

(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2010-14631

(P2010-14631A)

(43) 公開日 平成22年1月21日(2010.1.21)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/543 (2006.01)

F I

G O 1 N 33/543 5 4 1 Z

G O 1 N 33/543 5 2 1

G O 1 N 33/543 5 7 5

テーマコード (参考)

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2008-176376 (P2008-176376)
 (22) 出願日 平成20年7月4日(2008.7.4)

(71) 出願人 000005290
 古河電気工業株式会社
 東京都千代田区丸の内二丁目2番3号
 (74) 代理人 100076439
 弁理士 飯田 敏三
 (74) 代理人 100118131
 弁理士 佐々木 渉
 (74) 代理人 100131288
 弁理士 宮前 尚祐
 (72) 発明者 會澤 英樹
 東京都千代田区丸の内2丁目2番3号 古
 河電気工業株式会社内
 (72) 発明者 大久保 典雄
 東京都千代田区丸の内2丁目2番3号 古
 河電気工業株式会社内

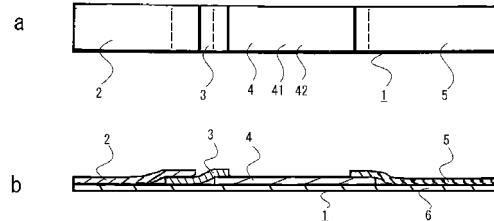
(54) 【発明の名称】 標識粒子として、蛍光粒子と着色粒子とを含有するイムノクロマト法用コンジュゲートパッド、
 それを用いたイムノクロマト法用テストストリップおよび検査方法

(57) 【要約】

【課題】製造工程において標識粒子をコンジュゲートパッドに含有させた際に、目視で含有状態が確認可能な標識粒子コロイドを含有させてなるコンジュゲートパッドを提供する。蛍光検出装置が無い状況でも目視の判定が可能なイムノクロマト法用テストストリップを提供する。作製から長期間経った後でも、目視による判定ができるイムノクロマト法用テストストリップを提供する。検査後のイムノクロマト法用テストストリップを検査結果として長期保存が可能なイムノクロマト法用テストストリップを提供する。

【解決手段】標識粒子として、着色粒子と蛍光粒子とを含有するイムノクロマト法用コンジュゲートパッド。

【選択図】図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

標識粒子として、着色粒子と蛍光粒子とを含有するイムノクロマト法用コンジュゲートパッド。

【請求項 2】

前記着色粒子がシリカ粒子、ラテックス粒子、半導体ナノ粒子、金粒子、金属ナノ粒子、無機結晶のいずれかであり、前記蛍光粒子がシリカ粒子、ラテックス粒子、半導体ナノ粒子のいずれかであることを特徴とする請求項 1 に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッド。

【請求項 3】

含有された前記着色粒子の表面積の和が、含有された前記蛍光粒子の表面積の和の 0.1 ~ 50 %であることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッド。

【請求項 4】

蛍光特性を有し、かつモル吸光係数が $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 以上である標識粒子が含有されてなることを特徴とする請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッド。

【請求項 5】

前記標識粒子の含有量が $20 \sim 200 \mu\text{g} / \text{cm}^2$ であることを特徴とする請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッド。

【請求項 6】

請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッドを用いて作製したイムノクロマト法用テストストリップ。

【請求項 7】

目視による判定を行った後、蛍光検出装置による高感度判定および/または定量測定を行うことを特徴とする、請求項 6 に記載のイムノクロマト法用テストストリップを用いてなる検査方法。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、標識粒子として、蛍光粒子と着色粒子とを含有するイムノクロマト法用コンジュゲートパッド、それを用いたイムノクロマト法用テストストリップおよび検査方法に関する。

【背景技術】**【0002】**

イムノクロマト法とは、被検物質が標識粒子に捕捉され、毛細管現象により多孔質支持体内を移動し、更に多孔質支持体にライン状に固定化された捕捉物質と効率的に接触することによって被検物質が結合した標識粒子が濃縮され、捕捉物質が固定化されたラインが発色化することによって被検物質の有無を判定する免疫測定法である。

イムノクロマト法の特徴として以下の 3 点が挙げられる。

- 1 判定までに要する時間が 20 分以下であり迅速な検査が可能である。
 - 2 検体を滴下するだけで測定でき、操作が簡便であるため、複数の検体処理が可能である。
 - 3 特別な検出装置を必要とせず、判定が容易なため一般消費者が自身で検査できる。
- これらの特徴を利用して、イムノクロマト法は妊娠検査薬やインフルエンザ検査薬に用いられており、新たな P O C T (P o i n t O f C a r e T e s t i n g) の手法として注目を集めている (例えば、特許文献 1 参照)。

【0003】

現在イムノクロマト法では標識粒子として金ナノ粒子や着色ラテックス粒子が使用されており、ラインの発色を目視で確認する方法が一般的である。しかし、ラインの発色を目

10

20

30

40

50

視で判定する方法は、簡便であるものの、感度が低いことが問題である。

本発明者らは標識粒子として蛍光粒子を用い、ラインの蛍光発色を蛍光検出装置で確認する方法について特許出願している。蛍光検出装置を用いる蛍光型イムノクロマト検査薬は従来の目視で確認するタイプに比べて感度が向上するものの、以下のような問題点がある。

【 0 0 0 4 】

1 イムノクロマト法試薬の製造工程において、抗体を感作させた標識粒子をパッドに含有させ、乾燥させ、コンジュゲートパッドを作製する。標識粒子が、発色を目視で判定する金粒子や着色ラテックス粒子等の着色粒子は、粒子の吸光度が高いのでパッドに粒子が含有されているかどうか、あるいは均一に含有されているかどうかを容易に判断できる。しかし標識粒子が蛍光粒子の場合は、粒子の吸光度が低いため、蛍光粒子をパッドに含有させた際に蛍光粒子が含有されているかどうかを容易に判断できず、一定量に含有させることが難しい。一定量に含有できているかどうかは蛍光検出装置で判定する必要がある、生産コストが高くなることが問題である。

