(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
2022年10月6日(06.10.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/210307 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/53 (2006.01) *G01N 33/543* (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/014180

(22) 国際出願日： 2022年3月24日(24.03.2022)

(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 2021-063362 2021年4月2日(02.04.2021) JP
特願 2022-030768 2022年3月1日(01.03.2022) JP

(71) 出願人: ライオン株式会社 (**LION CORPORATION**) [JP/JP]; 〒1308644 東京都墨田区本所一丁目３番７号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 坂本 裕樹 (**SAKAMOTO Hiroki**); 〒1308644 東京都墨田区本所一丁目３番７号 ライオン株式会社内 Tokyo (JP). 椛嶋 恭平 (**KABASHIMA Kyohei**); 〒1308644 東京都墨田区本所一丁目３番７号 ライオン株式会社内 Tokyo (JP).

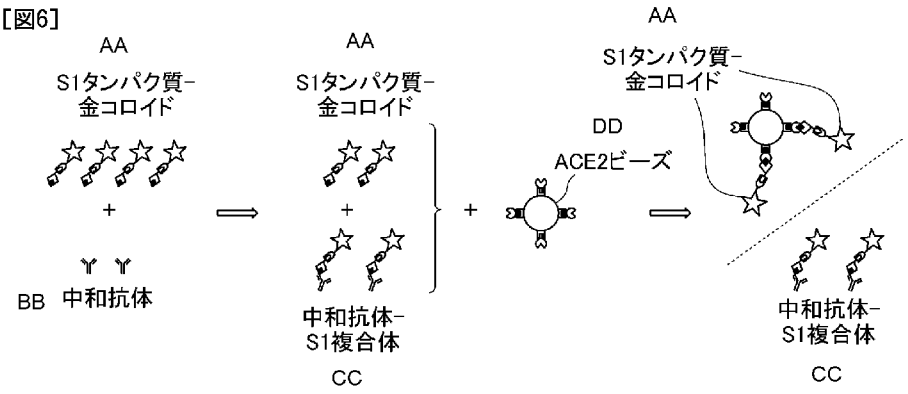
(74) 代理人: 田▲崎▼ 聡, 外 (**TAZAKI Akira** et al.); 〒1006620 東京都千代田区丸の内一丁目９番２号 Tokyo (JP).

(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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IT, JM, 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,

(54) **Title:** TEST METHOD

(54) 発明の名称： 検査方法

[図6]



AA S1 protein-gold colloid
BB Neutralizing antibody
CC Neutralizing antibody-S1 conjugate
DD ACE2 bead

(57) **Abstract:** The test method is a method for determining whether a detection-target substance A is present in a sample, wherein the detection-target substance A, by binding with an active substance B, inhibits binding via a prescribed mode between the active substance B and a recipient substance C. The test method carries out at least the following first treatment and second treatment in the indicated sequence. (First treatment: obtaining a treated-sample solution that contains the aforementioned sample and an active substance B to which a labeling substance is bonded.) (Second treatment: bringing the treated-sample solution into contact with an adsorbent that has an insoluble particulate carrier that carries the recipient substance C, and subsequently measuring the amount of adsorption of the labeling substance to the absorbent.)

WO 2022/210307 A1

[続葉有]

ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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:

一 国際調査報告(条約第21条(3))

(57) 要約:被検出物質Aが検体に含まれるか否かを検査する方法であって、前記被検出物質Aは、作用物質Bに結合することにより、前記作用物質Bと被作用物質Cが所定の様式で結合することを阻害するものであり、少なくとも下記の第1処理～第2処理をこの順で行う、検査方法。(第1処理:前記検体と、標識物質が結合した前記作用物質Bと、を含む検体処理液を得る。)(第2処理:前記被作用物質Cを担持した粒子状不溶性担体を有する吸着体を、前記検体処理液に接触させた後、前記吸着体に対する前記標識物質の吸着量を計測する。)

明　細　書

発明の名称 ： 検査方法

技術分野

[0001] 本発明は、検体に中和抗体が含まれるか否かを検査することが可能な検査方法に関する。本願は、２０２１年４月２日に、日本に出願された特願２０２１－０６３３６２号、及び２０２２年３月１日に、日本に出願された特願２０２２－０３０７６８号に基づき優先権を主張し、その内容をここに援用する。

背景技術

[0002] 新型コロナウイルスが蔓延している現状、同ウイルスの感染に対する防御力を有しているか否かを判定することは大きな意義がある。同ウイルスは、ウイルス中に含まれるスパイクタンパク質（Ｓ１）とヒト又は動物の細胞が有する受容体タンパク質（アンジオテンシン変換酵素２、ＡＣＥ２と称する場合がある）との結合を介して感染する。従って、ウイルス感染に対する防御力を有するということは、Ｓ１タンパク質とＡＣＥ２の結合を阻害することが可能な「中和抗体」を体内に保有していることと言い換えられる。現在、被験者から得た血液などの検体中に中和抗体を検出する手法には、実際のウイルスを用いて行う培養細胞実験やＥＬＩＳＡ法と呼ばれる技術が存在している。しかし、高度な専門技術や専用の設備を要するため、検査を簡便に実施することができない。

[0003] 特許文献１には、ニトロセルロース膜に抗体等のタンパク質を固定したイムノクロマト法に関する器具が開示されている。

非特許文献１には、イムノクロマト法によって、被験者の血液等の検体に、新型コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）に対する中和抗体があるか否かを検査する方法が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開２００９－０８５７５１号公報

非特許文献

[0005] 非特許文献1：medRxiv preprint “A lateral flow test detecting SARS-CoV-2 neutralizing antibodies” Nan Zhang, Shuo Chen, Jin V. Wu, Xinhai Yang, Jianfu J. Wang、doi: https://doi.org/10.1101/2020.11.05.20222596

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 図１１に、非特許文献１の検査方法（イムノクロマト法）の要部を模式的に示す。ここで、Ｓ１は新型コロナウイルスのスパイクタンパク質であり、ＡＣＥ２はヒト細胞膜に存在する受容体ＡＣＥ２である。

基本構成として、テープ状のニトロセルロース基材の上流側から下流側に向けて順に、領域Ｗ１、領域Ｗ２、領域Ｗ３が設けられている。

領域Ｗ１の上流側に検体を滴下し、基材に含浸させると、検体は下流側へ向けて基材に浸潤しながら流れる。検体の一例は中和抗体と非中和抗体を含む。領域Ｗ１には、金コロイドで標識されたＳ１が予め含浸されている。検体がＷ１に到達すると、検体はＷ１上でＳ１と接触し、これにより、中和抗体がＳ１に結合して複合体を形成し、非中和抗体もＳ１に結合して複合体を形成する。これらの複合体はさらに下流側へ向けて基材に浸潤しながら流れて、領域Ｗ２に到達する。

領域Ｗ２には、ＡＣＥ２が予め固定化されている。Ｓ１とＡＣＥ２は所定の様式で結合することが知られており、非中和抗体はＳ１とＡＣＥ２の結合を阻害しないので、非中和抗体－Ｓ１複合体は領域Ｗ２においてＡＣＥ２に捕捉され、領域Ｗ２に留まる。一方、中和抗体はＳ１とＡＣＥ２の結合を阻害するので、中和抗体－Ｓ１複合体はＡＣＥ２に捕捉されることなく、さらに下流側へ向けて基材に浸潤しながら流れて、領域Ｗ３に到達する。

領域Ｗ３には、抗ヒト抗体が予め固定化されている。中和抗体－Ｓ１複合体はこれに捕捉され、領域Ｗ３に留まる。Ｓ１には予め標識物質が結合されているので、領域Ｗ３に到達した標識物質を検出することにより、中和抗体

が領域Ｗ３に到達したことを検知することができる。この結果から、検体に中和抗体が含まれると判定する。

[0007] 非特許文献１の検査方法を要約すると、次の３段階の処理を基材上で連続的に行う。

１）ヒトから得た検体を、標識されたＳ１と基材上で接触させ、処理液を得る。

２）処理液を、基材に固定されたＡＣＥ２と接触させる。

３）処理液を、基材に固定された抗ヒト抗体と接触させる。

１）において、検体に含まれ得る中和抗体と非中和抗体がＳ１に結合して複合体となる。２）において、非中和抗体－Ｓ１複合体がＡＣＥ２に捕捉され、処理液から除かれる。

３）において、中和抗体－Ｓ１複合体が抗ヒト抗体に捕捉される（基材上に固定される）。

最後に、３）で捕捉された中和抗体－Ｓ１複合体の有無を、Ｓ１が有する標識物質を検知することにより判定する。

[0008] 非特許文献１の検査方法では、ニトロセルロース基材の上流側から下流側へ検体が流れることによって上記１）～３）の処理が順に行われるが、上記２）の処理が不完全であっても検体は下流側に流され、上記３）の処理に移行してしまう問題がある。ニトロセルロース基材上の小さな面積に固定された少数のＡＣＥ２が、全ての非中和抗体－Ｓ１複合体を捕捉して下流側への流出を防ぐことができない場合がある。このため、上記２）の処理が不充分になるリスクが常につきまとう。

また、非特許文献１の方法では、ＡＣＥ２をニトロセルロース基材上に固定する必要がある。固定処理には乾燥が必要であり、製造プロセスの効率化のために加熱を行うことが多い。ＡＣＥ２は立体的に高度な構造を有するタンパク質であり、加熱により変性し、機能が失活又は減弱するという問題がある。加熱工程を行う場合、上記２）の処理が不十分になるリスクが常につきまとう。

上記２）において処理液から非中和抗体が完全に除かれない場合、上記３）において中和抗体－Ｓ１複合体だけでなく、非中和抗体－Ｓ１複合体が抗ヒト抗体に捕捉される。この結果、検体中に中和抗体が存在せず、非中和抗体のみが存在する場合においても、上記判定において、陽性（中和抗体が存在する）という誤った判定（偽陽性）がなされてしまう、という問題がある。

また、加熱せずに乾燥を行うためには長時間の乾燥工程が必要となり、製造の効率が著しく低下する。

[0009] 本発明は、中和抗体等の被検出物質が検体に含まれるか否かを簡便に検査できる検査方法を提供する。

課題を解決するための手段

[0010] ［１］ 被検出物質Ａが検体に含まれるか否かを検査する方法であって、前記被検出物質Ａは、作用物質Ｂに結合することにより、前記作用物質Ｂと被作用物質Ｃが所定の様式で結合することを阻害するものであり、少なくとも下記の第１処理～第２処理をこの順で行う、検査方法。

（第１処理）

前記検体と、標識物質が結合した前記作用物質Ｂと、を含む検体処理液を得る。

（第２処理）

前記被作用物質Ｃを担持した粒子状不溶性担体を有する吸着体を、前記検体処理液に接触させた後、前記吸着体に対する前記標識物質の吸着量を計測する。

［２］ 前記第２処理において、前記計測の前に、前記吸着体と、前記吸着体に接触した後の前記検体処理液とをより分ける、［１］に記載の検査方法。

［３］ 前記より分ける方法が静置又は遠心分離であり、前記静置又は前記遠心分離によって生じた上清を除去した後で、前記計測を行う、［２］に記載の検査方法。

［４］　前記標識物質が金コロイドである、［１］～［３］の何れか一項に記載の検査方法。

［５］　前記計測の方法が比色法である、［１］～［４］の何れか一項に記載の検査方法。

［６］　前記第２処理で計測した前記吸着量が、所定値よりも小さい場合、前記検体に前記被検出物質Ａが含まれると判定し、前記第２処理で計測した前記吸着量が、所定値よりも大きい場合、前記検体に前記被検出物質Ａが含まれないと判定する、［１］～［５］の何れか一項に記載の検査方法。

［７］　前記被検出物質Ａが中和抗体であり、前記作用物質Ｂが病原体に由来するタンパク質であり、前記被作用物質Ｃは前記病原体が感染する細胞に由来するタンパク質である、［１］～［６］の何れか一項に記載の検査方法。

［８］　前記被検出物質Ａが中和抗体であり、前記作用物質Ｂは、コロナウイルスが有するスパイクタンパク質の一部又は全部であり、前記被作用物質Ｃは、ヒト又は動物の細胞が有する受容体タンパク質の一部又は全部である、［１］～［７］の何れか一項に記載の検査方法。

［９］　前記被検出物質Ａが中和抗体であり、前記作用物質Ｂは、コロナウイルスが有するスパイクタンパク質の一部又は全部であり、前記被作用物質Ｃは、ヒト又は動物の細胞が有する受容体タンパク質の一部又は全部であり、前記標識物質が金コロイドであり、前記第２処理において、前記計測の前に、前記吸着体と、前記吸着体に接触した後の前記検体処理液とを静置又は遠心分離により分け、前記静置又は遠心分離によって生じた上清を除去した後で、前記計測を比色法で行う、［１］に記載の検査方法。

［１０］［１］～［９］の何れか一項に記載の検査方法又は本明細書に記載の検査方法を実施するための、作用物質Ｂ、被作用物質Ｃ、標識物質、粒子状不溶性担体、及び粒子状不溶性担体を有する吸着体、からなる群から選択される１つ以上の使用。

