

(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
2017 年 1 月 5 日(05.01.2017)



(10) 国際公開番号

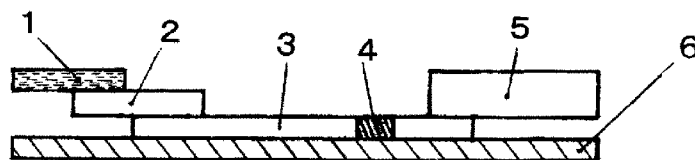
WO 2017/002882 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/069343
- (22) 国際出願日: 2016 年 6 月 29 日(29.06.2016)
- (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 2015-131804 2015 年 6 月 30 日(30.06.2015) JP
- (71) 出願人: 田中貴金属工業株式会社(TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K.) [JP/JP]; 〒1006422 東京都千代田区丸の内 2 丁目 7 番 3 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 鈴木 啓太(SUZUKI Keita); 〒2540076 神奈川県平塚市新町 2 番 7 3 号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内 Kanagawa (JP). 岩本 久彦(IWAMOTO Hisahiko); 〒2540076 神奈川県平塚市新町 2 番 7 3 号 田中貴金属工業株式会社技術開発センター内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人栄光特許事務所(EIKOH PATENT FIRM, P.C.); 〒1050003 東京都港区西新橋一丁目 7 番 1 3 号 虎ノ門イーストビルディング 10 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, KE, KG, KN, KP, KR, 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, 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, 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: CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS DEVICE AND CHROMATOGRAPHIC ANALYSIS METHOD

(54) 発明の名称: クロマト分析装置およびクロマト分析方法

〔図1〕



(57) Abstract: The present invention provides a chromatographic analysis device capable of improving the detection sensitivity of a substance to be detected while inhibiting a nonspecific reaction. The present invention relates to a chromatographic analysis device which includes at least a chromatograph medium section (3) supported by a detection part (4) for detecting a substance to be detected contained in a sample. The chromatograph medium section (3) has a configuration in which a membrane is disposed on a support. The average thickness of the membrane is 110 to 130 μm , and the development current velocity of the membrane is 30 to 45 seconds/40 mm.

(57) 要約: 本発明は、非特異反応を抑制しつつ、被検出物質の検出感度を高めることのできる、クロマト分析装置を提供する。本発明は、検体に含まれる被検出物質を検出する検出部 (4) が担持されたクロマトグラフ媒体部 (3) を少なくとも含むクロマト分析装置において、クロマトグラフ媒体部 (3) が、支持体上に膜を設けた構成を有し、前記膜の平均膜厚が、110 μm ~ 130 μm であり、かつ前記膜の展開流速が、30 ~ 45 秒 / 40 mm であるクロマト分析装置に関する。

WO 2017/002882 A1

明 細 書

発明の名称：クロマト分析装置およびクロマト分析方法

技術分野

[0001] 本発明は、クロマト分析装置およびクロマト分析方法に関する。

背景技術

[0002] 近年、検体の前処理を行う必要の無い、免疫クロマトグラフィーによる免疫アッセイは、抗体の持つ特異的反応性を利用して、試料液中の抗原を検出する簡便な体外診断キットもしくは携帯用診断装置として重要性が高まっている。特に、ウイルスや細菌等の病原体検査キットは、一般の病院やクリニックでも汎用されている身近な免疫クロマト分析装置である。

[0003] 従来の免疫クロマト分析装置の最も簡単な構造としては、試料添加部、標識物質保持部、検出部が担持されたクロマトグラフ媒体部、および検出部を通過した液体を吸収する吸収部が相互に繋がった構造である。

[0004] このような免疫クロマト分析装置に対し、現在ではインフルエンザウイルスのような微量な抗原を検出するために、高感度化が求められている。

[0005] そのため、従来では、標識物質に結合させる抗体の量を増加させる等の手段が行われていた。しかし、このような手段では、非特異反応が生じやすくなるという問題点がある。なお、抗体の量を減じると、十分な感度を得られない。

[0006] そこで、例えば特許文献1には、反応液に金属イオンのマスキング剤を共存させる技術が提案されている。

[0007] 特許文献2には、生体材料含有溶液の毛管現象による拡散を防ぐための制御ラインを所定の位置に形成し、該生体材料含有溶液を制御ラインの近傍に滴下し、これを局在化する技術が開示されている。

[0008] しかし、従来の免疫クロマト分析装置では、非特異反応を抑制しつつ、要求されるレベルにまで感度を高めることはできなかった。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：日本国特開平9－203735号公報

特許文献2：日本国特開2009－264879号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] したがって、本発明の目的は、非特異反応を抑制しつつ、被検出物質の検出感度を高めることのできる、クロマト分析装置およびクロマト分析方法を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明は、以下の通りである。

1. 検体に含まれる被検出物質を検出する検出部が担持されたクロマトグラフ媒体部を少なくとも含むクロマト分析装置において、

前記クロマトグラフ媒体部が、支持体上にメンブレンを設けた構成を有し、

前記メンブレンの平均膜厚が、 $110\mu\text{m}$ ～ $130\mu\text{m}$ であり、かつ

前記メンブレンの展開流速が、 $30\sim45$ 秒/40mmであるクロマト分析装置。

2. 前記検体を添加する試料添加部と、前記検体に含まれる被検出物質を認識する標識物質を保持する標識物質保持部と、前記クロマトグラフ媒体部とを順次含む前記1に記載のクロマト分析装置。

3. 前記メンブレンが、ニトロセルロースメンブレンである前記1または2に記載のクロマト分析装置。

4. 前記検体が、鼻汁、喀痰、唾液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、便から選択される少なくとも1種である前記1～3のいずれか1に記載のクロマト分析装置。

