(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
2014 年 5 月 22 日(22.05.2014)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2014/077142 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2013/079740

(22) 国際出願日: 2013 年 11 月 1 日(01.11.2013)

(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 2012-249906 2012 年 11 月 14 日(14.11.2012) JP

(71) 出願人: コニカミノルタ株式会社(KONICA MINOLTA, INC.) [JP/JP]; 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目７番２号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 田村 鶴紀(TAMURA, Tsuruki); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目７番２号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 宮崎 幸司(MIYAZAKI, Koji); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目７番２号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP). 村松 新一(MURAMATSU, Shinichi); 〒1007015 東京都千代田区丸の内二丁目７番２号 コニカミノルタ株式会社内 Tokyo (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人光陽国際特許事務所(KOYO INTERNATIONAL PATENT FIRM); 〒1000006 東京都千代田区有楽町一丁目１番３号 東京宝塚ビル１７階 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, IR, IS, JP, KE, KG, 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, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシ

[続葉有]

(54) **Title**: CHROMATOGRAPHIC TEST PIECE, CHROMATOGRAPHIC TEST METHOD AND MEMBRANE

(54) 発明の名称 : クロマトグラフィー試験片、クロマトグラフィー試験方法及びメンブレン

FIG.1A

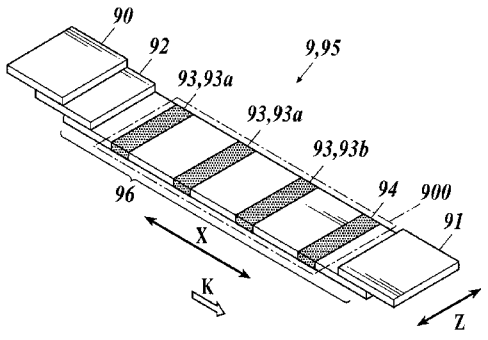
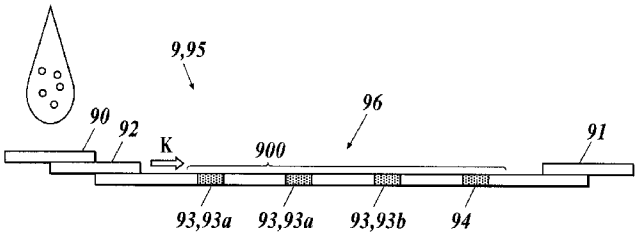


FIG.1B



(57) **Abstract**: A chromatographic test piece (9) which is for use in conducting the detection of an analyte contained in a sample or the determination of quantity thereof by chromatography using a fluorescence-labeled ligand and which is to be subjected to supply of a sample, development in a prescribed development direction (K), and scanning for determining whether fluorescence is generated or not. The chromatographic test piece (9) is provided with: multiple detection target areas (93) in which the presence of the analyte or the quantity thereof is detected and which are disposed in the development direction (K) with spaces thereamong; and a marker (94) which contains a cationic material and which generates fluorescence. The detection target areas (93) and the marker (94) are located in a scan area (900) which is to be subjected to scanning.

(57) 要約: 蛍光標識リガンドを用いたクロマトグラフィー試験で試料内のアナライトを検出または定量するために使用され、試料を供給されて所定の展開方向Ｋに展開させるとともに、蛍光の有無を検知するためのスキャンが行われるクロマトグラフィー試験片９は、スキャンの行われるスキャン領域９００内に、展開方向Ｋに離間した状態で配設された、アナライトの有無または量を検知するための複数の検知対象領域９３と、カチオン性の材料を含んで蛍光を生じるマーカー９４と、を備える。

WO 2014/077142 A1

ア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告（条約第 21 条(3)）

明　細　書

発明の名称 ：

クロマトグラフィー試験片、クロマトグラフィー試験方法及びメンブレン

技術分野

[0001] 本発明は、クロマトグラフィー試験片、クロマトグラフィー試験方法及びメンブレンに関するものである。

背景技術

[0002] 従来、アナライトを検出または定量するクロマトグラフィー試験においては、試料を供給されて所定の展開方向に展開させるクロマトグラフィー試験片が用いられている。このクロマトグラフィー試験片には、上方に開口したハウジングケースと、当該ハウジングケース内に収容されるとともに、試料を伝わらせて所定の展開方向に展開させるメンブレンとが具備されている。このメンブレンには、アナライトの有無または量を検知するための複数の検知対象領域として、テストライン及びコントロールラインが間隔をおいて短冊状に設けられている。このうち、テストラインとは、試料中のアナライト（例えば抗原）と、標識リガンド（例えば抗体）との複合体を特異的に捕捉する捕捉リガンド（抗原特異的抗体）が固定化されたラインであり、コントロールラインとは、標識リガンドを特異的に捕捉する捕捉リガンド（標識抗体特異的抗体）が固定化されたラインである。

[0003] このようなクロマトグラフィー試験片においては、一端に液状の試料が滴下されると、標識リガンドとアナライトとの結合が促された後、毛細管現象により複合体と標識リガンドがクロマトグラフィー試験片内を他端に向かって移動する結果、テストライン及びコントロールラインでそれぞれ複合体（アナライトと標識リガンドとの複合体）または標識リガンドが捕捉されるので、両ラインの呈色を光学的に検出することによって、アナライトが定性的あるいは定量的に検出される。

[0004] ところで、クロマトグラフィー試験を行う際、テストラインの位置が分か

らないと、試験結果を出すのに時間が掛かってしまうという問題がある。具体的には、テストラインが呈色していない場合には、テストラインの位置が分からないと、テストライン以外の領域でも呈色が無いことを確認するために時間が掛かってしまう。また、テストラインが呈色している場合には、テストラインが複数存在すると、何れのテストラインが呈色しているのかをデータ解析や画像解析により確認するために時間が掛かってしまう。

[0005] そのため、近年、テストラインの位置を特定するための２つの技術が提案されている。

１つ目の技術は、検知対象領域から生じる蛍光の検出によってアナライトの検出または定量を行うクロマトグラフィー試験の技術分野において提案されており、アナライトの有無や量に係らずコントロールラインから蛍光が生じることを利用し、蛍光検出によってコントロールラインの位置を検出した後、この位置を基準位置としてテストラインの位置を特定するようになっている（例えば特許文献１参照）。

[0006] また、２つ目の技術は、メンブレンを格納するハウジングケースに位置特定用のマーカーを予め設けておき、このマーカーの位置を基準位置としてテストラインの位置を特定するようになっている。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：特開２０１２－１９８０８３号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] しかしながら、上記１つ目の技術では、コントロールラインにおける標識リガンドの捕捉反応が弱い場合に、コントロールラインの位置、つまり基準位置が正確に特定されず、その結果、テストラインの位置が正確に特定されなくなってしまう。

[0009] また、上記２つ目の技術では、ハウジングケースとメンブレンとの位置合

わせの精度が低い場合に、マーカーの位置（基準位置）とテストラインとの位置関係が変化してしまい、テストラインの位置が正確に特定されなくなってしまう。また、マーカーの検出手法と検知対象領域での呈色の検出手法とが異なる場合、例えば、マーカーから生じる蛍光で当該マーカーを検出しつつ、検知対象領域の呈色を目視で検出する場合や、目視でマーカーを検出しつつ、検知対象領域から生じる蛍光で当該検知対象領域の呈色を検出する場合には、マーカーの検出と、検知対象領域の呈色の検出とを別々の作業・設備で行わなければならず、試験のコストが高くなってしまう。

[0010] 一方、これらの問題を考慮すると、コントロールラインとは別に位置特定用のマーカーをメンブレンに設けることも考えられるが、単純にメンブレンにマーカーを設けると、試料の展開によってマーカー成分が流れてしまう。そして、この場合には、マーカーの正確な位置が特定できずにテストラインの位置が正確に特定されなくなったり、メンブレン内の空隙がマーカー成分で塞がれて毛細管現象による試料の展開が阻害されたり、試料中のアナライトと標識リガンドとの複合化反応やテストラインにおける複合体の捕捉反応が阻害されてアナライトの検出精度が低下したりすることとなる。

[0011] そこで、本発明は以上のような事情に鑑みてなされたものであり、アナライトの検出精度を低下させることなく、各検知対象領域の位置を正確に特定することのできるクロマトグラフィー試験片、クロマトグラフィー試験方法及びメンブレンを提供することを目的とするものである。

課題を解決するための手段

[0012] 上記課題を解決するため、本発明の一側面を反映したクロマトグラフィー試験片は、

蛍光標識リガンドを用いたクロマトグラフィー試験で試料内のアナライトを検出または定量するために使用され、試料を供給されて所定の展開方向に展開させるとともに、蛍光の有無を検知するためのスキャンが行われるクロマトグラフィー試験片において、

スキャンの行われるスキャン領域内に、

前記展開方向に離間した状態で配設された、アナライトの有無または量を検知するための複数の検知対象領域と、

カチオン性の材料を含んで蛍光を生じるマーカーと、

を備える。

[0013] また、本発明の一側面を反映したクロマトグラフィー試験方法は、

本発明のクロマトグラフィー試験片を用いて試料内のアナライトを検出または定量する。

[0014] また、本発明の一側面を反映したメンブレンは、

蛍光標識リガンドを用いたクロマトグラフィー試験で試料内のアナライトを検出または定量するために使用され、試料を供給されて所定の展開方向に展開させるとともに、蛍光の有無を検知するためのスキャンが行われるクロマトグラフィー試験片に備えられるメンブレンにおいて、

当該メンブレンは、

供給される試料を伝わらせて前記展開方向に展開させるものであり、

スキャンの行われるスキャン領域内に、

前記展開方向に離間した状態で配設された、アナライトの有無または量を検知するための複数の検知対象領域と、

カチオン性の材料を含んで蛍光を生じるマーカーと、

が設けられている。

発明の効果

[0015] 本発明によれば、アナライトの検出精度を低下させることなく、各検知対象領域の位置を正確に特定することができる。

図面の簡単な説明

[0016] [図1A]クロマトグラフィー試験片を示す図である。

[図1B]クロマトグラフィー試験片を示す図である。

[図2]クロマトグラフィー試験装置の外観構成を示す図である。

[図3]クロマトグラフィー試験装置の内部構成を示す図である。

[図4]クロマトグラフィー試験片の変形例を示す図である。

[図5A]本発明に係るクロマトグラフィー試験片の実施例を示す図である。

[図5B]本発明に係るクロマトグラフィー試験片の実施例を示す図である。

[図5C]本発明に係るクロマトグラフィー試験片の実施例を示す図である。

[図5D]本発明に係るクロマトグラフィー試験片の実施例を示す図である。

[図6A]本発明に係るクロマトグラフィー試験片の比較例を示す図である。

[図6B]本発明に係るクロマトグラフィー試験片の比較例を示す図である。

[図6C]本発明に係るクロマトグラフィー試験片の比較例を示す図である。

[図6D]本発明に係るクロマトグラフィー試験片の比較例を示す図である。

発明を実施するための形態

[0017] 以下、本発明を図示の実施の形態に基づいて説明するが、本発明は該実施の形態に限られない。なお、図中、同一あるいは同等の部分には同一の番号を付与し、重複する説明は省略する。

