

(19) 日本国特許庁(JP)

再公表特許(A1)

(11) 国際公開番号

W02003/044534

発行日 平成17年3月24日(2005.3.24)

(43) 国際公開日 平成15年5月30日(2003.5.30)

(51) Int. Cl.⁷

G01N 33/543

F I

G01N 33/543 521

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全9頁)

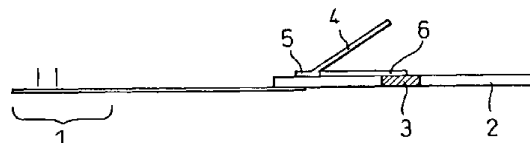
出願番号	特願2003-546112(P2003-546112)	(71) 出願人	000250100 湧永製薬株式会社
(21) 国際出願番号	PCT/JP2002/011973		大阪府大阪市淀川区宮原4丁目5番36号
(22) 国際出願日	平成14年11月15日(2002.11.15)	(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬
(31) 優先権主張番号	特願2001-357895(P2001-357895)	(74) 代理人	100092624 弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成13年11月22日(2001.11.22)	(74) 代理人	100087871 弁理士 福本 積
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(74) 代理人	100082898 弁理士 西山 雅也
(81) 指定国	AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW	(74) 代理人	100081330 弁理士 樋口 外治

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微量検体中の分析対象物を測定するための免疫クロマトグラフィーテストストリップ

(57) 【要約】

多孔性担体からなる免疫クロマトグラフィーテストストリップにおいて、該多孔性担体がある下流に分析対象物質を検出するための捕捉試薬が固定されている検出領域(1)、その上流に展開試薬を受領する展開液受容領域(2)を含み、また両領域の間に分析対象物と親和性を有する標識化試薬を含む試薬領域(3)と検体から測定を阻害する物質を分離する分離領域(4)を含む免疫クロマトグラフィーテストストリップを提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項1】

検体中の分析対象物を定性または定量するための、多孔性担体を有する免疫クロマトグラフィーテストストリップにおいて、該多孔性担体がある下流に分析対象物質を検出するための捕捉試薬が固定されている検出領域(1)、その上流に展開試薬を受領する展開液受容領域(2)を含み、また両領域の間に分析対象物と親和性を有する標識化試薬を含む試薬領域(3)と検体から測定を阻害する物質を分離する分離領域(4)を含む、ことを特徴とする免疫クロマトグラフィーテストストリップ。

【請求項2】

前記検体から測定を阻害する物質を分離する分離領域(4)が、当該ストリップから分岐した構造を有し、分岐点以外の部分において当該ストリップと直接接触しない、請求項1記載のテストストリップ。 10

【請求項3】

前記捕捉試薬が分析対象物と特異的に結合する性質のものである請求項1又は2記載のテストストリップ。

【請求項4】

前記多孔性担体が、ニトロセルロース、ナイロン、セルロース、ガラスファイバーいずれかを含む、請求項1～3いずれか1項記載の免疫クロマトグラフィーテストストリップ。

【請求項5】

前記検体が血液である、請求項1～4いずれか1項記載の免疫クロマトグラフィーテストストリップ。 20

【発明の詳細な説明】

発明の分野

本発明は免疫診断の分野、特に免疫クロマトグラフィーを用いた微量検体の簡便かつ正確なテストストリップに関する。

背景技術

免疫クロマトグラフィーを利用したストリップ形式のテストストリップは、試料を適用するだけで分析結果を得ることが出来るため、その簡便性、迅速性から臨床検査の分野や一般家庭などで幅広く利用されている。特に商業的には妊娠検査薬に代表されるように、免疫クロマトグラフィーを利用したストリップを不透過性固体材料でケーシングした装置がその主流をなしている。このような一般家庭での使用を念頭に置いたテストストリップでは、尿を試料に使うため試料の量の制限を考慮する必要はない。 30

しかしながら、臨床検査の分野では尿を試料とすることが稀であり、多くは全血、血清、血漿、髄液、組織抽出液等を試料とする。これらを試料とする場合は、本質的には尿を試料とするテストストリップと何ら変わるところはないが、全血を試料とする場合は、いくつかの問題が懸念される。例えば赤血球が存在すると、光の散乱及び吸収が起こり結果反射光又は透過光を測定するアッセイ法を妨害するおそれがある。