5. 免疫クロマト分析装置である前記1～4のいずれか1に記載のクロマト分析装置。

6. 前記1～5のいずれか1に記載のクロマト分析装置を用い、前記クロマトグラフ媒体部に担持された検出部によって、前記検体に含まれる被検出物質を検出する工程を少なくとも有するクロマト分析方法。

7. 前記2に記載のクロマト分析装置を用い、下記工程(1)～(4)を順次実施する、クロマト分析方法。

(1) 前記検体を試料添加部に添加する工程

(2) 前記標識物質保持部に保持されている標識物質により前記検体に含まれる被検出物質を認識させる工程

(3) 前記検体および標識物質を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

(4) 展開された移動相中の被検出物質を検出部で検出する工程

8. 前記メンブレンが、ニトロセルロースメンブレンである前記7に記載のクロマト分析方法。

9. 前記検体が、鼻汁、喀痰、唾液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、便から選択される少なくとも1種である前記6～8のいずれか1に記載のクロマト分析方法。

10. 前記クロマト分析装置が、免疫クロマト分析装置である前記6～9のいずれか1に記載のクロマト分析方法。

発明の効果

[0012] 本発明によれば、クロマトグラフ媒体部におけるメンブレンの平均膜厚および展開流速を特定の範囲に設定しているので、検出部における非特異反応の原因となる物質の悪影響を最大限に防止することができ、かつ検出感度も同時に高めることができる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、クロマト分析装置の構造の一例を説明するための断面図である。

[図2]図2は、クロマトグラフ媒体部の支持体とメンブレンの構造の一例を説明するための断面図である。

[図3]図3は、実施例6のクロマトグラフ媒体部の断面の走査型電子顕微鏡（SEM）写真である。

発明を実施するための形態

[0014] 以下に、本発明を実施するための形態についてさらに詳しく説明する。

[0015] 本発明のクロマト分析装置およびクロマト分析方法は、生体分子の親和力に基づく特異的な結合を利用するものであればとくに制限されない。例えば、抗原と抗体との結合を利用する免疫クロマト分析装置および方法、核酸のハイブリダイゼーションを利用する核酸クロマト分析装置および方法等が挙げられ、その他、糖とレクチンとの結合、ホルモンと受容体との結合、酵素と阻害剤との結合等を利用するクロマト分析装置および方法であることもできる。

[0016] 以下、本発明に好適な免疫クロマト分析装置および免疫クロマト分析方法を挙げて本発明をさらに説明するが、本発明は下記の形態に制限されるものではない。

[0017] 本発明の免疫クロマト分析装置は、検体に含まれる被検出物質を検出する検出部が担持されたクロマトグラフ媒体部を少なくとも含むものであり、このクロマトグラフ媒体部におけるメンブレンが、下記で説明する平均膜厚および展開流速を満たすものであればとくに制限されないが、以下、本発明の好適な免疫クロマト分析装置の一実施形態について、図面を参照しながら説明する。

[0018] 本発明の免疫クロマト分析装置は図1に示すように、試料添加部（サンプルパッドともいう）（1）、標識物質保持部（コンジュゲートパッドともいう）（2）、クロマトグラフ媒体部（3）、検出部（4）、吸収部（5）およびバッキングシート（6）を順次含んで構成されている。

[0019] 試料添加部（1）は、免疫クロマト分析装置において、検体である試料を添加する部位である。試料添加部（1）は、通常の免疫クロマト分析装置に使用される素材であればどのようなものでもよい。すなわち、試料添加部（1）では試料が迅速に吸収されるが、速やかに試料が移動していくような性

質の多孔質シートで構成することができる。多孔質シートとしては、例えば、セルロース濾紙、グラスファイバー、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロン、綿布等が挙げられる。

[0020] 標識物質保持部（２）は、あらかじめ被検出物質と結合する抗体に結合した、後述する標識物質（マーカー物質）が含有されている。標識物質保持部内を被検出物質が移動する際に抗体と結合し、標識化される。標識物質保持部（２）は、例えば、グラスファイバー不織布またはセルロース膜等からなっている。

[0021] クロマトグラフ媒体部（３）は、クロマトグラフの展開部位である。クロマトグラフ媒体部（３）は、毛管現象を示す微細多孔性物質からなる不活性の膜である。

[0022] クロマトグラフ媒体部（３）は、図２に示すように、支持体（３２）上にメンブレン（３４）を設けた構成を有し、本発明ではメンブレン（３４）の平均膜厚が、 $110\mu\text{m}\sim 130\mu\text{m}$ であり、かつメンブレン（３４）の展開流速が、 $30\sim 45\text{秒}/40\text{mm}$ である。

[0023] メンブレン（３４）の平均膜厚が $110\mu\text{m}$ 未満であると、支持体（３２）からメンブレン（３４）が脱離したり、傷がつきやすくなったりして実用的ではない。逆にメンブレン（３４）の平均膜厚が $130\mu\text{m}$ を超えると粘度の高い検体に対する非特異反応が生じやすくなる。

[0024] メンブレン（３４）の厚さは、例えば、支持体（３２）とメンブレン（３４）からなるクロマトグラフ媒体部（３）の断面の走査型電子顕微鏡写真（例えば、図３）より、支持体（３２）とメンブレン（３４）の境界線を特定し、メンブレン（３４）の厚さを計測できる。

[0025] また、クロマトグラフ媒体部（３）と、クロマトグラフ媒体部（３）をメタノールなどの有機溶媒に浸漬し、メンブレン（３４）を溶解させた後に残った支持体（３２）とを、市販のマイクロメータやダイヤルゲージなどの膜厚測定器で夫々の膜厚を測定し、溶解前後の膜厚の差分よりメンブレン（３４）の膜厚を算出することもできる。これら測定方法を用いてクロマトグラ

