

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5189201号  
(P5189201)

(45) 発行日 平成25年4月24日(2013.4.24)

(24) 登録日 平成25年2月1日(2013.2.1)

(51) Int.Cl.

F I

<b>GO 1 N 33/543</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 2 1
<b>GO 1 N 33/53</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/543	5 7 5
<b>GO 1 N 37/00</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 33/53	N
<b>GO 1 N 21/64</b>	<b>(2006.01)</b>	GO 1 N 37/00	1 0 1
		GO 1 N 21/64	F

請求項の数 22 (全 15 頁)

(21) 出願番号 特願2011-503165 (P2011-503165)  
 (86) (22) 出願日 平成21年4月2日(2009.4.2)  
 (65) 公表番号 特表2011-516863 (P2011-516863A)  
 (43) 公表日 平成23年5月26日(2011.5.26)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2009/039280  
 (87) 国際公開番号 W02009/124179  
 (87) 国際公開日 平成21年10月8日(2009.10.8)  
 審査請求日 平成22年11月22日(2010.11.22)  
 (31) 優先権主張番号 61/041,797  
 (32) 優先日 平成20年4月2日(2008.4.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/041,790  
 (32) 優先日 平成20年4月2日(2008.4.2)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501354521  
 アボット ポイント オブ ケア インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 08540 ニュージャージー州, プリンストン, カレッジロード イースト 400  
 (74) 代理人 100068021  
 弁理士 絹谷 信雄  
 (72) 発明者 ワードロー, スティーヴン・シー  
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ライムハイロック 1  
 (72) 発明者 レヴァイン, ロバート・エー  
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフォード ピルグリム・レーン 31

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全血を含む生体体液のイムノアッセイを実施するためのリガンドアッセイにおける結合標識と遊離標識との仮想分離

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

体液試料の標的分析物イムノアッセイを実施するための方法であって、  
前記体液試料が解析中にチャンバ内で静止して存在するように、前記体液試料をチャンバに入れるステップと、

前記体液試料中に検出可能標識を提供するステップであって、その標識が、前記標的分析物と結合することにより、前記体液試料中に検出可能な標識された標的分析物を生成するように機能する、ステップと、

前記チャンバ内に、標的分析物に特異的なリガンドが付着している少なくとも1つの第1の表面積を提供するステップであって、前記標的分析物に特異的なリガンドが、前記体液試料中に存在する標的分析物を前記第1の表面積に選択的に結合させるように機能する、ステップと、

前記チャンバ内に、少なくとも1つの第2の表面積であって、前記体液試料中に存在する標的分析物を前記第2の表面積に選択的に結合させるように機能する標的分析物に特異的なリガンドを含まない第2の表面積を提供するステップと、

前記少なくとも1つの第1の表面積を光学的に走査して、前記少なくとも1つの第1の表面積における前記標識された標的分析物の画素毎の平均標識信号強度の分布を検出及び記録するステップと、

前記少なくとも1つの第2の表面積を光学的に走査して、前記少なくとも1つの第2の表面積における前記標識された標的分析物の画素毎の平均標識信号強度の分布を検出及び

10

20

記録するステップと、

前記少なくとも1つの第1の表面積における標識された標的分析物の量と、前記少なくとも1つの第2の表面積における標識された標的分析物の量と、標識された標的分析物の比との中の少なくとも1つを決定するステップと、  
を含む、方法。

【請求項2】

前記チャンバの高さが1~200  $\mu\text{m}$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記チャンバの高さが約6  $\mu\text{m}$ である、請求項2に記載の方法。

【請求項4】

前記体液試料が全血である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記チャンバの高さが3  $\mu\text{m}$ ~15  $\mu\text{m}$ の範囲である、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記チャンバが少なくとも1つの壁を有し、前記少なくとも1つの第1の表面積及び前記少なくとも1つの第2の表面積が前記壁上に配置される、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記少なくとも1つの第1の表面積及び前記少なくとも1つの第2の表面積が、前記チャンバ内に配置された物体に配置される、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

前記チャンバの前記第1の表面積内にある標識された標的分析物の前記決定された総量と、前記チャンバの前記第2の表面積内にある標識された標的分析物の前記決定された総量とを用いて、前記体液試料中の前記標的分析物の総量を決定するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記体液試料中の前記標的分析物の総量を決定するステップが、標準曲線を用いる、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記体液試料中の標識された標的分析物の前記決定された総量と、前記チャンバの前記第2の表面積における標識された標的分析物の前記決定された総量とを用いて、前記体液試料中の結合した標的分析物の総量を決定するステップをさらに含む、請求項8に記載の方法。

【請求項11】

前記体液試料中の結合した標的分析物の総量を決定するステップが、標準曲線を用いる、請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記検出可能標識が検出可能な蛍光分子である、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

体液試料の標的分析物免疫アッセイを実施するための方法であって、  
前記体液試料が解析中にチャンバ内で静止して存在するように、前記体液試料をチャンバに入れるステップと、

前記体液試料中に、第1のリガンドと結合する検出可能標識を提供するステップであって、その第1のリガンドが、前記標的分析物のエピトープに特異的であり、その第1のリガンドが、前記標的分析物と結合することにより、前記体液試料中に検出可能な標識されたリガンド標的分析物を生成するように機能する、ステップと、

前記チャンバ内に、標的分析物に特異的な第2のリガンドが付着している少なくとも1つの第1の表面積を提供するステップであって、前記標的分析物に特異的な第2のリガンドが、前記体液試料中に存在する標的分析物を前記第1の表面積に選択的に結合させるように機能する、ステップと、

前記チャンバ内に、少なくとも1つの第2の表面積であって、前記体液試料中に存在す

10

20

30

40

50

る標的分析物を前記第2の表面積に選択的に結合させるように機能する標的分析物に特異的な第2のリガンドを含まない第2の表面積を提供するステップと、

前記少なくとも1つの第1の表面積を光学的に走査して、前記少なくとも1つの第1の表面積における前記標識されたりガンド標的分析物の画素毎の平均標識信号強度の分布を検出及び記録するステップと、

前記少なくとも1つの第2の表面積を光学的に走査して、前記少なくとも1つの第2の表面積における前記標識されたりガンド標的分析物の画素毎の平均標識信号強度の分布を検出及び記録するステップと、

