

(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4月28日(28.04.2022)



(10) 国際公開番号

WO 2022/085719 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/JP2021/038752
- (22) 国際出願日: 2021年10月20日(20.10.2021)
- (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 2020-176635 2020年10月21日(21.10.2020) JP  
特願 2020-193654 2020年11月20日(20.11.2020) JP  
特願 2020-193655 2020年11月20日(20.11.2020) JP
- (71) 出願人: 東洋紡株式会社 (TOYOBO CO., LTD.)  
[JP/JP]; 〒5308230 大阪府大阪市北区堂島浜  
二丁目2番8号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 山口 達哉 (YAMAGUCHI, Tatsuya);  
〒5200292 滋賀県大津市堅田二丁目1番1  
号 東洋紡株式会社内 Shiga (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, JO, JP, 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,  
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:

— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: IMMUNOCHROMATOGRAPHIC STRIP FOR QUANTITATIVELY DETERMINING VITAMIN A AND ASSAY KIT

(54) 発明の名称: ビタミンA定量用イムノクロマトストリップおよび測定キット

(57) Abstract: [Problem] To provide an immunochromatographic strip by which blood vitamin A concentration can be quickly and easily determined in a beef cattle farm and an assay kit. [Solution] An immunochromatographic strip for quantitatively determining vitamin A in a biological sample, said immunochromatographic strip comprising a sample drop part at the most upstream section and a test line and a control line downstream of the sample drop part in this order. An anti-vitamin A antibody is immobilized on the test line. Also provided is an immunochromatographic assay kit.

(57) 要約: 【課題】 本発明は、肉牛の飼育現場において血液中のビタミンA濃度を迅速、簡便に測定可能なイムノクロマトストリップおよび測定キットを提供する。【解決手段】 本発明は、生体試料中のビタミンAを定量するためのイムノクロマトストリップであって、前記イムノクロマトストリップは、最上流部に試料滴下部、および前記試料滴下部の下流側に順にテストライン、コントロールラインを有し、前記テストラインには、抗ビタミンA抗体が固定化されている、イムノクロマトストリップおよびイムノクロマト測定キットである。

WO 2022/085719 A1

## 明 細 書

発明の名称：

ビタミンA定量用イムノクロマトストリップおよび測定キット

### 技術分野

[0001] 本発明は、生体試料中のビタミンAを競合法により定量するためのイムノクロマトストリップおよびイムノクロマト測定キットに関する。

### 背景技術

[0002] 肉牛、とくに高品質牛肉である和牛生産においては、筋肉中の脂肪交雑を高めることにより肉の評価が上がる。このため、脂肪の分解を促進する機能を持つビタミンAの給餌量を極端に減少させて脂肪交雑を誘導するビタミンコントロールと呼ばれる飼育管理方法が近年では主流となっている。

しかしながら、ビタミンAの極端な不足は、肝機能低下などによる健康障害を起こし、また筋肉水腫や筋炎の発生による肉質低下をきたすことがあり大きな問題となる。

このため、牛の栄養状態を知り、前述のような問題発生を防ぐため、血液中のビタミンA濃度を測定することが行われている。

[0003] ビタミンA濃度の測定には、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）が一般に用いられている。しかし獣医師等が現場で血液を採取し、持ち帰った後、検査機関に測定を依頼するケースがほとんどで、検査結果が出るのは数日後であり、もしビタミンAが不足していても即時的な対処が出来ないという欠点がある。

このため、血中ビタミンA濃度の測定結果を即時に得ることが出来る迅速、簡便な測定方法の開発が望まれている。

[0004] 例えば、特許文献1および特許文献2には、血清から有機溶剤で抽出したビタミンAに特定波長の光を照射することにより、ビタミンAを定量する方法、および測定装置が記載されている。

しかしながら、この方法は、採取した血液を遠心して血清を分離した後、

エタノールによる血清タンパク質の除去操作、およびヘプタンによるビタミンA成分の抽出操作が必要であり、HPLCのような大型装置は要らないものの、牛の飼育現場で実施するには操作が煩雑であり、時間や手間が掛かるといった問題があるため、より簡便に測定することが望まれている。

## 先行技術文献

## 特許文献

[0005] 特許文献1：特開2010-230447号

特許文献2：特開2015-169627号

## 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、肉牛等の飼育現場において血液中のビタミンA濃度を迅速、簡便に測定することができるイムノクロマトストリップおよび測定キットを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0007] 本発明者は、前記課題を解決するために鋭意検討した結果、以下に示す手段により、上記課題を解決できることを見出し、本発明に到達した。

[0008] すなわち、本発明は、以下の構成からなる。

(1) 生体試料中のビタミンAを定量するためのイムノクロマトストリップであって、

前記イムノクロマトストリップは、最上流部に試料滴下部、および前記試料滴下部の下流側に順にテストライン、コントロールラインを有し、

前記テストラインには、抗ビタミンA抗体が固定化されている、ことを特徴とするイムノクロマトストリップ。

(2) さらに、前記試料滴下部の下流側に含浸部材を有し、前記含浸部材にはビタミンAと化合物との結合体、および前記化合物に対する抗体に標識物質を結合した標識体が含浸されていることを特徴とする(1)に記載のイムノクロマトストリップ。

(3) 前記ビタミンAと結合体をなす化合物は、ビオチンであることを特徴とする(2)に記載のイムノクロマトストリップ。

(4) 前記化合物に対する抗体は、抗ビオチン抗体であることを特徴とする(3)に記載のイムノクロマトストリップ。

(5) 前記標識物質は、金コロイドまたはセルロース微粒子であることを特徴とする(2)～(4)のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。

(6) 前記標識物質は、青色セルロース微粒子であることを特徴とする(2)～(4)のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。

(7) 前記抗ビタミンA抗体は、モノクローナル抗体であることを特徴とする(1)～(6)のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。

(8) 前記標識体を特異的に結合する抗体は、抗IgG抗体であることを特徴とする(1)～(7)のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。

(9) 前記コントロールラインには、前記標識体を特異的に結合する抗体が固定化されていることを特徴とする(1)～(8)のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。

(10) 全血または血清または血漿中のビタミンAを定量することを特徴とする(1)～(9)のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。

(11) (1)～(10)のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ、および検体希釈液を含むことを特徴とするイムノクロマト測定キット。

(12) (1)～(10)のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ、検体希釈液、および競合試薬を含むことを特徴とするイムノクロマト測定キット。

## 発明の効果

[0009] 本発明により、肉牛の生産現場において血液中のビタミンA濃度を迅速、簡便に測定することが可能なビタミンA測定用イムノクロマトキットが提供される。

## 図面の簡単な説明

[0010] [図1]本発明のイムノクロマトストリップの一例を示す模式図(上面図)であ

る。

[図2]本発明のイムノクロマトストリップの一例を示す模式図（側面図）である。

[図3]ハウジングケースに收容したイムノクロマトストリップの一例を示す模式図である。

[図4]本発明のイムノクロマトストリップを用いて得られたビタミンAの測定結果の一例を示す図である。

[図5]本発明のイムノクロマトストリップを用いて得られたビタミンAの測定結果の他の一例を示す図である。

[図6]本発明のイムノクロマトストリップおよびHPLC法による測定値の関係の一例を示す図である。

[図7]本発明のイムノクロマトストリップおよびHPLC法による測定値の関係の他の一例を示す図である。

[図8]本発明のイムノクロマトストリップを用いて得られたビタミンAの測定結果の一例を示す図である。

[図9]本発明のイムノクロマトストリップを用いて得られたビタミンAの測定結果の他の一例を示す図である。

[図10]本発明のイムノクロマトストリップおよびHPLC法による測定値の関係の一例を示す図である。

[図11]本発明のイムノクロマトストリップおよびHPLC法による測定値の関係の他の一例を示す図である。

[図12]本発明のイムノクロマトストリップを用いて得られたビタミンAの測定結果の一例を示す図である。

[図13]本発明のイムノクロマトストリップを用いて得られたビタミンAの測定結果の他の一例を示す図である。

[図14]本発明のイムノクロマトストリップおよびHPLC法による測定値の関係の一例を示す図である。

[図15]本発明のイムノクロマトストリップおよびHPLC法による測定値の

関係の他の一例を示す図である。

### 発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明を詳細に説明する。

[0012] 本発明は、生体試料中のビタミンAを定量するためのイムノクロマトストリップであって、前記イムノクロマトストリップは、最上流部に試料滴下部、および前記試料滴下部の下流側に順にテストライン、コントロールラインを有し、前記テストラインには、抗ビタミンA抗体が固定化されている、イムノクロマトストリップである。

[0013] (対象となる検体)

本発明において、係る対象となる試料としては、特に限定されるものではないが、血液（全血でも血清でも血漿でもよい）等が適しているが特に制限はない。動物種も、ウシの他、ヒト、ウマ、イヌ、ネコなどの血液を測定対象とすることが出来る。

[0014] (ビタミンA)

本発明において、ビタミンAは、レチノール、レチナール、レチノイン酸、レチニルエステルなどのレチノイド類を指す。また、ビタミンAは、レチノール結合タンパク（RBP）、プレアルブミンと複合体を形成したものであってもよい。

[0015] (ビタミンAと化合物との結合体)

本発明において、ビタミンAと化合物との結合体（競合試薬）は、生体試料中の遊離またはタンパク質に結合した状態のビタミンAと競合することが出来、かつ標識体により検出が可能であれば、特に制限はない。結合体とすることでビタミンAが安定化し、また性能の良い抗体が入手し易いことから好ましい。化合物としては、牛血清アルブミン、卵白アルブミンやビオチンなどが挙げられ、これらの中でもビオチンが好適に用いられる。詳細な理由は不明だが、生体試料中のビタミンAはレチノール結合タンパク（RBP）と複合体を形成しているため、低分子量のビオチンとの結合体を用いることにより、競合法による定量に好ましいと推測している。なお、競合試薬は、

イムノクロマトストリップの含浸部材に予め含浸させておいてもよいし、含浸部材を用いない場合には競合試薬として別調製したものを準備しておいてもよいし、検体希釈液に予め含ませておいてもよい。いずれいしも、ビオチンと結合体を形成したビタミンAは不安定な化合物であり、光や熱によって二重結合の異性化が起こりやすく、また酸や空気、金属イオンとも反応しやすいため容易に分解してしまう恐れがある。そのため、競合試薬、競合試薬を含むイムノクロマトストリップおよび検体希釈液は低温、暗所にて使用時まで保存するのが好ましい。保存温度としては4℃以下が好ましく、-20℃以下がより好ましく、-80℃以下がさらに好ましい。

[0016] (標識体)

本発明において、標識体は、ビタミンAに結合した化合物に対する抗体に標識物質を結合させて得ることが出来る。抗体は、ビタミンAに結合した化合物に対する抗体であればよく、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよいが、反応特異性の観点からモノクローナル抗体であることが好ましい。

[0017] 標識物質は特に制限はなく、例えば、呈色標識物質、酵素標識物質などが挙げられるが、迅速に検査結果が得られることから呈色標識物質であることが好ましい。呈色標識物質としては、コロイド金属および着色ラテックス粒子、着色セルロース微粒子などが挙げられる。コロイド金属の代表例としては、白金コロイド、金コロイド、銀コロイド、白金コロイド、パラジウムコロイド、金ナノロッド、金ナノプレート、銀ナノプレートなどが挙げられる。コロイド金属の粒子の大きさは通常、直径3~100nm程度とされる。着色ラテックスの代表例としては、赤色および青色などのそれぞれの顔料で着色されたポリスチレンラテックス、ポリメタクリル酸メチル、アクリル酸重合体などが挙げられる。ラテックス粒子の粒径としては特に制限されないが、粒径25~500nmのものが好ましい。この他に、市販されている着色セルロース微粒子なども使用出来る。着色セルロース微粒子の粒径としては特に制限されないが、粒径100~500nmのものが好ましい。

[0018] 前記着色セルロース微粒子の色は、特に限定されないが、例えば赤色、青色、黄色、緑色、黒色、白色、蛍光色が挙げられる。これらの中でも、バックグラウンドのヘモグロビン由来の赤色の影響を受けにくい青色、黒色が好ましく、青色がより好ましい。このような着色セルロース微粒子としては、旭化成社製の着色セルロースナノビーズ（NanoAct（登録商標））が挙げられるが、この中でもNavy（BL1）、Dark Navy（BL2）、Black（KR1）が好ましく、Navy（BL1）、Dark Navy（BL2）がより好ましい。

