(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)特許出願公表番号
特表2009-530598
(P2009-530598A)
(43)公表日　平成21年8月27日(2009.8.27)

(51)Int.Cl.		F I			テーマコード（参考）
G01N 33/536	(2006.01)	G01N	33/536	E	2G054
G01N 33/53	(2006.01)	G01N	33/53	M	
G01N 33/553	(2006.01)	G01N	33/53	U	
G01N 33/543	(2006.01)	G01N	33/553		
G01N 21/78	(2006.01)	G01N	33/543	521	

審査請求 未請求　予備審査請求 未請求　（全 17 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2008-558906 (P2008-558906)
(86)(22)出願日　平成19年3月16日 (2007.3.16)
(85)翻訳文提出日　平成20年9月12日 (2008.9.12)
(86)国際出願番号　PCT/GB2007/000938
(87)国際公開番号　WO2007/107716
(87)国際公開日　平成19年9月27日 (2007.9.27)
(31)優先権主張番号　0605452.2
(32)優先日　平成18年3月17日 (2006.3.17)
(33)優先権主張国　英国 (GB)
(31)優先権主張番号　60/786,808
(32)優先日　平成18年3月29日 (2006.3.29)
(33)優先権主張国　米国 (US)
(31)優先権主張番号　60/811,110
(32)優先日　平成18年6月6日 (2006.6.6)
(33)優先権主張国　米国 (US)

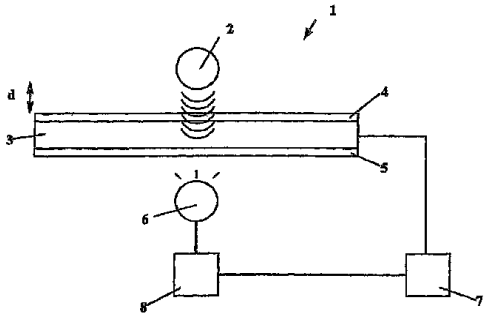
(71)出願人　507251192
ビバクタ、リミテッド
ＶＩＶＡＣＴＡ　ＬＩＭＩＴＥＤ
イギリス国ケント、シティングボーン、ケント、サイエンス、パーク、ギラット、アベニュ、１００
(74)代理人　100075812
弁理士　吉武　賢次
(74)代理人　100091487
弁理士　中村　行孝
(74)代理人　100094640
弁理士　紺野　昭男
(74)代理人　100107342
弁理士　横田　修孝

最終頁に続く

(54)【発明の名称】化学的検知装置

(57)【要約】

本発明は、化学的検知法、特に全血試料中の被分析物を検出する方法に関する。この方法は、要約すれば、該試料を、テザー試薬を有する変換器に露出する工程、標識を付けた試薬を導入する工程、該試料を一連の６００ｎｍ以上の波長における電磁放射線パルスで照射する工程、および電気的信号を変換し、各パルス間の時間遅延を検出する工程を含んでなる。標識を付けた試薬上の標識が、使用する電磁放射線の波長における全血試料の吸収と少なくとも等しいレベルで電磁放射線を吸収する。



【特許請求の範囲】
【請求項１】
全血試料中の被分析物を検出する方法であって、
前記試料を、パイロ電気的またはピエゾ電気的素子および電極を有し、エネルギーの変化を電気的信号に変換できる変換器に露出する工程と、
ここで前記変換器は、少なくとも一種のテザー試薬を前記変換器の上または近くに有し、前記少なくとも一種のテザー試薬は、前記被分析物を結合できる結合箇所を有し；
標識を付けた試薬を前記試料中に導入する工程と、
ここで前記標識を付けた試薬は、前記被分析物または前記テザー試薬のための結合箇所、および放射線源により発生した電磁放射線を吸収し、無放射減衰によりエネルギーを発生することができる標識を含み；
前記試料を一連の６００ｎｍ以上の波長における電磁放射線パルスに照射し、発生した前記エネルギーを電気的信号に変換する工程と；
前記電気的信号および前記放射線源から来る各電磁放射線パルスと前記電気的信号の発生との間の時間遅延を検出する工程
とを含んでなり、
各電磁放射線パルスと前記電気的信号の発生との間の時間遅延が、前記変換器の表面からの異なった距離における一つ以上の位置のいずれかにおける前記標識を付けた試薬の位置に対応し、
前記標識を付けた試薬上の前記標識が、前記標識が前記電磁放射線を、使用する前記電磁放射線の前記波長における前記全血試料の吸収に少なくとも等しいレベルで吸収するように選択される、方法。
【請求項２】
前記少なくとも一種のテザー試薬が抗体であり、前記被分析物が抗原である、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記標識を付けた試薬が標識を付けた抗体である、請求項１または２に記載の方法。
【請求項４】
前記少なくとも一種のテザー試薬が抗体であり、前記被分析物が抗原であり、前記標識を付けた試薬が、前記少なくとも一種のテザー試薬に結合することもできる、標識を付けた抗原であり、かつ、前記検出器により検出される前記電気的信号が、前記試料中にある前記被分析物の存在に逆比例する、請求項１または２に記載の方法。
【請求項５】
前記少なくとも一種のテザー試薬が第一の核酸であり、前記被分析物が第二の核酸であり、かつ、前記第一および第二核酸が相補的である、請求項１に記載の方法。
【請求項６】
前記少なくとも一種のテザー試薬がアビジンまたはその誘導体を含み、前記被分析物がビオチンまたはその誘導体を含むか、もしくはその逆である、請求項１に記載の方法。
【請求項７】
前記標識を付けた試薬上の前記標識が、染料分子、金粒子、着色重合体粒子、蛍光分子、酵素、磁性粒子、炭素粒子および非伝導性コア材料および少なくとも一つの金属シェル層を含んでなるナノ粒子から選択される、請求項１～６のいずれか一項に記載の方法。
【請求項８】
前記時間遅延が少なくとも１ミリ秒間である、請求項１～７のいずれか一項に記載の方法。
【請求項９】
前記時間遅延が５００ミリ秒間以下である、請求項１～８のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１０】
前記電磁放射線が、光、好ましくは可視光である、請求項１～９のいずれか一項に記載

