

(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  
2013年9月26日(26.09.2013)



(10) 国際公開番号  
WO 2013/141122 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2013/057094
- (22) 国際出願日: 2013年3月13日(13.03.2013)
- (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 2012-066409 2012年3月22日(22.03.2012) JP
- (71) 出願人: 田中貴金属工業株式会社 (TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K.) [JP/JP]; 〒1006422 東京都千代田区丸の内2丁目7番3号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 伊藤 大輔 (ITO Daisuke); 〒2540076 神奈川県平塚市新町2番73号 田中貴金属工業株式会社 技術開発センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 濱田 百合子, 外 (HAMADA Yuriko et al.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目7番13号 虎ノ門イーストビルディング10階 栄光特許事務所 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, 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, 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, PA, 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, 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: IMMUNOCHROMATOGRAPHY DETECTION METHOD

(54) 発明の名称: イムノクロマトグラフィー検出方法

(57) Abstract: The present invention provides an immunochromatography detection method whereby non-specific reactions can be minimized. The present invention relates to an immunochromatography detection method including: a step of adding an analyte diluted solution containing an analyte to a chromatography medium; a step of recognizing the detection target by a labeling substance which has been modified with gold nanoparticles, and which is retained in a dried state by a labeling substance retaining part; a step of developing a complex of the labeling substance and the detection target as the mobile phase; and a step of detecting the detection target in the developed mobile phase, by an assessment part, wherein the immunochromatography detection method is characterized in that the labeling substance is protected by polyalkylene glycol having one or more mercapto groups and/or a derivative thereof, and then retained in a dried state, together with arginine and casein, in the labeling substance retaining part.

(57) 要約: 本発明は、非特異的反応を抑制することができるイムノクロマトグラフィー検出方法を提供する。本発明は、検体を含む検体希釈液をクロマトグラフィー媒体中に添加する工程、標識物質保持部に乾燥保持されている金ナノ粒子により修飾された標識物質により検出対象物を認識させる工程、該標識物質と該検出対象物の複合体を移動相として展開させる工程、および展開された移動相中の該検出対象物を判定部で検出する工程を含むイムノクロマトグラフィー検出方法であって、該標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび/またはその誘導体で保護され、次いでアルギニンおよびカゼインと共に該標識物質保持部に乾燥保持されていることを特徴とするイムノクロマトグラフィー検出方法に関する。



WO 2013/141122 A1

## 明 細 書

発明の名称： イムノクロマトグラフィー検出方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、非特異的反応を抑制する高性能、高感度なイムノクロマトグラフィー検出方法に関する。また、本発明は、非特異的反応を抑制して、迅速、簡便に正確に試料中の検出対象物を検査／測定ができる検出キットに関するものである。

[0002] さらに詳しくは、本発明は、金属ナノ粒子で標識した検出対象物（被検出物質）を検出するための標識物質、即ち、検出対象物に特異的に結合する物質で金属コロイド粒子を感作した感作金属コロイドを、乾燥処理に対してまた乾燥状態において保護安定化し、かつ、非特異的反応を抑制して、迅速、簡便、正確に試料中の検出対象物を検査する方法に関する。

### 背景技術

[0003] 近年、検出試料の前処理を行う必要の無い、免疫クロマトグラフィー用ストリップ形式のイムノアッセイは、抗体の持つ特異的反応性を利用して、試料液中の抗原を検出する簡便な体外診断キットもしくは携帯用診断装置として重要性が高まっている。特に、ウィルスまたは細菌等の病原体検査キットは、一般の病院またはクリニックでも汎用されている身近な免疫クロマトグラフィー装置である。

[0004] 免疫クロマトグラフィー装置の最も簡単な構造としては、試料添加部位、標識物質保持部、判定（検出）部位、免疫クロマトグラフィー用多孔質担体、および試料吸収部位が相互に繋がった構造である。標識物質保持部は、検出対象物を検出するための金属ナノ粒子で標識した標識物質（以下、コンジュゲートともいう）を保護安定化溶液で処理した後、免疫クロマトグラフィー用多孔質担体に含浸または塗布し、次いで通気乾燥、真空乾燥または凍結乾燥などを行うことにより、製造されている。

[0005] そして、保護安定化溶液としては、従来から、牛血清アルブミン（BSA

)などの蛋白質を保護安定化剤として含むものがよく知られているが、乾燥状態で長期間に亘って安定に維持できないという問題があったため、更なる改良、研究がなされてきた。例えば、カゼイン、ホエイ蛋白、カゼイン分解物を含むものが報告されている（特許文献1参照）。

[0006] また、各種イムノアッセイにおける標識抗体の保護安定化として、金コロイドに生体分子（例えば、抗体等）を添加した後、チオールおよび／またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコールを含むことにより、コンジュゲートを保護安定化する（即ち、粒子の凝集を最小にし、かつ吸着可能な自由表面を飽和させる）技術が知られている（特許文献2参照）。

[0007] さらに、トレハロースといった糖類20～80%および緩衝液0.5～2mol/Lからなる保護安定化溶液が、固相免疫試薬を乾燥状態で長期間安定に保存できるものとして提案されている（特許文献3参照）。

[0008] また、感作金属コロイド含有凍結乾燥物の安定化を改善するために、感作金属コロイド含有溶液の凍結乾燥に際して、トレハロース、グルタミン酸-アルギニン、トリプトファン、塩化Ca等々の1種以上を含む技術が公知である（特許文献4参照）。

[0009] さらに、水溶液中で保存されているタンパク質、特に酵素等の保存安定性に優れ、3ヶ月保存後の、診断正確度の低下が少ない体外診断薬組成物として、グアニジン（その塩）、またはこれに更にアルギニン（その塩、またはその誘導体）を安定化剤として含むことにより、水溶液中でのタンパク質の凝集や加水分解等を起こすという問題点を解決できることが報告されている（特許文献5参照）。

[0010] 一方で、従来から免疫クロマトグラフィー装置において、バックグラウンド着色（判定部の固定相抗体以外の部分の着色）、ブランク発色（検出物質が存在しない場合での固定化相の発色、）およびプロゾーン現象（大過剰の被験物質を試料とした時に、見かけ上被験物質が少ないような偽陰性現象）が、検出時のSN比を下げるだけでなく、誤動作の原因にもなるため問題視

されている。

[0011] バックグラウンド着色は、可視化された移動相抗体と多孔質担体との疎水的な結合が原因であり、また、ブランク発色は、負電荷を帯びた移動相抗体と正電荷を帯びた固定相担体との電氣的相互作用が原因であり、非特異発色とも言われる。さらに、プロゾン現象は、標識物質と反応できなかった過剰の被験物質が判定部位と反応し、金属粒子で標識した被験物質を検出するための標識物質が判定部位と反応できなくなるのが原因とされている。

[0012] この対策として、種々の観点からの研究が多々なされている。例えば、pH緩衝剤などを含む展開液を用いる免疫クロマトグラフィー検出方法において、生物学的親和性に基づく副反応を抑制したり、非特異反応を抑制するために種々の添加剤を使用しており、例えば、抗原抗体反応の促進または非特異反応の抑制のための蛋白質（例えば、牛血清アルブミン、カゼインおよびゼラチン等）、高分子化合物（例えば、ポリエチレングリコール、デキストラン、メチルセルロースおよびポリビニルピロリドン等）、非イオン性界面活性剤（例えば、ツイーン20およびトリトンX-100等）、イオン性界面活性剤またはポリアニオン（例えば、デキストラン硫酸、ヘパリン、ポリスチレンスルホン酸、ヒアルロン酸およびコンドロイチン硫酸等）若しくはその塩等が、添加剤として挙げられている（特許文献6参照）。

[0013] また、被験物質を塩基性アミノ酸（例えば、アルギニン、リジン等）またはアミノ糖（例えば、グルコサミン等）を含む移動相で展開する免疫クロマトグラフィー分析法（特許文献7参照）、ならびに、アルギニン濃度が0.02~1.5Mで、pHが7.0~9.5で、アルギニン以外に緩衝剤を実質的に含まないアッセイ用媒体を用いるメンブランアッセイ法（特許文献8参照）が知られている。

[0014] さらに、バックグラウンド着色およびブランク発色などの対策、さらに生物学的親和性に基づく副反応を抑制したり、非特異反応を抑制したり、さらには、標識抗体といったコンジュゲートを安定化したりするために蛋白質（例えば、牛血清アルブミン、ゼラチン、カゼイン、ホエイ蛋白、カゼイン分

解物を含有するもの等)、高分子化合物(例えば、チオールおよび/またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコール等)、塩基性アミノ酸(例えば、アルギニン等)などが挙げられている。

[0015] しかし、非特異反応は抑制されても、検出感度が低下してしまったりといった問題点が生じたりして、未だ十分に目的が達成されたとは言えず、依然として非特異反応を十分に抑制できないという同様な問題があった。