[0019] 本発明において、標識物質表面への非特異結合を抑えるためにブロッキング剤を用いて処理するのが好ましい。ブロッキング剤は、ポリエチレングリコールやタンパク質を用いるのが好ましい。タンパク質としてはBlocking Peptide Fragment、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインなどが好ましい。これらのブロッキング剤は市販されているものがあればそれを用いても良いし、別途公知の方法で製造しても良い。分子サイズも特に制限されないが、平均分子量で100kDa以下が好ましい。一般的にブロッキング剤の分子サイズが小さいほど検出粒子1粒子に対するタンパク質の結合量が増加し感度などの性能が高くなる。

[0020] （テストライン）

本発明において、テストラインに固定化する抗体は、ビタミンAに特異的に結合することが出来る抗ビタミンA抗体であればよく、ポリクローナル抗体であっても、モノクローナル抗体であってもよいが、反応特異性の観点から、モノクローナル抗体であることが好ましい。ビタミンAは低分子化合物であり十分な複雑性を備えていないため、通常では免疫応答を誘発できない。このため、免疫した動物に抗体を産出させるには、オボアルブミンなどのキャリアタンパク質にビタミンAを化学結合したものを免疫原として用いる必要がある。また、アジュバントを混合して免疫原を注入すると、免疫応答強度が上がり、よい抗体を得る可能性が高まる。ポリクローナル抗体は、ウサギやマウスなどに免疫して得られた抗血清から精製して得ることが出来る

。モノクローナル抗体は、例えば、ビタミンAとオボアルブミンの結合物を適当なアジュバントとともにマウスのような動物に免疫したのち、免疫された動物の脾細胞とミエローマ細胞とを融合し、融合細胞のみが増殖出来る選択培地で培養し、増殖した細胞を前記ビタミンAとの結合物などを使用して、たとえば酵素標識免疫法などにより選別することにより取得することができる。

[0021] 本発明において、コントロールラインには、標識体中の化合物を特異的に結合する抗体が固定化されているのが好ましい。例えば、抗ウサギIgG抗体や抗マウスIgG抗体などを膜担体に固定化することによって形成することができる。コントロールラインを用いることにより、標識体が膜担体の最下流部まで移動したこと、即ち、イムノクロマト反応が（正常に）行われたことを確認することができる。

[0022] (イムノクロマトストリップ)

イムノクロマトストリップの具体例としては、図1、2に示すようなイムノクロマトストリップ8が挙げられる。図1、2において、1は粘着シート、2は含浸部材、3は膜担体、4は検出部位、5は吸収用部材、6は試料添加用部材を示している。膜担体3は、幅5mm、長さ25mmの細長い帯状のニトロセルロース製メンブレンフィルターからなり、同じく幅5mmの粘着シート1の中ほどに貼り付けられている。膜担体3には、クロマト展開の始点側、すなわち図1の左側（以下「上流側」とする。また、反対の右側を「下流側」とする。）の末端から下流側3～15mmの位置に抗ビタミンA抗体が固定され、ビタミンAと化合物との結合体と被験試料中のビタミンAを競合的に捕捉するための第一の捕捉部位（テストライン）4が形成されている。さらに、膜担体3の上流側の末端から下流側8～25mmの位置に第二の捕捉部位（コントロールライン）5が設けられている。このコントロールライン5は、分析対象物質であるビタミンAの存否に係わらずイムノクロマト展開が行われたことを確認するためのものである。例えば、標識体に結合している抗体（IgG）に対する抗体をコントロールライン5に固定化す

ることによって形成することができる。なお、テストラインはコントロールラインよりも上流側に配置され、テストラインとコントロールラインとの距離は3 mm以上10 mm未満とするのが好ましい。

[0023] 試料添加用部材6としては、例えば、多孔質ポリエチレンおよび多孔質ポリプロピレンなどのような多孔質合成樹脂のシートまたはフィルム、あるいは、濾紙および綿布などのようなセルロース製の紙または不織布などを用いることができる。

[0024] 含浸部材2は、5 mm×15 mmの帯状のガラス繊維を用いるが、これに限定されるものではなく、例えば、濾紙、ニトロセルロース膜、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック不織布なども使用できる。含浸部材2は、前記標識体を含む懸濁液を前記ガラス繊維等の部材に含浸せしめ、これを乾燥させることなどによって作製できる。なお、含浸部材を用いない場合には、前記標識体は検体希釈液に含ませておけばよい。

[0025] 膜担体3は、ニトロセルロース製メンブレンフィルターを用いているが、被験試料に含まれる分析対象物質をクロマト展開可能で、かつ、第一の捕捉部位（テストライン）4を形成する抗体等の物質を固定可能なものであれば、いかなるものであってもよく、他のセルロース類膜、ナイロン膜、ガラス繊維膜なども使用できる。

[0026] 吸収用部材7は、液体をすみやかに吸収、保持できる材質のものであればよく、綿布、濾紙、およびポリエチレン、ポリプロピレン等からなる多孔質プラスチック不織布等を挙げることができるが、特に濾紙が最適である。

[0027] イムノクロマトストリップ8は、図1、2に示されるように、膜担体3を粘着シート1の中ほどに貼着し、該膜担体3の上流側の末端の上に、必要により含浸部材2の下流側の末端を重ね合わせて接続するとともに、この含浸部材2の上流側部分を粘着シート1に貼着して作成できる。さらに、含浸部材2の上面に試料滴下部（試料添加用部材）6の下流側部分を載置するとともに、該試料添加用部材6の上流側部分を粘着シート1に貼着し、また、膜担体3の下流側部分の上面に吸収用部材7の上流側部分を載置するとともに

、該吸収用部材 7 の下流側部分を粘着シート 1 に貼着せしめてイムノクロマトストリップ 8 を構成している。

[0028] イムノクロマトストリップは、これを保護するため、また、取り扱いがし易いように、プラスチック製のハウジングケース 9 などに収容されるのが好ましい（図 2）。このケースは、例えば、イムノクロマトストリップの試料添加用部材 6 および第一の捕捉部位（テストライン） 4 および第二の捕捉部位（コントロールライン） 5 の上方に、被験試料滴下部 10 と判定部 11 が開口されて提供されることが好ましい。

[0029] （イムノクロマト展開）

被験試料と希釈液とを混合して調製した混合液を試料添加用部材 6 の試料滴下部 10 に注入した時、膜担体 3 の上流側の端部に接続した含浸部材 2 に予め含浸させた標識体が、該混合液と混合して膜担体 3 へとクロマト展開されるように、配置しておくことが好ましい。あるいは、標識体を、イムノクロマトストリップ 8 とは別の適当な容器内で、被験試料及び希釈液と混合して混合液とした後、この混合液をイムノクロマトストリップ 8 の試料添加用部材 6 に注入して膜担体 3 にクロマト展開させても構わない。

[0030] （競合法）

本発明において、生体試料中のビタミン A は競合法により定量するのが好ましい。ビタミン A のような低分子化合物は、2 種類の抗体でサンドイッチすることが難しいため、競合法をとることが好ましい。即ち、生体試料、競合試薬（ビタミン A と化合物との複合体）、および検体希釈液を混合して得られた生体試料希釈液をイムノクロマトストリップ上に滴下、展開することにより、試料中のビタミン A 及び競合試薬は、テストラインに固定化された抗ビタミン A 抗体に競合的に捕捉される。捕捉された競合試薬を、標識体（物質）により呈色させ、テストライン上のシグナルを測定することにより定量することができる。

[0031] （イムノクロマト測定キット）

本発明のイムノクロマト測定キットは、上記のイムノクロマトストリップ

に加えて、検体を希釈するための希釈液を少なくとも含み、更に必要に応じて、競合試薬（ビタミンAと化合物との結合体）、検量線を作成するためのビタミンA標準液や、希釈するための容器などを含む。また、イムノクロマト結果を測定するための測定装置（クロマトリーダー）も含む場合がある。

[0032] 本発明において、検体希釈液は、生体試料を展開させるための展開液として使用することができる。検体希釈液は、生体試料の展開性を向上させかつ免疫反応に影響しないノニオン性界面活性剤を含むことが好ましい。ノニオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルフェニルエーテル（T r i t o n（登録商標）系界面活性剤等）、ポリオキシエチレンアルキルエーテル（B r i j（登録商標）系界面活性剤等）、ポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル（T w e e n（登録商標）系界面活性剤等）、ポリオキシエチレン脂肪酸エステル、ソルビタン脂肪酸エステル、アルキルグルコシド、ショ糖脂肪酸エステル等が挙げられる。また、前記界面活性剤は単独で用いても、二種以上を組み合わせ用いてもよい。また、ノニオン性界面活性剤の濃度としては、好ましくは0.01wt%～5.0wt%である。

[0033] 前記検体希釈液にはさらに、無機塩類やpH調整に用いる緩衝剤を添加しても良い。

前記緩衝剤としては、目的とするpH範囲において十分な緩衝能力を有していれば、いかなる種類の緩衝剤を用いてもよく、例えば、トリス、リン酸、フタル酸、クエン酸、マレイン酸、コハク酸、シュウ酸、ホウ酸、酒石酸、酢酸、炭酸、グッドバッファ（MES、ADA、PIPES、ACES、コラミン塩酸、BES、TES、HEPES、アセトアミドグリシン、トリシン、グリシンアミド、ピシン）等が挙げられる。

## 実施例

[0034]（実施例1）

（検体希釈液の調製）

リン酸緩衝生理食塩水（pH7.4、ナカライテスク社、27576-2

1) に Triton X-100 (シグマアルドリッチ社、10789704001) を溶解させ、Triton X-100の濃度が0.1質量%の検体希釈液 (pH 7.4) を調整した。

[0035] (ビタミンA-ビオチン結合体の調製)

ビタミンA (レチナール、MyBiosource, Inc.、MBS6023224) を、Biotin-hydrazide (同仁化学、B303) を用いて、ビオチン化することにより、ビタミンA-ビオチン結合体を調製した。調製後、使用時まで-30℃に保存した。

[0036] (抗ビオチン抗体結合金コロイドの調製)

金コロイド液 (BB1 Solutions、EMGC40、OD=1) を pH 8.0 の 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  に懸濁させ、これに抗ビオチン抗体 (SIGMA、B3640) を加えて混合し、室温で10分間静置して、抗体を金コロイド表面に結合させた。更に、金コロイド表面への非特異結合を抑えるために、1質量% PEG 200、10質量% BSA を添加しブロッキング処理を行った。この後、洗浄操作を繰り返し、20 mM Tris-HCl (pH 8.2)、0.05質量% PEG 2000、150 mM NaCl、1質量% BSA 溶液に懸濁して、抗ビオチン抗体結合金コロイド液を調製した。

[0037] (抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子の調製)

セルロース微粒子液 (旭化成、BL1、1質量%) を pH 7.0 の 10 mM Tris Buffer (PBS) に懸濁させ、これに抗ビオチン抗体 (SIGMA、B3640) を加えて混合し、37℃で120分間静置して、抗体をセルロース微粒子表面に結合させた。更に、セルロース微粒子表面への非特異結合を抑えるために、1質量% カゼインを添加し、37℃で60分間静置してブロッキング処理を行った。この後、洗浄操作を行った後、1質量% スクロース含有 pH 7.4 の PBS に懸濁して、抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子液を調製した。

[0038] (イムノクロマトストリップの作製)

(1-1) 抗ビオチン抗体結合金コロイド含浸部材の作製

8 mm × 150 mmの帯状のガラス繊維不織布に、上記で得られた抗ビオチン抗体結合金コロイドを20 mM Tris-HCl、0.05 質量% PEG2000、37.5 mM NaCl、0.25 質量% BSA、3 質量% スクロース溶液に懸濁し、これを0.5 mL 含浸させた。室温で乾燥させた後に、8 mm × 5 mmの大きさに切断し、抗ビオチン抗体結合金コロイド含浸部材とした。

