

(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  
2021年7月1日(01.07.2021)



(10) 国際公開番号

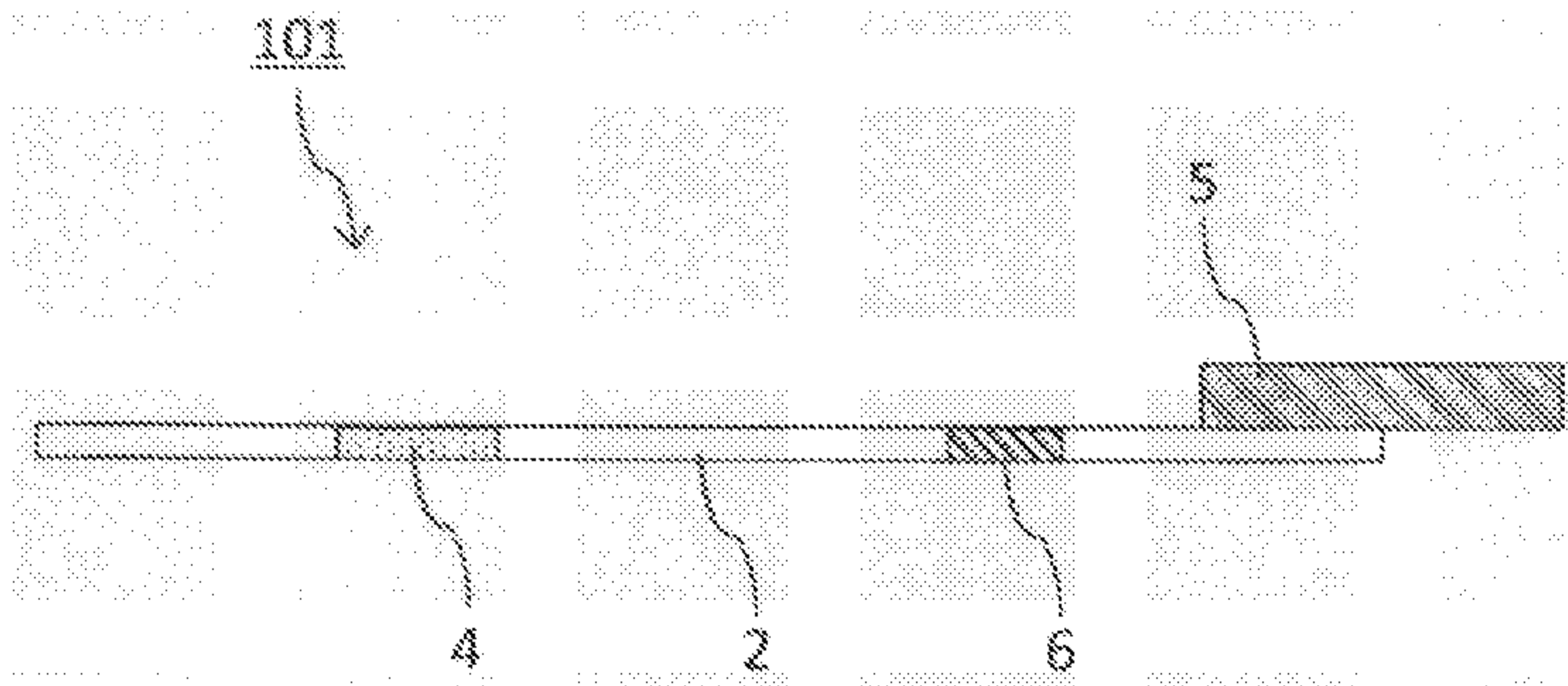
WO 2021/132470 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/543 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2020/048473
- (22) 国際出願日: 2020年12月24日(24.12.2020)
- (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 2019-234034 2019年12月25日(25.12.2019) JP
- (71) 出願人: 富士レビオ株式会社 (FUJIREBIO INC.) [JP/JP]; 〒1630410 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 廣瀬 遼 (HIROSE Ryo); 〒1630410 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内 Tokyo (JP). 石川 直樹 (ISHIKAWA Naoki); 〒1920031 東京都八王子市小宮町5-1番地 株式会社先端生命科学研究室内 Tokyo (JP). 吉永 貴治 (YOSHINAGA Takaharu); 〒1630410 東京都新宿区西新宿二丁目1番1号 富士レビオ株式会社内 Tokyo
- (74) 代理人: 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所 (CENTCREST IP ATTORNEYS); 〒1040031 東京都中央区京橋2-8-21 喜久家ビル9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, 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,

(54) Title: IMMUNOCHROMATOGRAPHIC STRIP, IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DEVICE, IMMUNOCHROMATOGRAPHIC KIT, AND METHOD FOR DETECTING TEST SUBSTANCE

(54) 発明の名称: イムノクロマト用ストリップ、イムノクロマト用装置、イムノクロマト用キット、及び被検物質検出方法

[図2]



(57) Abstract: An immunochromatographic strip for use in detecting a test substance in a sample by immunochromatography, said strip comprising a labeled-body-containing section that contains a blocked labeled antibody in which a labeling substance and an antibody capable of binding to the test substance are immobilized on a water-soluble carrier composed of a water-soluble polymer.

(57) 要約: 試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出するために用いるストリップであり、標識物質と被検物質に結合可能な抗体とが水溶性高分子からなる水溶性担体に固定されたブロック化標識抗体を含有する標識体含有部を備える、イムノクロマト用ストリップ。

WO 2021/132470 A1

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

添付公開書類：

- 一 国際調査報告 (条約第21条(3))

## 明 細 書

発明の名称：

イムノクロマト用ストリップ、イムノクロマト用装置、イムノクロマト用キット、及び被検物質検出方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、イムノクロマト用ストリップ、イムノクロマト用装置、イムノクロマト用キット、及び被検物質検出方法に関し、より詳しくは、イムノクロマト用ストリップ、それを備えるイムノクロマト用装置、これらのうちの少なくともいずれかを含むイムノクロマト用キット、並びに、これらのうちの少なくともいずれかを用いる被検物質検出方法に関する。

### 背景技術

[0002] 感染症の陽性・陰性判定やその原因を特定するためには、対象より採取した試料中から細菌やウイルス等の病原体を検出することが必要である。また、特定の疾患の陽性・陰性判定のために、当該疾患のマーカとなる物質を血液等の試料中から検出することも知られている。このような病原体やマーカ等の被検物質を検出する方法としては、抗原抗体反応を利用した免疫測定法が知られている。

[0003] 前記免疫測定法としては、例えば、ELISA等の固相に固定した抗体に被検物質を捕捉させた後、酵素標識した抗体を2次反応させて酵素活性を測定する方法が知られており、従来から多くの検討がなされている。例えば、国際公開第2006/070732号（特許文献1）には、これらの方法による検出感度を向上させることを目的として、特定分子量の担体が酵素を介して結合し、当該担体に酵素が結合した複合体に、プローブ分子が結合したブロック化酵素プローブ複合体を用いることが記載されている。

[0004] 他方、前記免疫測定法の中でも、簡易かつ迅速な検出方法として、イムノクロマト法が知られている。前記イムノクロマト法としては、例えば、試料中の被検物質に結合可能な抗体を固定した多孔性メンブレンからなるイムノ

クロマト用ストリップ（試験片）の一端から試料を展開させ、その展開の過程で、前記被検物質に対して特異的に結合可能な標識体（被検物質に対して特異的に結合可能、かつ、標識された物質（標識抗体等））と当該被検物質との複合体を形成させ、上記の多孔性メンブレンに固定化した抗原や抗体等によって間接的又は直接的に前記複合体を捕捉し、当該被検物質を検出する方法が挙げられる。かかる方法は、試料を前記イムノクロマト用ストリップに塗布又は滴下し、前記多孔性メンブレン上で当該試料や前記複合体等を毛细管現象によって展開させるだけで前記試料中の被検物質を検出することができるため、操作が簡単である。また、短時間で被検物質の検出が可能であり、目視判定も可能であることから、研究上の試験や臨床検査において広く利用されている。

[0005] このようなイムノクロマト技術としては、例えば、特開2015-1395号公報（特許文献2）に、かかる方法による検出感度を向上させることを目的として、特定粘度の水溶性多糖類を含み、かつ、平均粒子径が1nm以上60nm以下の担体で標識化された検出試薬を含むイムノクロマト用展開液を用いることが記載されている。また、アルカリホスファターゼ（ALP）標識抗体がメンブレン上にセットされた「エスプライン（登録商標）」が、インフルエンザウイルス抗原、HIV抗原等の検出用試薬として、富士レビオ株式会社より製造販売されている。

## 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：国際公開第2006/070732号

特許文献2：特開2015-1395号公報

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 本発明者らが試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出する方法についてさらなる検討を行ったところ、ALP標識抗体等の従来の標識抗体を用

いた検出方法では検出感度が未だ十分ではなく、試料中における被検物質の濃度が低い場合には、当該被検物質を検出できない、すなわち、検出されるシグナル強度が弱い（結果が陰性になる）ケースがあることを見出した。また、この場合には、標識物質の濃度や抗体の濃度を高くすることで検出されるシグナル強度を強くすることは可能であるが、それに伴ってバックグラウンドのシグナル強度も強くなるため、検出感度を高めることは困難である。

[0008] 本発明は上記課題に鑑みてなされたものであり、被検物質の濃度が低くとも高感度で当該被検物質の検出が可能なイムノクロマト用ストリップ、それを備えるイムノクロマト用装置、これらのうちの少なくともいずれかを含むイムノクロマト用キット、並びに、被検物質の濃度が低くとも高感度でイムノクロマトにより当該被検物質の検出が可能な被検物質検出方法を提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0009] 本発明者らは、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、試料中の被検物質をイムノクロマトで検出するために用いるストリップに含有させる標識体として、標識物質と被検物質に結合可能な抗体とが水溶性高分子からなる水溶性担体に固定されたブロック化標識抗体を用いることにより、試料中の被検物質の濃度が低くとも、バックグラウンドのシグナル強度を強くすることなく、高感度で当該被検物質の検出が可能となることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0010] すなわち、本発明は、イムノクロマト用ストリップ、それを備えるイムノクロマト用装置、これらを含むイムノクロマト用キット、並びに、これらを用いる被検物質検出方法に関し、より詳しくは、以下を提供するものである。

[1]

試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出するために用いるストリップであり、標識物質と被検物質に結合可能な抗体とが水溶性高分子からなる水溶性担体に固定されたブロック化標識抗体を含有する標識体含有部を備え

る、イムノクロマト用ストリップ。

[2]

前記ブロック化標識抗体の平均粒子径が50nm以上である、[1]に記載のイムノクロマト用ストリップ。

[3]

前記水溶性高分子が糖類及びアミノ酸類からなる群から選択される少なくとも1種である、[1]又は[2]に記載のイムノクロマト用ストリップ。

[4]

前記ブロック化標識抗体に結合した被検物質を補足可能な捕捉体が固定された捕捉体固定部をさらに備える、[1]～[3]のうちのいずれかに記載のイムノクロマト用ストリップ。

[5]

試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出するために用いる装置であり、[1]～[4]のうちのいずれかに記載のイムノクロマト用ストリップを備える、イムノクロマト用装置。

[6]

試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出するために用いるキットであり、[1]～[4]のうちのいずれか1項に記載のイムノクロマト用ストリップ及び[5]に記載のイムノクロマト用装置からなる群から選択される少なくとも1種を含む、イムノクロマト用キット。

[7]

