

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4920553号  
(P4920553)

(45) 発行日 平成24年4月18日(2012.4.18)

(24) 登録日 平成24年2月10日(2012.2.10)

(51) Int.Cl. F I  
**GO 1 N 33/543 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 4 1 Z  
**GO 1 N 33/531 (2006.01)** GO 1 N 33/543 5 2 1  
 GO 1 N 33/531 B

請求項の数 12 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2007-290094 (P2007-290094)	(73) 特許権者	306037311
(22) 出願日	平成19年11月7日(2007.11.7)		富士フイルム株式会社
(65) 公開番号	特開2008-139296 (P2008-139296A)		東京都港区西麻布2丁目26番30号
(43) 公開日	平成20年6月19日(2008.6.19)	(74) 代理人	100079049
審査請求日	平成22年7月6日(2010.7.6)		弁理士 中島 淳
(31) 優先権主張番号	特願2006-302843 (P2006-302843)	(74) 代理人	100084995
(32) 優先日	平成18年11月8日(2006.11.8)		弁理士 加藤 和詳
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100085279
			弁理士 西元 勝一
		(74) 代理人	100099025
			弁理士 福田 浩志
		(72) 発明者	小山田 孝嘉
			神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地
			富士フイルム株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 イムノクロマトグラフキット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

分析対象物及びそれと特異的に結合する抗体又は抗原による免疫反応を利用し、固定化された免疫複合体に由来する標識の信号を分析するイムノクロマトグラフキットであって、含有量が銀量として0.001モル/m<sup>2</sup>~0.2モル/m<sup>2</sup>である無機銀塩もしくは銀錯体、銀イオンの為の還元剤、および金属コロイド標識または金属カルコゲニド標識を含有することを特徴とするイムノクロマトグラフキット。

【請求項2】

前記無機銀塩がハロゲン化銀を含有することを特徴とする請求項1に記載のイムノクロマトグラフキット。

【請求項3】

前記銀錯体が銀イオンとチオ硫酸塩、チオシアン酸塩、亜硫酸塩、糖チオン誘導体、環状イミド化合物、または1,1-ビススルホニルアルカン類より選ばれる錯化剤との錯体を含有することを特徴とする請求項1に記載のイムノクロマトグラフキット。

【請求項4】

前記錯化剤が環状イミド化合物であることを特徴とする請求項3に記載のイムノクロマトグラフキット。

【請求項5】

前記無機銀塩もしくは前記銀錯体の溶剤を含むことを特徴とする請求項1~請求項4のいずれか1項に記載のイムノクロマトグラフキット。

## 【請求項 6】

前記無機銀塩もしくは前記銀錯体の溶剤が、チオ硫酸塩、チソシアン酸塩、亜硫酸塩、糖チオン誘導体、環状イミド化合物、または 1, 1 - ビススルホニルアルカン類を含有することを特徴とする請求項 5 に記載のイムノクロマトグラフキット。

## 【請求項 7】

前記無機銀塩または前記銀錯体、前記銀イオンの為の還元剤、前記金属コロイド標識または前記金属カルコゲニド標識を、同一のキット内に含有する事を特徴とする請求項 1 ~ 請求項 6 のいずれか 1 項に記載のイムノクロマトグラフキット。

## 【請求項 8】

前記無機銀塩または前記銀錯体および前記銀イオンの為の還元剤を含有する層、および前記金属コロイド標識または前記金属カルコゲニド標識を含有する層を、同一のキット内に含む事を特徴とする請求項 7 に記載のイムノクロマトグラフキット。

10

## 【請求項 9】

前記金属コロイドが金コロイド、銀コロイド、白金コロイド、もしくはこれらの複合コロイドである事を特徴とする請求項 1 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載のイムノクロマトグラフキット。

## 【請求項 10】

前記金属コロイドの平均粒径が 5 nm 以上 100 nm 以下である事を特徴とする請求項 9 に記載のイムノクロマトグラフキット。

## 【請求項 11】

20

前記金属カルコゲニドが、金、銀、白金、パラジウム、鉛、亜鉛、カドミウム、錫、クロム、銅、またはコバルトの金属硫化物、セレン化物、もしくはテルル化物である事を特徴とする請求項 1 ~ 請求項 8 のいずれか 1 項に記載のイムノクロマトグラフキット。

## 【請求項 12】

前記金属カルコゲニドの平均粒径が 5 nm 以上 100 nm 以下である事を特徴とする請求項 11 に記載のイムノクロマトグラフキット。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、分析対象物を含む試料を、簡易、迅速、正確に定性及び定量を行うことができるイムノクロマトグラフキットに関する。

30

## 【背景技術】

## 【0002】

天然物、毒素、ホルモン、又は農薬等の生理活性物質又は環境汚染物質の中には、極微量で作用するものが非常に多い。従って、これらの物質の定性的及び定量的測定には、従来、高感度分析が可能な機器分析法が広く用いられてきた。しかし、機器分析法は、特異性が低く、試料の前処理工程を含め、分析に時間を要する上、操作が煩雑なため、近年要求されている迅速簡便測定目的には不都合である。一方、免疫学的測定法は、特異性も高く、操作も機器分析よりはるかに簡便であることから、生理活性物質又は環境汚染物質の測定分野に徐々に普及してきた。しかし、96穴プレートを用いた酵素免疫測定法やラテックス凝集法のような従来の免疫学的測定法は、必ずしも測定の迅速簡便性又は検出感度を満たすものではなかった。

40

## 【0003】

また他の二 - ズとしては、現在スワブ液や血液と言った比較的侵襲的な検体を用いている検査においても、高感度化が達成されることで、鼻水やうがい液、尿、といった比較的侵襲的な検体中にごく少量含まれる被検試料を検出することが出来るようになることで、患者の負担の少ない検査方法が可能となることも期待できる。

## 【0004】

近年、特に迅速な診断が求められる感染症の検査に、イムノクロマトグラフ法を用いた検査キット（以後の説明において、イムノクロマトグラフキットと記す。）が多く使用さ

50

れるようになってきている。これらキットの普及により、患者の感染を迅速・簡便な方法で特定することができ、その後の診断、治療を素早く的確に行うことが可能となってきた。例えば、サンドイッチ法を利用したイムノクロマトグラフ法では、分析対象物（例えば、抗原）に特異的に結合する第1抗体を特定の領域に固定した不溶性薄膜状支持体（例えば、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜など）中に、分析対象物と特異的に結合する標識化第2抗体と、分析対象物を含む可能性のある検体溶液とを展開し、不溶性薄膜状支持体の第1抗体を固定した領域上で、分析対象物との免疫複合体を形成させ、標識の着色又は発色などの信号を検出し、分析対象物を測定することができる。なお、前記標識としては、例えば、酵素を含むタンパク質、着色ラテックス粒子、金属コロイド、又は炭素粒子を使用することができる。

10

## 【0005】

イムノクロマトグラフ法は、その判定・測定に重厚な設備・機器を必要とせず、操作が簡便であり、例えば分析対象物を含む可能性のある検体溶液を滴下した後、約5分～10分間静置するだけで測定結果が得られるほど迅速であるので、簡便・迅速・特異性の高い判定・測定手法として、多くの場面、例えば病院における臨床検査、研究室における検定試験等に広く使われている。

## 【0006】

また、天然物、毒素、ホルモン、又は農薬等の生理活性物質又は環境汚染物質は、従来の一般的イムノクロマトグラフに検出できるイムノクロマトグラフ法の開発が求められている。