[0039] (1-2) 抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子含浸部材の作製

8 mm × 150 mmの帯状のガラス繊維不織布に、上記で得られた抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子液を0.5 mL 含浸させた。室温で乾燥させた後に、8 mm × 5 mmの大きさに切断し、抗ビオチン抗体結合セルロース含浸部材とした。

[0040] (2) テストラインおよびコントロールラインの作製

抗ビタミンA抗体 (Cloud-Clone Corp.、PAD051 Ge01) を1 mg/mLの濃度に調製した後、これを25 mm × 300 mmのニトロセルロース製メンブレンフィルターに1.0 μL/cmの量で線状に塗布してテストラインを作製した。

次に、抗ウサギIgG抗体 (MyBiosource, Inc.、MBS539780) を1 mg/mLの濃度に調製した後、上記ニトロセルロース製メンブレンフィルターに1.0 μL/cmの量で線状に塗布してコントロールラインを作成した。

テストラインおよびコントロールラインを作成後、50℃で30分間乾燥させ、25 mm × 5 mmの大きさに切断し、イムノクロマト展開用膜担体とした。

[0041] (3) イムノクロマトストリップの作製

図1に示すように、粘着シート1の上に、上記(2)で得られた膜担体3、上記(1-1)および(1-2)で得られた含浸部材2、吸収用部材7を配置し、イムノクロマトストリップを作製した。

## [0042] (4) ビタミンA標準液

20か月齢の牛から採血して得られた血清中のビタミンA濃度をHPLC法にて測定し、値付けしたものをビタミンA標準液とした。HPLCによる測定は、臨床検査センター（株式会社近畿予防医学研究所）に依頼して測定した。

## [0043] (5) 測定キットを用いた定量

上記標準液を検体希釈液（pH7.4 PBS、0.1質量% Triton X-100）を用いて希釈し、各濃度のビタミンA液を調製した。そして、この被験試料を前記（3）で得られたイムノクロマトストリップの試料添加用部材6の試料滴下部10にマイクロピペットで100 $\mu$ L滴下し、10分後、テストラインにおける吸光度をイムノクロマトリーダ（浜松ホトニクス、C10066-10）で測定した。その結果を表1（金コロイド）および表2（着色セルロース微粒子）に示した。また、測定の結果得られたグラフを図4および図5に示した。

## [0044] [表1]

ビタミンA濃度 (ng/ml)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	吸光度 平均値 (mAbs)	標準 偏差
0	484.5	449.4	472.4	463.1	438.3	461.5	18.3
3.75	306.4	319.2	333.2	303.3	328.9	318.2	13.2
7.5	190.1	186.2	222.3	187.4	205.3	198.3	15.5
15	119	121.2	130	115.8	132.5	123.7	7.21
30	64.8	48.4	67	42.3	51.9	54.9	10.7

## [0045]

[表2]

ビタミンA濃度 (ng/ml)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	吸光度 平均値 (mAbs)	標準 偏差
0	516	480.4	505.9	488.6	463.7	490.9	20.7
3.75	330.3	342.8	359.5	323	351.6	341.4	15
7.5	201.1	200.7	236.7	198.3	216.6	210.7	16.3
15	126.7	129.8	140.3	124	139.8	132.1	7.53
30	69.9	52.2	70.7	45.2	54.9	58.6	11.3

## [0046] (6) ウシ血清のビタミンA測定

20頭の牛から採血して得られた血清中のビタミンA濃度を、それぞれHPLC法および本発明の免疫クロマトストリップを用いて測定した。HPLCによる測定は、臨床検査センター（株式会社近畿予防医学研究所）に依頼して測定した。免疫クロマト法では、標準液を同時に測定して得られた標準曲線を用いて、各血清のビタミンA濃度を算出した。測定結果を表3および図6（金コロイド）、表4および図7（着色セルロース微粒子）に示した。免疫クロマト法の測定値とHPLC法による測定値の相関係数はそれぞれ0.98、0.98であり、良好な相関関係を示した。

[0047]

[表3]

個体No.	HPLC法 ビタミンA測定値 (ng/mL)	イムノクロマト法 ビタミンA測定値 (ng/mL)
1	88	94.8
2	124.5	115.9
3	100.8	96.1
4	72.3	77
5	113.5	118.7
6	86.4	89.4
7	58.7	64.4
8	161.2	169.8
9	149.9	158.1
10	106.6	111.3
11	92.9	85.7
12	126.3	136.5
13	116.1	108
14	38.7	33.9
15	78.4	71.5
16	119.4	127
17	122.2	128.8
18	91	85.3
19	102.1	110.3
20	133.8	143.6

[0048]

[表4]

個体No.	HPLC法 ビタミンA測定値 (ng/mL)	イムノクロマト法 ビタミンA測定値 (ng/mL)
1	161	167.9
2	90.1	96.9
3	57	63.2
4	99.1	108.2
5	126.1	117.9
6	151.8	160.8
7	93.2	87.2
8	78.3	70.7
9	100.7	95
10	73.2	78.3
11	106.5	110.1
12	118.9	110.4
13	95.1	87.6
14	118.7	126.4
15	110.2	116.4
16	39.2	34.5
17	88.5	91.4
18	122.6	133.9
19	133.7	142
20	121	129.2

[0049] (実施例2)

(ビタミンAビオチン結合体の調製)

ビタミンA（レチナール、MyBiosource, Inc.、MBS6023224）を、Biotin-hydrazide（同仁化学、B303）を用いて、ビオチン化することにより、ビタミンA-ビオチン結合体を調製した。調製後、使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$ に保存した。

[0050]（検体希釈液の調製）

リン酸緩衝生理食塩水（ $\text{pH}7.4$ 、ナカライテスク社、27576-21）にTritonX-100（シグマアルドリッチ社、10789704001）、および調製したビタミンA-ビオチン結合体を溶解させ、 $\text{pH}7.4$ 、TritonX-100およびビタミンAビオチン結合体の濃度がそれぞれ、0.1室用%、 $0.1\mu\text{M}$ になるように検体希釈液を調整し、使用時まで $-30^{\circ}\text{C}$ で保管した。

[0051]（抗ビオチン抗体結合金コロイドの調製）

金コロイド液（BBISolutions、EMGC40、 $\text{OD}=1$ ）を $\text{pH}8.0$ の $50\text{mM}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$ に懸濁させ、これに抗ビオチン抗体（SIGMA、B3640）を加えて混合し、室温で10分間静置して抗体を金コロイド表面に結合させた。更に、金コロイド表面への非特異結合を抑えるために、1質量%PEG200、10質量%BSAを添加しブロッキング処理を行った。この後、洗浄操作を繰り返し、 $20\text{mM}$  Tris-HCl（ $\text{pH}8.2$ ）、0.05質量%PEG2000、 $150\text{mM}$  NaCl、1質量%BSA溶液に懸濁して、抗ビオチン抗体結合金コロイド液を調製した。

[0052]（抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子の調製）

標識物質としてセルロース微粒子液（旭化成、BL1、1質量%）を $\text{pH}7.0$ の $10\text{mM}$  Tris Buffer（PBS）に懸濁させ、これに抗ビオチン抗体（SIGMA、B3640）を加えて混合し、 $37^{\circ}\text{C}$ で120分間静置して、抗体をセルロース微粒子表面に結合させた。更に、セルロース微粒子表面への非特異結合を抑えるために、1質量%カゼインを添加し、 $37^{\circ}\text{C}$ で60分間静置してブロッキング処理を行った。この後、洗浄操作

を行った後、1質量%スクロース含有PBS (pH 7.4) に懸濁して、抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子液を調製した。

[0053] (イムノクロマトストリップの作製)

(1-1) 抗ビオチン抗体結合金コロイド含浸部材の作製

8mm×150mmの帯状のガラス繊維不織布に、上記で得られた抗ビオチン抗体結合金コロイドを20mM Tris-HCl、0.05質量%PEG2000、37.5mM NaCl、0.25質量%BSA、3質量%スクロース溶液に懸濁し、これを0.5mL含浸させた。室温で乾燥させた後に、8mm×5mmの大きさに切断し、抗ビオチン抗体結合金コロイド含浸部材とした。

[0054] (1-2) 抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子含浸部材の作製

8mm×150mmの帯状のガラス繊維不織布に、上記で得られた抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子液を0.5mL含浸させた。室温で乾燥させた後に、8mm×5mmの大きさに切断し、抗ビオチン抗体結合セルロース含浸部材とした。

[0055] (2) テストラインおよびコントロールラインの作製

抗ビタミンA抗体 (Cloud-Clone Corp.、PAD051 Ge01) を1mg/mLの濃度に調製した後、これを25mm×300mmの硝化セルロース製メンブレンフィルターに1.0μL/cmの量で線状に塗布してテストラインを作製した。

次に、抗ウサギIgG抗体 (MyBiosource, Inc.、MBS539780) を1mg/mLの濃度に調製した後、上記硝化セルロース製メンブレンフィルターに1.0μL/cmの量で線状に塗布してコントロールラインを作成した。

テストラインおよびコントロールラインを作成後、50℃で30分間乾燥させ、25mm×5mmの大きさに切断し、イムノクロマト展開用膜担体とした。

[0056] (3) イムノクロマトストリップの作製

粘着シートの上に、上記得られた膜担体、含浸部材、および吸収用部材を配置し、イムノクロマトストリップを作製した。

[0057] (4) ビタミンA標準液

20か月齢の牛から採血して得られた血清中のビタミンA濃度をHPLC法にて測定し、値付けしたものをビタミンA標準液とした。HPLCによる測定は、臨床検査センター（株式会社近畿予防医学研究所）に依頼して測定した。

[0058] (5) 測定キットを用いた定量

上記標準液を検体希釈液（pH7.4 PBS、0.1質量% Triton X-100、0.1 μM ビタミンA-ビオチン結合体）を用いて希釈し、各濃度のビタミンA液を調製した。そして、この被験試料に前記（3）で得られたイムノクロマトストリップの試料添加用部材の試料滴下部にマイクロピペットで100 μL滴下し、10分後、テストラインにおける吸光度をイムノクロマトリーダ（浜松ホトニクス、C10066-10）にて測定した。その結果を表5（金コロイド）および表6（着色セルロース微粒子）に示した。また、測定の結果得られたグラフを図8（金コロイド）および図9（着色セルロース微粒子）に示した。

[0059] [表5]

ビタミンA濃度 (ng/mL)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	吸光度 平均値 (mAbs)	標準 偏差
0	475	438	464	450	429	451.0	18.7
3.75	296	311	322	295	318	309.0	12.4
7.5	183	176	215	178	199	190.0	16.6
15	109	115	122	110	123	116.0	6.28
30	59.7	40.6	62.2	33.6	46.8	48.6	12.3

[0060]

[表6]

ビタミンA濃度 (ng/mL)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	吸光度 平均値 (mAbs)	標準 偏差
0	507	468	497	476	454	481	21.3
3.75	322	332	352	311	343	332	16.1
7.5	192	194	226	191	207	202	15.0
15	121	120	134	115	134	125	8.56
30	64.6	44.6	65.8	40.3	49.6	53.0	11.6

## [0061] (6) ウシ血清のビタミンA測定

20頭の牛から採血して得られた血清中のビタミンA濃度を、それぞれHPLC法および本発明のイムノクロマト測定キットを用いて測定した。HPLCによる測定は、臨床検査センター（株式会社近畿予防医学研究所）に依頼して測定した。イムノクロマト法では、標準液を同時に測定して得られた標準曲線を用いて、各血清のビタミンA濃度を算出した。測定結果を表7および図10（金コロイド）、表8および図11（着色セルロース微粒子）に示した。イムノクロマト法の測定値とHPLC法による測定値の相関係数はそれぞれ0.98、0.98であり、良好な相関関係を示した。

## [0062]

[表7]

個体No.	HPLC法 ビタミンA測定値 (ng/mL)	イムノクロマト法 ビタミンA測定値 (ng/mL)
1	152	161
2	119	111
3	35.2	30.1
4	125	131
5	110	106
6	90.4	97.4
7	103	108
8	52.9	59.7
9	82.9	85.6
10	95.0	90.4
11	121	112
12	87.1	81.0
13	141	152
14	79.2	85.0
15	116	121
16	168	176
17	72.6	66.8
18	87.5	81.5
19	126	135
20	132	143

