

(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
2024年9月12日(12.09.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/185875 A1

(51) 国際特許分類:

G01N 33/543 (2006.01) G01N 33/569 (2006.01)
G01N 21/78 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/008964

(22) 国際出願日: 2024年3月8日(08.03.2024)

(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 2023-036180 2023年3月9日(09.03.2023) JP

(71) 出願人: 富士フイルム株式会社 (FUJIFILM CORPORATION) [JP/JP]; 〒1068620 東京都港区西麻布2丁目2番30号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 齊藤 耕一 (SAITO Koichi); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP). 武井 俊樹 (TAKEI Toshiki); 〒2588538 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フイルム株式会社内 Kanagawa (JP).

(74) 代理人: 弁理士法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目8番7号 京橋日殖ビル8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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF,

(54) Title: ANALYTE DETECTION METHOD AND ANALYTE DETECTION KIT

(54) 発明の名称: 測定対象物質の検出方法および測定対象物質の検出のためのキット

(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing an analyte detection method and an analyte detection kit, in which signals in a background region are reduced and whereby high-sensitivity detection becomes possible. According to the present invention, an analyte detection method is provided, the method comprising: developing a mixture of a specimen containing an analyte and an extraction solution and a labeling substance containing a metal on an insoluble carrier while allowing the mixture and the extraction solution to come into contact with each other; capturing a complex of the analyte and the labeling substance at a detection site on the insoluble carrier; amplifying a signal of the labeling substance with silver; and detecting the amplified signal. In the method, the extraction solution contains at least one nonionic surfactant represented by formula (1). Formula (1): $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$ In the formula, C_nH_{2n+1} represents a linear alkyl group; n represents an integer of 10 to 20; and m represents an integer of 18 to 25.

(57) 要約: 本発明は、背景領域のシグナルが抑制され、高感度な検出が可能となるような、測定対象物質の検出方法および測定対象物質の検出のためのキットを提供することを課題とする。本発明によれば、測定対象物質を含む検体と抽出液との混合物と、金属を含む標識物質とを接触させた状態で、不溶性担体上に展開し、不溶性担体上の検出部位において測定対象物質と標識物質との複合体を捕捉し、標識物質のシグナルを銀で増幅し、増幅されたシグナルを検出することを含む測定対象物質の検出方法であって、抽出液が、下記式(1)で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤を含む、方法が提供される。式(1): $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$ 式中、 C_nH_{2n+1} は直鎖アルキル基であり、nは10~20の整数を示し、mは18~25の整数を示す。

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：

測定対象物質の検出方法および測定対象物質の検出のためのキット

技術分野

[0001] 本発明は、所定の界面活性剤を用いる測定対象物質の検出方法に関する。本発明はさらに、所定の界面活性剤を含む、測定対象物質の検出のためのキットに関する。

背景技術

[0002] 免疫測定方法の中でもイムノクロマトグラフ法は、操作が簡便であり短時間で測定可能であることから、一般的によく利用されている。イムノクロマトグラフ法で用いられている免疫反応としては、競合的反応またはサンドイッチ型反応が広く使われている。その中でも、イムノクロマトグラフ法ではサンドイッチ型反応が主流であり、その典型例においては、試料中の抗原よりなる測定対象物質を検出するために、以下のような操作が行われる。まず、測定対象物質である抗原に対する抗体により感作させた微粒子を固相微粒子としてクロマトグラフ担体に固定化することにより、あるいはこの抗体そのものをクロマトグラフ担体に直接固定化することにより、反応部位を有するクロマトグラフ担体を調製する。一方、標識微粒子に測定対象物質に対する抗体を感作させて感作標識微粒子を調製する。この感作標識微粒子を試料と共に、クロマトグラフ担体上でクロマトグラフ的に移動させる。以上の操作により、クロマトグラフ担体に形成された反応部位において、固定化された抗体が固定化試薬となり、これに測定対象物質である抗原を介して感作標識微粒子が特異的に結合する。その結果、感作標識微粒子が反応部位に捕捉されることにより生ずるシグナルの有無または程度を目視で判定することにより、試料中の測定対象物質の存在の有無または量を測定することができる。

[0003] 特許文献1には、界面活性剤を含み、pHが3～8であることを特徴とす

る検体浮遊液組成物が記載されており、上記検体浮遊液組成物を用いてイムノアッセイ法によって被測定物を検出することが記載されている。

- [0004] 特許文献2には、イムノクロマトグラフィー法により検体中の検出対象物を検出する際に、ポリオキシエチレン23ラウリルエーテル（B r i j 35ともいう）などの非イオン界面活性剤、N，N－ビス（2－ヒドロキシエチル）グリシン緩衝剤およびカゼインを含むイムノクロマトグラフィー用試薬組成物を、検体処理液または展開液として用いることが記載されている。しかし、特許文献2は、感度向上に着目したものではなく、銀増幅イムノクロマトグラフ法については記載されていない。

先行技術文献

特許文献

- [0005] 特許文献1：特開2006-084351号公報

特許文献2：特開2012-37253号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0006] 感染症の抗原検査において、標的抗原を検出するために病原体を溶解する必要があるが、病原体の溶解効率が悪いと、感染していても陰性と判定され、適切な治療が行われない問題がある。また、銀増幅クロマトグラフ法は抗原を高感度に検出可能な技術であるが、検体を溶解する界面活性剤の種類によっては背景領域のシグナルが高くなり、正しく判定できないなどの問題がある。そのため、病原体から抗原を効率よく抽出し、かつ銀増幅クロマトグラフ法において背景領域シグナルが低い界面活性剤を見出すことが重要である。

- [0007] 本発明は、銀増幅クロマトグラフ法において、背景領域のシグナルが抑制され、高感度な検出が可能となるような、測定対象物質の検出方法および測定対象物質の検出のためのキットを提供することを解決すべき課題とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、後記の式（１）で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤を添加した抽出液を用いて銀増幅イムノクロマトグラフ法を行う場合に、背景領域シグナルが低く、かつ病原体を高感度に検出することができることを見出した。本発明は上記の知見に基づいて完成したものである。

[0009] 即ち、本発明によれば、以下の発明が提供される。

< 1 > 測定対象物質を含む検体と抽出液との混合物と、測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した金属を含む標識物質とを接触させた状態で、不溶性担体上に展開すること；

測定対象物質に対する第二の結合物質、又は測定対象物質に対する第一の結合物質への結合性を有する物質を含む不溶性担体上の検出部位において、測定対象物質と標識物質との複合体を捕捉すること；

捕捉した標識物質のシグナルを銀で増幅すること；および

増幅されたシグナルを検出すること；

を含む、測定対象物質の検出方法であって、上記抽出液が、下記式（１）で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤を含む、方法。

式（１）： $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$

式中、 C_nH_{2n+1} は直鎖アルキル基であり、 n は１０～２０の整数を示し、 m は１８～２５の整数を示す。

< 2 > 抽出液中の非イオン界面活性剤の濃度が、０．００１質量％～１．０質量％である、< 1 >に記載の方法。

< 3 > 測定対象物質が、ＳＡＲＳ－ＣｏＶ－２、インフルエンザウイルス、ＲＳウイルス、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、マイコプラズマ、肺炎球菌、Ａ群連鎖球菌、ノロウイルス、ロタウイルス、およびサルモネラから選択される一つあるいは複数の病原体の抗原である、< 1 >に記載の方法。

< 4 > 抗原がヌクレオカプシドタンパク質またはその断片である、< 3 >に記載の方法。

<5> 第一の結合物質、及び第二の結合物質の少なくともいずれか一方が抗体である、<1>から<4>の何れかーに記載の方法。

<6> 捕捉した標識物質のシグナルを銀で増幅することを、銀を含む化合物及び銀イオンのための還元剤を含む増幅液を用いて行う、<1>から<4>の何れかーに記載の方法。

<7> 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン23ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン20セチルエーテル、およびポリオキシエチレン20ステアリルエーテルからなる群から選択される1以上である、<1>から<4>の何れかーに記載の方法。

<8> 下記式(1)で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤と、
測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した金属を含む標識物質と、
測定対象物質に対する第二の結合物質、又は測定対象物質に対する第一の結合物質への結合性を有する物質を含む不溶性担体と、

標識物質のシグナルを銀で増幅するための増幅液とを含む、測定対象物質の検出のためのキット。

式(1) : $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$

式中、 C_nH_{2n+1} は直鎖アルキル基であり、 n は10~20の整数を示し、 m は18~25の整数を示す。

<9> 非イオン界面活性剤が、非イオン界面活性剤を含む抽出液として提供され、抽出液中の非イオン界面活性剤の濃度が、0.001質量%~1.0質量%である、<8>に記載のキット。

<10> 測定対象物質が、SARS-CoV-2、インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、マイコプラズマ、肺炎球菌、A群連鎖球菌、ノロウイルス、ロタウイルス、およびサルモネラから選択される一つあるいは複数の病原体の抗原である、<8>に記載のキット。

<11> 抗原がヌクレオカプシドタンパク質またはその断片である、<10>に記載のキット。

< 1 2 > 第一の結合物質、及び第二の結合物質の少なくともいずれか一方が抗体である、< 8 >から< 1 1 >の何れかに記載のキット。

< 1 3 > 増幅液が、銀を含む化合物及び銀イオンのための還元剤を含む、< 8 >から< 1 1 >の何れかに記載のキット。

< 1 4 > 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン 2 3 ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン 2 0 セチルエーテル、およびポリオキシエチレン 2 0 ステアリルエーテルからなる群から選択される 1 以上である、< 8 >から< 1 1 >の何れかに記載のキット。

発明の効果

[0010] 本発明による測定対象物質の検出方法および測定対象物質の検出のためのキットによれば、背景領域のシグナルが抑制され、高感度な検出が可能となる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]図 1 は、イムノクロマトグラフキットの一例を示す斜視図である。

[図2]図 2 は、イムノクロマトグラフキットの一例を示す分解概略斜視図である。

[図3]図 3 は、検査用ストリップ、第一のポットおよび第二のポットの位置関係を示す模式側面図である。

発明を実施するための形態

[0012] 以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

本明細書において「～」を用いて示された数値範囲は、「～」の前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を意味する。

[0013] 本発明による測定対象物質の検出方法は、

測定対象物質を含む検体と抽出液との混合物と、測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した金属を含む標識物質とを接触させた状態で、不溶性担体上に展開すること；

測定対象物質に対する第二の結合物質、又は測定対象物質に対する第一の結合物質への結合性を有する物質を含む不溶性担体上の検出部位において、

測定対象物質と標識物質との複合体を捕捉すること；

捕捉した標識物質のシグナルを銀で増幅すること；および

増幅されたシグナルを検出すること；

を含み、上記抽出液が、下記式（１）で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤を含む、方法である。

