

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2017-62258

(P2017-62258A)

(43) 公開日 平成29年3月30日(2017.3.30)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 O 1 K
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/543	5 4 1 Z
	GO 1 N 33/543	5 2 1
	GO 1 N 33/531	A

審査請求 有 請求項の数 21 O L (全 21 頁)

(21) 出願番号 特願2016-234649 (P2016-234649)
 (22) 出願日 平成28年12月2日 (2016.12.2)
 (62) 分割の表示 特願2015-514919 (P2015-514919)
 の分割
 原出願日 平成25年5月31日 (2013.5.31)
 (31) 優先権主張番号 10-2012-0058708
 (32) 優先日 平成24年5月31日 (2012.5.31)
 (33) 優先権主張国 韓国 (KR)

(71) 出願人 514305356
 エスディー バイオセンサー インコーポ
 レイテッド
 大韓民国 16690 キョンギド, ス
 ウォンシ, ヨントング, トギョンデロ
 , 1556 ボンギル, 16, デジタ
 ル エンパイア シードン, 4 アン
 ド 5 フロアー
 (74) 代理人 110001427
 特許業務法人前田特許事務所
 (72) 発明者 チェ ヒョンギル
 大韓民国 463-030 キョンギド,
 ソンナムシ, プンダング, プンダンドン,
 69, ジャンガン タウン, 105-10
 4

最終頁に続く

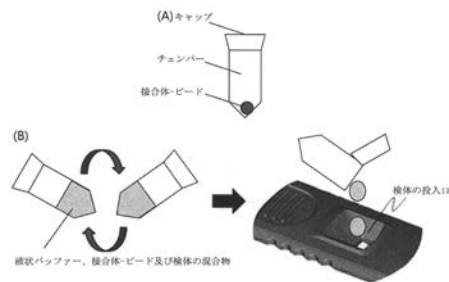
(54) 【発明の名称】 免疫分析用キット及びこれを利用する分析法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】凍結乾燥接合体構造物及び免疫クロマトグラ
 フィー用ストリップを含む免疫分析用キットを提供する。

【解決手段】免疫クロマトグラフィー用の凍結乾燥接
 合体構造物、凍結乾燥接合体構造物及び免疫クロマトグラ
 フィー用ストリップを備えた免疫分析用キット及び免疫
 分析用キットを使用して検体内の分析物質を定性又は定
 量分析する方法。

【選択図】 図5



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫クロマトグラフィー用の凍結乾燥接合体構造物として、信号検出のための第 1 標識物質及び分析物質と反応する第 1 リガンドを含む第 1 接合体を含み、

前記第 1 標識物質と第 1 リガンドは、物理的又は化学的に連結されており、前記凍結乾燥接合体構造物は、既知濃度の前記第 1 接合体が、溶媒内に分散されている分散液を 5 μ L 以上 30 μ L 以下の均一体積の滴形態として急速冷凍させた後、凍結乾燥して溶媒を除去して形成され、急速冷凍された滴から溶媒が占める空間は、溶媒除去によって孔隙を形成し、

前記凍結乾燥接合体構造物は、70%以上90%以下の孔隙率を有し、

前記第 1 標識物質は、ラテックス粒子、金粒子、着色ポリスチレン微細粒子、酵素、蛍光性染料及び伝導性高分子からなる群より選択されることを特徴とする凍結乾燥接合体構造物。

【請求項 2】

信号検出のための第 2 標識物質及びレポーター分子と反応する第 2 リガンドを含む第 2 接合体をさらに含む、前記第 2 標識物質と第 2 リガンドは、物理的又は化学的に連結されており、

前記第 2 標識物質は、前記第 1 標識物質と同一又は相異なるものである請求項 1 に記載の凍結乾燥接合体構造物。

【請求項 3】

前記第 1 リガンドは、抗原、抗体、受容体又は前記受容体のリガンドである請求項 1 に記載の凍結乾燥接合体構造物。

【請求項 4】

前記急速冷凍は、気化点が -270 ~ -180 である液体に滴下させて行う請求項 1 に記載の凍結乾燥接合体構造物。

【請求項 5】

前記液体は、液体窒素又は液体ヘリウムである請求項 4 に記載の凍結乾燥接合体構造物。

【請求項 6】

前記急速冷凍は、選択的にテイスペンサーを用いて一定の体積で滴下させて行うことを特徴とする請求項 1 に記載の凍結乾燥接合体構造物。

【請求項 7】

前記免疫クロマトグラフィーは、定性又は定量分析用である請求項 1 に記載の凍結乾燥接合体構造物。

【請求項 8】

前記凍結乾燥接合体構造物は、即時又は 5 秒以内に緩衝液に完全に溶解される請求項 1 に記載の凍結乾燥接合体構造物。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の凍結乾燥接合体構造物及び免疫クロマトグラフィー用ストリップを含む免疫分析用キット。

【請求項 10】

前記凍結乾燥接合体構造物を溶解させる緩衝液をさらに含む請求項 9 に記載のキット。

【請求項 11】

前記緩衝液は、接合体の溶解のための溶媒又はクロマトグラフィーの移動相として作用するものである請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

前記緩衝液は、追加的に検体の希釈又は血球成分の溶解の機能を有するものである請求項 10 に記載のキット。

【請求項 13】

信号検出のための第 2 標識物質及びレポーター分子と反応する第 2 リガンドを含む第 2

10

20

30

40

50

接合体を含む凍結乾燥接合体構造物をさらに含み、

前記第 2 標識物質と第 2 リガンドは、物理的又は化学的に連結されており、

前記接合体構造物は、前記第 2 接合体が、溶媒内に分散されている分散液を滴形態として急速冷凍させた後、凍結乾燥して溶媒を除去して形成され、急速冷凍された滴から溶媒が占める空間は、溶媒除去によって孔隙を形成することを特徴とする請求項 9 に記載のキット。

【請求項 14】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、検体内の分析物質を捕獲するための検査線が形成された多孔性メンブレンパッド及び前記多孔性メンブレンパッドの一末端に検体移送のための駆動力を提供する吸収パッドを備えるものである請求項 9 に記載のキット。

10

【請求項 15】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、下部に固体支持体をさらに含むものである請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、追加的にケース内に固定されており、