［１１］被検出物質Ａが検体に含まれるか否かを検査するための検査キット

を製造するための、作用物質Ｂ、被作用物質Ｃ、標識物質、粒子状不溶性担体、及び粒子状不溶性担体を有する吸着体、からなる群から選択される１つ以上の使用であって、検査キットは［１］～［９］の何れか一項に記載の検査方法又は本明細書に記載の検査方法に使用される。検査キットは、作用物質Ｂ、被作用物質Ｃ、標識物質、粒子状不溶性担体、及び粒子状不溶性担体を有する吸着体、からなる群から選択される１つ以上を含む液剤を１つ以上任意に組み合わせて備えることが好ましい。例えば、作用物質Ｂ及び標識物質を含む第１の液剤と、被作用物質Ｃが粒子状不溶性担体に担持されてなる吸着体を含む第２の液剤とを備える検査キットが挙げられる。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、被検出物質Ａ（実施形態の一例：中和抗体）が検体に含まれるか否かを簡便に検査することができる。

被作用物質Ｃ（実施形態の一例：ＡＣＥ２）は不溶性担体に担持されており、この不溶性担体と検体処理液を混合するため、検体処理液中の成分と充分に接触できる。このため、被作用物質Ｃと作用物質Ｂ（実施形態の一例：Ｓ１）とが結合する機会が充分に得られる。

また、被作用物質Ｃは不溶性担体に担持されているので、湿潤状態に保ちやすく、被作用物質Ｃの作用物質Ｂに対する結合力（結合機能）を充分に保持することができる。

また、被作用物質Ｃは不溶性担体に担持されているので、１つの検体の量（検体処理液の体積）が増えても、検体処理液に接触させる前記不溶性担体の量を増やすことは容易である。つまり、従来のイムノクロマト法では微量（数μＬ～数百μＬ）の検体しか取り扱えないが、本発明にあっては上限なく１つの検体の量を増やすことが可能である。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]金コロイドにストレプトアビジンを結合させる処理の概念図である。

[図2]金コロイドで標識されたＳ１タンパク質を得る処理の概念図である。

[図3]ＡＣＥ２が表面に担持されたアガロースビーズを得る処理の概念図であ

る。

[図4]夾雑物質の存在下で、ＡＣＥ２ビーズにＳ１タンパク質－金コロイドが捕捉される様子の概念図である。

[図5]非中和抗体の存在下で、ＡＣＥ２ビーズにＳ１タンパク質－金コロイドが捕捉される様子の概念図である。

[図6]中和抗体の存在下で、ＡＣＥ２ビーズにＳ１タンパク質－金コロイドが捕捉される様子の概念図である。

[図7]中和抗体及び非中和抗体の存在下で、ＡＣＥ２ビーズにＳ１タンパク質－金コロイドが捕捉される様子の概念図である。

[図8]実施例１～２の結果の一つを示す写真である。

[図9]実施例１～２の結果の一つを示す写真である。

[図10]実施例１～２の結果の一つを示すグラフである。

[図11]非特許文献１の検査方法の要点を説明するための模式図である。

[図12]実施例３～４の結果を示すグラフである。

[図13]実施例５～６の結果を示すグラフである。

[図14]実施例７～８の結果の一つを示す写真である。

[図15]実施例７～８の結果を示すグラフである。

[図16]実施例９～１０の結果を示すグラフである。

[図17]実施例１１の結果の一つを示す写真である。

[図18]実施例１１の結果を示すグラフである。

[図19]実施例１１の結果を近似する曲線を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 以下、本発明の実施形態について図面を参照しながら説明する。

[0014] 本発明の一態様は、被検出物質Ａが検体に含まれるか否かを検査する方法である。被検出物質Ａは、例えば、作用物質Ｂに結合することにより、作用物質Ｂと被作用物質Ｃが所定の様式で結合することを阻害するものである。本態様の検査方法は、少なくとも下記の第１処理及び第２処理をこの順で行うことが好ましい。また、第１処理及び第２処理に加えて任意に他の処理を

行ってもよい。

[0015] 第１処理は、前記検体と、標識物質が結合した作用物質Ｂと、を含む検体処理液を得る処理である。

第２処理は、被作用物質Ｃを担持した粒子状不溶性担体を有する吸着体を、前記検体処理液に接触させた後、前記吸着体に対する前記標識物質の吸着量を計測する処理である。

[0016] 前記検体は、被検出物質Ａが含まれているか否かを検査する検査対象である。検査対象として、例えば、生体に由来する試料が挙げられる。ここではウイルスも生体に該当するものとする。

生体試料として、例えば、血液（全血）、血清、血漿、リンパ液、涙、唾液、鼻水、喀痰、皮脂、鼻腔や咽頭の付着物、尿、汗、糞便、その他の体液等が挙げられる。これらの生体試料は、必要に応じて適当な液性媒体に溶解又は分散することにより、液性試料とすることができる。

[0017] 生体試料として血液（全血）を用いる場合、血液中の血球成分、特に赤血球が混入すると、比色試験を妨害し、正確な値を得ることができない場合があるため、第１処理の前に、血清や血漿を得る前処理を行うことが好ましい。前処理の方法として、例えば、遠心分離法（上清を回収する）、ガラス繊維濾紙や血球成分が完全に通過できないポアサイズの多孔性シートによるフィルター法、多孔性膜担体を用いた分離法、コンドロイチン硫酸などとの接触により赤血球を凝集させた後に上清を回収する方法等が挙げられる。好ましい前処理方法としては、コンドロイチン硫酸などとの接触により赤血球を凝集させた後に上清を回収する方法である。

[0018] 被検出物質Ａは、本態様の検査方法によって定性的又は定量的に検出する物質である。このような物質の例として、例えば、物質ｂと物質ｃが相互作用する（例えば互いに結合する）ことを阻害する物質ａが挙げられる。

被検出物質Ａは、例えば生体由来物質であり、タンパク質、脂質又は核酸が挙げられる。

前記タンパク質として、例えば抗体が挙げられる。一般に抗体は抗原の特

定部位（エピトープ）に結合することが知られている（抗原抗体反応）。抗原の一例は、病原体そのもの又は病原体に由来するものである。抗原に結合することにより抗原の機能を阻害する抗体は、中和抗体と呼ばれる。一方、抗原に結合するが、結合された抗原の機能を阻害しない抗体は、非中和抗体と呼ばれる。

[0019] 作用物質Ｂと被作用物質Ｃは、例えば、互いに物理的な接触を介して相互作用するものである。作用物質Ｂと被作用物質Ｃは、所定の様式で互いに結合するものであることが好ましい。

[0020] 本態様の検査方法において、被検出物質Ａは、作用物質Ｂに結合することにより、作用物質Ｂと被作用物質Ｃが所定の様式で結合することを阻害するものである、という関係性を有することが好ましい。

[0021] 前記関係性を有する例として、被検出物質Ａが中和抗体であり、作用物質Ｂが病原体に由来する生体物質（例えばタンパク質）であり、被作用物質Ｃは前記病原体が感染する細胞に由来する生体物質（例えばタンパク質）である場合が挙げられる。

ここで、前記病原体に由来する生体物質は、自然界に存在するときのネイティブ（native）な状態又はインタクト（intact）な状態であってもよいし、前記所定の様式で結合する機能が損なわれない範囲で人為的に改変された状態であってもよい。

[0022] 前記病原体として、例えば、コロナウイルス、インフルエンザウイルス等のウイルスが挙げられる。コロナウイルスとして、例えば新型コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）が挙げられる。

[0023] 前記関係性を有する例として、被検出物質Ａが中和抗体であり、作用物質Ｂは、コロナウイルスが有するスパイクタンパク質の一部又は全部であり、被作用物質Ｃは、前記コロナウイルスが感染するヒト又は動物の細胞が有する受容体タンパク質の一部又は全部である場合が挙げられる。

前記スパイクタンパク質の一部としては、例えば、前記受容体に対する結合ドメイン（ＲＢＤ）を含むものが挙げられる。

前記受容体としては、例えば、アンジオテンシン変換酵素２（ＡＣＥ２）、シアル酸受容体等が挙げられる。

なお、新型コロナウイルスは、スパイクタンパク質（例えばＳ１タンパク質）をＡＣＥ２に所定の様式で結合することにより、細胞内へ侵入して感染することが知られている。

[0024] 前記関係性を有する例として、被検出物質Ａが中和抗体であり、作用物質Ｂは、インフルエンザウイルスが有するＨＡタンパク質の一部又は全部であり、被作用物質Ｃは、前記インフルエンザウイルスが感染するヒト又は動物の細胞が有する、シアル酸若しくは受容体タンパク質の一部又は全部である場合が挙げられる。

なお、インフルエンザウイルスは、ＨＡタンパク質を、シアル酸を有する電位依存性Ca^{2+}チャネル（受容体）に所定の様式で結合することにより、細胞内へ侵入して感染することが知られている。

[0025] 第１処理において、前記検体と、標識物質が結合した作用物質Ｂと、を含む検体処理液を得る方法としては、例えば、前記検体と作用物質Ｂを任意の液体中で接触させる方法が挙げられる。

具体的には、例えば、血液とＳ１タンパク質（以下、Ｓ１ということがある）とをｐＨ緩衝液中で接触させ、これらが含まれた検体処理液を得る方法が挙げられる。血液にＳ１に結合する抗体が含まれている場合、検体処理液中でＳ１－抗体複合体が形成される。ここでｐＨ緩衝液は、検体処理液中で前記複合体の形成が安定に行われるｐＨ範囲に調整するものである。

[0026] 第１処理で使用する作用物質Ｂには予め標識物質が結合されていることが好ましい。つまり、前記検体処理液において被検出物質Ａが作用物質Ｂに結合する前に、作用物質Ｂに予め標識物質が結合されていることが好ましい。

前記標識物質は、任意の方法でその存在を検知することが可能なものであれば特に制限されない。前記標識物質としては、例えば、金属粒子、色素、顔料、酵素、蛍光物質、発光物質、放射性同位元素、ビオチン、アビジン若しくはストレプトアビジン、ポリリジン、ポリヒスチジン等が挙げられる。

また、これらの標識物質の何れかを含有する又は担持する担体が挙げられる。このような担体としては、例えば、ラテックス、アガロース、ポリスチレン等の高分子化合物によって形成された粒子や、シリカ、金属等の無機物質によって形成された粒子が挙げられる。

[0027] 好ましい標識物質として、金コロイド（水等の分散媒に分散してコロイド状態になり得る金粒子）が挙げられる。金コロイドの色は、液の状態や金微粒子の粒子径によって変わるが、例えば後述する比色法では、被験出物質Ａの検出感度や精度の点から赤色が好ましく、この場合、金コロイドは赤色の微粒子であると理解してもよい。

金コロイドの形状は特に制限されず、例えば、球状、棒状、板状、ウニ状等の種々の形状が挙げられる。

金コロイドの平均粒子径は、例えば、５ｎｍ～４００ｎｍであることが好ましい。Ｓ１タンパク質に結合させる金コロイドの平均粒子径は、結合が容易であり、検出も容易であることから、１０ｎｍ～８０ｎｍであることが好ましい。例えば、免疫染色に使用される一般的な金コロイドを前記標識物質として使用することができる。

金コロイド以外の好ましい標識物質としては、ポリスチレンマイクロスフェア（ポリスチレンを構成成分とする）が挙げられる。ポリスチレン中に着色剤が内部まで染色されている標準品が市販されている。ポリスチレンマイクロスフェアの色は、着色剤の種類によって変わり、具体的には赤色、黄色、黒色、青色、紫色、橙色、緑色が挙げられるが、例えば後述する比色法では、被験出物質Ａの検出感度や精度の点から青色、赤色が好ましく、この場合、ポリスチレンマイクロスフェアは青色、赤色の微粒子であると理解してもよい。

ポリスチレンマイクロスフェアの平均粒子径は、例えば、０．０２μｍ～１５０μｍであることが好ましい。Ｓ１タンパク質に結合させるポリスチレンマイクロスフェアの平均粒子径は、結合が容易であり、検出も容易であることから、０．１μｍ～２０μｍであることが好ましい。

[0028] 前記標識物質は作用物質Ｂに直接に結合していてもよいし、連結体（リンカー）を介して間接的に結合していてもよい。

前記標識物質が作用物質Ｂに結合する方法としては、例えば、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力等による受動吸着が挙げられる。また、前記標識物質及び作用物質Ｂの少なくとも一方が有するカルボキシ基、アミノ基、チオール基、ヒドロキシ基等の反応性基の反応によって形成される共有結合が挙げられる。また、前記標識物質及び作用物質Ｂのうち、一方が有するプロテインＡ、プロテインＧ、又はプロテインＬと、他方が有する抗体又はその一部とのアフィニティ結合が挙げられる。また、前記標識物質及び作用物質Ｂのうち、一方が有するアビジン又はストレプトアビジンと、他方が有するビオチンとのアフィニティ結合が挙げられる。