本発明による測定対象物質の検出のためのキットは、下記式（１）で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤と、

測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した金属を含む標識物質と、

測定対象物質に対する第二の結合物質、又は測定対象物質に対する第一の結合物質への結合性を有する物質を含む不溶性担体と、

標識物質のシグナルを銀で増幅するための増幅液とを含むキットである。

式（１）： $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$

式中、 C_nH_{2n+1} は直鎖アルキル基であり、 n は１０～２０の整数を示し、 m は１８～２５の整数を示す。

[0014] 本発明者らは、抽出液を用いて銀増幅なしのイムノクロマトグラフ法を行ったが、予想した範囲内の効果であった。一方、式（１）で示される界面活性剤を添加した抽出液を用いて銀増幅イムノクロマトグラフ法を行った場合には、背景領域シグナルが低く、かつ病原体を高感度に検出することができ、予想外の有利な効果が得られた。この効果は、界面活性剤としてＴｗｅｅｎ ８０を添加した抽出液を用いる場合よりも優れた予想外の有利な効果である。

[0015] ＜クロマトグラフ方法＞

一般には、クロマトグラフ方法とは以下のような手法で測定対象物質を簡便、迅速かつ特異的に判定および測定する手法である。すなわち、測定対象物質と結合可能な結合物質（例えば、抗体）を有する検出部位の少なくとも一つを有する標識物質捕捉領域を有することが可能な結合物質固定化メンブレン（不溶性担体：多孔性担体）を固定相として用いる。この不溶性担体上で、測定対象物質に対する第一の結合物質によって修飾された標識物質を含

む液を移動層としてクロマトグラフ的に移動させると共に、測定対象物質と標識物質とが特異的に結合しながら、検出部位を有する標識物質捕捉領域まで到達する。標識物質捕捉領域の検出部位において、測定対象物質と標識物質の複合体が、固定化された第二の結合物質に特異的に結合することにより、被検試料中に測定対象物質が存在する場合にのみ、第二の結合物質に標識物質が濃縮されることを利用し、それらを目視または適当な機器を用いて被検試料中に測定対象物質が存在することを定性的および定量的に分析する手法である。

[0016] 本発明の方法においては、標識物質のシグナルを増幅するために使用する2種の増幅試薬、具体的には、銀を含む化合物と、銀イオンを還元し得る還元剤とを使用し、標識物質捕捉領域上の固定化試薬に結合した測定対象物質と標識物質の複合体を核として増幅反応によって、シグナルを増幅し、結果として高感度化を達成することができる。

[0017] <被検試料>

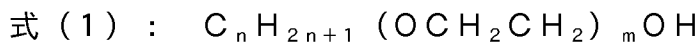
本発明の検出方法およびキットにより分析することのできる被検試料としては、測定対象物質を含む可能性のある試料である限り、特に限定されるものではない。例えば、生物学的試料、特に動物（特にヒト）の体液（例えば、全血、血清、血漿、髄液、涙液、汗、尿、膿、鼻汁、鼻腔拭い液、鼻咽頭拭い液、咽頭拭い液、鼻腔吸引液、唾液または喀痰）若しくは排泄物（例えば、糞便）、臓器、組織、粘膜や皮膚、それらを含むと考えられる擦過検体（スワブ）、または動植物それ自体若しくはそれらの乾燥体を挙げることができる。

[0018] 本発明における測定対象物質は、特に限定されないが、例えば、SARS-CoV-2、インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、マイコプラズマ、肺炎球菌、A群連鎖球菌、ノロウイルス、ロタウイルス、およびサルモネラから選択される一つあるいは複数の病原体の抗原である。病原体の抗原としては、ヌクレオカプシドタンパク質またはその断片を挙げるができるが、特に限定されない。

[0019] <抽出液>

被検試料は、適当な抽出液との混合物として、不溶性担体上に展開される。抽出液は、通常の免疫学的分析法で用いられる溶媒（例えば、水、生理食塩液、または緩衝液等）と式（１）で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤とを含む。

[0020] 本発明で使用する非イオン性界面活性剤は、下記式（１）で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤である。



式中、 $C_n H_{2n+1}$ は直鎖アルキル基であり、 n は１０～２０の整数を示し、 m は１８～２５の整数を示す。ここで、 $C_n H_{2n+1}$ の末端の炭素原子が $(OCH_2CH_2)_m OH$ に結合している。

[0021] n は、好ましくは１２～１８の整数を示し、より好ましくは１２、１６又は１８を示す。

m は、好ましくは２０～２３の整数を示し、より好ましくは２０または２３を示す。

[0022] 式（１）で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤としては、特に好ましくは、ポリオキシエチレン２３ラウリルエーテル（商品名：Ｂｒｉｊ（登録商標）３５）、ポリオキシエチレン２０セチルエーテル（商品名：Ｂｒｉｊ（登録商標）５８）、およびポリオキシエチレン２０ステアリルエーテル（商品名：Ｂｒｉｊ（登録商標）Ｓ２０）からなる群から選択される一つ以上である。

ポリオキシエチレン２３ラウリルエーテル： $C_{12}H_{25}(OCH_2CH_2)_{23}OH$

ポリオキシエチレン２０セチルエーテル： $C_{16}H_{33}(OCH_2CH_2)_{20}OH$

ポリオキシエチレン２０ステアリルエーテル： $C_{18}H_{37}(OCH_2CH_2)_{20}OH$

[0023] 抽出液中の非イオン界面活性剤の濃度は、好ましくは０．０００１質量％～１０質量％であり、より好ましくは０．００１質量％～１．０質量％であ

る。

[0024] <構成>

本発明のキットにおいては、クロマトグラフ用ストリップを組み込み使用することができる。使用することのできるクロマトグラフ用ストリップとしては、通常のクロマトグラフ法に用いることができるクロマトグラフ用ストリップである限り、特に限定されるものではない。

[0025] 本発明において使用することができるクロマトグラフ用ストリップとしては、被検試料の展開方向の上流方向から下流方向に向かって、標識物質保持領域、標識物質捕捉領域を有している。好ましい態様においては、クロマトグラフ用ストリップは、更に、発色試薬を有する領域を有している。本発明において、より好ましい態様としては、発色試薬を有する領域は、標識物質捕捉領域の下流方向に位置している態様であり、更には、試料添加パッド、標識物質保持領域を有する標識物質保持パッド（例えば金コロイド抗体保持パッド）、不溶性担体である抗体固定化メンブレン（例えば、標識物質捕捉領域を有する抗体固定化メンブレン）、および吸水パッドをこの順に、粘着シート上に配置する態様が好ましく用いられる。不溶性担体である抗体固定化メンブレンとしては、測定対象物質と特異的に結合する結合物質を固定化した検出部位を少なくとも一つ有する領域である標識物質捕捉領域を有し、所望により、コントロール用抗体または抗原を固定化した領域であるコントロール部位（コントロール領域と記載することもある）を更に有していてもよい。

[0026] 本発明で用いることができる標識物質保持領域を有する標識物質保持パッドは、標識物質を含む懸濁液を調製し、その懸濁液を適当な吸水パッド（例えば、グラスファイバーパッド）に塗布した後、それを乾燥することにより調製することができる。

[0027] <標識物質>

本発明で用いる標識物質としては、金属を含む標識物質を用いる。本発明で用いることができる金属の種類としては、好ましくは、金、銀、白金の貴

金属や、鉄、鉛、銅、カドミウム、ビスマス、アンチモン、錫、または水銀を用いることができ、それらの化合物を用いることができる。更に好ましくは金、銀、白金の貴金属を用いることができる。本発明において使用できる金属を含む標識物質の好ましい形態としては、金属コロイド標識または金属硫化物標識を用いることができる。本発明においては、金属コロイド標識としては、好ましくは、白金コロイド、金コロイド、銀コロイド、鉄コロイド、または水酸化アルミニウムコロイドなどを用いることができ、金属硫化物標識としては、好ましくは、鉄、銀、鉛、銅、カドミウム、ビスマス、アンチモン、錫、または水銀の各硫化物を用いることができる。本発明においては更に好ましくは、白金コロイド、金コロイド、銀コロイド、最も好ましくは金コロイドを用いることができる。金属コロイド標識として金コロイド粒子を用いる場合には、市販のものを用いてもよい。あるいは、常法、例えば塩化金酸をクエン酸ナトリウムで還元する方法（Nature Physical Science, 241 (1973) 20等）により金コロイド粒子を調製することができる。

[0028] 金属コロイドの平均粒径としては、約1 nm～500 nmが好ましく、3～100 nmがさらに好ましく、5～60 nmが特に好ましい。金属コロイドの平均粒径は、市販の粒度分布計等で計測することができる。粒度分布の測定法としては、光学顕微鏡法、共焦点レーザー顕微鏡法、電子顕微鏡法、原子間力顕微鏡法、静的光散乱法、レーザー回折法、動的光散乱法、遠心沈降法、電気パルス計測法、クロマトグラフィー法、超音波減衰法等が知られており、それぞれの原理に対応した装置が市販されている。

[0029] 平均粒径の測定方法としては、粒径範囲および測定の容易さから、動的光散乱法を好ましく用いることができる。動的光散乱を用いた市販の測定装置としては、ナノトラックUPA（日機装株式会社）、動的光散乱式粒径分布測定装置LB-550（株式会社堀場製作所）、濃厚系粒径アナライザーFPAR-1000（大塚電子株式会社）等が挙げられ、本発明においては、25℃の測定温度で測定したメジアン径（ $d = 50$ ）の値として平均粒径を

求める。

[0030] 本発明によれば、検出用の標識物質として金属コロイド標識または金属硫化物標識、その他金属合金標識（以下、金属系標識と称することがある）、また金属を含むポリマー粒子標識を用いるクロマトグラフにおいて、金属系標識の信号を増幅させることができる。具体的には、測定対象物質と検出用標識物の複合体の形成後に、無機銀塩や有機銀塩などの銀を含む化合物から供給される銀イオン、および銀イオンを還元し得る還元剤を接触させ、還元剤によって銀イオンを還元して銀粒子を生成させると、その銀粒子が金属系標識を核として金属系標識上に沈着するので、金属系標識が増幅され、測定対象物質の分析を高感度を実施することができる。即ち、本発明のクロマトグラフ方法においては、還元剤による銀イオンの還元作用により生じた銀粒子を用いて、免疫複合体の標識に沈着させる反応を実施し、こうして増幅された信号を分析する。