下部のケースには、ガイド及びストリップ支持部が備わっており；

上部のケースには、検体の投入口及び検査線に相応する位置に結果確認窓を含む請求項 14 に記載のキット。

【請求項 17】

前記検査線は、検体内の分析物質に特異的に結合する第 3 リガンドが固定されている請求項 14 に記載のキット。

20

【請求項 18】

第 1 リガンドを通じて第 1 標識物質と結合した分析物質が、第 3 リガンドによって検査線に捕獲され、検査線上の第 1 標識物質からの信号を測定して検体内の分析物質の有無、量又はいずれも測定できるものである請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、検査線の前又は後に、検体の展開を確認できる対照線をさらに含み、前記対照線は、レポーター分子が固定されているものである請求項 14 に記載のキット。

【請求項 20】

請求項 9 に記載された免疫分析用キットを用いて、検体内の分析物質を定性又は定量分析する方法として、

30

接合体の構造物に緩衝液及び検体を同時に又は順次に加えて、接合体構造物の溶解及び接合体と検体の反応を同時に又は順次に行う段階；

前段階の結果物を免疫クロマトグラフィー用ストリップにローディングして展開させる段階；及び

検査線から第 1 標識物質の信号の有無及び強さを確認する段階を含むことを特徴とする分析方法。

【請求項 21】

前記検体は、全血、血清又は血漿であり、分析物質は、糖化血色素である請求項 20 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫クロマトグラフィー凍結乾燥接合体構造物；前記凍結乾燥接合体構造物及び免疫クロマトグラフィー用ストリップを含む免疫分析用キット及び前記免疫分析用キットを使用して検体内の分析物質を定性又は定量分析する方法に関するものである。

【背景技術】

【0002】

50

ラピッドテスト (r a p i d t e s t) 法として知られる免疫クロマトグラフィー分析法は、抗原 抗体反応を利用して、微量の分析物質 (a n a l y t e) を短時間で定性及び定量的に分析できる方法として、各種の疾病の診断又は検査をはじめ、医学、農業、畜産業、食品、軍事、環境などの多様な分野において使用されている。このような、免疫クロマトグラフィー分析には、検出しようとする分析物質と反応して変化を表すことのできる反応物質を含む分析ストリップ (a s s a y s t r i p) 又は前記分析ストリップをプラスチックケースに装着したデバイス形態の分析装置が一般的に使用されている。図 1 は、通常的な免疫クロマトグラフィー分析に使用される分析ストリップの断面図である。図 1 に示すように、通常的な分析ストリップは、液状検体を収容する検体パッド、肉眼又はセンサーを利用して感知できるシグナルを発生させる標識を抗原、抗体などのリガンドに接合させた接合体 (c o n j u g a t e) を含有する接合体パッド、検体中の分析物質及び/又は前記接合体と特異的に結合する結合体 (抗体又は抗原) を固定させた多孔性メンブレンパッド及び液状検体を最終的に収容する吸湿パッドからなり、このような機能性パッドは、前記並べた順に一部重畳した形態で連結されて固体支持体上に付着され連続的に並べられる。前記分析ストリップが、プラスチックケース内部に装着されて使われる場合、ケースの上部には、検体パッドの位置に検体を滴下するための検体の投入口が、多孔性メンブレンパッドの結合体が固定された位置には、検査結果を確認するための結果確認窓が形成される。このように、分析ストリップを利用した免疫クロマトグラフィー分析法において、検体パッドに液状検体を滴下すると、液状検体は、毛細管現象によって接合体パッド及び多孔性メンブレンパッドを通じて移動し、最終的に吸収パッドに収容される。この際、前記接合体パッドに含有されていた接合体も液状検体と共に移動し、検体中に分析しようとする物質が存在すると、接合体が分析物質を媒介して多孔性メンブレンパッドに固定された結合体と結合したり (通常、「サンドイッチ (s a n d w i c h) 反応」という) 接合体と分析物質が競争的に結合体と結合することで、 (通常、「競争 (c o m p e t i t i o n) 反応」という) 検体中の分析物質が存在するかどうかを肉眼で又はセンサーを利用して感知することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 3 】

しかしながら、このような通常的な分析ストリップは、接合体パッドに乾燥された形態で固定されている接合体が毛細管現象によって移動する液状検体と混合される時、接合体との結合が均一にならなくて、個別分析ストリップ毎に偏差が生じることがあり、従って、定量的検体分析の正確度と再現性が低下する問題点がある。

【 0 0 0 4 】

また、生化学的分析に主に使用される液状試薬を用いる方法は、ウェル (W e l l) 内で液状試薬を一定の比率で混ぜることで、検体分析の正確度と再現性は改善できるが、抗原-抗体を含む液状試薬の場合、長期保管時、抗原-抗体反応の親和力 (a f f i n i t y) が減少したり、抗原、抗体自体が変性するなどの安定性に問題がある。これによって、液状試薬を冷蔵、冷凍保管することで、長期間の安定性を向上させることができるが、ラピッドテストのような現場診断用 (p o i n t o f c a r e t e s t i n g) としての目的に照らして、冷蔵、冷凍保管は、様々な測定現場で使用し難いという短所がある。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 5 】

本発明の一つの目的は、免疫クロマトグラフィー用の凍結乾燥接合体構造物として、信号検出のための第 1 標識物質及び分析物質と反応する第 1 リガンドを含む第 1 接合体を含み、前記第 1 標識物質と第 1 リガンドは、物理的又は化学的に連結されており、前記接合体構造物は、既知濃度の前記第 1 接合体が溶媒内に分散されている分散液を均一体積の滴形態として急速冷凍させた後、凍結乾燥して溶媒を除去して形成され、急速冷凍された滴から溶媒が占める空間は、溶媒除去によって孔隙を形成することが特徴である凍結乾燥接合体構造物を提供することである。

【 0 0 0 6 】

本発明の他の目的は、前記凍結乾燥接合体構造物及び免疫クロマトグラフィー用ストリップを含む免疫分析用キットを提供することである。

【0007】

本発明の他の目的は、前記免疫分析用キットを使用して検体内の分析物質を定性又は定量分析する方法として、接合体構造物に緩衝液及び検体を同時に又は順次に加えて、接合体構造物の溶解及び接合体と検体の反応を同時に又は順次に行う段階；前段階の結果物を免疫クロマトグラフィー用ストリップにローディングして展開させる段階；及び検査線から第1標識物質の信号の有無及び強さを確認する段階を含むことを特徴とする方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、接合体の安定性を高めて検体分析の正確度と再現性を向上させるために、鋭意研究し努力した結果、長期間の保管の安定性に優れて、前処理装置を利用して検体を一定量の接合体と均一に反応させて分析装置に滴下させることによって、定量測定に適した均一な大きさ及び濃度の凍結乾燥接合体-ビード及びこれを含む検体前処理装置を開発することによって、本発明を完成した。