[0018] （１．クロマトグラフィー試験片）

始めに、本発明に係るクロマトグラフィー試験片について、図１を用いて説明する。ここで、図１Ａはクロマトグラフィー試験片９（以下、試験片９とする）の外観構成の一例を示す斜視図であり、図１Ｂは側面図である。

[0019] 試験片９は、クロマトグラフィー試験で試料内のアナライトを検出または定量するために使用されるものであり、試料を供給されて展開させるとともに、後述のクロマトグラフィー試験装置１（図２参照）において、蛍光の有無を検知するためのスキャンが行われるようになっている。

[0020] この試験片９は、図１Ａに示すように、試料の展開方向Ｋに長尺な矩形板状に形成されており、図１Ｂに示すように、上方に開口したケース（図示せず）内に、テストストリップ９５を有している。

[0021] （１－１．テストストリップ）

テストストリップ９５は、展開方向Ｋに長尺な矩形シート状に形成されており、上面における一端部にはサンプルパッド９０が設けられ、他端部には吸収パッド９１が設けられている。

[0022] このうち、サンプルパッド９０は、液状の試料が滴下されて供給される部

分である。また、吸収パッド９１は、サンプルパッド９０に滴下された試料を吸収することにより、当該試料を毛細管現象によって展開方向Ｋに展開させる部分である。

[0023] サンプルパッド９０に対して展開方向Ｋの下流側には、コンジュゲートパッド９２が配設されている。このコンジュゲートパッド９２は、試料中に含まれるアナライトと結合する蛍光標識リガンドを含んでおり、サンプルパッド９０から供給される試料を展開方向Ｋの下流側に移動させつつ、試料内のアナライトを蛍光標識リガンドと結合させるようになっている。なお、試料やアナライト、蛍光標識リガンドの詳細は後述する。

[0024] コンジュゲートパッド９２の下面から吸収パッド９１の下面までの間には、メンブレン９６が延在しており、コンジュゲートパッド９２から供給される試料を伝わらせて展開方向Ｋに展開させるようになっている。メンブレン９６は、毛管現象を示し、試料を添加すると同時に当該試料が展開するような微細多孔性の不活性物質（アナライト、各種リガンド、各種蛍光体などと反応しない物質）で形成されている。具体的には、メンブレン９６としては、ポリウレタン、ポリエステル、ポリエチレン、ポリ塩化ビニル、ポリフッ化ビニリデン、ナイロン、ニトロセルロース又は酢酸セルロース等のセルロース誘導体等で構成される繊維状又は不織繊維状マトリクス、膜、濾紙、ガラス繊維濾紙、布、綿等が挙げられる。中でも、好ましくはセルロース誘導体やナイロンで構成される膜、濾紙、ガラス繊維濾紙等が用いられ、より好ましくはニトロセルロース膜、混合ニトロセルロースエステル（ニトロセルロースと酢酸セルロースの混合物）膜、ナイロン膜、濾紙が用いられる。

[0025] このメンブレン９６の上面のうち、後述のクロマトグラフィー試験装置１によってスキャンの行われるスキャン領域９００内には、アナライトの有無または量を検知するための３つの検知対象領域９３と、検知対象領域９３の位置を特定するためのマーカー９４とが設けられている。なお、本実施の形態においては、スキャン領域９００は矩形状の領域となっており、展開方向Ｋにおけるメンブレン９６の両端よりも内側に位置している。また、図１や

、後述の図３，図４においては、便宜上、検知対象領域９３やマーカー９４を視認できるように図示しているが、視認できないように設けられてもよい。

[0026] ３つの検知対象領域９３は、帯状に形成されており、展開方向Ｋに所定の間隔を空けて離間して配設され、展開方向Ｋの直交方向、つまり試験片９の幅方向（以下、検知ライン方向Ｚとする）にそれぞれ延在している。なお、本実施の形態においては、検知対象領域９３の間隔は２ｍｍ程度で一定となっており、展開方向Ｋにおける検知対象領域９３の長さ（幅）は１ｍｍ～３ｍｍ程度で互いに等しくなっている。

[0027] これら３つの検知対象領域９３のうち、上流側の２つの検知対象領域９３はテストライン９３ａとなっており、最も下流側の検知対象領域９３はコントロールライン９３ｂとなっている。

[0028] テストライン９３ａは、検出ゾーンとも称される領域である。このテストライン９３ａには、試料中のアナライトと蛍光標識リガンドとの複合体を特異的に捕捉する捕捉リガンドが固定化されている。なお、本実施の形態においては２つのテストライン９３ａのうち、一方のテストライン９３ａはアナライトとしてのＡ型のインフルエンザ抗原と蛍光標識リガンドとの複合体を捕捉し、他方のテストライン９３ａはアナライトとしてのＢ型のインフルエンザ抗原と蛍光標識リガンドとの複合体を捕捉するようになっている。

[0029] また、コントロールライン９３ｂは、参照ゾーンとも称される領域である。このコントロールライン９３ｂには、蛍光標識リガンドを特異的に捕捉する捕捉リガンドが固定化されている。

[0030] なお、以上のテストライン９３ａ及びコントロールライン９３ｂは、同一の塗布装置（例えばインクジェットプリンタなど）によってメンブレン９６上に形成されている。また、テストライン９３ａ及びコントロールライン９３ｂにおける捕捉リガンドとしては、アナライトや蛍光標識リガンドの種類に応じて、従来より公知のものを用いることができる。

[0031] マーカー９４は、蛍光を生じる領域であり、本実施の形態においては、帯

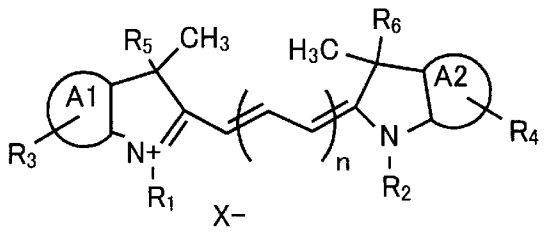
状に形成されて、展開方向Ｋの直交方向、つまり検知ライン方向Ｚに延在している。このマーカー９４は、３つの検知対象領域９３のうち少なくとも１つの検知対象領域９３よりも展開方向Ｋの下流側に配設されており、本実施の形態においては、３つの検知対象領域９３の全体よりも展開方向Ｋの下流側に配設されている。なお、最も下流側の検知対象領域９３とマーカー９４との間隔は検知対象領域９３同士の間隔と等しくなっており、展開方向Ｋにおけるマーカー９４の長さ（幅）は検知対象領域９３の長さ（幅）と等しくなっている。

[0032] 以上のマーカー９４は、蛍光体を含有しており、好ましくは、蛍光体を担持する担体を更に含有している。

これら蛍光体，担体としては、蛍光標識リガンドにおける蛍光体，担体（不溶性粒子）として後述されるもの等を用いることができる。但し、マーカー９４から生じる蛍光の波長領域と、検知対象領域９３から生じる蛍光の波長領域とは、少なくとも１部の波長が重複するようになっている。また、本発明においては、マーカー９４に含まれる蛍光体及び担体のうち、少なくとも一方はカチオン性となっている。具体的には、マーカー９４に担体が含まれない場合には、蛍光体がカチオン性であり、マーカー９４に担体が含まれる場合には、蛍光体がカチオン性であるか、担体がカチオン性であるか、或いは蛍光体及び担体の両方がカチオン性である。また、好ましくは、マーカー９４の蛍光体は、下記の化学構造式で示されるインドシアニン骨格を有し、６００～８００ｎｍの範囲内の励起光で蛍光発光する。

[0033]

[化1]



・A1,A2は、ベンゼン環、ナフタレン環
・R_1,R_2は、水素原子、アルキル基、スルホン酸基、アルコキシ基
・R_3,R_4,R_5,R_6は、メチル基、アルキル基、スルホン酸アルキル基、アミノアルキル基
・nは、1～3の整数
・X-は、必要に応じてアニオン種

[0034] ここで、カチオン性の担体としては、１級アミン導入のラテックス粒子などが挙げられる。このような担体としては、例えば「Polybead Amino Microspheres」（粒径0.20μm, Polysciences社製。但し「Polybead」は登録商標）などが挙げられる。

[0035] また、カチオン性の蛍光体としては、ＢＯＤＩＰＹ系色素や、インドシアニン骨格を有する色素、クマリン色素（Aminomethyl coumarin:例えばAMCA等）、アニリノナフタレンスルホン酸（ＡＮＳ）色素、Ｐｒｏｄａｎ色素、Ｈｏｅｃｈｓｔ色素、オレンジイエロー、ＹＯＹＯ色素（オレンジイエローの２量体）、チアゾールオレンジ、ＴＯＴＯ色素（チアゾールオレンジの２量体）等が挙げられる。

[0036] また、インドシアニン骨格を有する蛍光体（インドレニン系）とは、例えばAlexa Fluor 647（但し「Alexa Fluor」は登録商標）,Cy5, Cy5.5, 「S0830」（DKSHジャパン株式会社製)などのシアニン系色素である。

[0037] 以上のマーカー９４は、テストライン９３ａやコントロールライン９３ｂと同一の塗布装置によってメンブレン９６上に形成されている。

[0038] （１－２．試料及びアナライト）

試料は、アナライトとして、蛋白質、糖類、核酸、各種生理活性物質などを含み得るものである限り特に限定されるものではない。例えば、目的のアナライトを含み得る生体試料や食品の抽出液等が挙げられる。なお、生体試料としては、全血、血清、血漿、尿、唾液、喀痰、鼻腔又は咽頭拭い液、髄

液、羊水、乳頭分泌液、涙、汗、皮膚からの浸出液、組織や細胞および便からの抽出液等が挙げられる。

[0039] また、試料には、必要に応じて、蛍光標識リガンドやテストライン９３ａの捕捉リガンドと、アナライトとの特異的な結合反応が生じやすくするために、アナライトの前処理を行ってもよい。ここで、前処理としては、酸、塩基、界面活性剤等の各種化学薬品等を用いた化学的処理や、加熱・撹拌・超音波等を用いた物理的処理が挙げられ、これらの両方を用いても良い。特に、アナライトがインフルエンザウイルスＮＰ抗原等の、通常は表面に露出していない物質である場合、界面活性剤等による処理を行うのが好ましい。この目的に使用される界面活性剤として、特異的な結合反応、例えば、抗原抗体反応等のリガンドとアナライトとの結合反応性を考慮して、非イオン性界面活性剤が用いられてもよい。