[0031] <結合物質>

本発明では、標識物質は、測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾されている。第一の結合物質とは、例えば測定対象物質（抗原）に対する抗体、測定対象物質（抗体）に対する抗原、測定対象物質（たんぱく質、低分子化合物等）に対するアプタマーなど、測定対象物質に対して親和性を持つ化合物であれば何でもよい。

[0032] 本発明におけるキットは、測定対象物質に対する第二の結合物質または上記第一の結合物質に対する結合物質を標識物質捕捉領域に有している。測定対象物質に対する第二の結合物質とは、例えば測定対象物質（抗原）に対する抗体、測定対象物質（抗体）に対する抗原、測定対象物質（たんぱく質、低分子化合物等）に対するアプタマーなど、測定対象物質に対して親和性を持つ化合物であれば何でもよい。また、第二の結合物質と第一の結合物質とは異なるものでも良いし、同一のものでもよい。第一の結合物質に対する結合物質とは、測定対象物質そのものでもよいし、第一の結合物質が認識する部位を持つ化合物でもよく、たとえば測定対象物質の誘導体とタンパク質（

例えばB S A など) とを結合させたような化合物などがそれにあたる。

[0033] 好ましくは、第一の結合物質、及び第二の結合物質の少なくともいずれか一方が抗体である。より好ましくは、第一の結合物質が抗体であり、第二の結合物質が抗体である。

[0034] 本発明の検出方法において、測定対象物質に対する抗体としては、特に限定されるものではないが、例えば、測定対象物質によって免疫された動物の血清から調製する抗血清、抗血清から精製された免疫グロブリン画分、その測定対象物質によって免疫された動物の脾臓細胞を用いる細胞融合によって得られるモノクローナル抗体、あるいは、それらの断片〔例えば、F (a b ') 2、F a b、F a b'、またはF v〕または一本鎖抗体 (s c F v など) を用いることができる。これらの抗体の調製は、常法により行うことができる。

[0035] 本発明において、第一の結合物質を用いて標識物質を修飾する方法としては、例えば、金属コロイドと結合物質との結合の場合は、以下に記載されている従来公知の方法 (例えばThe Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 30, 7 (1982) 691-696) に従い、行うことができる。具体例としては、金属コロイドと特異結合物質 (例えば抗体) を適当な緩衝液中で室温下5分以上混合する。反応後、遠心分離により得た沈殿を、ポリエチレングリコール等の分散剤を含む溶液中に分散させることにより、目的の金属コロイド標識特異結合物質を得ることができる。

[0036] <不溶性担体>

本発明で用いることができる不溶性担体としては、特に、ニトロセルロース担体 (ニトロセルロース膜など)、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、または糸等が好ましい。

[0037] 本発明においては、不溶性担体の標識物質捕捉領域に、測定対象物質に対する第二の結合物質を固定化させた検出部位を有する。測定対象物質に対す

る第二の結合物質は、不溶性担体の一部に物理的または化学的結合により直接固定化させて検出部位を形成させてもよいし、あるいはラテックス粒子などの微粒子に物理的または化学的に結合させ、この微粒子を不溶性担体の一部にトラップさせて固定化させ、検出部位を形成してもよい。なお、不溶性担体は、測定対象物質に対する第二の結合物質を固定化した後、不活性蛋白による処理等により非特異的吸着防止処理を施して使用することが好ましい。不溶性担体は、結合部位を複数有している態様も好ましく用いることができ、更には標識物質捕捉領域の一部として、所望により、上述のコントロール部位を有していてもよい。

[0038] <標識物質保持パッド>

本発明においては、標識物質保持領域を有する標識物質保持パッド、好ましくは金コロイド保持パッドをクロマトグラフキットに組み込んで使用する態様が好ましい。標識物質保持パッドの素材としては、例えば、セルロース濾紙、グラスファイバー、および不織布等を好ましく使用することができ、前述のように調製した標識物質を一定量含浸し、乾燥させて標識物質保持領域とすることができる。

[0039] <試料添加パッド>

本発明におけるキットは更に、試料添加パッドを組み込み使用することが好ましい。試料添加パッドは、添加された測定対象物質を含む試料を受け入れるだけでなく、試料中の不溶物粒子等を濾過する機能をも兼ねる態様が好ましい。試料添加パッドの材質としては、セルロース濾紙、ガラス繊維、ポリウレタン、ポリアセテート、酢酸セルロース、ナイロン、および綿布等の均一な特性を有するものが挙げられる。また、分析の際、試料中の測定対象物質が試料添加パッドの材質に非特異的に吸着し、分析の精度を低下させることを防止するため、試料添加部を構成する材質は、予め非特異的吸着防止処理して用いることもできる。本発明においては、試料添加パッドは、標識物質保持領域を有する標識物質保持パッドを兼ねていてもよい。

[0040] <吸水パッド>

本発明においては、好ましくは、吸水パッドをキットに組み込んで用いることができる。吸水パッドは、添加された試料がクロマト移動により物理的に吸収されると共に、クロマトグラフ担体の検出部に不溶化されない未反応標識物質等を吸収除去する部位であり、セルロース濾紙、不織布、布、セルロースアセテート等吸水性材料が用いられる。添加された試料のクロマト先端部が吸水パッドに届いてからのクロマトの速度は、吸水パッドの材質、大きさなどにより異なるので、その選定により測定対象物質の測定に合った速度を設定することができる。

[0041] <銀イオンを還元し得る還元剤を検出するための発色試薬>

本発明におけるキットにおいては、発色試薬を、不溶性担体に担持させてもよい。

[0042] 本発明において、銀イオンを還元し得る還元剤を検出するための発色試薬としては、例えば、イオンに反応して発色する化合物を使用することが好ましい。第一の増幅試薬については本明細書中で後記するが、例えば、第一の増幅試薬が、2価の鉄イオン (Fe^{2+}) を含む試薬である場合には、その発色試薬としては、 Fe^{2+} イオンと反応して発色する化合物を使用することができる。 Fe^{2+} イオンと反応して発色する化合物としては、 Fe^{2+} イオンと錯形成することで発色できる化合物を使用することができる。 Fe^{2+} イオンと反応して発色する化合物の具体例としては、フェナントロリン骨格を有する化合物 [例えば、1, 10-フェナントロリン、5-メチルフェナントロリン、5-ニトロフェナントロリン、バソフェナントロリン (4, 7-ジフェニル-1, 10-フェナントロリン)、またはバソフェナントロリンジスルホン酸など]、あるいはピピリジン骨格を有する化合物 [例えば、2, 2'-ピピリジンなど] を使用することができ、好ましくはフェナントロリン骨格を有する化合物を使用することができる。また、被検試料を含む水溶液と第一の増幅試薬を含む水溶液のpHが異なる場合には、第一の増幅試薬を検出するために、 H^+ イオンにより構造変化が起こって色味が変化する試薬を好ましく使用することができる。特に第一の増幅試薬を含む水溶液が酸性（

pH 7より小さい、 H^+ イオン濃度が高い)である場合には、酸性領域用のpH指示薬として公知の発色試薬である H^+ イオンと反応して発色する化合物(例えば、メチルオレンジ、メチルレッド、コンゴーレッドおよびメチルイエローなどのジアゾ系の発色試薬、並びに、チモールブルー、ブロモクレゾールグリーン、ブロモクレゾールパープルおよびブロモチモールブルーなどのサルトン系の発色試薬)等を、増幅試薬を含む水溶液のpHに合わせて適宜選択して使用することが好ましい。上記の中でも、1,10-フェナントロリン、バソフェナントロリンまたはブロモクレゾールグリーンをより好ましく使用できる。

[0043] 発色試薬としては、被検試料を含む水溶液または銀イオンを還元し得る還元剤を含む水溶液のいずれかを展開した際に、不溶性担体中を実質的に移動しない発色試薬であることが好ましい。従って、発色試薬のLogP(水とオクタノール中での分配係数)が4.0以上であることが好ましく、5.0以上であることがより好ましい。LogPとしては実測値を用いてもよいが、簡便に判断する方法として、化学構造等から得られる計算値を用いることもできる。LogPを計算する方法としては、CambridgeSoft社のChemDrawPro version 12で使用されている計算方法が好ましい。代表的な発色試薬の応答性およびLogP(ChemDrawPro version 12による)を以下の表1に示した。

[0044]

[表1]

化合物名	応答性	L o g P
2, 2' -ビピリジン	F e 2 + 応答	1.88
パソフェナントロリンジスルホン酸	F e 2 + 応答	0.52
1, 10 -フェナントロリン	F e 2 + 応答	2.2
5 -メチルフェナントロリン	F e 2 + 応答	2.69
5 -ニトロフェナントロリン	F e 2 + 応答	2.34
チモールブルー	p H 応答	4.01
メチルオレンジ	p H 応答	2.95
メチルレッド	p H 応答	3.63
コンゴーレッド	p H 応答	3.63
メチルイエロー	p H 応答	4.76
パソフェナントロリン	F e 2 + 応答	5.55
プロモクレゾールグリーン	p H 応答	7.99
プロモクレゾールパープル	p H 応答	6.33
プロモチモールブルー	p H 応答	8.8

[0045] 発色試薬を有する領域が、不溶性担体の検出部位を有する標識物質捕捉領域より下流に位置していることが好ましい。発色試薬をクロマトグラフキット内に保持する方法としては、後述する吸水パッドを発色試薬溶液に浸し減圧乾燥する方法、不溶性担体の標識物質捕捉領域よりも下流方向にライン状に塗布する方法などがある。

被検試料を含む水溶液または第一の増幅試薬を含む水溶液のいずれかを展開した際に、発色試薬が不溶性担体を実質的に移動する場合には、発色試薬を吸水パッドに含有させて使用することが好ましい。

[0046] 被検試料を含む水溶液または第一の増幅試薬を含む水溶液のいずれかを展開した際に、発色試薬が不溶性担体中を実質的に移動しない場合には、標識物質捕捉領域を有する不溶性担体に発色試薬を担持させることが好ましい。

標識物質捕捉領域に第一の増幅試薬が到達したことをより小さいタイムラグで表示することを可能とするため、本発明においては発色試薬を不溶性担体に担持させる態様がより好ましい。

[0047] 本発明において、測定対象物質を含む混合物が添加される領域と、標識物

質捕捉領域とを、測定対象物質を含む混合物の展開方向に対して上流から下流の方向にこの順番で有するとは、測定対象物質を含む混合物を毛管現象や、吸水パッドを使用した場合の吸引力等を利用して展開させる場合に、測定対象物質を含む混合物の展開方向に対して、上流方向、下流方向と定義する。本発明の具体的な態様では、標識物質保持領域から標識物質捕捉領域に向かって測定対象物質を含む混合物を展開した場合に、標識物質保持領域の方向を上流方向、標識物質捕捉領域の方向を下流方向と定義する。