試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出する方法であり、  
標識物質と被検物質に結合可能な抗体とが水溶性高分子からなる水溶性担体に固定されたブロック化標識抗体を含有する標識体含有部を備えるイムノクロマト用ストリップにおいて、

試料と前記ブロック化標識抗体とを接触させ、前記試料中の被検物質と前記ブロック化標識抗体との複合体を形成させる標識工程と、

前記複合体を捕捉する捕捉工程と、

捕捉された複合体を検出する検出工程と、  
を含む、被検物質検出方法。

[8]

前記ブロック化標識抗体の平均粒子径が50nm以上である、[7]に記載の被検物質検出方法。

[9]

前記水溶性高分子が糖類及びアミノ酸類からなる群から選択される少なくとも1種である、[7]又は[8]に記載の被検物質検出方法。

[10]

前記免疫クロマト用ストリップが、前記ブロック化標識抗体に結合した被検物質を補足可能な捕捉体が固定された捕捉体固定部をさらに備えるストリップであり、かつ、前記捕捉工程が、前記捕捉体固定部において前記ブロック化標識抗体に結合した被検物質を介して前記複合体を捕捉する工程である、[7]～[9]のうちのいずれかに記載の被検物質検出方法。

[0011] なお、本発明の構成によって上記目的が達成される理由は必ずしも定かではないが、本発明者らは以下のように推察する。すなわち、本発明の免疫クロマト用ストリップの標識体含有部に含有させるブロック化標識抗体においては、標識物質と被検物質に結合可能な抗体とが、水溶性高分子からなる水溶性担体に固定されているため、複数の標識物質及び抗体が高分子である前記水溶性担体によって一連となった複合体を形成する。そのため、例えばこれが被検物質と前記抗体を介して免疫複合体を形成し、免疫クロマト用ストリップの捕捉体固定部に捕捉された場合には、標識物質及び抗体のみからなる標識抗体を用いた場合に比べて、当該捕捉体固定部に捕捉される標識物質の量が結果としてより多くなる。免疫クロマトにおいて、被検物質の検出は捕捉体固定部に捕捉される標識物質に由来するシグナルを確認することで行うため、このように捕捉体固定部に捕捉される標識物質の量を従来よりも多くすることが可能な本発明の免疫クロマト用ストリップを用いることにより、前記シグナル強度を十分に強くせしめ、検出感度をより高くする

ことができるものと本発明者らは推察する。

## 発明の効果

[0012] 本発明によれば、被検物質の濃度が低くとも高感度で当該被検物質の検出が可能なイムノクロマト用ストリップ、それを備えるイムノクロマト用装置、これらのうちの少なくともいずれかを含むイムノクロマト用キット、並びに、被検物質の濃度が低くとも高感度でイムノクロマトにより当該被検物質の検出が可能な被検物質検出方法を提供することが可能となる。

## 図面の簡単な説明

[0013] [図1]本発明のイムノクロマト用ストリップの一実施形態を示す模式平面図である。

[図2]本発明のイムノクロマト用ストリップの一実施形態を示す模式断面図である。

[図3]本発明のイムノクロマト用装置の主要部の一実施形態を示す模式断面図である。

[図4]本発明のイムノクロマト用装置の一実施形態を示す模式平面図である。

[図5]本発明のイムノクロマト用装置の一実施形態を示す模式断面図である。

## 発明を実施するための形態

[0014] 以下、本発明をその好適な実施形態に即して詳細に説明する。

[0015] 本発明のイムノクロマト用ストリップは、試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出するために用いるストリップであり、標識物質と被検物質に結合可能な抗体とが水溶性高分子からなる水溶性担体に固定されたブロック化標識抗体を含有する標識体含有部を備えるものである。

[0016] (被検物質)

本発明において、検出される「被検物質」としては、特に制限されず、細菌、原生生物、真菌、ウイルス等の病原体、及びこれらに由来する糖鎖等の物質；特定の疾患のマーカとなる物質が挙げられ、より具体的には、前記病原体、タンパク質、多糖類、核酸等が挙げられる。前記病原体としては、例えば、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）、インフルエンザウイルス（A型

、B型等)、ジカウイルス、HBV (B型肝炎ウイルス) 等が挙げられるが、これらに限定されるものではない。

[0017] (試料)

本発明において、被検物質の検出に用いられる「試料」としては、前記被検物質が存在し得る試料である限り特に制限はない。前記試料としては、例えば、対象 (例えば、哺乳動物、好ましくはヒト) から採取された全血、血清、血漿、尿、便、粘膜分泌液 (喀痰、咽頭ぬぐい液、鼻腔ぬぐい液、唾液、耳漏) 等の検体を挙げることができるが、これらに限定されるものではない。前記試料としては、水性試料であることが好ましく、水溶液又は水分散液であることがより好ましく、必要に応じて、前記検体を希釈液で希釈したり、各種前処理液で処理したり、ろ過フィルターでろ過したもの等であってもよい。前記希釈液としては、例えば緩衝液が挙げられ、前記緩衝液としては、目的の抗原抗体反応に好適なpHに調節可能な緩衝液、より具体的には、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、グッド緩衝液、ホウ酸緩衝液等が挙げられる。前記前処理液としては、例えば界面活性剤が挙げられる。

[0018] (検出)

本発明において、「被検物質の検出」には、被検物質の存在の有無を確認する検出、及び被検物質の量の定量又は半定量が含まれる。本発明において、被検物質の検出は、標識物質に由来するシグナルを検出し、必要に応じてその強度を定量することによって行われ、また、必要に応じて、その検出の成否は、下記の展開確認ゾーンのシグナルを検出することによって判定するが、前記「シグナル」には、呈色 (発色)、反射光、発光、蛍光、放射性同位体による放射線等が含まれ、肉眼で確認できるものの他、シグナルの種類に応じた検出方法・装置によって確認できるものも含まれる。

[0019] (ブロック化標識抗体)

本発明において、「ブロック化標識抗体」とは、水溶性高分子からなる水溶性担体と、標識物質と、前記被検物質に結合可能な抗体と、を備え、かつ、前記標識物質及び前記抗体が前記水溶性担体に固定されている複合体であ

り、前記標識物質と前記抗体と前記水溶性担体とが互いに直接的又は間接的に結合した結合体である。本発明のブロック化標識抗体としては、水溶性担体1分子に対して、複数の標識物質及び／又は複数の抗体が結合している。

[0020] 本発明のブロック化標識抗体においては、前記水溶性担体に標識物質及び抗体が担持されていればよく、水溶性担体に標識物質及び抗体が互いに独立して結合していても、水溶性担体、標識物質及び抗体のいずれもが他の2者と結合していても、水溶性担体に標識物質又は抗体を介して他方の抗体又は標識物質が結合していてもよい。

[0021] 〔水溶性担体〕

本発明のブロック化標識抗体に含まれる水溶性担体は、主に前記標識物質及び抗体を担持する担体として機能するものであり、水溶性高分子からなる。本発明に係る水溶性担体を構成する水溶性高分子としては、前記標識物質及び抗体を固定させて担持できる水溶性高分子である限り特に制限はない。本発明において、「水溶性高分子」とは、常温常圧下で水に対する溶解度が0.01g/mLを超える高分子、好ましくは0.05g/mL以上である高分子、より好ましくは0.1g/mL以上である高分子を示す。

[0022] 本発明に係る水溶性高分子としては、重量平均分子量（ゲル濾過クロマトグラフィー（GFC）による分子量マーカでの検量による重量平均分子量、以下同じ）が、検出の感度の観点及び水溶性であるという観点から、30,000～1,000,000であることが好ましく、より好ましい平均粒子径のブロック化標識抗体を得られる傾向にある観点から、50,000～500,000であることがより好ましく、70,000～250,000であることがさらに好ましい。

[0023] また、本発明に係る水溶性高分子としては、平均質量（ゲル濾過クロマトグラフィー（GFC）によるマーカでの検量による平均質量、以下同じ）が、より好ましい平均粒子径のブロック化標識抗体を得られる傾向にある観点から、50,000～500,000Daであることも好ましく、70,

000～250, 000Daであることもより好ましい。

[0024] 本発明に係る水溶性高分子としては、例えば、デキストラン、アミノデキストラン、フィコール（商品名）、デキストリン、アガロース、プルラン、各種セルロース（例えば、ヘミセルロースやリグリン）、キチン、キトサン、及びこれらの修飾体（例えば、ヒドラジン化デキストラン）等の糖類； $\beta$ -ガラクトシダーゼ、サイログロブリン等のタンパク質類；ポリペプチド；DNA；ヘモシアニン；ポリリジン等のアミノ酸類が挙げられ、これらのうちの1種を単独であっても2種以上の組み合わせであってもよい。これらの中でも、本発明に係る水溶性高分子としては、免疫原性がより低い、イオン性がより弱い、より親水性であるといった観点から、前記糖類及びアミノ酸類からなる群から選択される少なくとも1種であることが好ましく、デキストラン、アミノデキストラン、フィコール（商品名）、デキストリン、アガロース、プルラン、親水性セルロース、及びこれらの修飾体等の糖類；並びに、ポリリジン等のアミノ酸類からなる群から選択される少なくとも1種であることがより好ましい。さらに、ブロック化標識抗体をより製造しやすい、ブロック化標識抗体の平均粒子径をより制御しやすい、ブロック化標識抗体の展開不良がより生じにくい、展開の際に乾燥状態から復元しやすいために測定感度をより一定に維持することができる等の観点から、デキストランであることがさらに好ましい。

[0025] 〔標識物質〕

本発明のブロック化標識抗体に含まれる標識物質は、主に前記ブロック化標識抗体の標識として機能するものであり、公知の免疫測定法において標識物質として用いられているものを特に制限なく用いることができる。

[0026] 本発明に係る標識物質としては、例えば、酵素；放射性同位元素；アクリジニウム誘導体等の発光物質；ユーロピウム等の蛍光物質；アロフィコシアニン（APC）及びフィコエリスリン（R-PE）等の蛍光蛋白質；フルオレセインイソチオシアネート（FITC）及びローダミンイソチオシアネート（RITC）等の低分子量標識物質；金粒子；アビジン；ビオチン；ラテ

ックス；ジニトロフェニル（DNP）；ジゴキシゲニン（DIG）が挙げられ、これらのうちの1種を単独であっても2種以上の組み合わせであってもよい。これらの中でも、本発明に係る標識物質としては、ブロック化標識抗体の展開不良がより生じにくい、目視による検出がより容易であるという観点から、酵素であることが好ましい。前記標識物質として酵素を用いた場合には、発色基質、蛍光基質、化学発光基質等を基質として用いることにより、前記基質に応じて種々の検出を行うことができる。

[0027] 前記酵素としては、従来から酵素免疫測定法に用いられる各種酵素を挙げることができるが、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ（ALP）、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ（ $\beta$ -gal）、グルコースオキシダーゼ、ルシフェラーゼを挙げることができるが、これらに限定されるものではない。また、前記放射性同位元素としては、例えば、ヨウ素、トリチウム、炭素等の同位元素を挙げることができるが、例えばボルトンハンター試薬等を用いて行う方法を用いて標識することができる。

[0028] 〔抗体〕

本発明のブロック化標識抗体に含まれる「被検物質に結合可能な抗体」とは、前記被検物質と結合可能であり、当該被検物質を捕捉可能な抗体である。前記抗体としては、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。また、本発明において、「抗体」には、完全な抗体の他、抗体断片（例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、単鎖抗体、ダイアボディー等）や抗体の可変領域を結合させた低分子化抗体も含まれる。これらの中でも、本発明のブロック化標識抗体に含まれる抗体としては、ブロック化標識抗体の展開不良がより生じにくい、ブロック化標識抗体の平均粒子径をより制御しやすい、という観点から、抗体断片であることが好ましい。