[0063]

[表8]

個体No.	HPLC法 ビタミンA測定値 (ng/mL)	イムノクロマト法 ビタミンA測定値 (ng/mL)
1	106	114
2	148	157
3	87.3	82.4
4	103	97.5
5	101	105
6	126	117
7	97.4	90.1
8	104	112
9	115	123
10	46.2	40.6
11	128	137
12	51.1	58.4
13	163	170
14	86.5	93.0
15	128	120
16	90.8	93.9
17	128	135
18	69.6	74.4
19	85.3	76.8
20	119	130

[0064] (比較例1)

保冷库 (-30℃) から取出し、室温 (25℃) に1日放置した検体希釈液を用いて、ウシ血清中のビタミンA濃度を測定したところ、測定値のバラつきが大きく、またHPLC法による測定値との相関係数も0.81であり

、測定精度の著しい低下が認められた。

[0065] (実施例3)

(競合試薬の調製)

ビタミンA (レチナール、MyBiosource, Inc.、MBS6023224) を、Biotin-hydrazide (同仁化学、B303) を用いて、ビオチン化することにより、ビタミンA-ビオチン結合物を調製した。調製後、使用時まで-30℃にて保存した。

[0066] (検体希釈液の調製)

リン酸緩衝生理食塩水 (pH7.4、ナカライテスク社、27576-21) にTritonX-100 (シグマアルドリッチ社、10789704001) を溶解させ、TritonX-100の濃度が0.1質量%の検体希釈液 (pH7.4) を調整した。

[0067] (抗ビオチン抗体結合金コロイドの調製)

金コロイド液 (BBI Solutions、EMGC40、OD=1) をpH8.0の50mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  に懸濁させ、これに抗ビオチン抗体 (SIGMA、B3640) を加えて混合し、室温で10分間静置して抗体を金コロイド表面に結合させた。更に、金コロイド表面への非特異結合を抑えるために、1質量%PEG200、10質量%BSAを添加しブロッキング処理を行った。この後、洗浄操作を繰り返し、20mM Tris-HCl (pH8.2)、0.05質量%PEG2000、150mM NaCl、1質量%BSA溶液に懸濁して、抗ビオチン抗体結合金コロイド液を調製した。

[0068] (抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子の調製)

標識物質としてセルロース微粒子液 (旭化成、BL1、1質量%) をpH7.0の10mM Tris Buffer (PBS) に懸濁させ、これに抗ビオチン抗体 (SIGMA、B3640) を加えて混合し、37℃で120分間静置して、抗体をセルロース微粒子表面に結合させた。更に、セルロース微粒子表面への非特異結合を抑えるために、1質量%カゼインを添加し

、37℃で60分間静置してブロッキング処理を行った。その後、洗浄操作を行った後、1質量%スクロース含有PBS（pH7.4）に懸濁して、抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子液を調製した。

[0069] (イムノクロマトストリップの作製)

(1-1) 抗ビオチン抗体結合金コロイド含浸部材の作製

8mm×150mmの帯状のガラス繊維不織布に、上記で得られた抗ビオチン抗体結合金コロイドを20mMTri s-HCl、0.05質量%PEG2000、37.5mMNaCl、0.25質量%B S A、3質量%スクロース溶液に懸濁し、これを0.5mL含浸させた。室温で乾燥させた後に、8mm×5mmの大きさに切断し、抗ビオチン抗体結合金コロイド含浸部材とした。

[0070] (1-2) 抗ビオチン抗体結合セルロース粒子含浸部材の作製

8mm×150mmの帯状のガラス繊維不織布に、上記で得られた抗ビオチン抗体結合セルロース微粒子液を0.5mL含浸させた。室温で乾燥させた後に、8mm×5mmの大きさに切断し、抗ビオチン抗体結合セルロース含浸部材とした。

[0071] (2) テストラインおよびコントロールラインの作製

抗ビタミンA抗体（Cloud-Clone Corp.、PAD051 Ge01）を1mg/mLの濃度に調製した後、これを25mm×300mmのニトロセルロース製メンブレンフィルターに1.0μL/cmの量で線状に塗布してテストラインを作製した。

次に、抗ウサギIgG抗体（MyBiosource, Inc.、MBS539780）を1mg/mLの濃度に調製した後、上記ニトロセルロース製メンブレンフィルターに1.0μL/cmの量で線状に塗布してコントロールラインを作成した。

テストラインおよびコントロールラインを作成後、50℃で30分間乾燥させ、25mm×5mmの大きさに切断し、イムノクロマト展開用膜担体とした。

## [0072] (3) イムノクロマトストリップの作製

粘着シートの上に、上記で得られた膜担体、含浸部材、および吸収用部材を配置し、イムノクロマトストリップを作製した。

## [0073] (4) ビタミンA標準液

20か月齢の牛から採血して得られた血清中のビタミンA濃度をHPLC法にて測定し、値付けしたものをビタミンA標準液とした。HPLCによる測定は、臨床検査センター（株式会社近畿予防医学研究所）に依頼して測定した。

## [0074] (5) 測定キットを用いた定量

上記標準液を検体希釈液（pH7.4 PBS、0.1質量% Triton X-100）を用いて希釈し、各濃度のビタミンA液を調製した。そして、前記ビタミンA液にビタミンA-ビオチン結合物体を最終濃度が0.1 μMになるように加え、前記(3)で得られたイムノクロマトストリップの試料添加用部材の試料滴下部にマイクロピペットで100 μL滴下し、10分後、テストラインにおける吸光度をイムノクロマトリーダ（浜松ホトニクス、C10066-10）にて測定した。その結果を表9（金コロイド）および表10（着色セルロース微粒子）に示した。また、測定の結果得られたグラフを図12（金コロイド）および図13（着色セルロース微粒子）に示した。

## [0075] [表9]

ビタミンA濃度 (ng/mL)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	吸光度 平均値 (mAbs)	標準 偏差
0	488	451	476	464	442	464	18.5
3.75	308	322	334	307	331	320	12.6
7.5	194	187	225	190	209	201	15.8
15	119	125	130	121	132	126	5.86
30	68.3	49.9	70.1	43.4	55.4	57.4	11.6

## [0076]

[表10]

ビタミンA濃度 (ng/mL)	1回目	2回目	3回目	4回目	5回目	吸光度 平均値 (mAbs)	標準 偏差
0	519	482	509	490	467	493	20.9
3.75	334	344	363	323	356	344	16.0
7.5	202	205	236	203	218	213	14.4
15	130	131	143	126	144	135	7.95
30	73.2	53.9	73.7	50.1	58.2	61.8	11.0

## [0077] (6) ウシ血清のビタミンA測定

20頭の牛から採血して得られた血清中のビタミンA濃度を、それぞれHPLC法および本発明のイムノクロマト測定キットを用いて測定した。HPLCによる測定は、臨床検査センター（株式会社近畿予防医学研究所）に依頼して測定した。イムノクロマト法では、標準液を同時に測定して得られた標準曲線を用いて、各血清のビタミンA濃度を算出した。測定結果を表11および図14（金コロイド）、表12および図15（着色セルロース微粒子）に示した。イムノクロマト法の測定値とHPLC法による測定値の相関係数はそれぞれ0.98、0.97であり、良好な相関関係を示した。

[0078]

[表11]

個体No.	HPLC法 ビタミンA測定値 (ng/mL)	イムノクロマト法 ビタミンA測定値 (ng/mL)
1	111	108
2	121	111
3	71.3	67.5
4	124	132
5	153	162
6	89.9	96.1
7	104	107
8	54.1	60.5
9	84.4	85.1
10	93.7	91.1
11	132	142
12	87.9	82.5
13	141	151
14	79.9	84.0
15	117	122
16	170	176
17	33.9	30.8
18	86.5	82.7
19	127	137
20	120	113

[0079]

[表12]

個体No.	HPLC法 ビタミンA測定値 (ng/mL)	イムノクロマト法 ビタミンA測定値 (ng/mL)
1	68.3	75.1
2	149	158
3	50.1	59.6
4	120	132
5	100	106
6	127	119
7	96.9	88.8
8	105	111
9	116	124
10	47.7	40.1
11	127	138
12	89.2	81.9
13	164	172
14	86.0	91.7
15	129	119
16	92.0	94.7
17	130	135
18	107	113
19	84.3	78.0
20	102	98.2

## [0080] (比較例2)

保冷库 (-30℃) から取出し、室温 (25℃) に1日放置した競合試薬を用いて、ウシ血清中のビタミンA濃度を測定したところ、測定値のバラつきが大きく、またHPLC法による測定値との相関係数も0.81であり、

測定精度の著しい低下が認められた。

### 産業上の利用可能性

[0081] 本発明により、肉牛の生産現場において牛血液中のビタミンA濃度を迅速、簡便に測定するビタミンAイムノクロマトキットを提供することが可能となる。

### 符号の説明

- [0082]
- 1 粘着シート
  - 2 含浸部材
  - 3 膜担体
  - 4 第一の捕捉部位（テストライン）
  - 5 第二の捕捉部位（コントロールライン）
  - 6 試料添加用部材
  - 7 吸収用部材
  - 8 イムノクロマトストリップ
  - 9 ハウジングケース
  - 10 試料滴下部
  - 11 判定部

## 請求の範囲

- [請求項1] 生体試料中のビタミンAを定量するためのイムノクロマトストリップであって、
- 前記イムノクロマトストリップは、最上流部に試料滴下部、および前記試料滴下部の下流側に順にテストライン、コントロールラインを有し、
- 前記テストラインには、抗ビタミンA抗体が固定化されている、ことを特徴とするイムノクロマトストリップ。
- [請求項2] さらに、前記試料滴下部の下流側に含浸部材を有し、前記含浸部材にはビタミンAと化合物との結合体、および前記化合物に対する抗体に標識物質を結合した標識体が含浸されていることを特徴とする請求項1に記載のイムノクロマトストリップ。
- [請求項3] 前記ビタミンAと結合体をなす化合物は、ビオチン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ストリップ。
- [請求項4] 前記化合物に対する抗体は、抗ビオチン抗体であることを特徴とする請求項3に記載のイムノクロマト試験片。
- [請求項5] 前記標識物質は、金コロイドまたはセルロース微粒子であることを特徴とする請求項2～4のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。
- [請求項6] 前記標識物質は、青色セルロース微粒子であることを特徴とする請求項2～4のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。
- [請求項7] 前記抗ビタミンA抗体はモノクローナル抗体であることを特徴とする請求項1～6のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。
- [請求項8] 前記標識体を特異的に結合する抗体は抗IgG抗体であることを特徴とする請求項1～7のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。
- [請求項9] 前記コントロールラインには、前記標識体を特異的に結合する抗体が固定化されていることを特徴とする請求項1～8のいずれかに記載

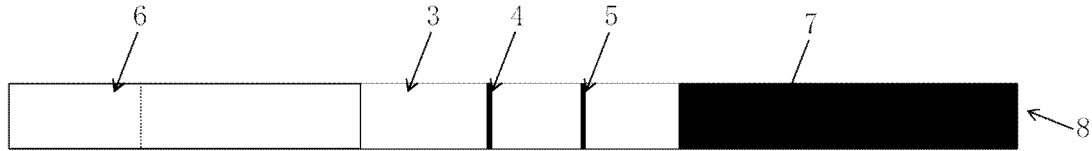
のイムノクロマトストリップ。

[請求項10] 全血または血清または血漿中のビタミンAを定量することを特徴とする請求項1～9のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ。

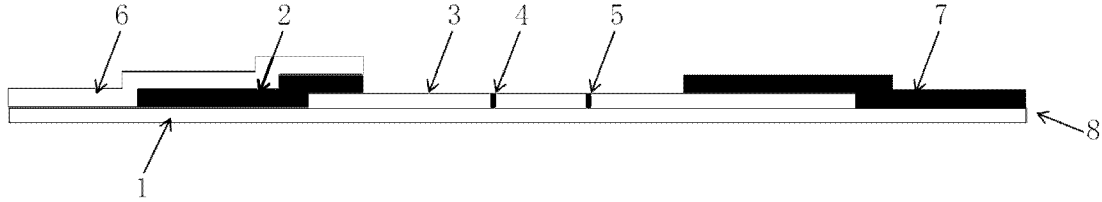
[請求項11] 請求項1～10のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ、および検体希釈液を含むことを特徴とするイムノクロマト測定キット。