20

## 【0007】

従来、展開の手段を工夫した技術（例えば、特許文献1, 2参照。）、着色粒子を工夫した技術（例えば、特許文献3, 4参照。）、展開部材を工夫した技術（例えば、特許文献5参照。）、アビジン-ビオチン結合を利用した技術（例えば、特許文献6参照。）、及び酵素免疫法を利用した技術（例えば、特許文献7参照。）、触媒作用のある金属コロイドを用いた技術（例えば、特許文献8参照。）、金属イオンを沈着させる技術（例えば、特許文献9参照。）等、高感度化を目指した数多くの技術が開示されている。

## 【0008】

しかしながら、これらの技術の進歩によりイムノクロマトグラフ法は、分析対象物の検出感度が高くなり酵素免疫測定法に近づいたとは言え、さらなる高感度化が要望されている。

30

【特許文献1】特開平1-32169号公報

【特許文献2】特開平4-299262号公報

【特許文献3】特開平5-10950号公報

【特許文献4】特開平5-133956号公報

【特許文献5】特開平7-318560号公報

【特許文献6】特開平10-68730号公報

【特許文献7】特開平11-69996号公報

【特許文献8】特開2002-262638号公報

【特許文献9】特開2002-202307号公報

40

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

本発明の課題は、イムノクロマトグラフ法の簡便迅速というメリットを保ちつつ、その高感度化をはかることである。

一般に、従来イムノクロマトグラフ法の検出感度は細菌の場合、 $10^5$  CFU/mL～ $10^7$  CFU/mLである。最近の高感度な検出法として遺伝子増幅法（PCR法）が挙げられ、その検出感度は $10^3$  CFU/mL～ $10^4$  CFU/mLまで達成されている。しかしながら、PCR法は、重厚な設備、機器および煩雑な操作が必要であり、しかも検出までに数時間という長時間を要するため、簡便・迅速な測定方法とは言えない。従来

50

イムノクロマトグラフ法を1桁～4桁程度高感度化することは、つまりこれまでPCR法により行っていたような簡便・迅速とは言えなかった検査を、簡便・迅速に行うことを可能にすると考えられる。

【0010】

また、既にイムノクロマトグラフ法による測定法が確立されている感染症の検査においても高感度化が求められている。例えば、イムノクロマトグラフ法によるインフルエンザ検査は近年その簡便・迅速な検査方法として普及しているが、この検査において、感染初期のウイルス量が比較的少ない際には、その検出感度不足から偽陰性が出てしまい再検査が必要となることがある。一般にインフルエンザウイルスは4時間で10倍に増殖するとされることから、例えば1桁の感度アップにより、従来よりも4時間前の時点で感染を判定できるようになる。何度も通院するという患者の負担を低減するという観点から、イムノクロマトグラフ法のような簡便迅速でさらに高感度な検査法の開発が求められている。

10

【0011】

従って、本発明の課題は、迅速且つ簡便であって、しかも、従来公知のイムノクロマトグラフ法による検査キットよりも更に高感度なイムノクロマトグラフキットを提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0012】

本発明の上記課題は、下記的手段により解決された。

【0013】

20

< 1 > 分析対象物及びそれと特異的に結合する抗体又は抗原による免疫反応を利用し、固定化された免疫複合体に由来する標識の信号を分析するイムノクロマトグラフキットであって、含有量が銀量として $0.001 \text{ mol/m}^2 \sim 0.2 \text{ mol/m}^2$ である無機銀塩もしくは銀錯体、銀イオンの為の還元剤、および金属コロイド標識もしくは金属カルコゲニド標識を含有することを特徴とするイムノクロマトグラフキット。

< 2 > 前記無機銀塩がハロゲン化銀を含有することを特徴とする< 1 >に記載のイムノクロマトグラフキット。

< 3 > 前記銀錯体が銀イオンとチオ硫酸塩、チソシアン酸塩、亜硫酸塩、糖チオン誘導体、環状イミド化合物、または1,1-ビススルホニルアルカン類より選ばれる錯化剤との錯体を含有することを特徴とする< 1 >に記載のイムノクロマトグラフキット。

30

< 4 > 前記錯化剤が環状イミド化合物であることを特徴とする< 3 >に記載のイムノクロマトグラフキット。

< 5 > 前記無機銀塩もしくは前記銀錯体の溶剤を含むことを特徴とする< 1 >～< 4 >のいずれかに記載のイムノクロマトグラフキット。

< 6 > 前記無機銀塩もしくは前記銀錯体の溶剤が、チオ硫酸塩、チソシアン酸塩、亜硫酸塩、糖チオン誘導体、環状イミド化合物、または1,1-ビススルホニルアルカン類を含有することを特徴とする< 5 >に記載のイムノクロマトグラフキット。

< 7 > 前記無機銀塩または前記銀錯体、前記銀イオンの為の還元剤、前記金属コロイド標識または前記金属カルコゲニド標識を、同一のキット内に含有する事を特徴とする< 1 >～< 6 >のいずれかに記載のイムノクロマトグラフキット。

40

< 8 > 前記無機銀塩または前記銀錯体および前記銀イオンの為の還元剤を含有する層、および前記金属コロイド標識または前記金属カルコゲニド標識を含有する層を、同一のキット内に含む事を特徴とする< 7 >に記載のイムノクロマトグラフキット。

< 9 > 前記金属コロイドが金コロイド、銀コロイド、白金コロイド、もしくはこれらの複合コロイドであることを特徴とする< 1 >～< 8 >のいずれかに記載のイムノクロマトグラフキット。

< 10 > 前記金属コロイドの平均粒径が5nm以上100nm以下であることを特徴とする< 9 >に記載のイムノクロマトグラフキット。

< 11 > 前記金属カルコゲニドが、金、銀、白金、パラジウム、鉛、亜鉛、カドミウム、錫、クロム、銅、またはコバルトの金属硫化物、セレン化物、もしくはテルル化物であ

50

る事を特徴とする< 1 > ~ < 8 >のいずれかに記載のイムノクロマトグラフキット。

< 1 2 > 前記金属カルコゲニドの平均粒径が5 nm以上100 nm以下である事を特徴とする< 1 1 >に記載のイムノクロマトグラフキット。

【発明の効果】

【0014】

本発明により、分析対象物を含む試料を、簡易、迅速、正確に定性及び定量を行うことができる高感度のイムノクロマトグラフキットが提供される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

#### 1. イムノクロマト

一般に、イムノクロマトグラフ法とは以下のような手法で被分析物を簡便・迅速・特異的に判定・測定する手法である。すなわち、被分析物と結合可能な固定化試薬（抗体、抗原等）を含む少なくとも1つの反応部位を有するクロマトグラフ担体を固定相として用いる。このクロマトグラフ担体上で、分析対象物結合可能な試薬によって修飾された検出用標識物が分散されてなる分散液を移動相として前記クロマトグラフ担体中をクロマトグラフ的に移動させ際に、前記分析対象物と検出用標識物とが特異的に結合しながら、前記反応部位まで到達する。前記反応部位において、前記分析対象物と検出用標識物の複合体が前記固定化試薬に特異的に結合することにより、被分析液中に分析対象物が存在する場合のみ、前記固定化試薬部に検出用標識物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検出することで被分析液中に被検出物が存在することを定性および定量的に分析する手法である。

