

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4820827号
(P4820827)

(45) 発行日 平成23年11月24日(2011.11.24)

(24) 登録日 平成23年9月9日(2011.9.9)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/53

K

請求項の数 10 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2007-556660 (P2007-556660)	(73) 特許権者	502301425
(86) (22) 出願日	平成18年2月23日 (2006.2.23)		アクシス—シールド エイエスエイ
(65) 公表番号	特表2008-532006 (P2008-532006A)		ノールウェー エヌ—O 5 1 O オスロ
(43) 公表日	平成20年8月14日 (2008.8.14)		ウルフェンファイエン 87
(86) 国際出願番号	PCT/GB2006/000638	(74) 代理人	110000040
(87) 国際公開番号	W02006/090154		特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ
(87) 国際公開日	平成18年8月31日 (2006.8.31)	(72) 発明者	フランツェン、フランク
審査請求日	平成20年10月20日 (2008.10.20)		ノールウェー エヌ—O 5 1 O オスロ
(31) 優先権主張番号	0503836.9		ウルフェンファイエン 87、アクシス—
(32) 優先日	平成17年2月24日 (2005.2.24)		シールド エイエスエイ内
(33) 優先権主張国	英国 (GB)	(72) 発明者	ファーレン、アーン、ルードヴィッグ
			ノールウェー エヌ—O 5 1 O オスロ
			ウルフェンファイエン 87、アクシス—
			シールド エイエスエイ内
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アッセイ方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト又はヒト以外の血管を有する動物の被検体から採取された全血試料中の血漿ホモシステインを分析する方法であって、

前記被検体からの全血試料を以下の試薬 - 液体稀釈剤、還元剤、ホモシステイン変換酵素、前記酵素のホモシステイン変換反応の阻害剤、細胞溶解剤、前記ホモシステイン変換酵素の変換産物に結合可能な色標識結合剤、及び前記変換産物と競合して前記結合剤に結合可能な微粒子に接触させること；

前記試薬との接触後、結合していない状態及び前記変換産物に結合した状態の前記結合剤を通過させるのには十分であるが、前記微粒子に結合した状態の前記結合剤を通過させるのには不十分な多孔性を示す膜を通して前記試料を引き込むこと；

前記膜上に保持された前記結合剤の色標識を検出すること；及び、

前記全血試料中の赤血球細胞の濃度に依存する補正因子を適用することにより血漿ホモシステイン濃度の示度を前記検出から判断することを含み、

前記試薬との接触が、下記規定に従うことを条件として連続して又は同時に行われる方法。

i) 前記溶解剤との接触が、前記稀釈剤、酵素、及び還元剤との接触後に起こること、

i i) 前記阻害剤との接触が、前記稀釈剤、酵素、及び還元剤との接触後であって前記溶解剤との接触前に起こること、及び

i i i) 前記結合剤及び前記微粒子との接触が、前記結合剤及び前記微粒子を共に含む液

10

20

体との接触を伴わないこと。

【請求項 2】

前記膜を通して前記試料を引き込む前に、前記試料中の DNA をフラグメント化する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記試薬の少なくとも 1 つがビーズ形態で提供される請求項 1 及び 2 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 4】

前記色標識結合剤が、金属ビーズ標識結合剤である請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【請求項 5】

前記血漿ホモシステイン濃度を可視又は電子信号として提示することを含む、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

全血を用いる血漿ホモシステインアッセイ用の使い捨てカートリッジであって、前記カートリッジは、複数ウェルを備えたベース、先端にキャピラリーが付いた取り外し可能なピペット、及びカバーを有し、

前記カバーは、先端に膜が付いたピペットを担持し、

前記ベースのウェルは、以下のアッセイ試薬：液体希釈剤、還元剤、ホモシステイン変換酵素、前記酵素のホモシステイン変換反応の阻害剤、細胞溶解剤、前記酵素の変換産物に結合可能な色標識結合剤、及び前記変換産物と競合して前記結合剤に結合可能な微粒子を含み、

20

前記結合剤及び前記微粒子は異なる前記ウェル内に存在し、

前記阻害剤及び前記酵素は異なる前記ウェルに存在し、前記溶解剤は、前記酵素並びに前記還元剤及び前記希釈剤の少なくとも一部を含む 1 つ又は複数のウェルとは異なるウェルに存在し、

前記カートリッジは、前記カートリッジに供給された全血試料と前記試薬との接触が、下記規定に従うように構成されている、カートリッジ。

i) 前記溶解剤との接触が、前記希釈剤、酵素、及び還元剤との接触後に起こること、

i i) 前記阻害剤との接触が、前記希釈剤、酵素、及び還元剤との接触後であって前記溶解剤との接触前に起こること。

30

【請求項 7】

前記ベースに少なくとも 5 つのウェルを線形配列で有する請求項 6 に記載のカートリッジ。

【請求項 8】

前記ベースにおける少なくとも 1 つのウェル内に少なくとも 1 つの試薬含有ビーズを有する請求項 6 及び 7 のいずれか 1 項に記載のカートリッジ。

【請求項 9】

前記ピペットの少なくとも 1 つに前記ビーズの少なくとも 1 つを有する請求項 8 に記載のカートリッジ。

40

【請求項 10】

前記ベース内の前記ウェルのうちの少なくとも 1 つにヌクレアーゼを含む請求項 6 から 9 のいずれか 1 項に記載のカートリッジ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液中のホモシステインを分析する方法、及びそのような方法に用いられるアッセイキットに関する。

【背景技術】

【0002】

50

ホモシステイン (H C y) は、蛋白質の合成には用いられないが、細胞及び細胞外液中に低濃度 (例えば、通常、成人の血漿中約 $10 \mu\text{M}$) で存在する、硫黄を含有する小さな α -アミノ酸である。血漿 H C y のレベルが高いことは、葉酸又はビタミン B 欠乏及び心臓血管疾患に関係があった。したがって、血漿中の H C y を分析することは臨床上重要な関心事である。

【0003】

このようなアッセイシステムの1つは、Axis - Shield ASAによって開発され、Abbott Laboratoriesから市販されている。販売開始後最初の6年間で、このシステムを使って2,600万件を上回るこのようなH C yアッセイが行われた。Axis - Shield / Abbott H C yアッセイは、血漿中でのH C yのS - アデノシル - ホモシステイン (SAH) への酵素的変換、及びSAHのイムノアッセイ検出を含む。しかし、Axis - Shield / Abbott H C yアッセイは、臨床実験室内で実施されるように設計されている。そのため、患者がアッセイの結果を聞くために再訪問する必要があるないように、例えば診察室での治療時 (point - of - care) に実施可能な形態のH C yアッセイが依然として求められている。

10

【0004】

治療時に用いられるアッセイ実施デバイスは、近年、Axis - Shield ASAによって開発された。これは、Afinion (商標) の下で市販されており、例えばWO 02 / 090995 (特許文献1) に記載されている。本明細書では、その内容を参考のために援用する。Afinionシステムでは、アッセイを実施するために必要な試薬が予め添加 (プレロード) されたいくつかのウェルを含み、特定の試料タイプ及び目的の分析物に対してアッセイをどのように行うかをデバイスが判断できるようにするための十分なコンピュータ読出し可能情報を保持するアッセイカートリッジに試料 (例えば、血液、血漿、尿、など) が配置される。

20

【特許文献1】WO 02 / 090995

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

我々は、全血を用いて (すなわち、血液試料から細胞を分離する必要なく)、例えば、Afinionデバイスを用いて、治療時に実施可能な血漿H C yのアッセイを開発した。

30

【0006】

血漿ではなく、全血を用いることができることにより、医師に求められる試料の取扱いが大幅に簡略化される。

【0007】

しかし、全血を用いると、血漿H C yアッセイの性能に深刻な問題を引き起こす。なぜなら、試料中の細胞内H C yが場合によっては血漿に漏れることがあるからである。実際、現在行われている血漿H C yの臨床実験室におけるアッセイでは、医師は、細胞内H C yによる汚染 (コンタミネーション) を避けるために、30分以内に血漿を全血から分離して血漿試料を冷えた状態で保管するように指示されている。細胞内H C yによる汚染は回避されなければならない。なぜなら、正常 / 異常血液H C yの現在の基準が血漿H C y用になっており、細胞内H C yにおいて患者間でどの程度のばらつきがあるのか、これが患者の健康によってどの程度変化するのかについては分かっていないからである。

40

【課題を解決するための手段】

【0008】

しかし、我々は、血漿H C yの酵素イムノアッセイにおいて、結合が起こるまで細胞溶解を遅らせ、ヘマトクリットを補正することによって、分離されていない全血試料を使用可能であることを見出した。

【0009】

したがって、1つの局面によると、本発明は、ヒト又はヒト以外の血管を有する (v a

50

s c u l a r i z e d) 動物の被検体から採取された血液試料中の血漿ホモシステインを分析する方法であって、前記被検体からの全血試料を以下の試薬、すなわち、液体稀釈液、還元剤、ホモシステイン変換酵素 (c o n v e r t i n g e n z y m e)、選択的に前記酵素のホモシステイン変換反応の阻害剤、細胞溶解剤、前記ホモシステイン変換酵素の変換産物に結合可能な色標識結合剤、及び前記変換産物と競合して前記結合剤に結合可能な微粒子に接触させること；前記試薬との接触後、結合していない状態及び前記変換産物に結合した状態の前記結合剤を通過させるのには十分であるが、前記微粒子に結合した状態の前記結合剤を通過させるのには不十分な多孔性を示す膜を通して前記試料を引き込むこと；前記膜上に保持された前記結合剤の色標識を検出すること；前記全血試料中の赤血球細胞の濃度に依存する補正因子を適用することにより血漿ホモシステイン濃度の示度 (i n d i c a t i o n) を前記検出から判断すること；選択的ではあるが好ましくは、前記血漿ホモシステイン濃度を可視又は電子信号として提示することを含み、前記試薬との接触が、下記規定に従うことを条件として連続して又は同時に行われる方法を提供する。

10

- i) 前記溶解剤との接触が、前記稀釈剤、酵素、及び還元剤との接触後に起こること、
- i i) 前記阻害剤が存在する場合には前記阻害剤との接触が、前記稀釈剤、酵素、及び還元剤との接触後であって前記溶解剤との接触前に起こること、及び
- i i i) 前記結合剤及び前記微粒子との接触が、前記結合剤及び前記微粒子を共に含む液体との接触を伴わないこと。