前記少なくとも1つの第1の表面積における標識されたりガンド標的分析物の量と、前記少なくとも1つの第2の表面積における標識されたりガンド標的分析物の量と、前記第1の表面積と第2の表面積との標識されたりガンド標的分析物の比とのうちの少なくとも1つを決定するステップと、

を含む、方法。

【請求項14】

前記標的分析物が、所与のサブタイプの免疫グロブリンである、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

前記第1の表面積が第1の粒子上に配置される、請求項13に記載の方法。

【請求項16】

前記第1の粒子が、第1の薬物で被覆された第1のタイプの粒子である、請求項15に記載の方法。

【請求項17】

前記第2の表面積が第2の粒子上に配置され、その第2の粒子が、第1のタイプであり、且つ薬物コーティングを含まない、請求項15に記載の方法。

【請求項18】

前記第1の表面積が、第1のタイプの第1の粒子と、前記第1のタイプとは異なる第2のタイプの第2の粒子とに配置される、請求項13に記載の方法。

【請求項19】

前記第1の粒子が第1の薬物で被覆され、且つ前記第2の粒子が、前記第1の薬物とは異なる第2の薬物で被覆される、請求項18に記載の方法。

【請求項20】

前記第2の表面積が第3の粒子上に配置され、その第3の粒子が、前記第1のタイプ又は前記第2のタイプであり、且つ薬物コーティングを含まない、請求項18に記載の方法。

【請求項21】

前記体液試料が全血である、請求項13に記載の方法。

【請求項22】

前記チャンバの高さが  $3\ \mu\text{m} \sim 15\ \mu\text{m}$  の範囲である、請求項13に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、2008年4月2日に出願された米国仮特許出願第61/041,784号明細書；2008年4月2日に出願された米国仮特許出願第61/041,791号明細書；2008年4月2日に出願された米国仮特許出願第61/041,790号明細書；2008年4月2日に出願された米国仮特許出願第61/041,794号明細書；2008年4月2日に出願された米国仮特許出願第61/041,797号明細書；及び2008年4月9日に出願された米国仮特許出願第61/043,571号明細書の利益を主張する。

【0002】

本発明は、全血、血清、血漿、尿、乳、胸水及び腹水、並びに精液などのヒト及び動物

10

20

30

40

50

の生体体液において免疫学的に検出される物質の電子的な仮想検出、定量化及び特性決定に関し、この検出、定量化及び特性決定は、薄いチャンバ内で静止状態の体液試料に対して実施され、前記チャンバは少なくとも2つの平行な平面壁を有し、そのうちの少なくとも1つは透明である。

【背景技術】

【0003】

本発明は、現行では結合分析物の遊離分析物との物理的な分離を伴うあらゆるイムノアッセイの実施において、その代わりに、リガンドアッセイにおいて光学的に検出される結合標識と遊離標識との仮想分離を実施することによる改良に関し、標識は、好ましくは蛍光標識であるが、光学的に検出可能且つ定量可能な標識であればいずれであっても十分である。このアッセイに使用されるチャンバ、及びそうしたチャンバにおいて分析物を計測するための機器は、以下の発行済み特許：S. C. Wardlawに対して発行された米国特許第6,929,953号明細書；S. C. Wardlawに対して発行された米国特許第6,869,570号明細書；S. C. Wardlawに対して発行された米国特許第6,866,823号明細書；及び2007年4月19日に公開されたS. C. Wardlawに対する米国特許出願公開第2007/0087442号明細書に記載されている。

10

【0004】

結合分析物の遊離分析物との物理的な分離は、先行技術においては、限定はされないが、チャコール又はタルクによる遊離標識の吸着、結合分析物又は非結合分析物のいずれかを含むビーズの磁気分離、試験管の壁にカップリングさせた抗体などの、容器による結合標識分析物の吸着及び分析物の結合した抗体に対する二次沈降抗体の使用と、それに続く遠心、並びに上記の特許及び公開に記載される方法を含め、様々な手段により達成されている。

20

【0005】

先行技術における結合した標的分析物を物理的に分離するタイプのアッセイのいくつかは、全てR. A. Levineらに対して発行された以下の米国特許：米国特許第5,834,217号明細書；米国特許第5,776,710号明細書；米国特許第5,759,794号明細書；米国特許第5,635,362号明細書；米国特許第5,593,848号明細書；米国特許第5,342,790号明細書；米国特許第5,460,979号明細書；米国特許第5,480,778号明細書；及び米国特許第5,360,719号明細書に記載されている。前述の特許では、結合分析物の遊離分析物との分離は、遠心か、又は他の物理的な方法、例えば、デカント若しくはろ過などにより実施される。

30

【0006】

先行技術はまた、「ホモジニアスイムノアッセイ」と称されるタイプのアッセイについても記載している。ホモジニアスイムノアッセイは、結合分析物の非結合分析物、すなわち遊離分析物との物理的な分離を必要としない。「結合物の遊離物との分離」は、比較的大型の抗体による酵素の立体化学的な干渉を利用し、着色された、又は蛍光を発する酵素作用産物を定量することにより達成される。ホモジニアスアッセイの別の方法は、フルオロフォアの蛍光消光を利用して結合分析物を遊離分析物と識別する。これらの方法はイムノアッセイの実施を大幅に簡略化するが、概して高濃度の低分子量分析物に対してのみ有用であり、これは、タンパク質（例えば、インスリン）、成長ホルモンなどの高分子量の標的分析物が同様に酵素に干渉し、消光に影響を及ぼし得るためである。さらに、このホモジニアスタイプのアッセイは、典型的には、標準的なイムノアッセイほどの高い感度を有しない。