また、全血試料は、色素または他の可視試験を実質的に干渉する深赤色を有するため、赤血球やヘモグロビンおよびその他の測定阻害物質は、血液検体が特定の分析物について分析される前に、血球分離膜などをテストストリップ内に組み込むことにより、血漿または血清から分離する必要がある。また、その他の試料を用いる場合でも測定阻害物質を含むことが多いことから、正確な測定を行うためにはそれらの物質を分離する必要がある。 40

全血試料から血漿を分離する機能を持つ血球分離膜については、多くの先行文献がある。特許第2,940,990号では、血球凝集素を組み込んだ親水性焼結多孔性マトリックスをもちいた血球分離膜を試験ストリップなどのテストストリップの成分として使用可能であることを開示している。また、特公平7-85083号公報ではポリビニルアルコールまたはポリビニルアルコール/ポリ酢酸ビニルで被膜されたガラス繊維を含むことを特徴とする器具が示されている。特表平7-504747号公報では赤血球に対する抗体を含有するマトリックスをデバイスに適用する方法を記載している。

これらの方法は全血から血球を分離する能力では優れた方法である。しかし、免疫クロマ 50

トグラフィーを利用したテストストリップでは全血の量が問題となる。免疫クロマトグラフィーを利用したテストストリップに組み込んだ場合、完全に反応を終わらせるためには少なくとも50 μ L程度の血漿成分、全血量として100 μ L程度の血液検体が必要となり、ある程度の血液量を確保するために採血管、注射用シリンジを用いた採血が必要となってくることから家庭用などには不向きである。

使用する全血等の試料の量を少なくするため展開溶液を用いる方法もあるが、同一ストリップ上で血球等測定阻害物質の分離工程並びに展開行程が連続して行われるため、分離膜でトラップした血球が流出してしまうことから判定に影響を及ぼすことが懸念される。また、分離したテストストリップのサイズを小さくする方法もあるが、操作性や結果の観察のしやすさの点から、このテストストリップの小型化が適切であるとは限らない。

10

これらの方法を改善する方法として、特開2000-321278号公報では、全血試料を非多孔性受液部材に適用し、順次試薬を吸収しながら検出部で分析対象物を検出する方法を提示している。この方法は全血試料が、テストストリップの末端から吸収されていくため、血球分離能が優れており、より少量の全血試料で反応が終了すると考えられる。しかしながら、この方法によっても、テストストリップの他の構成、結合パッドや橋かけパッド等の大きさに依存して、ある程度の血漿試料の量が必要となってくるため、全血の量を少なくするには限界があった。

このため、微量検体でも簡便かつ正確な測定が可能なテストストリップが望まれていた。発明の開示

本発明は、微量の検体で測定可能な、免疫クロマトグラフィーを利用した簡便で正確なテストストリップを提供することを目的とする。

20

本発明者は、上記の課題を解決するため鋭意検討を行った結果、本発明の免疫クロマトグラフィーテストストリップが微量の検体で正確な測定が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

従って、本発明は、検体中の分析対象物を定性または定量するための、多孔性担体を有する免疫クロマトグラフィーテストストリップにおいて、該多孔性担体がある下流に分析対象物質を検出するための捕捉試薬が固定されている検出領域(1)、その上流に展開試薬を受領する展開液受容領域(2)を含み、また両領域の間に分析対象物と親和性を有する標識化試薬を含む試薬領域(3)と、検体から測定を阻害する物質を分離する分離領域(4)を含む、ことを特徴とする免疫クロマトグラフィーテストストリップを提供するものである。

30

発明の実施の形態

図1に本発明の代表的な形態の一例を示す。(1)は分析対象物質を検出するための捕捉試薬が固定されている検出領域、(2)は展開試薬を受領する展開液受容領域、(3)は分析対象物と親和性を有する標識化試薬を含む試薬領域、そして(4)は検体から測定を阻害する物質を分離する分離領域、をそれぞれ示しており、(3)と(4)の位置関係は前後してもよい。以下、これに従い説明するが、本発明はこの形態に限定されるものではない。

本発明の免疫クロマトグラフィーテストストリップにおいては、繊維質の材料からなる展開液受容領域(2)から展開液が毛管現象により移動し、その下流区域に位置する試薬領域(4)に展開液が到達すると、分析対象物と親和性を有する標識化試薬が溶解されて展開液とともにさらに下流へ展開する。その下流側に検体から測定を阻害する物質を分離する分離領域(4)との接点(5)があり、該分離領域で精製された検体と、上流から展開されてきた標識化試薬を含む展開液がここで合流し、分析対象物と標識化試薬が複合体を形成しながら捕捉試薬が固定されている検出領域(1)に達する。