## 先行技術文献

### 特許文献

- [0016] 特許文献1：日本国特開平9-80051号公報  
特許文献2：日本国特開平10-73594号公報  
特許文献3：日本国特開平2003-215127号公報  
特許文献4：日本国特開平11-125635号公報  
特許文献5：日本国特開2011-196996号公報  
特許文献6：日本国特開2007-322310号公報  
特許文献7：日本国特開2001-289852号公報  
特許文献8：日本国特開2007-114049号公報

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0017] 本発明者らは、上記の高分子化合物(例えば、チオールおよび/またはジスルフィド基で置換されたポリエチレングリコール等)に着目して実験を行なった結果、試料中の被験物質をイムノクロマトグラフィー法により検出する際、ブランク発色や非特異反応が依然として起こることを観察している。そのため、標識物質保持部に乾燥保持されているコンジュゲートを長期に亘って保護安定化させ、かつ、非特異反応を十分に抑制して、検出感度の向上を達成するという課題が依然としてある。

[0018] 本発明は、従来技術に比して、標識物質を保護安定化し、かつ非特異反応を抑制する高性能、高感度なイムノクロマトグラフィー検出方法を提供する

ことにある。また、本発明は、従来技術に比して、標識物質を保護安定化し、かつ非特異的反応を抑制して、迅速、簡便および高精度に検査ができるイムノクロマトグラフィー検出キットを提供することを目的とする。本発明は、例えば、ウィルスや細菌等の病原体と特異的に反応して迅速、簡便な病原体の感染検査ができる免疫クロマトグラフィー装置を提供することを目的とする。

[0019] さらに、本発明は、試料を検体希釈液により測定に適した濃度に調整または希釈した検体をこの検出キットの試料添加部に供給し、標識物質保持部に乾燥保持された標識物質と共に移動相として展開し、展開された移動相中の検出対象物を判定部で検出するにおいて、非特異的反応を抑制して、迅速、簡便、高精度に検査ができる検出キットを提供することを目的とする。

[0020] 本発明は、例えば、鼻汁または痰を検体希釈液により調整または希釈したものを前記検出キットの試料添加部に供給することによって、迅速、簡便および高精度に病原体の感染検査ができる検出キットを提供することを目的とする。

[0021] また、本発明は、非特異的反応を抑制して、試料中の検出対象物をイムノクロマトグラフィー法により検出する方法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

[0022] 本発明者らは、イムノクロマトグラフィー装置に標識物質保持部を設けるに際し、標識物質をメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび/またはその誘導体で保護し、次いでアルギニンおよびカゼインと共に標識物質保持部に乾燥保持させることにより、標識物質を、乾燥処理から保護すると共に、長期間に亘って乾燥状態で安定的に保持できることを見出し、本発明を完成させた。

[0023] すなわち、本発明は以下の通りである。

1. 検体を含む検体希釈液をクロマトグラフィー媒体中に添加する工程、標識物質保持部に乾燥保持されている金ナノ粒子により修飾された標識物質により検出対象物を認識させる工程、該標識物質と該検出対象物の複合体を移

動相として展開させる工程、および展開された移動相中の該検出対象物を判定部で検出する工程を含むイムノクロマトグラフィー検出方法であって、

該標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体で保護され、次いでアルギニンおよびカゼインと共に該標識物質保持部に乾燥保持されていることを特徴とするイムノクロマトグラフィー検出方法。

2. 前記メルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体が、メルカプト基を1以上有する分子量が1000～3000のポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体であることを特徴とする前項1に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

3. 前記標識物質が前記メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体を含む溶液中で保護処理されており、該標識物質を保護処理した後の溶液中の該ポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体の濃度が0.0001～0.05質量%であることを特徴とする前項2に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

4. 前記アルギニンおよびカゼインが、標識物質溶液中に含有されて前記クロマトグラフィー媒体に湿潤されることにより該標識物質保持部に乾燥保持されており、該クロマトグラフィー媒体に湿潤される前の該標識物質溶液中の終濃度として、アルギニンの濃度が0.01～2質量%であり、カゼインの濃度が0.1～10質量%であることを特徴とする前項1～3のいずれか1に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

5. 前記金ナノ粒子が、平均粒径が30～100nmの赤色金ナノ粒子または平均粒径が20～200nmの青色金ナノ粒子であることを特徴とする前項1～4のいずれか1に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

6. 前記検体が、鼻汁、鼻腔拭い液、咽頭拭い液または痰であることを特徴とする前項1～5のいずれか1に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

7. 前記検体希釈液にグアニジンを含むことを特徴とする前項1～6のいずれか1に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

8. 前記検体希釈液中のグアニジンの濃度が1～200 mMであることを特徴とする前項7に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

9. 試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体部、検出部および吸収部から実質的に順次構成され、該標識物質保持部が該試料添加部の端部と該検出部との間の領域部に設けられており、且つ標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体により保護され、アルギニンおよびカゼインと共に該標識物質保持部に乾燥保持されていることを特徴とするイムノクロマトグラフィー装置。

10. 試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体部、検出部および吸収部から実質的に順次構成され、試料添加部の端部と検出部との間の領域部に該標識物質保持部が設けられており、且つ標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体により保護し、アルギニンおよびカゼインと共に該標識物質保持部に乾燥保持されているイムノクロマトグラフィー装置を含むことを特徴とする検出キット。

### 発明の効果

[0024] 本発明のイムノクロマトグラフィー検出方法は、イムノクロマトグラフィー装置に標識物質保持部を設けるに際し、検出対象物を検出するための金属ナノ粒子で標識された標識物質をメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／または誘導体により保護し、アルギニンおよびカゼインと共に標識物質保持部に乾燥保持させる。このことにより、検出対象物に特異的に結合する物質で該金属コロイド粒子を感作した感作金属コロイドを、乾燥処理から保護すると共に長期間に亘って乾燥状態で該標識物質保持部に安定的に保持することができる。

[0025] したがって、本発明のイムノクロマトグラフィー検出方法によれば、試料中の検出対象物（例えば、抗原など）を検出する際に、その安定化または非特異反応の抑制機構の原理の詳細は不明であるが、メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／または誘導体、並びにアルギニンおよびカゼインの三者が三位一体となって、協同作用して、非特異反応を顕著に

抑制することができる。さらには、感度の低下が無く、正確に結果の判定が可能である。

[0026] 例えば、検体として用いる咽頭拭い液中のウイルス等を検出する際に、感度の低下がなく、しかも、非特異反応を顕著に抑制するため、正確に感染の有無検査等の結果の判定が可能である。

[0027] 本発明のイムノクロマトグラフィー用検査キットは、病原菌の有無検査に有効であり、特に特定ウイルスの有無検査が迅速かつ正確に可能であることにより、的確な治療措置を行なうことが出来るため、医療現場において好適に用いられる。

### 図面の簡単な説明

[0028] [図1]図1は、イムノクロマトグラフィー装置の試験片の概略図である。

### 発明を実施するための形態

[0029] 以下、本発明を詳細に説明する。

本発明は、検体希釈液をクロマトグラフィー媒体中に添加する工程、標識物質保持部に乾燥保持されている金ナノ粒子により修飾された標識物質により該検出対象物を認識させる工程、該標識物質と該検出対象物の複合体を移動相として展開させる工程、および展開された移動相中の該検出対象物を判定部で検出する工程を含むイムノクロマトグラフィー検出方法であって、該標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体で保護され、次いでアルギニンおよびカゼインと共に該標識物質保持部に乾燥保持されていることを特徴とするイムノクロマトグラフィー検出方法である。

[0030] 前記標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体で保護され、次いでアルギニンおよびカゼインと共に標識物質保持部に乾燥保持されていることにより、検出対象物に特異的に結合する物質（例えば、抗体、抗原、酵素、ペプチド等々の生体分子）で金属コロイド粒子を感作した感作金属コロイドを、乾燥処理から安定的に保護すると共に長期間に亘って乾燥状態で標識物質保持部に安定的に保持するこ

とができる。

[0031] その作用機序は不明ではあるが、メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体、並びにアルギニンおよびカゼインの三者は、共働して標識物質における金属粒子の自由表面に複合吸着することにより被覆飽和させて、非特異的反応を惹起するような吸着の可能性を顕著に消失させ、かつ、金属粒子の凝集を最低に保持する作用を果たすと想定される。

[0032] また、移動相抗体と多孔質担体との疎水結合や移動相抗体と固定相担体との電氣的相互作用を、アルギニン、メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体およびカゼインの相互作用によって高度に打ち消す作用をすることが想定される。

[0033] さらに検出対象物や標識化した検出試薬の安定化、並びに検出対象物と標識抗体との反応による複合体の安定化が、メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体、アルギニンおよびカゼインの相乗作用によってなされると同時にそれらの移動相としての移動をスムーズにする作用を果たすと想定される。

[0034] これらの作用により、本発明のイムノクロマトグラフィー検出方法は、非特異反応を極めて顕著に抑制して、試料中の検出対象物を特異的に高感度かつ迅速に検出／測定することが高精度に出来ると考えられる。

[0035] 本発明に用いるポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体は、好ましくは分子量1000～30000、より好ましくは分子量2000～20000のメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体であることが好ましい。