【発明の効果】

【0009】

本発明によって別途製造された凍結乾燥接合体構造物を利用して、外部から検体と均一に反応させてクロマトグラフィーに適用することで、既存の接合体を吸着させて製造した接合体パッドを含む免疫クロマトグラフィー用ストリップを利用して分析する方法より高い再現性及び濃度に対する線型性を持って定量分析を行うことができる。

【0010】

また、本発明の凍結乾燥接合体構造物は、追加的なキャップを含むチェンバーに収容されて提供することができるため、汚染なく保管が可能で、携帯が容易であり、前記凍結乾燥接合体構造物は、素早く均一に溶解できるため、緩衝液及び検体を直接混合して即時反応させて免疫分析用キットとして分析が可能であるため、現場診断用分析に適している。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1】図1は、通常の免疫クロマトグラフィー分析に使用される分析ストリップの断面を示す図である。

【図2】図2は、通常の免疫分析装置の分解斜視図である。

【図3】図3は、本発明の一実施例による免疫分析装置の分解斜視図である。

【図4】図4は、本発明の一実施例による凍結乾燥接合体-ビードの形態を示す図である。

【図5】図5は、本発明の一実施例による検体の前処理装置の斜視図及び免疫分析方法を示す図である。(A)は、検体前処理装置として凍結乾燥接合体-ビードを含むキャップが装着されたチェンバーを示す図である。(B)は、前記検体前処理装置を利用して免疫分析する方法を示す図である。

【図6】図6は、本発明の実施例及び比較例による免疫分析装置を用いた糖化血色素の定量分析結果を比較して示した図である。ひし形は、本発明の実施例による免疫分析装置の測定値を、四角形は、従来免疫分析装置と類似した比較例による測定値を示す。

【図7】図7は、本発明の一実施例による凍結乾燥接合体の滴体積による糖化血色素の測定値の変化を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0012】

前記の目的を達成するための一態様として、本発明は、免疫クロマトグラフィー用の凍結乾燥接合体構造物として、信号検出のための第1標識物質及び分析物質と反応する第1リガンドを含む第1接合体を含み、前記第1標識物質と第1リガンドは、物理的又は化学的に連結されており、前記接合体構造物は、既知濃度の前記第1接合体が溶媒内に分散さ

10

20

30

40

50

れている分散液を均一体積の滴形態として急速冷凍させた後、凍結乾燥して溶媒を除去し形成されたもので、急速冷凍された滴から溶媒が占める空間は、溶媒除去によって孔隙を形成することを特徴とする凍結乾燥接合体構造物を提供する。

【0013】

本発明の用語「免疫クロマトグラフィー」は、抗原-抗体反応に基づいた免疫反応の原理と検体及び試薬が移動相によって媒質に沿って移動するクロマトグラフィーの原理を結合させた分析方法である。簡略に、多孔性膜(membrane)に分析しようとする抗体又は抗原を改めて分注させて固定し膜の一末端から前記固定しておいた抗体又は抗原に向かって検体を展開させ、検体中の抗原又は抗体との反応を観察することである。一般的な意味の免疫反応は、抗原-抗体の反応を意味するが、本発明では、広義的に、抗原-抗体の反応以外にも、お互いに特異的に結合する受容体と、これに特異的に結合するリガンド反応も含み、これに制限されることなく、酵素と基質間の反応など、お互いを特異的に認識して起こる反応までも全て含むことができる。

10

【0014】

前記抗原-抗体反応を肉眼で又はセンサーを用いて容易に確認できるようにするために、標識物質を利用することができる。また、このような標識物質が、分析しようとする分析物質と結合できるように、分析物質に特異的に結合できるリガンドを標識物質に連結させて利用することができる。本発明の用語「接合体(conjugate)」は、前記標識物質とリガンドを連結させた結合体を意味する。前記標識物質とリガンドは、物理的又は化学的に連結させることができる。つまり、標識物質とリガンドが、パッシブ吸着(passive adsorption)によって連結するようにできるし、反応性グループを有するように標識物質を改質させ、リガンドと共有結合で連結するようにすることができるが、これに制限することなく、前記標識物質とリガンドの連結は、当業者に公知の方法を用いて行うことができる。

20

【0015】

本発明の用語「標識物質」(label)は、肉眼又はセンサーを用いて感知できる信号を発生させる物質を意味する。前記標識物質としては、ラテックス粒子、金粒子、着色ポリスチレン微細粒子、酵素、蛍光性染料、伝導性高分子又は磁性粒子などを使用することができるが、これに制限されるものではない。また、前記信号は、発光などのような標識物質の内在的特性によって自ら発生できるものであったり、蛍光などのような外部の刺激によって発生するものであり得る。

30

【0016】

本発明の用語「リガンド」は、お互いに特異的に結合する物質を意味する。例えば、抗原に対して特異的に結合する抗体、特定の受容体に特異的に結合するリガンドなどがお互いにリガンドとして作用する。その他にも、本発明において、リガンドは、前記定義された特性を表す物質であれば、制限なく使用することができる。本発明の全般で使用されたリガンドの意味は、特定の受容体に特異的に結合するリガンドとであると具体化して表記されない限り、前記定義されたように、お互いに特異的に結合する物質を意味する。

【0017】

前記接合体は、標識物質とリガンドをそれぞれ既知濃度の溶液で製造して混合させた後、一定時間反応するようにして製造することができる。この際、それぞれの溶液の濃度及び混合比率は、標識物質とリガンドの混合比を考慮して決定することができる。前記標識物質とリガンドの結合は、1つの標識物質に1つのリガンドが結合する場合、1つの標識物質に複数個のリガンドが結合する場合又は複数個の標識物質が1つのリガンドに結合する場合であり得る。具体的な結合比は重要ではないが、好ましい態様は、一定の比率を維持することであり得る。前記結合比は、標識物質とリガンドの種類によって変化し得るし、これらの相対的な大きさ及び結合位置の個数などを考慮して予測することができる。例えば、標識物質として、数マイクロサイズのラテックスビードを、リガンドとして抗体を使用する場合、複数個の抗体が1つのラテックスに結合することができる。好ましくは、それぞれのラテックス表面に均一の個数で抗体を結合させるために、抗体がラテックス

40

50

表面に飽和されて結合できるように、抗体及びラテックス溶液の濃度及び混合比率を調節することができるが、これに制限されるものではない。

【0018】

上記のように、それぞれの既知濃度の標識物質とリガンドを混合して反応させることによって、既知濃度の接合体の溶液を得ることができる。前記接合体の溶液は、一定濃度の接合体分子が、溶液上に均一に分散されている分散液の形態である。