前記標識物質による作用物質Ｂの標識は、バイオ実験の一般的な技法（受動吸着標識、共有結合標識、アフィニティ結合標識）によって行うことができる。

[0029] 第２処理において使用する、被作用物質Ｃを担持するための不溶性担体は、被作用物質Ｃが外部から作用を受けることが可能な状態で担持できるものであればよい。ここで、不溶性であるとは、前記検体処理液中において溶解せずに元の形態を保持し得る性質をいう。

前記不溶性担体を構成する材料としては、例えば、バイオ実験において一般的に利用されるアガロース、デキストラン、セルロース、ニトロセルロース等の多糖類や、アクリルアミド等の重合体によって形成されたヒドロゲルが挙げられる。また、ポリスチレンやポリプロピレン等の合成樹脂、セラミックス、金属（磁性体）が挙げられる。

前記不溶性担体の色は、後述する比色法において標識物質の色を識別することが容易になることから、標識物質と異なる色であればよく、例えば、透明無色、半透明の白色、又は不透明の白色であることが好ましい。これらの色の不溶性担体は、上記の材料によって不溶性担体を形成すれば容易に得られる。

前記不溶性担体の形態は、例えば、粒子状、糸（ストランド）状、網状、多孔質状、ファイバー状等が挙げられる。ただし、前記不溶性担体は、イムノクロマト法で使用されるニトロセルロース膜とは異なるものであること、すなわち、ニトロセルロースシート（フィルム、膜）以外の不溶性担体であることが好ましい。検体処理液との接触効率を高める観点から、粒子状であることがより好ましい。

前記粒子の形状は特に制限されず、球状、棒状、板状、ウニ状等の種々の形状が挙げられる。

[0030] 前記粒子の平均粒子径は、例えば、１μｍ～１０ｍｍが好ましく、１０μｍ～１０００μｍがより好ましく、２０μｍ～５００μｍがさらに好ましく、４０μｍ～２００μｍが特に好ましい。

上記範囲の下限値以上であると、粒子の表面に充分な量の被作用物質Ｃを担持することが容易になる。また、粒子と上清の分離も容易になる。

上記範囲の上限値以下であると、前記検体処理液中における分散性が高まり、また第２処理において検体処理液との接触頻度が高くなるので、作用物質Ｂに対する接触が容易になる。

なお、前記粒子の平均粒子径は、ロータップ法、レーザー回折散乱法、コールターカウンター式電気抵抗法、光学顕微鏡法等を用いて測定することができ、コールターカウンター式電気抵抗法や光学顕微鏡法で測定される個数分布平均粒子径であることが好ましい。

[0031] このような粒子状の不溶性担体としては、例えば、バイオ実験に使用される市販のアガロースビーズ（平均粒子径：４０μｍ～２００μｍ程度）や磁性ビーズ（平均粒子径：１μｍ～１０μｍ程度）が挙げられる。

[0032] 被作用物質Ｃは不溶性担体に直接に結合していてもよいし、連結体（リンカー）を介して間接的に結合していてもよい。

被作用物質Ｃが不溶性担体に結合する方法としては、例えば、静電相互作用、疎水性相互作用、水素結合、ファンデルワールス力等による受動吸着が挙げられる。また、被作用物質Ｃ及び不溶性担体の少なくとも一方が有する

カルボキシ基、アミノ基、チオール基、ヒドロキシ基等の反応性基の反応によって形成される共有結合が挙げられる。また、被作用物質Ｃ及び不溶性担体のうち、一方が有するアルキン（アルキニル基）と、他方が有するアジド（アジド基）の反応によって形成される共有結合が挙げられる。また、被作用物質Ｃ及び不溶性担体のうち、一方が有するプロテインＡ、プロテインＧ、プロテインＬと、他方が有する抗体又はその一部とのアフィニティ結合が挙げられる。また、被作用物質Ｃ及び不溶性担体のうち、一方が有するアビジン又はストレプトアビジンと、他方が有するビオチンとのアフィニティ結合が挙げられる。

被作用物質Ｃを不溶性担体に担持させる方法は、バイオ実験の一般的な技法（受動吸着標識、共有結合標識、アフィニティ結合標識）を適用することができる。

[0033] 吸着体が有する不溶性担体は被作用物質Ｃを担持しており、被作用物質Ｃが安定に保たれる状態で吸着体を保管することが容易である。例えば、温度管理されたｐＨ緩衝液中で保管することができる。また、不溶性担体に被作用物質Ｃを担持させる製造工程だけでなく、吸着体を第２処理で使用する時まで、被作用物質Ｃを一度も乾燥させることなく、湿潤状態に保つことができる。このため、被作用物質Ｃがタンパク質である場合、被作用物質Ｃの乾燥による変性を防止し、作用物質Ｂに対する結合力（結合機能）を充分に保持することができる。

[0034] 第２処理において、吸着体を前記検体処理液に接触させる方法としては、例えば、前記検体処理液に吸着体を添加する方法が挙げられる。

具体的には、例えば、ＡＣＥ２が担持されたアガロースビーズからなる吸着体を前記検体処理液に添加して穏やかに撹拌する方法が挙げられる。また、ＡＣＥ２が担持されたアガロースビーズからなる吸着体が充填されたカラムに、前記検体処理液を流す方法が挙げられる。

[0035] 吸着体が有する被作用物質Ｃの量は、前記検体処理液に含まれる作用物質Ｂの量よりも多いことが好ましい。この量比であると、一部の作用物質Ｂが

結合することによって吸着体の被作用物質Ｃが飽和し、残りの作用物質Ｂが吸着体に結合できずに前記検体処理液中に残存することを防止することができる。ここで、各物質の量比は、質量基準で定められてもよいし、個数基準（モル比）で定められてもよい。

[0036] 前記検体処理液に前記標識物質によって標識されたＳ１が含まれている場合、そのＳ１と、吸着体が有するＡＣＥ２とが結合する性質を利用して、吸着体を前記標識物質によって標識することができる。ただし、前記検体処理液にＳ１とＡＣＥ２の結合を阻害する中和抗体が含まれている場合、吸着体の少なくとも一部は標識されない。

[0037] 第２処理において、吸着体に対する前記標識物質の吸着量を計測する方法は、前記標識物質を定性的又は定量的に計測できる方法であれば特に制限されず、前記標識物質の性質に応じて適宜選択される。

例えば、前記標識物質が吸着体と異なる色として視認できるものである場合、吸着体の色の変化を計測することにより、前記標識物質が吸着体に吸着したことが分かる。さらに吸着体の色の変化の程度を計測することにより、吸着体に吸着した前記標識物質を定量することができる。

吸着体の色の変化を計測する方法は特に制限されず、公知の比色法を適用することができ、例えば、目視による計測、画像解析による計測、比色分析装置による計測等が挙げられる。

[0038] 第２処理において、前記計測を行う前に、吸着体と、吸着体に接触した後の前記検体処理液とをより分けることが好ましい。より分けておくことにより、吸着体に結合しない状態で前記検体処理液に含まれている前記標識物質を、吸着体から離れた位置におけるので、前記計測の精度を高めることができる。

より分ける方法としては、例えば、自然沈降、遠心分離、濾過、磁性分離等が挙げられる。より分けた後、分取した吸着体について前記計測を行うことが好ましい。

[0039] 第２処理で計測した前記吸着量が、予め任意に定めた所定値よりも小さい

場合、前記検体に被検出物質Ａが含まれると判定することができる。一方、前記吸着量が、前記所定値よりも大きい場合、前記検体に被検出物質Ａが含まれないと判定することができる。

また、前記吸着量が上限の飽和値よりも少なくなる程、前記検体に含まれる被検出物質Ａの量が多いと判定できる。一方、前記吸着量が上限の飽和値に達している場合、前記検体に含まれる被検出物質Ａの量は検出限界以下であるとみなせる。

被検出物質Ａが含まれる濃度を段階的に高めた標準試料を用いて、被検出物質Ａの濃度と前記吸着量の対応関係を予め調べておき、検量線を作成しておくと、検体に含まれる被検出物質Ａの濃度を高い精度で推定することができる。

また、検量線を作成する場合、検体自身の色の影響を排除するため、上清の色を計測し、吸着体の色の計測値を補正することで、検量線の精度を向上することができる。

[0040] ＜具体的な実施形態の一例＞

本態様の検査方法の一例として、検体が血液であり、被検出物質Ａが中和抗体であり、作用物質ＢがＳ１であり、被作用物質ＣがＡＣＥ２であり、標識物質が金コロイドである場合について、ここでまとめて簡単に説明する。

まず、金コロイドにストレプトアビジンを結合させる（図１参照）。予めビオチンが結合されたＳ１タンパク質を準備し、これにストレプトアビジンが結合した金コロイドを混ぜると、金コロイドで標識されたＳ１タンパク質「Ｓ１タンパク質－金コロイド」が得られる（図２参照）。また、予めプロテインＡが結合されたアガロースビーズに、予めＩｇＧのＦｃ領域が融合されたＡＣＥ２を混ぜると、ＡＣＥ２が表面に担持されたアガロースビーズ「ＡＣＥ２ビーズ」が得られる（図３参照）。

通常、血液にはＡＣＥ２と相互作用しない夾雑物質が含まれている。この血液にＳ１タンパク質－金コロイドを混合した後、さらにＡＣＥ２ビーズを混合すると、ＡＣＥ２ビーズにＳ１タンパク質－金コロイドが捕捉される（

図４参照）。つまり、夾雑物質はＡＣＥ２とＳ１の結合を阻害しないので、夾雑物質は無視することができる。

さて、血液に非中和抗体が含まれている場合、この血液にＳ１タンパク質－金コロイドを混合すると、Ｓ１タンパク質に非中和抗体が結合する。その後、さらにＡＣＥ２ビーズを混合すると、ＡＣＥ２ビーズにＳ１タンパク質－金コロイドが捕捉される（図５参照）。

一方、血液に中和抗体が含まれている場合、この血液にＳ１タンパク質－金コロイドを混合すると、Ｓ１タンパク質に中和抗体が結合する。その後、さらにＡＣＥ２ビーズを混合すると、中和抗体が結合したＳ１タンパク質はＡＣＥ２ビーズに結合せず、中和抗体が結合していない残りのＳ１タンパク質のみがＡＣＥ２ビーズに捕捉される（図６参照）。つまり、検体に中和抗体が含まれている場合、ＡＣＥ２ビーズに捕捉されるＳ１タンパク質－金コロイドが少なくなる。同様の結果は、検体に中和抗体及び非中和抗体が含まれている場合にも得られる（図７参照）。

従って、ＡＣＥ２ビーズに吸着した金コロイドを計測することにより、血液に中和抗体が含まれるか否かを検査することができる。

[0041] 本態様の実施形態の一例として、検体が血液であり、被検出物質Ａが中和抗体であり、作用物質ＢがＳ１であり、被作用物質ＣがＡＣＥ２であり、標識物質が金コロイドである場合の検査器具について説明する。

生体試料として血液（全血）を用いる場合、夾雑物質はＡＣＥ２とＳ１の結合を阻害しないので、通常夾雑物質は無視することができるが、赤血球は比色試験を妨害し、正確な値を得ることができない場合があるため、第１処理の前に、血清や血漿を得る前処理が行えることが好ましく、前記前処理と第１処理と第２処理が一つの検査器具に組み込まれている実施形態が好ましい。

具体的には、フィルター一体型ろ過バイアル（例えば、サイティバ製「ミニユニG」）のフィルター部を、ガラス繊維濾紙や血球成分が完全に通過できないポアサイズの多孔性シートによるフィルターに置換し、「Ｓ１タンパク質

－金コロイド」をサンプル注入部に充てんし、ろ液捕集部には「ＡＣＥ２ビーズ」を充てんした検査器具が挙げられる。なお、「Ｓ１タンパク質－金コロイド」をサンプル注入部に充てんせず、フィルターに含浸させてもよく、また、別途含浸させたフィルターを装着してもよい。血液をサンプル注入部に充てんしろ過処理を行うと、前処理と第１処理が同時に進行し、ろ液捕集部には第１処理された検体処理液が捕集される。また、サンプル注入部にトロンビン等の血液凝固因子を加えると、赤血球のろ過をより効率的に実施できるため好ましい。血液凝固因子を加える場合は、上記フィルターの材質やポアサイズは限定されない。

ろ液捕集部において第２処理が行われるため、中和抗体が含まれていない場合、ＡＣＥ２ビーズにＳ１タンパク質－金コロイドが捕捉される。一方、中和抗体が含まれている場合、ＡＣＥ２ビーズに捕捉されるＳ１タンパク質－金コロイドが少なくなる。ろ液捕集部のＡＣＥ２ビーズに吸着した金コロイドを計測することにより、血液に中和抗体が含まれるか否かを検査することができる。また、予め中和抗体量と対応した色味見本を準備し、ＡＣＥ２ビーズの色と対比させることで、中和抗体量を推定することも可能である。