2 蛍光検出型イムノクロマト法試薬は、蛍光検出器が故障した場合や蛍光検出装置を持ち合わせていない場合など、蛍光検出器が使用できない環境においては使用できないことが問題である。

3 蛍光粒子は保存期間が長くなると退色によって蛍光強度が低下するため、長期間保管した蛍光型イムノクロマト法試薬を用いると、正しい判定ができない場合があることが問題である。

4 検査後のイムノクロマト法試薬を検査結果として保管する際、蛍光型イムノクロマト法試薬では蛍光粒子の退色によってラインが消えてしまい、イムノクロマト法試薬の検査後の判定結果を長期保管ができないことが問題である。

【特許文献 1】特開 2 0 0 6 - 6 7 9 7 9 公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 5 】

本発明の目的は、上記の問題点に鑑みて、製造工程において標識粒子をコンジュゲートパッドに含有させた際に、目視で含有状態が確認可能な標識粒子コロイドを含有させてなるコンジュゲートパッドを提供することにある。

また、本発明の目的は、蛍光検出装置が無い状況でも目視の判定が可能なイムノクロマト法用テストストリップを提供することにある。

また、本発明の目的は、作製から長期間経った後でも、目視による判定ができるイムノクロマト法用テストストリップを提供することにある。

更に、本発明の目的は、検査後のイムノクロマト法用テストストリップを検査結果として長期保存が可能なイムノクロマト法用テストストリップを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 6 】

本発明は下記手段により達成された。

すなわち本発明は、

(1) 標識粒子として、着色粒子と蛍光粒子とを含有するイムノクロマト法用コンジュゲートパッド、

(2) 前記着色粒子がシリカ粒子、ラテックス粒子、半導体ナノ粒子、金粒子、金属ナノ粒子、無機結晶のいずれかであり、前記蛍光粒子がシリカ粒子、ラテックス粒子、半導体ナノ粒子のいずれかであることを特徴とする前記 (1) に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッド、

(3) 含有された前記着色粒子の表面積の和が、含有された前記蛍光粒子の表面積の和の 0 . 1 ~ 5 0 % であることを特徴とする前記 (1) または (2) に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッド、

(4) 蛍光特性を有し、かつモル吸光係数が $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 以上である標識

10

20

30

40

50

粒子が含有されてなることを特徴とする前記(1)～(3)のいずれか1項に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッド、

(5) 前記標識粒子の含有量が $20 \sim 200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であることを特徴とする前記(1)～(4)のいずれか1項に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッド、

(6) 前記(1)～(5)のいずれか1項に記載のイムノクロマト法用コンジュゲートパッドを用いて作製したイムノクロマト法用テストストリップ、及び

(7) 目視による判定を行った後、蛍光検出装置による高感度判定および/または定量測定を行うことを特徴とする、(6)に記載のイムノクロマト法用テストストリップを用いてなる検査方法

を提供するものである。

【発明の効果】

【0007】

本発明のイムノクロマト法用コンジュゲートパッドは、着色粒子と蛍光粒子を両方含有しているため、製造工程においてどの程度含有しているか、また均一に含有しているかを蛍光検出装置によらないで目視で確認することができる。

本発明のイムノクロマト法用テストストリップは、前記イムノクロマト法用コンジュゲートパッドを用いて作製してなるので、蛍光検出装置が使えない状況であっても、目視による検出が可能である。

本発明のイムノクロマト法用テストストリップは、前記イムノクロマト法用コンジュゲートパッドを用いて作製してなるので、長期間保存し、蛍光が退色してしまった後であっても、目視による検出が可能である。

さらに、本発明のイムノクロマト法用テストストリップは、前記イムノクロマト法用コンジュゲートパッドを用いて作製してなるので、検査後の前記テストストリップを保存し、蛍光が退色してしまった場合でも、目視による判定結果の再確認が可能であるため、判定結果の長期間の保存が可能である。

本発明の検査方法は、前記イムノクロマト法用テストストリップを用いてなるので、目視によって判定できない場合であっても高侵襲な処置により検体を再採取することを要することなく、蛍光による判定ないし定量が可能であることから低侵襲な検査ができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0008】

まず、本発明のコンジュゲートパッドについて説明する。

本発明のコンジュゲートパッド(標識粒子含有部材)は、イムノクロマト法用テストストリップに用いられ、標識粒子として、着色粒子と蛍光粒子とをいずれをも含有することを特徴とする。

本発明のコンジュゲートパッドにおける単位面積(cm^2)当たりの前記標識粒子の含有量は特に制限ないが $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \sim 2 \text{mg}/\text{cm}^2$ が好ましく、 $20 \sim 200 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ であることがより好ましい。含有量が多すぎると、1粒子当りの検体結合数が低下し、検出感度が低下する。

含有させる方法としては、前記標識粒子の分散液を塗布、滴下ないしは噴霧後、乾燥する方法等が挙げられる。このとき着色粒子または蛍光粒子を含有させ、一旦乾燥させた後、蛍光粒子または着色粒子を含有させても良く、予め着色粒子と蛍光粒子を混合し、この混合コロイドを含有させても良い。

吸光粒子と蛍光粒子の割合は、特に制限は無いが、目視でも蛍光でも十分な検出感度を得るために、コンジュゲートパッドに含有された吸光粒子の表面積の和が、コンジュゲートパッドに含有された蛍光粒子の表面積の和の50%以下であることが好ましく、含有された前記蛍光粒子の表面積の和の0.1～50%であることがより好ましく、含有された前記蛍光粒子の表面積の和の1%～30%であることがさらに好ましい。

本発明において、前記標識粒子の表面積の和は、一定体積のコロイドに含まれる標識粒子の表面積の総和を意味する。例えば粒子Aと粒子Bの混合コロイドを考える。本混合コロイド中の粒子Aの重量濃度を $c [\text{mg}/\text{ml}]$ 、粒子Aの平均粒径を $d [\text{nm}]$ 、粒子