[0029] 前記抗体は、前記被検物質の種類等に応じて、従来公知の産生方法を適宜採用、改良することによって産生することができ、また、一般に流通されているものを適宜用いてもよい。

## [0030] [ブロック化標識抗体の構成]

本発明のブロック化標識抗体において、前記標識物質の含有量としては特に制限されないが、検出感度をより向上させるために、前記水溶性高分子1分子に結合する標識物質の分子数ができるだけ多くなるように設定することが好ましく、例えば、前記標識物質が酵素である場合、前記水溶性高分子の質量（前記水溶性高分子が2種以上の組み合わせである場合にはそれらの合計、以下同じ）100質量部に対する標識物質の質量（標識物質が2種以上の組み合わせである場合にはそれらの合計）が、200～1,000質量部であることが好ましく、300～800質量部であることがより好ましい。

[0031] 本発明のブロック化標識抗体において、抗体の含有量としては特に制限されないが、検出感度をより向上させるために、前記水溶性高分子1分子に結合する抗体の分子数ができるだけ多くなるように設定することが好ましく、例えば、前記水溶性高分子の質量100質量部に対する抗体の質量（抗体が2種以上の組み合わせである場合にはそれらの合計）が、400～20,000質量部であることが好ましく、500～1,500質量部であることがより好ましい。

[0032] また、本発明のブロック化標識抗体としては、ブロック化標識抗体1分子あたりの重量平均分子量が、1,000,000～3,000,000であることが好ましく、1,500,000～2,600,000であることがより好ましい。前記重量平均分子量が前記下限未満である場合には、検出感度が低下する傾向にあり、他方、前記上限を超える場合には、検出感度が向上する一方で、水溶液中において凝集等を生じやすくなる傾向にある。

[0033] また、本発明のブロック化標識抗体としては、抗体を除いた複合体、すなわち、前記水溶性担体に標識物質が固定された複合体（以下、場合により「標識担体」という）の平均粒子径が35nm以上であることが好ましく、40～185nmであることがより好ましく、50～135nmであることがさらに好ましく、60～125nmであることが特に好ましい。前記標識担体の平均粒子径が前記下限未満であると、検出感度が低下する傾向にあり、

他方、前記上限を超えるとブロック化標識抗体の展開不良が生じやすくなる傾向にある。

[0034] また、本発明のブロック化標識抗体としては、例えば前記抗体が抗体断片（好ましくは、最長径が15nm以上）である場合に、その平均粒子径が50nm以上であることが好ましく、55～200nmであることがより好ましく、65～150nmであることがさらに好ましく、75～140nmであることが特に好ましい。前記ブロック化標識抗体の平均粒子径が前記下限未満であると、検出感度が低下する傾向にあり、他方、前記上限を超えるとブロック化標識抗体の展開不良が生じやすくなる傾向にある。

[0035] 前記標識担体及びブロック化標識抗体の平均粒子径は、バッファー（0.1M リン酸バッファー（pH7.0）若しくは0.1M Tris-HClバッファー（pH8.0））中における濃度が0.07～0.8mg/mLである標識担体液又はブロック化標識抗体液について、ゼータ電位・粒径・分子量測定システム（ELS Z-2000 ZS、大塚電子株式会社製）を用い、同システムにデフォルトで搭載された条件にて測定及び解析を行うことにより、それぞれ得られる平均粒子径である。前記測定及び解析の具体的な条件の詳細としては、下記の実施例に記載のとおりである。なお、本発明において、標識担体及びブロック化標識抗体の粒子径には、それぞれ、一次粒子及びこれらが凝集してなる二次粒子（凝集体）の粒子径を含む。

[0036] 前記標識担体及びブロック化標識抗体の平均粒子径は、例えば、前記水溶性高分子として適当な分子量又は質量の水溶性高分子を用いることや、前記水溶性高分子を修飾すること、或いは、例えば前記水溶性高分子がデキストランである場合には、その酸化条件（酸化剤濃度、酸化時間等）を調整すること等によって調整することができる。

[0037] 〔ブロック化標識抗体の製造方法〕

本発明のブロック化標識抗体は、前記水溶性担体に前記標識物質及び抗体を固定することによって製造することができる。かかる製造方法としては、適宜従来公知の方法又はそれに準じた方法を採用することができ、前記水溶

性担体に、前記標識物質及び抗体（以下、場合により「被担持物質」と総称する）をそれぞれ直接固定してもよく、間接的に固定してもよい。

[0038] 前記被担持物質を前記水溶性担体に直接固定する方法としては、例えば、前記被担持物質及び／又は水溶性高分子に、カルボキシ基、エポキシ基、トシル基、アミノ基、ヒドロキシ基、イソチオシアネート基、イソシアネート基、アジド基、アルデヒド基、カーボネート基、アリル基、アミノオキシ基、マレイミド基、チオール基等の活性基を付与し、或いは、前記被担持物質及び／又は水溶性担体として前記活性基を有するものを用い、当該活性基と前記被担持物質及び／又は水溶性高分子との共有結合によって固定する方法が挙げられる。前記活性基を付与した被担持物質及び水溶性高分子としては、それぞれ、市販のものをそのまま用いてもよいし、適切な反応条件で被担持物質及び水溶性高分子表面に前記活性基を導入して調製してもよい。一例として、チオール基の導入は、例えば、S-アセチルメルカプト無水コハク酸やN-スクシンイミジル3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート、2-イミノチオラン塩酸塩等の市販の試薬を用いて行うことができ、アミノ基へのマレイミド基の導入は、例えば、N-(6-マレイミドカプロイルオキシ)スクシンイミドやN-(4-マレイミドブチリロキシ)スクシンイミド等の市販の試薬を用いて行うことができる。ピリジルジスルフィド基の導入は、例えば、N-Succinimidyl 3-(2-pyridyl dithio) propionate (SPDP) やN-{6-[3-(2-Pyridyl dithio) propionamido] hexanoyloxy} sulfosuccinimide、sodium salt (Sulfo-AC5-SPDP) 等の市販の試薬を用いて行うことができる。

[0039] また、前記被担持物質を前記水溶性担体に間接的に固定する方法としては、例えば、ポリヒスチジン、ポリエチレングリコール、システイン及び／又はリジンを含むオリゴペプチド、前記活性基を有するリンカー分子（例えば、ヒドラジン塩、ヒドラジド、AMAS (N- $\alpha$ -maleimidoac

et-oxysuccinimide ester)、BMPS (N- $\beta$ -maleimidopropyl-oxysuccinimide ester)、GMBS (N- $\gamma$ -maleimidobutryl-oxysuccinimide ester)、MBS (m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimide ester)、SMCC (succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate)、EMCS (N- $\epsilon$ -maleimidocaproyl-oxysuccinimide ester)、SMPB (succinimidyl 4-(p-maleimidophenyl)butyrate)、SMPH (succinimidyl 6-((beta-maleimidopropionamido)hexanoate))、LC-SMCC (succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxy-(6-amidocaproate))、Sulfo-KMUS (N- $\kappa$ -maleimidoundecanoyl-oxysulfosuccinimide ester)、SIA (succinimidyl iodoacetate)、SBAP (succinimidyl 3-(bromoacetamido)propionate)、SIAB (succinimidyl (4-iodoacetyl)aminobenzoate)、Sulfo-SANPAH (sulfosuccinimidyl 6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino)hexanoate)、SDA (NHS-Diazirine) (succinimidyl 4,4'-azipentanoate)、Sulfo-SDAD (Sulfo-NHS-SS-Diazirine) (sulfosuccinimidyl 2-((4,4'-azipentanamido)ethyl)-1,3'-dithiopropionate)、EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hyd

rochloride)、NHS (N-hydroxysuccinimide)、BMPH (N- $\beta$ -maleimidopropionic acid hydrazide)、EMCH (N- $\epsilon$ -maleimidocaproic acid hydrazide)、MPBH (4-(4-N-maleimidophenyl)butyric acid hydrazide)、KMUH (N- $\kappa$ -maleimidoundecanoic acid hydrazide)、PDPH (3-(2-pyridyldithio)propionyl hydrazide)、PMPH (p-maleimidophenyl isocyanate)、及びSPB (succinimidyl-[4-(psoralen-8-yloxy)]-butyrate)等のリンカーを介して固定する方法が挙げられる。前記リンカーの選択及びその大きさは、前記被担持物質及び／又は水溶性高分子との結合の強さや前記被担持物質を前記水溶性担体に固定化したことによる立体障害等を考慮して適宜設定することができる。

[0040] 本発明のブロック化標識抗体の製造方法においては、前記水溶性担体に前記標識物質及び抗体を一度に固定しても、これらを別々に順次固定してもよいが、製造のしやすさ、並びに、標識物質及び抗体量の制御しやすさの観点からは、前記水溶性担体にいずれか一方（より好ましくは標識物質）を固定してから他方（より好ましくは抗体）を固定することが好ましい。

[0041] かかる製造方法としては、特に制限されず、例えば、下記の実施例に記載のように、前記標識物質が酵素である場合、先ず、前記水溶性高分子を過ヨウ素酸ナトリウム (NaIO<sub>4</sub>) のような酸化剤で酸化してアルデヒド基を付与し、ヒドラジン塩酸塩と反応させた後、これをジメチルアミンボラン (DMAB) 等の還元剤と反応させてヒドラジン化する。一方、前記酵素も過ヨウ素酸ナトリウムのような酸化剤で酸化してアルデヒド基を付与させる。次いで、当該アルデヒド基と上記で前記水溶性高分子に付与したヒドラジン残基とを反応させてヒドラゾン結合させ、水溶性高分子-酵素結合体（標識担体）を得る。次いで、得られた水溶性高分子-酵素結合体をクロスリンカー

(例えば、s u l f o - E M C S等)で処理し、マレイミド基を導入する。また、チオール化試薬で抗体にチオール基を付与させ(チオール化)、前記水溶性高分子-酵素結合体に導入したマレイミド基と結合させることにより、水溶性高分子(水溶性担体)-酵素-抗体の三者を共有結合させることができる。これらの反応に供する水溶性高分子、標識物質、及び抗体の比率は、それぞれ、上記のブロック化標識抗体における各含有量の好ましい範囲を達成するように適宜選択することができる。

[0042] (イムノクロマト用ストリップ、イムノクロマト用装置)

イムノクロマト法は、ストリップ(試験片)の一端又は一点から試料を展開させ、その展開の過程で、抗原抗体反応によって被検物質を検出する免疫測定方法である。本発明のイムノクロマト用ストリップは、前記ブロック化標識抗体を含有する標識体含有部を備えるものである。また、本発明のイムノクロマト用装置は、本発明のイムノクロマト用ストリップを備えるものである。

[0043] 以下、本発明のイムノクロマト用ストリップ及びイムノクロマト用装置の好ましい形態について、図面を参照しながら例を挙げて詳細に説明するが、本発明はこれに限定されるものではない。なお、以下の説明及び図面中、同一又は相当する要素には同一の符号を付し、重複する説明は省略する。