[0048] 本発明の好ましい態様においては、標識物質捕捉領域に捕捉された標識物質のシグナルを増幅するために使用する2種の増幅試薬のうちの第一の増幅試薬を、標識物質捕捉領域の上流方向から標識物質捕捉領域の下流方向に展開し、発色試薬を有する領域における物理的または化学的变化を検出することによって、標識物質捕捉領域が第一の増幅試薬で満たされていることを確認する。発色試薬を有する領域における物理的または化学的变化としては、第一の増幅試薬と発色試薬との反応によって生じる発色や蛍光の変化等を検出することができる。好ましくは発色を検出することができる。このような物理的または化学的变化は、視覚的に検出してもよいし、検出機器を利用して検出してもよい。

[0049] <検出方法>

以下、本発明の検出方法について、その具体的な実施態様であるサンドイッチ法について説明する。

サンドイッチ法では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により測定対象物質の分析を実施することができる。まず、測定対象物質に対する第一の結合物質および測定対象物質に対する第二の結合物質を予め調製しておく。また、第一の結合物質で、予め標識物質を修飾しておく。第二の結合物質を、適当なクロマトグラフ担体（不溶性担体）（例えば、ニトロセルロース膜、ガラス繊維膜、ナイロン膜、またはセルロース膜等）上に固定して標識物質捕捉領域とし、測定対象物質を含む可能性のある被検試料を含む混合物と接触させると、その被検試料中に測定対象物質が存在する場

合には、第二の結合物質との結合（例えば、第二の結合物質との抗原抗体反応）が起こる。測定対象物質と第二の結合物質との結合と同時にまたは結合後に、更に第一結合物質で修飾した標識物質を過剰量接触させると、被検試料中に測定対象物質が存在する場合には、固定化された第二の結合物質と、測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した標識物質とからなる複合体が形成される。

[0050] サンドイッチ法では、固定化された第二の結合物質と測定対象物質、および測定対象物質と標識物質を修飾した第一の結合物質との反応が終了した後、免疫複合体を形成しなかった標識物質を除去し、続いて、例えば、不溶性担体の標識物質捕捉領域をそのまま観察しその標識物質を検出、または定量し、被検試料中の測定対象物質の有無の判定を行うか、または量を測定することができる。本発明においては、例えば、還元剤および銀イオン含有化合物を供給することにより、かかる複合体を形成した標識物質からの信号を増幅し検出する。

[0051] <増幅試薬>

本発明においては、銀を含む化合物及び銀イオンのための還元剤を含む増幅液を用いて、捕捉した標識物質のシグナルを増幅する。

増幅試薬は、標識物質や測定対象物質の作用により、触媒的に反応することで、着色した化合物や発光などを生じ、シグナルの増幅を起こすことができる試薬であり、試薬を含有する溶液の状態、即ち増幅液として使用することができる。例えば、金属標識上で、物理現像により金属銀の析出を起こす銀イオン溶液や、ペルオキシダーゼ標識と過酸化水素の作用により色素となる、フェニレンジアミン化合物とナフトール化合物の溶液などが挙げられる。

[0052] 詳細には、写真化学の分野での一般書物（例えば、「改訂写真工学の基礎—銀塩写真編—」（日本写真学会編、コロナ社）、「写真の化学」（笹井明、写真工業出版社）、「最新処方ハンドブック」（菊池真一他、アミコ出版社））に記載されているような、いわゆる現像液を、増幅試薬を含有する増

幅液として用いることができ、液中に銀イオンを含み、液中の銀イオンが現像の核となるような金属コロイド等を中心に還元される、いわゆる物理現像液であれば、特に限定されることなく増幅液として用いることができる。

[0053] 本発明のキットは、銀を含む化合物と、銀イオンを還元し得る還元剤とを含む。増幅液の具体例としては、銀イオンを還元し得る還元剤を含む第一の増幅液、および、銀を含む化合物を含む第二の増幅液の組み合わせを用いることができる。

[0054] 本発明においては、標識物質捕捉領域に捕捉された標識物質のシグナルを増幅するために使用する2種の増幅試薬のうち、第一の増幅試薬を第一の増幅液に、第二の増幅試薬を第二の増幅液に含有させておき、第一の増幅液および第二の増幅液を順次、添加することにより増幅を行うことが好ましい。第一の増幅液は、標識物質保持パッドおよび試料添加パッドよりも上流方向に位置する、還元剤溶液を送液するためのパッドに添加することが好ましい。

以下、第一の増幅液に含まれる銀イオンを還元し得る還元剤と第二の増幅液に含まれる銀を含む化合物等について説明する。

[0055] <銀を含む化合物>

銀を含む化合物としては、銀イオン含有化合物、例えば、有機銀塩、無機銀塩、もしくは銀錯体を用いることができる。好ましくは、水などの溶媒に対して溶解度の高い銀イオン含有化合物であり、硝酸銀、酢酸銀、乳酸銀、酪酸銀、チオ硫酸銀などが挙げられる。特に好ましくは硝酸銀である。銀錯体としては、水酸基やスルホン基など水溶性基を有する配位子に配位された銀錯体が好ましく、ヒドロキシチオエーテル銀等が挙げられる。

[0056] 無機銀塩、もしくは銀錯体は、銀として一般に $0.001 \text{ mol/m}^2 \sim 0.2 \text{ mol/m}^2$ 、好ましくは $0.01 \text{ mol/m}^2 \sim 0.05 \text{ mol/m}^2$ 含有されることが好ましい。

[0057] <銀イオンを還元し得る還元剤>

銀イオンを還元し得る還元剤は、銀イオンを銀に還元することができれば

、無機・有機のいかなる材料、またはその混合物でも用いることができる。

無機還元剤としては、 Fe^{2+} 、 V^{2+} 、 Ti^{3+} 、などの金属イオンで原子価の変化し得る還元性金属塩、還元性金属錯塩を好ましく挙げることができる。無機還元剤を用いる際には、酸化されたイオンを錯形成するか還元して、除去するか無害化する必要がある。例えば、 Fe^{2+} を還元剤として用いる系では、クエン酸やEDTAを用いて酸化物である Fe^{3+} の錯体を形成し、無害化することができる。本系ではこのような無機還元剤を用いることが好ましく、より好ましくは Fe^{2+} の金属塩が好ましい。

[0058] なお、湿式のハロゲン化銀写真感光材料に用いられる現像主薬（例えばメチル没食子酸塩、ヒドロキノン、置換ヒドロキノン、3-ピラゾリドン類、p-アミノフェノール類、p-フェニレンジアミン類、ヒンダードフェノール類、アミドキシム類、アジン類、カテコール類、ピロガロール類、アスコルビン酸（またはその誘導体）、およびロイコ色素類）、および本分野での技術に熟練している者にとって明らかなその他の材料、例えば米国特許第6,020,117号に記載されている材料も用いることができる。

[0059] 還元剤としては、アスコルビン酸還元剤も好ましい。有用なアスコルビン酸還元剤は、アスコルビン酸と類似物、異性体とその誘導体を含み、例えば、D-またはL-アスコルビン酸とその糖誘導体（例えばγ-ラクトアスコルビン酸、グルコアスコルビン酸、フコアスコルビン酸、グルコヘプトアスコルビン酸、マルトアスコルビン酸）、アスコルビン酸のナトリウム塩、アスコルビン酸のカリウム塩、イソアスコルビン酸（またはL-エリスロアスコルビン酸）、その塩（例えばアルカリ金属塩、アンモニウム塩または当技術分野において知られている塩）、エンジオールタイプのアスコルビン酸、エナミノールタイプのアスコルビン酸、チオエノールタイプのアスコルビン酸等を好ましく挙げることができ、特にはD、LまたはD、L-アスコルビン酸（そして、そのアルカリ金属塩）若しくはイソアスコルビン酸（またはそのアルカリ金属塩）が好ましく、ナトリウム塩が好ましい塩である。必要に応じてこれらの還元剤の混合物を用いることができる。

[0060] <その他の助剤>

増幅液のその他の助剤としては、緩衝剤、防腐剤、例えば酸化防止剤または有機安定剤、速度調節剤を含む場合がある。緩衝剤としては、例えば、酢酸、クエン酸、水酸化ナトリウムまたはこれらのどれかの塩、またはトリス（ヒドロキシメチル）アミノメタンを用いた緩衝剤、その他一般的化学実験に用いられる緩衝剤を用いることができる。これら緩衝剤を適宜用いて、その増幅溶液に最適なpHに調整することができる。また、カブリ防止剤としてアルキルアミンを添加剤として用いることができ、特に好ましくはドデシルアミンである。またこれら添加剤の溶解性向上のため、界面活性剤を用いることができ、特に好ましくは $C_9H_{19}-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_{50}H$ である。

[0061] 増幅試薬をクロマトキットに点着する方法としては、還元剤溶液を送液するためのパッドに第一の増幅液としての還元剤溶液を点着し、標識物質捕縛領域を含む領域に、上から第二の増幅液としての銀イオン溶液を点着して、銀イオン溶液を不溶性担体の厚み方向に浸潤させる方法が好ましい。

2種の増幅試薬をクロマトキットに内蔵する方法としては、各増幅試薬を含む溶液を含むポットを、各増幅試薬を点着する部位の上部に配置する方法が挙げられる。還元剤溶液（第一の増幅液）を、還元剤溶液を送液するためのパッドの上部に置き、銀イオン溶液（第二の増幅液）を含むポットを銀イオン溶液充填孔のすぐ上部に設置することが好ましい。このように配置することにより、それぞれのポットを押すことで液が流れ、所定の部位に点着することができる。

[0062] <クロマトグラフキット>

本発明のキットにおいては、測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した標識物質を予め不溶性担体上に具えているものでもよいし、あるいは、測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した標識物質を不溶性担体とは別に具えているものでもよい。この場合、不溶性担体とは別に具えられた、測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した標識物質を、被検試料と混

合した後に不溶性担体上を展開するなどの方法で測定を行うことができる。

[0063] 本発明のキットは、反応部位を有する不溶性担体と、銀を含む化合物と、銀イオンを還元し得る還元剤とを内包するハウジングケースとを備えていてもよい。

本発明のキットは、破断可能な部材を備えたポットをさらに含み、銀を含む化合物と、銀イオンを還元し得る還元剤とがそれぞれ上記ポットに封入されていてもよい。この場合、上記ポットが、外力によって破断することができる。