10

20

30

40

50

A の密度を ρ [g / c m ³] とすると、本混合コロイド 1 m l の粒子 A の表面積の和 S [m ²] は下記の式 1 で表される。

【 0 0 0 9 】

【 数 1 】

$$S = \frac{6 \ c}{\rho \ d} \quad \text{式 1}$$

10

【 0 0 1 0 】

本発明に用いる標識粒子について説明する。

本発明に用いられる標識粒子は、検体を認識する物質（例えば、抗体、抗原、DNA、RNA などの生体分子）で表面修飾された着色粒子および蛍光粒子である。

本発明において、前記標識粒子の平均粒径は 20 ~ 1000 nm であることが好ましく、20 ~ 600 nm であることがより好ましく、60 ~ 300 nm であることがさらに好ましい。粒径が小さすぎると、検出感度が低下し、粒径が大きすぎると、イムノクロマト法に用いられる多孔質支持体（メンブレン）の目詰まりの原因となる。

20

本発明において、前記平均粒径は、透過型電子顕微鏡（TEM）、走査型電子顕微鏡（SEM）等の画像から無作為に選択した 50 個の標識粒子の合計の投影面積から標識粒子の占有面積を画像処理装置によって求め、この合計の占有面積を、選択した標識粒子の個数（50 個）で割った値に相当する円の直径の平均値（平均円相当直径）を求めたものである。

粒度分布の変動係数いわゆる CV 値は特に制限はないが、10 % 以下が好ましく、8 % 以下がより好ましい。

本明細書及び特許請求の範囲において、単分散とは CV 値 15 % 以下の粒子群をいう。

【 0 0 1 1 】

本発明のコンジュゲートパッドは、上述のように、標識粒子として、着色粒子と蛍光粒子とをいずれをも含有してなり、蛍光特性を有し、かつモル吸光係数 ϵ が $5 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 以上である標識粒子（着色粒子及び蛍光粒子の混合物を含む。）を含有していることが好ましく、蛍光特性を有し、かつモル吸光係数 ϵ が $5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1} \sim 1 \times 10^{10} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ である標識粒子（着色粒子及び蛍光粒子の混合物を含む。）を含有していることがより好ましい。

30

ここで、モル吸光係数 ϵ は下記ランベルト - ベールの式から算出することができる。

$$A = \text{Log}_{10} (I_0 / I) = \epsilon b p = a_s b p'$$

[A : 吸光度、I : 透過光の強度、 I_0 : 入射光の強度、 ϵ : モル吸光係数 ($\text{M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)、b : 光路長 (cm)、p : 標識粒子（着色粒子及び蛍光粒子の混合分散液を含む。）の濃度 ($\text{M} (\text{mol} / \text{l})$)、 a_s : 比吸光度、 p' : 標識粒子（着色粒子及び蛍光粒子の混合分散液を含む。）の濃度 (g / l)]

40

【 0 0 1 2 】

上記濃度 p' (g / l) は、一定量（例えば 1 m l）の標識粒子分散液から標識粒子のみを回収し、乾燥させて得られた質量を決定して得られた値である。一方、上記濃度 p (mol / l) は、標識粒子の大きさを TEM 写真から求め、一粒子の体積を決定し、粒子の密度（例えばシリカ粒子の場合は $2.3 \text{ g} / \text{cm}^3$ ）から一粒子の質量を決定し、一定量（例えば 1 m l）の標識粒子分散液から標識粒子のみを回収し、乾燥させて得られた標識粒子の質量からモル数を決定して得られた値である。

本発明において、「標識粒子のモル吸光係数 ϵ 」とは、標識粒子分散液（着色粒子及び蛍光粒子の混合分散液を含む。）について吸光度を測定し、前記ランベルト - ベールの式

50

に適用することにより得られた、前記分散液中における標識粒子（着色粒子及び蛍光粒子の混合物を含む。）のモル吸光係数 ε をいう。

標識粒子の吸光度、吸光スペクトル及び ε は、任意の吸光光度計ないしはプレートリーダーを用いて、水分散液、エタノール分散液、N, N - ジメチルフォルムアミド分散液等の分散液として測定できる。

【0013】

前記着色粒子の材質に特に制限はないが、例えば、シリカ粒子、ラテックス粒子、半導体ナノ粒子、金粒子、金属ナノ粒子、無機結晶等を用いることができる。

また蛍光粒子の材質に特に制限はないが、例えば、シリカ粒子、ラテックス粒子、半導体ナノ粒子等を用いることができる。

前記標識粒子は、上述のように検体を認識する物質（例えば、抗体、抗原、DNA、RNAなどの生体分子）で表面修飾されている。

【0014】

本発明において、前記シリカ粒子としては特に制限はなく、任意のいかなる調製方法によって得られたシリカ粒子であってよい。例えば、Journal of Colloid and Interface Science, 159, 150 - 157 (1993) に記載のゾル - ゲル法で調製されるシリカ粒子等が挙げられる。

国際公開2007/074722A1公報に記載された蛍光色素化合物含有コロイドシリカ粒子の調製方法に準じて得られた、標識物質を含有するシリカ粒子を用いることが特に好ましい。

具体的には、前記標識物質を含有するシリカ粒子は、前記標識物質とシラン化合物とを反応させ、共有結合、イオン結合その他の化学的に結合もしくは吸着させて得られた生成物に1又は2種以上のシラン化合物を重合させることにより調製することができる。

前記標識物質を含有するシリカ粒子の好ましい調製方法の態様としては、N - ヒドロキシスクシンイミド (NHS) エステル基、マレイミド基、イソシアナート基、イソチオシアナート基、アルデヒド基、パラニトロフェニル基、ジエトキシメチル基、エポキシ基、シアノ基等の活性基を有する前記標識物質と、それら活性基と対応して反応する置換基（例えば、アミノ基、水酸基、チオール基）を有するシランカップリング剤とを反応させ、共有結合させて得られた生成物に1又は2種以上のシラン化合物を重合させることにより調製することができる。

