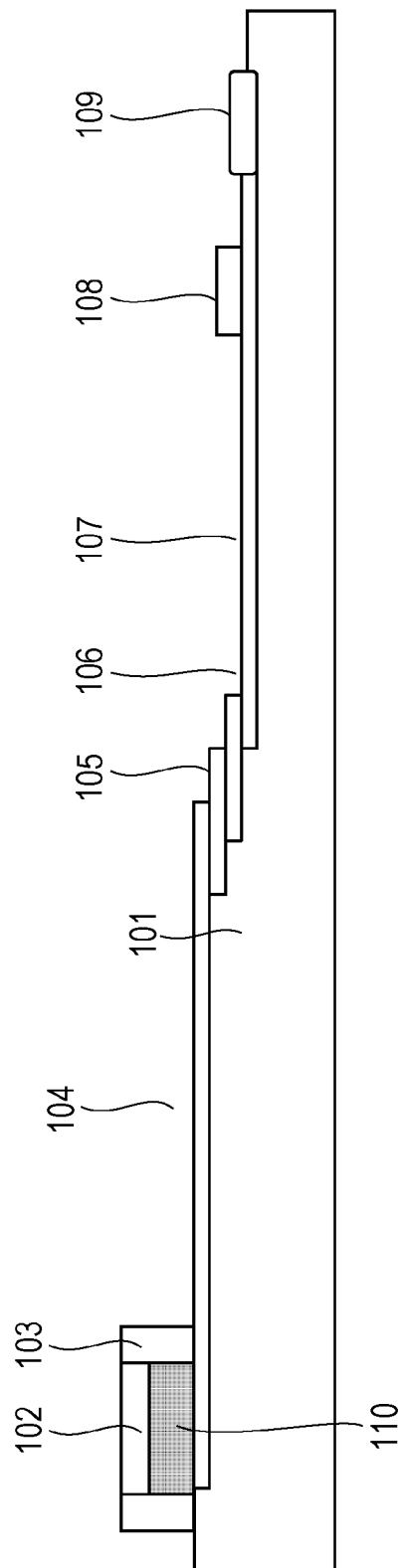
[図1]



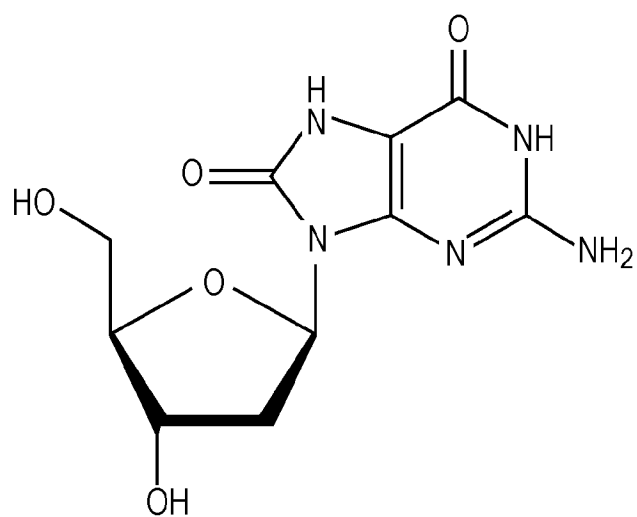
[図2]



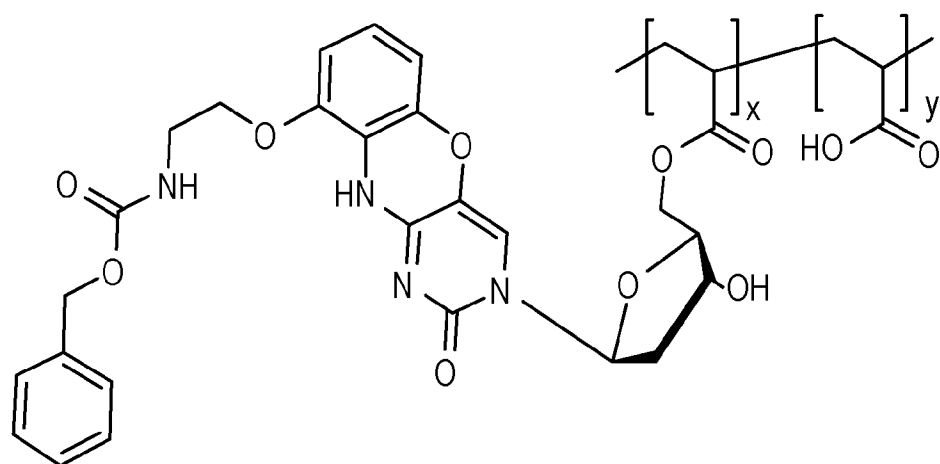
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/034764

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl. G01N33/543 (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)

Int.Cl. G01N33/543, G01N33/558

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan	1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan	1971-2017
Registered utility model specifications of Japan	1996-2017
Published registered utility model specifications of Japan	1994-2017

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 2009-58507 A (INVERNESS MEDICAL SWITZERLAND GMBH) 19 March 2009, claims, paragraphs [0031],	1-3, 5, 7, 9, 11-16
Y	[0049]-[0060], [0123] & US 2012/0015448 A1 claims, paragraphs [0039], [0057]-[0068], [0146] & GB 717045 D & EP 2031376 A2	4, 6, 8, 10
Y	JP 2010-261912 A (BL:KK) 18 November 2010, fig. 3 (Family: none)	4, 6

☒ 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
21 November 2017 (21.11.2017)

Date of mailing of the international search report
12 December 2017 (12.12.2017)

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/JP2017/034764

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-205336 A (MITSUBISHI CHEMICAL MEDIENCE CORP.) 07 October 2013, paragraphs [0027]-[0028] (Family: none)	8
Y	JP 2011-69755 A (ALOKA CO., LTD.) 07 April 2011, paragraph [0016] (Family: none)	10
A	WO 2003/029822 A1 (MATSUSHITA ELECTRIC INDUSTRIAL CO., LTD.) 10 April 2003, entire text, all drawings & EP 1361435 A1 & CN 1489691 A	1-16
A	US 2007/0243630 A1 (BOEHRINGER, Hans) 18 October 2007, entire text, all drawings & WO 1998/039657 A1 & AU6450698 A	1-16

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

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, G01N33/558

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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 2009-58507 A (インバーネス・メデイカル・スウィツツアーランド・ゲゼルシャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハフツング)	1-3, 5, 7, 9, 11-16
Y	2009.03.19, 特許請求の範囲、段落 0031、0049-0060、123 & US 2012/0015448 A1 (特許請求の範囲、段落 0039、0057-0068、146) & GB 717045 D & EP 2031376 A2	4, 6, 8, 10
Y	JP 2010-261912 A (株式会社ビーエル) 2010.11.18, 図3 (ファミリーなし)	4, 6

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

の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

21.11.2017

国際調査報告の発送日

12.12.2017

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)

赤坂 祐樹

2 J

3 3 1 6

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
Y	JP 2013-205336 A (三菱化学メディエンス株式会社) 2013. 10. 07, 段落 0027-0028 (ファミリーなし)	8
Y	JP 2011-69755 A (アロカ株式会社) 2011. 04. 07, 段落 0016 (ファミリーなし)	10
A	WO 2003/029822 A1 (松下電器産業株式会社) 2003. 04. 10, 全文、全図 & EP 1361435 A1 & CN 1489691 A	1-16
A	US 2007/0243630 A1 (BOEHRINGER, Hans) 2007. 10. 18, 全文、全図 & WO 1998/039657 A1 & AU 6450698 A	1-16