【0019】

前記接合体分散液は、内部対照群 (internal control) として利用できるように、信号検出のための標識物質及び対照線に固定されたレポーター分子と反応するリガンドを含む他の接合体分子を追加的に含むことができる。前記追加的な接合体は、
10
上で言及した接合体の製造方法と同様の方法によって、均一な分散液の形態として製造されて前記接合体溶液に混合され得る。前記追加的な接合体分子に利用される標識物質は、前記接合体に利用されたものと同様又は相異なるものであり得る。上記した用語及び内部対照群に対するものは、おって詳しく論議する。

【0020】

本発明の「凍結乾燥接合体構造物」は、保管の容易性及び検体との反応の均一性のために、前記接合体の分散液は、一定体積の滴形態として急速冷凍させた後、凍結乾燥して製造され得る。具体的に、既知濃度の接合体分子が溶媒に均一に分散された分散液を、一定体積で噴射して極低温の液体冷媒に滴下させて接触させることで、冷凍することができる。
20
この際、冷媒の冷熱によって、外部から急速凍結されることによって、一般的には、一定の大きさの球形の固形物として冷凍される。前記極低温の液体冷媒としては、 $-270 \sim -180$ の気化点を有する液体を用いてもよい。例えば、液体窒素、液体ヘリウム、液体酸素、液体水素などを使用してもよく、費用及び安全性を考慮して選択してもよい。好ましくは、液体窒素又は液体ヘリウムであってもよいが、これに制限されるものではない。

【0021】

本発明の免疫クロマトグラフィーは、定性又は定量分析に使用され得る。本発明の凍結乾燥接合体構造物を定量分析に用いるためには、個々の接合体の構造物質が、一定の数の接合体分子を含むように製造することができる。これは、上記のように、既知濃度の均一な接合体分散液を極低温の液体冷媒に一定の体積で噴射し滴下させて急速冷凍することによって行うことができる。前記既知濃度の均一な接合体分散液を一定の体積で噴射するために、選択的にディスペンサーを利用してもよい。前記ディスペンサーを利用することで、
30
偏差を最小化し、一定の体積を有する滴として噴射されることが出来る。この際、ディスペンサーのノズル穴の大きさ及び分注圧力などを調節することで、噴射される溶液滴の体積を調節することができる。それ以外にも、接合体溶液の組成及び粘性度、滴下する溶液の速度と量及び表面張力によって製造される接合体滴の大きさが調節され得る。前記溶液液滴の体積は、 $5 \sim 30 \mu\text{l}$ であり、大きさは、直径が $0.5 \sim 5 \text{mm}$ である球形であり得るが、これに制限されるものではない。

【0022】

前記急速冷凍させた接合体構造物は、凍結乾燥させて凍結乾燥接合体構造物を製造することができる。前記凍結乾燥の過程を通じて冷凍接合体構造物内の溶媒が除去されることで、
40
構造物は孔隙を有するようになる。このように製作された孔隙を有する多孔性の凍結乾燥接合体構造物は、以後、検体との反応のために、緩衝液で溶解させる時、より素早く溶解されて均一な反応を誘導することができる。前記凍結乾燥は、凍結乾燥機を利用して行ってもよく、この際、凍結乾燥チャンバーの冷却温度は、 -20 以下であり得る。好ましくは、 -40 以下であり得るが、これに制限されるものではない。前記凍結乾燥の時間及び温度は、乾燥させたい試料の特性によって変化することができる。前記製造された凍結乾燥接合体構造物は、 $70 \sim 90\%$ の孔隙率を有し、緩衝液で溶解時、即時又は5秒以内に緩衝液に完全に溶解され得る。

【0023】

10

20

30

40

50

他の一態様として、本発明は、前記凍結乾燥接合体構造物及び免疫クロマトグラフィー用ストリップを備えた免疫分析用キットを提供する。

【0024】

本発明の用途「免疫分析」は、抗原-抗体反応などの特異的な免疫反応を利用して分析物質を検出する方法である。これに、クロマトグラフィーの原理を適用して免疫クロマトグラフィー法を行うことができる。つまり、免疫クロマトグラフィーによる分析は、媒質を通じて毛細管現象によって移動相と共に分析物質を含む検体が移動しながら行われる。従って、このような、免疫クロマトグラフィーの展開のための媒質として、ストリップを製造して利用することができる。このような、免疫クロマトグラフィー用ストリップの具体的な構成要素及びそれぞれの機能は、後述する。

10

【0025】

上記のように、免疫クロマトグラフィーは、媒質に沿って分析物質を含む移動相が移動するクロマトグラフィーの原理を利用する。従って、免疫クロマトグラフィー用ストリップを用いた免疫分析のためには、分析物質を含む検体をストリップに沿って移動させるための移動相を必要とする。これにより、本発明の免疫分析用キットは、緩衝液を追加で含むことができる。前記緩衝液は、免疫クロマトグラフィー用ストリップに沿って検体を移動させる移動相 (mobile phase) として作用するだけでなく、接合体を溶解させる溶媒として作用することもでき、必要に応じては、検体を希釈させるための希釈液としての役割も兼ねることができる。また、全血分析のための赤血球などの血球成分を溶解 (lysis) させるための成分を追加的に含むことができる。前記緩衝液としては、

20

【0026】

好ましくは、本発明の免疫分析用キットは、免疫クロマトグラフィーに検体を注入させる前に接合体と検体との均一な反応のために凍結乾燥接合体構造物を緩衝液に均一に溶解させた溶液と先に反応させた後、分析ストリップを用いて分析することができる。

【0027】

前記凍結乾燥接合体構造物の保管のために、さらに、緩衝液を用いた溶解及び検体との反応のために、追加的に備わるキャップを含むチェンバーと共に提供され得る。前記キャップを含むチェンバーに収容された凍結乾燥接合体構造物に直接緩衝液及び検体を添加し接合体構造物を溶解させて検体と均一に反応させることができる。前記チェンバーを用いると、キャップを装着したまま保管することができるため、凍結乾燥接合体構造物自体及び/又は緩衝液と検体との混合物を、汚染なく保管することができる。前記チェンバーは、好ましくは、ピペットなどの器具を用いて反応混合溶液を損失なく容易にストリップにローディングできるように、円錐形であってもよいが、これに制限されるものではない。

30

【0028】

前記凍結乾燥接合体構造物は、既知濃度の分散液を一定の体積で、冷凍、凍結乾燥させたものであり、構造物中、接合体分子の含量が一定して分析物質の定量分析に利用されるのに適している。