40

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

標的分析物の定量化が仮想的なもので、電子的に実施することができ、従ってホモジニアスイムノアッセイの利点を有すると同時に、標準的なイムノアッセイの感度を維持し、

50

並びに大型の標的分析物、例えば、インスリン及び成長ホルモンのようなホルモンを有することが可能な標的分析物のリガンドアッセイが提供されたならば、極めて望ましい。

【課題を解決するための手段】

【0008】

イムノアッセイは、血液中のホルモン等、広範な分析物の分析に用いられる。イムノアッセイは、計測対象の標的分析物と特異的に結合する特定の結合剤を検出する一般的な手法によって機能する。結合剤は、本明細書ではリガンドと称される。リガンドは、本明細書では、限定はされないが、抗体、レクチン、アプタマー (aptamer)、又は天然に存在する物質を含め、標的分析物に結合するように機能するものとして定義される。計測される試料は、標的分析物と、標識された形の計測対象の分析物とに対して特異的なリガンドと混和される。この混合物をインキュベートすると、標的分析物の標識した分子と標識していない分子とがリガンド上の結合部位について競合する。好適な期間後、何らかの方法でリガンドを除去し、リガンドと結合した標識を、結合せず混合物中に遊離したままの標識と比較する。この結合/遊離比は、最初に試料中にあった標的分析物の濃度に関係するが、結合標識又は遊離標識のいずれによっても同じ情報を得ることができる。この比を用いて精度管理チェックを行うことが可能であり、ここで容積が一定であるならば、結合物+遊離物の合計は比較的一定している。この精度管理はまた、本発明の実施においても用いられ得る。

10

【0009】

本発明のある態様によれば、体液試料中にあり得る標的分析材料についての生体体液試料のアッセイ方法が提供される。この方法は、体液試料中に含まれる遊離標的分析物と結合標的分析物との仮想分離を利用し、試料の電子走査が関わる。この方法は、所定の固定高さを有する検査チャンバに、そのチャンバ内に体液試料の薄層が生じるように体液試料を置くことを含む。チャンバの少なくとも1つの壁、通常は上壁が透明であるため、チャンバ内の試料を観察することができる。ある場合には、チャンバの上壁及び底壁の双方が透明である。チャンバの高さ(例えば、典型的には $1\mu\sim 200\mu$ )は、当面の用途に従い変わり得る。例えば、抗凝固処理された全血を分析するときには、 $6\mu$ のチャンバ高さであれば、それによって血液試料中の赤血球の単層と、それらの間に散在する血漿ラクナとが作り出されるため有利である。

20

【0010】

固定的な構造又はリガンドで被覆されたビーズの高さは、最適には、チャンバの高さの10分の1以上であり、理想的にはチャンバの高さとほぼ同等であるべきである。その理由は、標識が結合する粒子又は構造を取り囲んで遊離状態で存在する標識(例えば、フルオロフォア)の総量が、検出される最小量の結合標識の量よりはるかに多い場合、ビーズ又は構造と結合した標識の量を正確に決定する能力が、信号対雑音比の影響により低下するためである。数学的には、チャンバの高さに制限はないが、検出される標識の信号対雑音による実際的な制限から、最適に動作するためには、薄いチャンバと、構造の外周を囲んで描かれ、且つチャンバの下端から上端まで延在する円柱の容積の少なくとも10パーセントを占める構造とが必要となる。構造又はビーズではなく、リガンドがチャンバの上面又は底面に付着する例では、上記の比率が適用されるが、アッセイは、最適には、結合

30

40

【0011】

本発明の方法を用いて、患者の薬物アレルギー又はアレルギー感受性をポイント・オブ・ケアで検査することができる。薬物アレルギー及びアレルギー感受性は、一般的で重要な障害である。患者及び社会にとっては費用がかかる。例えば、ペニシリンクラスの薬物によるペニシリンアレルギー患者の治療は、死亡又は重篤な反応を引き起こし得る。ペニシリンは、この論考において代表的な薬物として使用され、これは、ペニシリンが重症な

50

アレルギー反応の原因となる薬物タイプとして最も一般的であるという理由による。本発明は、ペニシリンアレルギーの検査に限定されるものではなく、他の薬物（例えば、抗生物質、筋弛緩剤、麻酔剤等）及びアレルギーに対する感受性の検査にも用いられ得る。

【0012】

ペニシリンは、安価で効果的な、概して非毒性の薬物である。自分がペニシリンアレルギーを有すると思っている患者は、アレルギーの恐れがあることを考慮して、それほど微生物を標的とすることのない別の薬物で治療され得る。しかしながら、かかる代替薬物は患者に重篤な副作用を引き起こし得るとともに、新薬になるほど、ペニシリン薬と比べて価格が数百倍又は数千倍高くなり得るため、保険医療システムが負担する費用は莫大となる。同じように重要なこととして、標的微生物に一層焦点が搾られた薬物ではなく、より広域の薬物を使用するとき起こる薬剤耐性の細菌、ウイルス、又は他の感染病原体の発生が増加することに関連して社会が被る費用がある。従って、個々の患者、医療提供者、及び社会にとって、患者が提供する病歴に追加される方法により、薬物アレルギー又はアレルギー感受性の有無を決定することは重要である。本発明の一目的は、患者の全血又は血漿の試料中の薬物アレルギー及び/又はアレルギー ( a l l e r g e n ) 感受性の有無を検出することである。

10

【0013】

ペニシリンアレルギーであると主張する患者の多くはアレルギーではなく、同様に、自分がアレルギーではないと思っている一部の患者が、最近の曝露によりアレルギーを発症してもおかしくないことが十分に裏付けられている。自分はペニシリンアレルギーであると考えている人の約80%が、実際にはペニシリンの使用に耐容性を示すという報告が数多くあり、そのため、こうした患者については、効果が弱まり、毒性が高まり、且つ治療費がさらにかかる結果となり得る抗生物質選択の制約は、不要である。

20

【0014】

薬物アレルギーの検出を可能にする必要性が、患者に直面するポイント・オブ・ケア以上に求められているところは他にない。診療室、救急処置室又は病院で薬を処方しようとしている医師には、インピトロで、又は皮膚試験により実施される検査のために何時間も、又は1日中待つ余裕はない。皮膚試験は、患者がさらに被検物質に対する反応を起こすリスクにさらされ得るとともに、理論的には、既往反応によってアレルギーが誘発されたり、又は強まったりする可能性がある。インピトロ検査の実施は、現在のところ複雑で時間がかかり、医師が情報を得るのは、そうした情報が最も役立つであろうときのずっと後になってからである。さらに、ペニシリン型の薬物を含む多くの薬物のアレルギー性は、2つ以上のエピトープに起因することもあり、正確な検査には、アレルギー反応の原因となり得るあらゆる一般的なエピトープについての検査が必要となり得る。一般には、文献に詳しく記載されているRAST検査が、限られた数の検査用アレルギー及びそれらのエピトープに関して実施される。