【0016】

本発明におけるイムノクロマトグラフキットは、無機銀塩および銀イオンのために還元剤を内蔵し、前記固定化試薬に結合した前記分析対象物と検出用標識物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を特徴とする。本発明によれば、従来のイムノクロマトグラフキットで必要とされる外部からの増幅のための金属イオンや還元剤溶液の供給を必要とせず、一段と簡便で、迅速な高感度イムノクロマトグラフキットが提供される。

【0017】

#### 2. 被検試料

本発明のイムノクロマトグラフキットで分析することのできる被検試料としては、分析対象物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く、例えば、生物学的試料、特に動物（特にヒト）の体液（例えば、血液、血清、血漿、髄液、涙液、汗、尿、膿、鼻水、又は喀痰）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搾過検体（スワブ）、うがい液、又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】

#### 3. 被検試料の前処理

本発明のイムノクロマトグラフキットでは、前記被検試料をそのまま、あるいは、前記被検試料を適当な抽出用溶媒を用いて抽出して得られる抽出液の形で、更には、前記抽出液を適当な希釈剤で希釈して得られる希釈液の形、若しくは前記抽出液を適当な方法で濃縮した形で、用いることができる。前記抽出用溶媒としては、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、又は緩衝液等）、あるいは、前記溶媒で希釈することにより直接抗原抗体反応を実施することができる水混和性有機溶媒を用いることもできる。

【0019】

#### 4. 構成

本発明のイムノクロマトグラフキットに使用することのできるイムノクロマトグラフ用ストリップとしては、通常のイムノクロマトグラフ法に用いることができるイムノ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。例えば、図1に模式的

10

20

30

40

50

に従来のイムノクロマトグラフ用ストリップの平面図を模式的に示す。図2に図1で示されたイムノクロマトグラフキットの縦断面を模式的に示す縦断面図である。図3は本発明のイムノクロマトグラフ用ストリップの縦断面図を模式的に示す。

本発明のイムノクロマトグラフ用ストリップ10は、展開方向(図1において矢印Aで示す方向)の上流から下流に向かって、試料添加パッド5、標識化物質保持パッド(例えば金コロイド抗体保持パッド)2、クロマトグラフ担体(例えば抗体固定化メンブレン)3、及び吸収パッド4がこの順に、粘着シート1上に配置されている。

#### 【0020】

前記クロマトグラフ担体3は、捕捉部位3aを有し、分析対象物と特異的に結合する抗体又は抗原を固定化した領域である検出ゾーン(検出部と記載することもある)31を有し、所望により、コントロール用抗体又は抗原を固定化した領域であるコントロールゾーン(コントロール部と記載することもある)32を更に有する。さらに、検出ゾーン31およびコントロールゾーン32は、増幅のための無機銀塩と銀イオンのための還元剤を含有する。

10

#### 【0021】

前記標識化物質保持パッド2は、標識化物質を含む懸濁液を調製し、その懸濁液を適当な吸収パッド(例えば、グラスファイバ-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。

#### 【0022】

前記試料添加パッド5としては、例えばグラスファイバ-パッドを用いることができる。

20

#### 【0023】

##### 4-1. 検出用標識物

検出用標識物は、免疫凝集反応に用いられている着色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-ブタジエン共重合体のような有機高分子のラテックス着色粒子、金属コロイドのような金属又は金属カルコゲニドを用いることができる。担体粒子(又はコロイド)の平均粒径は、 $0.02\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$ の範囲が好ましい。色素を含有したりポゾ-ムやマイクロカプセル等も着色粒子として使用することができる。従来公知の着色金属コロイドはいずれも標識用着色粒子として使用することができる。例えば、金コロイド、銀コロイド、白金コロイド、鉄コロイド、水酸化アルミニウムコロイド、およびこれらの複合コロイドなどが挙げられ、好ましくは、金コロイド、銀コロイド、白金コロイド、およびこれらの複合コロイドである。特に、金コロイドと銀コロイドが適当な粒径において、金コロイドは赤色、銀コロイドは黄色を示す点で好ましい。金属コロイドの平均粒径としては、約 $1\text{nm} \sim 500\text{nm}$ が好ましく、特に強い色調が得られる $5\text{nm} \sim 100\text{nm}$ がさらに好ましい。金属コロイドと特異結合物質との結合は、従来公知の方法(例えばThe Journal of Histochemistry and Cytochemistry, Vol. 30, No. 7, pp 691-696, (1982))に従い、行うことができる。すなわち、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。金属コロイド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 Phys. Sci., vol. 241, 20, (1973)等)により金コロイド粒子を調製することができる。

30

40

#### 【0024】

本発明によれば、検出用標識物として金属コロイド標識又は金属カルコゲニド標識、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-粒子標識を用いるイムノクロマトグラフキットにおいて、前記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、前記分析対象物と検出用標識物の複合体の形成後に、無機銀塩から供給される銀イオンおよび銀イオンのために還元剤を接触させ、還元剤によって

50

銀イオンを還元して銀粒子を生成させると、その銀粒子が前記金属系標識を核として前記金属系標識上に沈着するので、前記金属系標識が増幅され、分析対象物の分析を高感度に行うことができる。従って、本発明のイムノクロマトグラフキットは、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免疫複合体の標識上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ことを除けば、それ以外の点では従来公知のイムノクロマトグラフ法をそのまま適用することができる。

#### 【0025】

本発明のイムノクロマトグラフキットでは、分析対象物（抗原又は抗体）と特異的に結合する抗体若しくは抗原、又は標準化合物を標識するのに用いる標識として、金属コロイド標識又は金属カルコゲニド標識を用いる。前記金属コロイド標識又は金属カルコゲニド標識としては、通常のイムノクロマトグラフ法に用いることができる標識である限り、特に限定されるものではなく、金属コロイド標識としては、例えば、金、銀、白金、パラジウム、鉛、亜鉛、カドミウム、錫、クロム、銅、またはコバルトのコロイド、好ましくは、金、銀、白金、およびパラジウムのコロイド、そして、それらの混合物を挙げることができ、金属カルコゲニド標識としては、例えば、水銀、銅、金、銀、白金、パラジウム、鉛、亜鉛、ニッケル、カドミウム、錫、クロム、銅、またはコバルトの各硫化物、セレン化物、もしくはテルル化物を挙げるができる。本発明のイムノクロマトグラフキットにおいては、これらの金属コロイド標識及び金属カルコゲニド標識の少なくとも一方を標識として用いることができる。

#### 【0026】

##### 4-2. 抗体

本発明のイムノクロマトグラフキットにおいては、分析対象物に対して特異性を有する抗体として、特に限定されるものではないが、例えば、その分析対象物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、その分析対象物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、 $F(ab')_2$ 、 $Fab$ 、 $Fab'$ 、又は $Fv$ 〕を用いることができる。これらの抗体の調製は、常法により行なうことができる。

#### 【0027】

##### 4-3. クロマトグラフ担体

クロマトグラフ担体としては、多孔性担体が好ましい。特に、ニトロセルロース膜、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、又は糸等が好ましい。

通常クロマトグラフ担体の一部に検出用物質を固定化させて検出ゾーンを作製する。検出用物質の固定は、検出用物質をクロマトグラフ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もいいし、検出用物質を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、この微粒子をクロマトグラフ担体の一部にトラップさせて固定化させてもいい。なお、クロマトグラフ担体は、検出用物質を固定化後、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して用いるのが好ましい。