フ媒体部（３）内の異なる複数個所を測定し（好ましくは９～１０箇所以上）、その平均値をメンブレン（３４）の平均膜厚として算出する。

[0026] メンブレン（３４）の平均膜厚は、より高感度で非特異的反応を抑制するためには、 $110\mu\text{m}$ ～ $127\mu\text{m}$ のものが好ましく用いられ、 $110\mu\text{m}$ ～ $120\mu\text{m}$ のものがより好ましく用いられ、 $114\mu\text{m}$ ～ $117\mu\text{m}$ のものが最適である。また、メンブレン（３４）の厚さは、 $110\mu\text{m}$ ～ $132\mu\text{m}$ の範囲内であれば、本発明の効果を十分発揮でき好ましく、 $110\mu\text{m}$ ～ $122\mu\text{m}$ のものがより好ましく用いられる。

[0027] メンブレン（３４）の展開流速が３０秒／４０ｍｍ未満であると、十分な感度を得る事が出来にくく、逆に展開流速が４５秒／４０ｍｍを超えると、非特異反応が生じやすくなる。

[0028] メンブレン（３４）のさらに好ましい展開流速は、３５～４５秒／４０ｍｍである。

なお、本発明における展開流速は、メンブレン上に水を垂直方向に４０ｍｍ展開させた時間を測定することにより得られた値を意味する。

[0029] 一般的に、メンブレン（３４）の平均膜厚が薄くなると、メンブレン（３４）の平均孔径が小さくなり、展開流速は遅くなる。逆にメンブレン（３４）の平均膜厚が増加すると、展開流速は速くなる。本発明では、従来技術のクロマト分析装置に比べ、メンブレン（３４）の平均膜厚を薄くするとともに、展開流速を速く設定している。メンブレン（３４）の平均膜厚が薄くなることより検体に含まれる被検出物質と検出部（４）における抗体との接触確率が上昇し、高感度化を達成できるとともに、展開流速を速くすることにより、検出部（４）における非特異反応の原因となる物質の悪影響を最大限に防止することができる。

[0030] なお、メンブレン（３４）の平均膜厚を薄くし、かつ、展開流速を速く設定するには、メンブレン（３４）の平均孔径を調整する手段が挙げられ、この平均孔径の調整は、例えばメンブレン（３４）を構成するポリマーを、有機溶剤を含む溶液に溶解し、キャストイングしてメンブレンとするときに、

該有機溶剤に含まれる水分量を適宜調整することにより、行うことができる。

[0031] 本発明では、クロマトグラフで使用される検出試薬、固定化試薬または被検出物質などと反応性を有しないという観点から、また、本発明の効果が向上するという観点から、例えば、ニトロセルロース製のメンブレン（以下「ニトロセルロースメンブレン」という場合がある）や、酢酸セルロース製のメンブレン（以下「酢酸セルロースメンブレン」という場合がある）が好ましく、ニトロセルロースメンブレンがさらに好ましい。なお、セルロース類メンブレン、ナイロンメンブレンおよび多孔質プラスチック布類（ポリエチレン、ポリプロピレン）も使用可能である。

[0032] ニトロセルロースメンブレンとしては、ニトロセルロースが主体で含まれていればよく、純品またはニトロセルロース混合品などニトロセルロースを主材とするメンブレンを使用することができる。

[0033] ニトロセルロースメンブレンは毛細管現象を示すものであるが、さらに毛細管現象を促進させる物質を含有させることもできる。該物質としては、膜面の表面張力を低下させ、親水性をもたらす物質が好ましい。例えば、糖類、アミノ酸の誘導体、脂肪酸エステル、各種合成界面活性剤またはアルコール等の両親媒性の作用を有する物質であって、免疫クロマトグラフ上での被検出物質の移動に影響がなく、標識物質（例えば金粒子など）の発色に影響を及ぼさない物質が好ましい。

[0034] 本発明におけるメンブレン（３４）は上記のように平均膜厚が薄いものであるため、その構造を維持するべく、クロマトグラフ媒体部（３）は、支持体（３２）上にメンブレン（３４）を設けた構成を有する。

[0035] 支持体（３２）としては、水不透過性のプラスチック等からなる支持体を挙げることができ、例えばポリエチレンテレフタレート、ポリエチレン、ポリウレタン製のフィルム状の支持体が挙げられる。なお、目視判定によって測定結果の観察を行う場合には、支持体（３２）は、標識物質によりもたらされる色彩と類似しない色彩を有するものであることが好ましく、通常、無

色、または白色であることが好ましい。

[0036] 支持体（３２）の厚さは、例えば $50\mu\text{m}\sim 130\mu\text{m}$ であり、好ましくは $80\mu\text{m}\sim 120\mu\text{m}$ である。

[0037] 上記のようなニトロセルロースメンブレンや酢酸セルロースメンブレンに代表されるクロマトグラフ媒体部（３）の形態および大きさは特に制限されるものではなく、実際の操作の点および反応結果の観察の点において適切であればよい。

[0038] 検出部（４）は、前記クロマトグラフ媒体部（３）上に形成され、すなわち、被検出物質と特異的に結合する抗体が任意の位置に固定化される。

[0039] 抗体としては例えば、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体が挙げられる。モノクローナル抗体およびポリクローナル抗体若しくはそのフラグメントは、公知であり、入手可能であり、公知の方法により調製することができる。抗体は、固定化試薬として任意の位置に固定化し、反応部位としての検出部（４）を形成することができる。

[0040] 固定化試薬をクロマトグラフ媒体部（３）に固定化する方法としては、固定化試薬をクロマトグラフ媒体部（３）に物理的または化学的手段により直接固定化する方法と、固定化試薬を微粒子に物理的または化学的に結合し、この微粒子をクロマトグラフ媒体部（３）に捕捉して固定化する間接固定化方法がある。