30

【0015】

一般に、IgE媒介性免疫反応は、アナフィラキシー、じんま疹、下痢を伴う腸の腫脹及び気道の腫脹に起因する気道閉塞を含む最も重症のアレルギー反応の原因であることが認められている。一部の専門家によっては、他の免疫グロブリンクラスもまた、薬物に対するアレルギー反応に寄与し得ることが示唆されているが、一般には、IgG及びIgM媒介性薬物アレルギーに対するアレルギー反応は生命を脅かすものではなく、発疹のほうが起こり易い。

40

【0016】

本発明の利点は、本発明が、ポイント・オブ・ケアに最適に、所与の状況下で使用が適応される、又は適応され得る1つ又は複数の薬物に対して親和性を有するIgE又は任意の他の免疫グロブリンの存在の決定を実施する手段を提供することである。

【0017】

標識の選択としては、検出が容易で、且つリガンドと結合するフルオロフォアの使用である。しかしながら、本発明は蛍光定量的な標識の使用に限定されるものではない。同じ

50

チャンバ内でビーズと結合することになり得る2つ以上のクラスの免疫グロブリンの有無を調べるのに必要であれば、2色以上のフルオロフォアを使用してもよい。抗原の結合していないビーズが対照として使用される。対照ビーズは、被覆されたビーズと化学的及び幾何形状的に同様であってもよく、色のみが異なるか、又は他の手段（例えば、蛍光、又はその構造に取り込まれた蛍光色素の組み合わせ）によってその検出が可能となる。対照ビーズは、例えば、IgEに対する蛍光標識抗体であって、潜在的なアレルゲンとしての被験薬物の決定基（エピトープ）を含むビーズと結合した抗体からの有意な蛍光信号の検出を、エピトープによって被覆されていない、又はエピトープが結合していない同様のビーズに存在する信号と比較し得るような対照を提供する。従って非特異的な結合は制御され、偽陽性の結果が生じることはない。

10

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1】先行技術に従う血液又は他の試料に対するイムノアッセイの実施に使用され得るリガンド担持表面の概略側面図である。

【図1(a)】図1と同様の図であるが、先行技術に従い試料が洗い流された後の表面を示す。

【図2】図1と同様の概略側面図であるが、先行技術に従う血液又は他の試料に対するサンドイッチイムノアッセイの実施に使用され得るリガンド担持表面を示す。

【図2(a)】図2と同様の図であるが、先行技術に従い第2の標識が試料に添加された後の試料を示す。

20

【図2(b)】図2(a)と同様の図であるが、先行技術に従い試料が洗い流された後の表面を示す。

【図3】本発明に従い形成された試料採集チャンバであって、抗凝固処理された全血試料を含むチャンバの第1の実施形態の平面図であり、この血液試料には、リガンドを担持する分析物捕捉粒子が添加されている。

【図4】リガンドで被覆された標的分析物捕捉粒子の1つを含む図3の試料採集チャンバの一部の側断面図である。

【図5】図4に示されるものと同じ検査チャンバの平面図であり、リガンドで被覆された標的分析物捕捉粒子の1つを含む試料範囲を示し、また、リガンドで被覆された標的分析物捕捉粒子の1つは含まず、血液試料中に遊離している標識された標的分析物のみを含む別の試料範囲も示す。

30

【図6】部分的にリガンドで被覆された標的分析物捕捉表面の断片的な断面図であり、表面の一部はリガンドで被覆され、表面の他の部分は被覆されていない。

【図7】図6に示されるような上面を有する閉鎖されたチャンバの概略断面図である。

【図8】図6に示される表面の平面図である。

【図9】図6及び図8に示される捕捉表面上のリガンドバンドからの発光のトレースである。

【発明を実施するための形態】

【0019】

ここで図面を参照すると、図1及び図1(a)は、甲状腺ホルモン、サイロキシンなどの低分子量の分析物に対して一般的に用いられる先行技術の競合イムノアッセイ（「平衡アッセイ」とも称される）を示し、ここで符号1は、標的分析物に特異的なリガンド2が当該技術分野で周知の何らかの手段により結合している表面を表す。表面1は、ガラス又はプラスチック製の管又は粒子の透明な壁であってもよい。溶液3は、非標識の標的分析物4（未知）と標識された標的分析物5との混合物を含む。ある時間が経つと（これは標的及び標識に応じて数分から数時間であり得る）、標識された標的分析物5と非標識の標的分析物4とが互いに平衡状態となり、ここでリガンド部位2の、概して全てではないものの、その多くが、標識された標的分析物5又は非標識の標的分析物4のいずれかによって占有される。この時点で（図1a）、リガンド2と結合している標識された標的分析物5を保つような方法で、混合物3がリガンド担持表面1から分離される。次に、表面1と

40

50

結合している標識された標的分析物 5 が計測され ( 図 1 a を参照 ) 、遊離している標識された標的分析物もまた計測され得るか、又は、合計 = 遊離物 + 結合物、すなわち結合物 = 合計 - 遊離物として計算され得る。結合標的分析物の遊離標的分析物に対する比は、試料中の標的分析物の総量に反比例する。

#### 【 0 0 2 0 】

図 2 ~ 図 2 ( b ) は、多くの場合に「サンドイッチ」アッセイと称されるリガンドアッセイを示し、ここでは、2 つの別個のリガンドが利用される。表面 1 は、上記と同じようにそれと結合したリガンド 2 ( 「結合リガンド」 ) を有し、標的分析物 4 を含む試料が溶液 3 に導入され、表面 1 と共にインキュベートされる。直ちに、又は好適な時間が経った後に、別個の標識されたリガンド 6 が溶液に導入され、この標識されたリガンド 6 は、結合リガンド 2 とは異なる標的分析物 4 上の部位に結合する ( 図 2 a ) 。これにより、事実上、中心に標的分析物 4 を含む「サンドイッチ」が生じる。次に、遊離している標識リガンド 6 が表面 1 から洗い落とされ、標識された部位で被覆された表面 1 が残る ( 図 2 b ) 。次に、表面 1 と結合している標識された標的分析物 4 が定量され、従って信号は、元の試料中の標的分析物 4 の量に正比例する。一般に、サンドイッチアッセイはより正確で、いくらか精度が高いことが認められているが、リガンドが結合することのできる少なくとも 2 つの異なる部位を有する標的分析物分子にしか適用することができない。