[0036] 前記メルカプト基を1以上有するという部分としては、例えば、モノメルカプトおよびジメルカプトが挙げられる。分枝構造を採る場合としては、例えば、トリメルカプトおよびテトラメルカプトが挙げられる。

[0037] 前記アルキレングリコールおよび／またはその誘導体部分としては、例えば、ポリエチレングリコール（「PEG」という）、ポリプロピレングリコ

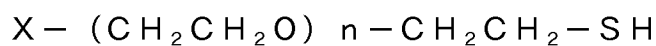
ール（「PPG」という）、ポリブチレングリコール（「PBG」という）のような単独重合体、並びにエチレングリコール（「EG」という）セグメント、プロピレングリコール（「PG」という）セグメントの任意の構成割合からなる、例えば、EG、PGおよびBGの混在するランダムまたはPEG、PPGおよびPBGブロックの混在するブロック共重合体が挙げられる。

[0038] 例えば、HS-PEG、HS-PEG-SH、HS-PPG、HS-PPG-SHSH-PBG、HS-PBG-HS、HS-PEG-PPG、HS-PEG-PPG-HS、HS-PEG-PBG-HS、HS-PEG-PPG-PBG-HSなどの各種EG、PG、BGなどをランダムに、またはブロックとして任意に含むポリマーが挙げられる。

[0039] ポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体部分の範疇に属する特に本発明の実施に有用な重合体は、ポリエチレングリコール（PEG）である。その分子量としては、例えば、分子量1000～30000の範囲のもの、具体的な分子量の例は、1500、5000、8000、15000、18000、25000というような任意の分子量のものが使用できる。実際には、その正確な数値の分子量を入手することが困難であるから、その分子量の前後のもの入手して使用すれば足りる。

[0040] いずれにせよ、メルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体の範疇に属するものであることが必須の要件である。そして、メルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールまたはその誘導体は、これらの混合物であっても使用可能である。

[0041] 本発明のイムノクロマトグラフィー用の標識物質の保護に最も好適に用いられる分子量1000～30000のメルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール（PEG）および／またはその誘導体は、一般式



（ここで、Xは、HS-、保護されていてもよいHO-、アルキル-O-を、nは、15～540の整数を表わす。）で表わされる。その誘導体とし

ては、例えば、末端基であるOHおよびSHの保護基または誘導体が挙げられる。例えば、OHの場合には、ペプチド合成の分野で汎用されている保護基、p-トルエンスルホニル基およびカルボニル基等が挙げられ、アルキル基が好ましく、特にメチル基が好ましい。

[0042] 具体的なメルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体としては、例えば、モノメルカプトポリエチレングリコール、ジメルカプトポリエチレングリコールが挙げられる。分枝構造を採る場合としては、例えば、トリメルカプトポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体が挙げられる。

[0043] 本発明のメルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール(PEG)および／またはその誘導体としては、市販されている分子量のもの(分子量が1000~3000)を入手して使用することができる。

[0044] メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール(PEG)および／またはその誘導体の特に好ましい分子量は2000~20000である。例えば、メトキシーPEG-チオール2000、チオール-PEG-チオール3400、メトキシーPEG-チオール5000、メトキシーPEG-チオール20000等が挙げられる。

[0045] メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール(PEG)および／またはその誘導体の分子量が2000以上であることにより、標識物質に対するPEG修飾が十分であっても、乾燥に対する安定性や保護機能が十分に発揮できなくなるのを防止することができる。また、非特異反応の抑制を向上することができる。

[0046] また、メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール(PEG)および／またはその誘導体の分子量を2000以下とすることにより、標識物質に対するPEG修飾が均一かつ十分となり、その結果、乾燥に対する安定性や保護機能を均一かつ十分に発揮することができる。また、非特異反応の抑制を向上することができる。

[0047] 分子量が1000~3000の範囲内であると、比較的高純度のものと

して入手できるばかりでなく、標識物質に対するPEG修飾が十分になされ、乾燥に対する安定性や保護機能が十分に発揮され、かつ、非特異反応の抑制も十分になされるため好ましい。

[0048] 分子量が1000～30000のメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールまたはその誘導体を使用することを必須としながらも、場合によっては、例えば、分子量が3000のPEGと8000のPEGというような、分子量が相違する二種類のメルカプト基含有ポリアルキレングリコールまたはその誘導体を任意の割合でポリマーブレンドしたのも使用できる。

[0049] 同様に、メルカプト基の観点から吟味すれば、メルカプト基を1個有するポリアルキレングリコールまたはその誘導体と2個有するポリアルキレングリコールまたはその誘導体を任意の割合でポリマーブレンドしたのも、例えば、「HS-PEGとHS-PEG-SH」の混合物のようなものが挙げられる。

[0050] さらに、メルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールまたはその誘導体20～99質量%程度とメルカプト基を有しないポリアルキレングリコール1～80質量%程度のポリマーブレンドのものも、例えば、「HS-PEGとPEG」の混合物のようなものが挙げられる。このポリマーブレンドの場合には、メルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールの機能を低下させないようにブレンド量の調整に注意を要する。

[0051] ブレンドポリマーにおける分子量が相違する二種類のメルカプト基含有ポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体の例としては、チオール-PEG-チオール3400とメトキシ-PEG-チオール5000の混合物からなる仕様のもを用いることが可能である。

[0052] メルカプト基を1個以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体、特に代表的なメルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／または誘導体を、検出対象物に特異的に反応する試薬成分（例えば、抗体など）を金ナノ粒子により修飾した標識物質に用いる濃度として

は、メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール誘導体により標識物質を保護処理した後の溶液中のメルカプト基を1個以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体の濃度が、0.0001～0.05質量%であることが好ましく、0.0005～0.01質量%であることがより好ましい。例えば、水中0.001質量%濃度の分子量5000のメトキシPEG-チオールを用いることができる。

[0053] 前記溶液中のメルカプト基を1個以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体の濃度を0.0001質量%未満とすることにより、乾燥に対する安定性や保護機能が十分となり、かつブランク発色や非特異的の反応を抑制することができ正確な判定を行うことができる。0.05質量%以下とすることにより、標識物質粒子が凝集するのを抑制し、必要十分な濃度となり経済的である。

[0054] 本発明に用いるアルギニンとは、5-グアニジノ-2-アミノペンタン酸とも呼称される、天然に存在するアミノ酸類である。アルギニンとしては、L-アルギニン ( $C_6H_{14}N_4O_2$ ) が好ましい。

[0055] アルギニンは標識物質溶液中に含有させてクロマトグラフィー媒体に湿潤させることにより標識物質保持部に乾燥保持させることが好ましい。該クロマトグラフィー媒体に湿潤させる前の標識物質溶液中のアルギニンの終濃度は、液中0.01～2質量%であることが好ましく、より好ましくは0.02～0.5質量%である。例えば、0.1質量%のL-アルギニン水溶液が好ましく用いられる。

[0056] 前記アルギニンの終濃度を0.01質量%以上とすることにより、乾燥に対する安定性や保護機能が十分となり、かつブランク発色や非特異的の反応を抑制して正確な判定を行うことができる。2質量%以下とすることにより、必要十分な濃度となり経済的である。

[0057] カゼインとは、牛乳やチーズに含まれる天然に存在するリンタンパク類の一種である。本発明に用いるカゼインとしては、例えば、カゼインそのもの、およびカゼインを主成分として含有するスキムミルクが挙げられる。

- [0058] カゼインは標識物質溶液中に含有させてクロマトグラフィー媒体に湿潤させることにより標識物質保持部に乾燥保持させることが好ましい。該クロマトグラフィー媒体に湿潤させる前の標識物質溶液中のカゼインの終濃度は、液中0.1～10質量%の濃度であることが好ましく、より好ましくは0.2～5質量%の濃度である。例えば、1質量%のカゼインを含む緩衝液が好ましく用いられる。
- [0059] 前記カゼインの終濃度を0.1質量%以上とすることにより、十分な作用効果が奏される。10質量%以下とすることにより、必要十分な濃度となり経済的である。
- [0060] メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール誘導体により保護された標識物質の水溶液（「A」と略す）に、アルギニンの水溶液（「B」と略す）およびカゼインの水溶液（「C」と略す）を、上記のような濃度となるように適宜組み合わせることで調合することが好ましい。BおよびCの各濃度は、0.01～2質量%および0.1～10質量%であることが好ましく、より好ましくは0.05～1質量%および0.5～5質量%である。
- [0061] 本発明では、検体希釈液中にグアニジンまたはその塩を含有させることが好ましい。グアニジンの塩としては、無機塩または有機塩であってよく、例えば、塩酸塩、硫酸塩、リン酸塩、酢酸塩、酒石酸塩、リンゴ酸塩、クエン酸塩が挙げられる。グアニジンまたはその塩の濃度は、検体希釈液中1～200mMであることが好ましく、より好ましくは2～100mMであり、さらに好ましくは5～50mMである。
- [0062] 検体希釈液として、例えば、20mMのグアニジン塩酸塩を含む緩衝液が好ましく用いられる。検体希釈液中のグアニジンまたはその塩の濃度を1mM以上とすることにより、十分な作用効果を達成することができる。200mM以下とすることにより、必要十分な濃度となり経済的である。
- [0063] 本発明に使用する、金ナノ粒子は、平均粒径が30～100nmの赤色金ナノ粒子、および／または平均粒径が20～200nmの青色金ナノ粒子であることが好ましい。勿論、白金、銀、ゲルマニウム、ロジウム若しくはパ