40

【0029】

さらに、内部対照群として前記凍結乾燥接合体構造物と同様の原理及び製造方法を用いて、信号検出のための第2標識物質及びレポーター分子と反応する第2リガンドを含む第2接合体を備えた凍結乾燥接合体構造物を追加的に含むことができる。内部対照群は、前記のように、凍結乾燥接合体構造物の製造時に、接合体分散液に第2接合体構造物を添加して、1つの構造物として製造して利用したり、同様の方法を利用して第2の凍結乾燥接合体構造物を別途製造して検体と接合体の混合液に添加することができる。内部対照群及びレポーター分子については、後述する。

【0030】

50

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、検体内の分析物質を捕獲するための検査線が形成された多孔性メンブレンパッド及び前記多孔性メンブレンパッドの一末端に検体移送のための駆動力を提供する吸収パッドを備えることができる。

【0031】

検体内の分析物質を検出するために、これと特異的に結合して選択的に捕獲できるリガンド又は分析しようとする物質との競争的反応を誘導して、これを検出できるように分析物質と同様の物質又はその類似体をリガンドとして、多孔性メンブレンパッドに固定して「検査線」を形成した。本発明の免疫クロマトグラフィー用ストリップの検査線には、検体内の分析物質と結合できる物質又は分析物質との競争的反応を誘発できるように、分析物質と同様の物質又はその類似体を第3のリガンドとして固定させることができる。前記第3リガンドの種類は、使用される免疫分析法の種類によって異なって選択され得る。免疫分析法の種類は、後述する。前記レポーター分子と反応する第2リガンド及び検体内の分析物質と結合する第3リガンドは、前記接合体に含まれるリガンドと同じ抗原、抗体、受容体又は前記受容体に特異的に結合するリガンドなどであり得る。

10

【0032】

移動相と検体の展開のための媒質としては、多孔性メンブレンパッドを利用して毛細管現象によって移動できるようにしており、この一末端には、検体移送のための駆動力を提供するために、吸収パッドを備えた。前記吸収パッドは、多孔性メンブレンパッドの一部重畳して位置することができる。前記メンブレンとしては、ニトロセルロースメンブレン、ガラス繊維メンブレン、ポリエーテルスルホンメンブレン、セルロースメンブレン、ナイロンメンブレン及びこれらの組み合わせを利用することができ、好ましくは、5～15 µmの気孔を有するニトロセルロースメンブレンが使用されてもよいが、これに制限されるものではない。

20

【0033】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、下部に固体支持体をさらに含んで製造することができる。このような固体支持体としては、プラスチック材質の支持体を利用することができ、前記固体支持体上に、ストリップを付着して製造することによって、耐久性を高めることができ、取り扱い及び保管を容易にすることができる。また、追加的に外部ケースの装着を容易にすることができる。前記固体支持体として使用できるプラスチック材質としては、ポリプロピレンフィルム、ポリエステルフィルム、ポリカーボネートフィルム、アクリルフィルムなどが利用されてもよいが、これに制限されるものではない。

30

【0034】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、追加的にケース内に固定され得る。下部のケースの内部には、前記クロマトグラフィー用ストリップを適切な位置に配置させ固定又は圧着させるための多数のガイド及び/又はストリップ支持体が備わってもよい。選択的に、下部のケースに備わったガイド及びストリップ支持体に対応される位置にガイド及びストリップ支持体が、上部のケースにも備わったものでもよい。つまり、上記ガイド及び/又はストリップ支持部は、必要に応じて、下部のケースに形成されたり、又は上部のケース及び下部のケースのいずれに形成され得る。また、上部のケースには、検体の投入口及び検査線に相応する位置に、標識物質からの信号を検出するための結果確認窓を備えることができる。前記検体の投入口は、多孔性メンブレンの一末端に、つまり、検査線に基づいた吸収パッドが位置した反対側末端に、検査線と検体がメンブレインに沿って展開できるように十分に離隔した地点にホール又はスリットなどの形態として形成され得る。前記結果窓は、多孔性メンブレン上に、検査線が位置した地点及び/又は場合によって、追加的に対照線が形成されている場合、対照線まで含んで外部から肉眼で又はセンサーを通じて識別可能であるため、十分な大きさに形成され得る。前記検査線及び/又は対照線を確認できる限り、その大きさ及び形は、制限なく形成され得る。

40

【0035】

前記上部及び下部のケースは、通常のプラスチック素材を利用して製造することができ、例えば、ポリカーボネート、アクリロニトリルブタジエンスチレンなどの素材が利用さ

50

れ得るが、これに制限されるものではない。前記上部及び下部のケースは、別途製作して結合ホーム、結合突起などを備えて通常的手段として結合され得るし、場合によっては、一体型として製造され得る。

【0036】

本発明の免疫分析用キットを使用すると、第1接合体と結合した分析物質、つまり、第1リガンドを通じて第1標識物質と結合した分析物質が、これに特異的に結合する第3リガンドによって検査線に捕獲され、この際、検査線上の第1標識物質からの信号を測定して検体内の分析物質の有無、量又は両方を測定することができる。つまり、検査線上においての第1標識物質からの信号の有無によって、分析物質の定性的な分析が可能であり、検査線上においての第1標識物質からの信号の量、つまり、強さを測定して定量的に分析することができる。

10

【0037】

従って、前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、検査線の前又は後に検体の展開を確認できる対照線を追加で備えることができる。前記対照線は、多孔性メンブレン上の検査線の前又は後に検査線とは重畳されないように適切に離隔した位置にレポーター分子を固定させることによって形成され得る。

【0038】

前記本発明の用語「対照線 (control line)」は、検体又は検体中の分析物質の濃度と関係なく、一定の信号を出す部分を意味する。上記対照線は、上記検査線と類似した方法を用いて形成することができるが、分析しようとする物質とは結合せず、検体と接合体の混合溶液に内部対照群として追加的に含まれて検体と共に移動相によって、多孔性メンブレンに沿って移動する第2接合体のリガンドと特異的に結合して捕獲することで、検体中の分析物質の濃度及び存在有無と関係なく、一定の信号を放出できる物質をリガンドで固定させて形成することができる。前記対照線として使用できるリガンドは、「レポーター分子」という用語を使用して表現しており、例えば、前記レポーター分子としては、抗-ラビットIgG、抗-チキンIgY、ストレプトアビジン (streptavidin) などが使用できる。前記検査線及び対照線の大きさ及び位置は、使用される抗原-抗体などによって適宜、選択してもよい。前記対照線の信号の有無から成功的な検体の展開のほどを確認でき、検査線の信号の強さを対照線の信号の強さと比較して分析物質の定量分析を行うことができる。