10

#### 【 0 0 2 1 】

上記のアッセイのいずれにおいても、結合標識の遊離標識との分離は、手順の困難な側面の一つとして認識されており、多くの場合に、遠心、デカント、洗浄等の 1 つ又は複数の機械的に複雑なステップが必要となる。結果として、こうした検査を自動化する機器類は比較的複雑で、複数の操作が必要なものとなっている。

20

#### 【 0 0 2 2 】

対照的に、本発明の態様は「仮想分離」する手段を提供し、ここで結合標識と遊離標識とは物理的に分離されるのではなく、被験細胞の構造と、被験細胞の異なる領域に由来する信号の数学的な操作との組み合わせにより分離される。結果として、簡略化された自動リガンドアッセイ方法及び装置を実現することができる。

#### 【 0 0 2 3 】

本発明の態様に従えば、結合剤がリガンドであるか、又は標的分析物に対して高親和性を有する他の物質であるイムノアッセイ又はリガンドアッセイが実施される。

30

#### 【 0 0 2 4 】

本発明に係るアッセイは、例えば、米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 2 4 3 1 1 7 号明細書及び米国特許出願公開第 2 0 0 7 / 0 0 8 7 4 4 2 号明細書及び米国特許第 6 , 8 6 6 , 8 2 3 号明細書 ( これらは全て、全体として参照により本明細書に援用される ) に記載される試料容器及び撮像機器システムを使用して実施することができる。しかしながら、本アッセイは、これらのチャンバ及び撮像機器に限定されるものではない。

#### 【 0 0 2 5 】

用語「イムノアッセイ」は、本開示及び特許請求の範囲において使用されるとき、抗体ベースの結合剤及び非抗体ベースの結合剤の双方を意味するものとする。非抗体ベースの結合剤の例としては、限定はされないが、ビタミン B 1 2 を結合するための内因子、及びビオチン標識された標的を結合するためのアビジン、又はその逆が挙げられる。

40

#### 【 0 0 2 6 】

本発明の態様に従えば、明確に定義され、且つ物理的に画定された表面であって、そこにリガンドの結合した表面が提供され、次に当該の表面と結合した標識からの信号が、溶液中に存在し得る任意の周囲の遊離標識の信号と数学的に識別される。以下のとおり記載される 2 つの一般的な場合がある。

#### 【 0 0 2 7 】

図 3 は、検体チャンバアセンブリ 4 0 の一区画の平面図であり、このチャンバアセンブリ 4 0 は、抗凝固処理された全血試料を含む。チャンバアセンブリ 4 0 は、上壁及び下壁 7 を含み ( 図 4 を参照 ) 、そのうちの少なくとも一方は透明である。好ましくは、壁 7 の

50

双方が透明である。チャンバアセンブリ40はスペーサー部材42を含み(図3を参照)、これらはチャンバアセンブリ40の内部にランダムに位置する。スペーサー部材42は、好ましくは球形で、チャンバアセンブリ40の高さを決定及び制御する。抗凝固処理された全血試料をアッセイする場合、直径が約6 $\mu$ のスペーサー部材42が特に良好に機能する。チャンバアセンブリ40に含まれる血液試料は、個々の赤血球44と赤血球の凝塊46とを含み得る。血液試料はまた、いかなる有形の血液成分も含まない透明な血漿ラクナ範囲48も含む。最後に、血液試料は複数のリガンドで被覆された標的分析物捕捉粒子8も含み、これらは好ましくは球状の形態である。標的分析物捕捉粒子8は血液試料全体にランダムに分散し、血液試料分析用には直径が約3 $\mu$ ~4 $\mu$ であってもよく、そのため血液試料中に容易に検出することができる。

10

## 【0028】

図4は、図3のチャンバアセンブリ40の構造を示す。チャンバアセンブリ40は、上壁及び下壁7により画定され、そのうちの少なくとも一方は透明でなければならない。チャンバ内に粒子8があり、その表面はリガンド9で被覆されている。粒子8は、その容積を決定することができる限りいかなる形状であってもよいが、好ましくは球形である。粒子8は、ガラス、又はポリスチレンなど、リガンドが結合することのできる任意の材料であってもよい。粒子はいかなる特定の直径にも限定されず(例えば、2 $\mu$ ~100 $\mu$ )、直径は、アッセイ対象の体液及び使用されるチャンバの高さに応じて変わり得る。壁7の間の距離は、典型的には粒子8の直径以上であるが、距離の上限は粒子8の性質に依存し得る。

20

## 【0029】

混合物10は、上記の図1に関連して説明されたのと同じようにして、標的分析物11と標識された標的分析物12との双方を含む。好適なインキュベーション期間の後、結合標的分析物及び遊離標的分析物からの信号が処理される。

## 【0030】

図5は、図4に示されるものと同じ検査チャンバアセンブリの上面図であり、混合物10の定義されない延在部13を示す。この延在部内において、定義された範囲14にわたり標識12からの全信号が収集され、この範囲は、いかなる特定の形状にも限定されない。収集手段は、蛍光標識の場合には蛍光スキャナであってもよく、又は放射標識の場合には放射ヌクレオチドスキャナであってもよい。この範囲は、直径が既知であるか、又は計測可能な少なくとも1個の粒子8を含むように選択される。粒子を含まない隣接する定義された範囲16もまた計測される。当該の場所に結合部位はないため、範囲16からの信号は非結合標識からの信号に相当する。しかしながら、範囲14からの信号は、結合標識及び遊離標識の双方からの信号を有する。各々の影響は、様々な方法で決定することができる。粒子が、好ましい形状である球形の場合、その容積( $V_p$ )はその直径から計算することができる。定義された範囲14の容積( $V_{14}$ )及び16の容積( $V_{16}$ )は、その幅及びチャンバ深さから容易に計算することができる。定義された範囲14と16とに関するチャンバ容積が同一であると仮定すれば、遊離標識からの信号は、範囲16からの信号( $S_{16}$ )と等しい。これはつまり、粒子(結合標識)からの信号がない場合、範囲14からの信号( $S_f$ )は、 $S_f = S_{16} \times (V_{14} - V_p)$ となるはずであることを意味する。この大きさを超える信号はいずれも、結合標識からの信号( $S_b$ )であり、 $S_b = S_{14} - S_f$ となる。粒子の容積が範囲14における容積と比較して僅少である場合、容積補正は必要ない。決定されるものは、走査の画素(又は集成的な画素群)当たりの平均標識信号強度である。画素という用語は、本願において使用されるとき、1つ又は複数の隣接する画素の意味を含み得る。