[0040] また、試料は、通常の免疫学的分析法で用いられる溶媒（水、生理食塩水、または緩衝液等）や水混和有機溶媒で適宜希釈されていてもよい。

アナライトとしては、腫瘍マーカー、シグナル伝達物質、ホルモン等のタンパク質（ポリペプチド、オリゴペプチド等を含む）、核酸（一本鎖または二本鎖の、ＤＮＡ、ＲＮＡ、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ＰＮＡ（ペプチド核酸）等を含む）または核酸を有する物質、糖（オリゴ糖、多糖類、糖鎖等を含む）または糖鎖を有する物質、脂質などその他の分子が挙げられ、蛍光標識リガンドやテストライン９３ａの捕捉リガンドに特異的に結合するものである限り特に限定されないが、例えば、癌胎児性抗原（ＣＥＡ）、ＨＥＲ２タンパク、前立腺特異抗原（ＰＳＡ）、ＣＡ１９－９、α－フェトプロテイン（ＡＦＰ）、免疫抑制酸性タンパク（ＩＰＡ）、ＣＡ１５－３、ＣＡ１２５、エストロゲンレセプター、プロゲステロンレセプター、便潜血、トロポニンＩ、トロポニンＴ、ＣＫ－ＭＢ、ＣＲＰ、ヒト絨毛性ゴナドトロピン（ＨＣＧ）、黄体形成ホルモン（ＬＨ）、卵胞刺激ホルモン（ＦＳＨ）、梅毒抗体、インフルエンザウイルス、ヒトヘモグロビン、クラミジア抗原、Ａ群β溶連菌抗原、ＨＢｓ抗体、ＨＢｓ抗原、ロタウイルス、ア

デノウイルス、アルブミン、糖化アルブミン等が挙げられる。これらの中でも非イオン性界面活性剤により可溶化される抗原が好ましく、ウイルス核タンパク質のように自己集合体を形成する抗原がより好ましい。

[0041] （１－３．蛍光標識リガンド）

蛍光標識リガンドは、アナライトに特異的に結合するリガンドを、蛍光体を含む蛍光粒子で標識化してなるものである。

[0042] このうち、リガンドは、試料に含まれるアナライトを認識し、またはアナライトに認識されて、アナライトと特異的に結合できる分子または分子断片である。このような分子または分子断片としては、例えば、核酸（ＤＮＡ、ＲＮＡ、ポリヌクレオチド、オリゴヌクレオチド、ＰＮＡ（ペプチド核酸）等、またはヌクレオシド、ヌクレオチドおよびそれらの修飾分子。但し、一本鎖であっても二本鎖であっても良い。）、蛋白質（ポリペプチド、オリゴペプチド等）、アミノ酸（修飾アミノ酸も含む）、糖質（オリゴ等、多糖類、糖鎖を含む物質等）、脂質、またはこれらの修飾分子、複合体等が挙げられる。

[0043] 上記蛋白質としては、例えば、抗体やレクチン等が挙げられる。なお、本明細書において、「抗体」との用語は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体、遺伝子組み換えにより得られた抗体、および抗体断片を包含する。

[0044] また、リガンドを蛍光粒子で「標識化する」とは、蛍光粒子に、上述のリガンドが直接的にまたは間接的に、化学的または物理的な結合や吸着等で固定されることを意味する。さらに、蛍光粒子とは、不溶性粒子としての担体に、蛍光体が直接的にまたは間接的に、化学的または物理的な結合や吸着等で固定されてなる粒子を意味する。例えば、蛍光標識リガンドは、上記リガンドに蛍光粒子が直接結合してなるものであってもよいし、上記リガンドと蛍光粒子とが、リンカー分子を介して結合してなるものや、蛍光体と上記リガンドとがそれぞれ不溶性粒子に固定されてなるものであってもよい。

[0045] 蛍光粒子を構成する不溶性粒子（担体）としては、例えば、合成高分子粒

子、無機化合物粒子または多糖類粒子が用いられる。前記合成高分子粒子としては、特に制限されないが、例えば、ラテックス粒子、ポリ乳酸粒子等があげられ、好ましくは、ラテックス粒子である。前記ラテックス粒子の材質としては、特に制限されないが、例えば、ポリスチレン、スチレンーブタジエン共重合体、スチレンーアクリレート共重合体、スチレンーマレイン酸共重合体、ポリエチレンイミン、ポリアクリル酸、ポリメタクリル酸、ポリメチルメタクリレート等があげられ、好ましくは、ポリスチレン、スチレンーアクリレート共重合体である。前記無機化合物粒子としては、特に制限されないが、例えば、金、銀、白金のような金属粒子、または金属コロイド粒子、多孔性ガラス粒子、シリカ、アルミナ等の金属酸化物粒子があげられる。前記多糖類粒子としては、特に制限されないが、例えば、アガロース粒子、デキストラン粒子、セルロース粒子、キトサン粒子等があげられる。

[0046] 蛍光粒子に含まれる蛍光体としては、特に限定されるものではないが、例えば、励起光として、２００～７００ｎｍの範囲内の波長の光（紫外～近赤外光）により励起されたときに、４００～９００ｎｍの範囲内の波長の蛍光（可視～近赤外光の蛍光）を示すものが挙げられる。具体的な蛍光体としては、フルオレセイン系色素分子、ローダミン系色素分子、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ（インビトロジェン社製）系色素分子、ＢＯＤＩＰＹ（インビトロジェン社製）系色素分子、カスケード系色素分子、クマリン系色素分子、エオジン系色素分子、ＮＢＤ系色素分子、ピレン系色素分子、ＴｅｘａｓＲｅｄ系色素分子、シアニン系色素分子等を挙げることができる。さらに具体的には、５ーカルボキシーフルオレセイン、６ーカルボキシーフルオレセイン、５，６ージカルボキシーフルオレセイン、６ーカルボキシー２’，４，４’，５’，７，７’ーヘキサクロロフルオレセイン、６ーカルボキシー２’，４，７，７’ーテトラクロロフルオレセイン、６ーカルボキシー４’，５’ージクロロー２’，７’ージメトキシフルオレセイン、ナフトフルオレセイン、５ーカルボキシーローダミン、６ーカルボキシーローダミン、５，６ージカルボキシーローダミン、ローダミン６Ｇ、テトラメチルローダミン、Ｘー

ローダミン、及びＡｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ３５０，Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ４０５、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４３０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ４８８、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ ５００、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５１４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ５３２、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５４６、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５５５、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ ５６８、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ５９４、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ６１０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６３３、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６３５、ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ ６４７、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ６６０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ６８０、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７００、Ａｌｅｘａ Ｆｌｕｏｒ ７５０、ＢＯＤＩＰＹＦＬ，ＢＯＤＩＰＹ ＴＭＲ、ＢＯＤＩＰＹ ４９３／５０３、ＢＯＤＩＰＹ ５３０／５５０、ＢＯＤＩＰＹ５５８／５６８、ＢＯＤＩＰＹ５６４／５７０、ＢＯＤＩＰＹ ５７６／５８９、ＢＯＤＩＰＹ５８１／５９１、ＢＯＤＩＰＹ ６３０／６５０、ＢＯＤＩＰＹ６５０／６６５（以上インビトロジェン社製）、メトキシクマリン、エオジン、ＮＢＤ、ピレン、Ｃｙ５（登録商標）、Ｃｙ５．５、Ｃｙ７等を挙げることができる。単独でも複数種を混合したものを用いてもよい。

[0047] また、特に６００～８００ｎｍの範囲内の励起光で蛍光発光する蛍光体としては、Ｃｙ３．５，Ａｌｉｘａ Ｆｌｏｒ ６４７，Ｃｙ５， Ｃｙ５．５，ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ ６８０、Ｃｙ７，ＡｌｅｘａＦｌｕｏｒ ７９０等のインドシアニン骨格を有した有機色素、アクリフラビン、ＤＤＡＯ等のアクリジン誘導体、ブリリアントブルー、ブリリアントグリーン等のシアニン誘導体、アロフィコシアニン等の蛍光蛋白質などが挙げられる。

[0048] なお、蛍光粒子を構成する不溶性粒子が、ラテックス粒子などの高分子化合物製の粒子である場合、蛍光体が、該粒子の表面に露出するように、あるいは、蛍光検出時に検出可能な限り、該粒子の表面近くに存在するように、練り込まれていてもよいし、該粒子の表面に吸着されていてもよい。

[0049] 上記リガンドを、蛍光粒子または不溶性粒子に固定化させる方法としては、上記リガンドを蛍光粒子または不溶性粒子に物理的に吸着による方法と、化学的な結合として共有結合による方法に大別できる。前者としては、例え

ば、不溶性粒子として、シリカ粒子や金粒子がコロイド状に分散した溶液に、上記リガンドを添加した後、所定の時間放置して物理吸着させるような方法が挙げられ、このような方法には操作が簡便であるという利点がある。一方、後者としては、例えば、蛍光粒子または不溶性粒子の粒子表面に導入したカルボキシル基と上記リガンドのアミノ基を縮合剤の使用によりアミド結合で結合する方法や、いわゆる架橋試薬を用いて蛍光粒子または不溶性粒子と上記リガンドとを結合する方法が挙げられ、このような方法には上記リガンドを蛍光粒子または不溶性粒子に定量的かつ不可逆的に導入できるという利点がある。また、上記のような方法により、上記リガンドを蛍光粒子または不溶性粒子に固定した後は、牛血清アルブミン溶液のようなブロッキング剤を添加して抗体が未結合な状態である粒子表面をブロッキングすることが好ましい。

[0050] （２．クロマトグラフィー試験装置）

（２－１．外観構成）

続いて、クロマトグラフィー試験装置の外観構成について、図２を用いて説明する。

ここで、図２はクロマトグラフィー試験装置１の外観構成の一例を示す斜視図である。

[0051] この図に示すように、クロマトグラフィー試験装置１は、試験片９上におけるアナライトを検出または定量するものであり、挿入口１０と、スイッチ群１１と、ディスプレイ１２と、プリンタ部１３とを備えている。

[0052] このうち、挿入口１０は、クロマトグラフィー試験装置１に対して試験片９を挿入したり、クロマトグラフィー試験装置１内の試験片９を排出したりするための開口部である。スイッチ群１１は、クロマトグラフィー試験装置１に対して各種の指示を行うための複数のスイッチを有している。ディスプレイ１２は、試験片９の分析結果など、各種の情報を表示するものであり、本実施の形態においてはＬＣＤ（Liquid Crystal Display）となっている。プリンタ部１３は、試験片９の分析結果など、各種の情報をプリントアウト

するものである。

[0053] （２－２．内部構成）

続いて、クロマトグラフィー試験装置１の内部構成について、図３を用いて説明する。

ここで、図３はクロマトグラフィー試験装置１の内部構成の一例を示す模式図である。

[0054] この図に示すように、クロマトグラフィー試験装置１は、光源２と、照射光学系３と、ラインセンサ４と、検出光学系５と、走査装置６と、制御部７とを備えている。