20

30

【0039】

免疫分析は、その原理によって大きく2つに分類される。まず、サンドイッチ分析 (sandwich assay) の場合、接合体の第1リガンドが、検体内の分析物質と共に免疫学的反応で免疫複合体を形成する。前記免疫複合体は、移動相の流れに沿って免疫クロマトグラフィー用ストリップに沿って移動し分析物質と特異的に結合するまた他のリガンド、つまり、第3リガンドが固定された検査線に免疫特異的結合反応によって捕獲される。一方、競争型分析 (competitive or inhibition assay) の場合、多孔性メンブレンの検査線に第3リガンドとして接合体のリガンド、つまり、第1リガンドと特異的に反応するリガンドを固定させる。前記第3リガンドは、検体内の分析しようとする物質と同様の物質であったり、これの類似体であり得るが、分析物質と競争的に接合体の第1リガンドに結合できる物質であれば、制限なく使用され得る。前記免疫反応によって検査線に捕獲された接合体の標識物質が発生させる信号の強さは、検体中の分析物質の濃度に比例又は半比例するため、信号の陽性又は陰性で分析物質が存在するかどうかを判断する定性分析だけでなく、信号の強さを標準比色表又は内部対照群と比較して定量分析することができる。

40

【0040】

また一つの態様として、本発明は、前記免疫分析用キットを使用して検体内の分析物質を定性又は定量分析する方法として、接合体構造物に緩衝液及び検体を同時に又は順次に加えて接合体構造物の溶解及び接合体と検体の反応を同時に又は順次に行う段階；前段階の結果物を免疫クロマトグラフィー用ストリップにローディングして展開させる段階；及

50

び検査線から第1標識物質の信号の有無及び強さを確認する段階を含むことが特徴である分析の方法を提供する。

【0041】

本発明の免疫分析用キットを使用して検体中の分析物質を定性及び/又は定量分析する具体的な原理は、上記のようである。

【0042】

具体的な分析方法を行うに至って、下記の順に進行することができる。まず、接合体構造物に緩衝液を加えて溶解させた後、該当溶液に検体を添加して均一に混合して一定時間反応させたり、接合体構造物に緩衝液及び検体を同時に添加して接合体構造物を溶解すると同時に、検体中の分析物質と反応できるように誘導することができる。好ましくは、接合体構造物を緩衝液に完全に溶解させ接合体分子が均一に分散された溶液を形成し、これに検体を添加して分析物質との免疫反応を行うことができるが、接合体構造物が完全に溶解して、接合体分子が溶液上に均一に分散されて検体と十分に反応し免疫複合体を形成できる限り、接合体構造物、緩衝液及び検体の混合順番及び反応順番に制限されるものではない。以後、前記溶解及び免疫反応段階の結果物である免疫複合体を含む溶液を、免疫クロマトグラフィー用ストリップにローディングして展開させた後、検査線から第1標識物質の信号有無及び強さを確認して検体中の分析物質の定性又は定量分析を行うことができる。

10

【0043】

前記ストリップの多孔性メンブレンを通じて移動する検体を含む溶液が均質するほど、移動相の移動速度及び抗原-抗体反応時間を一定にするため、検体分析の正確度を向上させることができる。従って、検体を緩衝液に完全に溶解させた均一な接合体溶液と混合して十分に反応させた後、免疫クロマトグラフィー用ストリップにローディングして展開させる本発明の分析方法は、分析の正確度を向上させるのに適している。

20

【0044】

本発明の具体的な実施例においては、本発明の分析方法と接合体が吸着された接合体パッドを追加で含む既存の免疫分析ストリップを利用した分析方法を行って、その結果を比較することで、本発明の方法を利用した糖化血色素分析でより再現性の高い結果が得られたことを確認した(表1)。さらに、定量分析において、濃度と測定された信号の強さが、高い線型性を有する比例関係を示すことを確認した(図6)。

30

【0045】

本発明の免疫分析のための検体としては、哺乳類、好ましくは、ヒトから分離した全血、血球、血清、血漿、髄液、汗、尿、涙、唾、皮膚、粘膜、毛髪などの全ての生体試料を含み、要するに、血液であり得る。血液は、血球成分を除去した血清又は血漿成分を利用してもよく、全血を利用する場合、血球成分を溶解(Lysis)できる成分を緩衝液に追加して使用することができる。

【0046】

本発明による免疫分析方法は、マラリア抗原(Ag)、エイズ、C型肝炎、B型肝炎、梅毒、胃潰瘍原因菌、ガンマーカー(AFP、PSA、CEA)、結核、サース、デング熱、らい病(ハンセン病)など主に全血を検体として使用する疾病の診断及び血糖検査などに有用である。好ましくは、分析物質は、糖化血色素であり得るが、これに制限されるものではない。

40

【0047】

本発明の具体的な実施例によると、検体として血液を使用し、前記検査線には、第2リガンドとして糖化血色素に対する抗体を固定して、これに捕獲された接合体の標識物質の発色度を測定して血中糖化血色素の濃度を測定することができた。例えば、前記測定は、センサーとして分光器を使用することができるが、検出方法は、これに制限されるものではない。糖化血色素の濃度は、通常、全体血色素の濃度に対する糖化血色素の濃度の百分率(比率)で表記される。全体血色素に対する糖化血色素の濃度百分率は、下記の式で計算することができ、前記糖化血色素の濃度百分率が、3~6.5%である場合、正

50

常として判断し、6.5～20%である場合、糖尿病として判断する。

【0048】

【数1】

$$HbA1c(\%) = \frac{HbA1c(g/dL)}{TotalHb(g/dL)} \times 100$$

【0049】

ヒトの赤血球中の血色素（ヘモグロビン）及び糖化血色素を測定するためには、赤血球を溶解させる段階を必要とする。通常の糖化血色素検査のように、赤血球を溶解させる前処理段階を含み、前記赤血球の溶解は、検体前処理段階に使用される液状緩衝液に血球の溶解緩衝液を混合して使用することで、別途の過程が必要なく、接合体との反応と同時に行うことができる。従って、本発明のキットは、現場診断用として活用度が高い。