[請求項12] 請求項1～10のいずれかに記載のイムノクロマトストリップ、検体希釈液、および競合試薬を含むことを特徴とするイムノクロマト測定キット。

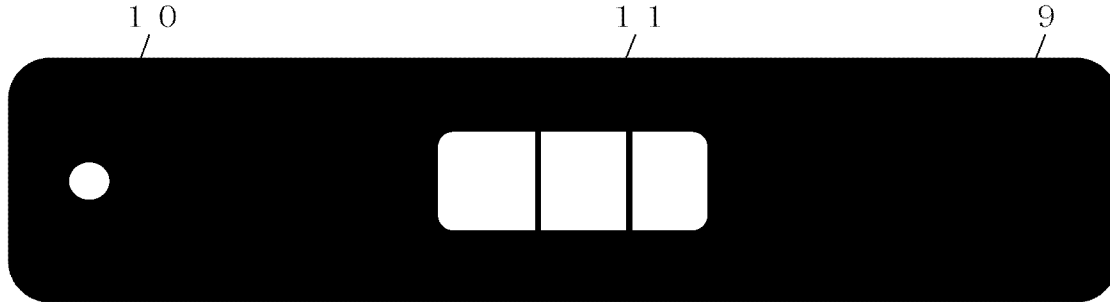
[図1]



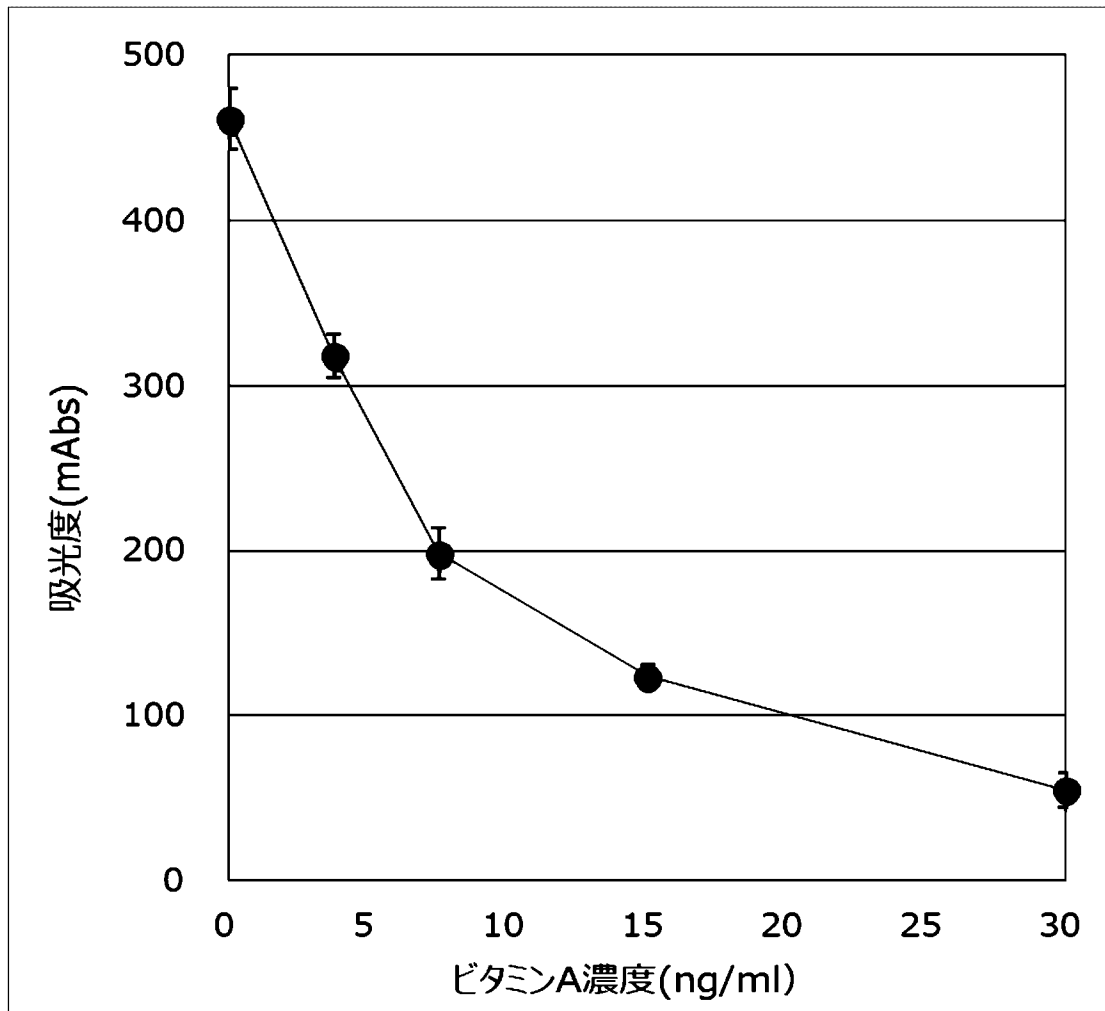
[図2]



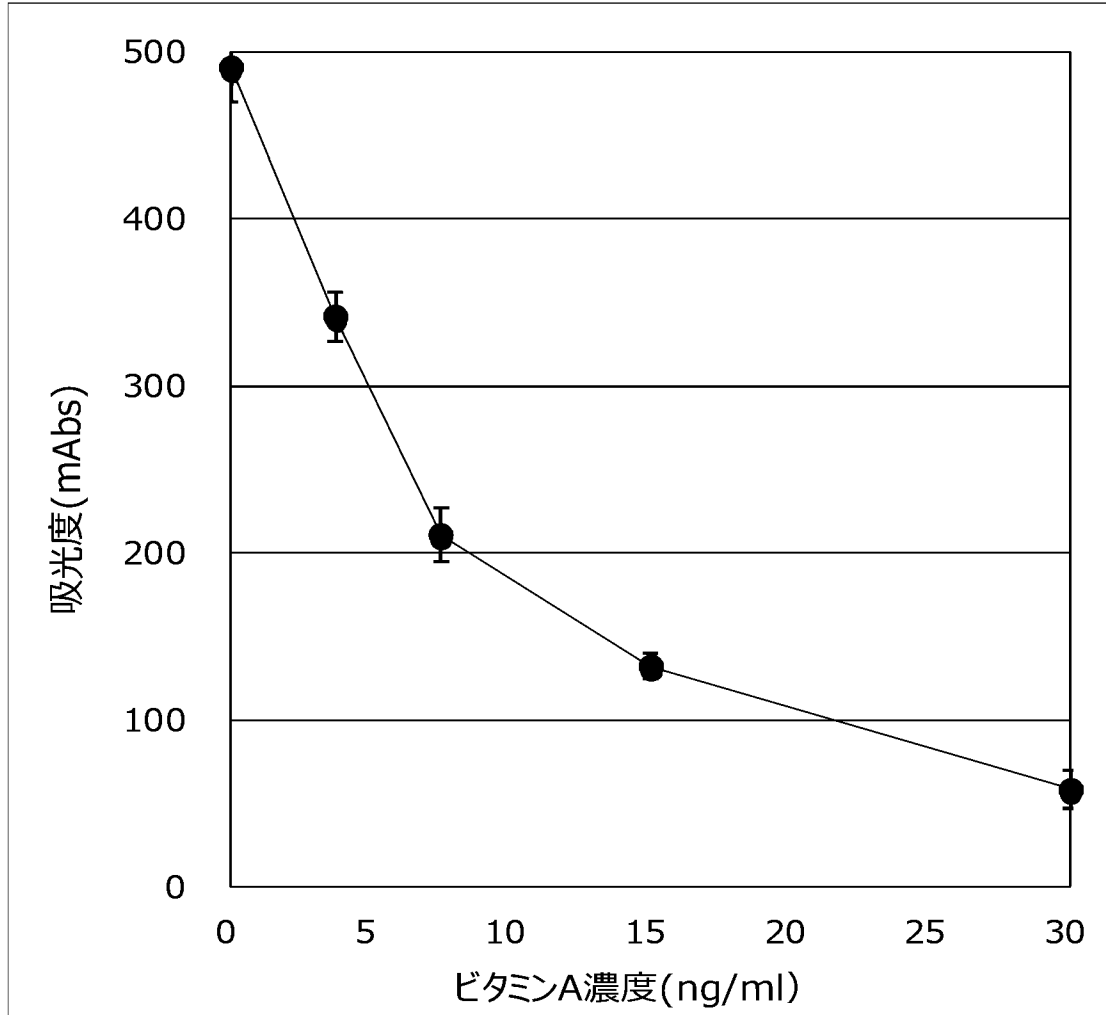
[図3]



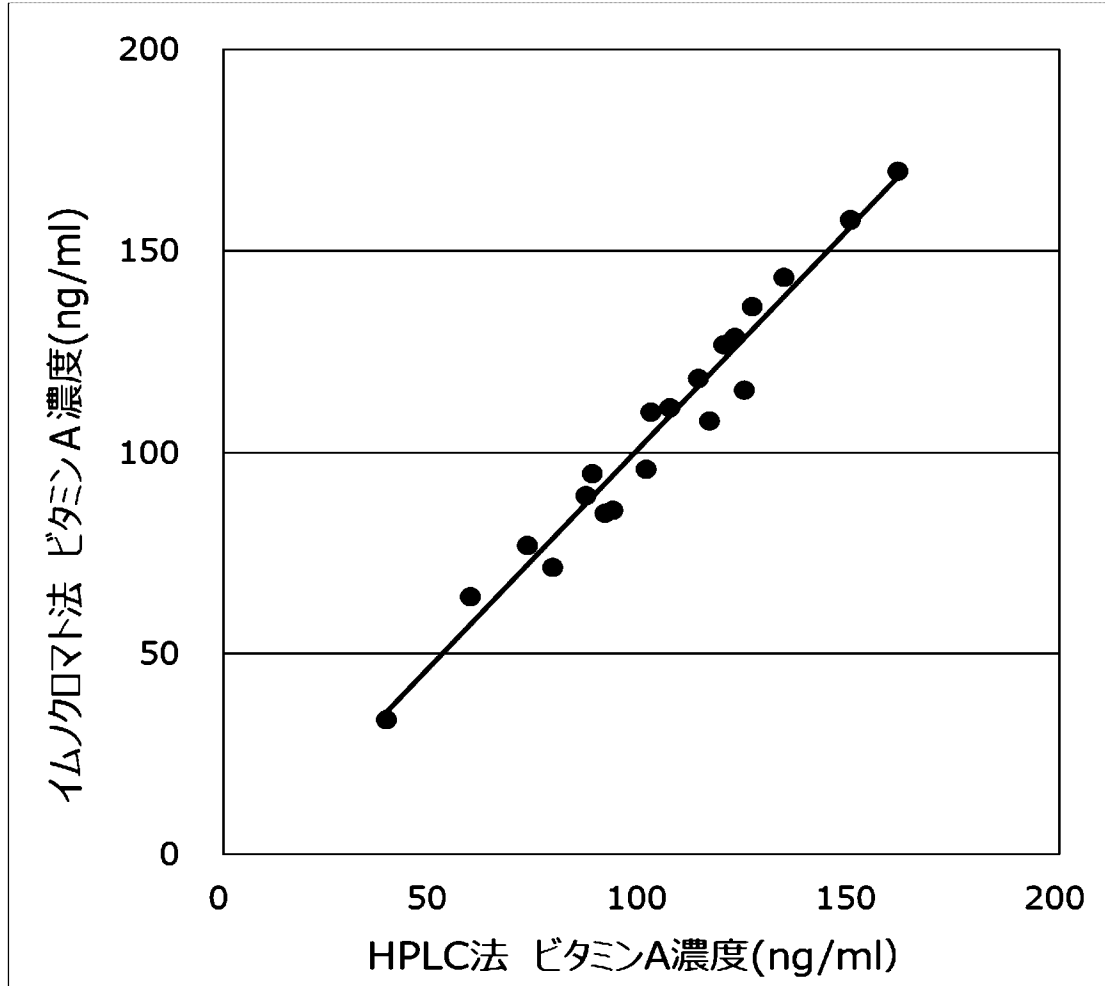
[図4]