[0044] 図1は、本発明のイムノクロマト用ストリップの一実施形態(イムノクロマト用ストリップ101)の概略模式平面図であり、図2は、その断面図である。また、図3は、本発明のイムノクロマト用装置の主要部の一実施形態(イムノクロマト用装置102)を示す概略模式断面図である。さらに、図4は、本発明のイムノクロマト用装置の一実施形態を示す概略模式平面図であり、図5は、その断面図である。図1~5において、イムノクロマト用ストリップは、ラテラルフロー式イムノクロマトグラフ用ストリップである。以下の説明において、マトリクス2の吸収ゾーン5側を下流(すなわち、試料の展開方向(図3では展開方向14)の下流側)その逆側を上流(すなわち、試料の展開方向(図3では展開方向14)の上流側)とする。

## [0045] [マトリクス]

本発明のイムノクロマト用ストリップは、少なくとも前記ブロック化標識抗体を含有する標識体含有部（例えば、標識体含有部4）と、標識体含有部4を有するマトリクス（例えば、マトリクス2）とを備える。

[0046] 本発明に係るマトリクスは、イムノクロマトグラフ媒体（固定相）として機能する不溶性担体である。また、前記マトリクスは、イムノクロマト用ストリップの本体として、標識体含有部、及び必要に応じて下記の捕捉体固定部や展開確認ゾーン等を有する抗体含有メンブレンでもある。

[0047] 本発明に係るマトリクスとしては、多孔性膜であることが好ましく、例えば、ニトロセルロース膜、ニトロセルロース混合エステル膜、セルロース膜、アセチルセルロース膜、ポリスルホン膜、ポリエーテルスルホン膜、ナイロン膜、ガラス繊維、不織布、布が挙げられ、これらの中でも、標識体含有部、及び必要に応じて下記の捕捉体固定部や基質ゾーンをより作製し易い傾向にある観点から、ニトロセルロース膜が好ましい。なお、かかるマトリクスに展開される試料の移動速度は、当該多孔性膜の材質、大きさ、孔径、及び分布等により変更することができ、被検物質の種類や濃度、検出目的等に応じて、適宜調整することができる。

[0048] 前記マトリクスのサイズとしては、特に制限はないが、例えば、幅3～10mm、長さ30～100mm程度のストリップ（細長い片）状とすることができる。前記マトリクスの厚さとしても特に制限はないが、例えば、100μm～1mmの範囲が挙げられる。

## [0049] [標識体含有部]

本発明に係る標識体含有部は、前記ブロック化標識抗体（以下、場合により単に「標識体」という）を溶出可能に保持する標識体保持部として機能する。前記標識体含有部としては、図1～2に示す標識体含有部4のようにマトリクス2と一体であっても、図3に示すように、標識体含有パッド4aとして別個の吸水性材料に対して前記標識体が溶出可能に保持され、これがマトリクス2の標識体ゾーン4bに積層されたものであってもよい。この場合

、標識体含有パッド4 aは、滴下又は塗布された試料を受容する試料供給部としても機能させることができる。前記吸水性材料としては多孔性材料であることが好ましく、例えば前記多孔性膜を挙げるることができる。

[0050] 標識体保持部のサイズとしては特に制限はないが、例えば、幅1～10 mm、長さ3～30 mmの範囲が挙げられ、標識体含有パッドの厚さとしては、例えば0.3～2 mmの範囲が挙げられる。

[0051] 本発明に係る標識体含有部に前記標識体を保持させる方法としては、試料（好ましくは水溶液若しくは水分散液）又は下記の展開液を展開した際にこれに前記標識体が溶出可能となる方法であれば特に制限されず、例えば、前記標識体を含有する溶液を上記のマトリクス又は標識体含有パッドの材料に塗布又は含浸させた後に乾燥させる方法が挙げられる。前記標識体を含有させる溶液としては、例えば緩衝液が挙げられ、前記緩衝液としては、目的の抗原抗体反応に好適なpHに調節可能な緩衝液、より具体的には、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、グッド緩衝液、ホウ酸緩衝液等が挙げられる。本発明に係る標識体含有部に保持させる前記標識体の量は、試料の形態、標識体に含まれる抗体の被検物質に対する感度や検出目的等によって適宜調整することができる。

[0052] 本発明のイムノクロマト用ストリップにおいては、前記試料が前記標識体含有部に接触すると、前記標識体が溶出されると共に、前記試料中に前記被検物質が存在する場合には、当該被検物質と前記標識体を構成する抗体との抗原抗体反応により、前記標識体に被検物質が結合した複合体（免疫複合体）が形成される。

[0053] 〔捕捉体固定部〕

また、本発明のイムノクロマト用ストリップとしては、前記マトリクスが、前記ブロック化標識抗体に結合した被検物質を補足可能な捕捉体が固定された捕捉体固定部（例えば、図1及び図2に示す捕捉体固定部6）をさらに有することが好ましい。

[0054] 本発明に係る捕捉体固定部は、本発明のイムノクロマト用ストリップの検

出ゾーンとして機能する。本発明に係る捕捉体固定部は、前記標識体含有部よりも下流側に配置される。

[0055] 本発明において、「ブロック化標識抗体に結合した被検物質を補足可能な捕捉体（以下、場合により単に「捕捉体」という）」とは、前記標識体に結合した被検物質に結合可能であり、前記被検物質を介して前記標識体を捕捉可能な物質である。

[0056] このような捕捉体としては、典型的には、前記被検物質に特異的に結合可能な抗体、又は前記被検物質と前記標識体に含まれる抗体との結合部に特異的に結合可能な抗体である。このような捕捉体に含まれる抗体としては、前記標識体に含まれる抗体と同一であっても異なってもよいが、被検物質の被認識部位によっては、当該被検物質に対する結合において競合しないことが好ましい。

[0057] なお、図1等において、捕捉体固定部6はライン状に形成されているが、本発明に係る捕捉体固定部の形状はこれに限定されず、円形、多角形等の任意の形状にすることができる。これらの形状の中でも、本発明に係る捕捉体固定部の形状としては、ライン状であることが好ましく、例えば、幅0.5～3.0mmのライン状であることがより好ましい。

[0058] また、本発明に係る捕捉体固定部としては、図3～4に示すように、被検物質の種類や検出方法に応じて、複数（図3～4では捕捉体固定部6aと6bとの2つ）であってもよい。例えば、標識体として被検物質aに結合可能な抗体aを含む標識体Aと被検物質bに結合可能な抗体bを含む標識体Bとを用いた場合には、これに対応して、被検物質aに結合可能な抗体が固定された捕捉体固定部Aと被検物質bに結合可能な抗体が固定された捕捉体固定部Bとを備えていてもよい。

[0059] 本発明に係る捕捉体固定部に前記捕捉体を固定する方法としては、特に制限されず、適宜従来公知の方法又はそれに準じた方法を採用することができ、例えば、物理的吸着法や共有結合によって前記マトリクスに結合させる方法が挙げられ、必要に応じてブロッキングを行ってもよい。本発明に係る捕

捉体固定部に固定させる前記捕捉体の量は、試料の形態、標識体に含まれる抗体の種類や検出目的等によって適宜調整することができる。

[0060] 本発明のイムノクロマト用ストリップにおいては、前記被検物質に結合して複合体を形成した標識体が前記捕捉体固定部まで移動すると、当該捕捉体固定部に固定化された捕捉体に、前記複合体が前記被検物質を介して補足され、当該複合体を構成する標識物質が当該捕捉体固定部に集積する。その結果、捕捉体固定部は標識物質の集積に起因してシグナルを示すため、これを検出することで、試料中の被検物質の検出をすることができる。

[0061] 〔展開確認ゾーン〕

さらに、本発明のイムノクロマト用ストリップとしては、前記マトリクスが、前記標識体を補足可能な物質が固定された展開確認ゾーン（例えば、図3及び図4に示す展開確認ゾーン10）をさらに有していてもよい。

[0062] 本発明に係る展開確認ゾーンは、本発明のイムノクロマト用ストリップにおける展開液の展開の成否を確認し、試験成立の可否を判定するコントロールゾーンとして機能する。本発明に係る展開確認ゾーンは、前記標識体含有部よりも下流側に配置される。また、本発明に係る展開確認ゾーンとしては、前記捕捉体固定部よりも下流側に配置されることが好ましい。

[0063] 本発明において、「ブロック化標識抗体（標識体）を補足可能な物質（以下、場合により「対照体」という）」とは、前記標識体と結合可能であり、前記標識体を捕捉可能な物質である。

[0064] このような対照体としては、被検物質には結合しない物質であることが好ましく、典型的には、前記標識体に含まれる標識物質又は抗体に結合可能な抗体である。このような抗体としては、例えば、前記標識体に含まれる標識物質が酵素である場合には抗酵素抗体を用いることができ、前記標識体に含まれる抗体が被検物質に特異的なウサギポリクローナル抗体である場合には抗ウサギイムノグロブリン抗体を用いることができる。

[0065] なお、図4において、展開確認ゾーン10はライン状に形成されているが、本発明に係る展開確認ゾーンの形状はこれに限定されず、円形、多角形等

の任意の形状にすることができる。これらの形状の中でも、本発明に係る展開確認ゾーンの形状としては、ライン状であることが好ましく、例えば、幅0.5～3.0mmのライン状であることがより好ましい。

[0066] 本発明に係る展開確認ゾーンに前記対照体を固定する方法としては、特に制限されず、適宜従来公知の方法又はそれに準じた方法を採用することができる。上記の捕捉体固定部に捕捉体を固定する方法として挙げた方法と同様の方法が挙げられる。本発明に係る展開確認ゾーンに固定させる前記対照体の量は、試料の形態、標識体に含まれる標識物質や抗体の種類、検出目的等によって適宜調整することができる。

[0067] 本発明のイムノクロマト用ストリップにおいては、前記標識体（展開確認ゾーンが前記捕捉体固定部よりも下流側に配置されている場合には当該捕捉体固定部で捕捉されなかった標識体）が展開確認ゾーンまで移動すると、展開確認ゾーンに固定化された前記対照体に前記標識体が捕捉され、当該標識体を構成する標識物質が当該展開確認ゾーンに集積する。その結果、展開確認ゾーンは標識物質の集積に起因してシグナルを示すため、これを検出することで、前記標識体が展開確認ゾーンまで展開されたことを確認することができる。

[0068] 〔吸収ゾーン〕

本発明のイムノクロマト用ストリップとしては、前記マトリクスが、クロマトグラフ媒体である前記マトリクスを移動した試料や展開液、捕捉体固定部や展開確認ゾーンに捕捉されなかった標識体等を吸収する機能を有する部材として、吸収ゾーン（例えば、図1～3及び図5に示す吸収ゾーン5）をさらに有していてもよい。本発明に係る吸収ゾーンは、前記マトリクスの最も下流に配置されることが好ましい。

[0069] 前記吸収ゾーンとしては、マトリクス2と一体であってもよいが、吸収ゾーン5のように別個の吸水性材料からなる部材（吸収パッド）であることが好ましい。前記吸収ゾーンの材料としては、特に制限されず、例えば、セルロースろ紙、不織布、布、セルロースアセテート膜等の吸水性材料が挙げら

れる。また、前記吸収性材料には、ケイ素含有粒子等が含まれていてもよい。

[0070] 前記吸収ゾーンのサイズとしては、特に制限はないが、例えば、幅1～10 mm、長さ4～6 mmの範囲が挙げられ、吸収パッドの厚さとしては、例えば0.5～2 mmの範囲が挙げられる。

[0071] [基質ゾーン]

本発明のイムノクロマト用ストリップとしては、前記標識体に含まれる標識物質が酵素である場合、前記マトリクスが、その酵素の基質を溶出可能に保持する基質ゾーン（例えば、図3に示す基質ゾーン7）をさらに有していてもよい。前記酵素の基質としては展開液に添加して用いてもよいが、このようにイムノクロマト用ストリップに予め保持させておいてもよい。