【0050】

以下、添付された図面を参考して、本発明を詳細に説明すると、次のようである。

図3は、本発明の一実施例による免疫分析装置の分解斜視図であり、図4は、本発明による凍結乾燥接合体の写真である。また、図5は、本発明による免疫分析方法の順番である。図3及び図5に図示されたように、本発明による免疫分析装置は、免疫クロマトグラフィ分析で検出が可能な検体の定性及び定量的分析のために、検体内の分析物質（analyte）及び/又は接合体（conjugate）と免疫特異的結合、つまり、抗原-抗体反応で結合する結合体（抗原、抗体又はその他リガンド）が固定された検査線が形成されている多孔性メンブレンを含む1つ以上のメンブレンストリップ、前記メンブレンストリップの上部を覆って検体の投入口及び結果確認窓を備えた上部のケース、前記メンブレンストリップの下部を覆って検体の貯蔵所が備わっている下部のケース及び前記接合体を含む凍結乾燥接合体が入っており、前記検体、液状緩衝液及び接合体を混合して前記検体貯蔵所へ投入する検体前処理装置（図5）を含む。また、本発明による免疫分析装置は、前記メンブレンストリップ及び前記検体前処理装置のみにより成され得る。

【実施例】

【0051】

以下、実施例を通じて本発明をより詳しく説明しようとする。これらの実施例は、本発明をより具体的に説明するためのもので、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されるものではない。

<実施例>

実施例1：凍結乾燥された接合体-ビードを用いた糖化血色素の検査

A．抗体の固定化ニトロセルロースパッドの製造

糖化血色素に対する単クローン抗体を、0.1Mリン酸緩衝液で1mg/mLの濃度に希釈した後、分注機を用いてニトロセルロースパッド（幅25mm、気孔の大きさ10～12μm）の検査線の位置に噴射した。また、ラビット免疫グロブリンGをマウスに免疫して得られた抗-ラビット免疫グロブリンG抗体を、0.1M PBSで1mg/mLの濃度に希釈して前記にニトロセルロースパッドの対照線の位置に噴射し、37℃の恒温器で乾燥して固定化させた。前記ニトロセルロースパッドの抗体が固定された部分を除いた残りの余白には、0.05重量%のウシ血清アルブミン、4重量%のスクロース及び0.0625重量%のイオン性界面活性剤を含有したPBSを噴霧して遮断させたあと、30℃の恒温器で60～120分間乾燥させた。前記製作されたニトロセルロースパッドを接着剤が塗布されたポリプロピレン（polypropylene）プレート支持体に吸着し、吸湿パッド（Millipore、USA）を前記支持体に付着したニトロセルロースパッド上段に1mm重畳するように付着した。

【0052】

10

20

30

40

50

B．抗体-ラテックス接合体の凍結乾燥接合体-ビードの製造

次の方法で接合体溶液を製造した。まず、pH 6.0の0.1 M MES (2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid) 緩衝液に溶かしたラテックス水溶液 1 mL に、糖化血色素に対する単クローン抗体とラビット免疫グロブリン G をそれぞれ濃度別に添加した後、37 恒温器で1時間反応させた。前記製造された接合体溶液を遠心分離機で12,000 rpmで1回遠心分離して上清液を除去することで、未反応の抗体を除去した。ここに、1重量%のウシ血清アルブミンを含む緩衝液を添加し24時間反応させることで、反応していないラテックス表面が、ウシ血清アルブミンで遮断されるようにした。前記緩衝液としては、1重量%ウシ血清アルブミン以外に、0.5重量%スクロース、1重量%PEG (polyethylene glycol)、1% PVA (polyvinyl alcohol)などを追加で含む0.1 M PBSを使用した。前記製造した接合体を含有する溶液をディスペンサーを用いて20 µL体積で一滴ずつ液体窒素に滴下して急速凍結させる過程を繰り返して接合体 ビードを獲得した後、凍結乾燥機内で20時間乾燥させた。

10

20

30

40

50

【0053】

C．免疫分析装置の製造

前記A段階で製造されたストリップを下部のケースに装着した後、上部のケースを覆って、本発明の実施例による免疫分析ストリップデバイス(図3)を製造した。前記B段階で製造された凍結乾燥接合体-ビード(図4)をそれぞれ1つずつ前処理装置(図5)に入れてキャップを閉じた。前記製造された免疫分析ストリップデバイスと前処理装置は、除湿密封して単一パウチで包装して保管した。

< 比較例 >

比較例1：接合体パッドを用いる従来の分析ストリップの製造方法

A．抗体固定化ニトロセルロースパッドの製造

前記実施例1のA段階と同様の方法を用いて製造した。

【0054】

B．抗体-ラテックス接合体パッドの製造

抗体-ラテックス接合体溶液は、前記実施例1のB段階と同様の方法で製造した。上のように製造した接合体を含有した溶液をディスペンサーを用いて図1に示した接合パッドであるガラス繊維パッドに10 µl / 25 mm²の密度で塗布した。前記抗体-ラテックス接合体を含有したパッドを液体窒素で急速凍結させた後、凍結乾燥機内で20分間乾燥させ、乾燥されたパッドを7 mm x 30 mmの大きさで切断した。

【0055】

前記製作された接合体パッドを前記支持体に付着したニトロセルロースパッドの下段に1 mm重畳するように、接着剤が塗布されたポリプロピレンプレート支持体(backing plate)に付着した。

【0056】

C．免疫分析装置の製造

前記比較例1のA及びB段階で製造された接合体パッドを含んで図1に示したように重畳して配列した後、下部のケースに装着して上部のケースを覆い、本発明の比較例による免疫分析ストリップデバイス(図2)を製造した。前記製造したストリップデバイスは、除湿密封して単一のパウチで包装及び保管した。

【0057】

実験例1：接合体パッドと凍結乾燥された接合体-ビードを用いた分析ストリップの糖化血色素測定性能の比較

本発明の実施例1と比較例1で製造された分析ストリップの性能を比較するために、10個の血液検体を利用して各10回ずつ測定した。前記測定に使用された10個の血液検体は、自動化大型装置(Variant II Turbo; Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)で糖化血色素の値を測定して、前記実施例1と比較例1によって製造された分析ストリップを利用して測定した結果と比較し

た。前記製造された分析ストリップを利用した測定値は、検査線及び対照線などのメンブレン上の特定の領域での発色程度 (i n t e n s i t y) を測定できる分光光学器を用いて数値化した。分光光学器で測定した検査線及び対照線などでの数値から H b A 1 c % 値を計算して表した。その結果を下記の表 1 に表した。