の方法。
【請求項１１】
前記少なくとも一種のテザー試薬が、前記変換器の上に吸着されている、請求項１～１０のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１２】
前記標識が、粒子径５０～２５０ｎｍを有する金粒子である、請求項１２に記載の方法。
【請求項１３】
前記電磁放射線の波長が６１０ｎｍ以上である、請求項１～１２のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１４】
前記電磁放射線の波長が６５４ｎｍである、請求項１～１３のいずれか一項に記載の方法。
【請求項１５】
下記（ｉ）および（ii）を含んでなる、キット：
（ｉ）　分散した粒子を含む液体試料中の被分析物を検出するための装置であって、
６００ｎｍ以上の波長で一連の電磁放射線パルスを発生するように設計された放射線源と、
パイロ電気的またはピエゾ電気的素子および電極を有し、エネルギーの変化を電気的信号に変換できる変換器と、
前記変換器の上または近くにある、少なくとも一種のテザー試薬であって、前記被分析物を結合できる結合箇所を有する、テザー試薬と、
前記試料を前記変換器と流体接触しながら保持するための閉じ込め構造と、
前記変換器により発生した前記電気的信号を検出することができ、前記放射線源から来る各電磁放射線パルスと前記電気的信号の発生との間の時間遅延を決定するように設計された検出器
とを含んでなる、装置、並びに
（ii）　前記被分析物または前記テザー試薬に結合する結合箇所、および放射線源により発生した電磁放射線を吸収し、無放射減衰によりエネルギーを発生することができる標識を有する、標識を付けた試薬であって、
前記標識を付けた試薬上の前記標識が、前記標識が前記電磁放射線を、使用する前記電磁放射線の前記波長における前記全血試料の吸収に少なくとも等しいレベルで吸収するように選択される、標識を付けた試薬。
【請求項１６】
前記少なくとも一種のテザー試薬が抗体であり、前記被分析物が抗原である、請求項１５に記載のキット。
【請求項１７】
前記標識を付けた試薬が標識を付けた抗体である、請求項１５または１６に記載のキット。
【請求項１８】
前記少なくとも一種のテザー試薬が抗体であり、前記被分析物が抗原であり、前記標識を付けた試薬が、前記少なくとも一種のテザー試薬に結合することもできる、標識を付けた抗原であり、前記検出器により検出される前記電気的信号が、前記試料中にある前記被分析物の存在に逆比例する、請求項１５または１６に記載のキット。
【請求項１９】
前記少なくとも一種のテザー試薬が第一の核酸であり、前記被分析物が第二の核酸であり、前記第一および第二核酸が相補的である、請求項１５に記載のキット。
【請求項２０】
前記少なくとも一種のテザー試薬がアビジン、ストレプトアビジン、またはその誘導体を含み、前記被分析物がビオチンまたはその誘導体を含むか、もしくはその逆である、請

求項１５に記載のキット。
【請求項２１】
前記標識を付けた試薬上の前記標識が、染料分子、金粒子、着色重合体粒子、蛍光分子、酵素、磁性粒子、炭素粒子および非伝導性コア材料および少なくとも一つの金属シェル層を含んでなるナノ粒子から選択される、請求項１５～２０のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２２】
前記時間遅延が少なくとも２０ミリ秒間である、請求項１５～２１のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２３】
前記時間遅延が５００ミリ秒間以下である、請求項１５～２２のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２４】
前記電磁放射線が光、好ましくは可視光である、請求項１５～２３のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２５】
前記少なくとも一種のテザー試薬が、前記変換器の上に吸着されている、請求項１５～２４のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２６】
前記閉じ込め構造がウェルである、請求項１５～２５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２７】
前記装置が横方向フロー装置であり、前記閉じ込め構造が多孔質材料である、請求項１５～２５のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２８】
前記電磁放射線の波長が６１０ｎｍ以上である、請求項１５～２２７のいずれか一項に記載のキット。
【請求項２９】
前記電磁放射線の波長が６５４ｎｍである、請求項１５～２８のいずれか一項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【発明の背景】
【０００１】
本発明は、化学的検知装置(chemical sensing device)、特に変換器(transducer)を使用する化学的検知装置に関する。
【０００２】
溶液中の被分析物、例えば生物検定における生物学的に重要な化合物の監視には、広い用途がある。そのため、広範囲な分析および診断装置が利用できる。多くの装置は、検出すべき化学種の存在下で、視覚的に検出可能な変色を受ける試薬を使用する。この試薬は、試験片上に支持することが多く、光学系を使用して変色の測定を行うことができる。
【０００３】
ＷＯ９０／１３０１７は、細片形態にあるパイロ電気的または他の熱電気的変換器素子を開示している。薄膜電極を用意し、一種以上の試薬を変換器表面上に堆積させる。この試薬は、検出する化学種と接触した時に選択的な比色変化を受ける。次いで、この装置を典型的には検出器の中に挿入し、通常は変換器をＬＥＤ光源により下から照明し、試薬による吸光度を変換器表面における顕微鏡的加熱として検出する。変換器から来る電気信号出力を処理し、検出している化学種の濃度を求める。
【０００４】
ＷＯ９０／１３０１７の方式は、試薬との反応または組合せで試薬中に変色をもたらす化学種の分析を行う。例えば、試薬としては、ｐＨおよび重金属指示薬染料、パラセタモール検定でアミノフェノールを検出するための試薬（例えばアンモニア性銅溶液中のｏ－

クレゾール）、および酵素免疫抗体法（ＥＬＩＳＡ）におけるオキシドレダクターゼ酵素を検出するためのテトラゾリウム染料がある。しかし、この方式は、特定の用途には有用であるが、変換器の表面上に位置するのはその試薬であるので、分析している化学種が試薬中で変色を呈する分析にのみ適していると考えられている。従って、この方式は、試薬中で変色を引き起こさないか、または変色が変換器の表面上ではない場合の化学種の分析には適用できない。生物検定の分野では、この方式の用途は限られている。

【０００５】

ＷＯ２００４／０９０５１２は、ＷＯ９０／１３０１７に開示されている技術に基づいてはいるが、電磁放射線で照射した時のある物質中の無放射減衰により発生したエネルギーは、その物質が変換器と接触していなくても、変換器により検出できること、および電磁放射線による照射と、変換器により発せられる電気信号との間の時間遅延は、その物質の、被膜の表面からの距離の関数であるという知見に基づく装置を開示している。この知見は、変換器の表面に結合した被分析物と、バルク液体中にある被分析物とを区別することができる「深さ方向分析(depth profiling)」を可能にする装置を提供している。従って、この出願は、検定、典型的には生物検定に使用でき、結合工程と、その結合工程の結果との間の別の洗浄工程を行う必要が無い装置を開示している。