【発明を実施するための最良の形態】

20

【 0 0 1 0 】

本発明の方法においては、細胞溶解が開始される前（又は開始されるのと同時に）ホモシステイン変換酵素によって H C y の変換を停止又は少なくとも減速させる方策を講じることが好ましい。これは、試料の温度を変化させ、例えば、酵素反応を減速させるか、若しくは酵素を変性させることにより、稀釈することにより、p H を変更することにより、又は、反応を阻害若しくは酵素を変性させるように作用する薬剤を添加することにより（例えば、S D S などの界面活性剤、N a S C N などのカオトロピック塩、尿素若しくは塩化グアニジニウムなどの他の公知の変性剤、又は（酵素反応が金属若しくは補助因子を必要とする場合には）金属若しくは補助因子結合剤を用いることにより）成し遂げられ得る。変性界面活性剤が用いられる場合、これは、溶解剤としても機能し得る。便宜上、酵素的 H C y 変換反応に干渉するこのような薬剤を、本明細書では、阻害剤と呼び、本発明の方法の好ましい実施形態では、阻害剤は、用いられる試薬のセットに含まれる。

30

【 0 0 1 1 】

本発明の方法では、試薬との接触には、所定時間、かつ、好ましくは所定温度における、稀釈剤、還元剤、及び酵素との接触が行われる第一段階と、続いて、微粒子及び結合剤との接触が行われる第二段階との二段階のインキュベーションが含まれることが好ましい。

【 0 0 1 2 】

第 1 の好ましい実施形態では、接触シーケンスは、以下のとおりである。

40

- i) 稀釈液との接触、
- i i) 酵素及び還元剤との接触、
- i i i) インキュベーション、
- i v) 微粒子、阻害剤、及び溶解剤との接触、
- v) 結合剤との接触、
- v i) インキュベーション、及び
- v i i) 膜を通しての引き出し。

【 0 0 1 3 】

第 2 のさらに好ましい実施形態では、接触シーケンスは、以下のとおりである。

- i) 稀釈剤との接触、
- i i) 還元剤、酵素、及び微粒子との接触、

50

- i i i) インキュベーション、
- i v) 溶解剤、阻害剤、及び結合剤との接触、
- v) インキュベーション、及び
- v i) 膜を通しての引き出し。

【 0 0 1 4 】

第 3 の好ましい実施形態では、接触シーケンスは、以下のとおりである：

- i) 稀釈剤との接触、
- i i) 還元剤、酵素、及び微粒子との接触、
- i i i) インキュベーション、
- i v) 溶解剤及び阻害剤との接触、
- v) 結合剤との接触、
- v i) インキュベーション、及び
- v i i) 膜を通しての引き出し。

【 0 0 1 5 】

試薬は、概して、使い捨ての複数のウェルを備えたアッセイカートリッジで提供されるのが好ましい。特に好ましくは、このようなカートリッジは、試薬、先端に膜が付いたピペット、及び先端にキャピラリーが付いた取り外し可能なピペットを含んでいなければならない。このようなカートリッジでは、少なくとも、結合剤及び酵素、並びに好ましくは結合剤が乾燥形態で提供され、結合剤と微粒子とが別個のウェルで提供される。

【 0 0 1 6 】

したがって、他の局面によると、本発明は、全血を用いる血漿ホモシステインアッセイ用の使い捨てカートリッジであって、前記カートリッジは、複数のウェルを備えたベース、先端にキャピラリーが付いた取り外し可能なピペット、及びカバーを有し、前記カバーは、先端に膜が付いたピペットを担持し、前記ベースのウェルは、以下のアッセイ試薬：液体稀釈剤、還元剤、ホモシステイン変換酵素、選択的に前記酵素のホモシステイン変換反応の阻害剤、細胞溶解剤、前記酵素の変換産物に結合可能な色標識結合剤、及び前記変換産物と競合して前記結合剤に結合可能な微粒子を含み、前記結合剤及び前記微粒子は異なる前記ウェル内に存在し、前記阻害剤が存在する場合には、前記阻害剤及び前記酵素は、異なる前記ウェルに存在し、前記溶解剤は、前記酵素並びに前記還元剤及び前記稀釈剤の少なくとも一部を含む 1 つ又は複数のウェルとは異なるウェルに存在するカートリッジを提供する。

【 0 0 1 7 】

第 1 の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも 4 つのウェルを有し、第 1 のウェルは、稀釈剤を含み、第 2 のウェルは、酵素及び還元剤を含み、第 3 のウェルは、微粒子、溶解剤、及び阻害剤を含み、第 4 のウェルは、結合剤を含む。第 2 の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも 4 つのウェルを有し、第 1 のウェルは、稀釈剤を含み、第 2 のウェルは、稀釈剤、阻害剤、及び溶解剤を含み、第 3 のウェルは、酵素、還元剤、及び微粒子を含み、第 4 のウェルは、結合剤を含む。第 3 の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも 4 つのウェルを有し、第 1 のウェルは、稀釈剤を含み、第 2 のウェルは、酵素、還元剤、及び微粒子を含み、第 3 のウェルは、稀釈剤、阻害剤、及び溶解剤を含み、第 4 のウェルは、阻害剤を含む。これら 3 つのカートリッジ形式は、特に、上記の好ましい接触シーケンスの実施に適切である。

【 0 0 1 8 】

本発明のカートリッジのウェルが液体を含む場合には、ウェルには、取り外し可能又は穿孔可能なクロージャ（例えば、フویلシール）が設けられているのが好ましい。カバーは、このようなシールを貫通する穿孔管を有するのが好ましく、それ自体が全血試料を引き込んでカートリッジに導入するように用いられる取り外し可能なピペットを保持するように形成されているのが好ましい。

【 0 0 1 9 】

使用前、カートリッジは、密封容器（例えば、フویلパック）に配置されているのが

10

20

30

40

50

好ましく、密封容器も、乾燥剤（例えば、シリカゲル）又はモレキュラーシーブを含んでいるのが好ましい。

【 0 0 2 0 】

したがって、第 1 の好ましいカートリッジの実施形態を用いるアッセイの実施は、以下の工程を含むのが適切である。

- 1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、
- 2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程（すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される）、
- 3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、
- 4) 稀釈剤を第 1 のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、
- 5) 血液及び稀釈剤を先端にキャピラリーが付いたピペットから第 2 のウェルに導入する工程、
- 6) 第 2 のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、
- 7) インキュベーションの間、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤を第 1 のウェルから第 3 のウェルに導入する工程、
- 8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、インキュベートされた液体を第 2 のウェルから第 3 のウェルに導入する工程、
- 9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、結合剤及び稀釈剤を第 4 のウェルから第 3 のウェルに導入する工程、
- 10) 第 3 のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、
- 11) インキュベートされた液体を第 3 のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、
- 12) 膜の外面に保持された結合剤を検出する工程、及び
- 13) 血漿 H C y 含有量を測定し、その結果を表示及び／又はエクスポートする工程。

【 0 0 2 1 】

第 2 の好ましいカートリッジの実施形態のためのアッセイ実施シーケンスは、以下のとおりである。

- 1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、
- 2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程（すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される）、
- 3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、
- 4) 稀釈剤を第 1 のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、
- 5) 血液及び稀釈剤を先端にキャピラリーが付いたピペットから第 3 のウェルに導入する工程、
- 6) 第 3 のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、
- 7) インキュベーションの間、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤を第 1 のウェル及び／又は第 2 のウェルから第 4 のウェルに導入する工程、
- 8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤、溶解剤、及び阻害剤を第 2 のウェルから第 3 のウェルに導入する工程、
- 9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、結合剤及び稀釈剤を第 4 のウェルから第 3 のウェルに導入する工程、
- 10) 第 3 のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、
- 11) インキュベートされた液体を第 3 のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、
- 12) 膜の外面に保持された結合剤を検出する工程、及び
- 13) 血漿 H C y 含有量を測定し、その結果を表示及び／又はエクスポートする工程。

【 0 0 2 2 】

第 3 の好ましいカートリッジの実施形態のためのアッセイ実施シーケンスは、以下のと

おりである。

- 1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、
- 2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程（すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される）、
- 3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、
- 4) 稀釈剤を第1のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、
- 5) 血液及び稀釈剤を先端にキャピラリーが付いたピペットから第2のウェルに導入する工程、
- 6) 第2のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、
- 7) インキュベーションの間、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤を第3のウェルから第4のウェルに導入する工程、
- 8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、インキュベートされた液体を第2のウェルから第3のウェルに導入する工程、
- 9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、結合剤及び稀釈剤を第4のウェルから第3のウェルに導入する工程、
- 10) 第3のウェルの内容物を所定期間インキュベートする工程、
- 11) インキュベートされた液体を第3のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、
- 12) 膜の外面に保持された結合剤を検出する工程、及び
- 13) 血漿HCy含有量を測定し、その結果を表示及び/又はエクスポートする工程。

【0023】

本発明のアッセイ方法に用いられる少なくとも1つの試薬は、固形状又は半固形状で（例えば、膜、粉、又はビーズとして）提供され得る。ビーズ状の試薬を用いる場合、本明細書に記載されているように、試薬が添加（ロード）されたカートリッジを用いてアッセイが実施される際には特に有利である。なぜなら、カートリッジ保管中に相互作用するかも知れない試薬が、保管中の相互作用の問題を引き起こさずに、同じカートリッジウェルにビーズ状で提供され得るだけでなく、カートリッジローディングの際の柔軟性が向上し、アッセイの実施が設計上向上するからである。さらに、個々の試薬の保管安定性は、溶液状よりもビーズ状の方が高いと思われる。

【0024】

この結果、本発明のさらに3つの好ましい実施形態では、アッセイカートリッジは、ビーズ状の選択された試薬を含む。したがって、第4の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも5つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤及び細胞溶解剤を含み、第2のウェルは、稀釈剤を含み、第3のウェルは、結合剤を含む第1のビーズと微粒子を含む第2のビーズとを含み、第4のウェルは、阻害剤を含む第3のビーズを含み、第5のウェルは、酵素及び還元剤を含む第4のビーズ、並びに選択的であるが好ましくは、ヌクレアーゼを含む第5のビーズを含む。第5の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも5つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤及び細胞溶解剤を含み、第2のウェルは、稀釈剤、及び選択的であるが好ましくは、ヌクレアーゼを含み、第3のウェルは、結合剤を含む第1のビーズと微粒子を含む第2のビーズとを含み、第4のウェルは、阻害剤を含む第3のビーズを含み、第5のウェルは、酵素及び還元剤を含む第4のビーズを含む。第6の好ましい実施形態では、カートリッジは、少なくとも5つのウェルを有し、第1のウェルは、稀釈剤及び細胞溶解剤を含み、第2のウェルは、稀釈剤、及び選択的であるが好ましくは、ヌクレアーゼを含み、第3のウェルは、結合剤を含む第1のビーズと微粒子を含む第2のビーズとを含み、第4のウェルには、試薬は入っておらず、第5のウェルは、阻害剤、及び、それとは別に酵素及び還元剤を含む第3のビーズを含む。