検査器具の別の一例としては、ヘッド部にパッドが装着された遠心用チューブ本体（例えば、栄研化学製「かんたんチューブ　‘栄研’」）のチューブ本体に「Ｓ１タンパク質－金コロイド」、赤血球を凝集させるコンドロイチン硫酸、「ＡＣＥ２ビーズ」を含有させた検査器具が挙げられる。なお、「Ｓ１タンパク質－金コロイド」はチューブ本体に含有させず、パッド部に含浸させてもよく、また、別途含浸させたパッドを装着してもよい。血液をパッド部に染み込ませ、検査器具を遠心機で遠心処理すると、パッド部もしくはチューブ本体内で第１処理され、コンドロイチン硫酸の分離部を通過することで前処理が完了する。続いて、「ＡＣＥ２ビーズ」との接触により第２処理が行われるため、血液に中和抗体が含まれていない場合、ＡＣＥ２ビーズにＳ１タンパク質－金コロイドが捕捉される。一方、中和抗体が含まれている場合、ＡＣＥ２ビーズに捕捉されるＳ１タンパク質－金コロイドが少なく

なる。捕集部のＡＣＥ２ビーズに吸着した金コロイドを計測することにより、血液に中和抗体が含まれるか否かを検査することができる。また、予め中和抗体量と対応した色味見本を準備し、ＡＣＥ２ビーズの色と対比させることで、中和抗体量を推定することも可能である。

実施例

[0042] ＜標識物質の準備＞

ストレプトアビジンに４ｍＭリン酸ナトリウムバッファー（ｐＨ６．７９）を加え、３３０μｇ／ｍＬとなるように調製したストレプトアビジン液を得た。

１８００μＬの２０ｎｍ金コロイド液に対して７２μＬの１００ｍＭリン酸ナトリウムバッファー（ｐＨ６．７９）を加え、その後、上記ストレプトアビジン液を１８０μＬ添加した。室温（２０～２５℃、以下の室温記載も同様）で攪拌しながら３０分間インキュベーションして反応させた後、反応液を遠心し（６，５００ｇ、４℃、３０分）、上清を除去し、沈殿ａを得た。

ＢＳＡ（ウシ血清アルブミン）に３０ｍＭトリスバッファー（ｐＨ７．５）を加え、０．１％ｗ／ｖとなるように調製したＢＳＡ液を得た。

上記沈殿ａを１８００μＬのＢＳＡ液に懸濁した後、懸濁液を遠心して再び沈殿させる処理（懸濁・遠心処理によるバッファー置換処理）を１回繰り返した。このようにして得た液を「ストレプトアビジン-金コロイド液」として、後の実験に使用した（図１参照）。

なお、金コロイド（金微粒子の集合体）は、赤色に見える標識物質である。

[0043] ＜作用物質Ｂの標識＞

ストレプトアビジン-金コロイド液４０μＬに、１．５μＬのビオチン－Ｓ１タンパク質溶液（５０μｇ／ｍＬ）、７μＬの３０ｍＭトリスバッファー（ｐＨ７．０）及び０．５μＬの１０％Ｔｗｅｅｎ２０溶液（前記トリスバッファーに溶解されたもの）を添加した。この混合液を室温で攪拌しながら

５分間インキュベーションし、得られた液を「Ｓ１タンパク質－金コロイド液」として、後の実験に使用した（図２参照）。

[0044] ＜被作用物質Ｃを担持した吸着体の準備＞

１００μＬのプロテインＡビーズ懸濁液（ビーズ含量が５０％ｖ／ｖとなるように３０ｍＭトリスバッファー（ｐＨ７．０）に懸濁されたもの）に、７．６３μＬのＦｃ－ＡＣＥ２溶液（１．３１ｍｇ／ｍＬ）を加え、４℃にて１６時間反応させた。この反応によりＦｃ－ＡＣＥ２が、ビーズ表面に担持されたプロテインＡに結合した。この反応を経たビーズを、以下では単にビーズということがある。

続いて上記の反応液を１２，０００ｇ、４℃、１分間の条件で遠心し、ビーズを沈殿させた。上清を除去し、ビーズと同体積の上記トリスバッファーを加え、遠心により再度ビーズを沈殿させる処理（懸濁・遠心処理によるバッファー置換処理）を数回繰り返し、最後に得た懸濁液を「ＡＣＥ２ビーズ懸濁液」として、後の実験に使用した（図３参照）。

[0045] ＜検体の準備＞

新型コロナウイルス（ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２）のＳ１の特定部位（ＲＢＤドメイン）に結合し、Ｓ１とＡＣＥ２の結合を阻害することが確認されている市販の中和抗体（マウス由来中和抗体）の溶液（濃度１ｍｇ／ｍｌ）を「検体１」として、後の実験に使用した。

一般に、新型コロナウイルスのＳ１タンパク質に結合するが、Ｓ１とＡＣＥ２の結合を阻害しない抗体を非中和抗体という。本実施例で使用する上記のビオチン－Ｓ１タンパク質は、組換えタンパク質であり、Ｓ１のＡＣＥ２に対する結合機能を阻害しないＣ末端側にＨｉｓタグを含む。従い、本実施例では、Ｈｉｓタグに結合する抗体を非中和抗体として使用した。具体的には、市販のＨｉｓタグ抗体（マウス由来）の溶液（濃度１ｍｇ／ｍｌ）を「検体２」として、後の実験に使用した。

[0046] ［実施例１］

（第１処理）

１μＬの「検体１」に、４９μＬの「Ｓ１タンパク質－金コロイド液」を加え、穏やかに攪拌しながら、４℃で６０分間反応させた（図６参照）。

[0047]（第２処理）

上記の反応液（検体処理液）から２０μＬを分取し、これに２５μＬの「ＡＣＥ２ビーズ懸濁液」を加え、穏やかに撹拌しながら、室温で３０分間反応させた（図６参照）。

上記の反応液を１０分程度静置し、自然にビーズを沈殿させた。この状態の反応液を含むマイクロチューブを図８の写真（中和抗体と表示した方）に示す。目視したところ、上清の色は濃い赤色であり、沈殿したビーズの色は元の白色に近い薄い赤色であった。

次に、上清を除去して、沈殿したビーズが底部に付着したマイクロチューブを、天地逆さまに置いた様子を図９の写真（中和抗体と表示した方）に示す。目視したところ、チューブに付着したビーズの色は元の白色に近い薄い赤色であった。

さらに、撮影した写真について、公知の画像解析ソフトウェア（Image Ｊ1.52a 、米国National Institutes of Health製）を使用して、ビーズの赤味を測定した。この結果を図１０のグラフ（中和抗体と表示した方）に示す。測定した赤味は、４８．６（任意単位）であった。

なお、上記の測定値にはビーズが本来的に有する色味の値（赤味＝３０）を含む。

以下の別の実施例においても各測定値にはビーズが本来的に有する色味の値をバックグラウンドとして含む。

[0048] 以上の結果は、ビーズが担持するＡＣＥ２に対して結合したＳ１の量が少ないことを示している。Ｓ１の結合量が基準値（中和抗体が入っていないことが事前に分かっている対照検体を同様に試験した場合の結合量）よりも少ないことは、検体１に中和抗体が含まれていると判定する根拠となる。この判定は、使用した検体１には中和抗体が含まれている事実と符合する。

[0049]［実施例２］

（第１処理）

１μＬの「検体２」に、４９μＬの「Ｓ１タンパク質－金コロイド液」を加え、穏やかに攪拌しながら、４℃で６０分間反応させた（図５参照）。

[0050] （第２処理）

上記の反応液（検体処理液）から２０μＬを分取し、これに２５μＬの「ＡＣＥ２ビーズ懸濁液」を加え、穏やかに撹拌しながら、室温で３０分間反応させた（図５参照）。

上記の反応液を１０分程度静置し、自然にビーズを沈殿させた。この状態の反応液を含むマイクロチューブを図８の写真（非中和抗体と表示した方）に示す。目視したところ、上清の色はほとんど無色透明であり、沈殿したビーズの色は元の白色ではなく、濃い赤色であった。

次に、上清を除去して、沈殿したビーズが底部に付着したマイクロチューブを、天地逆さまに置いた様子を図９の写真（非中和抗体と表示した方）に示す。目視したところ、チューブに付着したビーズの色は元の白色ではなく、濃い赤色であった。

さらに、撮影した写真について、実施例１と同様に画像解析を行い、ビーズの赤味を測定した。この結果を図１０のグラフ（非中和抗体と表示した方）に示す。測定した赤味は、６６．２（任意単位）であった。

[0051] 以上の結果は、ビーズが担持するＡＣＥ２に対して結合したＳ１の量が多いことを示している。Ｓ１の結合量が基準値（中和抗体が入っていないことが事前に分かっている対照検体を同様に試験した場合の結合量）と同程度に多いことは、「検体２に中和抗体が含まれていない」と判定する根拠となる。この判定は、使用した検体２に中和抗体が含まれていない事実と符合する。

[0052] なお、実施例２で使用した「検体２」が中和抗体を含まないことは事前に分かっているので、実施例２の結果は、上記の基準値を定める試験であると理解してもよい。つまり、実施例２の測定値「６６．２」を基準値としたとき、実施例１の測定値「４８．６」は、基準値を大きく下回っているので、

「検体１」に中和抗体が入っていることを事前に知らなくても、実施例１の測定結果から「検体１」に中和抗体が入っていると判定することができる。

[0053] 同様に、中和抗体が入っているか否か未知の検体Ｓを使用した場合においても、実施例１と同様に試験し、その測定結果が予め定めた基準値を下回っていれば、検体Ｓに中和抗体が入っていると判定でき、その測定結果が予め定めた基準値と同等であれば、検体Ｓに中和抗体は含まれていないと判定できる。

[0054] ＜作用物質Ｂの標識（２）＞

１５ｎｍストレプトアビジン-金コロイド液４０μＬに１．５μＬのビオチン－Ｓ１タンパク質溶液（５０μｇ／ｍＬ）、７μＬの３０ｍＬトリスバッファー（ｐＨ７．０）及び０．５μＬの１０％Ｔｗｅｅｎ２０溶液（前記トリスバッファーに溶解されたもの）を添加した。この混合液を室温で攪拌しながら５分間インキュベーションし、得られた液を「Ｓ１タンパク質－金コロイド液（１５ｎｍ）」として後の実験に使用した。

上記と同様に、６０ｎｍストレプトアビジン-金コロイド液を使用して、「Ｓ１タンパク質－金コロイド液（６０ｎｍ）」を調製し、後の実験に使用した。

[0055] ［実施例３］

（第１処理）

１μＬの「検体１」に、４９μＬの「Ｓ１タンパク質－金コロイド液（１５ｎｍ）」を加え、穏やかに攪拌しながら、室温で３０分間反応させた。

[0056] （第２処理）

上記の反応液（検体処理液）から２０μＬを分取し、これに２５μＬの「ＡＣＥ２ビーズ懸濁液」を加え、穏やかに撹拌しながら、室温で３０分間反応させた（図６参照）。

上記の反応液を１０分程度静置し、自然にビーズを沈殿させた。この状態の反応液を含むマイクロチューブの様子は図８と同様であり、目視したところ、上清の色は濃い赤色であり、沈殿したビーズの色は元の白色に近い薄い

赤色であった。

次に、このビーズを撮影した写真について、前記画像解析ソフトウェアを使用し、ビーズの赤味を測定した。この結果を図１２のグラフ（中和抗体と表示した方）に示す。測定した赤味は、９１．４（任意単位）であった。

[0057] ［実施例４］

検体の種類を「検体２」に変更した以外は、実施例３と同様に行った。最終的に沈殿して得たビーズの色は目視で濃い赤色であった。その結果を図１２のグラフ（非中和抗体と表示した方）に示す。測定したビーズの赤味は、１０５．７（任意単位）であった。

[0058] ［実施例５］

作用物質Ｂの種類を「Ｓ１タンパク質－金コロイド液（６０ｎｍ）」に変更した以外は、実施例３と同様に行った。その結果を図１３のグラフ（中和抗体と表示した方）に示す。測定したビーズの赤味は、１１４．２（任意単位）であった。

[0059] ［実施例６］

検体の種類を「検体２」に変更した以外は、実施例５と同様に行った。その結果を図１３のグラフ（非中和抗体と表示した方）に示す。測定したビーズの赤味は、１２８．０（任意単位）であった。

[0060] ＜標識物質の準備（２）＞

２００μＬの０．５μｍ青着色ポリスチレンマイクロスフェア（以下では単に青着色剤ということがある）に１００ｍＭホウ酸バッファー（ｐＨ８．５）を５００μＬ加え、１４，０００ｇ、４℃、１０分間の条件で遠心し、青着色剤を沈殿させた。上清を除去し、５００μＬの上記ホウ酸バッファーを加え、遠心により再度青着色剤を沈殿させる処理（懸濁・遠心によるバッファー置換処理）を２回繰り返し、最後に２００μＬの３０ｍＭリン酸ナトリウムバッファー（ｐＨ７．０）に懸濁させた液を「青着色剤液」として、後の実験に使用した。