【０００６】

ＷＯ２００４／０９０５１２に開示されている装置は、広範囲な用途に使用されているが、この装置を全血（細胞を含む凝固していない血液）中に存在する被分析物の検出に使用する場合には、用途が限られる。これは、試料中の赤血球が不規則に分布しているために、これらの細胞のある画分がピエゾ被膜に近すぎて、バックグラウンド信号を発生するためである。赤血球の吸収特性は非常に高いので、この信号が、行われている結合検定と干渉し、その適用性および感度を制限する。

【０００７】

従って、この分野では、全血試料の存在下で操作できる装置が求められている。これは、多くの検定が血液中に存在する被分析物に対して行われるので特に重要である。

【発明の概要】

【０００８】

そこで、本発明は、全血試料中の被分析物を検出する方法であって、

該試料を、パイロ電気的またはピエゾ電気的素子および電極を有し、エネルギーの変化を電気的信号に変換できる変換器に露出する工程と、

ここで該変換器は、少なくとも一種のテザー(tethered)試薬を該変換器の上または近くに有し、該少なくとも一種のテザー試薬は、該被分析物を結合できる結合箇所を有し；

標識を付けた試薬を試料中に導入する工程と、

ここで該標識を付けた試薬は、該被分析物または該テザー試薬のための結合箇所、および放射線源により発生した電磁放射線を吸収し、無放射減衰によりエネルギーを発生することができる標識を含み；

該試料を一連の６００ｎｍ以上の波長における電磁放射線パルスに照射し、発生したエネルギーを電気的信号に変換する工程と；

該電気的信号および該放射線源から来る各電磁放射線パルスと該電気的信号の発生との間の時間遅延を検出する工程

を含んでなる方法であり、

ここで、各電磁放射線パルスと該電気的信号の発生との間の時間遅延が、該変換器の表面からの異なった距離における一つ以上の位置のいずれかにおける該標識を付けた試薬の位置に対応し、該標識を付けた試薬上の該標識が、該標識が該電磁放射線を、使用する該電磁放射線の該波長における該全血試料の吸収に少なくとも等しいレベルで吸収するように選択される、方法を提供する。

【０００９】

本発明はまた、下記(i)および(ii)を含んでなるキットを提供する：

(i) 分散した粒子を含む液体試料中の被分析物を検出するための装置であって、６００

ｎｍ以上の波長で一連の電磁放射線パルスを発生するように設計された放射線源と、パイロ電気的またはピエゾ電気的素子および電極を有し、エネルギーの変化を電気的信号に変換できる変換器と、該変換器の上または近くにある少なくとも一種のテザー試薬であって、該被分析物を結合できる結合箇所を有するテザー試薬と、該試料を変換器と流体接触しながら保持するための閉じ込め構造と、該変換器により発生した該電気的信号を検出することができ、該放射線源から来る各電磁放射線パルスと該電気的信号の発生との間の時間遅延を決定するように設計された検出器とを含んでなる、装置、並びに、

(ii) 該被分析物または該テザー試薬に結合する結合箇所、および放射線源により発生した電磁放射線を吸収し、無放射減衰によりエネルギーを発生することができる標識を有する標識を付けた試薬であって、該標識を付けた試薬上の該標識が、該標識が該電磁放射線を、使用する該電磁放射線の該波長における該全血試料の吸収に少なくとも等しいレベルで吸収するように選択される、標識を付けた試薬。

【００１０】

この方法／キットにより、使用者は、深さ方向分析検出する標識を注意深く選択し、全血中における被分析物の存在を検出することができる。

【発明の具体的説明】

【００１１】

ここで、図面を参照しながら本発明を説明する。

【００１２】

図１は、本発明で使用する型の化学的検知装置１を示す。装置１は、電磁放射線で物質２を照射した時の物質２における発熱に依存する。装置１は、電極被覆４、５を有するパイロ電気的またはピエゾ電気的変換器３を含んでなる。変換器３は、好ましくは分極した(poled)ポリフッ化ビニリデン被膜である。電極被覆４、５は、酸化インジウムスズから形成され、厚さが約３５ｎｍであるのが好ましいが、１ｎｍの下限と１００ｎｍの上限の間の、ほとんどすべての厚さが可能であり、１ｎｍ未満では導電性が低すぎ、１００ｎｍを超えると、光学的透過率（９５％Ｔ未満にすべきではない）が低すぎる。物質２は、いずれかの好適な技術を使用して変換器３の近くに保持するが、ここでは上側電極被覆４に取り付けた状態を示す。物質は、どのような好適な形態にあってもよく、複数の物質を堆積させることもできる。好ましくは、物質２は上側電極上に、例えば共有結合により、または分子間力、例えばイオン性結合、水素結合またはファンデルワールス力により、結合させ、吸着させる。この装置の重要な特徴は、電磁放射線６、例えば光、好ましくは可視光、の供給源により照射した時に、物質２が発熱することである。光源は、例えばＬＥＤでよい。光源６が、適切な波長（例えば補色）の光で物質２を照明する。理論に捕らわれたくはないが、物質２が光を吸収して励起状態になり、次いでその励起状態が無放射減衰を受け、それによって、図１で曲線で示すエネルギーを発生する。このエネルギーは、主として熱（即ち環境中の熱運動）であるが、他の形態のエネルギー、例えば衝撃波、も発生することができる。しかし、このエネルギーは、変換器により検出され、電気的信号に変換される。本発明の装置は、測定している特定の物質に対して校正され、従って、無放射減衰により発生するエネルギーの精確な形態を決定する必要は無い。他に指示が無い限り、本明細書では、用語「熱」は、無放射減衰により発生するエネルギーを意味する。光源６は、物質２を照明するように配置する。好ましくは、光源６は、変換器３および電極４、５の下に配置し、物質２を、変換器３および電極４、５を通して照明する。光源は、変換器内の内部光源でもよく、その場合、光源は導波管系である。導波管は、変換器自体でもよいし、導波管は、変換器に付けられた別の層でもよい。