【0025】

これらの実施形態では、第5及び第4のウェル内のビーズは、先端にキャピラリーが付いたピペット又は先端に膜が付いたピペットのそれぞれ内部に配置されているのが望まし

い。第5のウェルがビーズを含む場合、先端にキャピラリーが付いたピペットの貯蔵部（リザーバー）内であるのが好ましい。直前に記載された実施形態では、これらのビーズは、酵素及び還元剤を含む。第6の実施形態では、第5のウェルもまた、例えば、ウェルのベースにおける逆円錐形のプラスチックカップ内に（すなわち、ビーズとは別個に）乾燥形態で阻害剤を含む。

【0026】

したがって、第4及び第5の好ましいカートリッジの実施形態を用いるアッセイの実施には、以下の工程を含むことが適切である。

1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、

10

2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程（すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される）、

3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、

4) 稀釈剤を第2のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、

5) 血液、稀釈剤、及び酵素を先端にキャピラリーが付いたピペットから第2のウェルに流す工程、

6) 第2のウェルの内容物をインキュベートする工程、

7) 稀釈剤及び細胞溶解剤を第1のウェルから先端に膜が付いたピペットに導入し、第1のウェルに流し戻す工程、

8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤、細胞溶解剤、及び阻害剤を第1のウェルから第2のウェルに導入する工程、

20

9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、溶解した試料を第2のウェルから第3のウェルに導入する工程、

10) 第3のウェルの内容物をインキュベートする工程、

11) インキュベートされた液体を第3のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通過させることによって導入する工程、

12) 膜の外面に保持された結合剤を検出する工程、及び

13) 血漿Hcy含有量を測定し、その結果を表示及び／又はエクスポートする工程。

【0027】

第6の好ましいカートリッジの実施形態を用いるアッセイ実施には、以下の工程を含むことが適切である。

30

1) キャピラリーを血液中に浸し、先端にキャピラリーが付いたピペットをカートリッジ内に配置する工程、

2) カートリッジをアッセイデバイス内に配置し、自動アッセイ作業を開始する工程（すなわち、以下に挙げられる工程は、自動的に実施される）、

3) カバーをベースから除去し、密封されたウェルのシールを取る工程、

4) 稀釈剤を第2のウェルから先端にキャピラリーが付いたピペットに導入する工程、

5) 血液、稀釈剤、及び酵素を先端にキャピラリーが付いたピペットから第2のウェルに流す工程、

6) 第2のウェルの内容物をインキュベートする工程、

40

7) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤及び細胞溶解剤を第1のウェルから第5のウェルに導入して阻害剤を溶解する工程、

8) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤、細胞溶解剤、及び阻害剤を第5のウェルから第1のウェルに移す工程、

9) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、稀釈剤、細胞溶解剤、及び阻害剤を第1のウェルから第2のウェルに移す工程、

10) 先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて、溶解した試料を第2のウェルから第3のウェルに導入する工程、

11) 第3のウェルの内容物をインキュベートする工程、

12) インキュベートされた液体を第3のウェルから先端に膜が付いたピペットへ膜を通

50

過させることによって導入する工程、

13) 膜の外面に保持された結合剤を検出する工程、及び

14) 血漿HCy含有量を測定し、その結果を表示及び/又はエクスポートする工程。

【0028】

それぞれの場合、試料のヘモグロビン含有量は、膜を通して試料を引き込む前に分光測光法によって測定されるのが好ましい。これは、試料が細胞溶解剤と接触した後に行われるのが望ましい。

【0029】

液体が1つのウェルから他のウェルに移される場合、一般に、ドナーウェルの液体の全含有量ではなく、所定の容量が移される。

10

【0030】

本発明の方法において用いられるホモシステイン変換酵素は、結合剤に直接的又は間接的に結合可能なホモシステイン変換産物を生成する任意の酵素であればよい。この場合、間接的な結合とは、最初の酵素的変換産物が、その産物が結合剤に結合可能であるさらなる反応において、反応物として用いられ得ることを意味する。いくつかのホモシステイン変換酵素が公知であり、使用できる。例えば、シスタチオニンβシンターゼ、ホモシステイナーゼ、ホモシステインデスルフラゼ、メチオニンシンターゼ、ジメチルテチンホモシステインメチルトランスフェラーゼ、ベタイン-ホモシステインメチルトランスフェラーゼ、5-メチルテトラヒドロ葉酸-ホモシステインS-メチルトランスフェラーゼ、5-メチルテトラヒドロプテロイルトリグルタミン酸-ホモシステインS-メチルトランスフェラーゼ、O-スクシニルホモセリン-β-リアーゼ、及びS-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ(SAH-ヒドロラーゼ)などが挙げられる。SAH-ヒドロラーゼ、特に、組換えSAH-ヒドロラーゼを用いるのが好ましい。これらの酵素を用いたホモシステインの酵素的変換には、SAH-ヒドロラーゼの場合にはアデノシン若しくはアデノシン類似体、又はホモシステイナーゼの場合には水などのさらなる反応物「補助基質(c o - s u b s t r a t e)」が必要な場合がある。補助基質が必要な場合、補助基質は、一般に、本発明のアッセイ方法及びカートリッジでは、試薬として提供される。このような補助基質は、1回目のインキュベーションに間に合うように血液試料と接触されるが、通常、希釈剤中に又は酵素と共に存在させることができる。

20

【0031】

酵素がSAH-ヒドロラーゼである場合、分析物は、一般に、アデノシン若しくはSAH、又はこれらのうちの1つの酵素的変換産物である。しかし、SAHが好ましい分析物である。酵素がホモシステインデスルフラゼである場合、分析物は、一般に、α-ケトンブチラート(alpha-keto butyrate)の酵素的変換産物である。

30

【0032】

本発明により用いられる希釈剤は、pHが通常6から10、より好ましくは7から9、特に7.2から8.5である水性のもの(例えば、水)又は水性緩衝剤(例えば、リン酸、炭酸、ホウ酸、MOBS、HEPES, トリス、又はグリシルグリシン緩衝剤)であるのが好ましい。このようなpHをもつ他の緩衝剤を用いてよいことは言うまでもない。

【0033】

本発明により用いられる還元剤は、血漿中で生じ得る様々な形態のHCyを遊離ホモシステインに変換するように作用する。還元剤のこのような使用は、血漿HCyアッセイにおいて従来から行われている。用いられ得る適切な還元剤の例としては、ジチオール類(特に、ジチオスレイトール(DTT)、ジチオエリスロール(DTE)、及びビス-(2-メルカプトエチル)スルホン)、ホスフィン類(例えば、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、トリフェニルホスフィン、及びトリ-n-ブチル-ホスフィン)、ボラン類(例えば、ボラン-テトラヒドロフラン複合体、ジメチルスルフィド-ボラン、及びデカボラン)、ボロヒドリド類(例えば、NaCNBH₃、NaBH₄、及びトリアセトキシボロヒドリド)、ヒドリド類(例えば、LiAlH₄)、並びにシラン類(例えば、Et₃SiHなどのアルキルシラン類、フェニルシラン類、及びトリス(トリ

40

50

メチルシリル)シラン)が挙げられる。トリス-(2-カルボキシエチル)ホスフィン：
H C L (T C E P) を用いるのが特に好ましい。

【0034】

本発明により用いられる阻害剤は、試料中の細胞が溶解する前にホモシステイン変換を停止するように作用し、アッセイによって測定される血漿H C y 値の、細胞内H C y からの多大な影響力によるコンタミネーションを防止する。酵素阻害剤は、周知である。一般に、このような阻害剤は、例えば、天然の基質の特性を模倣することによって、酵素と直接結合してその作用を阻止し、それによって、例えば、酵素又は他の産物の生成を阻止する。しかし、他の阻害剤は、基質若しくはコファクター、又は酵素プロセス中に形成された分子若しくは中間物に作用し(それによって、通常の最終産物の形成を防止することができる)。S A H - ヒドロラーゼの場合、例えば、チオール基と反応するか、又はチオール基に干渉する試薬は、阻害剤として機能する。なぜなら、遊離チオール基は、この酵素の生物学的作用に必要なからである。例としては、メルチオレート(Merthiolate; チメロサル)及びマレイミド化合物(例えば、N-エチルマレイミド)が挙げられる。他の阻害剤の例としては、アデニン類似体及びアデニンヌクレオシド類が挙げられる。さらなる阻害剤としては、D-エリタデニン、9-β-D-キシロフラノシルアデニン、アデニン9-(-D-アラビノフラノシド、エリスロ-9-(2-ヒドロキシ-3-ノニル)-アデニン、過ヨウ素酸アデノシン、2'-デオキシアデノシン、3'-デオキシアデノシン、2', 3'-ジデオキシアデノシン、炭素環式アデノシン、2-クロロ-アデノシン、2-クロロデオキシアデノシン、アデノシンジアルデヒド、N6-メチルアデノシン、コホルマイシン、2'-デオキシコホルマイシン、ホルマイシン、2-アミノ-6-クロロ-プリンリボシド、ネブラリン、ピラゾマイシン(pyrazomycin)、3-デアザ(+/-)-アリストロマイシン、アリストロマイシン(及びそのハロビニル誘導体)、ツベリシン、並びに、アラ-A及びその誘導体(例えば、2-クロロ-アラ-A)が挙げられる。メルチオレート(Merthiolate; チメロサル)を用いるのが好ましいが、例えば、300 μg/mLの作用濃度で、N-エチルマレイミドを用いるのが特に好ましい。組換えS A H - ヒドロラーゼ及びその機能を阻害する様々な物質に関する刊行物へのリンクは、<http://www.pdg.cnb.uam.es/UniPub/iHOP/gs/95822.html>において見出せる。

【0035】

本発明によって用いられる細胞溶解剤は、血液細胞が膜の外面に保持されないように血液細胞を破壊するように作用する。細胞溶解剤は、周知であり、本発明により用いられる適切な細胞溶解剤として、界面活性剤、例えば、尿素、デオキシコレート、エンピゲン、アモニクス(ammonyx)、S D S、セシト(thesit)(例えば、ルブロールP X及びC 1 2 E 9)、及びトリトンX 1 0 0(例えば、ノニデットP 4 0)が挙げられる。0.4重量%での作用濃度でS D Sを用いるのが好ましい。