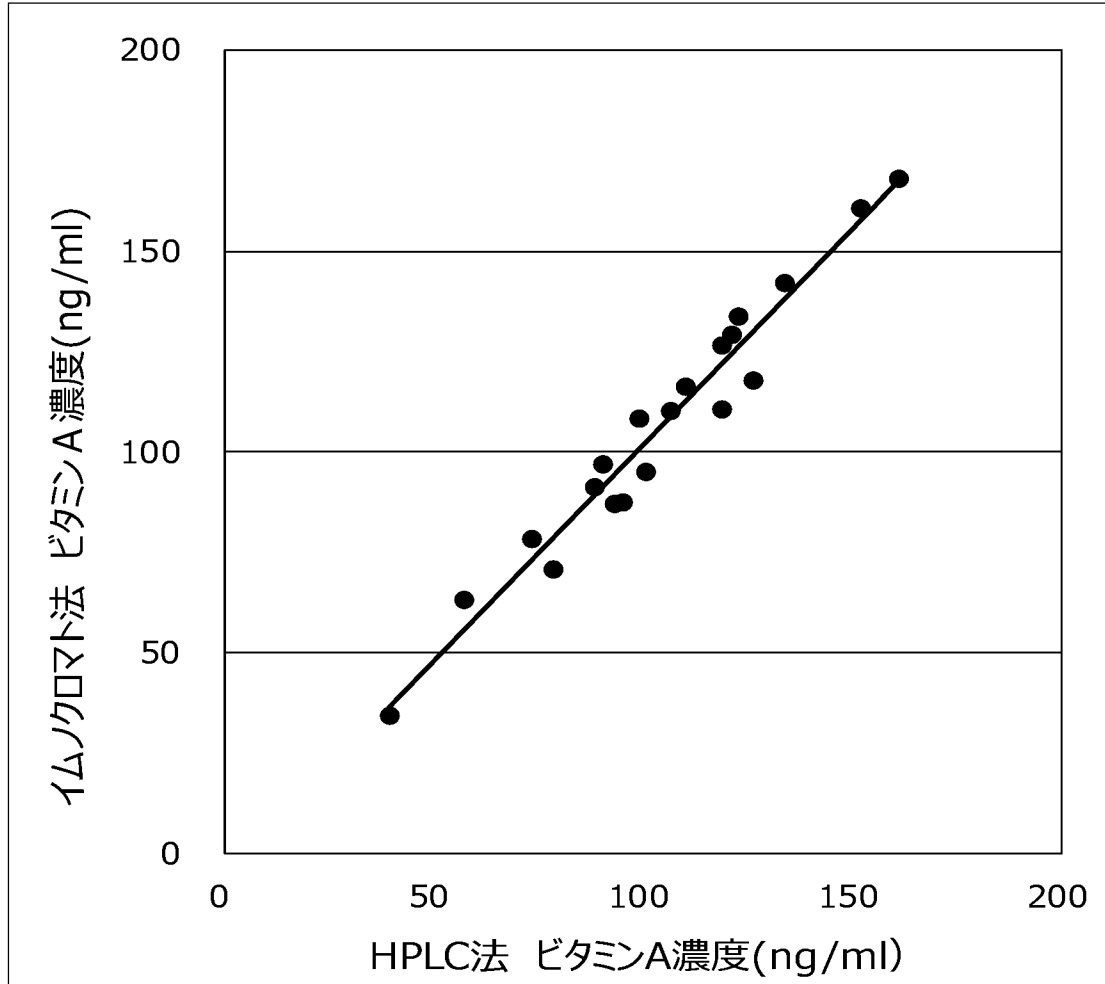
[図5]



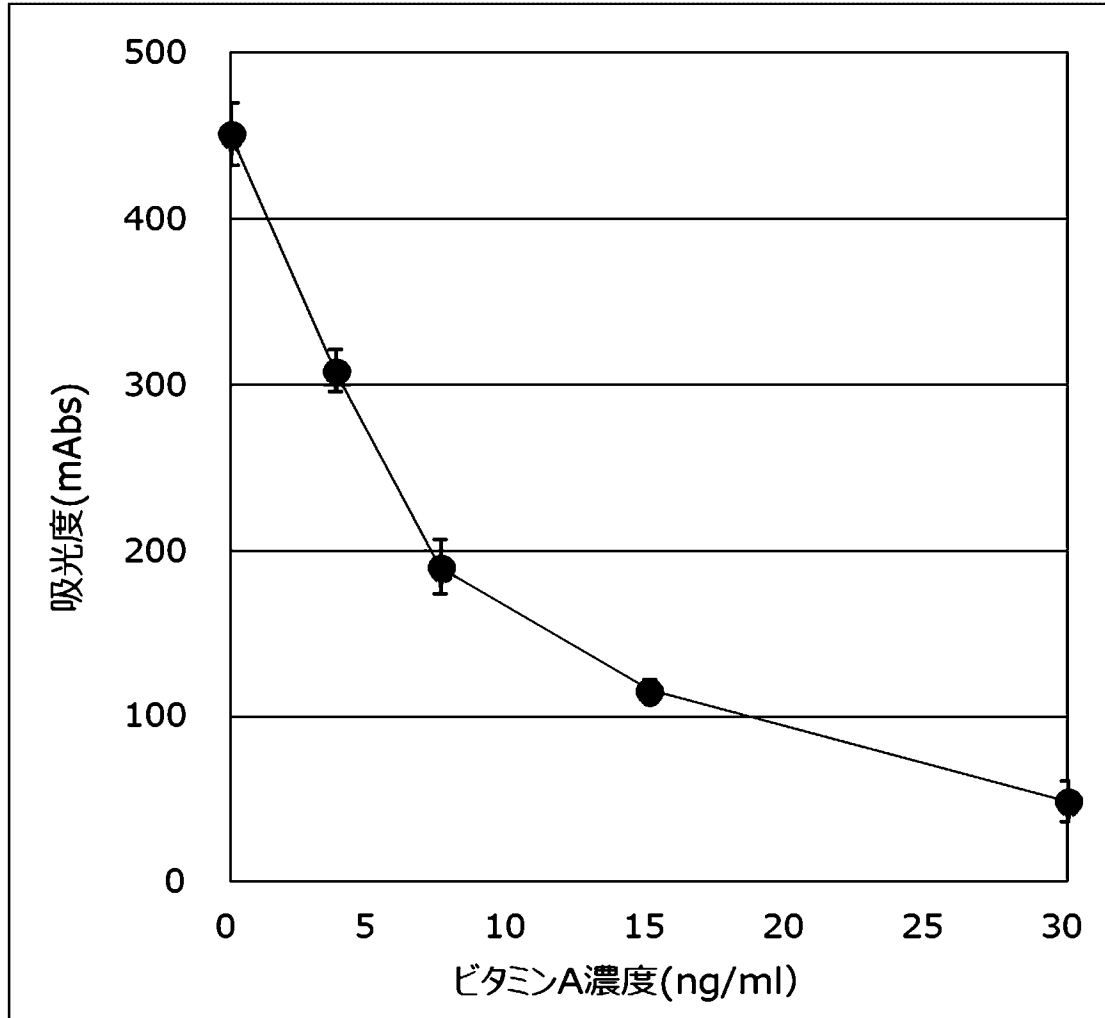
[図6]



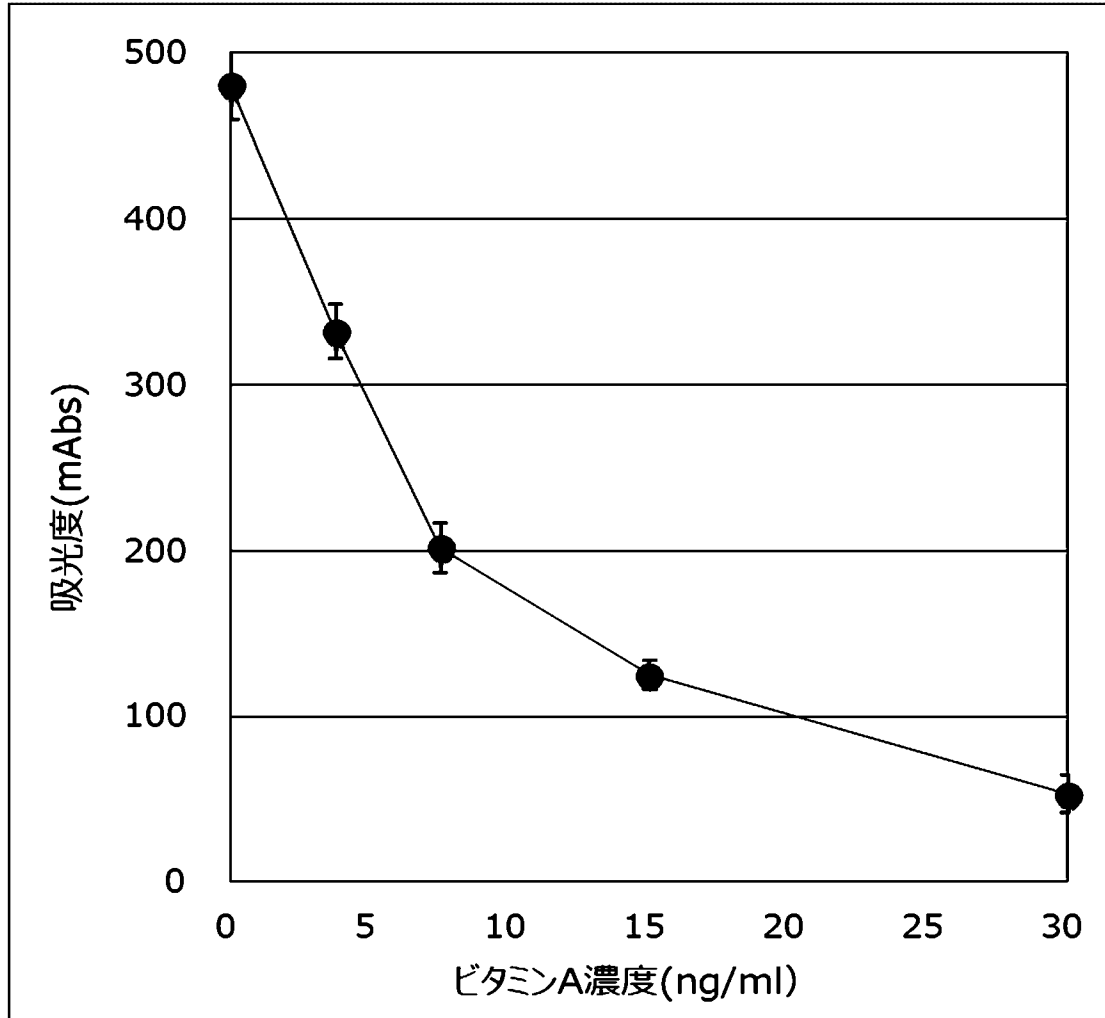
[図7]