【００１３】

物質２から発生したエネルギーは、変換器３により検出され、電気的信号に変換される。電気的信号は、検出器７により検出される。光源６および検出器７は、共に制御装置８により制御される。光源６は、「チョップドライト」と呼ばれる一連の光（ここで使用する用語「光」は、特定の波長が記載されていない限り、あらゆる形態の電磁放射線を意味する）のパルスを発生する。原則的に、単一の光フラッシュ、即ち１パルスの電磁放射線

、が、変換器３から信号を発生するのに十分である。しかし、再現性のある信号を得るには、複数のフラッシュ光を使用し、これは実際にはチョップドライトを必要とする。電磁放射線のパルスを印加する周波数は変えることができる。下限では、パルス間の時間遅延は、各パルスと測定すべき電気的信号の発生との間の時間遅延に十分でなければならない。上限では、各パルス間の時間遅延は、データを記録する時間が不当に延長される程大きくてはならない。好ましくは、パルスの周波数は、２～５０Ｈｚ、より好ましくは５～１５Ｈｚ、最も好ましくは１０Ｈｚである。これは、パルス間の時間遅延２０～５００ｍｓ、６６～２００ｍｓ、および１００ｍｓにそれぞれ相当する。しかし、時間遅延は１ｍｓまで小さくてもよい。さらに、いわゆる「マーク－スペース」比、即ち信号ｏｎと信号ｏｆｆの比は、好ましくは１であるが、他の比も有害な影響無しに使用できる。様々な断続(chopping)周波数または様々なマーク－スペース比のチョップドライトを発生する電磁放射線供給源も、この分野では公知である。検出器７は、光源６から来る光の各パルスと、変換器３から来る、検出器７により検出される対応する電気的信号との間の時間遅延（または「相関遅延」）を決定する。本出願者は、この時間遅延が距離ｄの関数であることを見出した。

【００１４】

各光パルスと対応する電気的信号との間の時間遅延を測定するための、再現性のある結果を与える、どのような方法でも使用できる。好ましくは、各光パルスの開始から、熱吸収に対応する電気的信号における最大値が検出器７により検出される時点までの時間遅延を測定する。

【００１５】

従って、物質２を変換器表面から分離することができ、それでも信号は検出できる。その上、変換器３にエネルギーを伝達できる仲介媒体を通して信号を検出できるのみならず、様々な距離ｄを区別することができ（これは、「深さ方向分析」と呼ばれている）、受信される信号の強度は、変換器３の表面からの特定の距離ｄにおける物質２の濃度に比例する。

【００１６】

典型的な免疫検定では、問題とする抗原に対して特異的な抗体を重合体状支持体、例えばニトロセルロース、ポリ塩化ビニルまたはポリスチレン、のシートに付加させる。試料の一滴をシート上に置き、抗原－抗体コンプレックスの形成後に洗浄する。次いで、抗原上の異なった箇所に特異的な抗体を加え、シートを再度洗浄する。この第二の抗体は、高感度で検出できるような標識を有する。シートに結合した第二抗体の量は、試料中の抗原の量に比例する。この検定およびこの型の検定に対する他の変形は、良く知られており、例えば「The Immunoassay Handbook, 2nd Ed.」 David Wild, Ed., Nature Publishing Group, 2001参照。本発明の装置は、これらの検定のどれにでも使用できる。

【００１７】

図２は、ピエゾ電気的またはパイロ電気的変換器を使用する典型的な捕獲抗体検定を示す。装置は、変換器３および被分析物１１を中に分散または溶解させて含む液体１０を保持するウェル９を包含する。ウェル９は、試料を変換器３と流体接触させながら保持する閉じ込め構造として作用する。変換器３は、そこに付加した多くのテザー試薬、即ち抗体１２を有する。抗体１２は、図２では被膜に付加した状態で示すが、この付加は、共有結合または表面上への非共有吸着、例えば水素結合、によるものでよい。抗体は、変換器に付加した状態で示すが、抗体１２を変換器３上にまたはその近くに保持するためのどのような技術でも使用できる。例えば、追加の層、例えばシリコーン重合体層、が抗体１２と変換器３を分離するか、または抗体を不活性粒子に付加し、次いでその不活性粒子を変換器３に付加することができよう。あるいは、抗体１２を、変換器３の表面上に被覆したゲル層中に捕獲することもできよう。

【００１８】

使用の際、ウェルを、抗原１１を含む液体１０（またはいずれかの流体）で満たす。次いで抗原１１が抗体１２と結合する。追加の標識を付けた抗体１３を液体に加え、結合し

た抗体１２、抗原１１および標識を付けた抗体１３の間にいわゆる「サンドイッチ」コンプレックスを形成する。結合した抗原１１の全てがサンドイッチコンプレックスを形成するように、過剰の標識を付けた抗体１３を加える。従って、試料は、結合した標識を付けた抗原１３ａおよび溶液中に遊離している結合していない標識を付けた抗原１３ｂを含む。

【００１９】

サンドイッチコンプレックス形成の際または後に、試料を、電磁放射線、例えば光、の一連のパルスを使用して照射する。各パルスと変換器３による電気的信号の発生との間の時間遅延を検出器により検出する。適切な時間遅延を選択し、結合した標識を付けた抗原１３ａにより発生した熱だけを測定する。時間遅延は、変換器３と標識との間の距離の関数であるので、結合した標識を付けた抗体１３ａは、結合していない標識を付けた抗原１３ｂと区別することができる。これによって、洗浄工程の必要性が無くなるという点で、従来のサンドイッチコンプレックス免疫検定に対して重大な優位性が得られる。従来のサンドイッチコンプレックスでは、結合していない標識を付けた抗原は、結合した標識を付けた抗原により発生する信号と干渉するので、結合していない標識を付けた抗体を、結合した標識を付けた抗体から、全ての測定の前に分離しなければならない。しかし、本発明により与えられる「深さ方向分析」により、結合した、および結合していない標識を付けた抗原を区別することができる。

【００２０】

テザー試薬は、変換器３に付加しており、従って、変換器につながれてなく、液体を通して自由に拡散する標識を付けた試薬とは異なっている。

【００２１】

公知の免疫検定のもう一つの例として、検出器により検出される電気的信号が、試料中にある標識を付けていない抗原の存在に逆比例する競合検定に本発明を適用できる。この場合、問題となるのは、試料中の標識を付けていない抗原の量である。