ラジウムなどの貴金属粒子、チタン、鉄または亜鉛などの平均粒径が好ましくは10～250nm、より好ましくは35～120nm程度の金ナノ金属粒子も使用できる。

[0064] 金ナノ粒子は、診断精度の面で最も推奨されるが、金を主体とする金と白金のような金属の混合物も使用することができる。さらには、ある特殊な診断の為に、金属ナノ粒子をできるだけ同一形状にする、例えば真球状にするとか、各粒子の粒径をできるだけ均一そろえるという工夫をすることもできる。

[0065] 前記金属ナノ粒子は分散状態としてもよく、例えば、抗体、抗原による感作金属コロイド、感作金コロイド、感作白金-金コロイド、感作金-銀コロイドまたは鉄コロイドなど挙げられるが、金コロイドが取り扱いが容易であり、測定の精度などから推奨される。コロイド金標識増感剤の併用も診断の測定感度を向上させる為に推奨される。

[0066] 診断の目的が、高感度、高精度が求められるような特殊な場合には、金コロイドの例で言えば、コロイドの粒子の形状を同じ形のもの、例えば真球状にしたものを多くするとか、コロイド粒子の粒径を均一にすること、例えば、40nm、80nm、または120nmというような、特定な粒径の一点に集中させるという、いわゆる粒度分布曲線を狭くしたコロイドにするという工夫をすることも可能である。

[0067] さらに、金属コロイドの発色性を調和する為に、金の粒子状態およびその集まりにより色彩が異なるので、可視光線の領域における特有の色彩を有する、例えば、赤色金ナノ粒子コロイドと青色金ナノ粒子コロイドを任意の割合で配合することにより、所定の色彩を有する金ナノ粒子コロイドを調製することも可能である。

[0068] 判定の際には、色彩を調節して、より鮮明な色彩表示を工夫することにより、判定の精度を向上させることも可能であり、例えば赤（波長770～640nm）緑（波長490～430nm）青（490～430nm）の光の三原色を適宜組み合わせる要領である。いずれの金属ナノ粒子コロイドも、

製品として市場から容易に入手できる。

[0069] なお、平均粒径は、コロイドの粒度分布を動的光散乱法粒度分布計で測定した後の平均粒径を求めるといった各種慣用の測定法に基づいて決めることができる。

[0070] 本発明に用いる標識物質溶液または検体希釈液等を含む試薬組成物は、緩衝剤または界面活性剤、特に、非イオン界面活性剤を含有することが好ましい。

[0071] 前記緩衝剤としては、試料の添加または試料の蒸発や希釈による濃度の変化、外部からの多少の異物の混入によっても致命的な影響を生じない作用（緩衝作用）を持つものであれば特に制限はない。

[0072] 前記緩衝剤としては、例えば、酢酸緩衝液（酢酸＋酢酸ナトリウム）、リン酸緩衝液（リン酸＋リン酸ナトリウム）、クエン酸緩衝液（クエン酸＋クエン酸ナトリウム）、ホウ酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液（トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン＋塩酸）、T E 緩衝液（トリス＋エチレンジアミン四酢酸）、T A E 緩衝液（トリス＋酢酸＋エチレンジアミン四酢酸）、T B E 緩衝液（トリス＋ホウ酸＋エチレンジアミン四酢酸）およびH E P E S 緩衝液（2- [4- (2-ヒドロキシエチル) -1-ピペラジニル] エタン sulfonic acid）が挙げられる。好ましくは、H E P E S 緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液またはトリス塩酸緩衝液であり、より好ましくは、H E P E S 緩衝液である。また、悪影響を及ぼさない範囲内においてその他の緩衝剤を配合して使用することもできる。

[0073] 前記非イオン性界面活性剤としては、例えば、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレン／ポリオキシプロピレンアルキルエーテル（日油（株）製、商品名：ノニオン（登録商標）MN811、ナカライテスク社製、商品名：NP-40）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（商品名「Tween」シリーズ）、ポリオキシエチレンp-t-オクチルフェニルエーテル（商品名「Triton」シリーズ）、ポリオキシエチレンp-t-ノニルフェニルエーテル（商品名「Triton N」シリー

ズ)、アルキルポリグルコシド、脂肪酸ジエタノールアミドおよびアルキルモノグリセリルエーテルが挙げられる。非イオン性界面活性剤は、単独でも2種以上を混合しても用いることができる。

[0074] 本発明に用いる各種試薬組成物には、生物学的親和性に基づく副反応を抑制したり、非特異的反応を抑制することが公知の添加剤を含有してもよい。添加剤としては、例えば、抗原抗体反応の促進または非特異的反応を抑制するための蛋白質(例えば、牛血清アルブミンおよびゼラチン等)、高分子化合物(例えば、ポリエチレングリコール、メチルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリビニルアルコールおよびデキストラン等)、イオン性界面活性剤またはポリアニオン(例えば、デキストラン硫酸、ヘパリン、ポリスチレンスルホン酸およびコンドロイチン硫酸等)および抗菌剤が挙げられる。これらは1種もしくは2種以上を添加して使用してもよい。

[0075] また、前記抗原抗体反応の促進または非特異的反応を抑制するための蛋白質、高分子化合物、イオン性界面活性剤またはポリアニオン、および抗菌剤等々の1種もしくは2種以上を、固定相を構成するクロマトグラフィー媒体上の、移動相の移動経路上に保持させておくことも可能かつ有効であって、何ら妨げるものではない。

[0076] 前記標識物質溶液を固相中に保持させるに際し、保護安定化物質または溶解促進物質を標識物質溶液中に含有させてもよい。保護安定化物質または溶解促進物質としては、例えば、糖類、即ち、単糖類、二糖類、三糖類、オリゴ糖または多糖類が挙げられる。単糖類としては、例えば、グルコース、ガラクトース、キシロースおよびフラクトース等が挙げられる。二糖類としては、例えば、トレハロース、シュークロース、ラクトース、マルトース等が、三糖類やオリゴ糖としては、ラフィノース等が挙げられる。多糖類としては、例えば、グルコン酸およびデキストラン等が挙げられる。これらは、1種または2種以上を混合して用いても何ら差支えない。

[0077] また、本発明において、標識物質保持部をイムノクロマトグラフィー装置の領域部内に設けるには、具体的には、例えば、標識物質を分子量1000

～30000のメルカプト基を1以上有するアルキレングリコールおよび／またはその誘導體（保護試薬）により保護処理された溶液と、アルギニンおよびカゼイン（安定化試薬）を混合することにより、標識物質を保護安定化する試薬（標識物質保護安定化試薬含有組成物）を含有する組成物を調製し、該組成物を試料添加部の端部と判定部との間の領域内に塗布、吸着もしくは含浸させて後、乾燥させることによって標識物質保持部に担持または保持もしくは形成させることができる。

[0078] 前記標識物質保護安定化試薬含有組成物を調製するに際して、保護処理された標識物質溶液と混合する試薬の添加順序としては、どの安定化試薬を最初に混合し、又、どの安定化試薬を最後に混合するかは、標識物質保護安定化試薬含有組成物の状態を考慮して、任意に決めることができるものであり、設計事項の範囲内である。

[0079] 例えば、標識物質にまず分子量1000～30000のメルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導體を添加し、次いでこれにアルギニンまたはカゼインを一者ずつ順次加えていってもよい。

[0080] あるいは、標識物質にまず該ポリエチレングリコールおよび／またはその誘導體を添加し、次いでこれにアルギニンおよびカゼインの二者混合物を加えてもよい。もしくはアルギニンおよびカゼインの二者混合物（添加順不同）の溶液へ、標識物質に該ポリエチレングリコール誘導體を加えた溶液を加えてもよい。

[0081] 加えるにあたっては、均一に加えられるのであれば少量ずつ連続的に加えてもまたは間欠的に加えてもよいし、一度に加えてもよく、加える量に応じて適宜なし得る設計事項の範囲内である。標識物質保持部の大きさ（幅）、濃度などはその性能を考慮して、任意に決めることができるものであり、設計事項の範囲内である。

[0082] 本発明に用いる標識物質溶液またはその他の試薬組成物を含む部位をイムノクロマトグラフィー装置に設ける方法としては、例えば、イムノクロマトグラフィー装置におけるグラスファイバーパッド（標識物質保持部材）中へ