30

40

## 【0031】

第2の最も好ましい実施形態において、リガンドはチャンバそれ自体の少なくとも1つの表面に付着している。図6は、ガラス製か、又はアクリル若しくはポリスチレンなどのプラスチック製であり得る(上側の)透明なチャンバ表面17を示し、そこに、当該技術

50

分野において周知の何らかの手段によってリガンドの様なコーティングが付着している。様なコーティングが形成された後、リガンドは、機械的若しくは化学的手段によるか、又はレーザーアブレーションにより、1つ又は複数の領域18から選択的に除去され、結果的に隣接する領域19に活性リガンドが残る。

#### 【0032】

図7は、この表面17を混合物20の入った薄いチャンバの一部として示し、これは、非標識の標的分析物21と標識された分析物22とを含む。チャンバは、好ましくは高さが約1mm未満であり、最も好ましくは200 $\mu$ 未満(例えば、1~200 $\mu$ の範囲)である。既述のとおり、好適な時間が経つと、標識された分析物及び非標識の分析物はリガンドと平衡に達し、標識された分析物の一部23が表面と結合し、但しリガンドが残っている領域においてのみ結合した状態となる。蛍光標識の場合、チャンバ表面17を適切な波長の光源24で照明すると、標識の蛍光が励起される。レンズ25が蛍光発光を集め、それらは光学フィルタ26によりフィルタリングされたうえ、電荷結合素子(CCD)、又は相補型金属酸化膜半導体(complementary metal oxide semiconductor)(CMOS)などであり得る解像機器27に投影される。或いは、光源は、極めて小さい移動スポットの焦点をチャンバ上に合わせるレーザーであってもよく、その場合には、集光機器27は単純な光電管又は光電子増倍管であり得る。

#### 【0033】

いずれかのプロセスの最終的な結果が図8に示され、これはチャンバ28の概略的な上面図であり、ここでは活性リガンド29とアブレーションを受けたりガンド30とが一連の垂直な縞として現れている。図7の装置からの走査線は、線a-aによって表される。図9は、走査線a-aに沿った波形を表し、山31は活性リガンドからの信号で、谷32は不活性な範囲からの信号である。従って、結合標識濃度は、山から谷までの距離によって表され、谷の高さが遊離標識を表す。活性範囲及び不活性範囲は、いかなる特定の幾何形状にも限定されない。

#### 【0034】

いくつかの実施形態において、比較的小さい点荷重を受けると局部的に弾性変形し得る十分な可撓性を有するチャンバ壁17を使用することができる。チャンバ壁17の弾性の性質により、極めて微弱な「結合」信号を捕捉する独自の選択肢が実現される。チャンバ壁17が、撮像範囲から少し外れたところを細いスタイラスなどにより圧縮される場合、遊離標識22は局所視野から横方向に放出され、従ってその信号は著しく低下する。この「背景」信号の低下により、結合標識23からの極めて微弱な信号を検出することができる。

#### 【0035】

標識が異なる波長の蛍光を発するか、又は分析物1用のリガンドがチャンバ内で分析物2用のリガンドと異なる物理的位置にある場合には、複数の分析物を同時に計測することができる。

#### 【0036】

本発明に係る方法の例では、この方法は、患者が1つ若しくは複数の薬物(例えば、ペニシリンを含む抗生物質等)又はアレルゲンに対してアレルギーを有し得るかどうかを決定するアッセイの実施を含む。このアッセイは、多数の(例えば、数千個の)抗生物質エピトープで被覆されたビーズと被覆されていない対照ビーズとの入った分析チャンバを有するカートリッジを使用して実施される。2つ以上の抗生物質エピトープを対象としたこれらの分析については、同定を目的として、特定の各抗生物質エピトープを特定のタイプのビーズに対応させる。種々のエピトープに関連したビーズ群は、例えばエピトープAが白色ビーズを被覆し、エピトープBが赤色ビーズを被覆するなど、ビーズの色、サイズ、形状等の特性を用いて互いに識別することができる。毛細血管又は静脈の抗凝固処理された全血の少量の試料(例えば、0.5~5マイクロリットル)をチャンバに入れ(例えば、毛管作用によってチャンバに引き込み)、チャンバを閉じると、血液は、ビーズの入ったチャンバ内のある範囲に送り込まれる。第1の期間(例えば、数分間~1時間)にわた