【００２２】

競合する免疫検定では、図２に示すように抗体を変換器に付加する。次いで、抗原を含む試料を加える。しかし、標識を付けた抗体を加えるのではなく、既知量の標識を付けた抗原を溶液に加える。次いで、標識を付けた、および標識を付けていない抗原が変換器３に付加した抗体に結合しようと競合する。その場合、結合した標識を付けた抗原の濃度は、結合した標識を付けていない抗原の濃度に逆比例し、従って、標識を付けた抗原の量は既知であるので、最初の溶液中にある標識を付けていない抗原の量を計算することができる。これらの抗体に関して特異的な同じ標識も、これらの抗原で使用できる。従って、この実施態様では、標識を付けた試薬は標識を付けた被分析物である。この分野では、溶液中の抗体に標識を付け、抗原をセンサー表面に付加する免疫検定を包含する、多くの形態の競合する免疫検定が公知である（例えば上記のWild, The Immunoassay Handbook参照）。

【００２３】

別の実施態様では、ピエゾ電気的またはパイロ電気的変換器を横方向フロー分析に使用する。これは、特に妊娠試験におけるヒト絨毛性ゴナドトロピン（ＨＣＧ）の検出に使用される。

【００２４】

図３は、本発明の簡素化された横方向フロー装置１４を示す。この装置は、濾紙または他の吸収材１５を有し、試料受け部１６および芯(wick)１７を、第一および第二区域１８および１９と共に含み、これらの区域は、結合していない、および結合した抗体（即ち、濾紙または他の吸収材１５に結合していない、および結合した）をそれぞれ含み、ＨＣＧを結合することができる。第一および第二区域１８および１９は多孔質材料から製造され、試料がその区域を通過する時に液体試料を閉じ込める。この装置は、第二区域１９の近くにピエゾ電気的被膜２０も含む。尿または血清の試料を試料受け部１６に加え、次いで、その試料は、吸収材１５に沿って芯１７に移動する。第一区域１８は、ＨＣＧに対する

標識を付けた抗体を含み、試料が第一区域１８を通過する時、ＨＣＧがその試料中に存在する場合、ＨＣＧに対する標識を付けた抗体が試料により取り上げられる。試料が第一区域１８から第二区域１９に通過する時、抗原および抗体がコンプレックスを形成する。第二区域１９では、抗原－抗体コンプレックスを結合することができる第二の抗体を吸収材１５またはピエゾ電気的被膜２０に付加する。従来の横方向フロー分析、例えば妊娠試験機、では、陽性結果は第二区域１９で変色させる。しかし、従来の横方向フロー分析は、透明試料に限られ、実質的に陽性または陰性、即ち、はい／いいえ、の結果にのみ好適である。しかし、本発明の装置は、ピエゾ電気的被膜２０を使用する。被膜から予め決められた距離にある試料だけが測定されるので、バルク試料中の汚染物は読みに影響しない。その上、ピエゾ電気的被膜の感度は、結果の定量化を行う。結果の定量化により、横方向フロー分析により広い用途が与えられ、異なった抗原量を区別することにより、誤った結果の数が減少する。

【００２５】

上記の種類の検定では、変換器３から既知の距離にある信号だけが測定されるので、試料の、溶液または懸濁液中にある他の遊離成分は、検出に干渉しない筈であると期待されよう。しかし、全血は、前に説明したように、読みに干渉し、感度を下げる場合があることが分かっている。この分野では、一般的に、試料の初期分離を行い、赤血球および他の汚染物を全血試料から除去することにより、この問題に対処している。しかし、本発明では、全血試料を使用する場合、異なった波長で吸収する標識を試料に使用することにより、分離工程の必要性が回避される。

【００２６】

金粒子のモル吸収係数が高いので、この種の検定は、典型的には、これらの粒子および通常は４０ｎｍ粒子を使用する。この分野では４０ｎｍ金粒子が使用されるが、これは、このサイズの粒子が毛管作用により、横方向フロー装置の固相を形成するフィルターメンブランを通って容易に移動し、より大きな粒子は再分散が遅いためである。しかし、４０ｎｍ金粒子は、それらの吸収極大を約５２５ｎｍに有し、そのため、全血試料中に存在する赤血球が検定に干渉する。この理由から、全血に対して行われる従来の検定は分離工程を含み、全血から赤血球細胞を分離している。しかし、本出願者は、本明細書に記載する深さ方向分析法を取り入れた装置を使用することにより、異なった吸収プロファイルを有する、より大きな金粒子を使用できることを見出した。

【００２７】

図４は、ヘモグロビン（Ｈｂ）および酸素化されたヘモグロビン（HbO_2）の吸収スペクトルを示す。５２５ｎｍにおけるモル吸光係数は約３００００である。６５４ｎｍにおけるモル吸光係数は、HbO_2に関して約３４５であり、Ｈｂに関して３５００である。血液中ヘモグロビンの濃度は約０．００２３$mol \cdot dm^{-3}$であり、吸収値（光学的密度）が５２５ｎｍで約７０であり、静脈血（即ち非酸素化血液）に関して６５４で８であり、動脈血液（即ち酸素化血液）に関して０．８である。この５２５ｎｍにおける７０の強い光学的密度は、試料中の被膜に非常に近い赤血球画分のために、ピエゾ被膜上に重大な信号を生じると期待されよう。

【００２８】

図５は、金粒子の様々な粒子径に対する吸収極大を示す（尺度は任意であり、大きな粒子は、遙かに高いモル吸光係数を有することに注意）。ヘモグロビンの吸収極大と粒子径６０ｎｍまでの小さな金粒子の吸収極大との間には、大きな重なりがあることは明らかである。

【００２９】

このように、この分野で現在使用されている粒子径より大きな金粒子を使用することにより、検定を全血の存在下で行うことができる。大きな金粒子を使用することには、モル吸光係数がより大きくなるという利点もある。モル吸光係数は、粒子径直径のほぼ３乗で増加する。つまり、８０ｎｍは、４０ｎｍ粒子の吸収で約８倍の増加を示し、検定の感度を増加させる。