#### 【0028】

##### 4-4. 試料添加パッド

試料添加パッドの材質は、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、及び綿布等の均一な特性を有するものが挙げられるが、これらに限定されるものではない。試料添加部は、添加された分析対象物を含む試料を受入れるだけでなく、試料中の不溶物粒子等を濾過する機能をも兼ねる。また、分析の際、試料中の分析対象物が試料添加部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ある。

#### 【0029】

##### 4-5. 標識化物質保持パッド

標識化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、

10

20

30

40

50

及び不織布等が挙げられ、前述のように調製した検出用標識物を一定量含浸し、乾燥させて作製する。

#### 【0030】

##### 4 - 6 . 吸収パッド

吸収パッドは、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収部に届いてからのクロマトの速度は、吸収材の材質、大きさなどにより異なるので、その選定により分析対象物の測定に合った速度を設定することができる。

10

#### 【0031】

##### 5 . 免疫検査の方法

以下、本発明に用いられるイムノクロマトグラフ法について、その具体的な実施態様であるサンドイッチ法、抗体固定化競合法、抗原固定化競合法、及び固定抗原法にそれぞれ適用した各態様に基づいて、順に説明する。

#### 【0032】

##### 5 - 1 . サンドイッチ法

本発明のイムノクロマトグラフキットにサンドイッチ法を適用した態様（以下、単に、サンドイッチ法と称する）では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により分析対象物の分析を実施することができる。まず、分析対象物（抗原）に対して特異性を有する第1抗体及び第2抗体を、先に述べた方法により予め調製しておく。また、第2抗体を、予め標識化しておく。第1抗体を、適当な不溶性薄膜状支持体（例えば、ニトロセルロース膜、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜等）上に固定し、分析対象物（抗原）を含む可能性のある被検試料（又はその抽出液）と接触させると、その被検試料中に分析対象物が存在する場合には、抗原抗体反応が起きる。この抗原抗体反応は、通常の抗原抗体反応と同様に行なうことができる。前記抗原抗体反応と同時に又は反応後に、過剰量の標識化第2抗体を更に接触させると、被検試料中に分析対象物が存在する場合には、固定化第1抗体と分析対象物（抗原）と標識化第2抗体とからなる免疫複合体が形成される。

20

#### 【0033】

サンドイッチ法では、固定化第1抗体と分析対象物（抗原）と第2抗体との反応が終了した後、前記免疫複合体を形成しなかった標識化第2抗体を除去し、続いて、例えば、不溶性薄膜状支持体における固定化第1抗体を固定した領域に、金属イオン及び還元剤を供給することにより、前記免疫複合体を形成した標識化第2抗体の標識からの信号を増幅する。あるいは、標識化第2抗体に金属イオン及び還元剤を添加し、同時に薄膜状支持体に添加することにより、前記免疫複合体を形成した標識化第2抗体の標識からの信号を増幅する。

30

#### 【0034】

##### 5 - 2 . 抗体固定化競合法

本発明のイムノクロマトグラフキットに抗体固定化競合法を適用した態様（以下、単に、抗体固定化競合法と称する）では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により分析対象物の分析を実施することができる。まず、分析対象物（抗原）に対して特異性を有する抗体を、先に述べた方法により予め調製しておき、その抗体を、適当な不溶性薄膜状支持体（例えば、ニトロセルロース膜、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜等）上に固定しておく。また、標準化合物を、予め標識化しておく。分析対象物（抗原）を含む可能性のある被検試料（又はその抽出液）と、前記標識化標準化合物とを展開させながら接触させ、それと同時に、あるいは、その終了後に、前記固定化抗体に、前記標識化標準化合物を展開させながら接触させると、その被検試料中に分析対象物が存在する場合には、抗原抗体反応が起きる。この抗原抗体反応は、通常の抗原抗体反応と同様に行なうことができる。

40

50

## 【0035】

抗体固定化競合法では、前記不溶性薄膜状支持体上の固定化抗体と、標識化標準化合物（すなわち、標識化抗原）との反応が終了した後、固定化抗体と結合した標識化標準化合物と、固定化抗体と結合しなかった標識化標準化合物とを分離し、続いて、例えば、不溶性薄膜状支持体における固定化抗体を固定した領域に、金属イオン及び還元剤を供給することにより、固定化抗体と結合した標識化抗原の標識からの信号を増幅する。あるいは、標識化標準化合物に金属イオン及び還元剤を添加し、同時に薄膜状支持体に添加することにより、固定化抗体と結合した標識化標準化合物の標識からの信号を増幅する。前記分離は、例えば、緩衝液による洗浄によって行なうことができる。

## 【0036】

## 5 - 3 . 抗原固定化競合法

本発明のイムノクロマトグラフキットに抗原固定化競合法を適用した態様（以下、単に抗原固定化競合法と称する）では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により分析対象物の分析を実施することができる。まず、分析対象物（抗原）に対して特異性を有する抗体を、先に述べた方法により予め調製しておく。また、前記抗体を、予め標識化しておく。更に、既知量の標準化合物（抗原）を、適当な不溶性薄膜状支持体（例えば、ニトロセルロース膜、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜等）上に固定しておく。

## 【0037】

抗原固定化競合法では、前記不溶性薄膜状支持体上の固定化標準化合物（すなわち、固定化抗原）と、標識化抗体との反応が終了した後、固定化標準化合物と結合した標識化抗体と、固定化標準化合物と結合しなかった標識化抗体とを分離し、続いて、例えば、不溶性薄膜状支持体における固定化標準化合物を固定した領域に、金属イオン及び還元剤を供給することにより、固定化標準化合物と結合した標識化抗体の標識からの信号を増幅する。あるいは、標識化抗体に金属イオン及び還元剤を添加し、同時に薄膜状支持体に添加することにより、固定化標準化合物と結合した標識化抗体の標識からの信号を増幅する。前記分離は、例えば、緩衝液による洗浄によって行なうことができる。

## 【0038】

## 5 - 4 . 固定抗原法

本発明のイムノクロマトグラフキットに固定抗原法を適用した態様（以下、単に、固定抗原法と称する）では、特に限定されるものではないが、例えば、以下の手順により分析対象物の分析を実施することができる。まず、分析対象物（抗体）に対して特異性を有する第2抗体を、先に述べた方法により予め調製しておく。また、前記第2抗体を、予め標識化しておく。分析対象物（抗体）が特異的に結合する抗原を、適当な不溶性薄膜状支持体（例えば、ニトロセルロース膜、ガラス繊維膜、ナイロン膜、又はセルロース膜等）上に固定し、分析対象物（抗体）を含む可能性のある被検試料（又はその抽出液）と接触させると、その被検試料中に分析対象物が存在する場合には、抗原抗体反応が起きる。この抗原抗体反応は、通常の抗原抗体反応と同様に行なうことができる。前記抗原抗体反応と同時又は反応後に、過剰量の標識化第2抗体を更に接触させると、被検試料中に分析対象物が存在する場合には、固定化抗原と分析対象物（抗体）と標識化第2抗体とからなる免疫複合体が形成される。

## 【0039】

固定抗原法では、固定化抗原と分析対象物（抗体）と第2抗体との反応が終了した後、前記免疫複合体を形成しなかった標識化第2抗体を除去し、続いて、例えば、不溶性薄膜状支持体における固定化抗原を固定した領域に、金属イオン及び還元剤を供給することにより、前記免疫複合体を形成した標識化第2抗体の標識からの信号を増幅する。あるいは、標識化第2抗体に金属イオン及び還元剤を添加し、同時に薄膜状支持体に添加することにより、前記免疫複合体を形成した標識化第2抗体の標識からの信号を増幅する。