【0036】

試料が多孔膜を通して引き出されて膜によって保持された物質が検出される前に試料中の細胞が溶解される、本発明のようなアッセイ方法では、細胞溶解によって放出されるD N Aが膜孔に少なくとも部分的に詰まる可能性がある。これは、特に、試料が高濃度の白血球を含んでいる場合に起こる。したがって、膜孔の詰まりは、D N a s e、すなわち、ヌクレアーゼを用いて、細胞溶解によって放出されるD N Aを消化させることによって低減され得る。ヌクレアーゼは、試料が膜を通して引き出される前の任意の時点で、試料と接触させればよい。

【0037】

ヌクレアーゼは、アクチベータ、例えば、M g ²⁺などの2族金属イオンを必要とし、この場合、ヌクレアーゼとアクチベータとの接触は、試料が膜を通して引き出される前に試料とヌクレアーゼとの接触が起こるのであれば、試料とヌクレアーゼとの接触前、接触中、又は接触後でよい。しかし、ヌクレアーゼとアクチベータとの接触は、試料とヌクレアーゼとの接触と同時であることが好ましい。ヌクレアーゼ及びヌクレアーゼが必要とする

アクチベータは、周知であり、例えば、Merckからベンゾナーゼ (Benzonase) として市販されている。

【0038】

本発明により用いられる結合剤は、試料中に存在する他の物質に対してよりも酵素的変換産物及びその競合剤 (微粒子) に優先的に結合する任意の物質であればよい。結合剤は、共有結合又はその他の方法で共に結合若しくは保持された2つの機能部、すなわち、色標識及び結合部分から構成される。色標識は、可視範囲で光を吸収、放射、散乱、又は生成する材料、例えば、発色団又は蛍光体であるのが望ましい。しかし、赤外線又はUVの領域における光を吸収、放射、散乱、又は生成する色標識を用いてもよい。したがって、色標識は、発色団又は蛍光体などの分光測光法によって検出可能な任意の部分、又は分光測光法によって読み取り可能な色、蛍光、発光、若しくは散乱信号を生成することが可能な酵素標識 (例えば、アルカリホスファターゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、若しくはホタルルシフェラーゼ) であってよい。例えば、約100から200nmのクラスター用のモード粒径を有する金又は他の金属のクラスターコロイドを用いるのが特に好ましい。結合部分は、抗体、フラグメント、若しくはその構築物、又は小さな有機分子等であってよい。抗体及び抗体フラグメント又は構築物を用いるのが好ましい。用いられる酵素がSAH-ヒドロラーゼである場合、抗SAH抗体、特にこのような抗体の組換え体を用いるのが好ましい。このタイプの抗体については、例えば、Axis-Shield ASAの特許公報 (例えば、WO 00/40973) に記載されている。本明細書では、その開示を参考のために援用する。具体的には、モノクローナル抗SAH抗体は、WO 40973の実施例1に記載されているように製造され得る。このような抗体への金コロイドの結合は、US-A-5691207及びUS-A-5650333に記載されているように行われ得る。

【0039】

本発明により用いられる微粒子は、稀釈剤に懸濁し、膜によって保持され得る任意の物質であればよい。微粒子は、同様に、2つの機能成分、すなわち、膜に保持されるバルキー部 (bulky entity) 及び結合剤に結合する競合部を有し、これら2つの機能成分は、共有結合又は他の相互作用によって結合している。バルキーな物質 (agent) は、好ましくは、白色又は無色の、例えば、ポリマー粒子 (例えば、テックス粒子) である。競合部分は、通常、酵素的変換産物、又はその類似体若しくはフラグメントである。酵素がSAH-ヒドロラーゼである場合、競合部は、S-アデノシル-システインであるのが好ましい。競合部をバルキー部分にカップリングさせるために用いられる化学技術は、明らかに、反応のために利用できる後者の官能基の特性に依存する。通常、水溶性カルボジイミド類 (例えば、1-エチル-3-(ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド (EDC/EDAC)) などの連結剤、ビス(スルホ-スクシンイミジル)スベレート (BS₃) などのホモ二官能連結剤、を用いてもよいが、バルキー部がクロロメチル若しくはアルデヒドなどの反応性の基若しくは予め活性化された基を担持する場合には、連結は直接行われてもよい。好ましくは、競合部は、まず、蛋白質-競合部複合体がバルキー部にカップリングされる前に蛋白質 (例えば、アルブミン、より好ましくはチログロブリン) にカップリングされる。このようなカップリングの化学的性質は、当該技術分野で十分確立されている。

【0040】

本発明により用いられる膜は、微粒子を保持するが、結合剤とその変換産物との複合体を透過させるような多孔性を示す任意の物質であれよい。膜材料を選択する際に考慮されなければならない要因としては、孔径、強度、及び接着性が挙げられる。孔径は、所望の複合体を停止させるように十分に小さく、非複合物質及び望ましくない複合体を透過させるように十分に大きい。小さな微粒子 (例えば、0.1から1.0µm) を用いることによって、大きな微粒子 (例えば、1から10µm) よりもより良好な信号が提供されるものの、膜の詰まりは激しくなる。したがって、好ましい微粒子の粒径は、1から2µmであり、膜孔径は、これに従って選択されるのが好ましい。親水性ポリエーテルスルホン及

10

20

30

40

50

びアクリルコポリマー膜（例えば、孔径が $0.8\mu\text{m}$ より大きい）が用いられるのが好ましい。このような膜は、PallからSupor及びVersaporとして入手できる。膜は、そのピペットに付着又は溶着され得る。好ましくは、膜は平坦であり、ピペットの軸に対して傾斜して（すなわち、垂直と水平との間に）配置される。この配置については、WO 02/090995に記載され、Axis-Shield ASAから販売されているAffinionカートリッジにおいて見られる。

【0041】

少なくとも、本発明により用いられるカートリッジ内のピペットを有さないウェルは、ウェルの軸に垂直な面に対してある角度で傾斜した平坦で透明なベースを有して、断面が長方形であるのが望ましい。

10

【0042】

適切な分析物が生成されるように酵素反応が完全に起こるようになるためには、上記のように、試料をインキュベートすることが望ましい。同様に、適切な信号が生成されるように十分な結合剤の結合が起こるようになるためには、試料をもう一度インキュベートすることが望ましい。換言すると、いずれの反応も平衡になる必要はなく、ユーザがアッセイを最適に受け入れられるようにアッセイの所望の精度に適合しさえすれば、インキュベーション時間は、できるだけ短く保持されるのが望ましい。通常、このようなインキュベーションは、20～45、好ましくは、30～45、最も好ましくは36～42である。適切なインキュベーション時間は、一般に、0.5分～10分、好ましくは0.75分～5分、より好ましくは1分～3分の範囲である。酵素インキュベーションについては、1分～2分が最も好ましい範囲である。

20

【0043】

血漿Hcyについて測定された値が血液試料の相対的な血漿含有量に対して補正され得るように（これは、ヘマトクリットは患者によって変化し得るためである）、医師がヘマトクリットについての（又はヘマトクリットを示す）値を入力するか、より好ましくは、アッセイ工程中にヘマトクリットについての（又はヘマトクリットを示す）値を測定しなければならない。このため、試料のヘモグロビンの含有量は、細胞溶解の前、又はより好ましくは細胞溶解の後に分光測光法によって測定され得る。測定が細胞溶解の前に行われる際には、バックグラウンド補正は、例えば、赤外線範囲でなされる分光測光測定を用いて行われるのが好ましい。測定されたヘマトクリットの値が異常に低い、例えば、0.3未満、特に、0.25未満である場合、本発明の方法では、ヘマトクリット値、又はヘマトクリット値が低いことを知らせる警告を（視覚的又は電子的に）提示することも好ましい。必要に応じて、ヘマトクリット値をとにかく提示してもよい。

30

【0044】

ヘモグロビンの含有量は、光散乱、透過率、又は反射率によって測定され得る。ヘモグロビンの含有量は、例えば、光源として緑色又は青色ダイオードを用いて、吸収率によって測定されるのが好ましい。膜上に残存する結合剤の濃度は、一般に、例えば、光源として緑色又は青色ダイオードを用いて、反射率によって測定される。

【0045】

大抵のアッセイについては、アッセイは、例えば、Hcy含有量が既知の標準物質を用いることによって較正されるのが好ましい。用いられる試薬用の較正データには、例えば、カートリッジ又はそのパッケージング上にバー若しくは他の機械読出し可能コードがエンコードされたカートリッジが設けられているのが好ましい。

40

【0046】

本発明の方法は、 $30\mu\text{M}$ までの血漿Hcyレベルを定量化する際に特に効果的である。血漿Hcyが $30\mu\text{M}$ を上回る場合、アッセイ出力は、血漿Hcy含有量が異常に高いことだけを単に示してもよい。通常のレベルは、一般に、 $10\sim15\mu\text{M}$ 以下であり、これより高いレベルでは、例えば、ビタミンB若しくは葉酸の補給又は心臓血管障害の検査のために医師の介入が必要とされる。通常の血漿Hcy値よりも低い値は、一般に問題であるとはみなされず、子供及び総合ビタミン補給をしている患者では、値は、約 $5\mu\text{M}$ 程

50

度であればよい。

【0047】

血液細胞内にも存在する細胞外分析物の血漿含有量を測定するために、全血に対して診断アッセイを実施することは、新規のことであり、本発明のさらなる態様を構成する。この態様によると、本発明は、血漿及び血液細胞中に存在する分析物を分析する方法であって、(a)全血試料の血漿中の前記分析物の含有量を測定すること、(b)前記試料のヘマトクリット又はヘモグロビンの含有量を(好ましくは分光測光法で)測定すること、及び(c)前記測定から前記分析物の血漿濃度を測定することを含む方法を提供する。

【0048】

したがって、工程(a)は、全血試料中の細胞が無傷の状態で前記全血試料の血漿中の分析物を反応させて検出可能な種(産物)を生成すること、細胞内分析物が反応して前記産物を形成しない条件下で前記細胞を溶解すること、及び、前記産物を検出することを含み得る。

【0049】

試薬がビーズの形態で提供される場合、これらの試薬は、乾燥試薬及び選択的に不活性かつ好ましくは非吸湿性のバインダー(例えば、トレハロース又はPEGなどの糖)でコーティング又は含浸された不溶性ビーズであってよい。しかし、ビーズは、試薬及び不活性バインダーを含む水溶性のビーズであるのが好ましい。このようなビーズは、例えば、5~100 μ L(好ましくは10~50 μ L)の緩衝試薬溶液の液滴を凍結させ、次いで、凍結された液滴を凍結乾燥させることによって調製され得る。