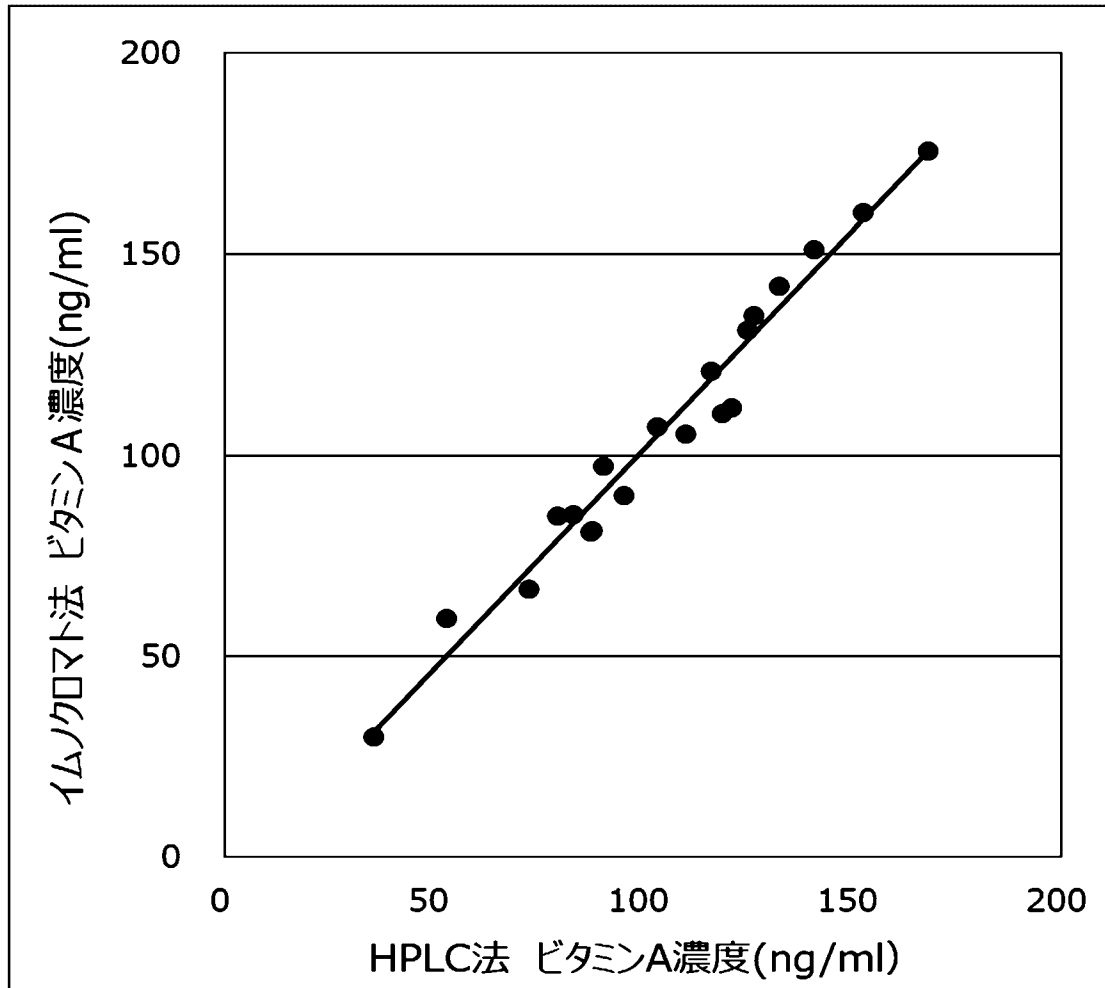
[図8]



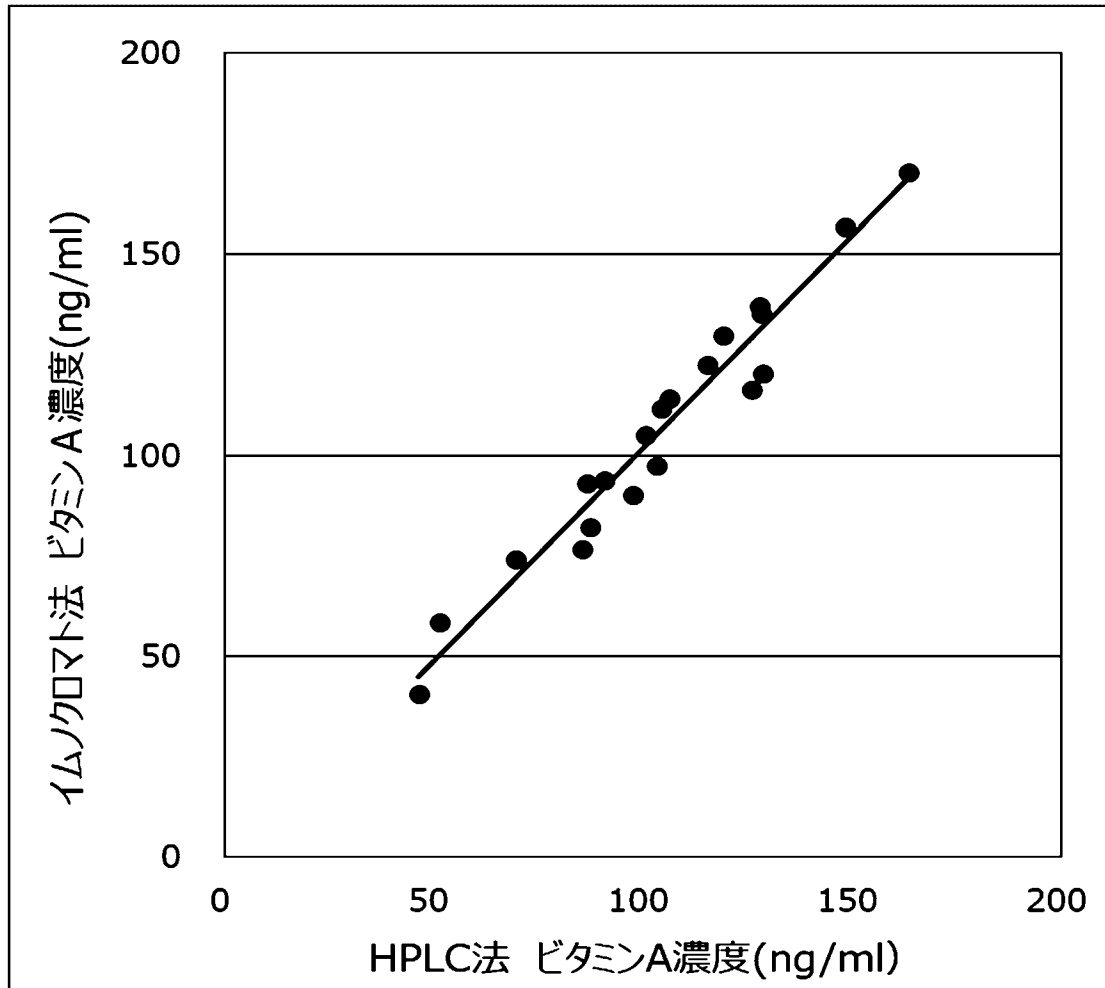
[図9]



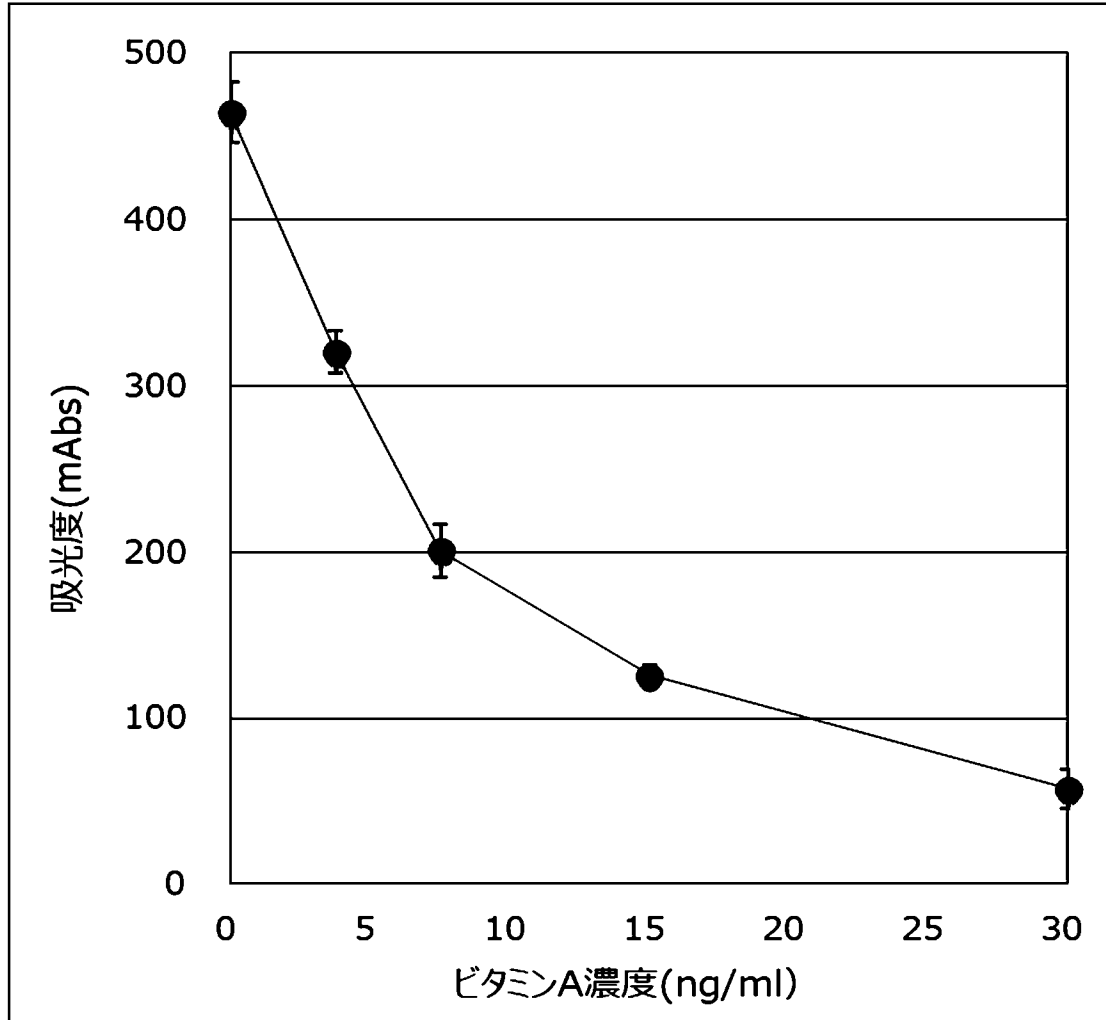
[図10]



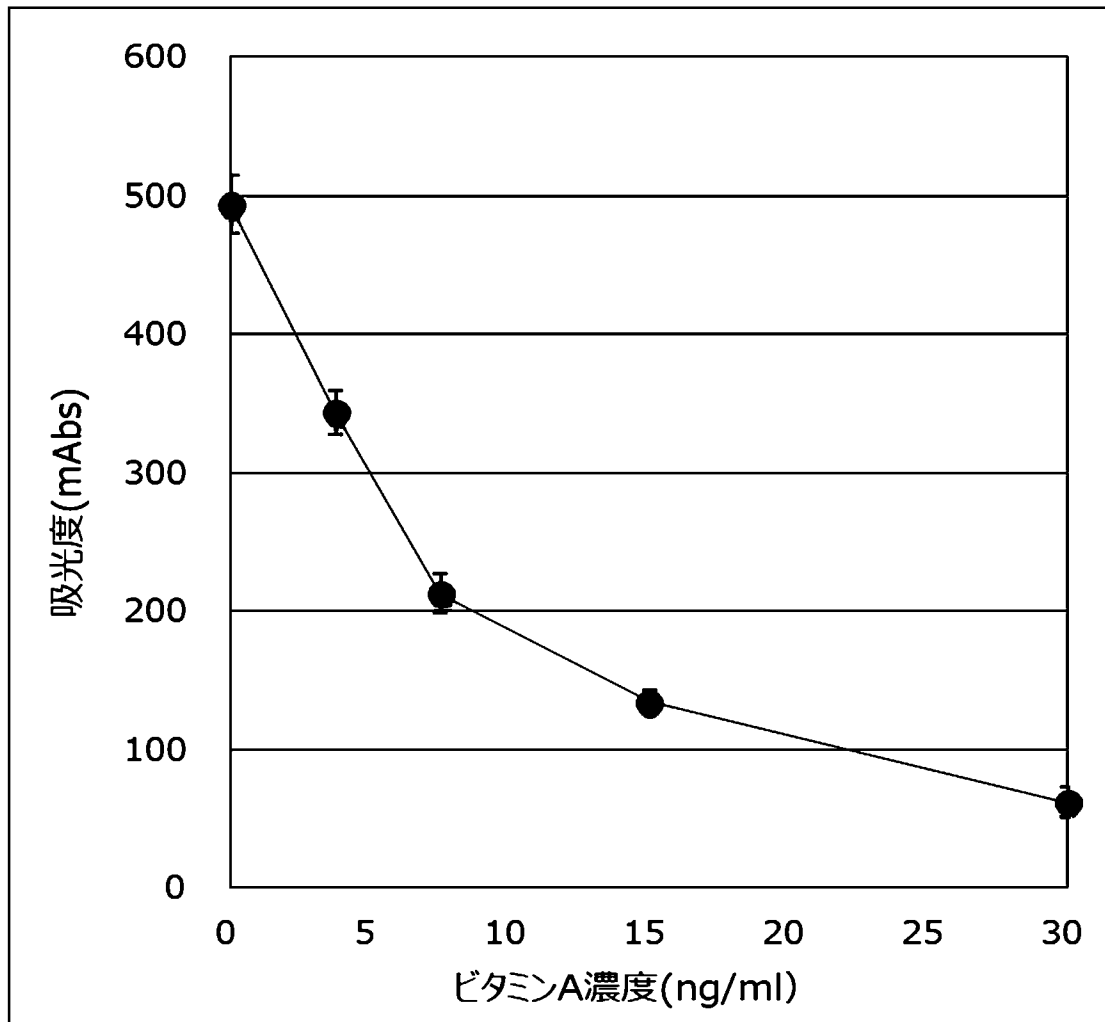
[図11]