[0055] 光源２は、光を出射するものであり、本実施の形態においては、レーザ光源となっている。このレーザ光源の波長は、使用する蛍光標識リガンドの種類に依存するものの、630nm～780nmの範囲であることが好ましい。

[0056] 照射光学系３は、光源２から出射された光を試験片９に導いて、当該試験片９に対する照射光Ｓを出射する光学系であり、本実施の形態においては、レンズ３０，３２と、バンドパスフィルター３１と、アパーチャ３３とを有している。なお、本実施の形態において照射光Ｓとは、光源２から試験片９に向かって照射された光のうち、照射光学系３を通過した後、試験片９に当たるまでの部分をいう。

[0057] レンズ３０は、光源２から出射された光を平行光に変換してバンドパスフィルター３１に入射させるようになっている。バンドパスフィルター３１は、光源２から出射された光の各周波数成分のうち、試験片９の蛍光標識リガンドやマーカー９４を励起して蛍光を生じさせる周波数成分のみを通過させるようになっている。レンズ３２は、バンドパスフィルター３１を通過した光を試験片９上に集光するようになっている。アパーチャ３３は、レンズ３２から出射される収束光の周辺部分を遮ることにより、試験片９に不要な光が当たるのを防止するようになっている。

[0058] ラインセンサ４は、ライン状に配列された複数の画素によって光電変換を行う受光センサであり、所定の長手方向Ｙに延在して配設されている。この

ように受光センサとしてラインセンサ４を用いることにより、受光センサとしてエリアセンサやフォトダイオードを用いる場合と比較して、信号処理の制御や走査機構の構成を簡略化することができる。なお、ラインセンサ４としては、ラインＣＣＤやラインＣＭＯＳ、１次元に配列されたフォトダイオードなど、従来より公知のものを用いることができる。

[0059] 検出光学系５は、照射光Ｓに起因して試験片９で生じる検出対象光Ｔをラインセンサ４に導く光学系であり、本実施の形態においては、レンズ５０，５２と、バンドパスフィルター５１とを有している。なお、本実施の形態において検出対象光Ｔとは、光源２からの出射光に起因して試験片９で発生する光のうち、検出光学系５に入射するまでの部分をいい、励起された蛍光標識リガンドやマーカー９４で生じる蛍光や、試験片９での反射光、散乱光を含んでいる。

[0060] レンズ５０は、試験片９で生じる検出対象光Ｔを平行光に変換してバンドパスフィルター５１に入射させるようになっている。バンドパスフィルター５１は、検出対象光Ｔの各周波数成分うち、蛍光標識リガンドやマーカー９４で生じた蛍光の周波数成分のみを通過させるようになっている。レンズ５２は、バンドパスフィルター５１を通過した光をラインセンサ４上に集光するようになっている。

[0061] 走査装置６は、照射光学系３若しくは検出光学系５における少なくとも１つの光学素子、または試験片９を走査対象物として走査方向Ｘに走査させることで、照射光Ｓによる照射スポットを試験片９のスキャン領域９００内で走査させるものであり、本実施の形態においては、試験片９を下方から支持する板状の支持台６０と、当該支持台６０を走査方向Ｘに往復運動させるモータ６１とを有し、試験片９を走査対象物として支持台６０ごと走査方向Ｘに走査させるようになっている。ここで、モータ６１としてはステッピングモータやボイスコイルモータ、ＤＣモータなど、従来より公知のモータを用いることができる。また、本実施の形態においては、走査方向Ｘは展開方向Ｋと平行となっており、また、ラインセンサ４の長手方向Ｙと直交している

。

[0062] 制御部７は、スイッチ群１１から入力される指示に応じて所定の処理を実行し、各機能部への指示やデータの転送等を行い、クロマトグラフィー試験装置１を統括的に制御するとともに、種々の演算を行うものである。例えば、この制御部７は、ラインセンサ４からの出力信号に基づいてアナライトを検出または定量するようになっている。なお、図３では制御部７が光源２やラインセンサ４、モータ６１などに接続された状態を図示しているが、制御部７の接続対象はこれらに限定されるものではない。

[0063] なお、以上のようなクロマトグラフィー試験装置１としては、例えば上記特許文献１に記載の装置を用いることができる。

[0064] 続いて、クロマトグラフィー試験装置１を用いて行われるクロマトグラフィー試験方法について説明する。

[0065] まず、試験片９に試料が供給されて当該試験片９におけるコントロールライン９３ｂ、つまり最も下流側の検知対象領域９３に蛍光標識リガンドが結合した後に、試験片９がクロマトグラフィー試験装置１の挿入口１０に挿入される。試料の滴下からコントロールライン９３ｂに蛍光標識リガンドが結合するまでの時間は、一般に試料の滴下から１０分程度である。

[0066] 次に、制御部７が、試験片９上でのマーカー９４の位置や幅などを検出するための走査処理（以下、予備走査処理とする）を行う。具体的には、この予備走査処理においてまず制御部７は、モータ６１を駆動して試験片９を１ステップ分だけ走査方向Ｘに移動させることで、照射光Ｓによる試験片９上の照射スポットをスキャン領域９００内の下流端から上流端の側に向かって移動させる。ここで、１ステップ分の移動量としては、走査方向Ｘにおけるマーカー９４の幅より小さい所定量が予め設定されている。次に、制御部７が光源２を点灯させて光を照射させた後、ラインセンサ４から各画素での受光信号のデータを取得して、光源２を消灯させる。そして、制御部７は、走査方向Ｘにおいてマーカー９４の全域が検出されるまで上述の処理を繰り返した後、予備走査処理を終了する。

[0067] 以上の予備走査処理が終了したら、次に制御部７は、予備走査処理で検知されたマーカー９４の位置に基づいて、テストライン９３ａやコントロールライン９３ｂの位置を算出して特定するとともに、コントロールライン９３ｂでの光量に基づいて、光源２のパワーを変更し、テストライン９３ａの検知に用いる閾値を変更した後、テストライン９３ａにおけるアナライトの有無または量を検知するための走査処理、つまり本走査処理を行う。なお、この本走査処理としては、従来より公知の処理を用いることができる。但し、このとき制御部７は、コントロールライン９３ｂでの光量を基準とする代わりに、マーカー９４での光量を基準として光源２のパワーを変更し、テストライン９３ａの検知に用いる閾値を変更しても良い。この場合には、コントロールライン９３ｂでの光量を基準光量として用いる場合と異なり、基準光量が標識リガンドの捕捉反応の強弱などに影響を受けないこととなる。

[0068] 以上のように、本実施形態によれば、スキャン領域９００内にマーカー９４が設けられているので、ハウジングケースに位置特定用のマーカーを予め設ける従来の場合と異なり、ハウジングケースとメンブレン９６との位置合わせの精度によってテストライン９３ａの位置特定精度が影響を受けてしまうのを防止することができる。更に、マーカー９４は蛍光を生じるので、試料と一緒に流される蛍光標識リガンドの捕捉領域、つまりコントロールラインの位置を基準位置とする従来の場合と異なり、捕捉反応の強弱によってテストライン９３ａの位置特定精度が影響を受けてしまうのを防止することができる。従って、各検知対象領域９３の位置を正確に特定することができる。

また、マーカー９４は蛍光を生じるので、検知対象領域９３からの蛍光を検出する設備を用いて、マーカー９４の位置を検出することができる。従って、マーカー９４位置の検出，定量用に新たな設備を設ける必要がないため、試験のコストが高くなってしまうのを防止することができる。

また、マーカー９４はカチオン性であるので、アニオン性である場合と比較して、試料に水溶し難い。従って、試料の展開によってマーカー９４の成

分が流れてしまうのを防ぐことができるため、マーカー９４の正確な位置が特定できずにテストラインの位置が正確に特定されなくなったり、メンブレン９６内の空隙がマーカー９４の成分で塞がれて毛細管現象による試料の展開が阻害されたり、試料中のアナライトと蛍光標識リガンドとの複合化反応やテストライン９３ａにおける複合体の捕捉反応が阻害されてアナライトの検出精度，定量精度が低下したりするのを防止することができる。

[0069] また、マーカー９４から生じる蛍光の波長領域と、検知対象領域９３から生じる蛍光の波長領域とは少なくとも１部の波長が重複するので、検知対象領域９３からの蛍光を検出する設備を用いて、マーカー９４の位置を確実に検出することができる。従って、マーカー９４位置の検出，定量用に新たな設備を設けることで試験のコストが高くなってしまうのを、確実に防止することができる。

[0070] また、マーカー９４は少なくとも１つの検知対象領域９３よりも展開方向Ｋの下流側に配設されているので、試料内のアナライトや、試料と一緒に流される蛍光標識リガンドがマーカー９４の位置で堰き止められてしまう場合であっても、少なくとも１つの検知対象領域９３で、アナライトの検出，定量に関するデータを得ることができる。

[0071] また、マーカー９４は、複数の検知対象領域９３の全体よりも展開方向Ｋの下流側に配設されているので、試料内のアナライトや、試料と一緒に流される蛍光標識リガンドがマーカー９４の位置で堰き止められてしまう場合であっても、全ての検知対象領域９３で、アナライトの検出，定量に関するデータを得ることができる。

[0072] また、検知対象領域９３及びマーカー９４はメンブレン９６に設けられているので、別々の部材に設けられている場合と異なり、各部材の位置合わせの精度によってテストライン９３ａの位置特定精度が影響を受けてしまうのを防止することができる。

[0073] また、マーカー９４が蛍光体の担体を含有する場合には、試料の展開によってマーカー９４の成分が流れてしまうのを確実に防ぐことができる。従っ

て、マーカー９４の正確な位置が特定できずにテストライン９３ａの位置が正確に特定されなくなったり、試料中のアナライトと蛍光標識リガンドとの複合化反応やテストラインにおける複合体の捕捉反応が阻害されて、アナライトの検出精度，定量精度が低下したりするのを確実に防止することができる。また、蛍光体が担体に担持されるので、蛍光体が単体ではカチオン性の性質に起因して水溶し難く、メンブレン９６上に均一に塗布し難い場合であっても、蛍光体と担体との複合体を溶媒中に均一に分散させ、メンブレン９６上に均一に塗布することができる。

[0074] また、マーカー９４での光量を基準として光源２のパワーを変更し、テストライン９３ａの検知に用いる閾値を変更する場合には、コントロールライン９３ｂでの光量を基準光量として用いる場合と異なり、基準光量が蛍光標識リガンドの捕捉反応の強弱などに影響を受けないため、アナライトの検知や定量を正確に行うことができる。また、蛍光標識リガンドの捕捉反応や試料の展開状態によらず、常に一定の光量をマーカー９４から得ることができるため、この光量を用いてクロマトグラフィー試験装置１の動作確認やキャリブレーションを行うことができる。