【0050】

このような試薬ビーズを診断アッセイ、特に、カートリッジベースのアッセイに用いることは新規であり、本発明さらなる局面を構成する。したがって、本発明の他の局面によると、本発明は、診断用アッセイ、例えば、体液、塊、若しくは組織試料中の分析物のアッセイ用の使い捨てカートリッジであって、少なくとも1つ、好ましくは、少なくとも2つが前記アッセイを実施するための試薬を含む複数のウェルを備えたカートリッジ本体を有し、少なくとも1つのウェルが、溶媒(例えば、水)中で、少なくとも前記1つの試薬を放出するビーズを含んでいることを特徴とするカートリッジを提供する。ビーズ形態で提供可能な試薬としては、例えば、分析物結合剤、競合結合微粒子、酵素(例えば、ヌクレアーゼ、分析物(例えば、ホモシステイン)変換酵素、等)などが挙げられる。このよ

【0051】

これより、本発明の方法及びカートリッジを以下の限定しない実施例及び添付の図面を参照しながらさらに説明する。

【0052】

図1を参照すると、内部に5つのウェル2、3、4、5、6(実施例では、それぞれ、ウェルE、D、C、B、及びAと呼ぶ)と支持脚部7とを備えた透明なプラスチックベース1を有する5ウェルアッセイカートリッジが示されている。ウェル2、3、及び4は、フویل8で密封されている。カートリッジカバー9(一部のみ図示)は、先端にキャピラリーが付いたピペット10及び膜先端12を有する固定ピペット11を備える。ウェル2から4の内容物は、実施例1に記載されるとおりである。図示される矢印は、実施例2に記載される連続した物質の移動を示す。

【0053】

図2は、ウェル2から4の内容物が実施例3に記載されるとおりであることを除いて、図1と類似しており、矢印は、実施例4に記載される連続した物質の転送を示す。

【0054】

図3は、ウェル2から4の内容物が実施例5に記載されるとおりであることを除いて、図1と類似しており、矢印は、実施例6に記載される連続した物質の転送を示す。

【 0 0 5 5 】

図 4 は、ウェル 2 から 4 の内容物が実施例 7 に記載されるとおりであることを除いて、図 1 と類似しており、矢印は、実施例 8 に記載される連続した物質の転送を示す。

【 0 0 5 6 】

図 5 は、ウェル 1 から 5 の内容物が実施例 9 に記載されるとおりであることを除いて、図 1 と類似しており、矢印は、実施例 10 に記載される連続した物質の転送を示す。

【 0 0 5 7 】

図 6 は、ウェル 1 から 5 の内容物が実施例 11 に記載されるとおりであることを除いて、図 1 と類似しており、矢印は、実施例 12 に記載される連続した物質の転送を示す。

【 0 0 5 8 】

図 7 は、ウェル 1 から 5 の内容物が実施例 13 に記載されるとおりであることを除いて、図 1 と類似しており、矢印は、実施例 14 に記載される連続した物質の転送を示す。

【 0 0 5 9 】

図 8 を参照すると、実施例 2 において設定されている物質転送のシーケンスが、図 8 A から図 8 X に示されている。

【 0 0 6 0 】

実施例において、パーセントは、特に規定のない限り、重量に基づいている。

【実施例 1】

【 0 0 6 1 】

図 1 のアッセイカートリッジウェル A

このウェルは、W O 0 0 / 4 0 9 7 3 の実施例 1 に記載されるようにして調製され、U S - A - 5 6 9 1 2 0 7 及び U S - A - 5 6 5 0 3 3 3 に記載されるように結合され、逆円錐形のプラスチックカップ上に真空乾燥された金コロイド（粒子径：約 1 0 0 n m ）と抗 S A H 抗体との複合体を約 2 2 μ g 含む。

ウェル B

このウェルは、約 4 m m $\times$ 8 m m の S u p o r 8 0 0 膜（P a l l - 孔径 0 . 8 μ m ）が先端に付いたピペットを含む。

ウェル C

このウェルは、酵素阻害剤（0 . 2 %メルチオレート（チメロサル））及び溶解剤（1 %トリトン X - 1 0 0 ）を含有する 1 8 5 μ l の緩衝剤（1 0 m M リン酸塩、1 5 0 m M N a C l 、p H 7 . 4 、又は、2 5 m M トリス、1 5 0 m M N a C l 、p H 8 . 1 ）を含む。

ウェル D

このウェルは、0 . 2 7 μ g アデノシン、5 0 μ g 微粒子（S - アデノシル - システインを結合した 1 μ m のラテックス粒子）又は 3 0 0 μ g 微粒子（S - アデノシル - システインを結合した 2 μ m のラテックス粒子）、約 5 ユニットの組換え S A H - ヒドロラーゼ、及び、還元剤（2 3 μ g T C E P （トリス（2 - カルボキシエチル）ホスファイン：H C l ））を含む。これらの内容物の濃縮水溶液がウェルに添加され、次いで真空乾燥されている。

ウェル E

このウェルは、3 0 0 ~ 3 5 0 μ L の緩衝剤（1 0 m M リン酸塩、1 5 0 m M N a C l 、p H 7 . 4 、又は、2 5 m M トリス、1 5 0 m M N a C l 、p H 8 . 1 ）を含む。

【実施例 2】

【 0 0 6 2 】

図 1 / 実施例 1 におけるアッセイ実施

ウェル A に示されるキャピラリー中の血液試料（5 ~ 1 0 μ L ）を、ウェル E から 2 0 0 μ L の緩衝剤を引き込むことによって希釈し、空になるまでウェル D に移す。キャピラリーピペットを用いてウェル C の 8 5 μ L の内容物をウェル A に移して、金複合体を溶解させる。キャピラリーピペットを用いてウェル D の 1 0 0 μ L の内容物をウェル C に移す

10

20

30

40

50

前に、カートリッジを37で3分間インキュベートする。次に、ヘマトクリットレベルを、ウェルCの内容物による緑色又は青色ダイオードからの光の吸光度を検出ことによって測定する。次に、キャピラリーピペットを用いて、ウェルAの60 μ Lの内容物をウェルCに移す。次に、カートリッジを37で1分間インキュベートする。次に、ウェルCの全内容物（選択的に、続いてウェルEに残存する緩衝剤）を先端に膜が付いたピペットに引き込み、バックグラウンドを低減させる。次に、膜の外側に保持される（2回目のインキュベーションで形成される金/ラテックス複合体に対応する）金コロイドを、緑色又は青色ダイオード照射を用いて反射モードで検出する。

【0063】

アッセイは、HCY含有量が既知の標準物質にして較正され、同様に、ヘマトクリット測定（例えば、一連の血液試料についての遠心分離を利用したマトクリット測定）も標準物質に対して較正される。

【実施例3】

【0064】

図2についてのアッセイカートリッジ

ウェルA

約22 μ gの複合体を用いること以外は実施例1と同様。

ウェルB

実施例1と同様。

ウェルC

このウェルは、0.27gアデノシン、20 μ g微粒子（S-アデノシル-システインを結合した1 μ mのラテックス粒子）又は160 μ gの微粒子（S-アデノシル-システインを結合した2 μ mのラテックス粒子）、約5ユニットの組換えSAH-ヒドロラーゼ、及び、還元剤（23 μ gトリス（2-カルボキシエチル）ホスファイン：HCl）を含む。これらの内容物の濃縮水溶液がウェルに添加され、次いで真空乾燥されている。

ウェルD

このウェルは、酵素阻害剤（0.4%メルチオレート（チメロサル））及び溶解剤（2%のトリトンX-100）を含有する、225 μ Lの緩衝剤（10mMリン酸塩、150mM NaCl、pH7.4、又は、25mMトリス、150mM NaCl、pH8.1）を含む。

ウェルE

このウェルは、350 μ Lの緩衝剤（10mMリン酸塩、150mM NaCl、pH7.4、又は、25mMトリス、150mM NaCl、pH8.1）を含む。

【実施例4】

【0065】

図2/実施例3におけるアッセイの実施

キャピラリーピペットに引き込まれた血液試料（5~10 μ L）を、160 μ Lの緩衝剤をウェルEからキャピラリーピペットに引き込むことによって希釈する。次に、キャピラリーピペットの内容物をウェルCに排出する。キャピラリーピペットを用いて85 μ Lの緩衝剤をウェルE（又はウェルD）からウェルAに移す。次に、カートリッジを37で3分間インキュベートする。次に、キャピラリーピペットを用いて、ウェルDの40 μ Lの内容物をウェルCに移す。次に、ウェルCの内容物を用いて、ヘマトクリット値を実施例2のように測定する。キャピラリーピペットを用いて、ウェルAの60 μ Lの内容物をウェルCに移し、カートリッジを37で1分間インキュベートする。ウェルCの内容物（選択的に、続いてウェルD及び/又はEの残りの内容物）を先端に膜が付いたピペットで引き込み、膜の外側に保持された金コロイドを実施例2のように測定する。較正を実施例2のように行う。

【実施例5】

【0066】

図3におけるアッセイカートリッジ

ウェル A

実施例 1 と同様。

ウェル B

実施例 1 と同様。

ウェル C

このウェルは、 $20\text{ }\mu\text{g}$ 微粒子 (S - アデノシル - システインを結合した $1\text{ }\mu\text{m}$ のラテックス粒子) 又は $160\text{ }\mu\text{g}$ 微粒子 (S - アデノシル - システインを結合した $2\text{ }\mu\text{m}$ のラテックス粒子)、 $75\text{ }\mu\text{g}$ メルチオレート (チメロサル)、及び $750\text{ }\mu\text{g}$ トリトン X - 100 を含む。これらの内容物の濃縮水溶液がウェルに添加され、次いで真空乾燥されている。

10

ウェル D

このウェルは、 $0.27\text{ }\mu\text{g}$ アデノシン、5 ユニットの組換え SAH - ヒドロラーゼ、及び $23\text{ }\mu\text{g}$ TCEP : HCl を含む。これらの内容物の濃縮水溶液がウェルに添加され、次いで真空乾燥されている。

ウェル E

このウェルは、 $350\text{ }\mu\text{L}$ の緩衝剤 (10 mM リン酸塩、 150 mM NaCl、pH 7.4、又は、 25 mM トリス、 150 mM NaCl、pH 8.1) を含む。