40

検体中に分析対象物が存在すれば、補足試薬に分析対象物と標識化試薬との複合体が捕獲され、任意のシグナルとして観察される。

尚、これらの各領域は同じ多孔性のマトリックス上にあっても良く、また別のマトリックス上に存在し、試薬や検体が移動可能なように接触していても良い。

テストストリップに用いられる多孔性担体は、展開液や試薬、分析対象物等が毛管現象に

50

よって上流から下流領域に流動し得るものであれば特に制限されないが、好ましくは、ガラス繊維、セルロース類（濾紙、ニトロセルロース等）、ポリエチレン、ポリプロピレン等の多孔質プラスチック類、ナイロン等が挙げられる。更に好ましくはニトロセルロース、ナイロン、セルロース及びガラス繊維等である。

検体から測定を阻害する物質を分離する手段としては、検体によって異なるが、任意のフィルターや樹脂および血球凝集剤等を使用できる。例えば検体が血液の場合は、ガラス繊維膜等の血球分離膜等あるいは抗体やレクチン、糖アルコール等の血球凝集剤を用いることができる。

この分離領域（４）は、テストストリップから分岐した構造を有し、分岐点（５）以外の部分は当該ストリップと直接接触しないようにされる。その方法としては、例えば測定に影響を与えないフィルム等の不透湿性の材料を用いて、分離領域の前記分岐点以外の部分、またはストリップの分離領域に対応する部分（６）を、被覆することができる。

本発明に用いられる標識化試薬は任意の標識試薬で標識された分析対象物と親和性を有するものをいい、例えば、標識された抗体、抗原、及びハプテン等を用いることができる。

また、標識法としては、直接標識や間接標識（アルカリ性フォスファターゼ等の酵素類等、ビオチン標識）等があり、基質などを必要としない直接標識が好ましい。直接標識としては、例えば、プラチナ、金、銀および銅などの金属、ヨウ化銀、臭化銀、水酸化銀、酸化鉄、水酸化鉄または水和酸化鉄、水酸化アルミニウムまたは水和酸化アルミニウム、水酸化クロムまたは水和水酸化クロム、硫酸銅、硫酸水銀、硫酸バリウム二酸化チタンなどの金属化合物よりなる群から選ばれたものが挙げられ、好ましくは金コロイド粒子を用いて調製することができる。

本発明に用いられる検出領域に固定化された捕捉試薬としては、分析対象物と特異的に結合する抗体、抗原、ハプテン、アビジン、レセプター等が挙げられる。

本発明に用いられる使用可能な検体としては、例えば血液、尿、唾液及び粘液等が挙げられるが、血液が特に好ましく、測定対象成分としては、例えばタンパク、ウイルス抗原、腫瘍マーカー、炎症マーカー、ホルモンあるいは薬物等が挙げられる。

本発明に用いられる免疫学的特異的結合アッセイとしては、競合結合アッセイ法、サンドイッチアッセイ法（ビオチン化抗体とアビジンとの結合を用いたサンドイッチ法を含む）が挙げられ、いずれも適用可能であるが特にサンドイッチアッセイ法が好ましい。

また本発明は、特別な熟練を必要としないことから、簡便かつ正確なテストストリップとして臨床現場から家庭用まで幅広く応用が可能である。

実施例

以下、実施例により本発明を更に詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 .

検出領域の膜の作製

イムノダイン膜 A B C に抗 H C G 抗体をディスペンサーにてライン状に塗布、乾燥後カゼイン溶液でブロッキングし、P B S 溶液で洗浄した後、25℃にて乾燥した。最終的に 5 mm x 25 mm のストリップに切断した。

金コロイド標識化試薬の作製

金コロイド溶液は B B I 社の gold - sol G 4 0 を使用し、プロトコールに従って、抗 H C G 抗体を標識化した。金コロイド標識試薬をディスペンサーでコンジュゲートパッド上に塗布し、凍結乾燥した。最終的に 5 mm x 5 mm のパッドとした。

テストストリップの作製

セルロース膜を 5 mm x 10 mm 幅に切断し、血漿成分と標識化試薬の混合領域とした。コンジュゲートパッドを 5 mm x 10 mm に切断し、展開液受容部とした。粘着剤の塗布されたポリエチレンフィルム上に検出領域をもつイムノダイン膜を貼りつけ、その一端にセルロース膜、金コロイド標識化試薬を含有するパッド、および展開液受容部を順次貼りつけて一枚のストリップとした。さらにセルロース膜と金コロイド標識化試薬を含有するパッドの接点部分に血球分離膜である H e m a s e p (5 mm x 10 mm) の一端を接触