【0015】

前記標識物質は蛍光物質または吸光物質である。蛍光物質または吸光物質に関して特に制限はなく、有機化合物、無機化合物、半導体粒子等である。

前記活性基を有する前記標識物質の具体例として、5 - (及び - 6) - カルボキシテトラメチルローダミン・スクシンイミジルエステル（商品名、emp Biotech GmbH社製）等のNHSエステル基を有する標識物質を挙げることができる。

【0016】

前記置換基を有するシランカップリング剤の具体例として、 γ - アミノプロピルトリエトキシシラン (APS)、3 - [2 - (2 - アミノエチルアミノ) エチルアミノ] プロピル - トリエトキシシラン、N - 2 (アミノエチル) 3 - アミノプロピルメチルジメトキシシラン、3 - アミノプロピルトリメトキシシラン等のアミノ基を有するシランカップリング剤を挙げることができる。中でも、APSが好ましい。

【0017】

前記重合させる前記シラン化合物としては、特に制限はされないが、テトラエトキシシラン (TEOS)、 γ - メルカプトプロピルトリメトキシシラン (MPS)、 γ - メルカプトプロピルトリエトキシシラン、 γ - アミノプロピルトリエトキシシラン (APS)、3 - チオシアナトプロピルトリエトキシシラン、3 - グリシジルオキシプロピルトリエトキシシラン、3 - イソシアナトプロピルトリエトキシシラン、及び3 - [2 - (2 - アミノエチルアミノ) エチルアミノ] プロピル - トリエトキシシランを挙げることができる。中でも、TEOS、MPS又はAPSが好ましい。

本発明において、前記標識物質は、前記シリカ粒子中において固定化された状態にある。

【0018】

上述のように調製すると、球状、もしくは、球状に近いシリカ粒子が製造できる。球状に近いシリカ粒子とは、具体的には長軸と短軸の比が2以下の形状である。

所望の平均粒径のシリカ粒子を得るためには、YM-10、YM-100（いずれも商品名、ミリポア社製）等の限外ろ過膜を用いて限外ろ過を行い、粒径が大きすぎたり小さすぎる粒子を除去するか、または適切な重力加速度で遠心分離を行い、上清または沈殿のみを回収することで可能である。

【0019】

本発明において、前記ラテックス粒子としては、ポリスチレン、スチレン-スルホン酸（塩）共重合体、スチレン-メタクリル酸共重合体、アクリルニトリル-ブタジエン-スルホン酸共重合体、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なる合成高分子粒子を挙げることができる。

また、ラテックス粒子の着色方法としては、特開2000-178309、特開平10-48215号、特開平8-269207号、特開平6-306108号などに記載の方法で行うことができる。

【0020】

前記半導体ナノ粒子の材質として蛍光特性又は吸光特性を有する限り特に制限されないが、ZnO、ZnS、ZnSe、ZnTe、CdO、CdS、CdSe、CdTe、HgS、HgSe、HgTe、InP、InAs、GaN、GaP、GaAs、TiO₂、WO₃、PbS、又はPbSeが好ましく例示される。例えば、特許第3897285号公報等に記載の半導体ナノ粒子を用いることができる。

前記半導体ナノ粒子は、チオール化合物の-SH基が半導体ナノ粒子の表面のS、O、Se、Te、P、As、N等の原子と置換することにより表面修飾することができる。

前記金粒子、前記金属ナノ粒子としては、特開2003-26638明細書等に記載の金コロイド粒子及び金属コロイド粒子を用いることができる。

前記金属コロイド粒子の具体例としては、白金、銅、酸化鉄等の金属コロイド粒子が挙げられる。

前記無機結晶としては、酸化鉄(III)(Fe₂O₃)、酸化銀(I)(Ag₂O)、酸化スズ(IV)(SnO₂)、酸化チタン(IV)(TiO₂)、インジウムスズ酸化物(ITO)等が挙げられる。例えば、特開2005-76064公報に記載の無機結晶を用いることができる。

【0021】

前記標識粒子を前記検体を認識する物質で表面修飾させる方法としては特に制限は無く、静電的引力、ファンデルワールス力、疎水性相互作用等によって前記検体を認識する物質を前記標識粒子に吸着させても良いし、架橋剤や縮合剤によって化学結合で結合させても良い。また、前記標識粒子表面にチオール基を有する場合には、前記検体を認識する物質のチオール基とS-S結合によって結合させても良い。

また、前記標識粒子表面の生体分子（例えば、抗体、抗原、DNA、RNA）などの前記検体を認識する物質を結合したときに粒子が凝集する場合は、予め、前記標識粒子表面に交互吸着法によって表面処理を施しておいても良い。交互吸着法とは、電荷を有する基板や粒子の表面に電荷を持った高分子を静電的引力で吸着させることで、基板や粒子の表面に高分子の薄膜を形成する手法である。前記標識粒子の表面に交互吸着処理を行うことにより粒子表面に電荷を付与できるため、粒子間に静電的反発力が生じ、分散性が向上する。また、粒子に結合した高分子は排除体積を持つことから、立体反発力の効果によっても分散性が向上する。

【0022】

本発明のイムノクロマト法用テストストリップは、

(1) 試料添加用部材（サンプルパッド）と前記標識粒子を含有させてなる部材（本発明

10

20

30

40

50

のコンジュゲートパッド)とが、

(2) 前記コンジュゲートパッドと抗体固定化部を有するメンブレン(抗体固定化メンブレン)とが、並びに

(3) 前記抗体固定化メンブレンと吸収パッドとが

相互に毛細管現象が生じるように直列連結していることがより好ましい。

【0023】

図1a及びbを参照して、本発明のイムノクロマト法用テストストリップの好ましい1つの実施態様について説明する。

図1aは本発明のイムノクロマト法用テストストリップの平面図を示し、図1bは、aで示されたイムノクロマト法用テストストリップの平面図の縦断面図を示す図である。

本発明のイムノクロマト法用テストストリップ1は、試料添加用部材(サンプルパッド)2、標識粒子含有部材(本発明のコンジュゲートパッド)3、抗体固定化メンブレン4、吸収パッド5からなることが好ましい。上記各構成部材は粘着剤付きバックングシート6により裏打ちされていることがより好ましい。