[0075] ［変形例］

続いて、上記実施形態における試験片９の変形例について説明する。なお、上記実施形態と同様の構成要素には同一の符号を付し、その説明を省略する。

[0076] 本変形例における試験片９Ａは、上記実施形態における試験片９とは異なり、図４に示すように、テストストリップ９５Ａと、当該テストストリップ９５Ａ上に配設された透明なカバー部材９０１とを備えている。なお、テストストリップ９５Ａで生じる蛍光をカバー部材９０１の上方から検知できる限りにおいて、カバー部材９０１は必ずしも透明でなくても良い。

[0077] テストストリップ９５Ａは、メンブレン９６Ａを有している。このメンブレン９６Ａは、マーカー９４が設けられていない点を除き、上記実施形態におけるメンブレン９６と同様の構成となっている。

[0078] カバー部材９０１は、テストストリップ９５Ａの上面を覆う部材であり、好ましくは、コンジュゲートパッド９２の上面から、メンブレン９６Ａの上面のうち、最も下流側の検知対象領域９３までの領域を覆うようになっている。カバー部材９０１とメンブレン９６Ａの上面との間は、アナライトを含む試料がメンブレン９６Ａ上を展開できる程度の空間があることが好ましく、必要に応じて、カバー部材９０１の下面および／またはメンブレン９６Ａの上面に、スペーサーなどが形成されていてもよい。但し、カバー部材９０１が粘着剤を介してメンブレン９６Ａの上面を被覆していてもよい。例えば、親水性フィルムにおいて、そのメンブレン９６Ａに向き合う面の全体や周縁部などに、粘着剤層が形成されていてもよい。

[0079] このカバー部材９０１としては、ＰＥＴ製などの液体不透過性シートを用いても良いし、親水性フィルムを用いても良い。

[0080] ここで、親水性フィルムとは、少なくともフィルム両面のうち、メンブレン９６Ａに接する側（下側）の面が親水性を有するフィルムを指し、さらに「親水性」とは、空気中における水接触角が５０°以下、好ましくは４０°以下、より好ましくは３０°以下の表面を有することを指す。また、「水接触角」は、空気中における水とフィルム表面とが為す静的接触角であり、より具体的には、フィルムに水を滴下した際に生じる水とフィルム表面とのなす角度である。さらに換言すれば、「水接触角」は、水滴の気ー液界面がフィルム表面と接する点において、この水滴の気ー液界面とフィルム表面とがなす角度である。一般に、フィルム表面の親水性が高いほど、水接触角は小さい（すなわち０°に近い）。この水接触角は、空気中での水接触角として、θ／２法など種々の従来公知の方法により測定することによって評価できる。より具体的には、上記水接触角は、２３℃、５０％ＲＨの雰囲気下で、純水２μリットルを滴下し、接触角計（協和界面化学社製、型式：ＣＡ－Ｘ１５０）を用いて、θ／２法により算出される。

[0081] 親水性フィルムは、上記のような親水性の表面を有するものであれば特に限定されない。親水性フィルムは、例えば、セロハンなどの親水性ポリマー

からなるフィルムであってもよい。また、疎水性ポリマーに改質剤を添加して調製される、親水性が付与されたポリマーまたは組成物から得られたフィルムであってもよいし、疎水性ポリマーからなるフィルムの、少なくともメンブレン９６Ａに接する側の表面を、親水性を付与するために表面処理して得られたフィルムであってもよい。

[0082] 上記疎水性ポリマーとは、その表面の水接触角が通常５０°を超えるものであり、例えば、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレートなどのポリエステル樹脂、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリイソブチレン、ポリブタジエン等のポリオレフィン樹脂、ポリカーボネート樹脂、ポリメチルメタクリレート樹脂、ポリ塩化ビニル樹脂、セルロースエステル樹脂、ポリイミド樹脂、ポリアミド樹脂、ポリスルホン樹脂、ＡＳ樹脂、ＡＢＳ樹脂、メラミン樹脂、ポリ酢酸ビニル、ポリフッ化ビニルなどが挙げられる。

[0083] また、改質剤としては、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、変性ポリビニルアルコール（アクリルアミド、不飽和カルボン酸、スルホン酸モノマー、カチオン性モノマー、不飽和シランモノマー、不飽和エチレンオキサイドモノマー等との共重合体）、変性ポリビニルピロリドン（酢酸ビニル、不飽和イミダゾール、ビニルカプロラクトン等との共重合体）、親水性アクリル系ポリマー、ポリアクリル酸、ポリアクリル酸塩類、ポリアクリルアミド、ポリイソプロピルアクリルアミド、ポリホルムアミド、ポリエチレングリコール、デンプン、変性デンプン、ゼラチン、カゼイン、アルギン、セルロース化合物（カルボキシメチルセルロース、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース）、親水性ウレタン系ポリマー、セルロース化合物、水溶性ナイロン、ポリビニルホルマール、ポリビニルアセタール、ポリビニルベンザール、ポリウレタン、セロハンなどの親水性ポリマー；キチン類、キトサン類などの多糖類；ソルビタン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル、グリセリン脂肪酸エステル、ポリグリセリン脂肪酸エステル、プロピレングリコール脂肪酸エステ

ル、高級アルコール脂肪酸エステル、多価アルコール脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、ポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル、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フェニルエーテルなどの防曇剤（界面活性剤）；シリカ、アルミナ、イットリア、ジルコニア、チタニアなどの無機酸化物；が挙げられる。

[0084] なお、改質剤が親水性ポリマーや多糖類である場合、疎水性ポリマーに、該改質剤とともに、カルボジイミド化合物、ポリイソシアネート化合物、オキサゾリン化合物、エポキシ化合物などの架橋剤を添加して、疎水性ポリマーと前記改質剤とを架橋させてもよい。

[0085] また、改質剤が無機酸化物である場合、疎水性ポリマーに、該無機酸化物として、無機酸化物の粒子を添加してもよいし、水に無機酸化物が分散されてなる無機酸化物ゾルを添加してもよい。改質剤としての無機酸化物は、無定形チタニア、含水チタニアなどの光触媒作用を有するものであってもよい。

[0086] 疎水性フィルムの表面処理としては、放射線、紫外線等の照射、アーク、直流グロー、高周波、マイクロはコロナ放電等によるプラズマ処理などの電気化学処理、水酸基やカルボキシル基等の親水性基を有するカップリング剤等による化学的な表面処理が挙げられる。なお、カップリング剤としては、シランカップリング剤、チタンカップリング剤などが挙げられる。

[0087] なお、カバー部材９０１の色調や透明性は、照射光および励起光の吸収，散乱が蛍光強度の測定に対して実質的に影響しない程度であることが好ましい。このようなカバー部材９０１として親水性透明フィルムを用いる場合、その具体例としては、高い光透過率を有するＴＡＣフィルムや、ポリカーボネート、ポリプロピレンなどのポリオレフィン製フィルムが挙げられる。

[0088] カバー部材９０１として、以上のような親水性フィルムを用いる場合には、液体不透過性シートを用いる場合と比較して、試料を迅速に展開することができ、また、試料の展開時間が短くても良好な感度でアナライトを検出または定量することができる。

[0089] 以上のカバー部材９０１の上面には、マーカー９４Ａが設けられている。

マーカー９４Ａは、上記実施形態におけるマーカー９４と同様に、カチオン性の材料を含んで蛍光を生じる領域であり、検知ライン方向Ｚに延在している。このマーカー９４Ａは、上記実施形態におけるマーカー９４と異なり、メンブレン９６Ａ上を展開する試料に接することがないため、検知対象領域９３よりも展開方向Ｋの下流側に限らず、任意の位置に配設可能となっている。

[0090] 以上のような試験片９Ａによれば、上記実施形態における試験片９と同様の効果を得ることができるのは勿論のこと、検知対象領域９３がメンブレン９６に設けられ、マーカー９４がカバー部材９０１に設けられているので、試料の展開によってマーカー９４の成分が流れてしまうのを確実に防ぐことができる。従って、マーカー９４の正確な位置が特定できずにテストライン９３ａの位置が正確に特定されなくなったり、メンブレン９６内の空隙がマーカー９４の成分で塞がれて毛細管現象による試料の展開が阻害されたり、試料中のアナライトと蛍光標識リガンドとの複合化反応やテストライン９３ａにおける複合体の捕捉反応が阻害されてアナライトの検出精度，定量精度が低下したりするのを確実に防止することができる。

[0091] なお、本発明を適用可能な実施形態は、上述した実施形態や変形例に限定されることなく、本発明の趣旨を逸脱しない範囲で適宜変更可能である。

[0092] 例えば、上記の実施形態においては、検知対象領域９３を３つとして説明したが、２つや４つ以上としても良い。また、３つの検知対象領域９３のうち２つをテストライン９３ａ、１つをコントロールライン９３ｂとして説明したが、３つ全てをテストライン９３ａとしても良い。

[0093] また、テストストリップ９５を長尺な矩形状として説明したが、Ｌ字状など、他の任意の形状としても良い。この場合、試料は添加位置からテストストリップ９５の形状に沿って展開することとなる。

[0094] また、テストストリップ９５の一端に試料を添加することとして説明したが、中央部に添加することとしても良い。この場合には、試料はテストスト

リップ９５上を添加位置から端部（周縁部）に向って展開することとなる。

[0095] また、検知対象領域９３及びマーカー９４を展開方向Ｋの直交方向に延在する形状として説明したが、少なくとも一方の延在方向を他の方向としても良いし、一方向に延在しない形状、例えば円形などとしても良い。

[0096] また、マーカー９４がテストストリップ９５に１つ設けられていることとして説明したが、複数設けられることとしても良い。例えば、検知対象領域９３と同数のマーカー９４がそれぞれ検知対象領域９３の近傍に配設されることとしても良い。

[0097] また、上記の変形例においては、マーカー９４Ａがカバー部材９０１の上面に設けられていることとして説明したが、メンブレン９６Ａ上を展開する試料によってマーカー９４Ａが流されない限りにおいて、カバー部材９０１の下面に設けられていても良い。

実施例 1

[0098] 以下、実施例を挙げて本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

[0099] ［１．カチオン性の蛍光体を担持した不溶性担体分散液の調製］

マーカー９４に含まれるカチオン性の蛍光体として、2-[5-[1,1-Dimethyl-3-(3-methyl-butyl)-1,3-dihydro-benzo[e]indol-2-ylidene]-penta-1,3-dienyl]-1,1-dimethyl-3-(3-methyl-butyl)-1H-benzo[e]indolium hexafluorophosphate（製品品番「S0830」，DKSHジャパン株式会社製)を使用した。なお、この蛍光体はインドシアニン骨格を有している

。

[0100] また、蛍光体を担持する水不溶性の担体として、粒径が220nmのポリスチレンラテックス粒子（製品品番「IMMUTEX P2219」（但し「IMMUTEX」は登録商標），JSR株式会社製）を使用した。