[0072] 本発明に係る基質ゾーンに前記基質を保持させる方法としては、試料又は展開液を展開した際にこれに前記基質が溶出可能となる方法であれば特に制限されず、上記の標識体含有部に標識体を保持させる方法として挙げた方法と同様の方法が挙げられる。本発明に係る基質ゾーンに保持させる前記基質の量は、酵素や基質の種類等によって適宜調整することができる。

[0073] また、本発明のイムノクロマト用ストリップは、必要に応じて、図3及び図5に示すように、展開液をマトリクスに供給するための展開液パッド（図3及び図5では展開液パッド3）をさらに備えていてもよく、前記マトリクスや各パッドを支持するシート（図示せず、例えば、プラスチック製、金属製、紙製等の粘着シート）をさらに備えていてもよい。

[0074] 本発明のイムノクロマト用装置としては、本発明のイムノクロマト用ストリップを備えていればよく、その形態は特に制限されず、例えば、イムノクロマト用ストリップのマトリクスの上流に、展開液を貯蔵するための展開液槽（図3及び図5では展開液槽11）や、当該展開液槽内の展開液を前記展開液パッドを通じてマトリクスに供給するための突起部（図5では突起部13）や、当該突起部を加圧して移動させる押し込み部（図3及び図5では押し込み部12）等をさらに有していてもよい。

[0075] (被検物質検出方法)

本発明の被検物質検出方法は、本発明のイムノクロマト用ストリップにおいて、

試料と前記ブロック化標識抗体とを接触させ、前記試料中の被検物質と前記ブロック化標識抗体との複合体を形成させる標識工程と、

前記複合体を捕捉する捕捉工程と、

捕捉された複合体を検出する検出工程と、

を備える方法である。

[0076] 以下、本発明の被検物質検出方法の一実施形態として、図1又は図3のイムノクロマト用ストリップを使用した被検物質検出方法（イムノクロマトグラフ法）を例に挙げて説明する。

[0077] 先ず、試料をマトリクス2に滴下又は塗布してこれに受容させる（工程1）。前記試料は前記標識体と直接接するように受容させることが好ましく、例えば、図3に示すように標識体含有部4（標識体パッド4a）上の滴下ゾーン8に試料9を滴下又は塗布することが好ましい。

[0078] また、マトリクス2には、前記試料と同時又は別々に、標識体含有部4と同位置又はそれよりも上流に、展開液を滴下、浸漬、又は塗布してもよい。前記展開液としては、例えば緩衝液が挙げられ、前記緩衝液としては、目的の抗原抗体反応に好適なpHに調節可能な緩衝液、より具体的には、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、グッド緩衝液、ホウ酸緩衝液、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール（AMP）緩衝液等が挙げられる。

[0079] さらに、マトリクス2には、標識体に含まれる標識物質が酵素である場合、前記試料又は前記展開液と同時又は別々に、基質液を滴下又は塗布してもよい。前記基質の溶媒としては、例えば前記緩衝液が挙げられる。

[0080] マトリクス2に受容された試料は、毛細管現象によって標識体含有部4へと移動する。それにより、標識体含有部4に含有される標識体に前記試料を接触させ、前記標識体を溶出させると共に、前記試料中に前記被検物質が存在する場合には、当該被検物質と前記標識体を構成する抗体との抗原抗体反

応により、前記被検物質と前記標識体との複合体（免疫複合体）を形成させる（工程2、標識工程）。

[0081] 本発明のイムノクロマト用ストリップが例えば図3～図5に示す態様である場合には、滴下ゾーン8に滴下された試料9は標識体パッド4 aより標識体を溶出し、標識体ゾーン4 bにおいてマトリクス2に受容される。この時、前記試料中に被検物質が存在する場合には当該被検物質と前記標識体との複合体が形成される。マトリクス2に受容された試料及び標識体は毛細管現象によりマトリクス2中に展開される。また、押し込み部1 2を加圧して突起部1 3を移動させることにより、展開液パッド3を展開液槽1 1に挿入して浸漬し、展開液パッド3を通じて展開液をマトリクス2に供給することができる。この場合、展開液が基質ゾーン7を通過する際に基質が展開液中に溶出され、基質を含む展開液が流動する。マトリクス2中において、かかる展開液中には前記試料及び標識体（或いは前記複合体）も溶出され、当該基質、標識体（或いは前記複合体）、及び試料を含む展開液が流動する。

[0082] 次いで、前記複合体は、毛細管現象によって下流側に移動し、捕捉体固定部6（検出ゾーン6）に到達する。それにより、捕捉体固定部6において、捕捉体固定部6に固定化されている捕捉体で前記被検物質を介して前記複合体を捕捉する（工程3、捕捉工程）。前記複合体が捕捉体固定部6に捕捉される結果、捕捉体固定部6は前記標識体を構成する標識物質によって呈色などを示すため、これをシグナルとして検出することができ（検出工程）、必要に応じて定量することができる。

[0083] 本発明の被検物質検出方法において、前記捕捉工程と前記検出工程とは同時であっても前記捕捉工程の後に前記検出工程を実施してもよく、例えば、前記捕捉工程で前記複合体を捕捉した後、前記複合体に含まれる標識物質に応じた処理（基質の添加、蛍光顕微鏡による観察、蛍光光度計による検出、シンチレーションカウンターによる検出等）を行う検出工程を実施してもよい。

[0084] 試料中に被検物質が含まれていない場合には、標識体は捕捉体固定部6に

固定されず、さらに下流に移動するため、捕捉体固定部6においてシグナルは検出されない。また、試料中における被検物質の濃度が低い場合には、捕捉体固定部6に集積される標識物質の量が少なくなるために一般には十分なシグナルが検出されない（シグナル強度が弱い）傾向にあるが、本発明のイムノクロマト用ストリップを用いた検出方法によれば、被検物質の濃度が低くともシグナル強度が十分に強くなり、高感度で当該被検物質の検出が可能である。

[0085] また、標識体含有部4から溶出された標識体（展開確認ゾーン10が捕捉体固定部6よりも下流側に配置されている場合には捕捉体固定部6で捕捉されなかった標識体）は、毛細管現象によって下流側に移動し、展開確認ゾーン10にも到達する。それにより、展開確認ゾーン10において、展開確認ゾーン10に固定化されている前記対照体で前記標識体を捕捉して検出する（工程4）。なお、図1のイムノクロマト用ストリップ101においては工程3の後に工程4が行われるが、工程3と工程4とは互いに独立していても、同位置において同時であってもよく、また、工程4の後に工程3が行われてもよい。前記標識体が展開確認ゾーン10に捕捉される結果、展開確認ゾーン10は前記標識体を構成する標識物質によって呈色などを示すため、これをシグナルとして検出することができ、必要に応じて定量することにより、イムノクロマト用ストリップ上で試料が正常に移動したことの判定をすることができる。前記判定の基準は、検出の目的及び被検物質の種類等によって適宜設定することができる。展開液は、最終的に、その下流の吸収ゾーン5に吸収される。

[0086] <イムノクロマト用キット>

本発明のイムノクロマト用キットは、少なくとも、本発明のイムノクロマト用ストリップを含む。前記イムノクロマト用ストリップとしては、本発明のイムノクロマト用装置として含まれていてもよい。

[0087] また、本発明のイムノクロマト用キットとしては、必要に応じて、試料の希釈液や前処理液、及び前記展開液からなる群から選択される少なくとも1

種をさらに含んでもよい。さらに、前記標識体、前記捕捉体、前記対照体等を組み合わせることもできる。また、例えば前記標識物質が酵素である場合には、シグナルの検出に必要な基質や反応停止液等を含めることもできる。また、本発明のイムノクロマト用キットには、さらに、当該キットの使用説明書を含めることもできる。

[0088] 本発明のイムノクロマト用ストリップ、イムノクロマト用装置、被検物質検出方法、及びイムノクロマト用キットは、研究用としてのみならず、例えば、体外診断用医薬品として、前記被検物質に関連する疾患の診断の基礎となる当該被検物質の検出のために用いることができる。

## 実施例

[0089] 以下、実施例及び比較例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。特に、各バッファの種類や反応条件、精製条件等は、抗体や高分子の種類や量に応じて適宜調整することができる。

[0090] (1) ブロック化標識抗体の調製

(ブロック化標識抗HIV抗体)

1. 抗体消化（抗体断片（F（ab'）<sub>2</sub>）の調製）

まず、抗HIV-1 p24モノクローナル抗体（マウス、IgG、抗HIV抗体（hiv））のバッファを0.1Mクエン酸バッファ（pH3.5）に置換した。次いで、IgG：ペプシン=100：1（w：w）となるように2.5mg/mLペプシンを添加して37℃で1時間反応させた。反応後の反応液に対して1/10（v/v）量の2M Tris-HClバッファ（pH10.0）を添加し、反応を停止した。これを適当な液量に濃縮してゲル濾過精製を行い、抗体断片F（ab'）<sub>2</sub>（F（hiv））を得た。ゲル濾過精製の条件は、バッファ：1mM EDTA・2Na、0.1Mリン酸バッファ（pH6.3）；装置：AKTA purifier 10（GEヘルスケアラライフサイエンス社製）；カラム：Superdex 200 Increase 10/300 GL（GEヘルスケアラ

イフサイエンス社製)で行った。

[0091] 2. ヒドラジン化デキストランの調製

まず、4. 8 mLの0. 1 M リン酸バッファー (pH 7. 0) に70 kDa又は250 kDaのデキストラン (CarboMer社製、(D)) を240 mg添加し、25°Cの暗所で30分間攪拌して溶解させた。次いで、イオン交換水及びNaIO<sub>4</sub> (酸化剤) を、NaIO<sub>4</sub>の終濃度が50 mM、60 mM、又は65 mMとなるように添加し、25°Cの暗所で30分間攪拌した。PD-10カラム (GEヘルスケアライフサイエンス社製、カラム: Sephadex G-25) を用いて、0. 1 M リン酸バッファー (pH 6. 0) でバッファー交換を行い、20 mLの溶液を得た。5. 04 gのNH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub>・HClを添加し、25°Cの暗所で2時間攪拌した。800 mgのDMAB (ジメチルアミンボラン) を加え、さらに25°Cの暗所で2時間攪拌した。RC50K (分子量5万の再生セルロース) 透析膜を用いてイオン交換水4 Lによる透析を暗所で3時間行った後、4°Cで一晩静置した。0. 1 M リン酸バッファー (pH 6. 0) を用いたゲル濾過 (カラム: Sephadex G-25) でバッファー交換を行い、デキストランの濃度が1. 0 mg/mLとなるように調整し、各ヒドラジン化デキストラン液を得た。

[0092] 3. デキストラン-酵素結合体 (標識担体、DA) の調製

10 mg/mLのアルカリホスファターゼ (オリエンタル酵母社製「ALP-50」、ALP、(A)) 20. 0 mLについて、0. 1 M リン酸バッファー (pH 6. 0) を用いたゲル濾過 (カラム: Sephadex G-25) でバッファー交換を行い、3. 0 mg/mLの溶液を63. 4 mL調製した。27 mM NaIO<sub>4</sub>を31. 7 mL添加 (NaIO<sub>4</sub>終濃度: 9 mM) して、25°Cの暗所で30分間攪拌した。0. 1 M リン酸バッファー (pH 6. 0) を用いたゲル濾過 (カラム: Sephadex G-25) でバッファー交換を行い、0. 5 mg/mLのアルデヒド化ALP液を得た。