前記メンブレン4における抗体固定化部としては、検体の有無を判定、すなわち陽性陰性を判定するための捕捉用抗体が固定化されたテストライン41、および標識粒子により標識された全ての検体を捕捉する抗体が固定化されたコントロールライン42を含むことが好ましい。

本発明において、検出、定量、検査、診断、判定の対象としての検体は、抗原、抗体、DNA、RNA、糖、糖鎖、リガンド、受容体、ペプチド、化学物質等が挙げられる。

本発明において、検体を含有する試料液体としては特に制限ないが、尿、血液などが挙げられる。

【0024】

次に、上記各部材について説明する。

1) 試料添加用部材(サンプルパッド)2

サンプルパッド2は検体を含むサンプルを滴下する構成部材である。

2) 標識粒子含有部材(本発明のコンジュゲートパッド)3

コンジュゲートパッド3は標識粒子が含有された構成部材であり、サンプルパッド2から毛細管現象により移動してきた試料液体に含まれる検体が抗原抗体反応等の分子認識反応で、前記標識粒子によって捕捉され、標識される部分である。

【0025】

3) 抗体固定化メンブレン4

メンブレン4は前記標識粒子により標識された検体が毛細管現象によって移動する構成部材であり、固定化抗体—検体—標識粒子からなるサンドイッチ型免疫複合体形成反応が行われる抗体固定化部(判定部)を有する。

前記メンブレンにおける前記抗体固定化部(判定部)の形状としては局所的に捕捉用抗体が固定化されている限り特に制限はなく、ライン状、円状、帯状等が挙げられるが、ライン状であることが好ましく、幅0.5~1.5mmのライン状であることがより好ましい。

固定化抗体—検体—標識粒子からなるサンドイッチ型免疫複合体形成反応により抗体固定化部(判定部)に、前記標識粒子により標識された検体が捕捉され、形成された前記複合体中の前記標識粒子に由来する発色又は蛍光の程度により検体の有無を判定、すなわち陽性陰性を判定することができる。すなわち、前記抗体固定化部(判定部)に標識粒子が濃縮され、着色シグナルとして目視的に、又は検出機器を用いて検出、判定できる。

前記サンドイッチ型免疫複合体形成反応を十分に完了させるため、あるいは液体試料中の着色物質による測定への影響や検体と結合していない標識粒子による測定への影響を回避するため、メンブレンにおける判定部は、前記コンジュゲートパッドとの連結端及び前記吸収パッドとの連結端からある程度離れた位置(例えば、前記メンブレンの中程など)に設けておくことが好ましい。

【0026】

前記抗体固定化部（判定部）における抗体固定化量は特に制限ないが、形状がライン状の場合、単位長さ（cm）当たりの $0.1\mu\text{g} \sim 5\mu\text{g}$ が好ましい。固定化方法としては、抗体溶液を塗布、滴下ないしは噴霧後、乾燥して物理吸着により固定化する方法等が挙げられる。

前述の抗体固定化後に、非特異的吸着による測定への影響を防止するために前記メンブレン全体をいわゆるブロッキング処理を施しておくことが好ましい。例えば、アルブミン、カゼイン、ポリビニルアルコール等のブロッキング剤を含有する緩衝液中に適当な時間浸漬した後乾燥する方法等が挙げられる。市販の前記ブロッキング剤としては、例えば、スキムミルク（DIFCO社製）、4%ブロックエース（明治乳業社製）などが挙げられる。

10

【0027】

4) 吸収パッド5

吸収パッド5は、毛細管現象でメンブレンを移動してきた試料液体および標識粒子を吸収し、常に一定の流れを生じさせるための構成部材である。

これら各構成部材の材料としては特に制限は無く、イムノクロマト法用テストストリップに用いられる部材が使用できるが、サンプルパッドおよびコンジュゲートパッドとしてはGlass Fiber Conjugate Pad（商品名、MILLIPORE社製）等のガラスファイバーのパッドが好ましく、メンブレンとしてはHi-Flow Plus 120メンブレン（商品名、MILLIPORE社製）等のニトロセルロースメンブレンが好ましく、吸収パッドとしてはCellulose Fiber Sample Pad（商品名、MILLIPORE社製）等のセルロースメンブレンが好ましい。

20

前記粘着剤付きバックングシートとしては、AR9020（商品名、Adhesive Research社製）等が挙げられる。

前記テストストリップの作製法としては、試料添加用部材（サンプルパッド）、標識粒子含有部材（コンジュゲートパッド）、抗体固定化メンブレン、吸収パッドの並び順に、各部材間で毛管現象を生じさせ易くするために、それら各部材の両端を隣接する部材と1～5mm程度重ね合わせて（好ましくはバックングシート上に）貼付することで作製することができる。

【0028】

次に本発明のイムノクロマト法用テストストリップを用いてなる検査方法について説明する。

30

本発明のイムノクロマト法用テストストリップを用いてなる検査方法は、まず、検体を含む試料液体（サンプル）をサンプルパッドに滴下して行うことができる。サンプルに含まれる検体が一定量（目視検出可能量）以上であれば、テストラインの発色は目視で確認が可能であり、陽性あるいは陰性の判定ができる。

一方、検体が一定量以下のサンプルではテストラインの発色は目視では確認されないが、前記ストリップを、イムノクロマト法用蛍光検出装置を用いて観察することで陽性あるいは陰性の判定を高感度に行うことが可能である。このように、本発明のイムノクロマト法用テストストリップを用いてなる検査方法は、検体が一定量以上の場合は目視によって簡便かつ迅速に陽性の判定が可能であり、検体の量が一定以下の場合にはイムノクロマト法用蛍光検出装置を用いて高感度に判定することが可能である。

40

本発明のイムノクロマト法用テストストリップを用いてなる検査方法は、目視による判定を行った後、蛍光検出装置による高感度判定および/または定量測定を行うことが好ましい。