【実施例 6】【0067】図 3 / 実施例 5 におけるアッセイの実施

20

キャピラリーピペット中の血液試料 ($5\sim 10\text{ }\mu\text{L}$) を、ウェル E から $175\text{ }\mu\text{L}$ の緩衝剤を引き込むことによって希釈し、ウェル D に排出する。次に、キャピラリーピペットを用いて $80\text{ }\mu\text{L}$ の緩衝剤をウェル E からウェル A に移す。次に、カートリッジを 37 で 3 分間インキュベートする。次に、キャピラリーピペットを用いてウェル D の $75\text{ }\mu\text{L}$ の内容物をウェル C に移す。次に、ウェル C の内容物を用いて、ヘマトクリット値を実施例 2 のように測定する。次に、キャピラリーピペットを用いてウェル A の $50\text{ }\mu\text{L}$ の内容物をウェル C に移す。次に、カートリッジを 37 で 1 分間インキュベートする。次に、ウェル C の内容物 (選択的に、続いてウェル E の内容物) を先端に膜が付いたピペット内に引き込み、次に、膜の外側に保持された金コロイドを実施例 2 のように測定する。較正を実施例 2 のように行う。

30

【実施例 7】【0068】図 4 におけるアッセイカートリッジウェル A

実施例 3 と同様。

ウェル B

実施例 1 と同様。

ウェル C

このウェルの内容物は、 $4.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ アデノシン、 $330\text{ }\mu\text{g/mL}$ 微粒子 (S - アデノシル - システインを結合した $1\text{ }\mu\text{m}$ のラテックス粒子) 又は 2.7 mg/mL (S - アデノシル - システインを結合した $2\text{ }\mu\text{m}$ のラテックス粒子)、 80 U/mL 組換え SAH - ヒドロラーゼ、及び $380\text{ }\mu\text{g/mL}$ TCEP : HCl を含有する $60\text{ }\mu\text{L}$ の水性組成物である。

40

ウェル D

このウェルは、 0.4% メルチオレート (チメロサル) 及び 2% トリトン X - 100 を含有する $225\text{ }\mu\text{L}$ の緩衝剤 (10 mM リン酸塩、 150 mM NaCl、pH 7.4、又は、 25 mM トリス、 150 mM NaCl、pH 8.1) を含む。

ウェル E

このウェルは、 $285\text{ }\mu\text{L}$ の緩衝剤 (10 mM リン酸塩、 150 mM NaCl、pH 7.4、又は、 25 mM トリス、 150 mM NaCl、pH 8.1) を含む。

50

【実施例 8】

【0069】

図 4 / 実施例 7 におけるアッセイの実施

キャピラリーピペット中の血液試料 (5 ~ 10 μ L) を、ウェル E から 100 μ L の緩衝剤を引き込むことによって希釈し、ウェル C に排出する。次に、キャピラリーピペットを用いて 85 μ L の緩衝剤をウェル E (ウェル D) からウェル A に移す。次に、カートリッジを 37 で 3 分間インキュベートする。次に、40 μ L のウェル D の内容物をウェル C に移し、次いで、ヘマトクリットを実施例 2 のように測定する。次に、キャピラリーピペットを用いてウェル A の 60 μ L の内容物をウェル C に移し、カートリッジを 37 で 1 分間インキュベートする。次に、ウェル C の内容物 (選択的に、続いてウェル D 及び / 又は E の内容物) を先端に膜が付いたピペット内に引き込み、次に、膜の外側に保持された金コロイドを実施例 2 のように測定する。較正を実施例 2 のように行う。

10

【実施例 9】

【0070】

図 5 におけるアッセイカートリッジウェル A

このウェルは、カートリッジ 1 内に配置されるとき先端にキャピラリーが付いたピペット 10 の先端から過剰な試料を除去するように作用する吸着ワイパー 15 を含む。ピペット 10 の本体内にビーズ 16 及び 17 を含む試薬が配置される。ビーズ 16 は、65 μ g の T E C P とともに約 5 ユニットの r S A H アーゼを含む。ビーズ 17 は、40 μ g の M g C l₂ とともに約 0.1 ユニットのヌクレアーゼ (例えば、M e r c k からのベンゾナーゼ) を含む。両ビーズもまた、バインダーとしてトレハロースを含む。

20

ウェル B

このウェルは、ピペットの本体内に 120 μ g N - エチル - マレイミドを含む試薬含有ビーズ 18 を含むこと以外は実施例 1 に記載されたとおりである。

ウェル C

このウェルは、2 つの試薬含有ビーズ 19 及び 20 を含む。ビーズ 19 は、実施例 1 においてウェル A について記載された約 100 μ g の金複合体を含む。ビーズ 20 は、0.12 μ g の微粒子 (実施例 1 においてウェル D について記載された S - アデノシル - システインを結合した 1 ~ 2 μ m、好ましくは 1.6 μ m のラテックス粒子) を含む。

30

ウェル D

このウェルは、200 μ L の緩衝剤 (10 mM リン酸塩、150 mM N a C l、pH 7.4、又は、25 mM トリス、150 mM N a C l、pH 8.1) 中に 0.27 μ g アデノシンを含む。

ウェル E

このウェルは、ウェル D の緩衝剤中に 300 μ L の 0.4 重量 % S D S を含む。

【実施例 10】

【0071】

図 5 / 実施例 9 におけるアッセイの実施

ウェル A において示されるキャピラリー中 4.5 μ L の血液試料 (3 ~ 10 μ L) とともに 200 μ L の緩衝剤 (125 ~ 300 μ L) をウェル D から先端にキャピラリーが付いたピペット内に引き込み、ビーズ 16 及び 17 を溶解させる。内容物をウェル D に流し戻し、37 で 1 分間 (3 分まで) インキュベートする。

40

【0072】

このインキュベーション中、200 μ L の界面活性剤溶液 (125 ~ 300 μ L) をウェル E から先端に膜が付いたピペットに引き込み、ビーズ 18 を溶解させる。次に、内容物をウェル E に流し戻す。

【0073】

次いで、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて 100 μ L の界面活性剤及び阻害剤溶液 (25 ~ 200 μ L) をウェル E からウェル D に移す。赤血球溶解後、ヘマトク

50

リットを実施例 2 のようにウェル D 内で測定する。

【 0 0 7 4 】

次に、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いてウェル D 内の $200\ \mu\text{L}$ の混合物 ($150 \sim 275\ \mu\text{L}$) をウェル D からウェル C に移し、ビーズ 19 及び 20 を溶解させ、混合物を 1 分間 (3 分まで) インキュベートする。

【 0 0 7 5 】

次に、ウェル C の全内容物、及び、選択的に、続いてウェル E 内の残りの緩衝剤を、先端に膜が付いたピペット内に引き込む。膜の外側に保持された (2 回目のインキュベーションで形成された金 / ラテックス複合体に対応する) 金コロイドを、緑色又は青色ダイオード照射を用いて反射モードで検出する。

10

【 0 0 7 6 】

アッセイを、Hcy 含有量が既知の標準物質を用いて校正し、同様に、ヘマトクリットの測定 (例えば、一連の血液試料についての遠心分離を利用したマトクリット測定) も標準物質に対して校正する。

【 0 0 7 7 】

ブラケット内の体積又は量の範囲は、移される量に対して自由に限定される。しかし、正確にアッセイ及び校正を実施するためには、これらの範囲内の所定値を用いるべきである。

【実施例 11】

【 0 0 7 8 】

20

図 6 におけるアッセイカートリッジ

ウェル A

ビーズ 17 を省略すること以外は実施例 9 に記載されたとおりである。

ウェル B

実施例 9 に記載されたとおりである。

ウェル C

実施例 9 に記載されたとおりである。

ウェル D

0.1 ユニットのヌクレアーゼ (実施例 9 のウェル A の記載と同様) 及び $40\ \mu\text{g MgCl}_2$ を含むこと以外は実施例 9 に記載されたとおりである。

30

ウェル E

実施例 9 に記載されたとおりである。

【実施例 12】

【 0 0 7 9 】

図 6 / 実施例 11 におけるアッセイの実施

アッセイの工程は、実施例 10 に記載されたとおりに実施される。

【実施例 13】

【 0 0 8 0 】

図 7 におけるアッセイのカートリッジ

ウェル A

40

先端にキャピラリーが付いたピペット及びその内部のビーズ (16) は、実施例 11 に記載されたとおりである。ウェルのベースは、 $80 \sim 200\ \mu\text{g}$ (例えば、 $120\ \mu\text{g}$) の N-エチル-マレイミドを含有する乾燥阻害剤組成物を含む (実施例 1 に記載された) 挿入物を含む。

ウェル B

実施例 1 に記載されたとおりである。

ウェル C

実施例 9 に記載されたとおりである。

ウェル D

実施例 11 に記載されたとおりである。

50

ウェル E

実施例 9 に記載されたとおりである。

【実施例 14】

【0081】

図 7 / 実施例 13 におけるアッセイの実施

試料、酵素、及び還元剤をウェル D に移し、そこで実施例 10 のようにインキュベートする。

【0082】

このインキュベーション中、先端にキャピラリーが付いたピペットを用いて 50 μ L の界面活性剤溶液 (40 ~ 100 μ L) をウェル E からウェル A に移す。次に、この混合物をウェル E に戻す。

【0083】

次に、界面活性剤及び阻害剤を実施例 10 のようにウェル D に移し、実施例 10 のようにアッセイを続ける。

【実施例 15】

【0084】

試薬ビーズ

実施例 9 から 14 で用いられるビーズを以下のように調製する。

【0085】

一又は複数の試薬、トレハロース、ポリエチレングリコール (PEG)、25 mM トリス緩衝剤中のウシ血清アルブミン (BSA)、150 mM NaCl、pH 7.5 の水溶液を、ピペットを用いて冷えた (-50 より低い) 金属プレートに滴下する。凍結した液滴を凍結乾燥させ、15 重量%トレハロース、0.5 重量% PEG、及び 0.1 重量% BSA を含有するビーズを得る。液滴のサイズは、5 ~ 100 μ L が都合よく、10 ~ 50 μ L が好ましい。あるいは、溶液を液体窒素に滴状添加して、その後、凍結した液滴を収集して凍結乾燥させてもよい。

【図面の簡単な説明】

【0086】

【図 1】図 1 は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図 2】図 2 は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図 3】図 3 は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図 4】図 4 は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図 5】図 5 は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図 6】図 6 は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図 7】図 7 は、本発明によるアッセイ方法の実施における物質移動段階を示す、本発明によるカートリッジの概略図である。

【図 8 A】図 8 A は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 B】図 8 B は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 C】図 8 C は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 D】図 8 D は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 E】図 8 E は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 F】図 8 F は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 G】図 8 G は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 H】図 8 H は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 I】図 8 I は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