[0041] 直接的に固定化する方法としては、物理吸着を利用してもよいし、共有結合によってもよい。ニトロセルロースメンブレンの場合、物理吸着を行うことができる。共有結合ではクロマトグラフ媒体部（３）の活性化には一般的に臭化シアン、グルタルアルデヒドまたはカルボジイミド等が用いられるが、いずれの方法も用いることができる。

[0042] 間接的に固定化する方法としては、不溶性微粒子に固定化試薬を結合した後に、クロマトグラフ媒体部（３）に固定化する方法がある。不溶性微粒子の粒径はクロマトグラフ媒体部（３）に捕捉されるが移動することのできないサイズのものを選択することができ、好ましくは平均粒径 $5\mu\text{m}$ 程度以下

の微粒子である。

[0043] これらの粒子としては抗原抗体反応に使用されるものが種々知られており、本発明でもこれら公知の粒子を使用することができる。例えば、ポリスチレン、スチレンーブタジエン共重合体、スチレンーメタクリル酸共重合体、ポリグリシジルメタクリレートもしくはアクロレインーエチレングリコールジメタクリレート共重合体などの乳化重合法によって得られる有機高分子ラテックス粒子などの有機高分子物質の微粒子、ゼラチン、ベントナイト、アガロースもしくは架橋デキストランなどの微粒子、シリカ、シリカーアルミナもしくはアルミナなどの無機酸化物または無機酸化物にシランカップリング処理などで官能基を導入した無機粒子等が挙げられる。

[0044] 本発明においては、感度調整の容易さ等から直接固定化の方が好ましい。また、クロマトグラフ媒体部（３）への固定化試薬の固定化には、いろいろな方法が使用できる。例えば、マイクロシリンジ、調節ポンプ付きペンまたはインキ噴射印刷等、種々の技術が使用可能である。反応部位の形態としては特に限定されないが、円形のスポット、クロマトグラフ媒体の展開方向に対し垂直にのびるライン、数字、文字または＋、－などの記号等として固定化することもできる。

[0045] 固定化試薬を固定化した後、非特異反応により分析の精度が低下することをさらに防止するため、必要に応じて、クロマトグラフ媒体部（３）に、公知の方法でブロッキング処理を行うことができる。一般にブロッキング処理はウシ血清アルブミン、スキムミルク、カゼインまたはゼラチン等の蛋白質が好適に用いられる。かかるブロッキング処理後に、必要に応じて、例えば、T w e e n 2 0、T r i t o n X－1 0 0またはS D S等の界面活性剤を１つまたは２つ以上組み合わせて洗浄してもよい。

[0046] 吸収部（５）は、クロマトグラフ媒体部（３）の末端に、検出部（４）を通過した検体や展開液等の液体を吸収させるために必要に応じて設置される。本発明の免疫クロマト分析装置において、吸収部（５）は例えばグラスファイバー、パルプ、セルロースファイバー等、またはそれら不織布にアクリ

ル酸重合体等の高分子、エチレンオキサイド基等を持つ親水性薬剤を含有させたものが用いられ、特に好ましくはグラスファイバーである。吸収部（５）がグラスファイバーからなることによって、試料液の液戻りを大幅に低減することができる。

[0047] バッキングシート（６）は、基材である。片面に粘着剤を塗布したり、粘着テープを貼り付けることにより、片面が粘着性を有し、該粘着面上に試料添加部（１）、標識物質保持部（２）、クロマトグラフ媒体部（３）、検出部（４）、および吸収部（５）の一部または全部が密着して設けられている。バッキングシート（６）は、粘着剤によって試料液に対して不透過性、非透湿性となるようなものであれば、基材としては、特に限定されない。

[0048] 本発明の免疫クロマト分析方法は、上記の免疫クロマト分析装置を用い、クロマトグラフ媒体部（３）に担持された検出部（４）によって、検体に含まれる被検出物質を検出する工程を少なくとも有すればとくに制限されないが、以下の工程（１）～（４）を順次実施することが好ましい。

[0049] （１）前記検体を試料添加部に添加する工程

（２）前記標識物質保持部に保持されている標識物質により前記検体に含まれる被検出物質を認識させる工程

（３）前記検体および標識物質を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

（４）展開された移動相中の被検出物質を検出部で検出する工程

各工程について以下に説明する。

[0050] （１）検体を試料添加部に添加する工程

工程（１）では、第１に、検体を、測定精度を低下させることなく、免疫クロマトグラフ媒体部（３）中をスムーズに移動する程度の濃度に検体希釈液で調整または希釈して検体含有液とするのが好ましい。第２に、該検体含有液を試料添加部（１）上に、所定量（通常、０．１～２ｍｌ）滴下する。検体含有液が滴下されると、検体含有液は試料添加部（１）中で移動を開始する。

[0051] 検体希釈液は、また展開液としても使用することができるものであるが、通常、溶媒として水を用い、これに緩衝液、塩、および非イオン界面活性剤、さらに、例えば抗原抗体反応の促進あるいは非特異的反応を抑制するための蛋白質、高分子化合物（PVP等）、イオン性界面活性剤またはポリアニオン、あるいは、抗菌剤、キレート剤等々の1種もしくは2種以上を加えてもよい。展開液として用いる場合には、検体と展開液を予め混合したものを、試料添加部上に供給・滴下して展開させることもできるし、先に検体を試料添加部上に供給・滴下した後、展開液を試料添加部上に供給・滴下して展開させてもよい。

[0052] 被検出物質を含む検体としては、例えば、生体試料、即ち、鼻汁、喀痰、唾液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、便、全血、血清、血漿、尿、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の他、牛乳、卵、小麦、豆、牛肉、豚肉、鶏肉などやそれらを含む食品等の抽出液等が挙げられる。

[0053] 中でも本発明では、検体が、鼻汁、喀痰、唾液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、便から選択される少なくとも1種であることが好ましい。すなわち、いわゆる高粘性検体であることが好ましい。このような高粘性検体は、ムチンのような粘性物質を含有し、このような粘性物質は非特異反応を生じやすいことが知られている。