【0029】

次に、本発明に用いるイムノクロマト法用蛍光検出装置について説明する。

本発明に用いるイムノクロマト法用検出装置は、励起抗原およびフィルタからなる。

前記励起光源としては水銀ランプ、ハロゲンランプ、キセノンランプ、レーザダイオード、発光ダイオードなどが挙げられる。前記フィルタは、励起光源から特定の波長の光のみを透過するためのフィルタと、さらに、蛍光のみを検出する観点から、前記励起光を除

50

去し蛍光のみを透過するフィルタであり、前記蛍光粒子の蛍光波長、蛍光波長から適宜選択する。

前記蛍光検出装置は、前記蛍光を受光する光電子倍增管又はCCD検出器を備えていてもよい。これにより目視では確認できない強度ないしは波長の蛍光も検出でき、さらにはその蛍光強度を測定できることから検体の定量もでき、高感度検出及び定量が可能となる。

【実施例】

【0030】

以下、本発明を実施例に基づいてさらに詳細に説明する。本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

参考例1（本発明に用いる着色蛍光シリカナノ粒子の調製）

5 - （及び - 6） - カルボキシテトラメチルローダミン・スクシンイミジルエステル（商品名、emp Biotech GmbH社製）5.8mgを1mlのジメチルホルムアミド（DMF）に溶解した。ここに2.6μlのAPSを加え、室温（23℃）で1時間反応を行った。

得られた反応液400μlにエタノール128ml、TEOS400μl、蒸留水28.8ml、28質量%アンモニア水400μlを加え、室温で24時間反応を行った。

反応液を18000×gの重力加速度で30分間遠心分離を行い、上清を除去した。沈殿したシリカ粒子に蒸留水を4ml加え、粒子を分散させ、再度18000×gの重力加速度で30分間遠心分離を行った。本洗浄操作をさらに2回繰り返し、標識シリカナノ粒子分散液に含まれる未反応のTEOSやアンモニア等を除去し、平均粒径172nmのシリカナノ粒子94.2mgを得た。収率約88%。

図2は、得られた標識シリカナノ粒子のSEM写真像を示す図である。図中、白く見える球形状物質が、得られた標識シリカナノ粒子である。

前記標識シリカナノ粒子1g/lのコロイドの吸光度を測定し、シリカ粒子の密度を2.3mg/cm³として、粒子のモル吸光係数を求めたところ、 $7.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。また、前記標識シリカナノ粒子1g/lの蛍光強度を測定し、シリカ粒子の密度を2.3mg/cm³として、1粒子あたりの蛍光強度を求めたところ、1粒子あたりの蛍光強度は5 - （及び - 6） - カルボキシテトラメチルローダミンの87000個分に相当した。

【0031】

参考例2（シリカ粒子/アルギン酸の複合粒子の作製）

参考例1と同様な方法により得られた、濃度40mg/mlのローダミン含有シリカ粒子（平均粒径183nm）のコロイド500μl（分散媒蒸留水）に、蒸留水2.9mlと、濃度10mg/mlのアルギン酸ナトリウム水溶液（重量平均分子量70000）400μlを加え、撹拌子でよく撹拌した。続いて、28質量%のアンモニア水を200μl加え、コロイドを室温（23℃）で1時間撹拌した。得られたコロイドを15,000×Gの重力加速度で30分遠心分離し、上清を除去した。沈殿させた粒子に蒸留水を3.4ml加え、粒子を再分散させた。続いて、10mg/mlのアルギン酸ナトリウム水溶液を400μl加え撹拌子でよく撹拌したあと、28質量%のアンモニア水を200μl加え、1時間撹拌した。このコロイドを15,000×Gの重力加速度で30分遠心分離し、上清を除去後、蒸留水を1ml加え粒子を分散させた。同様にして更に2回遠心分離と蒸留水への分散を繰り返して粒子を洗浄し、蒸留水1mlに分散させ、ローダミン含有シリカ粒子/アルギン酸の複合粒子のコロイドを得た（収量20mg/ml×1ml）。

【0032】

参考例3（粒子の抗hCG抗体修飾）

参考例2で作製した濃度20mg/mlローダミン含有シリカ粒子/アルギン酸の複合粒子のコロイド500μlに、0.5MのMES（2-Morpholinoethanesulfonic acid）緩衝液（pH6.0）を100μl、50mg/mlのNHSを461μl、19.2mg/mlのEDCを150μl、蒸留水を1.089ml

10

20

30

40

50

1 加え、30 分間混合した。

反応液を 15,000 × G の重力加速度で 30 分遠心分離し、上清を除去後、蒸留水を 1 ml 加え粒子を分散させた。同様にして更に 2 回遠心分離と蒸留水への分散を繰り返して粒子を洗浄し、最後に 50 mM の KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0) 1 ml に分散させた。ここに 50 mM の KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0) に溶解した 1 mg/ml の抗 hCG 抗体 (Anti-hCG マウス IgG₁、Medix Biochemica 社製) を 1 ml 加え、2 時間混合した。続いて 100 mg/ml の BSA 溶液を 100 μl 加え、さらに 1 時間混合した。

反応液を 15,000 × G の重力加速度で 30 分遠心分離し、上清を除去後、50 mM の KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0) を 1 ml 加え粒子を分散させた。同様にして更に 2 回、遠心分離と 50 mM の KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0) への分散を繰り返して粒子を洗浄し、最後に 50 mM の KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0) 1 ml に分散させ、抗 hCG 抗体で修飾されたローダミン含有シリカ粒子のコロイドを得た (収量 10 mg/ml × 1 ml)。

【0033】

実施例 1 (着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の両方を含有したコンジュゲートパッドの作製)

粒径 0.16 μm、濃度 10 mg/ml の着色ラテックス粒子 (DC02B/5641, Bangs Laboratories 社製) 1 ml について、参考例 3 と同様の方法で抗 hCG 抗体を修飾し、50 mM の KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0) に分散した抗 hCG 抗体で修飾された着色ラテックス粒子コロイド 1 ml (10 mg/ml) を得た。