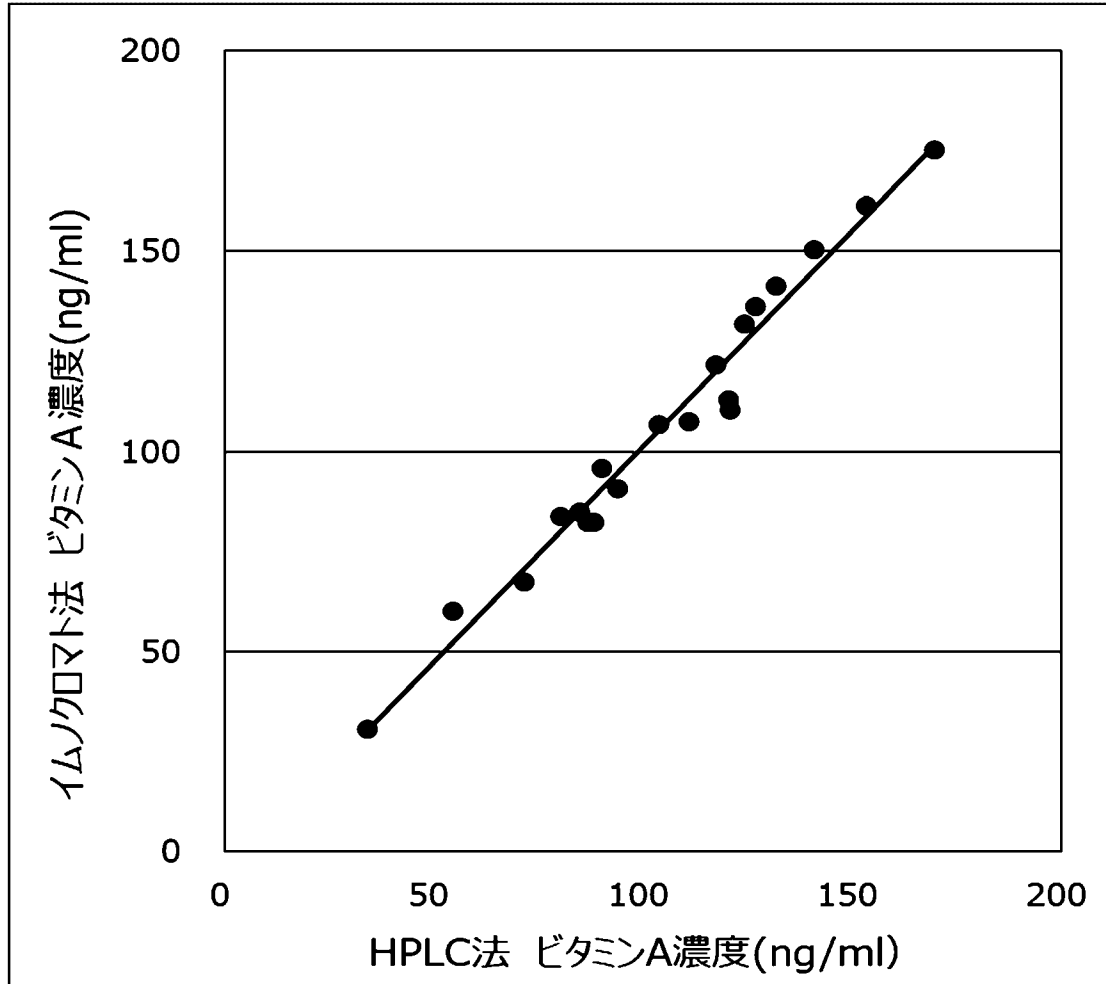
[図12]



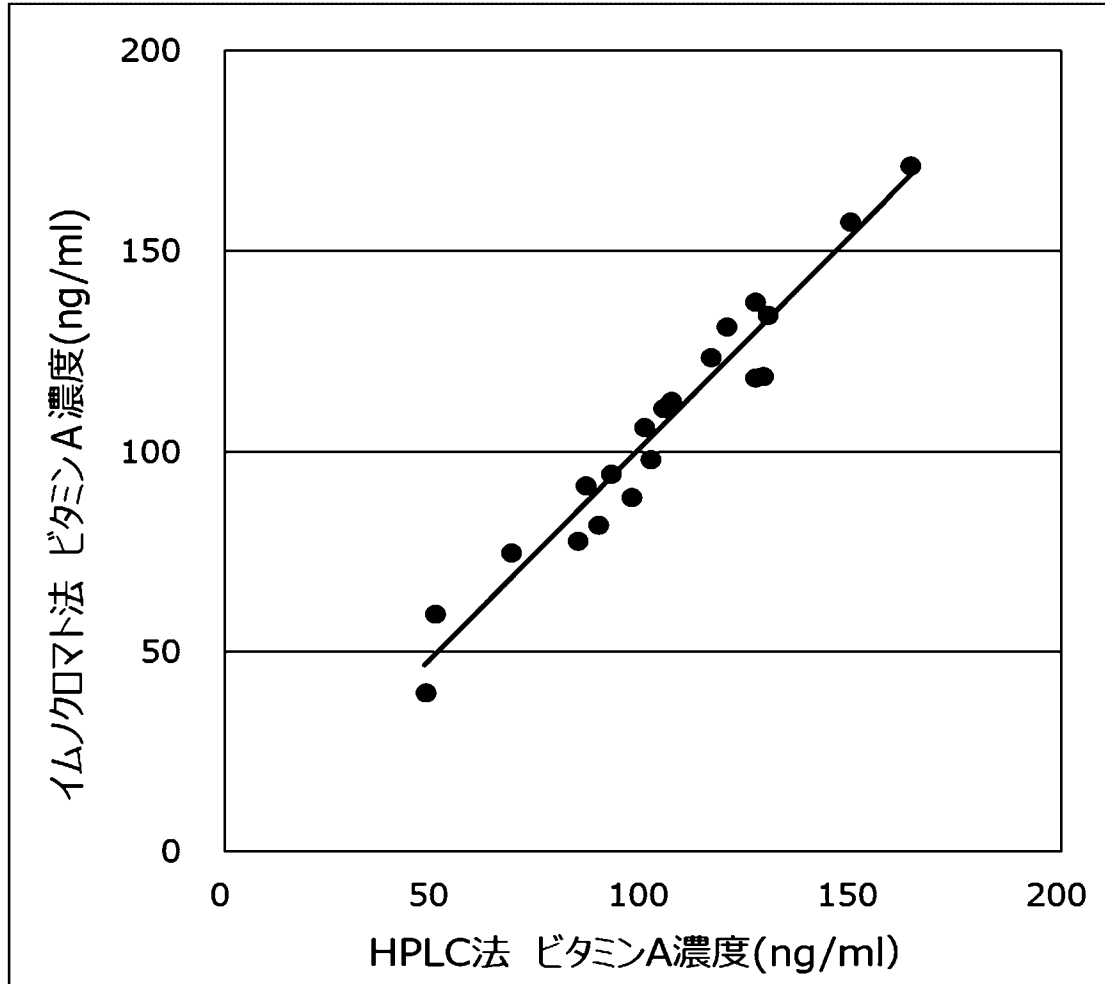
[図13]



[図14]



[図15]



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2021/038752

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
<i>G01N 33/53</i> (2006.01)i; <i>G01N 33/543</i> (2006.01)i FI: G01N33/543 521; G01N33/53 H		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
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 1971-2021 Registered utility model specifications of Japan 1996-2021 Published registered utility model applications of Japan 1994-2021		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GUPTA, Seema et al. Validation study of the VitaKit A Test kit for the Determination of Vitamin A Fluid Milk(2% Fat) for Routine Quality Control. journal of AOAC International, January 2011, vol. 94, no. 1, pp. 191-200 abstract, 1 Scope of Method	1-9, 11-12
A	abstract, 1 Scope of Method	10
Y	JP 2019-507890 A (AFFIMEDIX INC.) 22 March 2019 (2019-03-22) claim 9, fig. 1C	1-12
Y	WO 2019/215199 A1 (IMMUNDIAGNOSTIK AG) 14 November 2019 (2019-11-14) paragraphs [0002], [0078]	1-12
Y	JP 2018-513983 A (BLUDIAGNOSTICS, INC) 31 May 2018 (2018-05-31) claim 42, paragraph [0009]	1-12
Y	WESTFALL, S. S. and WIRTZ, G. H. Vitamin A antibodies: application to radioimmunoassay, Experientia, 15 December 1980, vol. 36, no. 12, PP.1351-1353 page 1351	1-12
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> 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 <b>15 December 2021</b>		Date of mailing of the international search report <b>11 January 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/JP <b>Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan</b>		Authorized officer  Telephone No.

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/JP2021/038752**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP	2019-507890	A	22 March 2019	WO 2017/127833 A1 claim 9, fig. 1C	
				US 2019/0086430 A1	
				EP 3405198 A1	
WO	2019/215199	A1	14 November 2019	US 2021/0172945 A1	
				EP 3791167 A1	
				JP 2021-522469 A	
JP	2018-513983	A	31 May 2018	US 2018/0106799 A1 claim 42, paragraph [0009]	
				WO 2016/164365 A1	
				EP 3281014 A1	
				CN 107667290 A	

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: G01N33/543 521; G01N33/53 H		
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 - 2021年 日本国実用新案登録公報 1996 - 2021年 日本国登録実用新案公報 1994 - 2021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	GUPTA, Seema et al., Validation study of the VitaKit A Test kit for the Determination of Vitamin A Fluid Milk(2% Fat) for Routine Quality Control , journal of AOAC International , 2011.01, Vol.94,No.1, PP.191-200 abstract, 1 Scope of Method	1-9,11-12
A	abstract, 1 Scope of Method	10
Y	JP 2019-507890 A (アフィメディックス, インコーポレイテッド) 22.03.2019 (2019 - 03 - 22) 請求項 9、図 1 C	1-12
Y	WO 2019/215199 A1 (IMMUNDIAGNOSTIK AG) 14.11.2019 (2019 - 11 - 14) 段落[0002]、[0078]	1-12
Y	JP 2018-513983 A (ブルーダイアグノスティックス・インコーポレイテッド) 31.05.2018 (2018 - 05 - 31) 請求項42、段落[0009]	1-12
Y	WESTFALL, S.S. and WIRTZ, G. H., Vitamin A antibodies: application to radioimmunoassay, Experientia, 1980.12.15, Vol.36, No.12, PP.1351-1353 第1351頁	1-12
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input checked="" type="checkbox"/> 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	
15.12.2021	11.01.2022	
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）  海野 佳子 2J 3906  電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

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/JP2021/038752

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
JP	2019-507890	A	22.03.2019	WO	2017/127833	A1	
					請求項9、図1C		
				US	2019/0086430	A1	
				EP	3405198	A1	
-----							
WO	2019/215199	A1	14.11.2019	US	2021/0172945	A1	
				EP	3791167	A1	
				JP	2021-522469	A	
-----							
JP	2018-513983	A	31.05.2018	US	2018/0106799	A1	
					請求項42、段落[0009]		
				WO	2016/164365	A1	
				EP	3281014	A1	
				CN	107667290	A	
-----							