10

【図 8 J】図 8 J は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 K】図 8 K は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 L】図 8 L は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 M】図 8 M は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 N】図 8 N は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

20

【図 8 O】図 8 O は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 P】図 8 P は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 Q】図 8 Q は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 R】図 8 R は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 S】図 8 S は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

30

【図 8 T】図 8 T は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 U】図 8 U は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

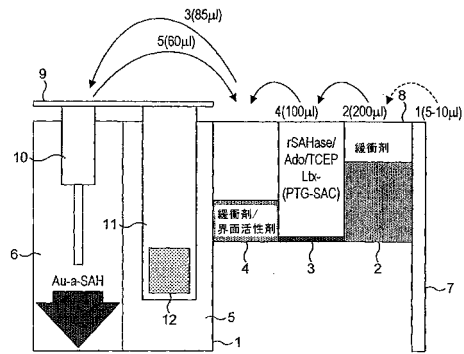
【図 8 V】図 8 V は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

【図 8 W】図 8 W は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

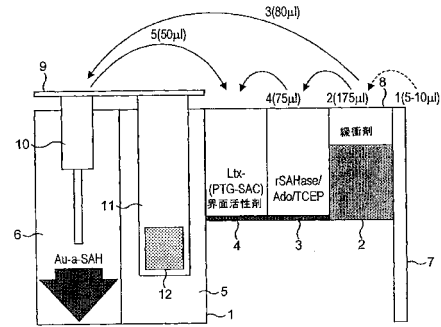
【図 8 X】図 8 X は、図 1 に示される段階におけるカートリッジの成分の相対的な位置を示す概略図である。