[0054] 本発明では、上記のようにメンブレン（34）の平均膜厚を $110\mu\text{m}$ ～ $130\mu\text{m}$ に、メンブレン（34）の展開流速を $30\sim45\text{秒}/40\text{mm}$ の範囲に設定しているため、検体に含まれる被検出物質と検出部（4）における抗体との接触確率を上昇させ、高感度化を達成するとともに、展開流速を速くすることにより、検出部（4）における高粘性物質の到達を遅延させ、非特異反応を最大限に防止することができる。

[0055] 具体的な被検出物質としては、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、CA1

25、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、RS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、アルブミンまたは糖化アルブミン等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0056] 好ましくは、便潜血、トロポニンI、トロポニンT、CK-MB、CRP、インフルエンザウイルス、RS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、アルブミンまたは糖化アルブミンが被検出物質として用いられる。

[0057] (2) 標識物質保持部に保持されている標識物質により検体に含まれる被検出物質を認識させる工程

工程(2)は、工程(1)において試料添加部に添加された検体含有液を、標識物質保持部(2)へと移動させ、標識物質保持部に保持されている標識物質により検体中の被検出物質を認識させる工程である。

[0058] 標識物質は抗体を標識化する。免疫クロマト分析方法における検出試薬の標識には、一般に酵素等も使用されるが、被検出物質の存在を目視で判定するのに適していることから、標識物質としては不溶性担体を用いることが好ましい。抗体を不溶性担体に感作することにより標識化した検出試薬を調製することができる。なお、抗体を不溶性担体に感作する手段は、公知の方法に従えばよい。

[0059] 標識物質としての不溶性担体には、金、銀もしくは白金等の金属粒子、酸化鉄等の金属酸化物粒子、硫黄等の非金属粒子および合成高分子よりなるラテックス粒子、またはその他の不溶性担体を用いることができる。不溶性担体は、被検出物質の存在を視覚的に判定するのに適した標識物質であり、目視による判定を容易にするためには有色であることが好ましい。金属粒子お

よび金属酸化物粒子は、それ自体が粒径に応じた特定の自然色を呈するものであり、その色彩を標識として利用することができる。

[0060] 特に金粒子が、検出が簡便であり、かつ凝集しづらく非特異的な発色が起こりにくい点で好ましい。金粒子の平均粒径は、例えば10nm～250nm、好ましくは35nm～120nmである。平均粒径は、透過型電子顕微鏡（TEM：日本電子（株）製、JEM-2010）により撮影した投影写真を用いて、無造作に100個の粒子の投影面積円相当径を計測し、その平均値から算出することができる。

[0061] （３）検体および標識物質を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

工程（３）は、工程（２）において被検出物質が標識物質保持部において標識物質に認識された後、検体および標識物質を、クロマトグラフ媒体部上を移動相として通過させる工程である。

[0062] （４）展開された移動相中の被検出物質を検出部で検出する工程

工程（４）は、クロマトグラフ媒体部上を移動相として通過した検体中の被検出物質が、抗原・抗体の特異的結合反応により、検出部に保持、即ち、担持固定されている抗体と標識試薬とによってサンドイッチ状に挟まれるように特異的に反応結合して、検出部が着色する工程である。

被検出物質が存在しない場合には、試料の水分に溶解した標識試薬は、クロマトグラフ媒体部上の検出部を通過しても特異的結合反応が起こらないので、検出部が着色しない。

[0063] 最後に、検体含有液の水分は、吸収部（５）へと移動する。

[0064] なお上記では免疫クロマト分析装置および免疫クロマト分析方法を例にとり説明したが、本発明は、上記形態に制限されず、生体分子の親和力に基づく特異的な結合を利用するものであれば、その効果をいずれも享受することができる。

実施例

[0065] 以下、本発明を実施例によりさらに説明するが、本発明は下記例に制限さ

れるものではない。

[0066] (1) 試料添加部の作製

試料添加部としてグラスファイバーからなる不織布（ミリポア社製：300 mm×300 mm）を用いた。

(2) 標識物質保持部の作製

金コロイド懸濁液（田中貴金属工業社製：LC40 nm）0.5 mlに、リン酸緩衝液（pH 7.4）で0.05 mg/mlの濃度になるように希釈したマウス由来抗RSウイルスモノクローナル抗体を0.1 ml加え、室温で10分間静置した。

次いで、1質量%の牛血清アルブミン（BSA）を含むリン酸緩衝液（pH 7.4）を0.1 ml加え、更に室温で10分間静置した。その後、十分攪拌した後、8000×gで15分間遠心分離を行い、上清を除去した後、1質量%のBSAを含むリン酸緩衝液（pH 7.4）を0.1 ml加えた。以上の手順で標識物質溶液を作製した。

上記作製した標識物質溶液300 μLに300 μLの10質量%トレハロース水溶液と1.8 mLの蒸留水を加えたものを15 mm×300 mmのグラスファイバーパッド（ミリポア社製）に均一になるように添加した後、真空乾燥機にて乾燥させ、標識物質保持部を作製した。

[0067] (3) クロマトグラフ媒体部および検出部の作製

ポリエチレンテレフタレート製の厚さ100 μmの支持体上に、ニトロセルロースからなりかつ下記表1及び表2に示す厚さおよび展開流速を有するメンブレン（300 mm×25 mm）を積層し、クロマトグラフ媒体部とした。表1及び表2に示すメンブレンの厚さは、後の免疫クロマト分析装置の作成後（裁断後）、免疫クロマト分析装置内のクロマトグラフ媒体部の走査型電子顕微鏡写真による任意の3箇所の断面観察から夫々任意の3箇所の膜厚測定を行い、測定された合計9箇所の膜厚からクロマトグラフ媒体の最小値の膜厚、最大値の膜厚および平均値の膜厚（平均膜厚）を算出した。

次に、5質量%のイソプロピルアルコールを含むリン酸緩衝液（pH 7.