[0064] 図1は、イムノクロマトグラフキット100の概略斜視図であり、図2は、図1のイムノクロマトグラフキット100の分解概略斜視図である。

図1および図2に示すように、本実施形態のイムノクロマトグラフキット100は、試料液を展開させる、測定対象物質の検査領域を有する不溶性担体2を含む検査用ストリップ1と、検査領域における検出信号を増幅するための、第一の増幅液41および第二の増幅液46がそれぞれ封入された、シート部材を備えた一面を有する第一のポット40および第二のポット45とがハウジングケース9に内包されてなる。ハウジングケース9は、検査用ストリップ1が配置される収容部21を備えた下部ケース20と、下部ケース20と周縁で接合された上部ケース10と、上部ケース10と下部ケース20との間に配置された中間部材30とを備えてなる。なお、本イムノクロマトグラフキット100を説明するに当たっては、上部ケース10側を上、下部ケース20側を下と定義する。

[0065] 中間部材30は、第一のポット40を受容し、第一の増幅液41を不溶性担体2上に滴下させるための増幅液充填孔を底面に備えたポット収容部32を有している。また、ポット収容部32内の第一のポット40のシート部材43に面する位置にシート部材43を破断する突起状の破断部34が設けられている。本例においては、ポット収容部32の上方に第一のポット40が、そのシート部材43を有する面が下面となるように配置されており、そのシート部材43に対向するポット収容部32の底面に破断部34が設けられ

ている（図3参照）。

[0066] また中間部材30のポット収容部32の底面の下流側に延在する流路形成部35を備えている。流路形成部35は、検査領域 L_1 、確認領域 L_2 および増幅指標領域 L_3 の上方位置に一致して配置され、これらの領域 $L_1 \sim L_3$ を視認可能とするために透明な材料で形成されている。

[0067] 上部ケース10は、第一のポット40に対向する部分に、外部から押圧力が加えられることにより、第一のポット40側に変形してその第一のポット40のシート部材43を中間部材30の破断部34により破断させる第一の凸状変形部12を備えている。また、上部ケース10は、第二のポット45に対向する部分に、外部から押圧力を加えることにより、第二のポット45側に変形して第二のポット45のシート部材48を破断する第二の凸状変形部14を備えている。

[0068] また、上部ケース10には、試料液滴下用開孔16が設けられており、この開孔16から検査用ストリップ1の標識保持パッド3上に試料液が滴下される。開孔16と標識保持パッド3との位置が一致するように、標識保持パッド3の位置を調整することで、標識保持パッド3上に確実に試料液を点着することが可能となる。また、上部ケース10は、中間部材30の流路形成部35に対応する位置に3つの領域 $L_1 \sim L_3$ を視認するための観察窓18を備えている。

[0069] 下部ケース20には、検査用ストリップ1が配置される収容部として、不溶性担体2が載置される不溶性担体収容部21およびその下流側に吸収パッド6が載置される吸収パッド収容部22が設けられている。また、不溶性担体収容部21の上流側には第二のポット45が収容される第二のポット収容部24が設けられている。

[0070] 図3は、検査用ストリップ1、中間部材30および2つのポット40、45の位置関係を示す模式的断面図である。検査用ストリップ1は、図3に示すように、試料液を展開させる不溶性担体2と、不溶性担体2上に固定された結合物質で修飾された標識物質を含む標識保持パッド3と、不溶性担体2

の一端に接触して配置された第二の増幅液 4 6 を不溶性担体 2 に送液する送液用パッド 4 と、不溶性担体 2 の他端に接触して配置された吸収パッド 6 とを備えている。不溶性担体 2 はバック粘着シート 7 上に固定されて支持されている。そして、不溶性担体 2 は、標識保持パッド 3 と吸収パッド 6 との間に、検査領域 L_1 、確認領域 L_2 、増幅指標領域 L_3 を標識保持パッド 3 側から順に有する。

[0071] なお、本明細書において検査領域 L_1 、確認領域 L_2 および増幅指標領域 L_3 が形成されてなる不溶性担体 2 をクロマトグラフ担体と称する場合がある。また、本明細書においては、図 3 に記載のように送液用パッド 4 側を上流、吸収パッド 6 側を下流として定義する。

[0072] 中間部材 3 0 は検査用ストリップ 1 の下流端側の上部に位置されており、第一のポット 4 0 はシート部材 4 3 を下にして、中間部材 3 0 のポット収容部 3 2 中に配置されている。第二のポット 4 5 はシート部材 4 8 を上にして、下部ケース 2 0 の検査用ストリップ 1 の上流端の下方に収容されている。

[0073] 図 3 に示されているように、中間部材 3 0 の流路形成部 3 5 の裏面 3 6 と、検査用ストリップ 1 の不溶性担体 2 との間には、隙間（クリアランス）D が形成される。この隙間 D は 0.01 mm ~ 1 mm の範囲にあることが好ましい。0.01 mm 以上であれば増幅液等を充分浸潤させることができ、1 mm 以下であれば毛細管力が発揮され、第一の増幅液 4 1 により不溶性担体 2 と中間部材 3 0 の隙間を均一に満たすことが可能である。

[0074] 第一の増幅液 4 1 が封入された第一のポット 4 0 は、例えば樹脂材料から構成された一面に開口を有する容器 4 2 に第一の増幅液 4 1 が充填され、その容器 4 2 の開口が破断可能なシート部材 4 3 により覆われ封止されている。

第二の増幅液 4 6 が封入された第二のポット 4 5 も同様に、例えば樹脂材料から構成された一面に開口を有する容器 4 7 に第二の増幅液 4 6 が充填され、その容器 4 7 の開口が破断可能なシート部材 4 8 により覆われ封止されている。

第一のポット40および第二のポット45における破断可能なシート部材43、48としては、アルミ箔やアルミラミシートなどのラミネートフィルムが好適に使用される。ここで、破断とは、破れた後に再生しない状態をいう。

[0075] 以下に、本発明の実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明する。なお、以下の実施例に示される材料、使用量、割合、処理内容、処理手順等は、本発明の趣旨を逸脱しない限り適宜変更することができる。したがって、本発明の範囲は以下に示す具体例により限定的に解釈されるべきものではない。

実施例

[0076] <実施例1>

(1) イムノクロマトグラフキットの作製

(1-1) 測定対象物質に結合可能な第一の物質が修飾された標識物質としての抗NP抗体修飾金コロイドの作製

直径50nmの金コロイドを含有する溶液（品番：EM, GC50、BBI社製）9mLに50mmol/Lの KH_2PO_4 バッファ（pH8.0）を1mL加えてpHの調整を行い、その後、 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ の抗NPモノクローナル抗体（SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質を認識するモノクローナル抗体：GenScript社製clone ID「4H2G1」）含有溶液1mLを加えて10分間攪拌した。その後、10分間静置した後に、1質量%のポリエチレングリコール（PEG（polyethylene glycol）；重量平均分子量（Mw.）：20000、品番：168-11285、富士フイルム和光純薬株式会社製）含有水溶液を $550\mu\text{L}$ 加えて10分間攪拌し、続いて10質量%牛血清アルブミン（BSA（Bovine Serum Albumin）；Fraction V、品番：A-7906、SIGMA社製）の水溶液を1.1mL加えて10分間攪拌した。この溶液を遠心分離装置（himac CF16RX、日立株式会社製）を用いて、 $8000\times g$ 、 4°C の条件で30分間遠心分離した。

容器の底に1 mLを残して上澄み液を取り除き、超音波洗浄機により容器の底に残った1 mL液中に含まれる金コロイドを再分散した。その後、20 mLの金コロイド保存液（20 mmol/L Tris-HCl（トリス塩酸）バッファー（pH 8.2）、0.05% PEG（Mw. 20000）、150 mmol/L NaCl、1% BSA）に分散し、再び同じ遠心分離装置を用いて同様の条件で遠心分離を行い、上澄み液を取り除き、超音波分散後、金コロイド保存液に分散し、抗体修飾金コロイド（50 nm）溶液を得た。

[0077] （1-2）標識保持パッドとしての抗NP抗体修飾金コロイド保持パッドの作製

（1-1）で作成した抗NP抗体修飾金コロイドを、Tris-HClバッファー（pH 8.2）の濃度が20 mmol/L、PEG（Mw. 20000）の濃度が0.05質量%、スクロースの濃度が5質量%、そして光路長10 mmとしたときの金コロイドの520 nmの光学濃度が0.1となるように水で希釈し、金コロイド塗布液とした。この塗布液を、5 mm×300 mmに切ったグラスファイバーパッド（Glass Fiber Conjugate Pad、ミリポア社製）1枚あたり1 mLずつ均一に塗布し、24時間減圧乾燥することで抗NP抗体修飾金コロイド保持パッドを得た。

[0078] （1-3）クロマトグラフ担体の作製

不溶性担体として、60 mm×300 mmに切断したニトロセルロースメンブレン（プラスチックの裏打ちあり、HiFlow Plus HF135（キャピラリーフローレート=135秒/cm）、ミリポア社製）を用い、このメンブレン上に以下のような方法により、捕捉領域として、以下の3つの領域である、検出領域、確認領域および増幅指標領域を形成してクロマトグラフ担体を作製した。

[0079] ニトロセルロースメンブレンの60 mmの短辺のうちの下流側から15 mmの位置に、1.5 mg/mLとなるように調製した抗NPモノクローナル抗体（SARS-CoV-2のヌクレオカプシドタンパク質を認識するモノ

クローナル抗体：GenScript社製clone ID「3F9C12」) 溶液をライン状に塗布し検査領域とした。さらに60mmの短辺のうちの下流側から11mmの位置に、0.5mg/mLとなるように調製した抗マウスIgG抗体溶液をライン状に塗布し確認領域とした。さらに60mmの短辺のうちの下流側から9mmの位置に、30mmol/Lに調製したブロモクレゾールグリーン（富士フイルム和光純薬株式会社製）をライン状に塗布し増幅指標領域とした。それぞれの塗布の後にニトロセルロースメンブレンを、温風式乾燥機で50℃、30分間乾燥した。乾燥が終了した後、ブロッキング液（0.5質量%カゼイン（乳由来、品番030-01505、富士フイルム和光純薬株式会社製）を含有する50mmol/Lのホウ酸バッファー（pH8.5））500mLを入れたバットに、上記のように乾燥したニトロセルロースメンブレンを浸漬させてそのまま30分間静置した。その後ニトロセルロースメンブレンを取り出して、別のバットに準備した洗浄・安定化液（0.5質量%スクロースおよび0.05質量%コール酸ナトリウムを含む50mmol/L Tris-HCl（pH7.5）バッファー）500mL中にニトロセルロースメンブレンを浸し、そのまま30分間静置した。その後、ニトロセルロースメンブレンを液から取り出し、25℃の環境で24時間乾燥させた。抗NP抗体を固定化した部分が、測定対象物質に結合する第二の物質を含む検査領域、抗マウスIgG抗体を固定化した部分が、第一の物質に結合可能な物質を含む確認領域、ブロモクレゾールグリーンを固定した部分が、第一の増幅液と反応する物質を含む増幅指標領域にそれぞれ相当する。これら3つの領域を合わせて捕捉領域としている。