## 【0040】

## 6 . 無機銀塩、銀錯体

10

20

30

40

50

本発明に用いられる無機銀塩、もしくは銀錯体は、還元可能な銀イオンを含む化合物である。好ましくは、還元剤の存在下で50以上まで加熱されると、光に比較的安定な金属銀を形成する無機銀塩、もしくは銀錯体である。

【0041】

本発明に用いられる無機銀塩は、例えば、ハロゲン化銀（塩化銀、臭化銀、塩臭化銀、ヨウ化銀、塩ヨウ化銀、塩ヨウ臭化銀、およびヨウ臭化銀等）、チオ硫酸塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はアンモニウム塩等）の銀塩、チオシアン酸塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はアンモニウム塩等）の銀塩、および亜硫酸塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はアンモニウム塩等）の銀塩等が挙げられる。

【0042】

本発明に用いられる無機銀塩は、好ましくはハロゲン化銀である。

本発明に用いられるハロゲン化銀の粒子形成方法は、写真業界でよく知られており、例えば、リサーチディスクロージャー1978年6月の第17029号、及び米国特許第3,700,458号に記載されている方法を用いることができるが、具体的にはゼラチンあるいは他のポリマー溶液中に銀供給化合物（例えば、硝酸銀）及びハロゲン供給化合物を添加することにより調製される。

【0043】

ハロゲン化銀の粒子サイズは、検査ノイズを小さくする上で微細であることが好ましく、具体的には0.20 μm以下、より好ましくは0.10 μm以下、更に好ましくはナノ粒子の範囲がよい。ここでいう粒子サイズとは、ハロゲン化銀粒子の投影面積（平板粒子の場合は主平面の投影面積）と同面積の円像に換算したときの直径をいう。

【0044】

チオ硫酸銀、チオシアン酸銀、および亜硫酸銀等もハロゲン化銀と同様の粒子形成方法により銀供給化合物（例えば、硝酸銀）及びチオ硫酸塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はアンモニウム塩等）の銀塩、チオシアン酸塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はアンモニウム塩等）の銀塩、および亜硫酸塩（例えば、ナトリウム塩、カリウム塩、又はアンモニウム塩等）を混合することにより調製される。

【0045】

本発明に用いられる銀錯体は、例えば、チオ硫酸塩と銀イオンの錯体、チオシアン酸塩と銀イオンの錯体、またはこれらの複合銀錯体、および、シュガーチオン誘導体と銀イオンの錯体、環状イミド化合物（例えば、ウラシル、ウラゾール、5-メチルウラシル、バルピツール酸など）と銀イオンの錯体、1,1-ビススルホニルアルカン類と銀イオンの錯体である。本発明に用いられる好ましい銀錯体は、環状イミド化合物（例えば、ウラシル、ウラゾール、5-メチルウラシル、バルピツール酸など）と銀イオンの錯体である。

本発明に用いられる銀錯体は、通常知られている塩形成反応により調製することができる。例えば、水もしくは水混和性溶媒中で水溶性銀供給体（例えば、硝酸銀）と銀錯体に対応する配位子化合物とを混合することにより調製される。調製された銀錯体は、透析法もしくは限外濾過法などの公知の脱塩方法により副成する塩類を除去して用いることが出来る。

【0046】

無機銀塩、もしくは銀錯体は、銀として一般に0.001モル/m<sup>2</sup> ~ 0.2モル/m<sup>2</sup>、好ましくは0.01モル/m<sup>2</sup> ~ 0.05モル/m<sup>2</sup>含有される。

【0047】

7. 錯化剤

本発明のイムノクロマトグラフキットは、無機銀塩もしくは銀錯体の溶剤（可溶化剤）を含有することが好ましい。本発明に用いられる溶剤としては、上記の銀錯体の項で説明した銀錯体を形成する配位子として用いられる化合物が好ましく用いられる。例えば、チオ硫酸塩、チオシアン酸塩、シュガーチオン誘導体、環状イミド化合物、および1,1-ビススルホニルアルカン類等である。本発明に用いられる溶剤として、より好ましくは、ウラシル、ウラゾール、5-メチルウラシル、バルピツール酸などの環状イミド化合物で

10

20

30

40

50

ある。

本発明に用いられる溶剤は、銀イオンに対してモル比で0.1モル～10モルの範囲で好ましく用いられる。

【0048】

#### 8. 還元剤

銀イオンのための還元剤は、銀(I)イオンを銀に還元することができるいかなる材料でも用いることができる。

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-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ものにとって明らかなその他の材料は、たとえば米国特許第6,020,117号(パウア-ほか)で記述されるように、本発明において用いることができる。

【0049】

「アスコルビン酸還元剤」はアスコルビン酸、及びその誘導体を意味する。アスコルビン酸還元剤は下記のように多くの文献において記載されており、例えば米国特許第5,236,816号(Puro1ほか)とその中で引用されている文献が挙げられる。

【0050】

本発明における還元剤として、アスコルビン酸還元剤が好ましい。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む。そのような化合物は以下にあげるもの含むが、これらに限定されるわけではない。

D-またはL-アスコルビン酸とその糖誘導体(例えばsorboascorbic酸、gamma-lactoascorbic酸、6-desoxy-Lアスコルビン酸、L-rhamnoascorbic酸、imino-6-desoxy-Lアスコルビン酸、glucoascorbic酸、fucoascorbic酸、glucoheptascorbic酸、maltoascorbic酸、L-arabosascorbic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)、endiolタイプのアスコルビン酸、enamino1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、たとえば米国特許第5,498,511、EP-A-0585,792、EP-A-0573700、EP-A-0588408、米国特許第5,089,819、米国特許第5,278,035、米国特許第5,384,232、米国特許第5,376,510、JP7-56286、米国特許第2,688,549、およびResearch Disclosure37152(1995年3月)に記載されているような化合物。

【0051】

これらの化合物のうち、好ましくは、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)がイソアスコルビン酸(またはそのアルカリ金属塩)であり、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。

【0052】

ヒンダ-ドフェノール類も単独で、または一つ以上の硬調化還元剤とコントラスト強化剤と組み合わせて好ましく用いられる。

ヒンダ-ドフェノールは、ベンゼン環上に一つだけの水酸基を有し、少なくとも一つの置換基を水酸基に対してオルト位に有する化合物である。ヒンダ-ドフェノール還元剤は複数の水酸基を別々のベンゼン環に持っていれば、複数の水酸基を有していても構わない。

ヒンダ-ドフェノール還元剤は、たとえば、ピナフトール類(すなわちジヒドロキシピナフトール類)、ピフェノール類(すなわちジヒドロキシピフェノール類)、ビス(ヒドロキシナフチル)メタン類、ビス(ヒドロキシフェニル)メタン類(すなわちビスフェノ

10

20

30

40

50

-ル類)、ヒンダ - ドフェノ - ル類、およびヒンダ - ドナフト - ル類が挙げられ、これらは置換されていて構わない。

【0053】

代表的なビナフト - ル類は以下に挙げられる化合物であるが、これらに制限されることはない。

1, 1' - bi - 2 - ナフト - ル、1, 1' - bi - 4 - メチル - 2 - ナフト - ル、6, 6' - ジブロモ - bi - 2 - ナフト - ル、および米国特許第3, 094, 417号と米国特許第5, 262, 295号に記載されている化合物。