4) で 1.0 mg/ml の濃度になるようにマウス由来抗RSウイルスモノクローナル抗体を希釈した溶液 $150 \mu\text{L}$ を、乾燥されたメンブレン上の検出部位（検出ライン）に 1 mm の幅で塗布し、金ナノ粒子標識試薬の展開の有無や展開速度を確認するために検出部位の下流に、金ナノ粒子標識物質などと広く親和性を有するヤギ由来抗血清をリン酸緩衝液（ $\text{pH } 7.4$ ）で希釈した液をコントロール部位（コントロールライン）に塗布した。その後、 50°C で 30 分間乾燥させ、室温で一晩乾燥させ、クロマトグラフ媒体部上に検出部を作製した。

[0068] （4）免疫クロマト分析装置の作成

次に、バックグシートから成る基材に、試料添加部、標識物質保持部、検出部が担持されたクロマトグラフ媒体部、展開した試料や標識物質を吸収するための吸収部としてグラスファイバー製の不織布を順次貼り合わせた。そして、裁断機で幅が 5 mm となるように裁断し、免疫クロマト分析装置とした。なお、標識物質保持部の試料展開方向の長さを 8 mm とした。

[0069] （5）検体希釈液

1 質量%の非イオン界面活性剤（日油株式会社製、商品名：MN811とナカライテスク社製、商品名NP-40の $1:1$ 混合物）、 80 mM の塩化カリウム、 20 mM のグアニジン塩酸塩、 0.4 重量%のポリビニルピロリドン（平均分子量 36 万）を含む 50 mM のHEPES緩衝液（ $\text{pH } 7.5$ ）を調製し、検体を希釈処理するための試薬とした。

[0070] （6）測定

RSウイルス陰性の臨床実検体鼻汁を前記検体希釈液で希釈し 10% の濃度とし検体とした。この検体の $120 \mu\text{L}$ を免疫クロマト分析装置の試料添加部上に載せて展開させ、 15 分経過後に、検出部の着色の度合いを目視で確認し、以下の評価基準によって非特異反応の有無を評価した。

++：はっきりしたラインが確認された。

＋：薄いラインが確認された。

－：ラインは確認されなかった。

[0071] なお、RSウイルス陽性の臨床実検体鼻汁を前記検体希釈液で希釈し10%の濃度としたものを検体として、上記測定を繰り返し、感度を評価した。実施形態毎に夫々5回の測定を行い、その平均の感度の結果を表1及び表2に示す。

[0072] [表1]

表1

	実施例1	実施例2	実施例3	実施例4	実施例5	実施例6
メンブレンの厚さ 最小値(μm)	125	127	121	112	112	110
メンブレンの厚さ 最大値(μm)	132	132	129	122	121	118
メンブレンの厚さ 平均膜厚(μm)	127	127	126	116	117	114
感度(陽性)	++	++	++	++	++	++
非特異反応(陰性)	-	-	-	-	-	-
展開流速(秒/40mm)	37	38	33	40	41	39

[0073] [表2]

表2

	比較例1	比較例2	比較例3
メンブレンの厚さ 最小値(μm)	145	133	125
メンブレンの厚さ 最大値(μm)	138	146	131
メンブレンの厚さ 平均膜厚(μm)	141	141	127
感度(陽性)	++	++	+
非特異反応(陰性)	+	+	-
展開流速(秒/40mm)	42	39	54

[0074] 表1において、実施例1～6は、メンブレンの平均膜厚が、110μm～130μmの範囲内であり、かつメンブレンの展開流速が30～45秒/4

0 mm の範囲内であるため、高粘性検体を用いた分析であっても非特異反応が生じないことが分かった。また感度も良好である。

これに対し、表 2 における比較例 1 ～ 2 は、展開流速は本発明の範囲内であるが、メンブレンの平均膜厚がいずれも本発明で規定する上限を超えているので、非特異反応が生じた。比較例 3 は、メンブレンの平均膜厚は本発明の範囲内であるが、展開流速が本発明で規定する上限を超えているので、感度が実施例と比較して低かった。

なお、前記検体希釈液のみを検体として上記試験を繰り返した場合は、感度および非特異反応ともに、いずれも「－」評価であった。

更に、実施例 1 ～ 6 について、夫々繰り返し 50 回測定した場合、実施例 4 ～ 6 では非特異反応は検出されなかったが、実施例 1 ～ 3 では、1 ～ 2 回の非特異反応が検出された。

[0075] 本発明を特定の態様を用いて詳細に説明したが、本発明の意図と範囲を離れることなく様々な変更及び変形が可能であることは、当業者にとって明らかである。なお本出願は、2015 年 6 月 30 日付で出願された日本特許出願（特願 2015-131804）に基づいており、その全体が引用により援用される。

符号の説明

- [0076] 1 試料添加部（サンプルパッド）
2 標識物質保持部
3 クロマトグラフ媒体部
3 2 支持体
3 4 メンブレン
4 検出部
5 吸収部
6 バッキングシート