イムノクロマトグラフィー用標識物質溶液を塗布または含浸させた後、乾燥させる方法（例えば、通気乾燥、真空乾燥、自然乾燥および凍結乾燥）により、グラスファイバーパッド中へ担持または保持させる方法が挙げられる。

[0083] 本発明に用いる検体希釈液は、展開液または試料希釈液としても使用することができるものである。検体希釈液としては、通常、溶媒として水を用い、これに緩衝液、塩、および非イオン界面活性剤、さらに、前記抗原抗体反応の促進若しくは非特異的反応を抑制するための蛋白質、高分子化合物（例えば、PVP等）、イオン性界面活性剤またはポリアニオン、または抗菌剤、キレート剤等々の1種もしくは2種以上を加える。加える順序は特に特定されず、同時に加えても差支えない。

[0084] 検体希釈液を展開液として用いる場合には、検体と展開液を予め混合したものを、サンプルパッド（試料添加部）上に供給・滴下して展開させることもできるし、先に検体をサンプルパッド（試料添加部）上に供給・滴下した後、展開液をサンプルパッド（試料添加部）上に供給・滴下して展開させてもよい。

[0085] 検体希釈液を試料希釈液として使用する場合には、検体を測定に適した濃度に調整する或いは希釈する希釈液は、そのまま展開液としてサンプルパッド（試料添加部）上に供給・滴下することにより使用できる。

[0086] 本発明における検体（検出対象物を含む試料）としては、例えば、主として生体試料、即ち、血液、血清、血漿、尿、唾液、髄液、汗、涙、羊水、乳頭分泌液、鼻汁、痰、鼻腔、咽頭拭い液、皮膚からの浸出液、組織、細胞および糞便からの抽出物が挙げられる。

[0087] 本発明における検出対象物は、それと特異的に結合する、例えば、抗原-抗体反応のように特異的に結合する物質が存在するもしくは製造できるものであればよく、特に限定されない。検出対象物が完全抗原といったそれ自体が抗原性を有するものであっても、もしくはハプテン（不完全抗原）といったそれ自体が抗原性を有しなくても化学的変成物とすることにより抗原性を持つに至るものであってもよい。これらの検出対象物と特異的に結合する物

質が存在するもしくは製造できるものであればよく、モノクローナル抗体若しくはポリクローナル抗体とすることができる。

[0088] 本発明における検出対象物としては、例えば、ペプチドホルモン（成長ホルモン（GH）、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、メラミン細胞刺激ホルモン（MSH）、プロラクチン、甲状腺刺激ホルモン（TSH）、黄体形成ホルモン（LH）、卵胞刺激ホルモン（FSH）、下垂体ホルモン、カルシウム代謝調節ホルモン、睨ホルモン、消化管ホルモン、血管作用ホルモン、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）、エストロン等の卵胞ホルモン、プロゲステロン等の天然または合成黄体ホルモン、テストステロン等の男性ホルモン、コルチゾール等の副腎皮質ホルモン、ジヨードサイロニン等の甲状腺ホルモン類等のホルモン、前立腺性酸性フォスファターゼ（PAP）、前立腺特異抗原（PSA）、アルカリ性フォスファターゼ、トランスアミナーゼ、トリプシン、ペプシノーゲン、 $\alpha$ -フェトプロテイン（AFP）、ガン胎児性抗原（CEA）等のガン特異物質、免疫グロブリンG（IgG）等の血清蛋白成分、リュウマチ因子、セロトニン、ウロキナーゼ、フェリチン、サブスタンP、便潜血、梅毒抗体、インフルエンザウィルス、アデノウィルス、ロタウィルス、マイコプラズマ、HBs抗原、HBs抗体、クラミジア抗原、A群 $\beta$ 溶連菌抗原、コレステロール、胆汁酸、強心性ステロイド、サポゲニン等のその他のステロイド類、エピネフリン、ドーパミン、生理活性アルカロイド類、アミノ基含有向精神薬類、TRH等の低分子ペプチド類、プロスタグランジン類、ビタミン類、ペニシリン等の抗生物質類、その他生体内成分、生体内投与薬物およびその代謝産物等が挙げられる。

[0089] これらの中でも、特にウィルスまたは細菌等の病原体が好ましく、より好ましくはインフルエンザウィルス、アデノウィルス、ロタウィルス、マイコプラズマである。この場合、検体（検出対象物を含む試料）としては、例えば、鼻汁、痰、鼻腔および咽頭拭い液が挙げられる。

[0090] 検体として咽頭拭い液を用いた場合は、検体希釈液を用いて咽頭拭い液を希釈した後に、イムノクロマトグラフィー装置におけるサンプルパッド上に

供給／滴下する。本発明のイムノクロマトグラフィー用検査キットは、病原菌の有無検査に有効であり、特に特定ウィルスの有無検査の結果により迅速で正確な治療措置を行なうことができる。

[0091] 鼻汁、痰、鼻腔または咽頭拭い液等の生体試料中に存在するウィルス等の有無を検査するためのイムノクロマトグラフィー装置は、その構造およびその動作・検出手法は公知である。

[0092] 生体試料（検体）を含む本発明の検体希釈液を従来のイムノクロマトグラフィー装置のサンプルパッド中へ供給／滴下し、本発明の標識物質溶液を担持させた、例えば、含浸後、乾燥させたイムノクロマトグラフィー装置を用いて、特異的に結合する反応、例えば、抗原抗体反応により試料中の検出対象物、例えば、咽頭拭い液中のインフルエンザウィルス等の同定・定量等の検査をすることができる。

[0093] イムノクロマトグラフィー装置および仕様について、以下に説明をする。イムノクロマトグラフィー装置は、試料添加部（１）（サンプルパッド）、標識物質保持部（２）、クロマトグラフィー媒体部（３）、検出部（４）、吸収部（５）、およびバックグシート（６）から構成されている。それらの各部位の構造、仕様および態様は以下のとおりである。

[0094] １）試料添加部（１）（サンプルパッド）は、図１を参考にすると、試料が迅速に吸収されるが、保持力は弱く、速やかに反応部へと試料が移動していくような性質の多孔質シートで構成されている。多孔質シートとしては、例えば、セルロース濾紙、ガラスファイバー濾紙、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロンおよび綿布が挙げられる。これらの中でも、ガラスファイバー濾紙が好ましい。

[0095] 本発明においては、非特異的反応を抑制するために、試料添加部（１）中に、緩衝液および非イオン界面活性剤等々を含むイムノクロマトグラフィー用試薬組成物を予め含浸させて後、乾燥させる等の手段により担持させる態様とすることができる。例えば、トリス塩酸緩衝液および片末端にアルキル基を持つポリオキシエチレン／ポリオキシプロピレンブロック共重合体の各

成分を含有するイムノクロマトグラフィー用試薬組成物の成分を予め担持または保持させておく態様とすることが可能かつ有効であって、何ら妨げるものではない。

[0096] 2) 標識物質保持部(2)には、標識成分によって試薬成分を標識した標識試薬を担持または保持させている。標識成分としては、金コロイド粒子、銀コロイド粒子等の金属コロイド粒子、各種のモノマーを(共)重合させて合成した合成高分子を染色して得られる着色ラテックス粒子、酵素、蛍光化合物、その他を用いることができる。試薬成分としては、分析物を認識する能力を有する粒子または分子であり、好ましくはモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体若しくはそのフラグメントである(第二試薬)。

[0097] 3) クロマトグラフィー媒体部(3)は、膜担体上に判定部位(4)を作成したものである。膜担体としては、毛細管現象により試料検体を吸収し移動させることができるものであれば、特に限定されるものではない。例えば、ニトロセルロース、酢酸セルロース、ナイロン、ポリエーテルスルホン、ポリビニルアルコール、ポリエステル、ガラスファイバー、ポリオレフィンおよびセルロース並びにこれらの混合繊維からなる人工ポリマーからなる群から選択される。これらの繊維、織布、不織布、布、膜などの任意のものからなる。

[0098] 4) 検出部(4)には、モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体若しくはそのフラグメント(第一試薬)が、ニトロセルロースのシート上に担持固定されている。判定部位(4)に用いる試薬成分(第一試薬)および標識試薬に用いる試薬成分(第二試薬)は、その一方または両方がモノクローナル抗体であってもよいし、ポリクローナル抗体であってもよいが、特異性を保った上で製造コストまたは抗体の安定供給を考慮する場合は少なくとも一方がポリクローナル抗体であることが好ましい。更に、標識試薬に用いる試薬成分(第二試薬)は、測定感度等の点から特異性の高いモノクローナル抗体がより好ましい。インフルエンザウィルスといった病原性が高い検体の検査にあっては、両方がモノクローナル抗体であることが最も好ましい。