[0093] これに、上記2で得られた1.0 mg/mLの各ヒドラジン化デキストラン液をそれぞれヒドラジド基（アミノ基）の濃度が25  $\mu$ Mになるように添加し、25°Cの暗所で16時間攪拌した。次いで、DMA Bを47 mg添加し、25°Cの暗所で2時間攪拌した後、1.5 M Tris-HClバッファ（pH 9.0）を5.6 mL添加し、25°Cの暗所で2時間攪拌した。Labscale TFF System（Merck Millipore社製）に限外濾過モジュール（ペリコン XL50、Merck Millipore社製）を取り付け、15 mLまで濃縮し、0.1 M リン酸バッファ（pH 7.0）を用いたゲル濾過（カラム：Sephadex 200 pg）でバッファ交換を行い、3.0 mg/mLの各デキストラン-酵素結合体（DA）液を10.9 mL得た。

[0094] 4. 抗体のチオール化

先ず、上記1で得られた抗体消化（ペプシン消化）後の抗体に対して1/20（v/v）量の0.2 mol/L 2-メルカプトエチルアミン（2MEA）を添加し、37°Cで1.5時間反応させた。反応後、反応液のバッファを1 mM EDTA・2Na、0.1 M リン酸バッファ（pH 6.3）に置換した。

[0095] 5. デキストラン-酵素結合体のマレイミド化

上記3で得られたデキストラン-酵素結合体にALP：Sulfo-EMCS=1：40（モル比）となるようにSulfo-EMCSを添加し、25°Cで1時間反応させた。反応後、反応液のバッファを1 mM EDTA・2Na、0.1 M リン酸バッファ（pH 6.3）に置換した。

[0096] 6. カップリング（ブロック化標識抗HIV抗体の調製）

先ず、上記4で得られたチオール化後の抗体断片と上記5で得られたマレイミド化デキストラン-酵素結合体（DA）とが4.5：1（モル比）になるように混和し、4°Cにおいて一晩反応（カップリング）させた。次いで、反応液に対して1/100（v/v）量の0.2 mol/L 2MEAを添加し、25°Cで30分間反応させた。次いで、反応液に対して1/50（

v/v) 量の 0.2 mol/L ヨードアセトアミド (IAA) を添加し、25°C で 30 分間反応させた後、ゲル濾過精製を行い、デキストラン (D) に ALP (A) と抗 HIV 抗体 (F(hiv)) とが結合したブロック化標識抗 HIV 抗体 (DAF(hiv)) を得た。ゲル濾過精製の条件は、バッファー: 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0); 装置: AKTA purifier 10 (GEヘルスケアライフサイエンス社製); カラム: Superose 6 Increase 10/300 GL 又は Superose 6 10/300 GL (GEヘルスケアライフサイエンス社製) で行った。ゲル濾過精製後のフラクションごとに HIV 抗原 (WHO international standard) と抗原抗体反応を行い、良好な反応性の得られたフラクションをプールして以後の各試験に用いた。

[0097] (ブロック化標識抗インフルエンザ抗体)

上記 1 の抗体消化工程において、抗 HIV-1 p24 モノクローナル抗体 (IgG, (hiv)) に代えて抗 A 型インフルエンザモノクローナル抗体 (IgG, (fluA)) 又は抗 B 型インフルエンザモノクローナル抗体 (IgG, (fluB)) を用いたこと以外はブロック化標識抗 HIV 抗体と同様にして、抗体断片 F(ab')<sub>2</sub> (F(fluA) 又は F(fluB)) を得た。

[0098] 得られた抗体断片 F(ab')<sub>2</sub> をそれぞれ用い、上記 6 のカップリング工程において、チオール化後の抗体断片 (F(fluA)) とマレイミド化デキストラン-酵素結合体 (DA) とは 3:1 (モル比) となるように、チオール化後の抗体断片 (F(fluB)) とマレイミド化デキストラン-酵素結合体 (DA) とは 2:1 (モル比) となるように、それぞれ混和したこと以外はブロック化標識抗 HIV 抗体と同様にして、デキストランに ALP と抗インフルエンザ抗体 A 又は B とが結合したブロック化標識抗インフルエンザ抗体 (DAF(fluA) 又は DAF(fluB)) を得た。得られたブロック化標識抗インフルエンザ抗体については、ゲル濾過精製後のフラクションごとに A 型インフルエンザリコンビナント抗原 (富士レビオ社製) 又は

B型インフルエンザリコンビナント抗原（富士レビオ社製）と抗原抗体反応を行い、良好な反応性の得られたフラクションをそれぞれプールして以後の各試験に用いた。

[0099] (2) 平均粒子径の測定

上記(1)3のデキストラン-酵素結合体の調製工程で得られた、0.1 M リン酸バッファー (pH 7.0) 中の各デキストラン-酵素結合体 (DA) について、平均粒子径を測定した。測定は、各DA液のDA濃度が0.07~0.8 mg/mLとなるように上記バッファーで調整し、ゼータ電位・粒径・分子量測定システム (ELS Z-2000 ZS、大塚電子株式会社製) を用い、同システムにデフォルトで搭載された条件：

[測定条件]

サンプリング時間：N/A ( $\mu$ s)、相関チャンネル数：475 (ch)、

相関方法：TD、積算回数：25 (times)、

ピンホール：50 ( $\mu$ m)、

測定位置 Z：4.900 (mm)、X：5.850 (mm)、

セルタイプ：Size Cell、測定角度：165.0 ( $^{\circ}$ )、

温度：25.0 ( $^{\circ}$ C)、溶媒名：WATER、

溶媒の屈折率：1.3328、溶媒の粘度：0.8878 (cP)、

散乱強度：75585 (cps)

[解析条件]

解析方法：CONTIN、解析範囲：1.0-1400.0 (nm)、

カット Left：0、Right：0、フィッティング範囲：1.003-2、

ノイズカットレベル：1 (%)、残差：1.763e-003 [OK]

、

散乱ファクタ：RGD

にて測定及び解析を行った。測定結果を上記(1)2のヒドラジン化デキス

トランの調製工程における  $\text{NaIO}_4$  (酸化剤) 濃度、用いたデキストラン質量、及び測定に用いた DA 液の DA 濃度と合わせて下記の表 1 に示す。

[0100] [表1]

ID	酸化剤濃度 [mM]	デキストラン質量 [Da]	DA濃度 [mg/mL]	平均粒子径 [nm]
A	50	70k	0.75	43.4
B	60	70k	0.1	119.8
C	65	70k	0.75	89.1
D	50	250k	0.1	80.1

## [0101] (3) イムノクロマト用装置の調製

## (実施例 1)

先ず、図 3 に示す、巾 3.65 mm、長さ 50 mm のニトロセルロース膜 (ザルトリウス社製) からなるマトリクス 2 に、検出ゾーン 6 a 及び 6 b、並びに、展開確認ゾーン 10 を形成した。検出ゾーン 6 a の形成に際しては、マトリクス 2 の吸収パッド 5 側端から 16 mm の位置に、HIV 抗原 (F(hiv) とは結合しない抗原) を 1.25 mg/mL 含有する抗原液 0.54  $\mu\text{L}$  を、ライン状に点着し乾燥させた。検出ゾーン 6 b の形成に際しては、マトリクス 2 の吸収パッド 5 側端から 13.3 mm の位置に、抗 HIV-1 p24 ポリクローナル抗体 (ウサギ、IgG) を 2.0 mg/mL 含有する抗体液 (捕捉体液) 0.54  $\mu\text{L}$  を、ライン状に点着し乾燥させた。また、展開確認ゾーン 10 の形成に際しては、マトリクス 2 の吸収パッド 5 側端から 10.8 mm の位置に、抗 ALP 抗体を 21.4  $\mu\text{g/mL}$  含有する対照体液 0.54  $\mu\text{L}$  をライン状に点着し乾燥させた。また、検出ゾーン 6 a 及び 6 b、並びに、展開確認ゾーン 10 の乾燥後、0.1 mg/mL のアルカリ処理カゼインを含有する溶液 10.0 mg を用いてブロッキングを行った。

[0102] 次いで、マトリクス 2 の吸収パッド 5 側端から 47 mm の位置に、BCIP (5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリルリン酸) 27.8  $\mu\text{g}$  をライ

ン状に点着して乾燥させ、基質ゾーン7を形成した。

[0103] 次いで、巾3.65mm、長さ15.0mmの多孔性シートに、上記(1)において表1のID:AのDAを用いて得られたブロック化標識抗HIV抗体(DAF70A(hiv))を12.5 $\mu$ g/mL、ALP標識HIV抗原を21.2 $\mu$ g/mL含有する標識体液3.04 $\mu$ Lを点着して乾燥させ、標識体パッド4aを形成した。得られた標識体パッド4aを、マトリクス2の検出ゾーン6aと基質ゾーン7との間の標識体ゾーン4bに配置し、イムノクロマト用ストリップとした。

[0104] 次いで、上記のイムノクロマト用ストリップ(マトリクス2、標識体パッド4a)、展開液パッド3(ガラス繊維濾紙)、及び吸収パッド5(高吸収性濾紙)を図3のように張り合わせたものを、図4~5に示すように展開液槽11及び押し込み部12を有するプラスチックケースに固定し、イムノクロマト用装置(イムノクロマト用装置102)とした。

[0105] (実施例2)

ブロック化標識抗HIV抗体として、DAF70A(hiv)に代え、(1)において表1のID:BのDAを用いて得られたブロック化標識抗HIV抗体(DAF70B(hiv))を用いたこと以外は実施例1と同様にして、イムノクロマト用装置を得た。

[0106] (比較例1)

(1)のデキストラン-酵素結合体(DA)に代えてアルカリホスファターゼ(オリエンタル酵母社)を用い、(1)5のマレイミド化工程でマレイミド化試薬としてSulfo-EMCSに代えてGMBSを用い、かつ、(1)6のカップリング工程におけるゲル濾過精製を、下記条件:バッファー:1M 硫酸アンモニウム in 0.1M リン酸バッファー(pH7.0)、0.1M リン酸バッファー(pH7.0);装置:AKTA purifier 10(GEヘルスケアライフサイエンス社製);カラム:HiTrap Phenyl HP(ヘルスケアライフサイエンス社製)にて疎水性クロマトグラフィーで行った後に行ったこと以外は、(1)のブロッ

ク化標識抗HIV抗体と同様にして、ALPと抗HIV抗体とが結合した標識抗HIV抗体（AF（hiv））を得た。ブロック化標識抗HIV抗体に代えて、得られた標識抗HIV抗体（AF（hiv））を用いたこと以外は実施例1と同様にして、イムノクロマト用装置を得た。

[0107] （実施例3）

まず、図3に示す、巾3.65mm、長さ50mmのニトロセルロース膜（ザルトリウス社製）からなるマトリクス2に、検出ゾーン6a及び6b、並びに、展開確認ゾーン10を形成した。検出ゾーン6aの形成に際しては、マトリクス2の吸収パッド5側端から16mmの位置に、抗A型インフルエンザモノクローナル抗体を1.0mg/mL含有する抗体液0.54 $\mu$ Lを、ライン状に点着し乾燥させた。検出ゾーン6bの形成に際しては、マトリクス2の吸収パッド5側端から13.5mmの位置に、抗B型インフルエンザモノクローナル抗体を1.0mg/mL含有する抗体液0.54 $\mu$ Lを、ライン状に点着し乾燥させた。また、展開確認ゾーン10の形成に際しては、マトリクス2の吸収パッド5側端から11mmの位置に、抗ALP抗体を57.1 $\mu$ g/mL含有する対照体液0.54 $\mu$ Lをライン状に点着し乾燥させた。