[0061] ＜作用物質Ｂの標識（３）＞

８μＬの青着色剤液を１９２μＬの上記リン酸ナトリウムバッファーにて希釈した後、７．５μＬの非標識Ｓ１タンパク質（５００μｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳで調製）を添加し、この混合液を４℃で攪拌しながら１６時間インキュベーションした。この反応により、非標識Ｓ１タンパク質が青着色剤に受動的に結合した。１４，０００ｇ、４℃、１０分間の条件で遠心し、青着色剤で標識されたＳ１タンパク質を沈殿させた。上清を除去し、５００μＬのＰＢＳを加え、遠心により再度沈殿させる処理（懸濁・遠心によるバッファー置換処理）を２回繰り返し、最後に２００μＬのＰＢＳで懸濁させた液を「青着色Ｓ１液」として、後の実験に使用した。

[0062] ＜被作用物質Ｃを担持した吸着体の準備（２）＞

１００μＬのストレプトアビジンビーズ懸濁液（ビーズ含量が５０％ｖ／ｖとなるようにＰＢＳに懸濁されたもの）に、１２μＬのビオチン－ＡＣＥ２溶液（０．２５ｍｇ／ｍＬ）を加え、４℃にて１時間反応させた。この反応によりビオチン－ＡＣＥ２が、ビーズ表面に担持されたストレプトアビジンに結合した。この反応を経たビーズを、以下では単にビーズということがある。

続いて上記の反応液を１４，０００ｇ、４℃、１分間の条件で遠心し、ビーズを沈殿させた。上清を除去し、ビーズと同体積のＰＢＳを加え、遠心により再度ビーズを沈殿させる処理（懸濁・遠心処理によるバッファー置換処理）を数回繰り返し、最後に得た懸濁液を「ＡＣＥ２ビーズ懸濁液（＃２）」として、後の実験に使用した。

[0063] ［実施例７］

（第１処理）

２μＬの「検体１」に、４０μＬの「青着色Ｓ１液」及び８μＬのＰＢＳを加え、穏やかに攪拌しながら、室温で３０分間反応させた。

[0064] （第２処理）

上記の反応液（検体処理液）から５０μＬを分取し、これに１５μＬの「ＡＣＥ２ビーズ懸濁液（＃２）」を加え、穏やかに撹拌しながら、室温で３

０分間反応させた。

上記の反応液を１０分程度静置し、自然にビーズを沈殿させた。この状態の反応液を含むマイクロチューブを図１４の写真（中和と表示した方）に示す。目視したところ、上清の色は濃い青色であり、沈殿したビーズの色は元の白色に近い薄い青色であった。

次に、撮影した写真について、前記画像解析ソフトウェアを使用して、ビーズの青味を測定した。この結果を図１５のグラフ（中和抗体と表示した方）に示す。測定したビーズの青味は、９６．２（任意単位）であった。

[0065] ［実施例８］

検体の種類を「検体２」に変更した以外は、実施例７と同様に行った。最終的に沈殿して得たビーズの色は目視で濃い青色であった。その結果を図１５のグラフ（非中和抗体と表示した方）に示す。測定したビーズの青味は、１５１．８（任意単位）であった。

[0066] ＜検体の準備（２）＞

インフルエンザウイルス（Ｈ１０Ｎ８型）のＨＡタンパク質の特定の部位に結合し、ＨＡタンパク質とシアル酸の結合を阻害することが確認されている市販のＨＡ中和抗体（マウス由来中和抗体）の溶液（濃度１ｍｇ／ｍＬ）を「検体３」として、後の実験に使用した。

インフルエンザウイルスのＨＡタンパク質に結合するが、ＨＡタンパク質とシアル酸の結合を阻害しない抗体を非中和抗体という。後述の実施例で使用するＨＡタンパク質は、組換えタンパク質であり、ＨＡタンパク質のシアル酸に対する結合機能を阻害しないＣ末端側にＨｉｓタグを含む。従って、後述の実施例においても、Ｈｉｓタグに結合する抗体を非中和抗体として使用した。具体的には、前記「検体２」を使用した。

[0067] ＜作用物質Ｂの標識（４）＞

５００μＬの２０ｎｍ金コロイド液に対して２０μＬの１００ｍＭトリスバッファー（ｐＨ７．０）を加え、その後、５０μＬのＨＡタンパク質（２５０μｇ／ｍＬとなるように４ｍＭトリスバッファー（ｐＨ７．０）で調製

したもの）を添加し、この混合液を室温で攪拌しながら３０分間インキュベーションした。この反応により、ＨＡタンパク質が金コロイドに受動的に結合した反応液を得た。

続いて、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）に４ｍＭトリスバッファー（ｐＨ７．０）を加え、ＢＳＡ濃度０．１％ｗ／ｖとなるように調製したＢＳＡ液を得た。

上記反応液に上記ＢＳＡ液５００μＬを添加し、室温で攪拌しながら３０分間インキュベーションした後、６，５００ｇ、４℃、３０分間の条件で遠心し、２０ｎｍ金コロイドで標識されたＨＡタンパク質を沈殿させた。上清を除去し、５００μＬの上記ＢＳＡ液を加えた。この懸濁液４０μＬに８．５μＬの前記トリスバッファー及び０．５μＬの１０％Ｔｗｅｅｎ２０溶液（前記トリスバッファーに溶解されたもの）を添加した。この混合液を「ＨＡタンパク質-金コロイド液」として、後の実験に使用した。

[0068] ＜被作用物質Ｃを担持した吸着体の準備（３）＞

１００μＬのアルキンビーズ懸濁液（ビーズ含量が５０％ｖ／ｖとなるように０．１ｍＭアスコルビン酸、０．０２ｍＭ硫酸銅水溶液に懸濁されたもの）に、５μＬのシアル酸アジド溶液（１ｍＭとなるようにジメチルスルホキシドに溶解されたもの）を加え、４℃にて１６時間反応させた。この反応によりシアル酸が、ビーズ表面に担持されたアルキンに共有結合した。この反応を経たビーズを、以下では単にビーズということがある。

続いて上記の反応液を１２，０００ｇ、４℃、１分間の条件で遠心し、ビーズを沈殿させた。上清を除去し、ビーズと同体積のＰＢＳを加え、遠心により再度ビーズを沈殿させる処理（懸濁・遠心処理によるバッファー置換処理）を数回繰り返し、最後に得た懸濁液を「シアル酸ビーズ懸濁液」として、後の実験に使用した。

[0069] ［実施例９］

（第１処理）

１μＬの「検体３」に、４９μＬの「ＨＡタンパク質-金コロイド液」を加

え、穏やかに攪拌しながら、室温で１０分間反応させた。

[0070] （第２処理）

上記の反応液（検体処理液）５０μＬに、１５μＬの「シアル酸ビーズ懸濁液」を加え、穏やかに攪拌しながら、室温で３０分間反応させた。

上記の反応液を１０分程度静置し、自然にビーズを沈殿させた。この状態の反応液を含むマイクロチューブの様子は図８と同様であり、目視したところ、上清の色は濃い赤色であり、沈殿したビーズの色は元の白色に近い薄い赤色であった。

次に、このビーズを撮影した写真について、前記画像解析ソフトウェアを使用して、ビーズの赤味を測定した。この結果を図１６のグラフ（中和抗体と表示した方）に示す。測定したビーズの赤味は、１６５．８（任意単位）であった。

[0071] ［実施例１０］

検体の種類を「検体２」に変更した以外は、実施例９と同様に行った。最終的に沈殿して得たビーズの色は目視で濃い赤色であった。その結果を図１６のグラフ（非中和抗体と表示した方）に示す。測定したビーズの赤味は、１８８．１（任意単位）であった。

[0072] ＜検体の準備（３）＞

新型コロナウイルスに対する中和抗体を含まないヒト血漿サンプルを「検体４」として、新型コロナウイルスに対する中和抗体を含み、その中和活性が４４、９５、２１０、１４７３ＩＵ／ｍＬのヒト血漿サンプルをそれぞれ「検体５」、「検体６」、「検体７」、「検体８」として、後の実験に使用した。なお、ＩＵとはＩｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ　Ｕｎｉｔを省略した表記であり、同単位は世界保健機関にて定められた新型コロナウイルスに対する中和活性の強さを示す単位である。

[0073] ＜作用物質Ｂの標識（５）＞

５００μＬの２０ｎｍ金コロイド液に対して２０μＬの１００ｍＭリン酸ナトリウムバッファー（ｐＨ７．０）を加え、その後、５０μＬの非標識Ｓ

１タンパク質（５００μｇ／ｍＬとなるようにＰＢＳで調製したもの）を添加し、この混合液を室温で攪拌しながら３０分間インキュベーションした。この反応により、非標識Ｓ１タンパク質が金コロイドに受動的に結合した反応液を得た。

続いて、ウシ血清アルブミン（ＢＳＡ）にＰＢＳを加え、ＢＳＡ濃度０．１％ｗ／ｖとなるように調製したＢＳＡ液を得た。

上記反応液に上記ＢＳＡ液５００μＬを添加し、室温で攪拌しながら３０分間インキュベーションした後、６，５００ｇ、４℃、３０分間の条件で遠心し、２０ｎｍ金コロイドで標識されたＳ１タンパク質を沈殿させた。上清を除去し、６２．５μＬの上記ＢＳＡ液を加えた液を「Ｓ１タンパク質－金コロイド液（＃２）」として、後の実験に使用した。

[0074] ［実施例１１］

（第１処理）

１０μＬの「検体４」、「検体５」、「検体６」、「検体７」、「検体８」、「ＰＢＳ」のそれぞれに、６μＬの「Ｓ１タンパク質－金コロイド液（＃２）」を添加し、１６μＬの「金コロイド-検体混合液」もしくは「金コロイド-ＰＢＳ混合液」を得た。これらを穏やかに攪拌しながら室温で３０分間反応させた。

[0075] （第２処理）

各「金コロイド-検体混合液」１５μＬと前記「ＡＣＥ２ビーズ懸濁液（＃２）」の１５μＬとをそれぞれ混合し、穏やかに撹拌しながら、室温で３０分間反応させた。これと同時に、「金コロイド-ＰＢＳ混合液」１５μＬと前記「ＡＣＥ２ビーズ懸濁液（＃２）」１５μＬとを混合した反応液（ポジティブコントロール）を準備した。さらに、「金コロイド-ＰＢＳ混合液」１５μＬと「ストレプトアビジンビーズ懸濁液」１５μＬとを混合した反応液（ネガティブコントロール）を準備した。これらを穏やかに撹拌しながら、室温で３０分間反応させた。

攪拌後、各反応液を１０分程度静置し、自然にビーズを沈殿させた。この

状態の各反応液を含むマイクロチューブを図１７の写真に示す。目視したところ、ポジティブコントロールにおいては上清の色はほとんど無色透明であり、沈殿したビーズの色は元の白色ではなく、濃い赤色であった。また、ネガティブコントロールにおいては上清の色は濃い赤色であり、沈殿したビーズの色は元の白色に近い薄い赤色であった。「検体４」～「検体８」を加えた反応液においては、中和活性（ＩＵ／ｍＬ）が高いほど上清の色は赤く、沈殿したビーズの色は元の白色に近い薄い赤色を示した。撮影した写真について、前記画像解析ソフトウェアを使用して、後述の方法により解析した。

解析の結果、既知の中和活性と、本実施例により算出された中和活性（％）には明瞭な相関が認められ、本発明による臨床検体の中和活性（中和抗体量）の定量性が確認された。その結果のグラフを図１８に示す。

[0076] ＜解析方法＞

（ステップ１）

各サンプルについて「ビーズの赤味」及び「上清の赤味」を測定し、「ビーズの赤味」／「上清の赤味」で表される比（α）を算出した。この比（α）を算出する理由は、一般的に黄色もしくは赤色を呈する血漿による「ビーズの赤味」への影響を低減するためである。

（ステップ２）

下記式の計算値を中和活性（％）とした。

｛（(検体のα)－(ポジコンのα)）／（(ネガコンのα)－(ポジコンのα)）｝×１００

なお、ポジコンはポジティブコントロールの略語であり、ネガコンはネガティブコントロールの略語である。

上記の解析方法を実施例１１に適用すると、表１に示す値が得られる。なお、赤味の測定値は任意単位である。

[0077]

[表1]

	ポジコン	検体４	検体５	検体６	検体７	検体８	ネガコン
ビーズの赤味	167.5	172.4	168.2	163.6	150.0	143.9	140.9
上清の赤味	128.2	128.4	143.7	145.2	158.9	160.6	153.9
比（α）	1.31	1.34	1.17	1.13	0.94	0.90	0.92
算出した中和活性（％）	-	-9.4	34.7	46.0	92.7	105.0	-
既知の中和活性（IU/mL）	-	0	44	95	210	1473	-

[0078] Ｘ軸に既知の中和活性（ＩＵ／ｍＬ）の１０を底とする対数をとり、Ｙ軸に算出した中和活性（％）をとり、表１を参照して各サンプルをプロットした散布図を図１９に示す。