- [0099] モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体若しくはそのフラグメントは、公知且つ入手可能であり、公知の方法により調製することができる。抗体産生動物種としては、例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびヤギが挙げられる。免疫グロブリンとしては、IgG、IgM、IgA、IgE、IgDのいずれでもよい。
- [0100] モノクローナル抗体は、常法に従って、抗原（例えば、インフルエンザウイルス等）で免疫したマウスの脾臓細胞と骨髄腫細胞をハイブリッドさせ、目的とする抗体を産生するハイブリドーマを選択し、このハイブリドーマから産生されてくるモノクローナル抗体を収得する。例えば、ケーラーとミルスタインの技法（Nature 256（1975）p. 495-497）を参照。
- [0101] ポリクローナル抗体は、常套手法により、抗原（インフルエンザウイルス等）を産生動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、ヤギおよびウマ等）に免疫して得た抗血清中から目的とする抗体を分離することにより得られる。
- [0102] インフルエンザウイルスは、ウイルス粒子を構成するタンパク質のうち、M1蛋白（エンベロープの内側に、それを裏打ちする形で局在し、実質的な殻の役割を果たしている。）とNP蛋白（エンベロープ内部にあり、核蛋白質にらせん状に巻付いていて、ヌクレオカプシドに相当する。）の抗原性の違いに基づいて、A型、B型、C型に分類される。
- [0103] 流行の規模または感染時の被害が大きいA型インフルエンザウイルスは、直径80～120nm程度の、エンベロープ（殻）を持つマイナス鎖の一本鎖RNAウイルスであるが、A型はさらに、ウイルス表面蛋白質であるヘマグルチミン（血球凝集素、HA）とノイラミニダーゼ（NA）の抗原性の違いに基づいて、HAでは16種類（H1からH16）、NAでは9種類（N1からN9）の亜型に分類されている。
- [0104] 検出部（4）に用いる試薬成分（第一試薬）および標識試薬に用いる試薬成分（第二試薬）としては、それぞれ抗インフルエンザウイルスモノクロー

ナル抗体あるいは抗インフルエンザウィルスポリクローナル抗体のどちらも用いることが可能である。しかしながら、両方に抗インフルエンザウィルスモノクローナル抗体を用いることが反応の正確性と効率性の観点から最も好ましい。

[0105] 5) 吸収部(5)は、過剰の試料を迅速に吸収する能力を有する材料、ガラス濾紙等が用いられる。

[0106] 6) バッキングシート(6)は、基材である。片面に粘着剤を塗布したり、粘着テープを貼り付けることにより、片面が粘着性を有し、該粘着面上に試料添加部(1)、標識物質保持部(2)、クロマトグラフィー媒体部(3)、検出部(4)および吸収部(5)の一部または全部が密着して設けられている。バッキングシート(6)は、粘着剤によって試料液に対して不透過性、非透湿性となるようなものであれば、基材としては、特に限定されない。

[0107] 検出対象物がインフルエンザウィルスである場合を具体例として、判定の原理を概説すると、

1. 試料(例えば、咽頭拭い液などの検体)を、測定精度を低下させることなく、イムノクロマトグラフィー媒体中をスムーズに移動する程度の濃度に検体希釈液で調製または希釈して検体試料(検体を含む検体希釈液)とする。該検体試料を試料添加部(1)上に、所定量(通常、0.1~2ml)滴下する。検体試料が滴下されると、試料添加部(1)中を検体試料は移動を開始する。

[0108] 2. 次いで検体試料は、標識物質保持部(2)へと移動する。ここを検体試料が通過する際、標識物質保持部(2)に保持されていた溶解補助物質がまず検体試料の水分に溶解し、次いで標識物質と共に保持されていた保護安定化物質並びに標識物質が、検体試料の水分に溶解し、検体試料と共に移動する。

[0109] 3. ついで、検体試料の水分に溶解した標識試薬は、クロマトグラフィー媒体部(3)上の検出部(4)を通過する。ここでは、検体試料中に溶解して

いる保護安定化物質等を含むイムノクロマトグラフィー用試薬組成物により非特異的結合反応は抑制され、抗原・抗体の特異的結合反応により、インフルエンザウィルスが存在する場合には、検体試料中のインフルエンザウィルスが、検出部（４）に保持、即ち、担持固定されている抗体と標識試薬とによってサンドイッチ状に挟まれるように特異的に反応結合して、検出部（４）が着色する。インフルエンザウィルスが存在しない場合には、試料の水分に溶解した標識試薬は、クロマトグラフィー媒体部（３）上の検出部（４）を通過しても特異的結合反応が起こらないので、検出部（４）が着色しない。

[0110] ４．最後に、試料の水分は、吸収部（５）へと移動する。このように、試料、例えば、検体試料中のインフルエンザウィルスの有無を検査することにより、インフルエンザウィルスの感染の有無を正確に判定することができる。

[0111] 採取した試料である鼻汁、痰、鼻腔または咽頭拭い液は、試料希釈液により約１０～１００倍に希釈して、その１５０μLを試料添加部（１）上に滴下／供給して展開することにより、上記と同様の検査を行なうことができ、上記と同様な結果を達成することができる。

[0112] 以下、本発明の有効性を各仕様の実施例および実施態様を挙げて説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

## 実施例

[0113] 以下に、実施例および比較例を挙げて、本発明の有意性を説明する。その実施の仕様は以下のとおりのものである。

[0114] [実施例１]

（１）クロマトグラフィー媒体上への判定部の作製

メンブレンとしてニトロセルロースからなるシート（ミリポア社製、商品名：HF12250mm×25mm）を用いた。５質量％のスクロースおよび５質量％のイソプロパノールを含む１０mMのリン酸緩衝液（pH7.4）で１.0mg/mlの濃度になるように抗インフルエンザA型ウィルスモノクローナル抗体（第一抗体）を希釈し、その希釈された溶液１５０μLを

抗体塗布機（BioDot社製）によりメンブラン上に1mmの幅で塗布し、50℃で30分間乾燥させ、室温で一晩乾燥させ、クロマトグラフィー媒体上に判定部を作製した。

[0115] (2) 標識物質溶液の作製

金コロイド懸濁液（田中貴金属工業社製：平均粒子径40nm）0.5mLに、HEPES緩衝（pH7.5）で0.1mg/mLの濃度になるように希釈した抗インフルエンザAモノクローナル抗体0.1mL加え、室温で10分間静置した。次いで、0.01質量%のPEG-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000）を含むHEPES緩衝液（pH7.5）を0.1mL加え（添加後のPEG-SH濃度：0.001質量%）、室温で10分間静置した。その後、十分攪拌した後、8000×gで15分間遠心分離を行い、上清を除去した後、1質量%の牛血清アルブミンを含むリン酸緩衝液（pH7.4）0.1mLを加え、標識物質溶液を作製した。

[0116] (3) イムノクロマトグラフィー用試験片の作製

上記作製した標識物質溶液200μLに100μLの25質量%トレハロース水溶液と80μLの5質量%のカゼイン（終濃度：1質量%）を含むリン酸緩衝液（pH9.0）、5μLの10質量%のL-アルギニン水溶液（終濃度：0.1質量%）を加えたものを12mm×100mmのグラスファイバーパッド（ミリポア社製）に均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、標識保持部材を作製した。次に、バックグシートから成る基材に、上記作製した判定部を有するクロマトグラフィー媒体、標識物質保持部材、試料を添加する部分に用いるグラスファイバー製のサンプルパッド、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収パッドを貼り合わせた。そして、裁断機で幅が5mmとなるように裁断し、イムノクロマトグラフィー用試験片とした。

[0117] (4) 検体希釈液の作製

1質量%の非イオン界面活性剤（日油株式会社製、商品名：MN811と

ナカライテスク社製、商品名NP-40の1:1混合物)、80mMの塩化カリウム、20mMのグアニジン塩酸塩、0.4質量%のポリビニルピロリドン(平均分子量36万)を含む50mMのHEPES緩衝液(pH7.5)を調製し、鼻汁・痰・咽頭ぬぐい液等の検体を希釈処理するための試薬とした。

[0118] (5) 測定

上記作製したイムノクロマトグラフィー用試験片および検体希釈液を用いて、以下の方法で検体中の抗原であるインフルエンザA型ウィルスの存在の有無を測定した。即ち、吸引トラップの片方の管を吸引ポンプに、もう片方の管をインフルエンザに感染していない人の鼻腔の奥部まで挿入し、吸引ポンプを陰圧にして鼻汁を採取した。

[0119] 採取した鼻汁を上記検体希釈液で20倍に希釈し、これを陰性検体試料とした。また、陰性検体試料に、蛋白濃度が25ng/mLとなるように市販の不活化インフルエンザA型ウィルス抗原を加えたものを陽性検体試料とした。

[0120] 陰性検体試料、陽性検体試料とも120 $\mu$ Lをイムノクロマトグラフィー用試験片のサンプルパッド上に添加し展開させ、15分後に目視判定をした。テストラインの赤い線を確認できるものを「+」、鮮明に確認できるものを「++」、より強く鮮明に確認できるものを「+++」、赤い線は確認できるが、非常に色が薄いものを「±」、赤い線を確認できないものを「-」とした。表1に結果を示す。

[0121] [実施例2]

標識物質の保護剤として、実施例1の(2)標識物質溶液の作製の工程で、0.01質量%のPEG-SH(分子量2000)のものを使用して、実施例1と同じ手順態様で実施した。そして、同じ目視判定基準に従って判定した。その判定結果を表1に示す。