[0101] そして、５０mgのポリスチレンラテックス粒子「P2219」を４００μLのDMSO（ジメチルスルホキシド）に懸濁し、１２０℃に加熱した。この懸濁液にカチオン性の蛍光体「S0830」のDMSO溶液（但し、蛍光体の濃度は１００mg/mL

）を２０μL加え、１２０℃で１時間加熱した。その後、この懸濁液に水／エタノール混合溶媒を５mL加えて懸濁し、遠心分離（15000xG, 30min）で粒子を回収した後、さらに０．５wt%のTriton-X100（界面活性剤）の水溶液で粒子を洗浄し、カチオン性の蛍光体を担持したラテックス粒子の分散液（但しラテックス粒子の濃度は０．１wt%）を調製した。

[0102] ［２．蛍光マーカーを塗布したテストストリップ９５の作製］

検知対象領域９３としてテストライン９３ａを形成するために、トリニトロセルロース製のメンブレン９６（Millipore社製、白色、幅60ｍｍ×長さ350ｍｍ）の上面のうち、スキャン領域９００における下流端から11.7mm、14.7mm、17.7mmの位置に、それぞれ別個の捕捉リガンドを塗布した。以下、最も上流側の位置に形成されるテストライン９３ａをテストライン９３a_1、２番目に上流側の位置に形成されるテストライン９３ａをテストライン９３a_2、最も下流側の位置に形成されるテストライン９３ａをテストライン９３a_3とする。また、テストライン９３a_1の捕捉リガンドを捕捉リガンド（１）とし、当該捕捉リガンド（１）によって捕捉されるアナライトをアナライト（１）とする。同様に、テストライン９３a_2の捕捉リガンドを捕捉リガンド（２）とし、当該捕捉リガンド（２）によって捕捉されるアナライトをアナライト（２）とし、テストライン９３a_3の捕捉リガンドを捕捉リガンド（３）とし、当該捕捉リガンド（３）によって捕捉されるアナライトをアナライト（３）とする。

[0103] 次に、マーカー９４を形成するために、スキャン領域９００における下流端から20.7mmの位置に、上述のように調整したラテックス粒子の分散液を塗布した。塗布には陽圧噴霧装置「BioJet」（BioDot社製）を用いた。

[0104] 次に、メンブレン９６に４５℃の温風を１０分間吹き付けた後、乾燥させた。

そして、図５Ａに示すように、このメンブレン９６を用いてテストストリップ（以下、実施例のテストストリップとする）９５を作製した。また、図６Ａに示すように、比較例として、マーカー９４を形成していないテストス

トリップ（以下、比較例のテストストリップとする）９５Ｈを作製した。なお、図５Ａ,図６Ａにおいては便宜上、テストライン９３ａを視認できないように図示し、図５Ａにおいてはマーカー９４を視認できるように図示している。

[0105] ［３．検知対象領域９３の反応］

実施例，比較例のテストストリップ９５，９５Ｈに、アナライト（１）～（３）をそれぞれ含有する試料を滴下して展開させた後、このテストストリップ９５，９５Ｈ上で蛍光検出による画像撮影を行ったところ、図５Ｂ，図６Ｂに示すような画像が得られた。

[0106] 同様に、実施例，比較例のテストストリップ９５，９５Ｈに、アナライト（２），（３）をそれぞれ含有する試料を滴下して展開させた後、このテストストリップ９５，９５Ｈ上で蛍光検出による画像撮影を行ったところ、図５Ｃ，図６Ｃに示すような画像が得られた。

[0107] 同様に、実施例，比較例のテストストリップ９５，９５Ｈに、アナライト（２）を含有する試料を滴下して展開させた後、このテストストリップ９５，９５Ｈ上で蛍光検出による画像撮影を行ったところ、図５Ｄ，図６Ｄに示すような画像が得られた。

[0108] ［４．評価］

図５Ｂ～図５Ｄ，図６Ｂ～図６Ｄから明らかなように、マーカー９４を設けたテストストリップ９５では、マーカー９４を設けていないテストストリップ９５Ｈと同様に、アナライトが精度よく検出されることが分かる。また、テストストリップ９５では、テストストリップ９５Ｈと異なり、各テストライン９３ａの位置を正確に特定し、何れのテストライン９３ａから蛍光が検出されているかを容易に把握可能であることが分かる。

[0109] なお、明細書、請求の範囲、図面および要約を含む２０１２年１１月１４日に出願された日本語特許出願Ｎｏ．２０１２－２４９９０６号の全ての開示は、そのまま本出願の一部に組み込まれる。

産業上の利用可能性

[0110] 以上のように、本発明は、検知対象領域の位置を正確に特定する必要のあるクロマトグラフィー試験片、クロマトグラフィー試験方法及びメンブレンに適している。

符号の説明

[0111]

９，９Ａ	クロマトグラフィー試験片
９３	検知対象領域
９３ａ	テストライン（検知対象領域）
９３ｂ	コントロールライン（検知対象領域）
９４，９４Ａ	マーカー
９６，９６Ａ	メンブレン
９００	スキャン領域
９０１	カバー部材

請求の範囲

[請求項1] 蛍光標識リガンドを用いたクロマトグラフィー試験で試料内のアナライトを検出または定量するために使用され、試料を供給されて所定の展開方向に展開させるとともに、蛍光の有無を検知するためのスキャンが行われるクロマトグラフィー試験片において、

スキャンの行われるスキャン領域内に、

前記展開方向に離間した状態で配設された、アナライトの有無または量を検知するための複数の検知対象領域と、

カチオン性の材料を含んで蛍光を生じるマーカーと、

を備えるクロマトグラフィー試験片。

[請求項2] 請求項１記載のクロマトグラフィー試験片において、

前記マーカーは、カチオン性の蛍光体を含有するクロマトグラフィー試験片。

[請求項3] 請求項２記載のクロマトグラフィー試験片において、

前記マーカーは、

前記蛍光体を担持する担体を含有するクロマトグラフィー試験片。

[請求項4] 請求項１記載のクロマトグラフィー試験片において、

前記マーカーは、

蛍光体と、

前記蛍光体を担持するカチオン性の担体とを含有するクロマトグラフィー試験片。

[請求項5] 請求項４記載のクロマトグラフィー試験片において、

前記蛍光体は、カチオン性であるクロマトグラフィー試験片。

[請求項6] 請求項１～５の何れか一項に記載のクロマトグラフィー試験片において、

前記蛍光体は、インドシアニン骨格を有する化合物であるクロマトグラフィー試験片。

[請求項7] 請求項１～６の何れか一項に記載のクロマトグラフィー試験片にお

いて、

前記マーカーは、

前記複数の検知対象領域のうち少なくとも１つの検知対象領域よりも前記展開方向の下流側に配設されているクロマトグラフィー試験片。

[請求項8] 請求項７記載のクロマトグラフィー試験片において、

前記マーカーは、

前記複数の検知対象領域の全体よりも前記展開方向の下流側に配設されているクロマトグラフィー試験片。

[請求項9] 請求項１～８の何れか一項に記載のクロマトグラフィー試験片において、

前記マーカーから生じる蛍光の波長領域と、

前記検知対象領域から生じる蛍光の波長領域とは、少なくとも１部の波長が重複するクロマトグラフィー試験片。

[請求項10] 請求項１～９の何れか一項に記載のクロマトグラフィー試験片において、

供給される試料を伝わらせて前記展開方向に展開させるメンブレンを備え、

前記複数の検知対象領域及び前記マーカーは、前記メンブレンに設けられているクロマトグラフィー試験片。

[請求項11] 請求項１～９の何れか一項に記載のクロマトグラフィー試験片において、

供給される試料を伝わらせて前記展開方向に展開させるメンブレンと、

前記メンブレンの上面を覆うカバー部材と、を備え、

前記複数の検知対象領域は、前記メンブレンに設けられ、

前記マーカーは、前記カバー部材に設けられているクロマトグラフィー試験片。

[請求項12] 請求項１～１１の何れか一項に記載のクロマトグラフィー試験片を用いて試料内のアナライトを検出または定量するクロマトグラフィー試験方法。

[請求項13] 蛍光標識リガンドを用いたクロマトグラフィー試験で試料内のアナライトを検出または定量するために使用され、試料を供給されて所定の展開方向に展開させるとともに、蛍光の有無を検知するためのスキャンが行われるクロマトグラフィー試験片に備えられるメンブレンにおいて、