【００３０】
好ましくは、本発明は、粒子径５０～２５０ｎｍ、より好ましくは最小サイズ８０ｎｍ以上、最も好ましくは１００ｎｍ以上、最大サイズ２００ｎｍ以下、最も好ましくは１５０ｎｍ以下、を有する金粒子標識を使用する。粒子径とは、粒子の、その最も広い点における直径を意味する。金粒子は、市販されているか、または公知の方法を使用して調製することができる(例えば、G. Frens, Nature, 241, 20-22(1973)参照)。
【００３１】
標識は、好ましくは染料分子、金粒子、着色重合体粒子（例えば着色ラテックス粒子）、蛍光分子、酵素、磁性粒子および炭素粒子から選択する。しかし、適切な周波数で吸収するなら、電磁放射線と相互作用し、発熱し得る全ての標識を使用できる。磁性粒子の場合、電磁放射線は、高周波放射線である。上記の他の標識は全て光を使用する。金粒子の場合、信号をさらに増加するために、銀イオンおよび還元剤の溶液を使用して標識を強化することができる。金は、銀イオンから銀金属への還元に触媒作用／活性化し、その銀金属が光を吸収するのである。
【００３２】
標識は、非伝導性コア材料および少なくとも一つの金属シェル層を含んでなるナノ粒子でもよい。金属シェル層の金属は、貨幣鋳造金属、貴金属、遷移金属、および合成金属から選択することができるが、好ましくは金である。コア材料は、誘電性材料または半導体が好ましい。好適な誘電性材料としては、二酸化ケイ素、二酸化チタン、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）、ポリスチレン、硫化金および巨大分子、例えばデンドリマー、がある。単分散コロイド状シリカは、球形粒子を容易に形成するので、特に好ましい。金めっきしたシリカが特に好ましい標識である。どの特定の粒子に対しても、最大吸収は、非伝導性層の厚さと伝導性シェル層の比によって異なり、これらのパラメータを変えて、所望の吸収プロファイルを与えることができる。そのような標識は、米国特許第６，３４４，２７２号に記載されている。
【００３３】
本発明で使用する電磁放射線は、波長が６００ｎｍ以上、好ましくは６１０ｎｍ以上である。上限はあまり重要ではないが、好ましくは１０００ｎｍ以下、より好ましくは８００ｎｍ以下である。波長は、６５４ｎｍであるのが最も好ましい。供給源は、好ましくはＬＥＤである。
【００３４】
標識は、使用する電磁放射線の波長における全血試料の吸収に少なくとも等しいレベルで電磁放射線を吸収する。検定および全ての結合工程の前で使用する濃度を使用して測定する。好ましくは、標識の吸収は、バックグラウンドの吸収の少なくとも２倍であり、最も好ましくは、その吸収の少なくとも１０倍である。
【００３５】
標識を付けた抗体、または事実、他の試薬のどれも、装置に組み込んだチャンバー中に保存するか、または装置とは別に、部品のキットの形態で供給することができる。
【００３６】
血液試料中の被分析物レベルを測定する装置は、好ましくは手で持てる携帯読み取り装置およびピエゾ電気的またはパイロ電気的被膜を含む使い捨て装置を含んでなる。血液の少量試料（約１０マイクロリットル）を入手し、使い捨て装置中のチャンバーに移す。チャンバーの片側は、問題とする被分析物に結合し得る抗体で被覆したピエゾ電気的またはパイロ電気的被膜から製造する。次いで、例えば上記のような標識を付けた抗体または既知濃度の標識を付けた抗原を含む別の溶液を加えることができる。反応を進行させ、次いで使い捨て装置を読み取り装置の中に挿入し、測定工程を開始する。次いで、検定の結果が、読み取り装置のディスプレイ上に表示される。次いで、ピエゾ電気的被膜を含む使い捨て装置を取り出し、廃棄する。
【００３７】
本明細書に記載する装置は、溶液中のただ一種の被分析物だけを検出することに限定さ

れない。本装置は「深さ方向分析」を行うので、検出している各被分析物を選択的に結合する試薬を使用することにより、様々な被分析物を検出することができ、その際、これらの試薬は、変換器３の表面から異なった距離にある。例えば、２種類の試薬を使用して２種類の被分析物を検出することができ、第一試薬を被膜から第一の距離に配置し、第二試薬を被膜から第二の距離に配置する。電磁放射線の各パルスと電気的信号の発生との間の時間遅延は、第一および第二試薬に結合した２種類の被分析物で異なっている。

【００３８】

異なった深さを与えると共に、異なった種類の試薬、例えば異なった抗体、を変換器の異なった部分、即ち変換器表面上の特定の区域または「スポット」、に使用し、複数の試験を行うことができる。あるいは、またはそれに加えて、電磁放射線の様々な波長に応答する試薬／被分析物を使用し、複数の試験を行うことができる。

【００３９】

熱を発生する物質は、被膜の表面上にあってよいが、物質は、被膜の表面から少なくとも５ｎｍで、被膜の表面から５００μｍ以下にあってもよい。しかし、好適な時間遅延を選択することにより、バルク溶液中の物質も測定することができる。

【００４０】

抗体－抗原反応に代わるものとして、試薬および被分析物は、第一および第二核酸でもよく、その際、第一および第二核酸は、相補的であり、あるいは試薬がアビジンまたはその誘導体を含み、被分析物がビオチンまたはその誘導体を含む、もしくはその逆である、でもよい。

【実施例】

【００４１】

酸化インジウムスズ中に被覆した分極させたポリフッ化ビニリデンバイモルフを、下記の例における検知装置として使用する。

【００４２】

この検知装置をニトロセルロース溶液中に浸し塗りし、酸化インジウムスズ上に厚さ約１ミクロンのニトロセルロース層を形成する。次いで、この被膜を、感圧接着剤の５００μｍ層およびポリカーボネートの蓋形成材料を加えることにより、反応チャンバーに構築する。反応チャンバーに液体を加える、およびそこから除去するための穴がある。