[0108] 次いで、マトリクス2の吸収パッド5側端から47.5mmの位置に、BCIP 73.6 $\mu$ gをライン状に点着して乾燥させ、基質ゾーン7を形成した。

[0109] 次いで、巾3.65mm、長さ15.0mmの多孔性シートに、上記（1）において表1のID：DのDAと同様にして得られたDAを用いたブロック化標識抗A型インフルエンザ抗体（DAF250（fluA））を5.36 $\mu$ g/mL、及びブロック化標識抗B型インフルエンザ抗体（DAF250（fluB））を8.04 $\mu$ g/mL、いずれも含有する標識体液3.04 $\mu$ Lを点着して乾燥させ、標識体パッド4aを形成した。得られた標識体パッド4aを、マトリクス2の検出ゾーン6aと基質ゾーン7との間の標識体ゾーン4bに配置し、イムノクロマト用ストリップとした。

[0110] 次いで、上記のイムノクロマト用ストリップ（マトリクス2、標識体パッド4 a）、展開液パッド3（ガラス繊維濾紙）、及び吸収パッド5（高吸収性濾紙）を、図3のように張り合わせたものを、図4～5に示すように展開液槽11及び押し込み部12を有するプラスチックケースに固定し、イムノクロマト用装置（イムノクロマト用装置102）とした。

[0111] （比較例2）

（1）1の抗体消化において抗A型インフルエンザモノクローナル抗体又は抗B型インフルエンザモノクローナル抗体（IgG）とペプシンとの量比（IgG：ペプシン）を200：1（w：w）とし、（1）のデキストラン-酵素結合体（DA）に代えてアルカリホスファターゼ（オリエンタル酵母社）を用い、（1）5のマレイミド化工程でマレイミド化試薬としてSulfon-EMCSに代えてGMBSを用い、かつ、（1）6のカップリング工程においてチオール化後の抗体断片（F（fluA））とALPとは2：1（モル比）となるように、チオール化後の抗体断片（F（fluB））とALPとは3：1（モル比）となるように、それぞれ混和したこと以外は（1）のブロック化標識抗インフルエンザ抗体と同様にして、ALPと抗インフルエンザ抗体とが結合した標識抗A型インフルエンザ抗体（AF（fluA））及び標識抗B型インフルエンザ抗体（AF（fluB））をそれぞれ得た。ブロック化標識抗A型インフルエンザ抗体及びブロック化標識抗B型インフルエンザ抗体に代えて、それぞれ、得られた標識抗A型インフルエンザ抗体（AF（fluA））及び標識抗B型インフルエンザ抗体（AF（fluB））をそれぞれ用いたこと、並びに、ニトロセルロース膜としてメルク社製のものをを用いたこと以外は実施例3と同様にして、イムノクロマト用装置を得た。

[0112] （4）被検物質検出試験（イムノクロマト試験）

（実施例1～2、比較例1）

HIV-1 p24抗原（WHO international standard）を陰性検体（ProMedDx社製）で8.0、4.0、2.0

、1.6、1.0、又は0.8 IU/mLとなるように希釈し、各試料を調製した。各試料25 μLをそれぞれ(3)の実施例1、2、又は比較例1で調製したイムノクロマト用装置の滴下ゾーン8に滴下した。次いで、押し込み部12を押下して展開液を展開させ、押下から15分後の検出ゾーン6a及び6b、並びに、展開確認ゾーン10の発色を目視で確認した。以下の基準：

陽性：検出ゾーン6b及び展開確認ゾーン10に青色のラインが認められる

陰性：展開確認ゾーン10に青色のラインが認められるが、検出ゾーン6a及び検出ゾーン6bには発色が確認されない

に基づいて判定した。なお、いずれのイムノクロマト用装置においても展開確認ゾーン10の発色は確認された。試験は、各イムノクロマト用装置2つ(Lot. 1~2)ずつについて行った。結果を下記の表2に示す。

[0113] [表2]

HIV-1p24抗原 [IU/mL]	Lot	比較例1	実施例1	実施例2
		AF	DAF70A	DAF70B
8.0	1	陽性	陽性	陽性
	2	陽性	陽性	陽性
4.0	1	陰性	陽性	陽性
	2	陰性	陽性	陽性
2.0	1	陰性	陽性	陽性
	2	陰性	陽性	陽性
1.6	1	陰性	陽性	陽性
	2	陰性	陽性	陽性
1.0	1	陰性	陰性	陽性
	2	陰性	陰性	陽性
0.8	1	陰性	陰性	陰性
	2	陰性	陰性	陰性

[0114] (実施例3、比較例2)

A型インフルエンザリコンビナント抗原(濃度：625 pg/mL)又は

B型インフルエンザリコンビナント抗原（濃度：8.75 ng/mL）を検体処理液で2、4、8、16、32、48、64、又は96倍希釈となるように希釈し、各試料を調製した。各試料20 μLをそれぞれ（3）の実施例3又は比較例2で調製したイムノクロマト用装置の滴下ゾーン8に滴下した。次いで、押し込み部12を押下して展開液を展開させ、押下から15分後の検出ゾーン6a及び6b、並びに、展開確認ゾーン10の発色を目視で確認した。以下の基準：

試料がA型インフルエンザリコンビナント抗原を含有する場合、

陽 性：検出ゾーン6a及び展開確認ゾーン10に青色のラインが認められる

陰 性：展開確認ゾーン10に青色のラインが認められるが、検出ゾーン6a及び検出ゾーン6bには発色が確認されない

試料がB型インフルエンザリコンビナント抗原を含有する場合、

陽 性：検出ゾーン6b及び展開確認ゾーン10に青色のラインが認められる

陰 性：展開確認ゾーン10に青色のラインが認められるが、検出ゾーン6a及び検出ゾーン6bには発色が確認されない

に基づいてそれぞれ判定した。なお、いずれのイムノクロマト用装置においても展開確認ゾーン10の発色は確認された。結果を下記の表3に示す。

[0115]

[表3]

A型インフルエンザリコンビナント抗原		
希釈倍	実施例3	比較例2
	DAF250	AF
4	陽性	陽性
8	陽性	陰性
16	陽性	陰性
32	陽性	陰性
64	陽性	陰性
96	陰性	-
B型インフルエンザリコンビナント抗原		
希釈倍	実施例3	比較例2
	DAF250	AF
2	陽性	陽性
4	陽性	陽性
8	陽性	陰性
16	陽性	陰性
32	陰性	陰性
48	陰性	陰性

[0116] 表2及び表3に示したように、本発明に係るブロック化標識抗体を含むイムノクロマト用ストリップを備えるイムノクロマト用装置（例えば、実施例1～3）を用いることにより、従来の高分子担体を含まない標識抗体を含むイムノクロマト用ストリップを備えるイムノクロマト用装置（例えば、比較例1～2）に比べて、被検物質の濃度が低い試料まで高感度で当該被検物質を検出できることが確認された。

### 産業上の利用可能性

[0117] 以上説明したように、本発明によれば、被検物質の濃度が低くとも高感度で当該被検物質の検出が可能なイムノクロマト用ストリップ、それを備えるイムノクロマト用装置、これらのうちの少なくともいずれかを含むイムノクロマト用キット、並びに、被検物質の濃度が低くとも高感度でイムノクロマ

トにより当該被検物質の検出が可能な被検物質検出方法を提供することが可能となる。前記被検物質としては、例えば、感染症の原因となるウイルスが挙げられ、体内ウイルス濃度が低い感染初期においても従来より高感度で検出できるため、本発明は、研究上の利用にとどまらず、当該ウイルスによる疾患の診断等、特に早期診断においても大きく貢献し得るものである。

### 符号の説明

[0118] 101…イムノクロマト用ストリップ、102…イムノクロマト用装置、2…マトリクス、3…展開液パッド、4、4b、4a…標識体含有部（4a…標識体パッド、4b…標識体ゾーン）、5…吸収ゾーン、吸収パッド、6、6a、6b…捕捉体固定部、検出ゾーン、7…基質ゾーン、8…滴下ゾーン、9…試料、10…展開確認ゾーン、11…展開液槽、12…押し込み部、13…突起部、14…展開方向

## 請求の範囲

- [請求項1] 試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出するために用いるストリップであり、標識物質と被検物質に結合可能な抗体とが水溶性高分子からなる水溶性担体に固定されたブロック化標識抗体を含有する標識体含有部を備える、イムノクロマト用ストリップ。
- [請求項2] 前記ブロック化標識抗体の平均粒子径が50nm以上である、請求項1に記載のイムノクロマト用ストリップ。
- [請求項3] 前記水溶性高分子が糖類及びアミノ酸類からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項1又は2に記載のイムノクロマト用ストリップ。
- [請求項4] 前記ブロック化標識抗体に結合した被検物質を補足可能な捕捉体が固定された捕捉体固定部をさらに備える、請求項1～3のうちのいずれか1項に記載のイムノクロマト用ストリップ。
- [請求項5] 試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出するために用いる装置であり、請求項1～4のうちのいずれか1項に記載のイムノクロマト用ストリップを備える、イムノクロマト用装置。
- [請求項6] 試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出するために用いるキットであり、請求項1～4のうちのいずれか1項に記載のイムノクロマト用ストリップ及び請求項5に記載のイムノクロマト用装置からなる群から選択される少なくとも1種を含む、イムノクロマト用キット。
- [請求項7] 試料中の被検物質をイムノクロマトにより検出する方法であり、  
標識物質と被検物質に結合可能な抗体とが水溶性高分子からなる水溶性担体に固定されたブロック化標識抗体を含有する標識体含有部を備えるイムノクロマト用ストリップにおいて、  
試料と前記ブロック化標識抗体とを接触させ、前記試料中の被検物質と前記ブロック化標識抗体との複合体を形成させる標識工程と、  
前記複合体を捕捉する捕捉工程と、