40

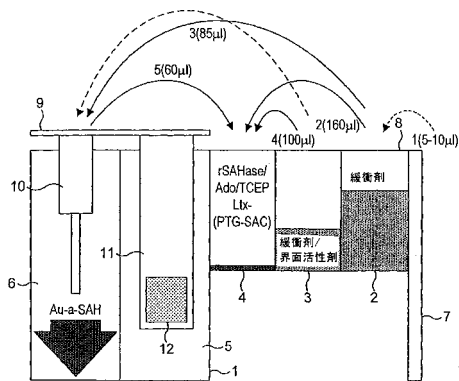
【図 1】



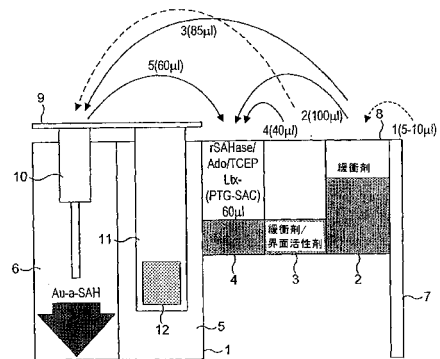
【図 3】



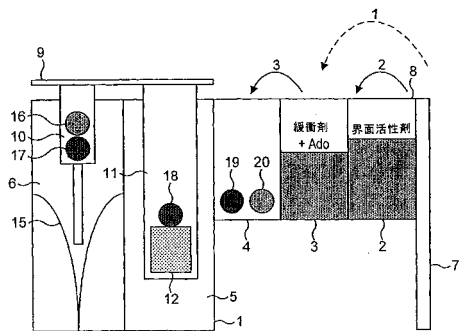
【図 2】



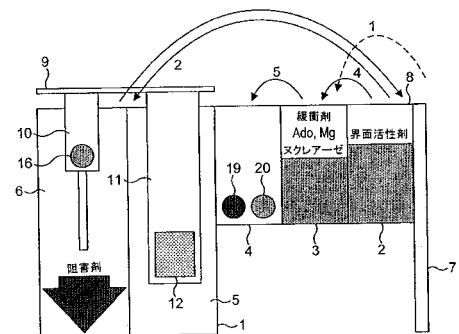
【図 4】



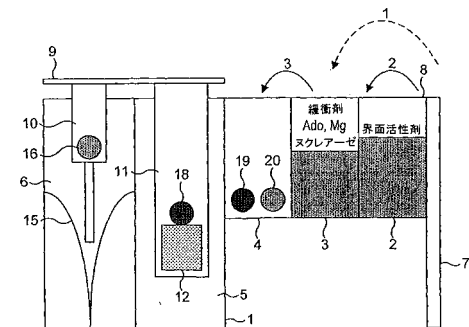
【図 5】



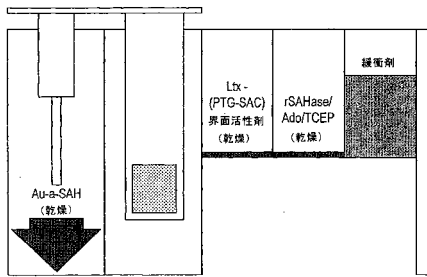
【図 7】



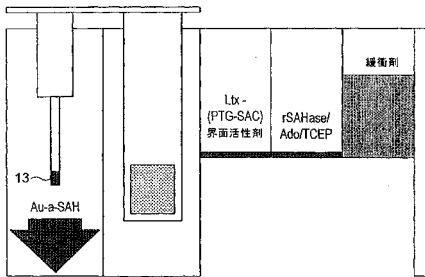
【図 6】



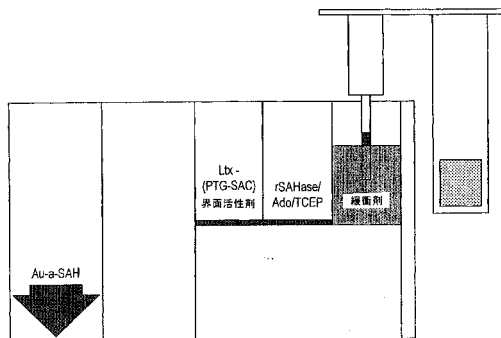
【図 8 A】



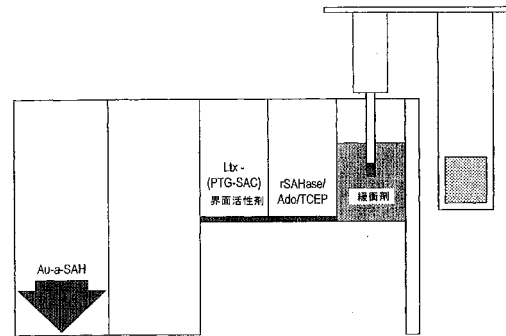
【図 8 B】



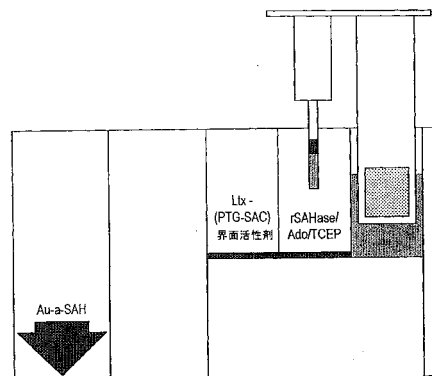
【図 8 D】



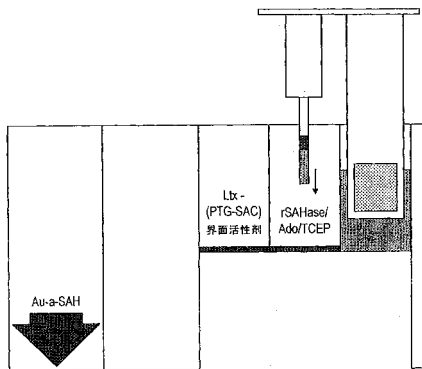
【図 8 C】



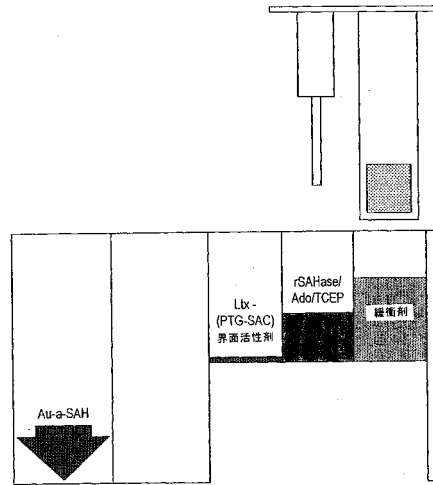
【図 8 E】



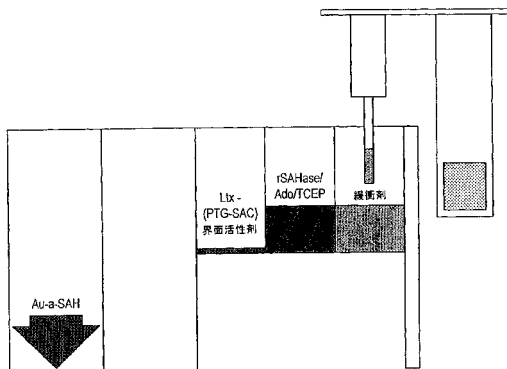
【図 8 F】



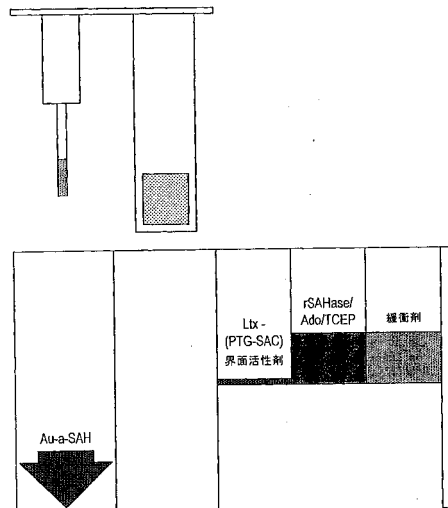
【図 8 G】



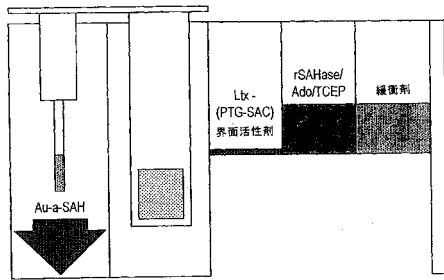
【図 8 H】



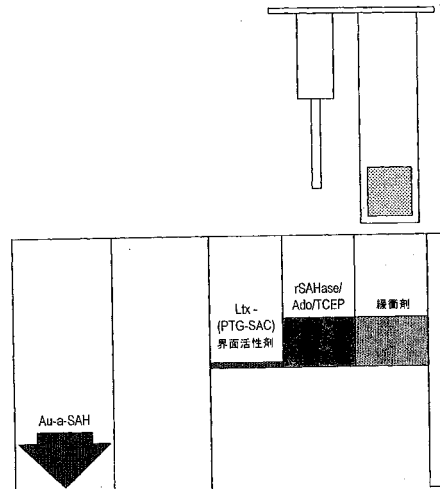
【図 8 I】



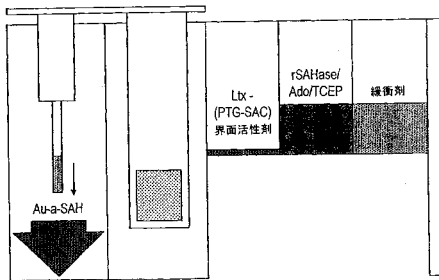
【図 8 J】



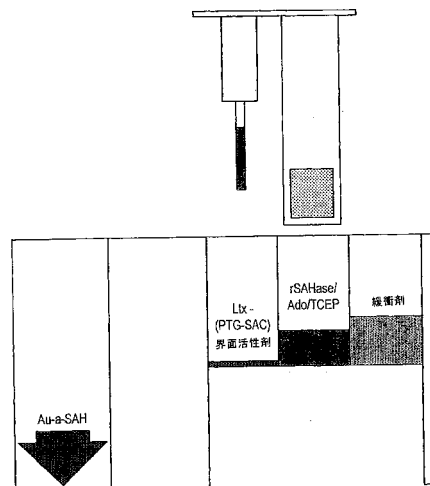
【図 8 L】



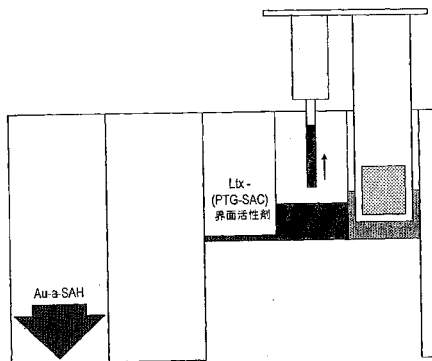
【図 8 K】



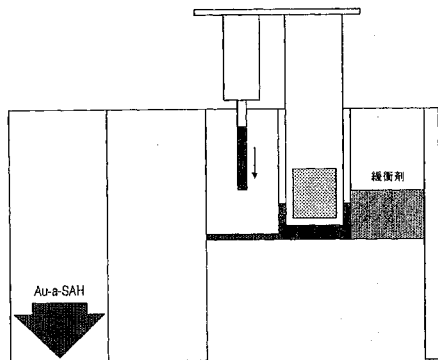
【図 8 N】



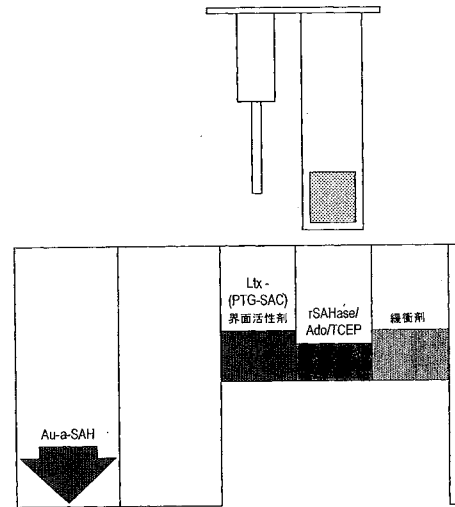
【図 8 M】



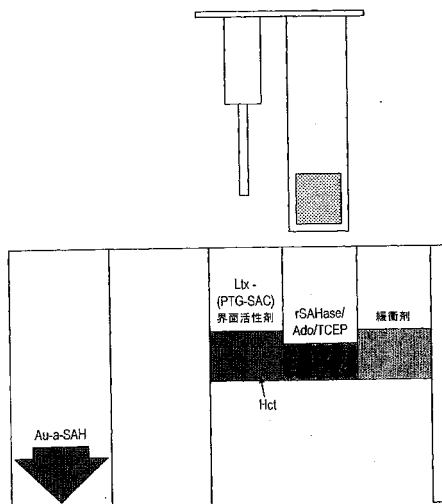
【図 8 O】



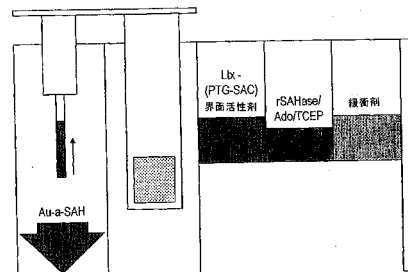
【図 8 P】



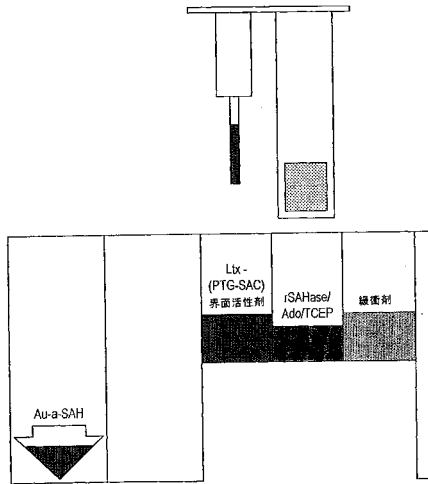
【図 8 Q】



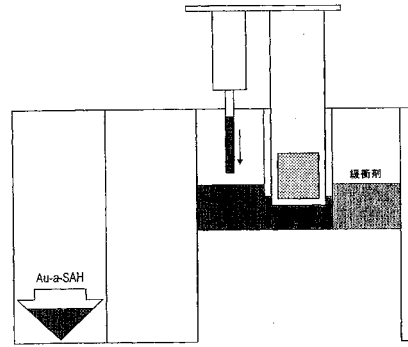
【図 8 R】



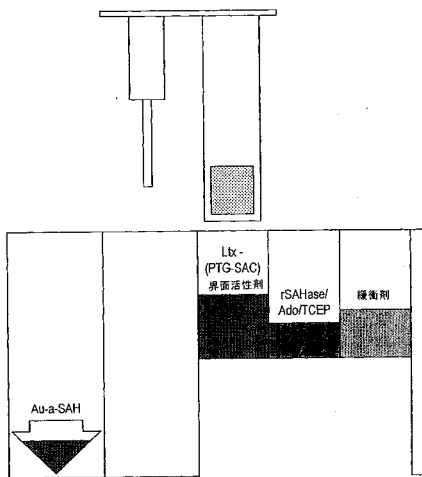
【図 8 S】



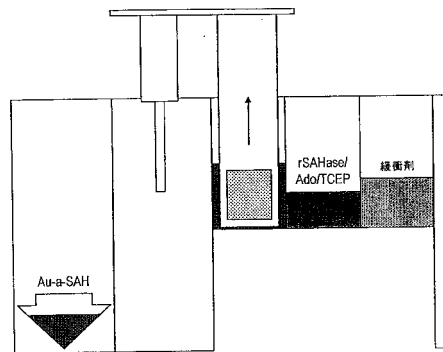
【図 8 T】



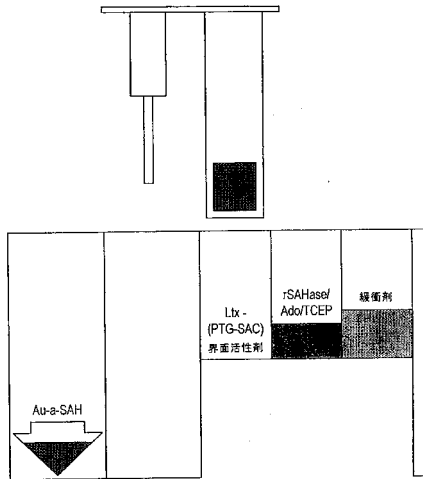
【図 8 U】



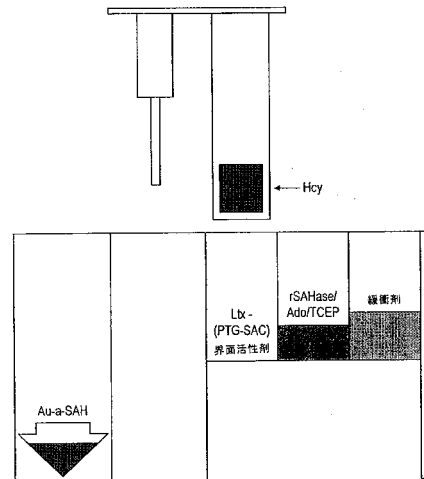
【図 8 V】



【図 8 W】



【図 8 X】



フロントページの続き

(72)発明者 ノードヘイ、アーン、クリスティアン
ノールウェー エヌ - 0 5 1 0 オスロ ウルフェンファイエン 87、アクシス - シールド エ
イエスエイ内

審査官 廣田 健介

(56)参考文献 特開昭59 - 468371 (JP, A)
特開2004 - 203390 (JP, A)
特表平11 - 508693 (JP, A)
米国特許第06096563 (US, A)
特開2002 - 107365 (JP, A)
特表2004 - 531725 (JP, A)
特表2003 - 530574 (JP, A)
国際公開第00 / 040973 (WO, A1)
Frank Frantzen et al., Enzyme conversion immunoassay for determining total homocysteine in plasma or serum, Clinical Chemistry, 1998年, 44(2), 311-316

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

专利名称(译)	分析方法		
公开(公告)号	JP4820827B2	公开(公告)日	2011-11-24
申请号	JP2007556660	申请日	2006-02-23
[标]申请(专利权)人(译)	阿克西斯 - 希尔德公司		
申请(专利权)人(译)	轴 - 盾Eiesuei		
当前申请(专利权)人(译)	轴 - 盾Eiesuei		
[标]发明人	フランツェンフランク ファーレンアーンルードヴィッグ ノードハイアーンクリスティアン		
发明人	フランツェン、フランク ファーレン、アーン、ルードヴィッグ ノードハイ、アーン、クリスティアン		
IPC分类号	G01N33/53 B01L3/00 B01L3/02 G01N33/68 G01N35/02 G01N35/10		
CPC分类号	G01N33/6815 B01L3/021 B01L3/502 B01L2200/10 B01L2300/0681 G01N35/026 G01N35/1016 G01N35/1079 G01N2035/1032 G01N2035/1039		
FI分类号	G01N33/53.K		
优先权	2005003836 2005-02-24 GB		
其他公开文献	JP2008532006A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明提供了基于盒的同型半胱氨酸的自动化测定。[选图]图1

【 図 1 】