[0122] [実施例3]

標識物質の保護剤として、実施例1の(2)標識物質溶液の作製の工程で

、0.01質量%のPEG-SH（分子量20000）のものを使用して、実施例1と同じ手順態様で実施した。そして、同じ目視判定基準に従って判定した。その判定結果を表1に示す。

[0123] [比較例1]

標識物質の保護剤として、実施例1の（2）標識物質溶液の作製の工程で、0.01質量%のPEG（分子量20000）という、メルカプト基を有しないポリエチレングリコールを使用して、実施例1と同じ手順態様で実施した。そして、同じ目視判定基準に従って判定した。その判定結果を表1に示す。

[0124] [比較例2]

標識物質の保護剤として、実施例1の（2）標識物質溶液の作製の工程で、0.01質量%のPEG（分子量5000）に代えて、同じ機能が予測されるポリビニルピロリドン（PVP K-90 分子量630000）を使用して、実施例1と同じ手順態様で実施した。そして、同じ目視判定基準に従って判定した。その判定結果を表1に示す。

[0125] [比較例3]

標識物質の保護剤として、実施例1の（2）標識物質溶液の作製の工程で、0.01質量%のPEG-SH（分子量5000）のものを使用して、標識物質保持部のアミノ酸成分をL-アルギニンに代えて「L-グルタミン酸」を使用して実施例1と同じ態様で実施した。そして、同じ目視判定基準に従って判定した。その判定結果を表1に示す。

[0126] [比較例4]

標識物質の保護剤として、実施例1の（2）標識物質溶液の作製の工程で、0.01質量%のPEG-SH（分子量5000）のものを使用して、標識物質保持部のアミノ酸成分をL-アルギニンに代えて「L-グルタミン酸+グアニジン塩酸塩」を使用して実施例1と同じ態様で実施した。そして、同じ目視判定基準に従って判定した。その判定結果を表1に示す。

[0127] [比較例5]

標識物質の保護剤として、実施例1の(2)標識物質溶液の作製の工程で、PEG-SH(日本油脂株式会社製、商品名:SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000)を含むHEPES緩衝液(pH7.5)を用い、標識物質保持部のアミノ酸成分としてL-アルギニンを用いて、標識物質保持部のタンパク質成分であるカゼインに代えて「BSA」を使用して実施例1と同じ態様で実施した。そして、同じ目視判定基準に従って判定した。その判定結果を表1に示す。

[0128] [表1]

	標識物質の保護剤	標識物質保持部のアミノ酸成分	標識物質保持部のタンパク質成分	展開15分後の目視判定		
				抗原量		
				0ng	25ng	50ng
実施例1	PEG-SH (分子量5000)	L-アルギニン	カゼイン	-	++	+++
実施例2	PEG-SH (分子量2000)	L-アルギニン	カゼイン	-	+	++
実施例3	PEG-SH (分子量20000)	L-アルギニン	カゼイン	-	+	++
比較例1	PEG (分子量20000)	L-アルギニン	カゼイン	+	+	++
比較例2	PVP K-90 (分子量630000)	L-アルギニン	カゼイン	±	+	++
比較例3	PEG-SH (分子量5000)	L-グルタミン酸	カゼイン	+	+	++
比較例4	PEG-SH (分子量5000)	L-グルタミン酸 + グアニジン塩酸塩	カゼイン	+	+	++
比較例5	PEG-SH (分子量5000)	L-アルギニン	BSA	±	±	+

## [0129] 5. 配合する成分による影響の評価

1) 表1の実施例1~3の結果から、標識物質の保護剤としてPEG-SH(分子量2000~20000)を含むHEPES緩衝液(pH7.5)を用い、これにカゼインを含むリン酸緩衝液(pH9.0)とL-アルギニン水溶液が配合される場合にのみ、抗原量が0ngでの「+」や「±」といった陽性、偽陽性を示さず、ブランク発色および非特異反応が抑制されることが解る。

[0130] 2) 「比較例1」および「比較例2」に見るとおり、標識物質の保護剤としてPEG-SH(日本油脂株式会社製、商品名:SUNBRIGHT M

E-050SH、分子量5000)を用いずにPEG(分子量20000)またはPVP K-90(分子量630000)を用いた場合(即ち、比較例1、2の場合)には、標識物質保持部のタンパク質成分としてカゼインを用い、かつ、標識物質保持部のアミノ酸成分としてL-アルギニンを用いたとしても、抗原量が0ngで「+」や「±」といった陽性、偽陽性を示し、正確な検査結果が得られないことが解る。

[0131] 3) また、比較例3、4に見るとおり、標識物質の保護剤としてPEG-SH(日本油脂株式会社製、商品名:SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000)を含むHEPES緩衝液(pH7.5)を用い、これにカゼインを含むリン酸緩衝液(pH9.0)を用いても、標識物質保持部のアミノ酸成分としてL-アルギニンを用いずにL-グルタミン酸またはL-グルタミン酸とグアニジン塩酸塩の混合物を用いた場合(即ち、比較例3、4の場合)には、抗原量が0ngで「+」といった陽性を示し、空白発色または非特異反応が惹起していることが解る。

[0132] 4) 「比較例5」に見るとおり、標識物質の保護剤としてPEG-SH(日本油脂株式会社製、商品名:SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000)を含むHEPES緩衝液(pH7.5)を用い、標識物質保持部のアミノ酸成分としてL-アルギニンを用いても、標識物質保持部のタンパク質成分としてカゼインを用いずにBSAを用いた場合(即ち、比較例5の場合)には、抗原量が0ngおよび25ngで「±」といった偽陽性を示し、正確な検査結果が得られないことが解る。

[0133] 以下に、本発明を実施する場合には、上記実施例1~3に準拠して実施することにより有意性を確認することができるが、その実施例の条件を若干変えて実施した場合でも同様に確認できることを、試験例または実施態様を挙げて詳細に説明するが、これらの試験例または実施態様に限定されるものではない。

[0134] [実施態様1]

別の実施態様として、上記実施例1における標識物質の保護剤であるPE

G-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000）に代えて、PEG-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000）とPEG-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-020SH、分子量2000）との混合物を用いて同様にして測定を行なった。上記実施例1におけるPEG-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000）のみの場合と略同様の目的を達成することが可能である。

[0135] [実施態様2]

また、上記実施例3におけるPEG-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-200SH、分子量20000）に代えて、PEG-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000）との混合物を用いて同様にして測定を行なった。上記実施例3におけるPEG-SH（分子量20000）単独の場合と略同様の目的を達成することが可能であることが確認できる。

[0136] [実施態様3]

さらに、上記実施例1における標識物質の保護剤として、PEG-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-050SH、分子量5000）に代えて、PEG-SH（日本油脂株式会社製、商品名：SUNBRIGHT ME-100SH、分子量10000）を用いて同様にして測定を行なった。上記試験例1の場合と略同様の目的を達成することが可能であることが確認できる。

[0137] [実施態様4]

次に、保護剤のメルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール誘導体により標識物質を保護処理した溶液中の該保護剤の濃度、保護処理した溶液へ混合されるアミノ酸成分のアルギニンおよびタンパク質成分のカゼインの二成分の終濃度の仕様を示す（表2）。

・メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール誘導体（A）は、そ

の保護処理後の溶液濃度（質量％）を0.0005、0.005、0.01、0.001、0.001という質量％濃度として標識物質を保護処理した以外は実施例1と同様に実施する。

・アルギニン溶液（B）は、その終濃度（質量％）を0.5、0.2、0.02、0、0.1という質量％濃度とした以外は実施例1と同様に実施する。

・カゼイン溶液（C）は、その終濃度（質量％）を0.2、5、2、1、0という質量％濃度とした以外は実施例1と同様に実施する。

（なお、各成分の重量部＝各成分濃度×各成分の配合量×100で計算。）

[0138] [表2]

実施態様（調合例）	1	2	3	4	5
A（質量％）	0.0005	0.005	0.01	0.001	0.001
B（質量％）	0.5	0.2	0.02	0	0.1
C（質量％）	0.2	5	2	1	0

[0139] 上記実施態様（調合例）1～3のような三成分の組成割合（固体換算：重量部）の溶液を使用する場合であっても、経時変化において安定であり、しかも、標識物質の色彩が非常に鮮明で、測定時間、取り扱い、測定精度が、向上し、実施例1と略同程度の判定結果が達成される。

[0140] また、上記実施態様（調合例）4のようにアミノ酸成分のアルギニンが不含の場合にあっては、抗原量が0 ngであっても陽性を示し、ブランク発色または非特異反応が惹起するばかりか、展開時に標識粒子が一部凝集し感度の低下や展開ムラが生じる。さらに、上記実施態様（調合例）5のようにタンパク質成分のカゼインが不含の場合にあっては、抗原量が0 ngで偽陽性を示し、非特異反応が惹起して正確な検査結果が得られないばかりか、展開時に標識粒子が一部凝集し感度の低下または展開ムラが生じる。