捕捉された複合体を検出する検出工程と、  
を含む、被検物質検出方法。

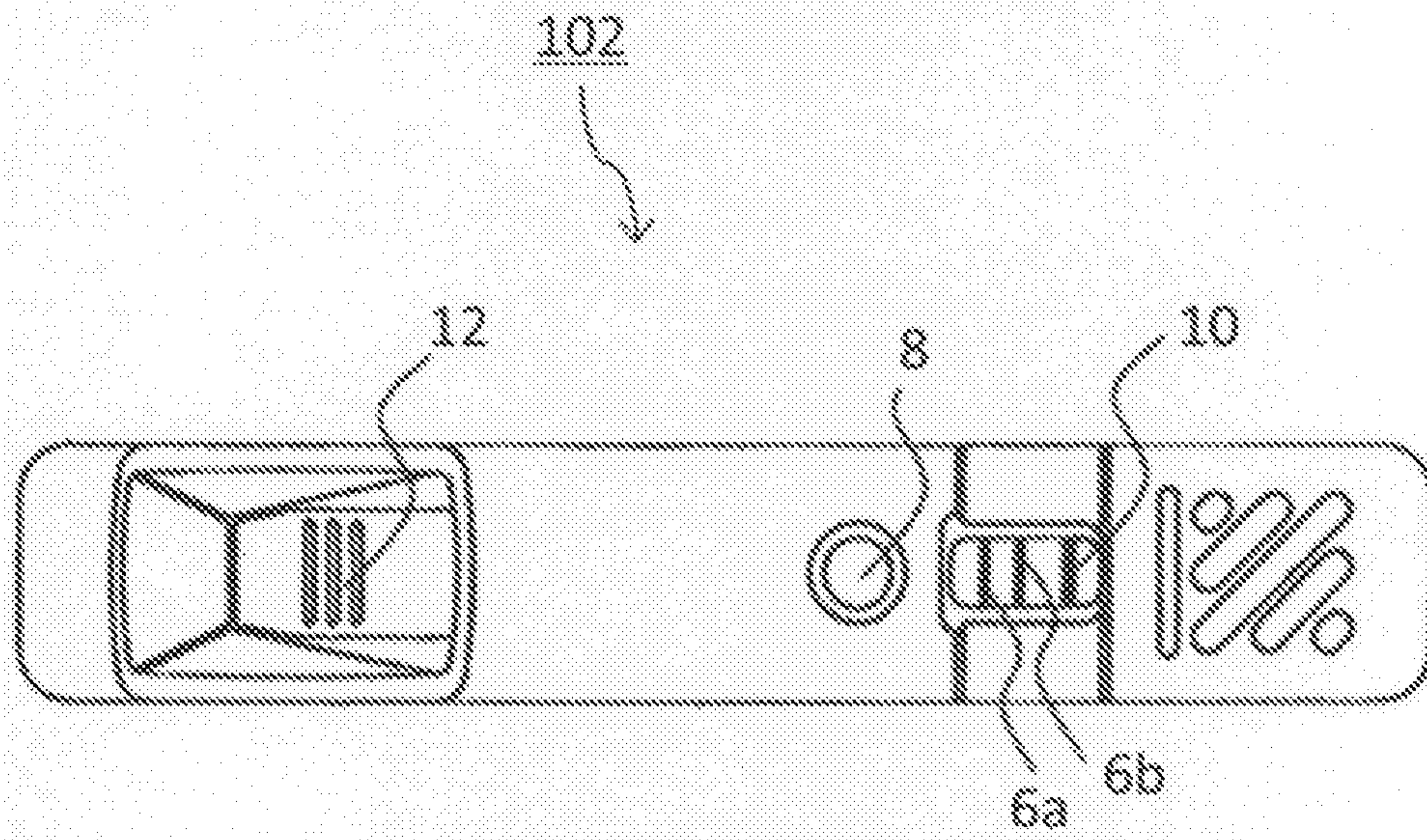
[請求項8] 前記ブロック化標識抗体の平均粒子径が50nm以上である、請求項7に記載の被検物質検出方法。

[請求項9] 前記水溶性高分子が糖類及びアミノ酸類からなる群から選択される少なくとも1種である、請求項7又は8に記載の被検物質検出方法。

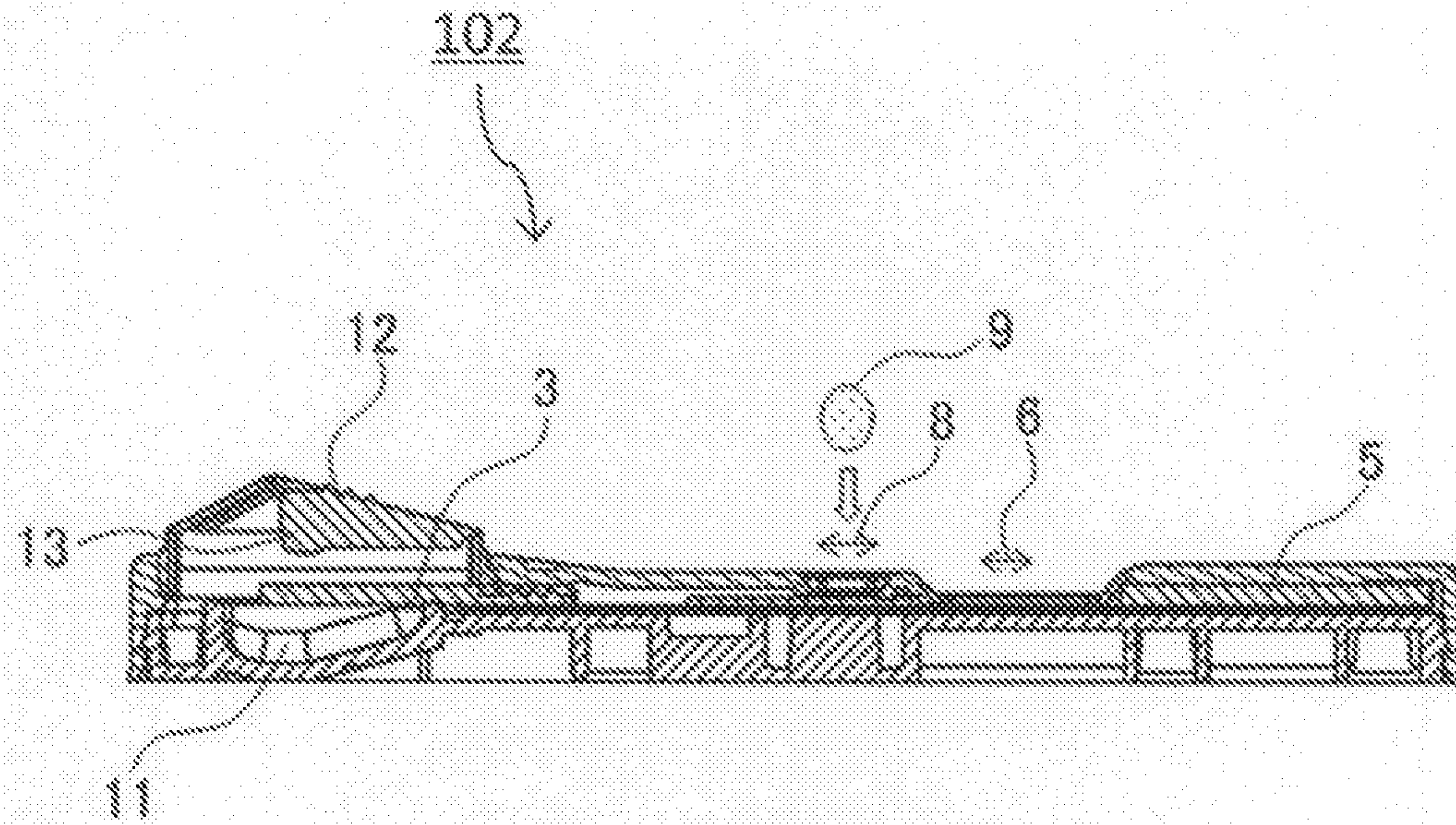
[請求項10] 前記免疫クロマト用ストリップが、前記ブロック化標識抗体に結合した被検物質を補足可能な捕捉体が固定された捕捉体固定部をさらに備えるストリップであり、かつ、前記捕捉工程が、前記捕捉体固定部において前記ブロック化標識抗体に結合した被検物質を介して前記複合体を捕捉する工程である、請求項7～9のうちのいずれか1項に記載の被検物質検出方法。



[図4]



[図5]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP2020/048473

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

G01N 33/543(2006.01) i  
 FI: G01N33/543 521; G01N33/543 501D

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

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)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 2006/0205090 A1 (NEWTON, Michael W.) 14 September 2006 (2006-09-14) paragraphs [0134]- [0139]	1, 3-7, 9-10 2, 8
Y	JP 2019-174336 A (ASAHI KASEI CORPORATION) 10 October 2019 (2019-10-10) paragraph [0013]	2, 8
Y	JP 2001-013145 A (NITTO DENKO CORP.) 19 January 2001 (2001-01-19) claims, paragraphs [0037]-[0064]	1-10
Y	WO 2006/070732 A1 (ADVANCED LIFE SCIENCE INSTITUTE, INC.) 06 July 2006 (2006-07-06) claims	1-10
Y	JP 2001-181299 A (NICHIREI CORPORATION) 03 July 2001 (2001-07-03) claims	1-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search  
 03 March 2021 (03.03.2021)

Date of mailing of the international search report  
 16 March 2021 (16.03.2021)

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/JP2020/048473

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2003-536074 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG) 02 December 2003 (2003-12-02) claims	1-10
Y	WO 2011/125606 A1 (SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) 13 October 2011 (2011-10-13) claims 1-3, paragraph [0004]	1-10
Y	JP 2007-033378 A (DENKA SEIKEN CO., LTD.) 08 February 2007 (2007-02-08) claims, paragraph [0024]	1-10

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

International application No. PCT/JP2020/048473
--

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
US 2006/0205090 A1	14 Sep. 2006	(Family: none)	
JP 2019-174336 A	10 Oct. 2019	(Family: none)	
JP 2001-013145 A	19 Jan. 2001	(Family: none)	
WO 2006/070732 A1	06 Jul. 2006	US 2008/0153089 A1 claims	
		EP 1837655 A1	
		CN 101088009 A	
		KR 10-2007-0090997 A	
JP 2001-181299 A	03 Jul. 2001	US 2001/0005583 A1 claims	
		EP 1111385 A2	
		KR 10-2001-0067472 A	
		CN 1300942 A	
JP 2003-536074 A	02 Dec. 2003	US 2004/0038431 A1 claims	
		WO 2001/094947 A1	
WO 2011/125606 A1	13 Oct. 2011	(Family: none)	
JP 2007-033378 A	08 Feb. 2007	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) G01N 33/543(2006.01)i FI: G01N33/543 521; G01N33/543 501D		
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)) G01N33/543		
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
X	US 2006/0205090 A1 (NEWTON MICHAEL W.) 14.09.2006 (2006 - 09 - 14) [0134]-[0139]	1,3-7,9-10
Y		2,8
Y	JP 2019-174336 A (旭化成株式会社) 10.10.2019 (2019 - 10 - 10) [0013]	2,8
Y	JP 2001-013145 A (日東電工株式会社) 19.01.2001 (2001 - 01 - 19) [特許請求の範囲], [0037]-[0064]	1-10
Y	WO 2006/070732 A1 (株式会社先端生命科学研究所) 06.07.2006 (2006 - 07 - 06) [特許請求の範囲]	1-10
Y	JP 2001-181299 A (株式会社ニチレイ) 03.07.2001 (2001 - 07 - 03) [特許請求の範囲]	1-10
Y	JP 2003-536074 A (エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー) 02.12.2003 (2003 - 12 - 02) [特許請求の範囲]	1-10
<input checked="" 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 03.03.2021	国際調査報告の発送日 16.03.2021	
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)  大瀧 真理 2J 9812  電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	WO 2011/125606 A1 (積水メディカル株式会社) 13.10.2011 (2011 - 10 - 13) [請求項1]-[請求項3], [0004]	1-10
Y	JP 2007-033378 A (デンカ生研株式会社) 08.02.2007 (2007 - 02 - 08) [特許請求の範囲], [0024]	1-10

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/JP2020/048473

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
US 2006/0205090 A1	14.09.2006	(ファミリーなし)	
JP 2019-174336 A	10.10.2019	(ファミリーなし)	
JP 2001-013145 A	19.01.2001	(ファミリーなし)	
WO 2006/070732 A1	06.07.2006	US 2008/0153089 A1 claims EP 1837655 A1 CN 101088009 A KR 10-2007-0090997 A	
JP 2001-181299 A	03.07.2001	US 2001/0005583 A1 claims EP 1111385 A2 KR 10-2001-0067472 A CN 1300942 A	
JP 2003-536074 A	02.12.2003	US 2004/0038431 A1 claims WO 2001/094947 A1	
WO 2011/125606 A1	13.10.2011	(ファミリーなし)	
JP 2007-033378 A	08.02.2007	(ファミリーなし)	