請求の範囲

- [請求項1] 検体に含まれる被検出物質を検出する検出部が担持されたクロマトグラフ媒体部を少なくとも含むクロマト分析装置において、
前記クロマトグラフ媒体部が、支持体上にメンブレンを設けた構成を有し、
前記メンブレンの平均膜厚が、 $110\mu\text{m} \sim 130\mu\text{m}$ であり、かつ
前記メンブレンの展開流速が、 $30 \sim 45$ 秒/ 40mm であるクロマト分析装置。
- [請求項2] 前記検体を添加する試料添加部と、前記検体に含まれる被検出物質を認識する標識物質を保持する標識物質保持部と、前記クロマトグラフ媒体部とを順次含む請求項1に記載のクロマト分析装置。
- [請求項3] 前記メンブレンが、ニトロセルロースメンブレンである請求項1または2に記載のクロマト分析装置。
- [請求項4] 前記検体が、鼻汁、喀痰、唾液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、便から選択される少なくとも1種である請求項1～3のいずれか1項に記載のクロマト分析装置。
- [請求項5] 免疫クロマト分析装置である請求項1～4のいずれか1項に記載のクロマト分析装置。
- [請求項6] 請求項1～5のいずれか1項に記載のクロマト分析装置を用い、前記クロマトグラフ媒体部に担持された検出部によって、前記検体に含まれる被検出物質を検出する工程を少なくとも有するクロマト分析方法。
- [請求項7] 請求項2に記載のクロマト分析装置を用い、下記工程(1)～(4)を順次実施する、クロマト分析方法。
(1) 前記検体を試料添加部に添加する工程
(2) 前記標識物質保持部に保持されている標識物質により前記検体に含まれる被検出物質を認識させる工程

(3) 前記検体および標識物質を移動相としてクロマトグラフ媒体部に展開させる工程

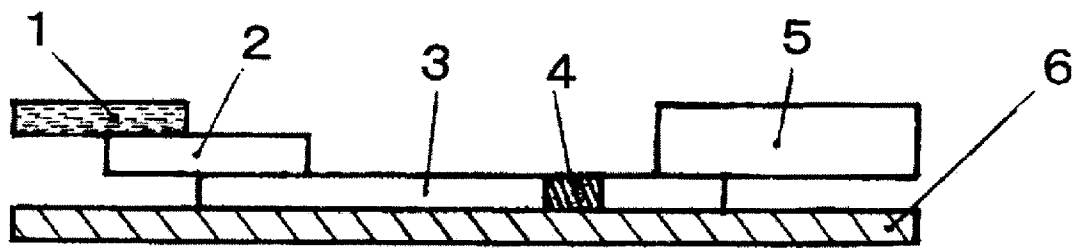
(4) 展開された移動相中の被検出物質を検出部で検出する工程

[請求項8] 前記メンブレンが、ニトロセルロースメンブレンである請求項7に記載のクロマト分析方法。

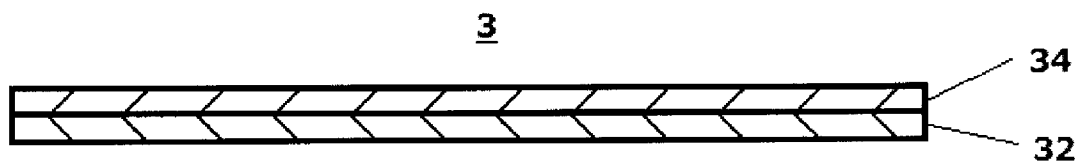
[請求項9] 前記検体が、鼻汁、喀痰、唾液、鼻腔拭い液、咽頭拭い液、便から選択される少なくとも1種である請求項6～8のいずれか1項に記載のクロマト分析方法。

[請求項10] 前記クロマト分析装置が、免疫クロマト分析装置である請求項6～9のいずれか1項に記載のクロマト分析方法。

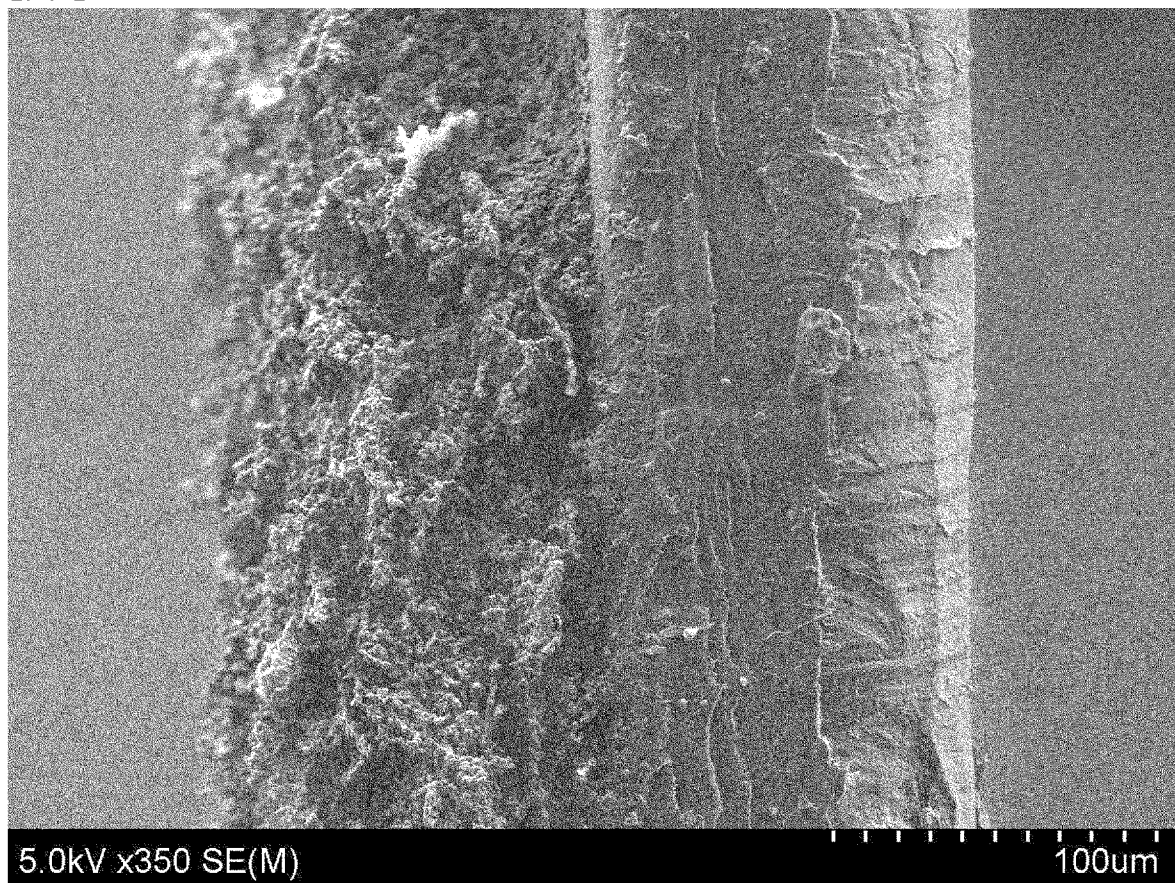
[図1]