各プロットの近似曲線を表す式（フィッティング式）は下記が妥当であると考えられた。

ｙ ＝－８．５５２＋１１８．６５２／（１＋１０^（（１．９０４－ｘ）×１．３１２））

R^2＝０．９６９４

上記フィッティング式は、医学統計解析ソフトウェアＰｒｉｓｍ９（ＧｒａｐｈＰａｄ社製）を用いて求めた。R^2は相関係数であり、１に近い値であるほど、妥当な近似であることを意味する。フィッティング式を求めるにあたり、各プロットは線型的に表わされるものではないと推定されることから、シグモイド曲線を前提とした。この前提が妥当であることは、相関係数が高いことから支持される。このようにシグモイド曲線で近似することは、作用物質Ｂ（例えばＳ１）と被作用物質Ｃ（例えばＡＣＥ２）の結合が被検出物質Ａ（例えば中和抗体）により競合的に阻害されていることを考慮しても妥当である。

[0079] ［使用材料］

２０ｎｍ金コロイド液は、製品名：Gold Nanoparticle Size Optimization Panel、製造会社：Cytodiagnostics、型番：G-SIZE-01を使用した。その金

コロイドの平均粒子径は２０ｎｍである。

ストレプトアビジンは、製造会社：富士フイルム和光純薬、型番：192-17864を使用した。

ビオチン－Ｓ１タンパク質は、製品名：Biotinylated Recombinant SARS-CoV-2 Spike S1-His-Avi Protein、製造会社：Syd Labs、型番：BP003055を使用した。Ｓ１にビオチンが結合した複合体である。

プロテインAビーズは、製品名：Immunoprecipitation Starter Pack、製造会社：Cytiva、型番：17-6002-35を使用した。ビーズ本体はアガロース（商品名：セファロース）によって形成されたものであり、ビーズ本体の粒径の幅は４５～１６５μｍであり、平均粒子径は９０μｍである。

Ｆｃ－ＡＣＥ２は、製品名：ACE-2 Fc Chimera, Human、製造会社：Genscript、型番：Z03484を使用した。ＦｃとＡＣＥ２の融合タンパク質である。

マウス由来中和抗体は、製品名：SARS-CoV-2 Neutralizing Antibody (5B7D7)、製造会社：Genscript、型番：A02057-100を使用した。

マウス由来非中和抗体は、製品名：Anti-6X His tag 抗体 [HIS.H8]、製造会社：Abcam、型番：ab18184を使用した。

１５ｎｍストレプトアビジン-金コロイド液は、製品名：Streptavidin, Gold Colloidal Particle 15nm、製造会社：Cytodiagnostics、型番：AC-15-04-05を使用した。金コロイドにストレプトアビジンが結合したものであり、その金コロイド部分の平均粒子径は１５ｎｍである。

６０ｎｍストレプトアビジン-金コロイド液は、製品名：Streptavidin, Gold Colloidal Particle 60nm、製造会社：Cytodiagnostics、型番：AC-60-04-05を使用した。金コロイドにストレプトアビジンが結合したものであり、その金コロイド部分の平均粒子径は６０ｎｍである。

０．５μｍ青着色ポリスチレンマイクロスフェアは、製品名Polybead(登録商標) Blue Dyed Microsphere Sampler Kit、製造会社：Polysciences, Inc.、型番：19821-1のうち、平均粒子径０．５μｍのものを使用した。

非標識Ｓ１タンパク質は、製品名：SARS-CoV-2 Spike Protein (S1, His T

ag)、製造会社：GenScript、型番：Z03485-100を使用した。

ビオチン－ＡＣＥ２溶液は、製品名：Human ACE2/Angiotensin-Converting Enzyme 2 Protein (His Tag), Biotinylated、製造会社：SinoBiological、型番：10108-H08H-Bを使用した。ビオチンが結合したＡＣＥ２タンパク質の溶液である。

ストレプトアビジンビーズ懸濁液は、製品名：Streptavidin Sepharose High Performance、製造会社：Cytiva、型番：17511301を使用した。ビーズの平均粒子径は３４μｍであり、セファロース製ビーズの表面にストレプトアビジンが担持されたものである。

アルキンビーズ懸濁液は、製品名：Alkyne Agarose、製造会社：Merck、型番：901982-2MLを使用した。粒子径の幅は５０～１５０μｍであり、アガロース製ビーズの表面に、末端アルキンを有する官能基が備えられたものである。

ＨＡタンパク質は、製品名：Influenza A H10N8 (A/Jiangxi-Donghu/346/2013) Hemagglutinin/HA Protein (His Tag)、製造会社：SinoBiological、型番：40359-V08Bを使用した。

シアル酸アジド溶液は、製品名：Disialylnonasaccharide-β-ethylazide、製造会社；東京化成工業、型番：D4217を使用した。

ＨＡ中和抗体は、製品名：Influenza A H10 Hemagglutinin/HA Neutralizing Antibody、製造会社：SinoBiological、型番：40359-M001を使用した。

血漿サンプルは、製品名：1st International Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 immunoglobulin、製造元：National Institute for Biological Standards and Control、型番：20/268を使用した。

請求の範囲

[請求項1] 被検出物質Ａが検体に含まれるか否かを検査する方法であって、

前記被検出物質Ａは、作用物質Ｂに結合することにより、前記作用物質Ｂと被作用物質Ｃが所定の様式で結合することを阻害するものであり、

少なくとも下記の第１処理～第２処理をこの順で行う、検査方法。

（第１処理）

前記検体と、標識物質が結合した前記作用物質Ｂと、を含む検体処理液を得る。

（第２処理）

前記被作用物質Ｃを担持した粒子状不溶性担体を有する吸着体を、前記検体処理液に接触させた後、前記吸着体に対する前記標識物質の吸着量を計測する。

[請求項2] 前記第２処理において、前記計測の前に、前記吸着体と、前記吸着体に接触した後の前記検体処理液とをより分ける、請求項１に記載の検査方法。

[請求項3] 前記より分ける方法が静置又は遠心分離であり、前記静置又は前記遠心分離によって生じた上清を除去した後で、前記計測を行う、請求項２に記載の検査方法。

[請求項4] 前記標識物質が金コロイドである、請求項１～３の何れか一項に記載の検査方法。

[請求項5] 前記計測の方法が比色法である、請求項１～４の何れか一項に記載の検査方法。

[請求項6] 前記第２処理で計測した前記吸着量が、所定値よりも小さい場合、

前記検体に前記被検出物質Ａが含まれると判定し、

前記第２処理で計測した前記吸着量が、所定値よりも大きい場合、

前記検体に前記被検出物質Ａが含まれないと判定する、

請求項１～５の何れか一項に記載の検査方法。

[請求項7] 前記被検出物質Ａが中和抗体であり、前記作用物質Ｂが病原体に由来するタンパク質であり、前記被作用物質Ｃは前記病原体が感染する細胞に由来するタンパク質である、請求項１～６の何れか一項に記載の検査方法。

[請求項8] 前記被検出物質Ａが中和抗体であり、前記作用物質Ｂは、コロナウイルスが有するスパイクタンパク質の一部又は全部であり、前記被作用物質Ｃは、ヒト又は動物の細胞が有する受容体タンパク質の一部又は全部である、請求項１～７の何れか一項に記載の検査方法。

[請求項9] 前記被検出物質Ａが中和抗体であり、前記作用物質Ｂは、コロナウイルスが有するスパイクタンパク質の一部又は全部であり、前記被作用物質Ｃは、ヒト又は動物の細胞が有する受容体タンパク質の一部又は全部であり、前記標識物質が金コロイドであり、前記第２処理において、前記計測の前に、前記吸着体と、前記吸着体に接触した後の前記検体処理液とを静置又は遠心分離により分け、前記静置又は遠心分離によって生じた上清を除去した後で、前記計測を比色法で行う、請求項１に記載の検査方法。

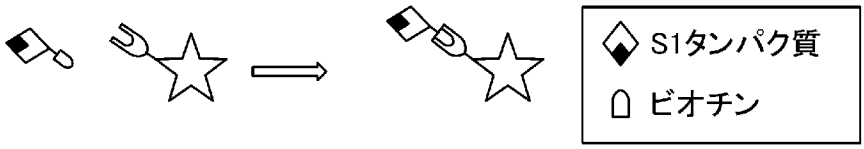
[図1]

ストレプトアビジン-金コロイドの作製



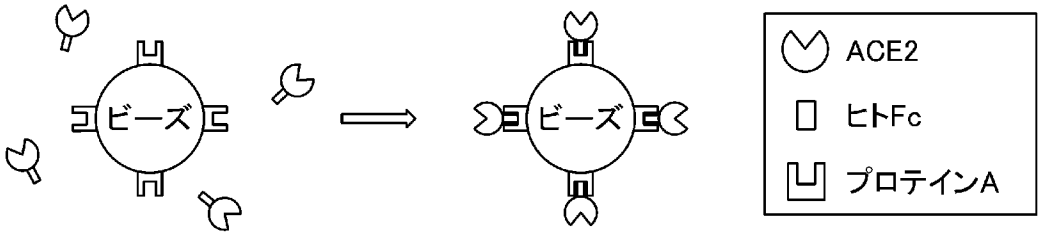
[図2]

S1タンパク質-金コロイドの作製

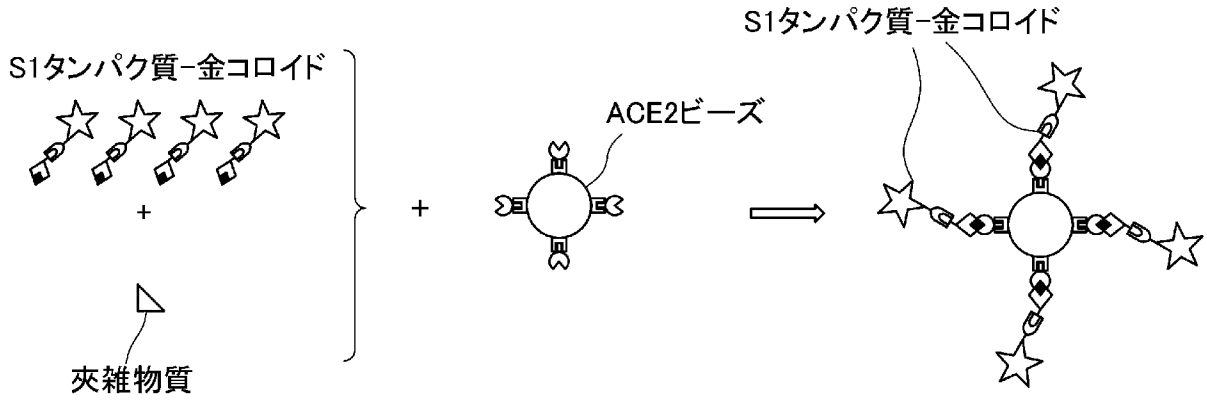


[図3]

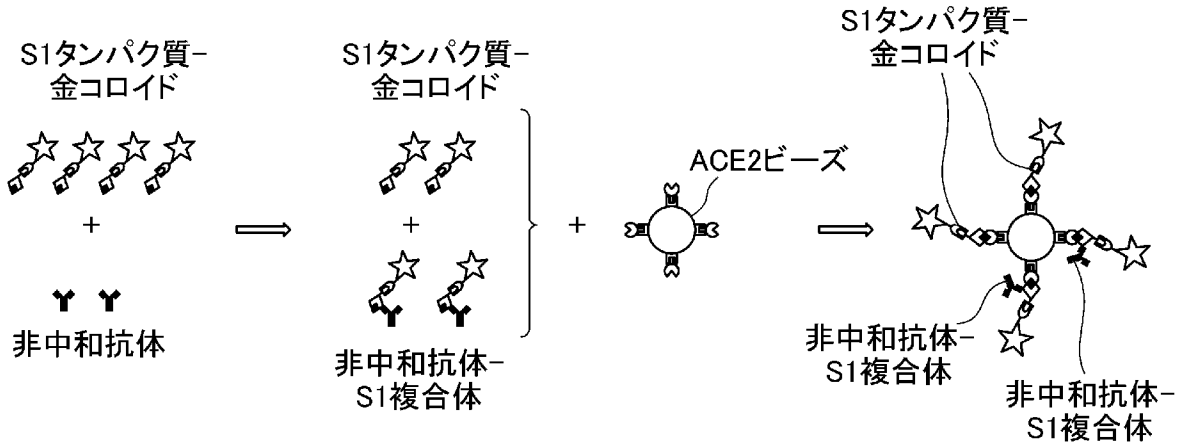
ACE2ビーズの作製



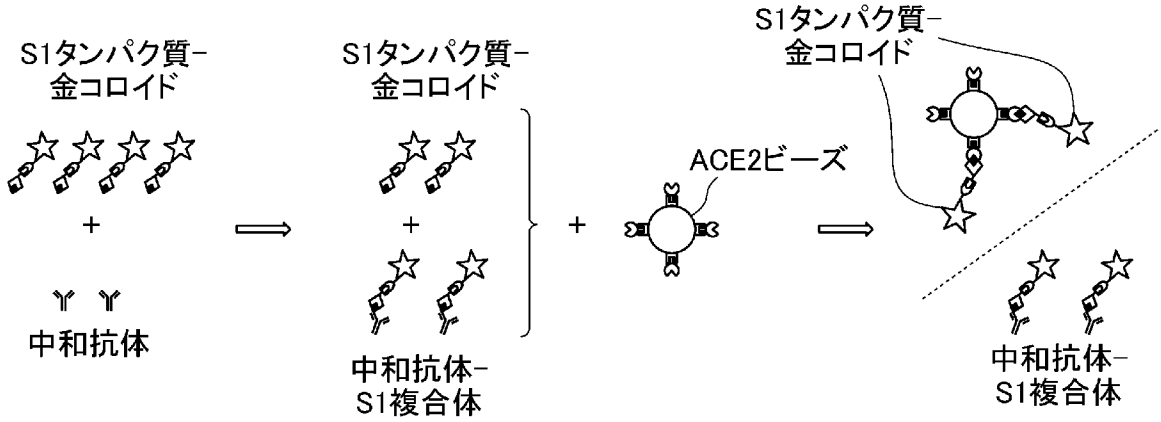
[図4]