【００４３】

例１（比較例）

ニトロセルロース被覆したピエゾ電気的被膜の表面上で実験を行い、被膜に隣接する溶液中における、抗体で標識を付けた粒子の存在を検出する。実験中、液体はニトロセルロース表面上に拘束する。被膜を重合させたストレプトアビジンの、ＰＢＳ（ホスフェート緩衝食塩水）ｐＨ７．２中、濃度２０μｇ／ｍｌの溶液中に一晩浸漬する。ＰＢＳ／Ｔｗｅｅｎ ０．０５％によるすすぎ／洗浄工程の後、ビオチニル化したマウスの抗体を加え、１時間培養する。過剰のマウス抗体をすすいで除去した後、専用の(proprietary)安定剤を使用して表面を安定化させる。

【００４４】

４０ｎｍ金粒子に共役させたヤギ抗－マウス抗体の溶液を、金粒子濃度が０．１５ｐｍｏｌｅｓ／ｍｌになるまで希釈する。この溶液を、安定化させたマウス抗体被覆した被膜に加える。

【００４５】

次いで、被膜を波長５２５ｎｍ（緑色光）のチョップドライトで照射する。ピエゾ電気的被膜により検出される極大信号の大きさを測定する。アナログ－デジタル変換器を使用して信号を表示する。検出器により受信される信号は、金粒子と表面の結合が起こるので、時間と共に増加する。抗体－抗原反応の速度論的プロファイルを監視し、２０分間にわたって１０秒間毎に測定を行う。

【００４６】

この同じ被膜に対して、ビオチニル化したマウスの抗体をＰＢＳで置き換えることに

より、ブランク実験を行う。このブランク実験では、検出器により受信される信号は、時間と共に増加しない。

【００４７】

例２

ニトロセルロース被覆したＰＶＤＦ被膜の表面を例１と同じ様式で被覆する。

【００４８】

８０ｎｍ金粒子に共役させた抗－マウス抗体の溶液を、金粒子濃度が０．０１５ｐｍｏｌｅｓ／ｍｌになるまで希釈する。この溶液を、安定化させたマウス抗体被覆した被膜に加える。

【００４９】

次いで、被膜を波長６５４ｎｍ（赤色光）のチョップドライトで照射する。ピエゾ電気的被膜により検出される極大信号の大きさを測定する。アナログ－デジタル変換器を使用して信号を表示する。検出器により受信される信号は、時間と共に増加する。抗体－抗原反応の速度論的プロファイルを監視し、２０分間にわたって１０秒間毎に測定を行う。

【００５０】

この同じ被膜に対して、ビオチニル化したマウスの抗体をＰＢＳで置き換えることにより、ブランク実験を行う。このブランク実験では、検出器により受信される信号は、時間と共に増加しない。

【００５１】

例３

例３は、全血の存在下で例２を繰り返し、同様の信号が発生する。

【図面の簡単な説明】

【００５２】

【図１】図は、本発明の化学的検知装置を図式的に示す。

【図２】図は、本発明の装置を使用するサンドイッチ免疫検定を示す。

【図３】図は、本発明の横方向フロー検定装置を示す。

【図４】図は、ヘモグロビンおよび酸素化されたヘモグロビンの吸収プロファイルを示す。

【図５】図は、様々な粒子径を有する金粒子の吸収プロファイルを示す。

【図６】図は、例１における結合検定の時間的経過を示す。

【図７】図は、例２における結合検定の時間的経過を示す。

【図１】

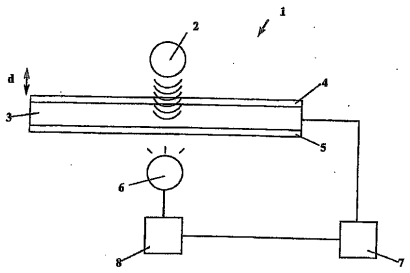


Fig. 1

【図２】

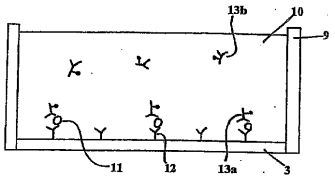


Fig. 2

【図３】

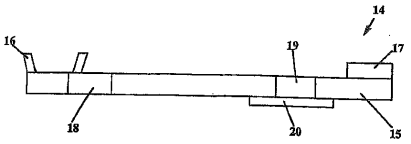
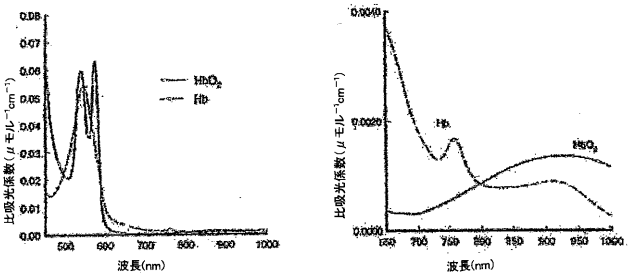
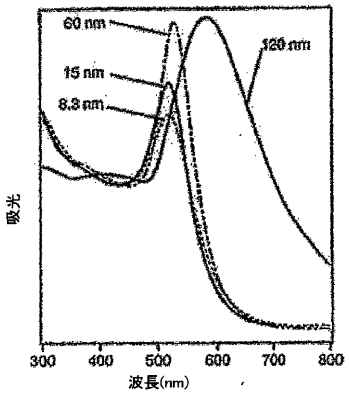