当該メンブレンは、

供給される試料を伝わらせて前記展開方向に展開させるものであり、

スキャンの行われるスキャン領域内に、

前記展開方向に離間した状態で配設された、アナライトの有無または量を検知するための複数の検知対象領域と、

カチオン性の材料を含んで蛍光を生じるマーカーと、

が設けられているメンブレン。

[請求項14] 請求項１３記載のメンブレンにおいて、

前記マーカーは、カチオン性の蛍光体を含有するメンブレン。

[請求項15] 請求項１４記載のメンブレンにおいて、

前記マーカーは、

前記蛍光体を担持する担体を含有するメンブレン。

[請求項16] 請求項１３記載のメンブレンにおいて、

前記マーカーは、

蛍光体と、

前記蛍光体を担持するカチオン性の担体とを含有するメンブレン。

[請求項17] 請求項１６記載のメンブレンにおいて、

前記蛍光体は、カチオン性であるメンブレン。

[請求項18] 請求項１３～１７の何れか一項に記載のメンブレンにおいて、

前記蛍光体は、インドシアニン骨格を有する化合物であるメンブレン。

[請求項19] 請求項１３～１８の何れか一項に記載のメンブレンにおいて、

前記マーカーは、

前記複数の検知対象領域のうち少なくとも１つの検知対象領域よりも前記展開方向の下流側に配設されているメンブレン。

[請求項20] 請求項１９記載のメンブレンにおいて、

前記マーカーは、

前記複数の検知対象領域よりも前記展開方向の下流側に配設されているメンブレン。

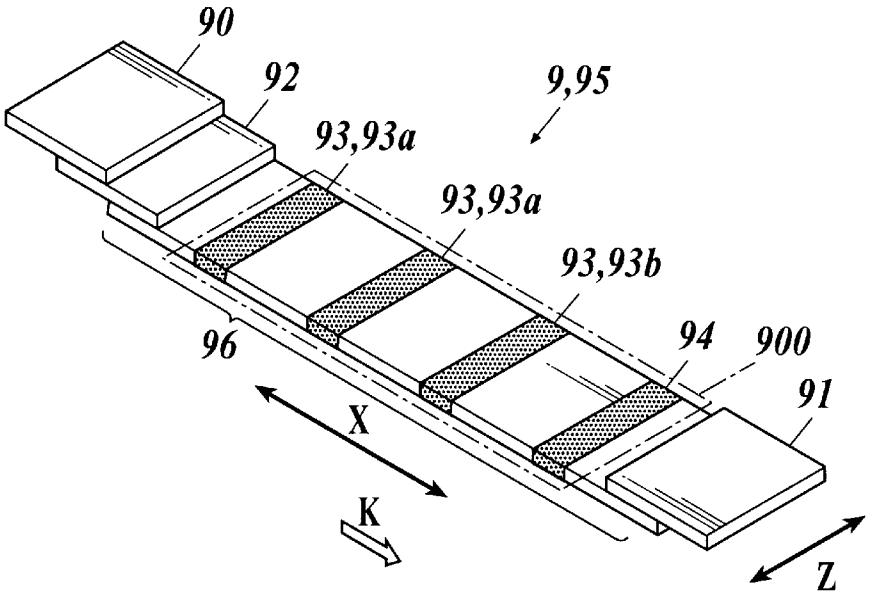
[請求項21] 請求項１３～２０の何れか一項に記載のメンブレンにおいて、

前記マーカーから生じる蛍光の波長領域と、

前記検知対象領域から生じる蛍光の波長領域とは、少なくとも１部の波長が重複するメンブレン。

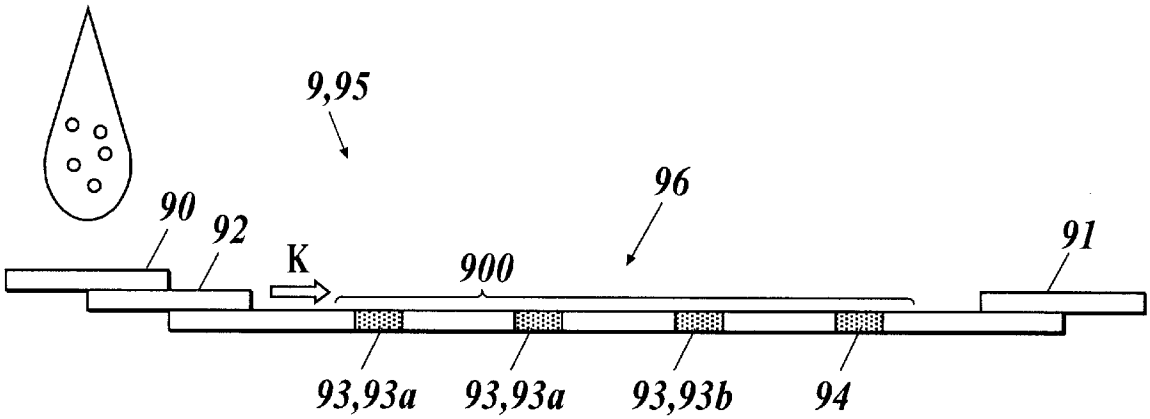
[図1A]

FIG.1A



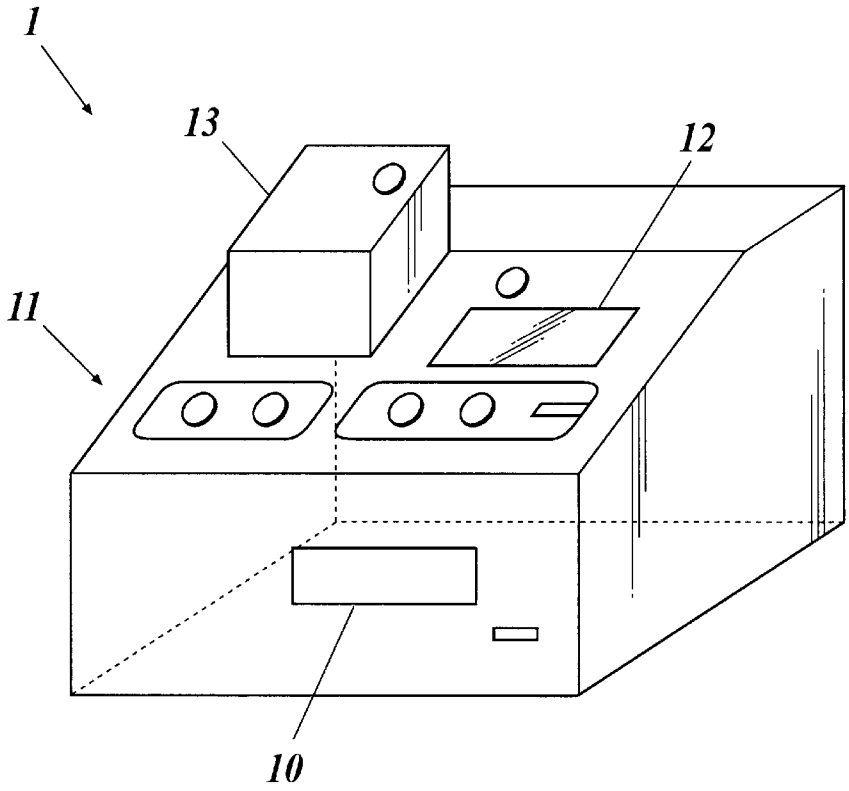
[図1B]

FIG.1B



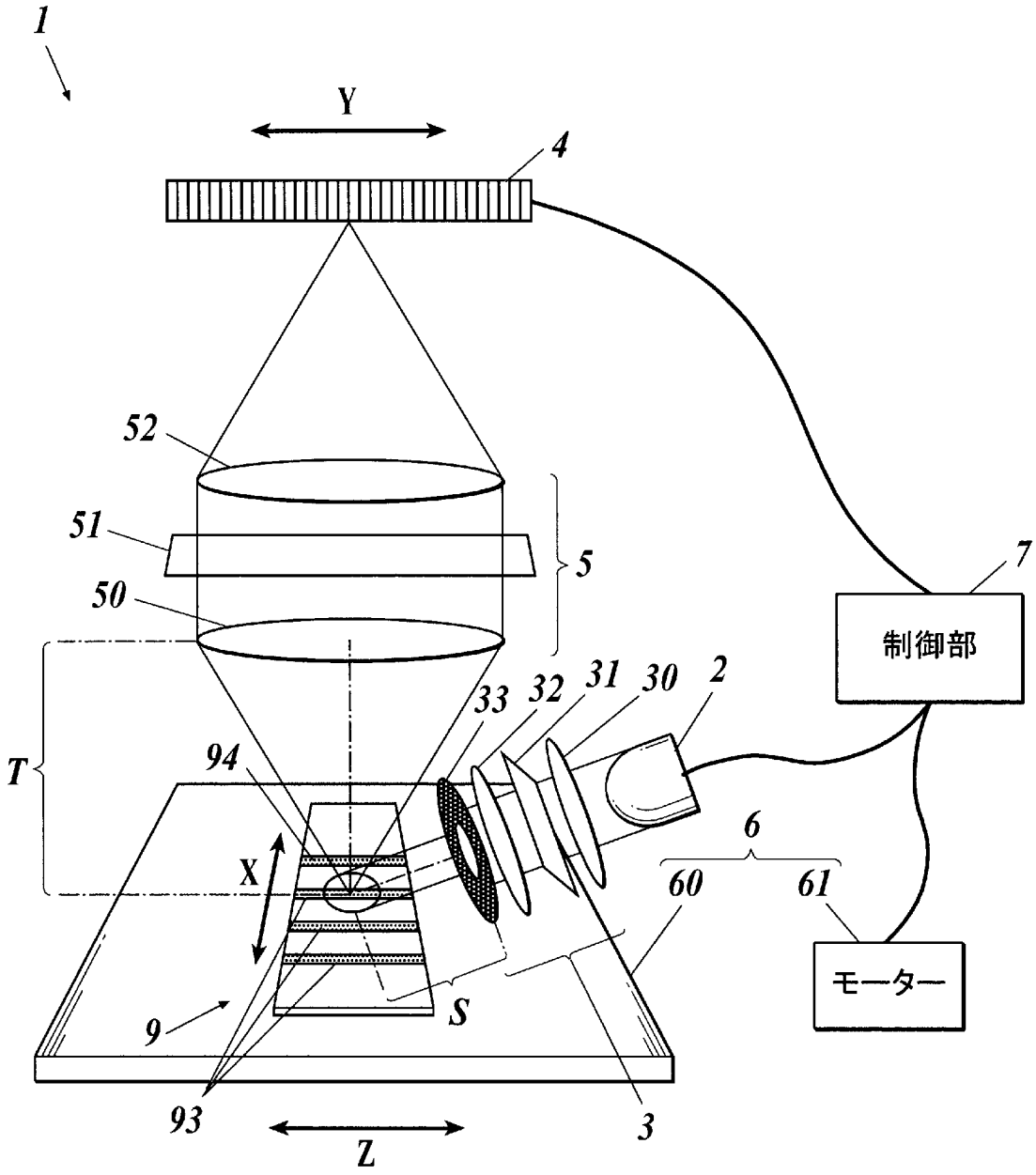
[図2]

FIG.2



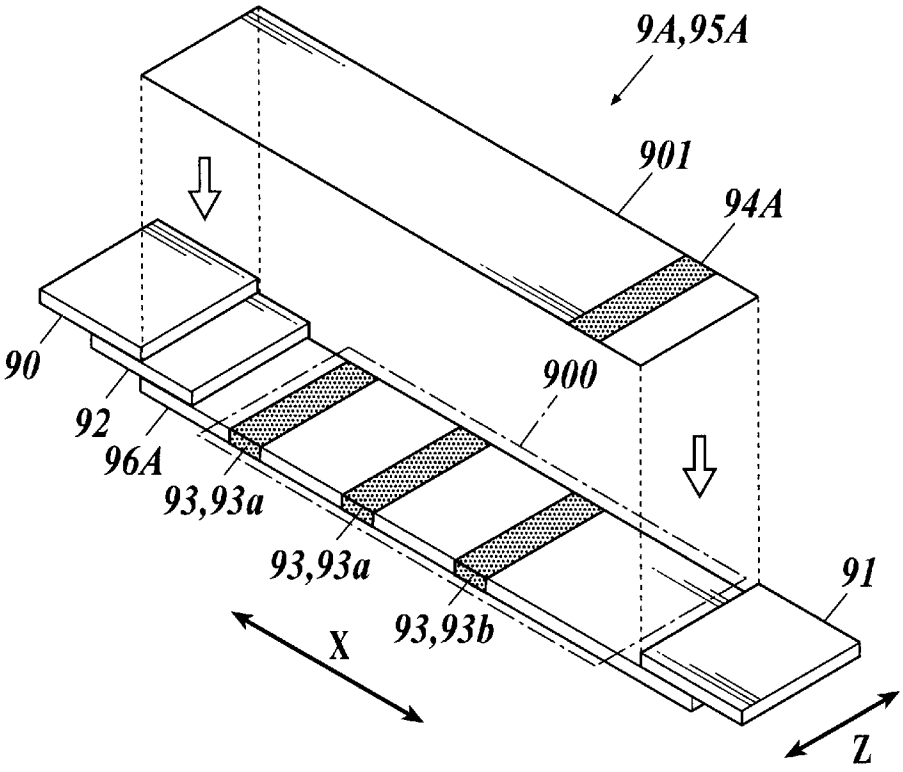
[図3]