[0080] (1-4) 検査用ストリップの作製

バック粘着シート（60mm×300mm（Adhesives Research社製））に、（1-3）で作製したクロマトグラフ担体を貼り付けた。次に、クロマトグラフ担体の短辺のうちの下流側から26mmの位置に幅3mmの両面テープ（日東電工）を固定した。その後、両面テープの下流端と8mm×300mmに切ったグラスファイバーパッド（GlassF

iber Conjugate Pad、ミリポア社製）の下流端が重なるようにして金コロイド保持パッドをクロマトグラフ担体に固定した。送液用パッド（25 mm×300 mmに切ったグラスファイバーパッド（Glass Fiber Conjugate Pad、ミリポア社製））をクロマトグラフ担体の上流側に、送液用パッドとクロマトグラフ担体が7 mm重なるように貼り付けた。こうして作製した部材を、300 mmの長辺と垂直な方向に対して平行に、幅が5 mmとなるようにギロチン式カッター（CM4000、ニッポンテクノクラスタ社製）で切断し、60本の検査用ストリップ（但し、吸収パッドを含まない。）を作製した。

[0081] (1-5) 増幅液の作製

(1-5-1) 第二のポットに封入する増幅液（還元剤溶液）の作製

水290 gに、硝酸鉄（III）九水和物（富士フィルム和光純薬株式会社製、095-00995）を水に溶解して作製した1 mol/Lの硝酸鉄水溶液23.6 mL、クエン酸（富士フィルム和光純薬株式会社製、038-06925）13.1 gを溶解させた。全て溶解したら、スターラーで攪拌しながら硝酸（10重量%）溶液を36 mL加え、硫酸アンモニウム鉄（III）六水和物（富士フィルム和光純薬株式会社製、091-00855）を60.8 g加えた。このように調製した溶液を第二のポットに封入する第二の増幅液である還元剤溶液とした。

[0082] (1-5-2) 第一のポットに封入する増幅液（銀イオン溶液）の作製

水66 gに、硝酸銀溶液8 mL（10 gの硝酸銀を含む）と1 mol/Lの硝酸鉄水溶液24 mLを加えた。さらに、この溶液と、硝酸（10重量%）5.9 mL、ドデシルアミン（富士フィルム和光純薬株式会社製、123-00246）0.1 g、界面活性剤 $C_{12}H_{25}-C_6H_4-O-(CH_2CH_2O)_{50}H$ 0.1 gをあらかじめ47.6 gの水に溶解した溶液を混合し、これを第一のポットに封入する第一の増幅液である銀イオン溶液とした。

[0083] (1-6) 吸収パッドの作製

12 mm×10 mmに切ったグラスファイバーパッド（ガラス濾紙、アド

バンテック社製)を60枚準備し、吸収パッドとした。

[0084] (1-7) イムノクロマトグラフキットの部品作製

図1および図2に示すようなイムノクロマトグラフキット100を構成する下部ケース20、上部ケース10、中間部材30、および第一のポット40、第二のポット45を、ポリプロピレンを材料として射出成形によりそれぞれ作製した。上部ケースは住友化学株式会社製オレフィン系エラストマーであるタフセレン(登録商標)を50質量%含有するポリプロピレンを材料として射出成形により作製した。なお、上部ケース10は、2つの変形可能な部位(第一の凸状変形部と第二の凸状変形部と)を備え、この2つの変形部は上部ケース10と分離する部分はなく、すべての境界部で上部ケース10の一部として射出成形で作成した。

[0085] なお、実施例の上部ケースは、図1および図2に示す第一の凸状変形部12が2本の突起部を有し、第二の凸状変形部14が1本の突起部を有する構成とした。

[0086] (1-8) イムノクロマトグラフキットの作製

下部ケース20、(1-4)で作製した検査用ストリップ1と(1-6)で作製した吸収パッド6を、図1および図2に示すように固定した。次に、図3に示すように、第一のポット40、第二のポット45に、それぞれ、(1-5-2)、(1-5-1)で作製した第一のポット40に封入する第一の増幅液41、第二のポット45に封入する第二の増幅液46を充填し、シート部材48としてのアルミ箔でポット45を、シート部材43としてのアルミ箔でポット40をそれぞれ封止し、図1、および図2に示すように、第二のポット45を、シート部材48を上にして下部ケース20に、第一のポット40を、シート部材43を下にして中間部材30に装着した。そして、上部ケース10と下部ケース20とを外周同士が接触するように嵌め合わせた状態で、上部ケースと下部ケースとの接触部を超音波溶着により接合させた。このとき、溶着部位は密閉状態で均一にすべての部位で溶着されていることを確認した。このようにしてイムノクロマトグラフキットを作製した。

[0087] (2) サンプルの調製

(2-1) 界面活性剤不含抽出液の調製

トリスヒドロキシジメチルメタンを120gとカゼイン4g、及びEDTA・Na60gを超純水3280mLに溶解し、pH7.7になるように調整した後、4Lにメスアップした。

[0088] (2-2) 界面活性剤含有抽出液の調製

(2-1)で調製した界面活性剤不含抽出液にBrj35を0.1%となるように添加し、界面活性剤含有抽出液を調製した。

[0089] (2-3) ウイルス抽出液の調製

(2-2)で調製した界面活性剤含有抽出液を用いて、SARS-CoV2(ATCC VR-3347HK)の濃度が 1×10^8 、 1×10^7 、 1×10^6 、 1×10^5 、及び 1×10^4 copies/mLとなるように希釈した。

[0090] (2-4) イムノクロマトグラフキットを用いた測定

(2-3)で調液したウイルス抽出液をイムノクロマトグラフキットに24μL点着した。

[0091] 検体の点着直後に、第二の凸状変形部14を押下することで、第二のポット45に封入した第二の増幅液46を封止しているシート部材48のアルミ箔を破り、第二のポット45の中に送液用パッド4を浸すことにより、毛細管現象を利用して第二の増幅液46を不溶性担体2に供給した。

[0092] 増幅指標領域L₃が緑からオレンジに変色した後、第一の凸状変形部12を押下して第一のポット40を中間部材30の第一のポット収容部32の破断部34に向けて移動させることにより、第一のポット40を封止しているシート部材43のアルミ箔を破断部34により押し破り、第一の増幅液41である銀イオン溶液を中間部材30の開口部から不溶性担体2に供給して、銀増幅反応を行った。銀増幅反応は数十秒で完了した。

[0093] 銀増幅反応終了後、LAS4000(GE製)を用いて検査領域及び背景領域における呈色強度を測定し、検査領域強度から背景領域強度を差し引い

た Δ 強度を算出し、検出能力を次に記載の5段階に区分した。

－（濃度差なし）

±（微弱な濃度差）

＋（明確な濃度差）

＋＋（顕著な濃度差）

＋＋＋（更に顕著な濃度差）

[0094] ＜実施例2＞

実施例1（2－2）で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、界面活性剤としてBr i j 58を用いたこと以外は全て実施例1と同様にして実施例2の評価を行った。

[0095] ＜実施例3＞

実施例1（2－2）で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、界面活性剤としてBr i j S20を用いたこと以外は全て実施例1と同様にして実施例3の評価を行った。

[0096] ＜実施例4＞

実施例1（2－2）で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、Br i j 35を0.0001質量%、0.001質量%、0.01質量%、0.1質量%、1質量%、または10質量%となるように添加したこと以外は全て実施例1と同様にして実施例4の評価を行った。

[0097] ＜実施例5＞

実施例1（2－2）で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、Br i j 58を0.0001質量%、0.001質量%、0.01質量%、0.1質量%、1質量%、または10質量%となるように添加したこと以外は全て実施例1と同様にして実施例5の評価を行った。

[0098] ＜比較例1＞

実施例1（2－2）で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、界面活性剤を添加しなかったこと、及び実施例1（2－3）で記載した銀増幅反応を行わないで検査領域及び背景領域における呈色強度を測定したこと以

外は全て実施例 1 と同様にして比較例 1 の評価を行った。

[0099] <比較例 2>

実施例 1 (2-2) で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、界面活性剤として T w e e n 8 0 を用いたこと、及び実施例 1 (2-3) で記載した銀増幅反応を行わないで検査領域及び背景領域における呈色強度を測定したこと以外は全て実施例 1 と同様にして比較例 2 の評価を行った。

[0100] <比較例 3>

実施例 1 (2-2) で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、界面活性剤として T r i t o n X - 1 0 0 を用いたこと、及び実施例 1 (2-3) で記載した銀増幅反応を行わないで検査領域及び背景領域における呈色強度を測定したこと以外は全て実施例 1 と同様にして比較例 3 の評価を行った。

[0101] <比較例 4>

実施例 1 (2-3) で記載した銀増幅反応を行わないで検査領域及び背景領域における呈色強度を測定したこと以外は全て実施例 1 と同様にして比較例 4 の評価を行った。

[0102] <比較例 5>

実施例 1 (2-2) で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、界面活性剤を添加しなかったこと以外は全て実施例 1 と同様にして比較例 5 の評価を行った。

[0103] <比較例 6>

実施例 1 (2-2) で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、界面活性剤として T w e e n 8 0 を用いたこと以外は全て実施例 1 と同様にして比較例 6 の評価を行った。

[0104] <比較例 7>

実施例 1 (2-2) で記載した界面活性剤含有抽出液の調製において、界面活性剤として T r i t o n X - 1 0 0 を用いたこと以外は全て実施例 1 と同様にして比較例 7 の評価を行った。

[0105] <評価結果>

銀増幅イムノクロマトグラフ法と B r i j 3 5 の組み合わせの効果の評価結果を表 2 に示した。銀増幅イムノクロマトグラフ法では、銀増幅なしのイムノクロマトグラフ法と比較して、数十倍程度抗原の検出能力が向上した。銀増幅なしのイムノクロマトグラフ法では、B r i j 3 5 を使用しても抗原の検出能力は変化しなかったが、銀増幅イムノクロマトグラフ法では B r i j 3 5 を加えることで、主に、低濃度抗原における背景領域のシグナル強度を b l a n k と同じ程度まで抑えられるため、更に検出能力が数十倍程度上昇する、顕著な思いもよらない効果を確認できた。銀増幅イムノクロマトグラフ法における B r i j 3 5 と同様の感度向上効果は T w e e n 8 0 及び T r i t o n X - 1 0 0 では認められなかった。