Fig. 3

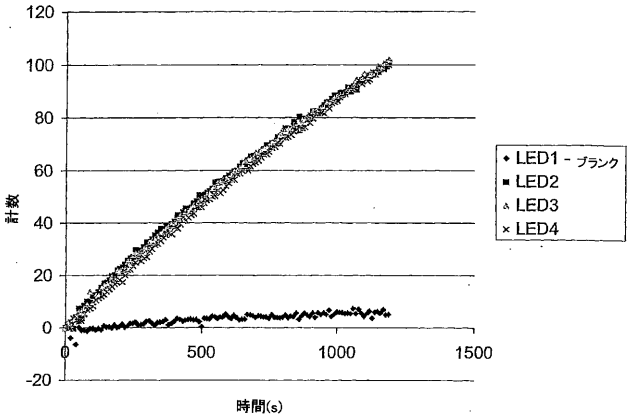
【図４】



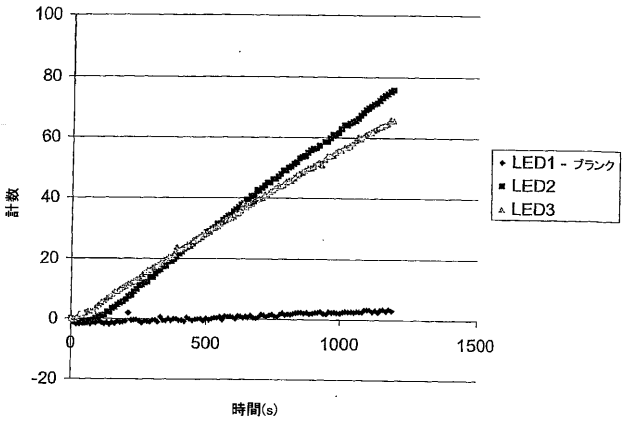
【図５】



【図６】



【図７】



【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000938

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. 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)
G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2004/090512 A (PIEZOPTIC LTD [GB]; CARTER TIMOTHY JOSEPH NICHOLAS [GB]; ROSS STEVEN A) 21 October 2004 (2004-10-21) cited in the application abstract page 8, paragraph 2 page 9, paragraph 2 page 10, paragraph 2 page 11, paragraph 1; example 1	1-29
A	WO 90/13017 A (HEALTH LAB SERVICE BOARD [GB]) 1 November 1990 (1990-11-01) abstract claims 1-26; figure 1	1-29

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C.

[X] 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
"E" earlier document 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	Date of mailing of the international search report
25 June 2007	04/07/2007
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Weijland, Albert

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000938

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	SHEN G ET AL: "Detection of antisperm antibody in human serum using a piezoelectric immunosensor based on mixed self-assembled monolayers" ANALYTICA CHIMICA ACTA, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 540, no. 2, 1 June 2005 (2005-06-01), pages 279-284, XP004889838 ISSN: 0003-2670 abstract figure 1	1-29
A	SUSMEL ET AL: "A piezoelectric immunosensor based on antibody entrapment within a non-totally rigid polymeric film" SENSORS AND ACTUATORS B, ELSEVIER SEQUOIA S.A., LAUSANNE, CH, vol. 111-112, 11 November 2005 (2005-11-11), pages 331-338, XP005088360 ISSN: 0925-4005 abstract; figure 1 page 337, left-hand column	1-29

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2007/000938

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004090512 A	21-10-2004	AU 2004227171 A1	21-10-2004
		CA 2521773 A1	21-10-2004
		EP 1613947 A1	11-01-2006
		JP 2006522930 T	05-10-2006
		US 2006263894 A1	23-11-2006
WO 9013017 A	01-11-1990	AT 212439 T	15-02-2002
		AU 655913 B2	19-01-1995
		AU 5568590 A	16-11-1990
		CA 2054702 A1	28-10-1990
		DE 69033904 D1	14-03-2002
		DE 69033904 T2	11-07-2002
		DK 470164 T3	13-05-2002
		EP 0470164 A1	12-02-1992
		ES 2166751 T3	01-05-2002
		JP 2939891 B2	25-08-1999
		JP 4504904 T	27-08-1992
		ZA 9003214 A	27-03-1991

フロントページの続き

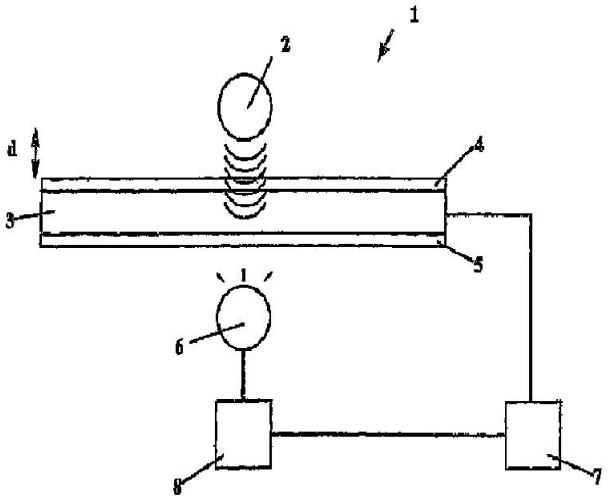
(51)Int.Cl.	ＦＩ	テーマコード（参考）
	Ｇ０１Ｎ　21/78　　Ｃ	

(81)指定国　AP(BW,GH,GM,KE,LS,MW,MZ,NA,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,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MT,NL,PL,PT,RO,SE,SI,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,BW,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PG,PH,PL,PT,RO,RS,RU,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,SV,SY,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA,ZM,ZW

(74)代理人　100111730
弁理士　伊藤　武泰
(72)発明者　ティモシー、ジョセフ、ニコラス、カーター
イギリス国ケント、シティングボーン、ケント、サイエンス、パーク、ギラット、アベニュ、１００
(72)発明者　スティーブン、アンドリュー、ロス
イギリス国ケント、シティングボーン、ケント、サイエンス、パーク、ギラット、アベニュ、１００

Ｆターム(参考) 2G054 AA06　CE01　EA03　GA03

专利名称(译)	化学的検知装置		
公开(公告)号	JP2009530598A	公开(公告)日	2009-08-27
申请号	JP2008558906	申请日	2007-03-16
[标]申请(专利权)人(译)	维瓦克塔有限公司		
申请(专利权)人(译)	Bibakuta有限公司		
[标]发明人	ティモシージョセフニコラスカーター スティーブンアンドリューロス		
发明人	ティモシー、ジョセフ、ニコラス、カーター スティーブン、アンドリュー、ロス		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/53 G01N33/553 G01N33/543 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/54373 G01N33/5438		
FI分类号	G01N33/536.E G01N33/53.M G01N33/53.U G01N33/553 G01N33/543.521 G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA06 2G054/CE01 2G054/EA03 2G054/GA03		
代理人(译)	耀希达凯贤治 中村KoTakashi		
优先权	2006005452 2006-03-17 GB 60/786808 2006-03-29 US 60/811110 2006-06-06 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及化学传感，尤其涉及一种检测全血样品中分析物的方法。该方法总的来说包括以下步骤：将样品暴露于具有栓系试剂的换能器;引入标记试剂;用一系列波长为600nm或以上的电磁辐射脉冲照射样品;并且转换和检测电信号以及每个脉冲之间的时间延迟。标记试剂上的标记吸收的电磁辐射的水平至少等于所用电磁辐射波长下全血样品的吸收。