[図2]



[図3]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/069343

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/543(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2013-195403 A (Tanaka Kikinzoku Kogyo Kabushiki Kaisha), 30 September 2013 (30.09.2013), claims; paragraph [0040]; fig. 1 & US 2015/0118675 A1 fig. 1; paragraph [0116]; claims & WO 2013/141122 A1 fig. 1; paragraph [0116]; claims & EP 2829879 A1 & TW 201400815 A & CN 104204802 A & KR 10-2014-0137367 A	1-10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
07 September 2016 (07.09.16)

Date of mailing of the international search report
20 September 2016 (20.09.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/069343

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2009/136476 A1 (Panasonic Corp.), 12 November 2009 (12.11.2009), claim 2; paragraphs [0026], [0066], [0067], [0076], [0079] & EP 2273269 A1 paragraphs [0026], [0066], [0067], [0076], [0079] & US 2011/0045578 A1	1-10
Y	JP 2014-62820 A (Toyo Roshi Kaisha, Ltd.), 10 April 2014 (10.04.2014), paragraphs [0015], [0040], [0043] (Family: none)	1-10
Y	JP 2014-167439 A (Asahi Kasei Corp.), 11 September 2014 (11.09.2014), paragraph [0033] (Family: none)	1-10
Y	JP 2008-197038 A (Fujifilm Corp.), 28 August 2008 (28.08.2008), claim 1; paragraphs [0007], [0008] (Family: none)	1-10
Y	WO 2013/088883 A1 (Konica Minolta, Inc.), 20 June 2013 (20.06.2013), paragraph [0006] (Family: none)	1-10
Y	JP 2013-228308 A (Konica Minolta, Inc.), 07 November 2013 (07.11.2013), abstract; paragraphs [0006], [0007], [0045] (Family: none)	1-10
A	JP 5567932 B2 (Tanaka Kikinzoku Kogyo Kabushiki Kaisha), 06 August 2014 (06.08.2014), paragraphs [0004], [0010], [0011], [0013] & EP 2602619 A1 paragraphs [0004], [0010], [0012], [0014] & US 2013/0137192 A1 & WO 2012/018057 A1 & CN 103052884 A	1-10
A	WO 2014/122094 A1 (WHATMAN GMBH), 14 August 2014 (14.08.2014), claim 1; page 2, lines 4 to 10 & JP 2016-507061 A & US 2015/0377872 A1 & EP 3001820 A1 & CN 105120991 A	1-10
A	JP 2004-245831 A (Denka Seiken Co., Ltd.), 02 September 2004 (02.09.2004), paragraphs [0034], [0052], [0062] (Family: none)	1-10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/069343

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2005-221473 A (Olympus Corp.), 18 August 2005 (18.08.2005), paragraph [0031] (Family: none)	1-10

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/543(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/543

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2013-195403 A (田中貴金属工業株式会社) 2013.09.30, [特許請求の範囲] [0040] [図1] & US 2015/0118675 A1 (Fig.1 [0116] Claims) & WO 2013/141122 A1 (Fig.1 [0116] Claims) & EP 2829879 A1 & TW 201400815 A & CN 104204802 A & KR 10-2014-0137367 A	1-10
Y	WO 2009/136476 A1 (パナソニック株式会社) 2009.11.12, [請求項2] [0026] [0066] [0067] [0076] [0079] & EP 2273269 A1 ([0026] [0066] [0067] [0076] [0079]) & US 2011/0045578 A1	1-10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

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

07.09.2016

国際調査報告の発送日

20.09.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

三木 隆

2 J

3312

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2014-62820 A (東洋濾紙株式会社) 2014. 04. 10, [0015] [0040] [0043] (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2014-167439 A (旭化成株式会社) 2014. 09. 11, [0033] (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2008-197038 A (富士フイルム株式会社) 2008. 08. 28, [請求項1] [0007] [0008] (ファミリーなし)	1-10
Y	WO 2013/088883 A1 (コニカミノルタ株式会社) 2013. 06. 20, [0006] (ファミリーなし)	1-10
Y	JP 2013-228308 A (コニカミノルタ株式会社) 2013. 11. 07, [要約] [0006] [0007] [0045] (ファミリーなし)	1-10
A	JP 5567932 B2 (田中貴金属工業株式会社) 2014. 08. 06, [0004] [0010] [0011] [0013] & EP 2602619 A1 ([0004] [0010] [0012] [0014]) & US 2013/0137192 A1 & WO 2012/018057 A1 & CN 103052884 A	1-10
A	WO 2014/122094 A1 (WHATMAN GMBH) 2014. 08. 14, C l a i m 1 2 ページ4行～10行 & JP 2016-507061 A & US 2015/0377872 A1 & EP 3001820 A1 & CN 105120991 A	1-10
A	JP 2004-245831 A (デンカ生研株式会社) 2004. 09. 02, [0034] [0052] [0062] (ファミリーなし)	1-10
A	JP 2005-221473 A (オリンパス株式会社) 2005. 08. 18, [0031] (ファミリーなし)	1-10