[0106] 銀増幅イムノクロマトグラフ法と B r i j の種類別による効果の評価結果を表 3 に示した。B r i j 3 5、B r i j 5 8 及び B r i j S 2 0 は、いずれも銀増幅イムノクロマトグラフ法における感度向上効果があることを確認した。

[0107] 銀増幅イムノクロマトグラフ法における B r i j 使用量による感度向上効果の評価結果を表 4 に示した。B r i j 3 5、B r i j 5 8 及び B r i j S 2 0 は、いずれも 0. 0 0 1 % ~ 1. 0 % の間の濃度で、顕著な効果が現れることを確認した。

[0108]

[表2]

表 2 : 銀増幅と界面活性剤の組み合わせの効果

	抗 原 濃度	銀増幅なし (比較例1)				銀増幅なし+Tween80 (比較例2)				銀増幅なし+TritonX-100 (比較例3)			
		検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検 出 能力	検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検 出 能力	検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検 出 能力
検体濃度 (コピー /mL)	Blank	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—
	1×10 ⁴	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—
	1×10 ⁵	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—
	1×10 ⁶	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—
	1×10 ⁷	0.08	0.08	0	—	0.08	0.08	0	—	0.1	0.08	0.02	+
	1×10 ⁸	0.1	0.08	0.02	+	0.1	0.08	0.02	+	0.15	0.08	0.07	++

	抗 原 濃度	銀増幅なし+Brij35 (比較例4)				銀増幅あり (比較例5)				銀増幅あり+Tween80 (比較例6)			
		検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検 出 能力	検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検 出 能力	検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検 出 能力
検体濃度 (コピー /mL)	Blank	0.08	0.08	0	—	0.13	0.13	0	—	0.13	0.13	0	—
	1×10 ⁴	0.08	0.08	0	—	0.13	0.13	0	—	0.13	0.13	0	—
	1×10 ⁵	0.08	0.08	0	—	0.13	0.13	0	—	0.13	0.13	0	—
	1×10 ⁶	0.08	0.08	0	—	0.14	0.13	0.01	±	0.14	0.13	0.01	±
	1×10 ⁷	0.08	0.08	0	—	0.16	0.13	0.03	+	0.16	0.13	0.03	+
	1×10 ⁸	0.1	0.08	0.02	+	0.2	0.14	0.06	++	0.2	0.14	0.06	++

	抗 原 濃度	銀増幅あり+TritonX-100 (比較例7)				銀増幅あり+Brij35 (実施例1)			
		検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検 出 能力	検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検 出 能 力
検体濃度 (コピー /mL)	Blank	0.26	0.26	0	—	0.09	0.09	0	—
	1×10 ⁴	0.26	0.26	0	—	0.1	0.09	0.01	±
	1×10 ⁵	0.26	0.26	0	—	0.11	0.09	0.02	+
	1×10 ⁶	0.26	0.26	0	—	0.15	0.09	0.06	++
	1×10 ⁷	0.26	0.26	0	—	0.2	0.1	0.1	+++
	1×10 ⁸	0.26	0.26	0	—	0.26	0.12	0.14	+++

[0109]

[表3]

表 3 : 銀増幅と界面活性剤の種類による効果

	抗 原 濃度	銀増幅あり+Brij35 (実施例 1)				銀増幅あり+Brij58 (実施例2)				銀増幅あり+ Brij S20 (実施例3)			
		検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検出能 力	検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検出能 力	検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検出能 力
検体濃 度 (コピー /mL)	Blank	0.09	0.09	0	—	0.09	0.09	0	—	0.09	0.09	0	—
	1x10 ⁴	0.1	0.09	0.01	±	0.1	0.09	0.01	±	0.1	0.09	0.01	±
	1x10 ⁵	0.11	0.09	0.02	+	0.11	0.09	0.02	+	0.11	0.09	0.02	+
	1x10 ⁶	0.15	0.09	0.06	++	0.15	0.09	0.06	++	0.15	0.09	0.06	++
	1x10 ⁷	0.2	0.1	0.1	+++	0.2	0.1	0.1	+++	0.2	0.1	0.1	+++
	1x10 ⁸	0.26	0.12	0.14	+++	0.26	0.12	0.14	+++	0.26	0.12	0.14	+++

[0110] [表4]

表 4 : 銀増幅と界面活性剤の使用量による効果

	界面活性 剤濃度 (%)	銀増幅あり+Brij35 (実施例4)				銀増幅あり+Brij58 (実施例5)			
		検 査 領域	背 景 領域	Δ 強度	検出能 力	検査領 域	背景領 域	Δ 強度	検 出 能 力
検体濃度 1x10 ⁶ (コピ ー/mL)	0.0001	0.12	0.09	0.03	+	0.12	0.09	0.03	+
	0.001	0.15	0.09	0.06	++	0.15	0.09	0.06	++
	0.01	0.15	0.09	0.06	++	0.15	0.09	0.06	++
	0.1	0.15	0.09	0.06	++	0.15	0.09	0.06	++
	1	0.15	0.09	0.06	++	0.15	0.09	0.06	++
	10	0.15	0.12	0.03	+	0.15	0.12	0.03	+

符号の説明

- [0111] 1 検査用ストリップ
- 2 不溶性担体
- 3 標識保持パッド（グラスファイバーパッド）
- 4 送液用パッド
- 6 吸収パッド
- 7 バック粘着シート
- 9 ハウジングケース
- 10 上部ケース
- 12 第一の凸状変形部

- 1 4 第二の凸状変形部
- 1 6 試料液滴下用開孔
- 1 8 観察窓
- 2 0 下部ケース
- 2 1 不溶性担体収容部
- 2 2 吸収パッド収容部
- 2 4 第二のポットの収容部
- 3 0 中間部材
- 3 2 第一のポットの収容部
- 3 4 破断部
- 3 5 流路形成部
- 3 6 流路形成部 3 5 の裏面
- 4 0 第一の増幅液用の第一のポット
- 4 1 第一の増幅液
- 4 2 容器
- 4 3 シート部材
- 4 5 第二の増幅液用の第二のポット
- 4 6 第二の増幅液
- 4 7 容器
- 4 8 シート部材
- 1 0 0 イムノクロマトグラフキット
- L₁ 検査領域
- L₂ 確認領域
- L₃ 増幅指標領域
- D 隙間（クリアランス）

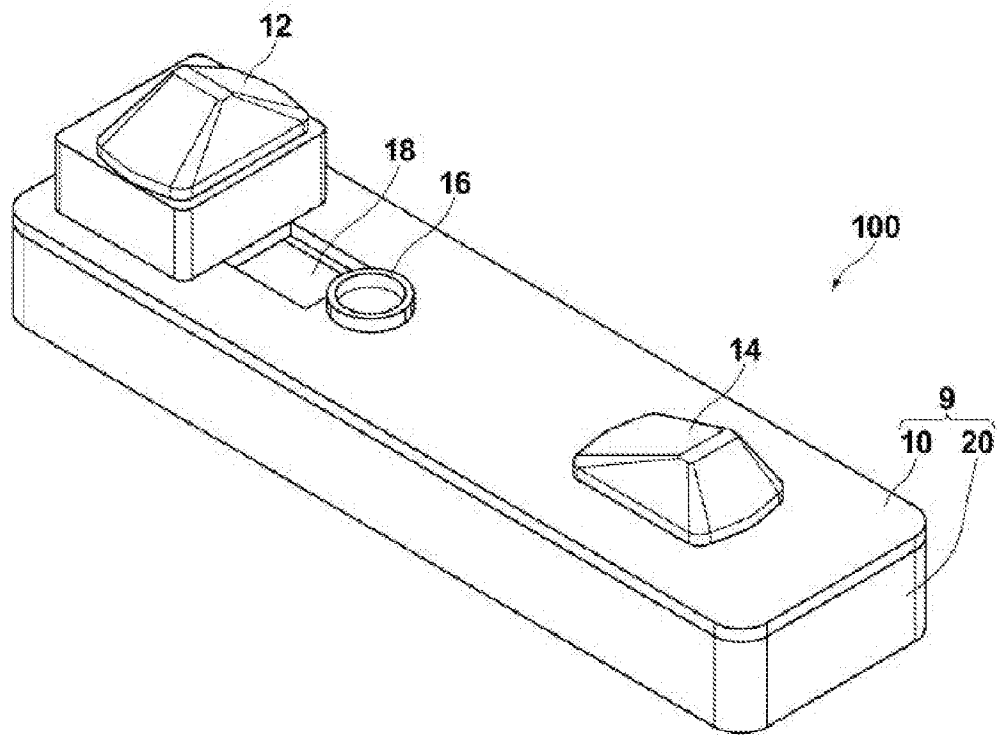
請求の範囲

- [請求項1] 測定対象物質を含む検体と抽出液との混合物と、測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した金属を含む標識物質とを接触させた状態で、不溶性担体上に展開すること；
- 測定対象物質に対する第二の結合物質、又は測定対象物質に対する第一の結合物質への結合性を有する物質を含む不溶性担体上の検出部位において、測定対象物質と標識物質との複合体を捕捉すること；
- 捕捉した標識物質のシグナルを銀で増幅すること；および
- 増幅されたシグナルを検出すること；
- を含む、測定対象物質の検出方法であって、前記抽出液が、下記式（1）で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤を含む、方法。
- 式（1）： $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$
- 式中、 C_nH_{2n+1} は直鎖アルキル基であり、 n は10～20の整数を示し、 m は18～25の整数を示す。
- [請求項2] 抽出液中の非イオン界面活性剤の濃度が、0.001質量%～1.0質量%である、請求項1に記載の方法。
- [請求項3] 測定対象物質が、SARS-CoV-2、インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、マイコプラズマ、肺炎球菌、A群連鎖球菌、ノロウイルス、ロタウイルス、およびサルモネラから選択される一つあるいは複数の病原体の抗原である、請求項1に記載の方法。
- [請求項4] 抗原がヌクレオカプシドタンパク質またはその断片である、請求項3に記載の方法。
- [請求項5] 第一の結合物質、及び第二の結合物質の少なくともいずれか一方が抗体である、請求項1から4の何れか一項に記載の方法。
- [請求項6] 捕捉した標識物質のシグナルを銀で増幅することを、銀を含む化合物及び銀イオンのための還元剤を含む増幅液を用いて行う、請求項1から4の何れか一項に記載の方法。