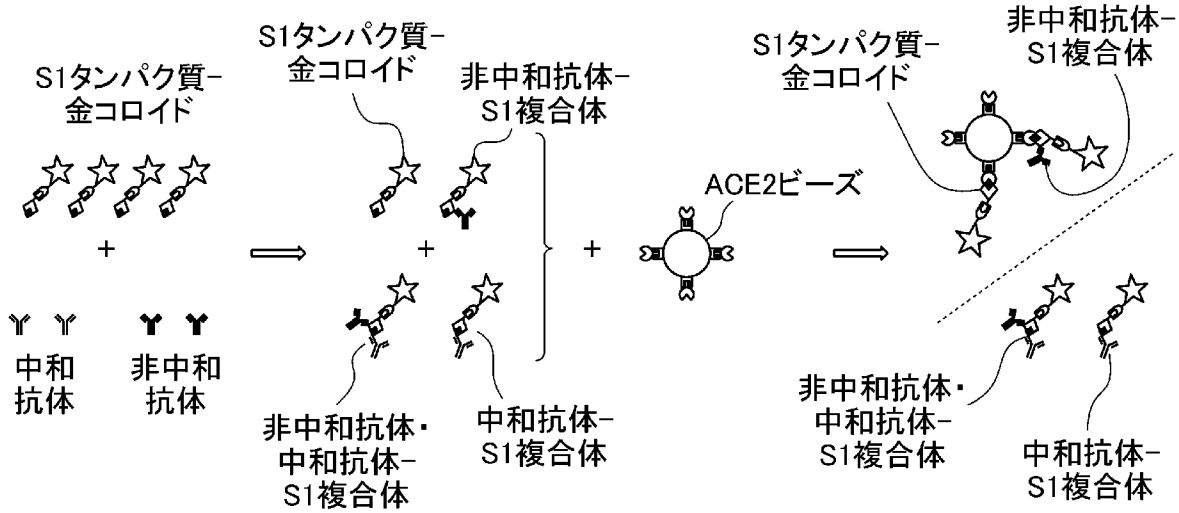
[図5]



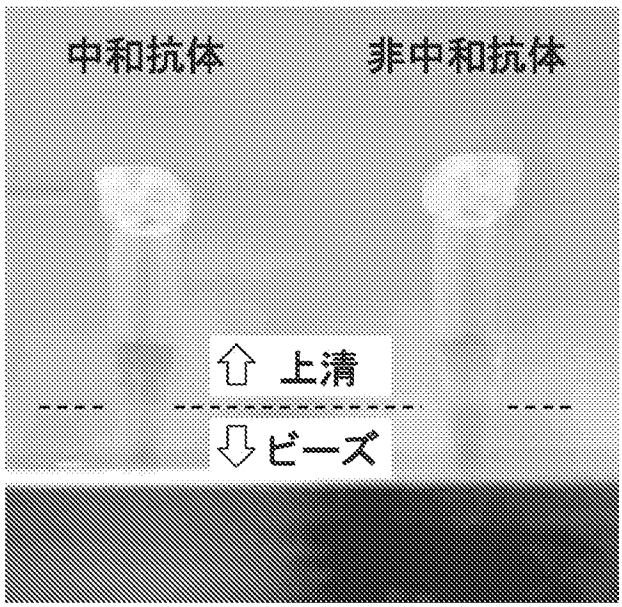
[図6]


S1タンパク質−
金コロイド
中和抗体
S1タンパク質−
金コロイド
中和抗体−
S1複合体
ACE2ビーズ
S1タンパク質−
金コロイド
中和抗体−
S1複合体

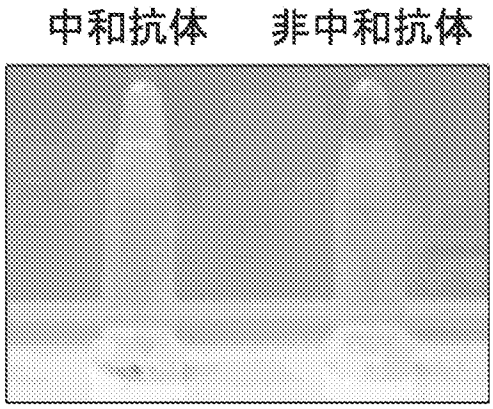
[図7]


S1タンパク質−
金コロイド
中和
抗体
非中和
抗体
S1タンパク質−
金コロイド
非中和抗体−
S1複合体
非中和抗体・
中和抗体−
S1複合体
中和抗体−
S1複合体
ACE2ビーズ
S1タンパク質−
金コロイド
非中和抗体−
S1複合体
非中和抗体・
中和抗体−
S1複合体
中和抗体−
S1複合体

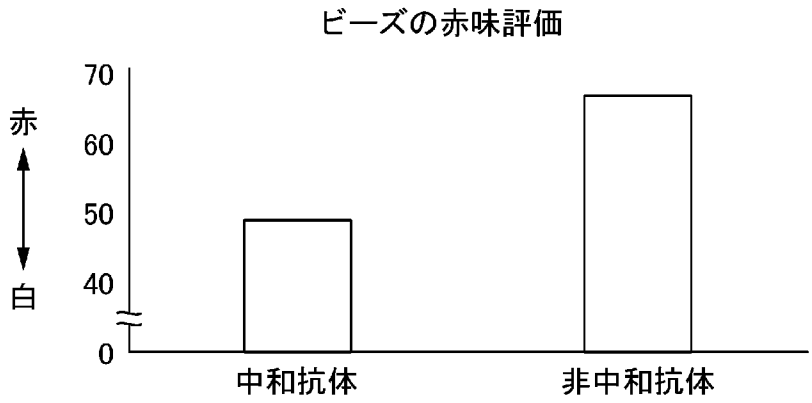
[図8]


中和抗体
非中和抗体
上清
ビーズ

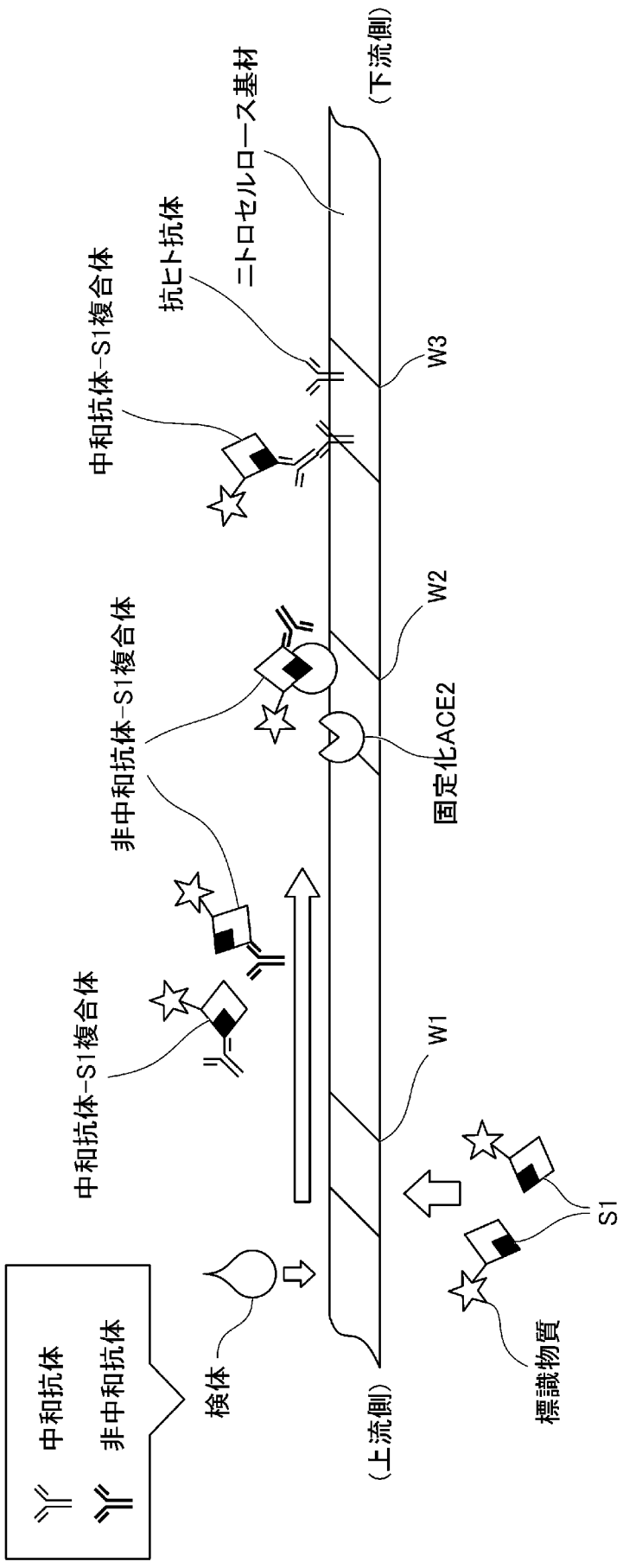
[図9]



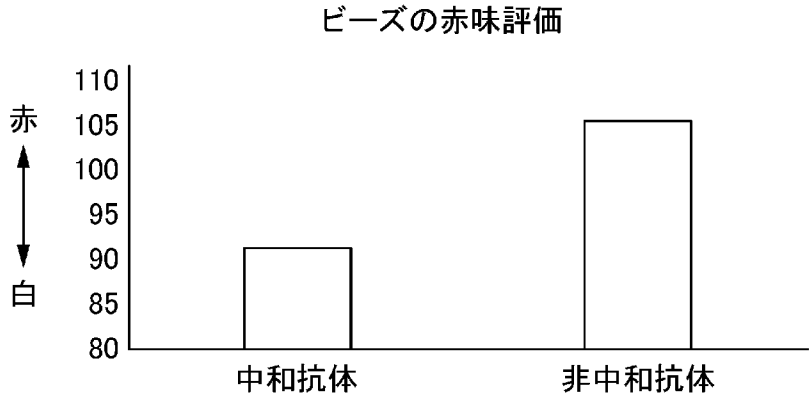
[図10]



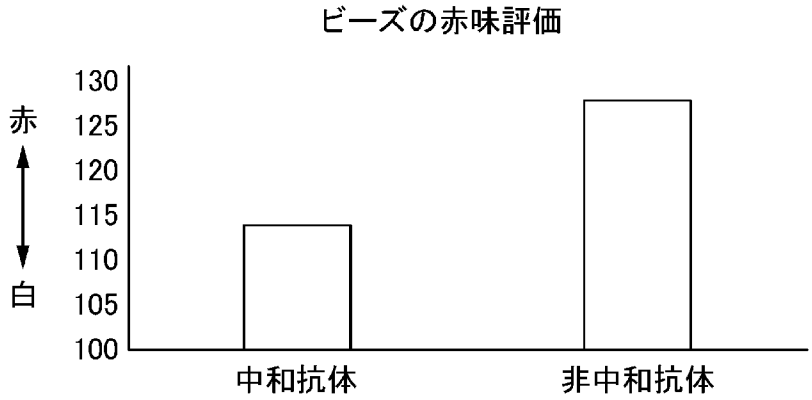
[図11]


中和抗体
非中和抗体
検体
中和抗体-S1複合体
非中和抗体-S1複合体
中和抗体-S1複合体
抗ヒト抗体
ニトロセルロース基材
固定化ACE2
標識物質
S1
W1
W2
W3
(上流側)
(下流側)

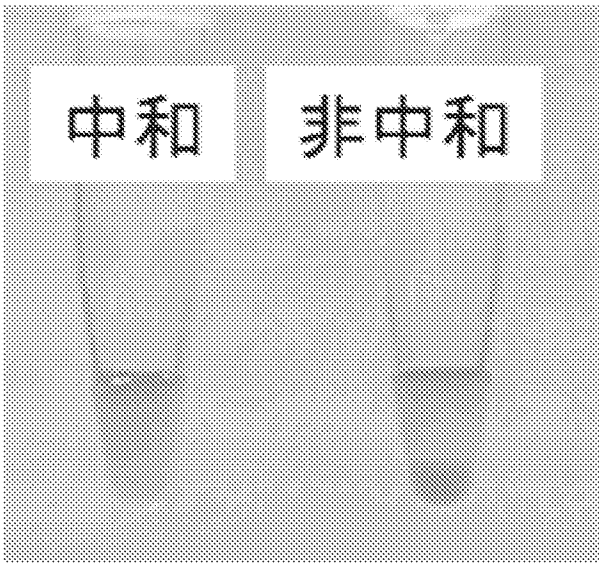
[図12]