10

20

30

40

50

るインキュベーション後、試料中に存在する免疫グロブリンは、免疫グロブリン分子が特異的親和性を有する薬物（又はアレルゲン）で被覆されたビーズと結合する。試料中に存在する異なる免疫グロブリン分子は、異なる薬物（又はアレルゲン）に特異的な異なる親和性を有し得る。組み合わせられたビーズと血液試料とは、検査対象の免疫グロブリン（例えば、免疫グロブリンE（「IgE」）等）に対する1つ又は複数の標識抗体とさらに混合され、第2の期間（例えば、数秒間～数分間）にわたりインキュベートされる。検査対象の免疫グロブリンに対する抗体にフルオロフォアでタグを付け、「標識抗体」を作成してもよい。次に、上記のタイプの分析チャンバに試料が送り込まれる。これらの2つのステップについて実際に必要なインキュベーション時間は実験的に決定することができ、存在する抗体の結合力及び濃度に依存するものと思われる。チャンバに入れられた試料は、上記の方法の1つ又は複数により、遊離している標識抗体及び結合している標識抗体の双方から信号を集めることによって分析される。アッセイに2つ以上の薬物のアレルギー罹患性、又は2つ以上のアレルゲンに対する感受性の決定が関わる場合、分析は、異なるタイプの被覆ビーズに従う結合標識抗体の識別もさらに含み得る。結合標識は、検査対象の免疫グロブリンと結合する標識抗体を表し、この免疫グロブリンは、特定の免疫グロブリン粒子が特異的な親和性を有する薬物（又はアレルゲン）で被覆された粒子と結合する。粒子に結合した標識の量は、撮像された粒子の全信号を計測し、画像に含まれる粒子の周囲の隣接範囲における周囲の遊離信号を減じることにより計算され得る。所与のクラスの被覆されたビーズに関する標識の量の比率は、被覆された標識ビーズと、同じタイプの被覆されていないビーズとを計測することにより計算することができる。従って、本発明を実行することにより、試料が所与の薬物（又はアレルゲン）に対して親和性を有する免疫グロブリン分子を含むかどうかの決定を行うことができる。加えて、本発明に従い、種々のタイプの検出可能なビーズ又は粒子であって、各タイプが異なる薬物（又はアレルゲン）で被覆されるビーズ又は粒子を使用して、2つ以上の薬物に対するアレルギー（又は2つ以上のアレルゲンに対する感応性）の同時検出を行うことができる。単一のタイプの粒子（又はビーズ）を、その粒子が被覆された粒子と同じサイズ及び組成であるならば、あらゆる薬物アレルギー（アレルゲン感受性）検査についての対照粒子として用いてもよい。必要であれば、対照粒子のサイズを、その比較対象となる薬物又はアレルゲンで被覆された粒子のサイズと一致させて、2つ以上のタイプの対照粒子を用いてもよい。

#### 【0037】

いくつかの実施形態において、第2のインキュベーション（標識されたりガンドを含むもの）の後、この方法は、標識を含まない液体を、チャンバに入れられた非結合標識を含む試料に添加し、それにより固定化されたビーズ又は構造に付着した標識を主に残すステップを含む。続いて結合物の遊離物との仮想分離が先述のとおり行われるが、標識を含む液体の除去は、複雑さを伴いながらも、アッセイの感度の上昇に役立ち得る。チャンバの総容量及びチャンバ内の液体の量は1～数マイクロリットル未満の範囲であるため、標識を含まない流体をチャンバに実質的な容積（例えば、数十マイクロリットル）で添加すると、標識を含む流体の大部分が取り除かれ、結合物の遊離物との仮想分離プロセスを利用することにより、残存する遊離標識信号が取り除かれる。

#### 【0038】

上述の方法は、標識された結合及び遊離標的分析物について、試料中の当該の標的分析物に特異的なリガンドを含む、又はリガンドを含まないチャンバの範囲内における量を決定し、それにより試料に関する定性的及び定量的な情報を提供するための新規の望ましい手法を提供する。場合によっては、試料中における標的分析物の有無を知るなど、定性的な情報が当面の分析に十分な情報である。かかる場合の例は、所与の薬物に対する特異的なIgEがない状態が正常である場合に、検体がかかるIgEを有するかどうかを決定することである。より定量的な情報が求められる場合（例えば、試料中の標的分析物の濃度）、得られる結合/遊離の情報を標準曲線と共に用いることで、定量的な情報、例えば試料中の標的分析物の量を決定してもよく、ここで標準曲線は、調べている特定の標的分析物及び試料について実験的に求められる。あらゆるタイプのイムノアッセイで用いられる

10

20

30

40

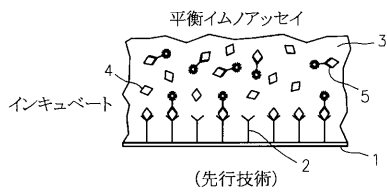
50

ように機能する標準曲線は公知であり、本発明は、いかなる特定の標準曲線にも限定されない。試料の曲線は、アッセイの前に、又はアッセイと同時に作成されてもよく、結果は分析を実施する機器に格納される。

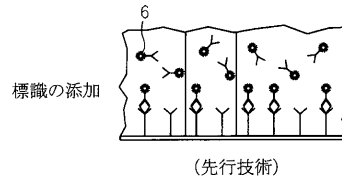
【 0 0 3 9 】

本発明は、その特定の詳細な実施形態に関して図示及び説明されているが、当業者は、本発明の趣旨及び範囲から逸脱することなく、その様々な形態及び詳細の変更が行われ得ることを理解するであろう。