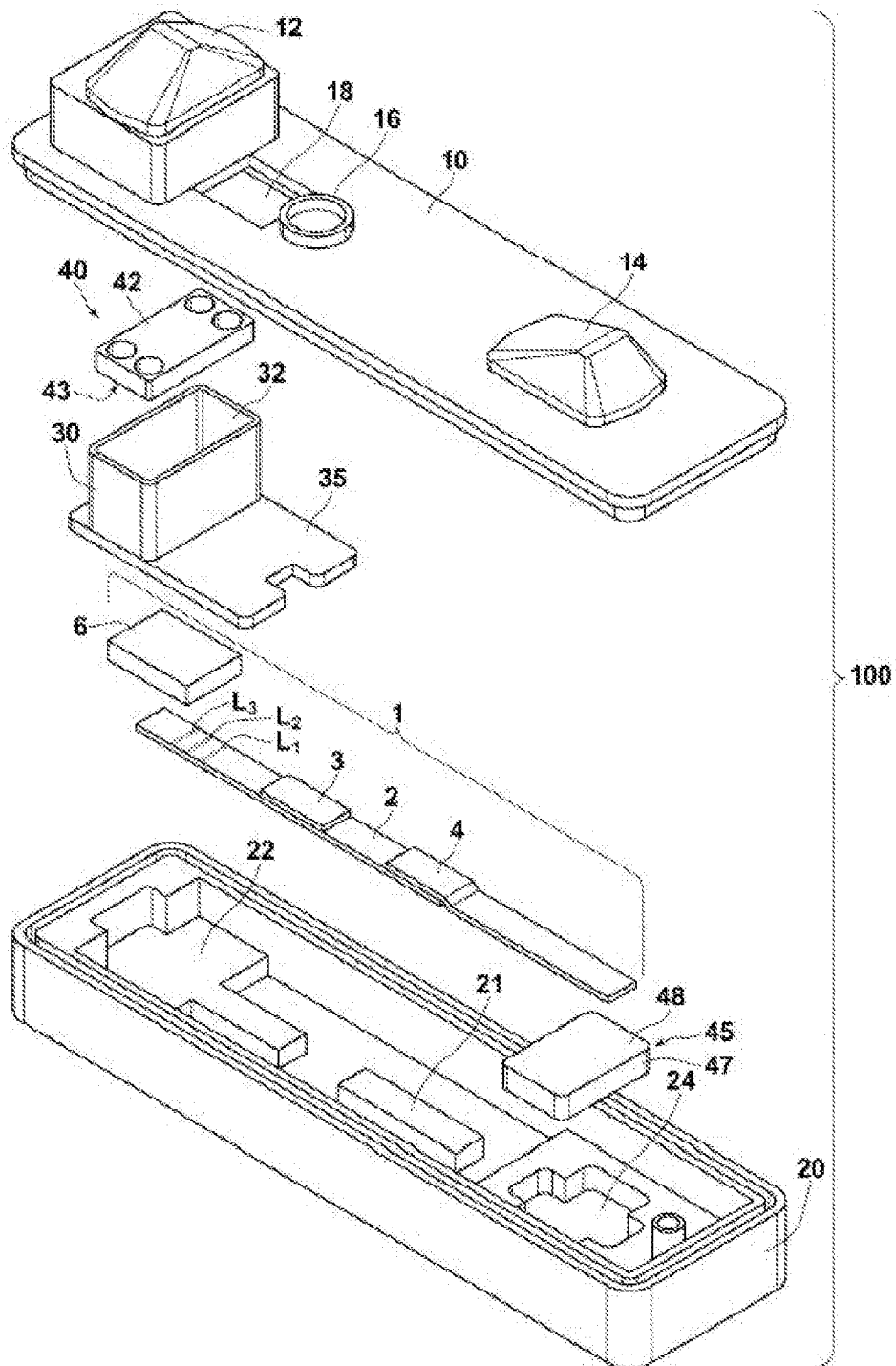
- [請求項7] 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン23ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン20セチルエーテル、およびポリオキシエチレン20ステアリルエーテルからなる群から選択される1以上である、請求項1から4の何れか一項に記載の方法。
- [請求項8] 下記式(1)で示される一つ以上の非イオン性界面活性剤と、
測定対象物質に対する第一の結合物質で修飾した金属を含む標識物質と、
測定対象物質に対する第二の結合物質、又は測定対象物質に対する第一の結合物質への結合性を有する物質を含む不溶性担体と、
標識物質のシグナルを銀で増幅するための増幅液とを含む、測定対象物質の検出のためのキット。
式(1) : $C_nH_{2n+1}(OCH_2CH_2)_mOH$
式中、 C_nH_{2n+1} は直鎖アルキル基であり、 n は10～20の整数を示し、 m は18～25の整数を示す。
- [請求項9] 非イオン界面活性剤が、非イオン界面活性剤を含む抽出液として提供され、抽出液中の非イオン界面活性剤の濃度が、0.001質量%～1.0質量%である、請求項8に記載のキット。
- [請求項10] 測定対象物質が、SARS-CoV-2、インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス、マイコプラズマ、肺炎球菌、A群連鎖球菌、ノロウイルス、ロタウイルス、およびサルモネラから選択される一つあるいは複数の病原体の抗原である、請求項8に記載のキット。
- [請求項11] 抗原がヌクレオカプシドタンパク質またはその断片である、請求項10に記載のキット。
- [請求項12] 第一の結合物質、及び第二の結合物質の少なくともいずれか一方が抗体である、請求項8から11の何れか一項に記載のキット。
- [請求項13] 増幅液が、銀を含む化合物及び銀イオンのための還元剤を含む、請求項8から11の何れか一項に記載のキット。

- [請求項14] 非イオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン23ラウリルエーテル、ポリオキシエチレン20セチルエーテル、およびポリオキシエチレン20ステアリルエーテルからなる群から選択される1以上である、請求項8から11の何れか一項に記載のキット。

[図1]



[図2]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/008964

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/543(2006.01)i; **G01N 21/78**(2006.01)i; **G01N 33/569**(2006.01)i
FI: G01N33/543 501M; G01N33/543 541Z; G01N33/569 L; G01N21/78 A

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/543; G01N21/78; G01N33/569

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 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

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	WO 2020/045524 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 05 March 2020 (2020-03-05) see entire text, all drawings, in particular, claims, examples	1-14
Y	YAMAOKA, Y et al, Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid pro, Cell Rep Med., 16 May 2021 see entire text, in particular, abstract, fig. 4, p. 5, left column, Development of rapid lateral flow immunochrom atographic assay	1-14
Y	WO 2012/018057 A1 (TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K.) 09 February 2012 (2012-02-09) see entire text, in particular, claims, paragraphs [0019]-[0062]	1-14
Y	WO 2013/145767 A1 (TANAKA KIKINZOKU KOGYO K.K.) 03 October 2013 (2013-10-03) see entire text, in particular, claims, paragraphs [0036], [0037]	1-14
A	WO 2021/193792 A1 (FUJIFILM CORPORATION) 30 September 2021 (2021-09-30) see entire text, all drawings, in particular, claims	1-14



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

13 May 2024

Date of mailing of the international search report

28 May 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/008964

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2018-072209 A (PRIMA MEAT PACKERS LTD.) 10 May 2018 (2018-05-10) see entire text, in particular, claims, paragraphs [0015], [0023]	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/008964

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO	2020/045524	A1	05 March 2020	EP 3845900 A1 see entire text, all drawings, in particular, claims, examples	
WO	2012/018057	A1	09 February 2012	WO 2012/018057 A1 see entire text, in particular, claims, paragraphs [0031]-[0095]	
				EP 2602619 A1	
WO	2013/145767	A1	03 October 2013	US 2015/0079581 A1 see entire text, in particular, claims, paragraphs [0062]-[0066]	
				EP 2833147 A1	
WO	2021/193792	A1	30 September 2021	US 2023/0015388 A1 see entire text, all drawings, in particular, claims	
				EP 4130744 A1	
JP	2018-072209	A	10 May 2018	(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; G01N 21/78(2006.01)i; G01N 33/569(2006.01)i FI: G01N33/543 501M; G01N33/543 541Z; G01N33/569 L; G01N21/78 A		
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; G01N21/78; G01N33/569 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 1971-2024年 日本国実用新案登録公報 1996-2024年 日本国登録実用新案公報 1994-2024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	WO 2020/045524 A1（富士フイルム株式会社）05.03.2020（2020-03-05） 全文・全図、特に、請求の範囲、実施例等参照	1-14
Y	YAMAOKA Y et al, Highly specific monoclonal antibodies and epitope identification against SARS-CoV-2 nucleocapsid pro, Cell Rep Med., 2021.05.16 全文、特に、要約、Fig. 4、第5頁左欄 Development of rapid lateral flow immunochromatographic assay等参照	1-14
Y	WO 2012/018057 A1（田中貴金属工業株式会社）09.02.2012（2012-02-09） 全文、特に、請求の範囲、段落[0019]－[0062]等参照	1-14
Y	WO 2013/145767 A1（田中貴金属工業株式会社）03.10.2013（2013-10-03） 全文、特に、請求の範囲、段落[0036]－[0037]等参照	1-14
A	WO 2021/193792 A1（富士フイルム株式会社）30.09.2021（2021-09-30） 全文・全図、特に、請求の範囲等参照	1-14
☒ 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、一般的技术水準を示すもの “D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献 “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 “I” 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 13.05.2024	国際調査報告の発送日 28.05.2024	
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） 草川 貴史 2J 4075 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2018-072209 A (プリマハム株式会社) 10.05.2018 (2018 - 05 - 10) 全文、特に、[特許請求の範囲]、段落 [0 0 1 5]、[0 0 2 3] 等参照	1-14

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/JP2024/008964

引用文献			公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO	2020/045524	A1	05.03.2020	EP 3845900 A1 全文・全図，特に，請求の 範囲，実施例等参照	
WO	2012/018057	A1	09.02.2012	WO 2012/018057 A1 全文，特に，請求の範囲， 段落 [0 0 3 1] - [0 0 9 5] 等参照	
				EP 2602619 A1	
WO	2013/145767	A1	03.10.2013	US 2015/0079581 A1 全文、特に，請求の範囲， 段落 [0 0 6 2] - [0 0 6 6] 等参照	
				EP 2833147 A1	
WO	2021/193792	A1	30.09.2021	US 2023/0015388 A1 全文・全図，特に，請求の 範囲等参照	
				EP 4130744 A1	
JP	2018-072209	A	10.05.2018	(ファミリーなし)	