[0141] 次に、実施例1における検体希釈液中のグアニジン塩酸塩の濃度の仕様を、実施例5～9として示す。

[0142] [実施例5～9]

実施例5～9の各実施例における検体処理液中のグアニジン塩酸塩の濃度

を、2、5、20、50、100 mMとしたこと以外は実施例1と同様に実施し、それぞれ3回の繰り返し実験を行なった。その仕様と結果を表3に示す。

[0143] [表3]

	グアニジン塩酸塩濃度 (mM)	展開15分後の目視判定		
		抗原量		
		0 ng	25 ng	50 ng
実施例5	2	—	++	+++
		—	++	+++
		±	++	+++
実施例6	5	—	++	+++
		—	++	+++
		—	++	+++
実施例7	50	—	+	++
		—	++	+++
		—	++	+++
実施例8	100	—	+	++
		—	±	+
		—	±	+

[0144] 以上により、標識物質の保護剤として、メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコール誘導体、標識物質保持部のアミノ酸成分としてL-アルギニン、および標識物質保持部のタンパク質成分としてカゼインという組み合わせを用いことにより、ブランク発色や非特異的反応を抑制し、感度よく正確に病原菌の有無検査が出来ることを見出された。

[0145] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更および変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお本出願は、2012年3月22日付で出願された日本特許出願（特願2012-066409）に基づいており、その全体が引用により援用される。

### 産業上の利用可能性

[0146] 本発明の検出キットは、ブランク発色や非特異的反応を抑制し、特異的に鼻汁、鼻腔拭い液、咽頭拭い液または痰中の病原菌の有無を高感度かつ正確

に検出できるので、病気の迅速な治療ができるという、産業上の利用可能性を有する。

### 符号の説明

- [0147] 1 試料添加部（サンプルパッド）  
2 標識物質保持部  
3 クロマトグラフィー媒体部  
4 検出部  
5 吸収部  
6 バックリングシート

## 請求の範囲

- [請求項1] 検体を含む検体希釈液をクロマトグラフィー媒体中に添加する工程、標識物質保持部に乾燥保持されている金ナノ粒子により修飾された標識物質により検出対象物を認識させる工程、該標識物質と該検出対象物の複合体を移動相として展開させる工程、および展開された移動相中の該検出対象物を判定部で検出する工程を含むイムノクロマトグラフィー検出方法であって、
- 該標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体で保護され、次いでアルギニンおよびカゼインと共に該標識物質保持部に乾燥保持されていることを特徴とするイムノクロマトグラフィー検出方法。
- [請求項2] 前記メルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体が、メルカプト基を1以上有する分子量が1000～30000のポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体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グラフィー検出方法。
- [請求項3] 前記標識物質が前記メルカプト基を1以上有するポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体を含む溶液中で保護処理されており、該標識物質を保護処理した後の溶液中の該ポリエチレングリコールおよび／またはその誘導体の濃度が0.0001～0.05質量%であることを特徴とする請求項2に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。
- [請求項4] 前記アルギニンおよびカゼインが、標識物質溶液中に含有されて前記クロマトグラフィー媒体に湿潤されることにより該標識物質保持部に乾燥保持されており、該クロマトグラフィー媒体に湿潤される前の該標識物質溶液中の終濃度として、アルギニンの濃度が0.01～2質量%であり、カゼインの濃度が0.1～10質量%であ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グラフ

ィー検出方法。

[請求項5] 前記金ナノ粒子が、平均粒径が30～100nmの赤色金ナノ粒子または平均粒径が20～200nmの青色金ナノ粒子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グラフィー検出方法。

[請求項6] 前記検体が、鼻汁、鼻腔拭い液、咽頭拭い液または痰であることを特徴とする請求項1～5のいずれか1項記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

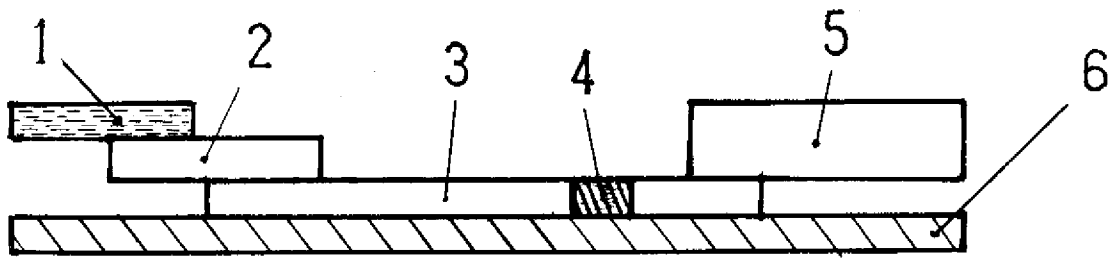
[請求項7] 前記検体希釈液にグアニジンを含有させることを特徴とする請求項1～6のいずれか1項に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

[請求項8] 前記検体希釈液中のグアニジンの濃度が1～200mMであることを特徴とする請求項7に記載のイムノクロマトグラフィー検出方法。

[請求項9] 試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体部、検出部および吸収部から実質的に順次構成され、該標識物質保持部が該試料添加部の端部と該検出部との間の領域部に設けられており、且つ標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体により保護され、アルギニンおよびカゼインと共に該標識物質保持部に乾燥保持されていることを特徴とするイムノクロマトグラフィー装置。

[請求項10] 試料添加部、標識物質保持部、クロマトグラフィー媒体部、検出部および吸収部から実質的に順次構成され、試料添加部の端部と検出部との間の領域部に該標識物質保持部が設けられており、且つ標識物質がメルカプト基を1以上有するポリアルキレングリコールおよび／またはその誘導体により保護し、アルギニンおよびカゼインと共に該標識物質保持部に乾燥保持されているイムノクロマトグラフィー装置を含むことを特徴とする検出キット。

[図1]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/057094

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

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)

G01N33/543

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	1996-2013
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2013	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2013

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.
Y	JP 2009-192223 A (Fujifilm Corp.), 27 August 2009 (27.08.2009), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0067] to [0070]; fig. 1, 2 & US 2009/0203153 A1	1-10
Y	JP 2009-180580 A (Asahi Kasei Corp.), 13 August 2009 (13.08.2009), entire text; all drawings; particularly, paragraph [0033]; fig. 1 (Family: none)	1-10
Y	JP 2009-192228 A (Fujifilm Corp.), 27 August 2009 (27.08.2009), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0025], [0100] & US 2009/0203155 A1	1-10

 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

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
23 May, 2013 (23.05.13)Date of mailing of the international search report  
04 June, 2013 (04.06.13)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2013/057094

## 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 10-073594 A (Boehringer Mannheim GmbH), 17 March 1998 (17.03.1998), entire text; particularly, paragraphs [0019], [0022] to [0033] & US 5972720 A & EP 811846 A2 & DE 19622628 A & DE 59708471 D	1-10
Y	JP 09-080051 A (Sanyo Chemical Industries, Ltd.), 28 March 1997 (28.03.1997), entire text; particularly, claims (Family: none)	1-10
Y	JP 2011-196996 A (Sanyo Chemical Industries, Ltd.), 06 October 2011 (06.10.2011), entire text; particularly, paragraphs [0003], [0004] (Family: none)	1-10
A	JP 2003-344397 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 03 December 2003 (03.12.2003), entire text; all drawings & US 2003/0180967 A1 & EP 1347298 A2 & DE 60305551 D & DE 60305551 T & CN 1482460 A	1-10

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

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 1971-2013年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2013年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2013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
Y	JP 2009-192223 A (富士フイルム株式会社) 2009.08.27, 全文・全図、特に、段落【0067】-【0070】、【図1】、【図2】等参照 & US 2009/0203153 A1	1-10
Y	JP 2009-180580 A (旭化成株式会社) 2009.08.13, 全文・全図、特に、段落【0033】、【図1】等参照 (ファミリーなし)	1-10

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 23.05.2013	国際調査報告の発送日 04.06.2013
--------------------------	--------------------------

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) 草川 貴史	2 J	4 0 7 5
	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 2009-192228 A (富士フイルム株式会社) 2009.08.27, 全文・全図、特に、段落【0025】、【0100】等参照 & US 2009/0203155 A1	1-10
Y	JP 10-073594 A (ベーリンガー マンハイム ゲーエムベーハー) 1998.03.17, 全文、特に、段落【0019】、【0022】－【0033】 等参照 & US 5972720 A & EP 811846 A2 & DE 19622628 A & DE 59708471 D	1-10
Y	JP 09-080051 A (三洋化成工業株式会社) 1997.03.28, 全文、特に、 【特許請求の範囲】等参照 (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2011-196996 A (三洋化成工業株式会社) 2011.10.06, 全文、特に、 段落【0003】、【0004】等参照 (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2003-344397 A (松下電器産業株式会社) 2003.12.03, 全文・全図等参 照 & US 2003/0180967 A1 & EP 1347298 A2 & DE 60305551 D & DE 60305551 T & CN 1482460 A	1-10