【0054】

代表的なビフェノ - ル類は以下に挙げられる化合物であるが、これらに制限されることはない。

2, 2' - ジヒドロキシ - 3, 3' - di - t - ブチル - 5, 5' - ジメチルビフェニル、2, 2' - ジヒドロキシ - 3, 3', 5, 5' - テトラ - t - ブチルビフェニル、2, 2' - ジヒドロキシ - 3, 3' - di - t - ブチル - 5, 5' - ジクロロビフェニル、2 - (2 - ヒドロキシ - 3 - t - ブチル - 5 - メチルフェニル) - 4 - メチル - 6 - n - ヘキシルフェノ - ル、4, 4' - ジヒドロキシ - 3, 3', 5, 5' - テトラ - t - ブチルビフェニル、4, 4' - ジヒドロキシ - 3, 3', 5, 5' - テトラメチルビフェニル、および米国特許第5, 262, 295号に記載の化合物。

【0055】

代表的なビス(ヒドロキシナフチル)メタン類は以下に挙げられる化合物であるが、これらに制限されることはない。

4, 4' - メチレンビス(2 - メチル - 1 - ナフト - ル)、米国特許第5, 262, 295号に記載の化合物。

【0056】

代表的なビス(ヒドロキシフェニル)メタン類は以下に挙げられる化合物であるが、これらに制限されることはない。

ビス(2 - ヒドロキシ - 3 - t - ブチル - 5 - メチルフェニル)メタン(CAO - 5)、1, 1' - ビス(2 - ヒドロキシ - 3, 5 - ジメチルフェニル) - 3, 5, 5 - トリメチルヘキサン(NONOXまたはPERMANAX WSO)、1, 1' - ビス(3, 5 - di - t - ブチル - 4 - ヒドロキシフェニル)メタン、2, 2' - ビス(4 - ヒドロキシ - 3 - メチルフェニル)プロパン、4, 4' - エチリデン - ビス(2 - t - ブチル - 6 - メチルフェノ - ル)、2, 2' - イソブチリデン - ビス(4, 6 - ジメチルフェノ - ル)(LOWINOX 221B46)、2, 2' - ビス(3, 5 - ジメチル - 4 - ヒドロキシフェニル)プロパン、および米国特許第5, 262, 295号に記載の化合物。

【0057】

代表的なヒンダ - ドフェノ - ルは以下に挙げられる化合物であるが、これらに制限されることはない。

2, 6 - ジ - t - ブチルフェノ - ル、2, 6 - ジ - t - ブチル - 4 - メチルフェノ - ル、2, 4 - ジ - t - ブチルフェノ - ル、2, 6 - ジクロロフェノ - ル、2, 6 - ジメチルフェノ - ル、および2 - t - ブチル - 6 - メチルフェノ - ル。

【0058】

代表的なヒンダ - ドナフト - ルは以下に挙げられる化合物であるが、これらに制限されることはない。

1 - ナフト - ル、4 - メチル1 - ナフト - ル、4 - メトキシ1 - ナフト - ル、4 - クロロ1 - ナフト - ル、2 - メチル1 - ナフト - ル、および米国特許第5, 262, 295号に記載の化合物。

【0059】

その他、下記の化合物も還元剤として開示されている。

アミドキシム類(例えばフェニルアミドキシム)、2 - チエニルアミドキシム、p - フェノキシフェニルアミドキシム、アジン類(たとえば4 - ヒドロキシ - 3, 5 - dime

10

20

30

40

50

thoxybenzaldehydrazine)、脂肪族カルボン酸アリルヒドラジドとアスコルビン酸の組み合わせ(例えば2,2'-bis(hydroxymethyl)-propionyl-phenylヒドラジドとアスコルビン酸の組み合わせ)、ポリヒドロキシベンゼンとヒドロキシルアミン、レダクトンおよびヒドラジンの少なくとも一方の組合せ(たとえばヒドロキノンとビス(エトキシエチル)ヒドロキシルアミンの組合せ)、ピペリジ-4-メチルフェニルヒドラジン、ヒドロキサム酸(例えばフェニルヒドロキサム酸、p-ヒドロキシフェニルヒドロキサム酸、およびo-アラニンヒドロキサム酸)、アジンとスルホンアミドフェノール類の組合せ(たとえばフェノチアジンと2,6-ジクロロ-4-ベンゼンスルホンアミドフェノール)、-シアノフェニル酢酸誘導体(例えばエチル-シアノ-2-メチルフェニル酢酸、エチル-シアノフェニル酢酸)、ビス-o-ナフトール(例えば2,2'-ジヒドロキシ-1-ピナフチル、6,6'-ジブromo-2,2'-ジヒドロキシ-1,1'-ピナフチル、ビス(2-ヒドロキシ-1-ナフチル)メタン]、

【0060】

ビス-o-ナフトールと1,3-ジヒドロキシベンゼン誘導体の組み合わせ(例えば2,4-ジヒドロキシベンゾフェノン、2,4-ジヒドロキシアセトフェノン)、5-ピラゾロン(例えば3-メチル-1-フェニル-5-ピラゾロン)、レダクトン類(例えばジメチルアミノヘキソ-スレダクトン、アンヒドロジヒドロ-アミノヘキソ-スレダクトン、アンヒドロジヒドロ-ピペリドン-ヘキソ-スレダクトン)、スルホンアミドフェノール還元剤(例えば2,6-ジクロロ-4-ベンゼンスルホンアミドフェノール、p-ベンゼンスルホンアミドフェノール)、インダン-1,3-ジオン類(例えば2-フェニルインダン-1,3-ジオン)、クロマン類(例えば2,2-ジメチル-7-t-ブチル-6-ヒドロキシクロマン)、1,4-ジヒドロキシピリジン類(例えば2,6-ジメトキシ-3,5-ジカルベトキシ-1,4-ジヒドロピリジン)、アスコルビン酸誘導体(1-アスコルビン酸パルミテート、アスコルビン酸ステアレート)、不飽和アルデヒド(ケトン)、3-ピラゾリドン類。

【0061】

本発明に用いることのできる還元剤として、米国特許第5,464,738に記載されるようなスルホニルヒドラジンを含む置換ヒドラジンがある。この他の有用な還元剤は、例えば、米国特許第3,074,809、米国特許第3,094,417、米国特許第3,080,254および米国特許第3,887,417に記載されている。米国特許第5,981,151に記載の補助還元剤もまた有用である。

【0062】

還元剤として、ヒンダ-ドフェノール還元剤とその他以下に挙げるような様々な補助還元剤から選ばれる化合物と組み合わせ用いられる場合もある。さらにコントラスト強化剤を加えた3成分の還元剤の混合物もまた有用である。補助還元剤としては米国特許第5,496,695に記載のトリチルヒドラジド、ホルミル-フェニルヒドラジドを用いることができる。

【0063】

コントラスト強化剤を還元剤とともに用いることができる。コントラスト強化剤としては例えば、下記の化合物が有用であるが、これらに限定されるわけではない。

ヒドロキシルアミン(ヒドロキシルアミンとalkyl-とアリール置換誘導体を含む)、米国特許第5,545,505に記載のalkanolaminesとフタル酸アンモニウム、米国特許第5,545,507に記載のヒドロキサム酸化合物、米国特許第5,558,983に記載のN-アシルヒドラジン化合物、米国特許第5,637,449に記載の水素原子ドナ-化合物。