続いて、粒径 0.19 μm、濃度 10 mg/ml の蛍光ラテックス粒子 (FS02F/8234, Bangs Laboratories 社製) 1 ml について、参考例 3 と同様の方法で抗 hCG 抗体を修飾し、50 mM の KH_2PO_4 緩衝液 (pH 8.0) に分散した抗 hCG 抗体で修飾された蛍光ラテックス粒子コロイド 1 ml (10 mg/ml) を得た。

前記抗 hCG 抗体で修飾された着色ラテックス粒子コロイド (10 mg/ml) 0.05 ml と、前記抗 hCG 抗体で修飾された蛍光ラテックス粒子コロイド (10 mg/ml) 0.25 ml と、50 mg/ml のスクロース 3 ml と、蒸留水 1.7 ml を混合した。

得られた混合コロイドの着色ラテックス粒子の重量濃度は 0.1 [mg/ml]、蛍光ラテックス粒子の重量濃度は 0.5 [mg/ml] である。また着色ラテックス粒子、蛍光ラテックス粒子の密度はどちらも 1.05 [mg/ml] である。着色ラテックス粒子の平均粒径を 160 nm、蛍光ラテックス粒子の平均粒径を 190 nm とし、前記式 1 より混合コロイド 1 ml 中の着色ラテックス粒子の表面積の和および蛍光ラテックス粒子の表面積の和を求めると、着色ラテックス粒子の表面積の和は 3.6×10^{-3} [m²] であり、混合コロイド 1 ml 中の蛍光ラテックス粒子の表面積は 1.5×10^{-2} [m²] である。よって本混合コロイドにおいて、着色ラテックス粒子の表面積の和は、蛍光ラテックス粒子の表面積の和の 24% である。

続いて前記混合粒子コロイドを Glass Fiber Conjugate Pad (商品名、MILLIPORE 社製、8 × 150 mm) 1 枚に対し 0.8 ml 含有させた。前記混合コロイド 0.8 ml に含まれる標識粒子の重量は 480 μg、前記 Glass Fiber Conjugate Pad の面積は 12 cm² であるから、本コンジュゲートパッドの標識粒子の含有量は 40 μg/cm² である。

【0034】

着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の混合粒子を含有させた Glass Fiber Conjugate Pad は薄い青色であり、パッドに粒子が含有されていることが目視で確認できた。

比較として、前記抗 hCG 抗体を修飾した蛍光ラテックス粒子コロイド (10 mg/ml) 0.3 ml と、50 mg/ml のスクロース 3 ml と、蒸留水 1.7 ml を混合して

得られた蛍光ラテックス粒子コロイドをGlass Fiber Conjugate Pad (商品名、MILLIPORE社製、 8×150 mm) 1枚に対し0.8 ml含有させた。蛍光ラテックス粒子を含有したGlass Fiber Conjugate Padは無色であり、パッドに粒子が含有されていることが目視で確認できなかった。

【0035】

実施例2 (着色蛍光シリカ粒子を含有したコンジュゲートパッドの作製)

参考例3で作製した、抗hCG抗体で修飾された着色蛍光シリカ粒子(10 mg/ml) 0.3 mlと、50 mg/mlスクロース3 mlと、蒸留水1.7 mlを混合した。得られた着色蛍光シリカ粒子コロイドをGlass Fiber Conjugate Pad (商品名、MILLIPORE社製、 8×150 mm) 1枚に対し0.8 ml含有させた。粒子を含有させたGlass Fiber Conjugate Padは薄い赤色であり、パッドに粒子が含有されていることが目視で確認できた。

10

【0036】

実施例3 (着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の混合粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したイムノクロマト法用テストストリップを用いたリコンビナントhCGの検出)

(1) 抗体固定化メンブレンの作製

メンブレン(丈25 mm、商品名Hi-Flow Plus 120 メンブレン、MILLIPORE社製)の中央付近(端から約12 mm)に幅約1 mmのテストラインとして抗hCG抗体(alpha subunit of FSH(LH), clone code/6601、Medix Biochemica社製)が1 mg/mL含まれる溶液((50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0) + 5%スクロース)を0.75 $\mu\text{L}/\text{cm}$ の塗布量で塗布した。

20

続いて、幅約1 mmのコントロールラインとして抗IgG抗体(Anti Mouse IgG、Dako社製)が1 mg/mL含まれる溶液((50 mM KH_2PO_4 , pH 7.0) シュガー・フリー)を0.75 $\mu\text{L}/\text{cm}$ の塗布量で塗布し、50 で30分乾燥させた。

次に、ブロッキング処理として前記メンブレン全体をブロッキングバッファー中に室温で30分浸した。

メンブレン洗浄/安定バッファーに移し室温で30分静置した。メンブレンを引上げ、ペーパートオル上に置いて室温で一夜乾燥させて、抗体固定化メンブレンを作製した。

30

前記得られたメンブレン、実施例1で得られた着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の混合粒子を含有したコンジュゲートパッド、サンプルパッド(Glass Fiber Conjugate Pad (GFCP)、MILLIPORE社製)、吸収パッド(Cellulose Fiber Sample Pad (CFSP) (MILLIPORE社製)をバックグシート(商品名AR9020, Adhesives Research社製)上で組み立て、5 mm幅、長さ60 mmのストリップ状に切断し、図1a及びbに示した構成のテストストリップを得た。図1a及びbについては前述の通りである。

なお、各構成部材は、図1a及びbに示しているように各々その両端を隣接する部材と2 mm程度重ね合わせて貼付した(以下、同様である。)。

40

【0037】

(2) リコンビナントhCGの検出

100, 50, 20, 10, 5, 2, 0.2 IU/LのリコンビナントhCG(ロート製薬社製)100 μL を前記ストリップのサンプルパッド部分に100 μL 滴下し、五分間放置し、目視で抗hCG抗体(alpha subunit of FSH(LH), clone code/6601、Medix Biochemica社製)を塗布したライン(テストライン)および、抗IgG抗体を塗布したライン(コントロールライン)の発色を確認したところ、リコンビナントhCGが100, 50, 20 IU/Lの場合は目視でテストラインおよびコントロールラインの発色が確認できた。リコンビナントh