ビーズの赤味評価
赤
白
110
105
100
95
90
85
80
中和抗体
非中和抗体

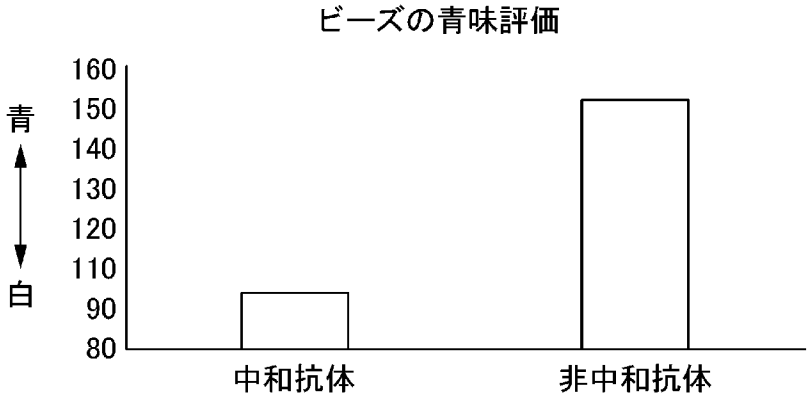
[図13]


ビーズの赤味評価
赤
白
130
125
120
115
110
105
100
中和抗体
非中和抗体

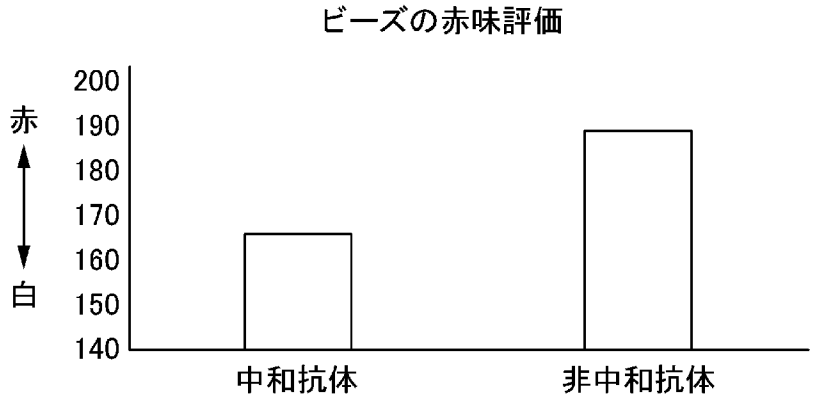
[図14]


中和
非中和

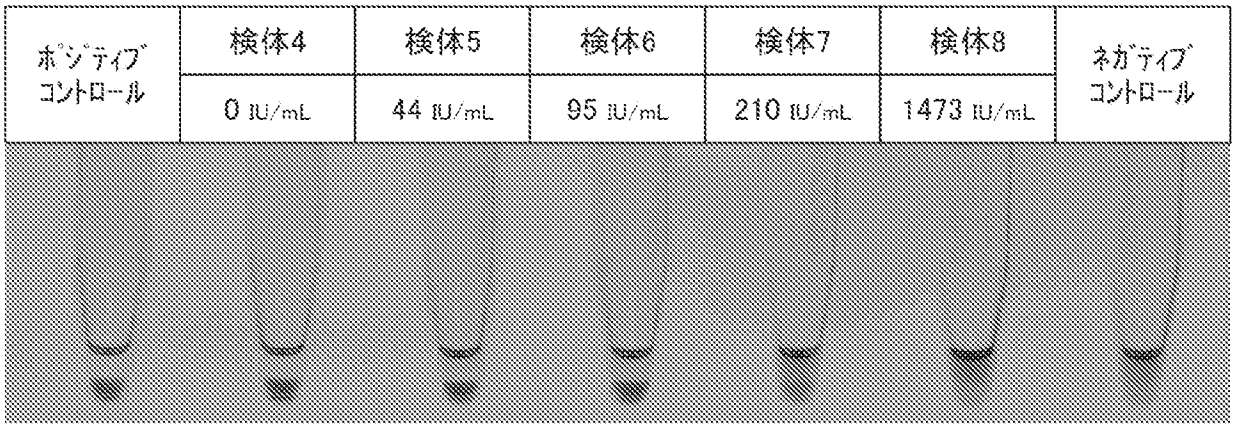
[図15]


ビーズの青味評価
青
白
160
150
140
130
120
110
90
80
中和抗体
非中和抗体

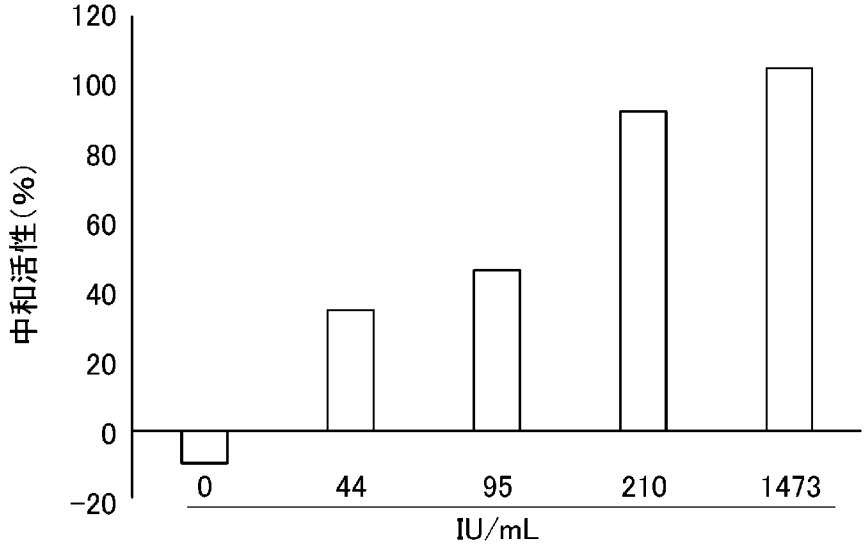
[図16]


ビーズの赤味評価
赤
白
200
190
180
170
160
150
140
中和抗体
非中和抗体

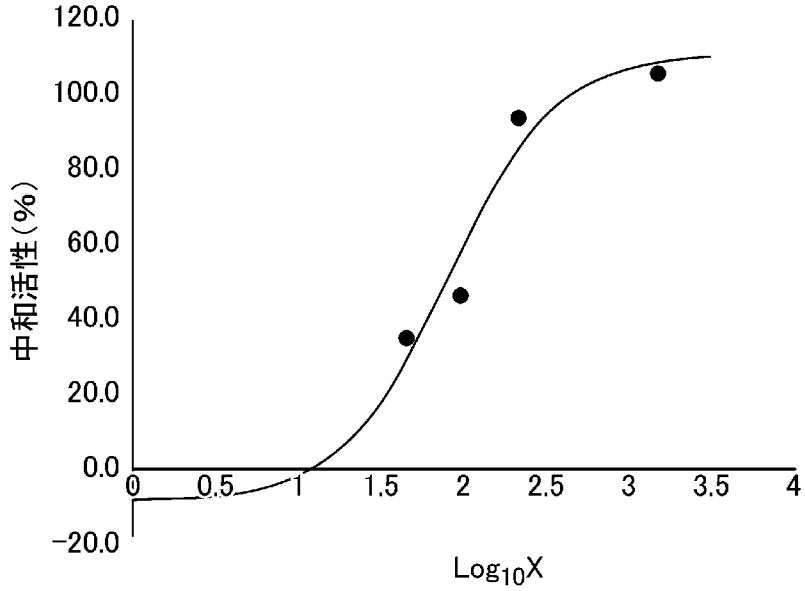
[図17]


ポジティブコントロール
検体4
検体5
検体6
検体7
検体8
ネガティブコントロール
0 IU/mL
44 IU/mL
95 IU/mL
210 IU/mL
1473 IU/mL

[図18]


120
100
80
60
40
20
0
-20
中和活性(%)
0
44
95
210
1473
IU/mL

[図19]


120.0
100.0
80.0
60.0
40.0
20.0
0.0
-20.0
中和活性(%)
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
Log10X

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/014180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/53(2006.01)i; ***G01N 33/543***(2006.01)i
FI: G01N33/543 551A; G01N33/53 N

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)

G01N33/53; G01N33/543

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 1971-2022
Registered utility model specifications of Japan 1996-2022
Published registered utility model applications of Japan 1994-2022

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	新型コロナウイルスに対する中和抗体評価試薬 iFlash-2019-nCoV NAb. MBL. 22 March 2021 in particular, see, measurement principle, correlation with virus neutralization test, non-official translation (Neutralizing antibody evaluation reagent iFlash-2019-nCoV NAb for novel coronavirus)	1-3, 5-9
Y		4
Y	ZHANG, N. et al. A lateral flow test detecting SARS-CoV-2 neutralizing antibodies. medRxiv. 10 November 2020 fig. 2A	4
Y	JP 2004-219346 A (NIPPON INST FOR BIOLOGICAL SCIENCE) 05 August 2004 (2004-08-05) paragraphs [0009], [0017], [0025]	4
A	新型コロナウイルス中和抗体 (CLIA/化学発光免疫測定法) 測定試薬取扱い開始, 22 March 2021 release date, non-official translation (Starting handling reagents for measuring SARS-CoV-2 eutralizing antibodies (CLIA/chemiluminescence immunoassay))	1-9

☑ 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	Date of mailing of the international search report
26 May 2022	**07 June 2022**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	新型コロナウイルス中和抗体測定試薬 iFlash-2019-nCoV NAb, March 2021 product name, non-official translation (Neutralizing antibody evaluation reagent iFlash-2019-nCoV NAb for novel coronavirus)	1-9
A	SARS-CoV-2 Anti-RBD Antibody Profiling Kit. MBL. March 2021 guessed reaction model, measurement principle	1-9
A	新型コロナウイルスに対する中和抗体の信頼性の高い簡易測定キットを開発, 慶應義塾大学医学部, 30 September 2020 research results, (KEIO UNIVERSITY SCHOOL OF MEDICINE), non-official translation (Developed a kit for highly reliable simplified measurement for neutralizing antibodies against novel coronavirus)	1-9
A	川村猛, 新型コロナウイルスの抗体検査, モダンメディア, March 2021, vol. 67/no. 3/2021 types and characteristics of antibody testing, tables, fig. 13, (KAWAMURA, Takeshi. Antibody test for COVID-19. Modern media.)	1-9
A	WAH TAN, C. et al. A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike p. nature biotechnology. 23 July 2020 abstract, fig. 1	1-9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/014180

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2004-219346 A	05 August 2004	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/014180

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/53(2006.01)i; G01N 33/543(2006.01)i
FI: G01N33/543 551A; G01N33/53 N

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））

G01N33/53; 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	１９７１－２０２２年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２２年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２２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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	新型コロナウイルスに対する中和抗体評価試薬　iFlash-2019-nCoV NAb, MBL, 2021.03.22 特に、測定原理、ウイルス中和試験との相関参照	1-3,5-9
Y		4
Y	ZHANG, N. et al., A lateral flow test detecting SARS-CoV-2 neutralizing antibodies, medRxiv, 2020.11.10 FIG.2A	4
Y	JP 2004-219346 A (財団法人日本生物科学研究所) 05.08.2004 (2004-08-05) [0009],[0017],[0025]	4
A	新型コロナウイルス中和抗体（ＣＬＩＡ／化学発光免疫測定法）測定試薬取扱い開始, 2021.03.22 発売日	1-9
A	新型コロナウイルス中和抗体測定試薬　iFlash-2019-nCoV　NAb, 2021.03 商品名	1-9
A	SARS-CoV-2 Anti-RBD Antibody Profiling Kit, MBL, 2021.03 推測される反応モデル、測定原理	1-9

☑ 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抵触するものではなく、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	国際調査報告の発送日
26.05.2022	07.06.2022

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

中村　直子 2J 4406

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

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
A	新型コロナウイルスに対する中和抗体の信頼性の高い簡易測定キットを開発，慶應義塾大学医学部，2020.09.30 研究の成果	1-9
A	川村猛，新型コロナウイルスの抗体検査，モダンメディア，2021.03，67巻/3号/2021 抗体検査の種類と特徴、表、図13	1-9
A	WAH TAN, C. et al., A SARS-CoV-2 surrogate virus neutralization test based on antibody-mediated blockage of ACE2-spike p, nature biotechnology, 2020.07.23 abstract, Figl	1-9

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2022/014180

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2004-219346 A	05.08.2004	（ファミリーなし）	