【0064】

全ての還元剤と無機銀塩の組み合わせが等しく効果があるわけではないが、好ましい組合せは還元剤としてアスコルビン酸型還元剤を用いた組合せである。

【0065】

10

20

30

40

50

本発明における還元剤は、銀に対しての1質量%～10質量%(乾燥質量)含まれる。多層構造において、還元剤が無機銀塩もしくは銀錯体を含む層以外の層に加えらるるならば、わずかに割合は高く、およそ2質量%～15質量%がより望ましい。補助還元剤は、およそ0.001質量%～1.5質量%(乾燥重)含まれる。

【0066】

本発明のキットは被検試料の展開後に加熱することが好ましい。好ましい加熱温度は40～90であり、好ましい加熱時間は1秒～120秒である。

【実施例】

【0067】

実施例1

実施例1では、hCG検出系で本発明のイムノクロマトグラフキットが高感度であることを以下に実証する。

【0068】

1. 検出用標識物である抗hCG抗体修飾金属硫化物コロイドの作製

<硫化パラジウムコロイドの調製>

水1000mLにグリセリン30g、塩化パラジウムと硫化ナトリウムをモル比1:1で混合し、粒子径が約30nmの硫化パラジウムコロイド溶液を調製した。得られた硫化パラジウムコロイド溶液9mLに50mMのKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>バッファ-(pH=7.0)1mLを加えることでpHを調整した後、50μg/mLの抗hCG抗体(Anti-hCG 5008 SP-5、Medix Biochemica社)溶液1mLを加え攪拌した。10分間静置した後、1質量%ポリエチレングリコール(PEG、Mw.20000、品番168-11285、和光純薬)水溶液を550μL加え攪拌し、続いて10質量%牛血清アルブミン(BSA Fraction V、品番A-7906、SIGMA)水溶液を1.1mL加え攪拌した。この溶液を8000G、4、30分間遠心(himac CF16RX、日立(株))した後、1mL程度を残して上清を取り除き、超音波洗浄機により再分散した。この後、20mLの硫化パラジウムコロイド溶液保存液(20mM、Tris-HClバッファ-(pH=8.2)、0.05質量%PEG(Mw.20000)、150mM NaCl、1質量%BSA、0.1質量%NaN<sub>3</sub>)に分散し、再び8000G、4、30分間遠心した後、1mL程度を残して上清を取り除き、超音波洗浄機により硫化パラジウムコロイド溶液を再分散し、抗体修飾硫化パラジウムコロイド溶液(平均粒径30nm)を得た。

【0069】

2. 金属硫化物抗体保持パットの作製

1で作製した各抗体修飾硫化パラジウムコロイド溶液を、硫化パラジウムコロイド溶液塗布液(20mM、Tris-HClバッファ-(pH=8.2)、0.05質量%PEG(Mw.20000)、5質量%スクロース)及び水により希釈し、520nmのODが1.5となるように希釈した。この溶液を、8mm×150mmに切ったガラスファイバパッド(Glass Fiber Conjugate Pad、ミリポア社)1枚あたり0.8mLずつ均一に塗布し、一晚減圧乾燥し、硫化パラジウムコロイド溶液抗体保持パットを得た。

【0070】

3. 抗体固定化メンブレン(クロマトグラフ担体)の作製

25mm×200mm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 HF120ミリポア社)に関し以下のような方法により抗体を固定し抗体固定化メンブレンを作製した。メンブレンの長辺を下にし、下から8mmの位置に、0.5mg/mLとなるように調製した固定化用抗hCGモノクロナル抗体(Anti-Alpha subunit 6601 SPR-5、Medix Biochemica社)溶液をインクジェット方式の塗布機(BioDot社)を用いて幅1mm程度のライン状に塗布した(「検出部」を形成する。)。同様に、下から12mmの位置に、0.5mg/mLとなるように調製したコントロール用抗マウスIgG抗体(抗

10

20

30

40

50

マウスIgG(H+L),ウサギF(ab')<sub>2</sub>,品番566-70621、和光純薬)溶液をライン状に塗布した(「コントロール部」を形成する。)。塗布したメンブレンは、温風式乾燥機で50、30分間乾燥した。ブロッキング液(0.5質量%カゼイン(乳由来、品番030-01505、和光純薬)含有50mMホウ酸Buffer(pH=8.5))500mLをバットに入れ、そのまま30分間静置した。その後、同様のバットに入れた洗浄・安定化液(0.5質量%スクロース、0.05質量%コル酸ナトリウム、50mMのTris-HCl(pH=7.5))500mLに移して浸し、そのまま30分間静置した。メンブレンを液から取り出し、室温で一晩乾燥し、抗体固定化メンブレンを得た。

#### 【0071】

#### 4.増感シートの作製

##### 4-1.塗布用材料の準備

#### 【0072】

##### 1)ウラシル銀のゼラチン分散物調製

ゼラチン水溶液中でウラシルのナトリウム塩と硝酸銀をモル比2:1で混合しウラシル銀錯体を調製した。

#### 【0073】

##### 2)還元剤としてアスコルビン酸水溶液、錯化剤としてウラシルナトリウム塩水溶液

#### 【0074】

##### 4-2.銀塩含有層の塗布

上記で得たウラシル銀錯体のゼラチン分散物にアスコルビン酸水溶液(銀量の1.2倍モル)、及びウラシルナトリウム塩水溶液(銀量の1.5倍モル)を順次添加した塗布液を、塗布銀量が $0.6\text{ g/m}^2$ となるように仮支持体上に塗布した。その上に、保護層としてゼラチン水溶液を $0.1\text{ g/m}^2$ 塗布し、乾燥した。

#### 【0075】

##### 4-3.増感シートの作製

得られた銀含有層塗布試料を $200\text{ mm} \times 70\text{ mm}$ に裁断し、その保護層表面にポリエステル粘着テープ(日東電工(株)製 No31B 71ハイ)を貼り付け、仮支持体より銀塩含有塗布層を粘着テープに貼り付けて剥離し、増感シートを得た。

#### 【0076】

#### 5.イムノクロマトグラフキットの作製

##### 5-1.キットA(比較例)の組み立て

図2に示すように、バック粘着シート1(ARCARE9020、ニッポンテクノクラスタ社)に、抗体固定化メンブレン3を貼り付けた。その際メンブレン長辺側のうち、抗hCG抗体ライン側を下側とする。抗体固定化メンブレンの下側に約2mm重なるように硫化パラジウムコロイド抗体保持パッド2を貼り付け、約4mm重なるようにして硫化パラジウムコロイド抗体保持パッド下側に試料添加パッド5(18mm×150mmに切ったグラスファイバパッド(Glass Fiber Conjugate Pad、ミリポア社))を重ねて貼り付けた。さらに、抗体固定化メンブレンの上側には約5mm重なるように吸収パッド4(20mm×150mmに切ったセルロース膜(Cellulose Fiber Sample Pad、ミリポア社))を重ねて貼り付けた。これら重ね張り合わせた部材を、部材の長辺側を5mm幅になるように短辺に平行にギロチン式カッター(CM4000、ニッポンテクノクラスタ社)切断していくことで、5mm×55mmのイムノクロマトグラフ用ストリップを作製した。これらをプラスチックケース(ニッポンテクノクラスタ社)に入れ、試験用イムノクロマトグラフキットAとした。捕捉部位3aは、検体の抗体を検出する検出部31とプロセスのノイズを示すコントロール部32よりなり、これらの部の発色(黒化)濃度の差から判定を下すことができる。抗体固定化メンブレン3の固定化用抗hCGモノクロナル抗体をライン状に塗布した箇所を検出部31であり、コントロール用抗マウスIgG抗体をライン状に塗布した箇所はコントロール部32である。