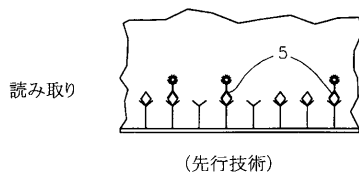
【 図 1 】



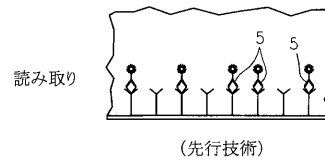
【 図 2 ( a ) 】



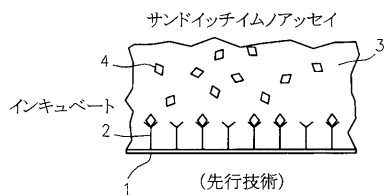
【 図 1 ( a ) 】



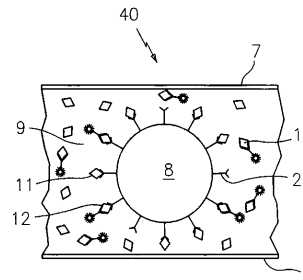
【 図 2 ( b ) 】



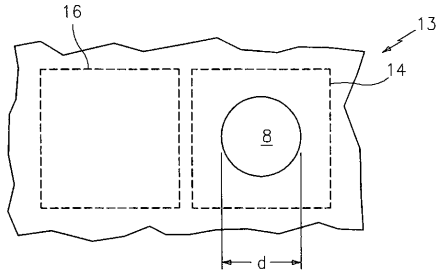
【 図 2 】



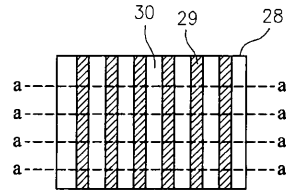
【 図 4 】



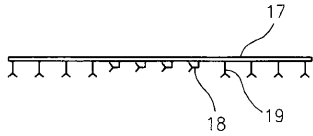
【 図 5 】



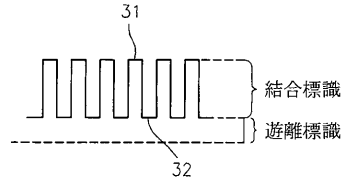
【 図 8 】



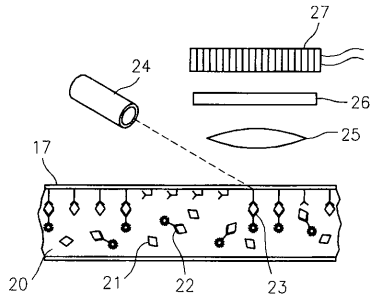
【 図 6 】



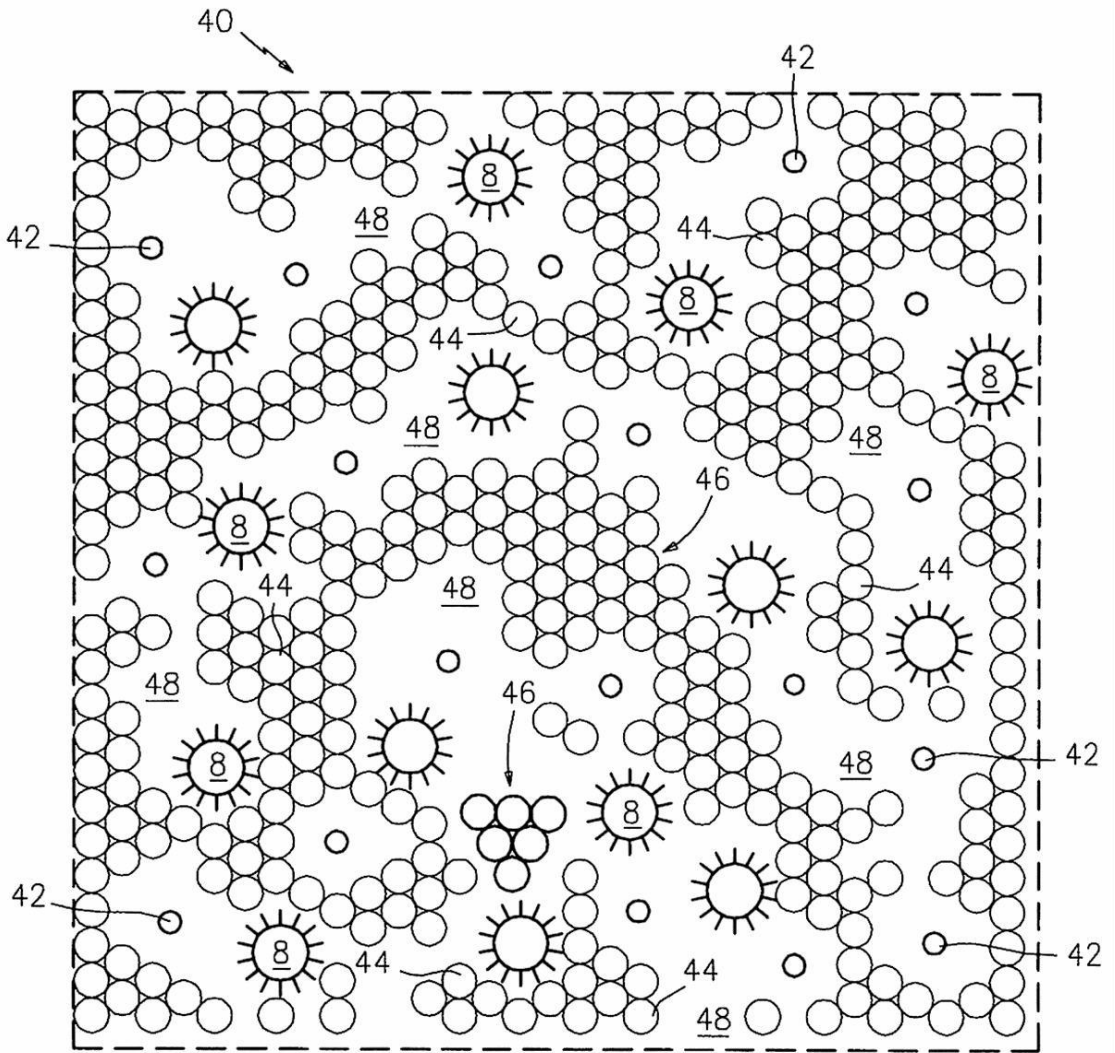
【 図 9 】



【 図 7 】



【図3】



---

フロントページの続き

- (31)優先権主張番号 61/041,791  
(32)優先日 平成20年4月2日(2008.4.2)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/041,784  
(32)優先日 平成20年4月2日(2008.4.2)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/041,794  
(32)優先日 平成20年4月2日(2008.4.2)  
(33)優先権主張国 米国(US)  
(31)優先権主張番号 61/043,571  
(32)優先日 平成20年4月9日(2008.4.9)  
(33)優先権主張国 米国(US)

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特表平09-509248(JP,A)  
特表2002-537563(JP,A)  
国際公開第2007/047908(WO,A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)  
G01N 33/53-33/566  
G01N 37/00

专利名称(译)	配体测定中结合标记和游离标记的虚拟分离，用于对含有全血的生物流体进行免疫测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP5189201B2</a>	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	JP2011503165	申请日	2009-04-02
[标]申请(专利权)人(译)	雅培医护站股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	保健公司雅培点		
当前申请(专利权)人(译)	保健公司雅培点		
[标]发明人	ワードロースティーヴンシー レヴァインロバートエー		
发明人	ワードロー,スティーヴン・シー レヴァイン,ロバート・エー		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/48 G01N21/6428 G01N33/5304 G01N33/54373 G01N33/54386		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/543.575 G01N33/53.N G01N37/00.101 G01N21/64.F		
优先权	61/041797 2008-04-02 US 61/041790 2008-04-02 US 61/041791 2008-04-02 US 61/041784 2008-04-02 US 61/041794 2008-04-02 US 61/043571 2008-04-09 US		
其他公开文献	JP2011516863A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

免疫检测物质的检测和表征以电子方式对人和动物生物体液进行，如全血，血清，血浆，尿液，牛奶，胸膜和腹膜液，以及精液，这些液体包含在形成静止液体样品的薄室中该腔室具有至少两个平行的平面壁，其中至少一个是透明的。

【図 2】