10

20

30

40

50

させ、この接触部分を、粘着剤を塗布したフィルムにより貼り合わせた。血球分離膜の上記接触部分以外の部分と展開試薬受領領域とが接触しないように、前記展開液受容部の一部の表面を粘着剤の塗布された不透過性フィルムで覆った。

全血試料にHCGが100IU/Lとなるように加え、上記のようにして作製したテストストリップの血球分離領域に10 μ L添加した。5分後、展開液100 μ Lを展開液受容部に加え、検出領域に達するように、下方向に15分展開させた後、検出領域中の発色したラインを520nmの反射光により測定した。一方、展開液受容部に血球分離膜をもちいた一般的なテストストリップを作製し対照として使用した。対照品では全血試料10 μ Lを添加した場合と全血検体10 μ Lを加えた後、展開液100 μ Lを加える方法で測定した。

本発明のテストストリップによる測定結果と対照品による測定結果の比較を表1に示す。

表1

	吸光度のピーク高
本発明テストストリップ	0.136
対照品 全血10 μ Lのみ	展開せず、測定不可能
対照品 全血+展開液	血球が検出領域にもれ出てきたため 検出不可能

表-1の結果から、極少量の全血10 μ Lの試料を免疫クロマトグラフィーを利用したテストストリップで分析する場合、一般的なテストストリップでは液量の不足から展開が十分に起こらず、分析が不可能であることが明白である。また、全血試料を滴下した後、同じ部位に展開液を加えると、液量は十分に足りるが、血球分離が十分に行われず、血球が検出領域にもれ出てくる現象が認められ、検出が出来なくなることが示された。

本発明のように全血検体の滴下部位と展開液受容部位とを明確に区分することで、少量の全血試料を用いた分析物の測定が可能となることが証明された。

産業上の利用可能性

本発明の免疫クロマトグラフィーテストストリップは、簡便かつ正確な測定が可能であることから、臨床現場から家庭用まで幅広く応用が可能である。

【図面の簡単な説明】

図1は本発明免疫クロマトグラフィーテストストリップの一形態を示す。

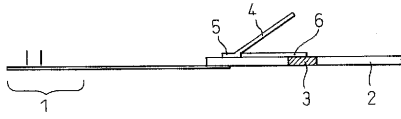
10

20

30

【 図 1 】

Fig.1



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/JP02/11973
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int. Cl. ⁷ G01N33/543		
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) Int. Cl. ⁷ G01N33/543		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2003 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2003 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2003		
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 A	JP 11-248708 A (Roche Diagnostics GmbH), 17 September, 1999 (17.09.99), & EP 926498 A	1, 3-5 2
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"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)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"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</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 05 February, 2003 (05.02.03)		Date of issuing of the international search report 18 February, 2003 (18.02.03)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

国際調査報告		国際出願番号	PCT/J P 02/11973	
A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))				
Int. Cl. G01N33/543				
B. 調査を行った分野				
調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))				
Int. Cl. G01N33/543				
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの				
日本国実用新案公報 1922-1996年				
日本国公開実用新案公報 1971-2003年				
日本国特許実用新案公報 1994-2003年				
日本国実用新案登録公報 1996-2003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 請求の範囲の番号	
X A	J P 11-248708 A (ロシュ ゲーエムペーハー) &EP 926498 A	(ロシュ ダイアグノスティクス 1999.09.17	1, 3-5 2	
<input type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input 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、一般的技术水準を示すもの 「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				
の日後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献				
国際調査を完了した日	05.02.03	国際調査報告の発送日	18.02.03	
国際調査機関の名称及びひあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 亀田 宏之 (印)	2 J	9 0 1 5	
	電話番号 03-3581-1101	内線	3 2 5 0	

フロントページの続き

- (72)発明者 松岡 秀一
広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内
- (72)発明者 兼澤 富士子
広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内
- (72)発明者 渡辺 利夫
広島県高田郡甲田町下甲立1624 湧永製薬株式会社内

(注)この公表は、国際事務局(WIPO)により国際公開された公報を基に作成したものである。なおこの公表に係る日本語特許出願(日本語実用新案登録出願)の国際公開の効果は、特許法第184条の10第1項(実用新案法第48条の13第2項)により生ずるものであり、本掲載とは関係ありません。