50

C G が 1 0 , 5 , 2 , 0 . 2 I U / L のときは目視ではテストラインの発色は確認されなかった。

続いて、励起光源側のフィルタとして F F 0 1 - 4 8 2 (商品名、S e m r o c k 社製)、検出器側のフィルタとして F F 0 1 - 5 3 6 (商品名、S e m r o c k 社製) を用い、前記リコンビナント h C G が 1 0 , 5 , 0 . 2 I U / L のサンプルを滴下したテストストリップを水銀ランプ (1 0 3 W) で照射し、検出器として C C D 検出器 (C 2 7 4 1 - 3 5 A (商品名、浜松ホトニクス社製)) を用いて蛍光の画像化を行った。その結果リコンビナント h C G が 1 0 , 5 , 2 , 0 . 2 I U / L の何れのサンプルについても、テストラインおよびコントロールラインの蛍光発色を確認した。

以上の結果から、前記着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の混合粒子を用いた前記テストストリップはリコンビナント h C G が 2 0 I U / L 以上の場合は目視で簡単に確認でき、リコンビナント h C G が 2 0 ~ 0 . 2 I U / L のときであっても蛍光検出装置で判定が可能である。

【 0 0 3 8 】

実施例 4 (着色蛍光シリカ粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したイムノクロマト法用テストストリップを用いたリコンビナント h C G の検出)

コンジュゲートパッドとして、実施例 2 で得られた着色蛍光シリカ粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いた以外は実施例 3 (1) と同じ方法で作製したテストストリップを用いて、実施例 3 (2) と同じ方法でリコンビナント h C G の検出を行った。その結果、リコンビナント h C G が 1 0 0 , 5 0 I U / L の場合は目視でテストラインおよびコントロールラインの発色が確認できた。リコンビナント h C G が 2 0 , 1 0 , 5 , 2 , 0 . 2 I U / L のときは目視ではテストラインの発色は確認されなかった。蛍光検出装置を用いた評価においては、リコンビナント h C G が 2 0 , 1 0 , 5 , 2 , 0 . 2 I U / L の何れのサンプルについても、テストラインおよびコントロールラインの蛍光発色を確認した。

以上の結果から、前記着色蛍光シリカ粒子を用いた前記テストストリップはリコンビナント h C G が 5 0 I U / L 以上の場合は目視で簡単に確認でき、リコンビナント h C G が 5 0 ~ 0 . 2 I U / L のときであっても蛍光検出装置で判定が可能である。

【 0 0 3 9 】

実施例 5 (長期放置後のテストストリップを用いたリコンビナント h C G の検出評価)

実施例 1 に記載の着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の両方を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップと、実施例 1 に記載の蛍光ラテックス粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップと、実施例 2 に記載の着色蛍光シリカ粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップそれぞれを、室温で 9 ヶ月間放置した。

9 ヶ月間放置後のテストストリップに、1 0 0 , 5 0 , 2 0 , 1 0 , 5 , 3 I U / L のリコンビナント h C G を滴下し、ラインの検出を行ったところ、着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の混合粒子を含有させたテストストリップは、リコンビナント h C G が 2 0 I U / L 以上であれば目視でテストラインおよびコントロールラインの発色が確認でき、着色蛍光シリカ粒子を含有させたテストストリップは、リコンビナント h C G が 5 0 I U / L 以上であれば目視でテストラインおよびコントロールラインの発色が確認できた。一方、蛍光ラテックス粒子を含有させたテストストリップでは何れの濃度のリコンビナント h C G を滴下した場合でも、目視によるテストラインおよびコントロールラインの発色の確認、および蛍光検出器によるテストラインおよびコントロールラインの蛍光発色の確認が共にできなかった。

以上の結果から、着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の両方を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップおよび着色蛍光シリカ粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップは長期保存に適していることが分かる。

【 0 0 4 0 】

実施例 6 (リコンビナント h C G の検出にもちいたテストストリップの長期放置後のライン発色確認の可否の評価)

実施例 1 に記載の着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の両方を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップと、実施例 1 に記載の蛍光ラテックス粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップと、実施例 2 に記載の着色蛍光シリカ粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップそれぞれについて、50 IU/L のリコンビナント h C G を 100 μ L 滴下し、テストラインとコントロールラインを発色させた。このテストストリップを室温で 10 ヶ月間放置した。

その結果、蛍光ラテックス粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップは目視によっても、蛍光検出器を用いてもコントロールライン及びテストラインの発色または蛍光発色が確認できなかった。着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の両方を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップおよび着色蛍光シリカ粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップは目視でコントロールライン及びテストラインの発色が確認できた。

以上の結果から、着色ラテックス粒子と蛍光ラテックス粒子の両方を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップおよび着色蛍光シリカ粒子を含有させたコンジュゲートパッドを用いて作製したテストストリップは、検査後のテストストリップを検査結果として長期間保存するのに適していることが分かる。

【図面の簡単な説明】

【0041】

【図 1】図 1 a は本発明のイムノクロマト法用テストストリップの平面図を示し、図 1 b は、a で示されたイムノクロマト法用テストストリップの平面図の縦断面図を示す図である。

【図 2】図 2 は、得られた標識シリカナノ粒子の SEM 写真像を示す図である。

【符号の説明】

【0042】

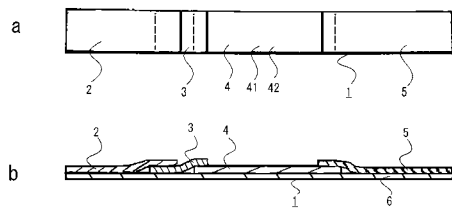
- 1 テストストリップ
- 2 サンプルパッド
- 3 コンジュゲートパッド
- 4 抗体固定化メンブレン
- 5 吸収パッド
- 6 バッキングシート

10

20

30

【図 1】



【図 2】