10

20

30

40

50

## 【0077】

## 5-2. キットB (本発明) の組み立て

バック粘着シート1 (ARcare9020、ニッポンテクノクラスタ社) に、3で作製した抗体固定化メンブレン3を貼り付けた。その際メンブレン長辺側のうち、抗hCG抗体ライン側を下側とする。その上に増感シート6を銀錯体含有層面を抗体固定化メンブレン面に対面するように貼り付けた。抗体固定化メンブレンの下側に約2mm重なるように2で作製した硫化パラジウムコロイド抗体保持パッド2を貼り付け、約4mm重なるようにして硫化パラジウムコロイド抗体保持パッド下側に試料添加パッド5 (18mm×150mmに切ったグラスファイバパッド (Glass Fiber Conjugate Pad、ミリポア社)) を重ねて貼り付けた。さらに、抗体固定化メンブレンの上側には約5mm重なるように吸収パッド4 (20mm×150mmに切ったセルロース膜 (Cellulose Fiber Sample Pad、ミリポア社)) を重ねて貼り付けた。これら重ね張り合わせた部材を、部材の長辺側を5mm幅になるように短辺に平行にギロチン式カッター (CM4000、ニッポンテクノクラスタ社) 切断していくことで、5mm×55mmのイムノクロマトグラフ用ストリップを作製した。これらをプラスチックケース (ニッポンテクノクラスタ社) に入れ、試験用イムノクロマトグラフキットBとした。

10

## 【0078】

## 6. 性能評価

## 1) 最小検出感度試験法

1質量% BSAを含むPBSバッファにhCG (リコンビナントhCG R-506、ロート製薬 (株) 製) を溶解し、各濃度の試験用hCG溶液を作製した。

各試験用イムノクロマトグラフキットに、各濃度の試験用hCG溶液を100 $\mu$ L滴下し、10、20、30、60分後に抗体固定メンブレンの抗hCG抗体を塗布した部位 (捕捉部位) を目視した際の着色度合いを、着色が濃い「+++」、着色がある「++」、薄い着色がある「+」、着色がない「-」、の4段階で判別した。

最も薄い濃度で判別できた濃度をそのキットでの最小検出感度とした。

20

## 【0079】

## 2) 結果

## 【0080】

## 【表1】

30

hCG濃度 (ng/mL)	検出ゾーンの着色度	
	キットA	キットB
100.00	+++	+++
30.00	++	+++
10.00	+	+++
3.00	-	+++
1.00	-	+++
0.30	-	++
0.10	-	++
0.03	-	+
0.01	-	-
0.00	-	-

40

## 【0081】

表1から明らかなように、本発明によるキットBは比較のキットAに比較して、極めて

50

高感度にhCGを検出できる。

【図面の簡単な説明】

【0082】

【図1】比較のイムノクロマトグラフキットの一態様を模式的に示す平面図である。

【図2】図1で示されたイムノクロマトグラフキットの縦断面を模式的に示す縦断面図である。

【図3】本発明のイムノクロマトグラフキットの縦断面を模式的に示す縦断面図である。

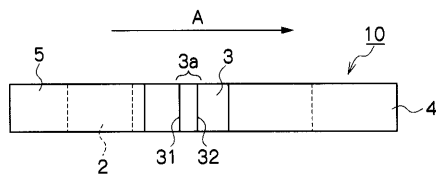
【符号の説明】

【0083】

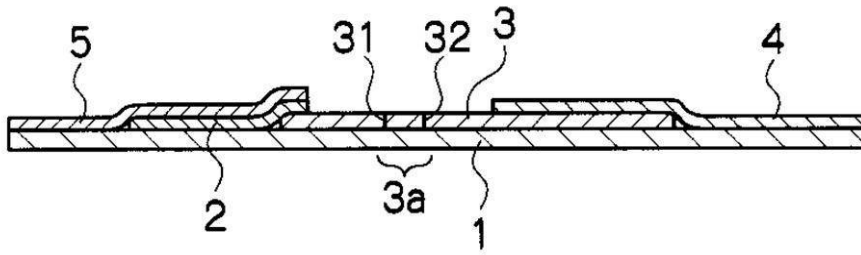
- 1：バック粘着シート
- 2：金属硫化物コロイド抗体保持パッド
- 3：抗体固定化メンブレン
- 3a：捕捉部位
- 31：検出部
- 32：コントロール部
- 4：吸収パッド
- 5：試料添加パッド
- 6：増感シート
- 10：イムノクロマトグラフキット

10

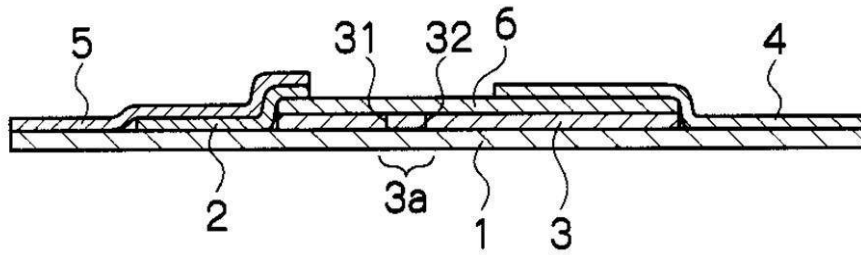
【図1】



【図2】



【図3】



---

フロントページの続き

(72)発明者 片田 順一

神奈川県足柄上郡開成町牛島577番地 富士フイルム株式会社内

審査官 白形 由美子

(56)参考文献 特開2002-202307(JP,A)

特表2004-537722(JP,A)

特開昭63-277971(JP,A)

特開平03-115860(JP,A)

国際公開第2005/072858(WO,A1)

特表平11-502615(JP,A)

特開昭57-45454(JP,A)

特開昭57-45460(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - G01N 33/98

专利名称(译)	免疫色谱试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">JP4920553B2</a>	公开(公告)日	2012-04-18
申请号	JP2007290094	申请日	2007-11-07
[标]申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	富士胶片株式会社		
[标]发明人	小山田孝嘉 片田順一		
发明人	小山田 孝嘉 片田 順一		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/558		
FI分类号	G01N33/543.541.Z G01N33/543.521 G01N33/531.B		
代理人(译)	中岛敦 福田浩		
审查员(译)	白形 由美子		
优先权	2006302843 2006-11-08 JP		
其他公开文献	JP2008139296A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

要解决的问题：提供一种简单快速的高灵敏度免疫色谱试剂盒。  
 ŽSOLUTION：免疫色谱试剂盒使用分析对象与特异性结合的抗体或抗原之间的免疫反应，分析源自固定免疫复合物的标记信号。免疫色谱试剂盒含有无机银盐或银络合物，银离子还原剂，金属胶体标记或金属硫属元素化物标记。Ž

hCG濃度 (ng/mL)	検出ゾーンの着色度	
	キットA	キットB
100.00	+++	+++
30.00	++	+++
10.00	+	+++
3.00	-	+++
1.00	-	+++
0.30	-	++
0.10	-	++
0.03	-	+
0.01	-	-
0.00	-	-