FIG.3



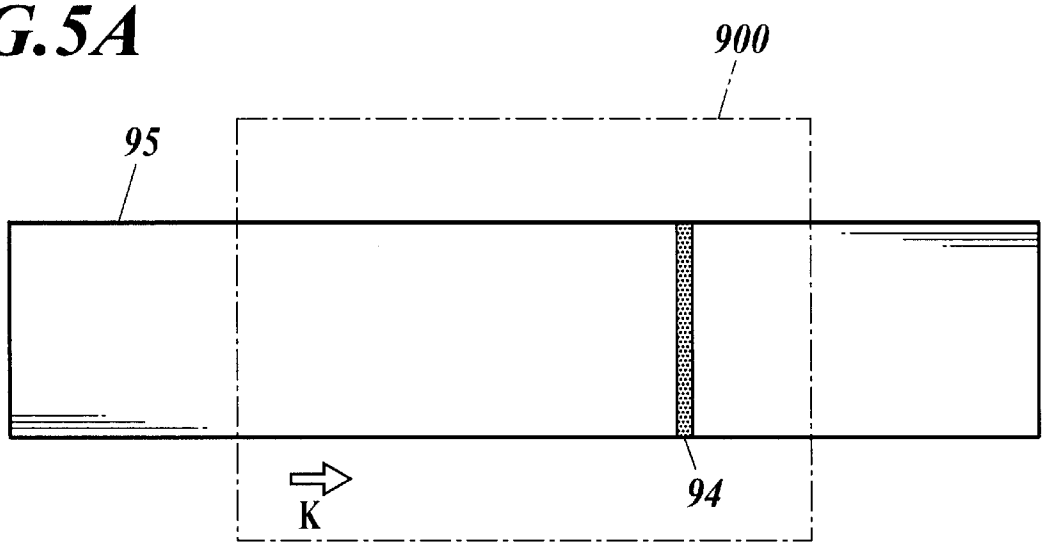
[図4]

FIG.4



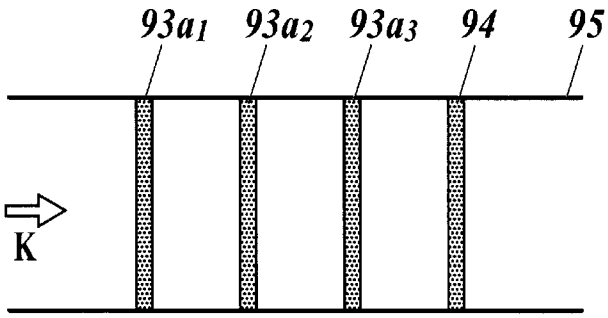
[図5A]

FIG.5A



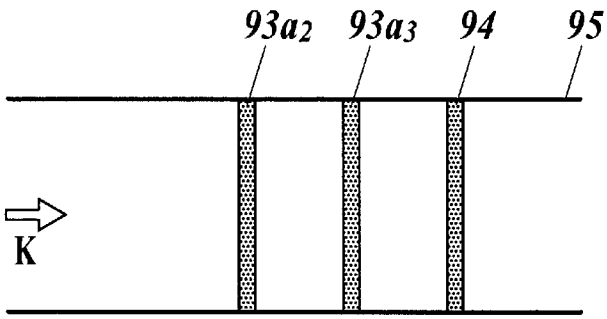
[図5B]

FIG.5B



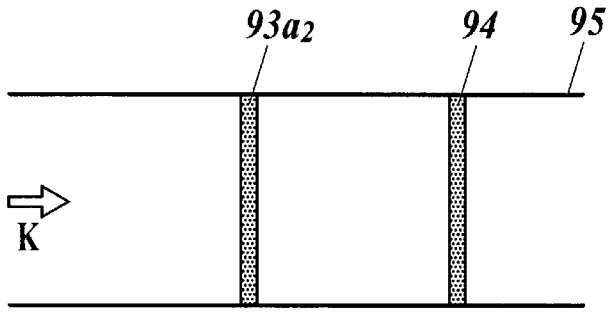
[図5C]

FIG.5C



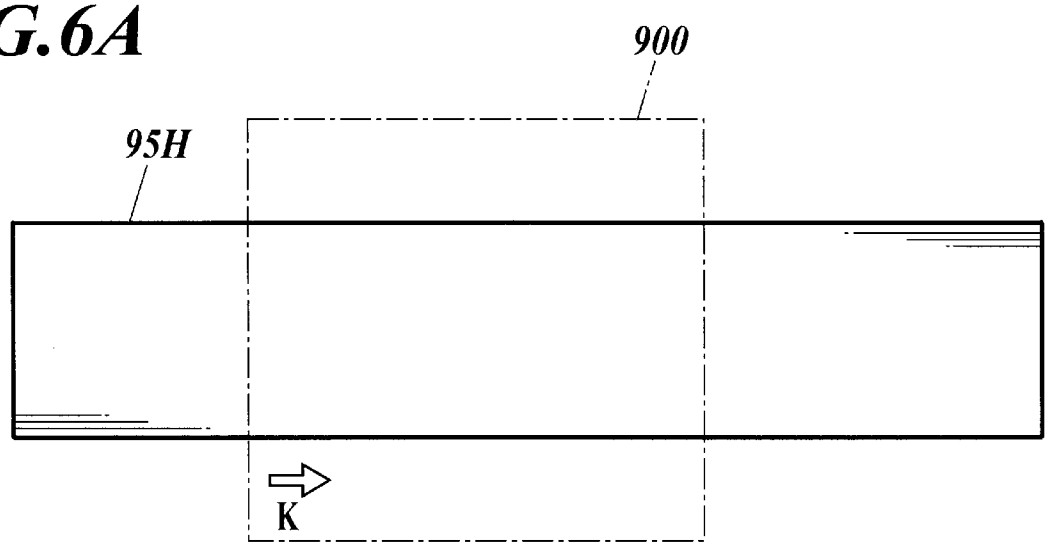
[図5D]

FIG.5D



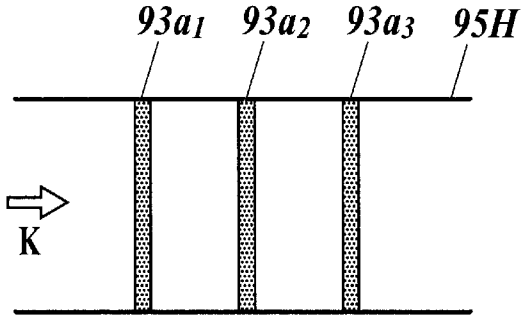
[図6A]

FIG.6A



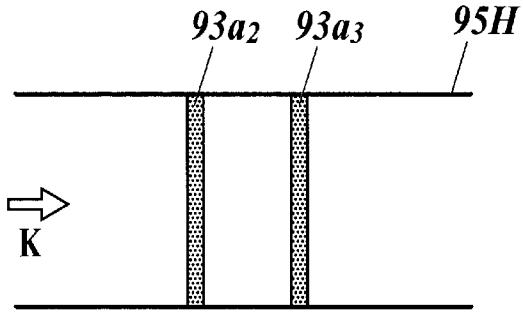
[図6B]

FIG.6B



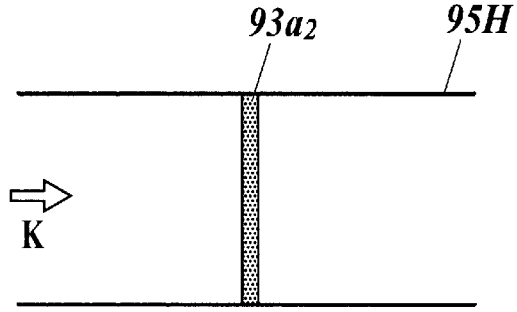
[図6C]

FIG.6C



[図6D]

FIG.6D



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/079740

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/543(2006.01)i, *G01N21/64*(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, G01N21/64

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	1996-2014
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2014	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2014

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/A	JP 2012-198083 A (Konica Minolta Advanced Layers, Inc.), 18 October 2012 (18.10.2012), claims; paragraph [0041] (Family: none)	1-3,6,9,10, 12-15,18,21/ 4,5,7,8,11, 16,17,19,20
Y/A	JP 2012-215494 A (Konica Minolta Medical & Graphic, Inc.), 08 November 2012 (08.11.2012), paragraphs [0036], [0039]; fig. 3 (Family: none)	1-3,6,9,10, 12-15,18,21/ 4,5,7,8,11, 16,17,19,20
Y/A	WO 2012/086376 A1 (Konica Minolta Opto, Inc.), 28 June 2012 (28.06.2012), paragraph [0003]; drawings (Family: none)	4,5,7,8,11, 16,17,19,20/ 1-3,6,9,10, 12-15,18,21

☒ 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
28 January, 2014 (28.01.14)	10 February, 2014 (10.02.14)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2013/079740

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2001-004613 A (Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.), 12 January 2001 (12.01.2001), paragraph [0027]; fig. 1 & WO 2000/079278 A1	4,5,7,8,11, 16,17,19,20/ 1-3,6,9,10, 12-15,18,21

国際調査報告

国際出願番号　ＰＣＴ／ＪＰ２０１３／０７９７４０

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, G01N21/64(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, G01N21/64

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	１９７１－２０１４年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０１４年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０１４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/A	JP 2012-198083 A (コニカミノルタアドバンストレイヤー株式会社) 2012.10.18, 特許請求の範囲、【００４１】（ファミリーなし）	1-3, 6, 9, 10, 12-15, 18, 21/4, 5, 7, 8, 11, 16, 17, 19, 20
Y/A	JP 2012-215494 A (コニカミノルタエムジー株式会社) 2012.11.08, 【００３６】、【００３９】、図３（ファミリーなし）	1-3, 6, 9, 10, 12-15, 18, 21/4, 5, 7, 8, 11, 16, 17, 19, 20

☑　Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☐　パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊　引用文献のカテゴリー
「Ａ」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「Ｅ」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「Ｌ」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
「Ｏ」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「Ｐ」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
「Ｔ」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「Ｘ」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Ｙ」特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「＆」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
２８．０１．２０１４	１０．０２．２０１４

国際調査機関の名称及びあて先
日本国特許庁（ＩＳＡ／ＪＰ）
郵便番号１００－８９１５
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

特許庁審査官（権限のある職員）　２Ｊ　３９０６
海野　佳子

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/A	WO 2012/086376 A1（コニカミノルタオプト株式会社）2012.06.28, ［０００３］、図面（ファミリーなし）	4,5,7,8,11,16,17,19,20/1-3,6,9,10,12-15,18,21
Y/A	JP 2001-004613 A（松下電器産業株式会社）2001.01.12, 【００２７】、図１ & WO 2000/079278 A1	4,5,7,8,11,16,17,19,20/1-3,6,9,10,12-15,18,21