【 0 0 5 8 】

【表 1】

糖化血色素測定性能の比較

検体No	自動化大型装備	実施例		比較例	
	測定平均値	測定平均値	CV%	測定平均値	CV%
検体 1	5. 6 %	5. 4 %	2. 3	5. 2 %	9. 7
検体 2	6. 5 %	6. 6 %	3. 1	5. 6 %	9. 5
検体 3	7. 4 %	7. 2 %	3. 4	6. 5 %	7. 6
検体 4	7. 9 %	8. 0 %	2. 5	8. 3 %	5. 0
検体 5	8. 7 %	8. 8 %	3. 8	8. 5 %	5. 5
検体 6	9. 5 %	9. 3 %	2. 6	9. 7 %	3. 0
検体 7	5. 4 %	5. 4 %	2. 9	5. 8 %	4. 8
検体 8	6. 1 %	6. 1 %	2. 6	6. 7 %	2. 4
検体 9	7. 2 %	7. 1 %	3. 2	7. 6 %	5. 1
検体 10	7. 9 %	8. 1 %	3. 2	7. 6 %	5. 9

10

20

【 0 0 5 9 】

前記表 1 に示した結果のように、本発明の実施例 1 によって製造された分析ストリップを用いて測定した値は、比較例 1 によって製造された分析ストリップを利用して測定した値と比較して高い再現性 (低い分散係数 CV % ; c o e f f i c i e n t o f v a r i a t i o n) を有することを確認した。また、前記測定された値を自動化大型装備によって測定された値と比較した時、実施例 1 による分析ストリップを利用して測定した値がより小さい偏差を示した。つまり、本発明による分析ストリップを利用した糖化血色素検査方法を用いる場合、既存の方法より検査の正確度及び再現性が向上されたことを確認した。

30

【 0 0 6 0 】

実施例 2 : 接合体パッドと凍結乾燥された接合体-ビードを用いた免疫測定装置の糖化血色素の定量分析能の比較

本発明の実施例 1 と比較例 1 で製造された免疫測定装置の定量分析能を比較するために、糖化血色素を様々な濃度として含む 12 個の血液検体について測定した。また、実験例 1 でのように、自動化大型装備 (V a r i a n t I I ; B i o - R a d L a b o r a t o r i e s , I n c) を用いて前記 12 個の同一な血液検体の糖化血色素値を測定して濃度に対する相関関係を分析し、その結果を図 6 に示した。青いひし形は、本発明の実施例 1 で製造された免疫測定装置による測定された信号値 (i n t e n s i t y) を示した結果であり、赤い四角形は、比較例 1 で製造された免疫測定装置による測定された信号値 (i n t e n s i t y) を数値化した結果である。図 6 に示したように、本発明の免疫測定装置によって測定された数値は、使用された糖化ヘモグロビンの濃度と比例し、糖尿病を診断できる領域を含む広い濃度範囲で高い線型性を有することを確認した ($R^2 = 0.996$)。一方、従来免疫測定装置と類似した比較例 1 によって製造された免疫測定装置によって測定された数値は、全般的に測定値が実際糖化ヘモグロビン濃度に比例する傾向を示してはいるが、線型性が低く ($R^2 = 0.919$)、特に糖尿かどうかを判断する基準になる 6.5 % を含む 5 ~ 8 % 濃度の糖化ヘモグロビンを含む検体に対しては、信頼し難いほど低い線型性を示しことを確認した ($R^2 = 0.747$; データは示していない) 前記

40

50

濃度依存性の実験に使用された個別の濃度及び測定値は、下記の表 2 にまとめた。

【 0 0 6 1 】

【表 2】

糖化血色素の定量分析能の比較

検体No.	HbA1c	A (◆)	B (■)
検体 1	5. 1%	0. 85709	0. 74213
検体 2	5. 4%	0. 87160	0. 77635
検体 3	6. 6%	0. 93709	0. 78221
検体 4	6. 7%	0. 93586	0. 79454
検体 5	7. 1%	0. 96748	0. 80414
検体 6	8. 0%	1. 01602	0. 93555
検体 7	9. 5%	1. 09534	0. 99538
検体 8	11. 1%	1. 18901	1. 02154
検体 9	11. 0%	1. 18645	1. 00212
検体 10	5. 6%	0. 89845	0. 75455
検体 11	6. 1%	0. 91795	0. 80114
検体 12	6. 8%	0. 96111	0. 85412

A ; 本発明の免疫分析装置 (実施例 1)、

B ; 従来 of 免疫分析装置 (比較例 1)

【 0 0 6 2 】

実験例 3 : 凍結乾燥接合体の滴体積による糖化血色素の測定値の変化

凍結乾燥接合体構造物の製造時に、均一の粒子の体積が定量分析能と密接な関連があることを確認するために、5 ~ 30 μ l の範囲内で 5 μ l 単位で均一な体積の凍結乾燥接合体構造物を製造して糖化血色素の定量分析を実施した。それぞれ異なる濃度の試料 5 種をそれぞれ異なる大きさの凍結乾燥接合体に適用して同様の方法で測定した。下記の表 3 に糖化血色素の数値の値とこれに相応するそれぞれの体積で製造された凍結乾燥接合体を利用して測定した測定値を一緒に表した。また、これを図 7 に図示した。

【 0 0 6 3 】

【表 3】

HbA1c%	5 μ l	10 μ l	15 μ l	20 μ l	25 μ l	30 μ l
5.4%	0.7245	0.7845	0.8241	0.8716	0.8944	0.9123
7.2%	0.8124	0.8874	0.9214	0.96748	0.9541	1.001
9.5%	0.9841	1.015	1.0135	1.09534	1.1121	1.1231
11.4%	1.0245	1.1112	1.1231	1.18901	1.2234	1.2234
13.8%	1.0844	1.1945	1.2121	1.2752	1.2955	1.3454

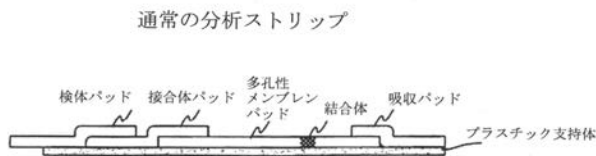
【 0 0 6 4 】

その結果、前記表 3 及び図 7 に示すように、それぞれの均一の大きさの凍結乾燥接合体が、濃度に比例する高い線型の相関関係を有する測定値を示すと同時に、同一濃度の試料では、凍結乾燥接合体構造物の粒子の体積が増加するにつれて測定値が多少増加する傾向を示すことを確認した。このことから、5 ~ 30 μ l 範囲で一定の体積の滴形態として凍結乾燥接合体構造物を利用することが、免疫分析キットの正確性及び再現性を向上させ、定性及び定量分析のいずれも可能であることを確認した。

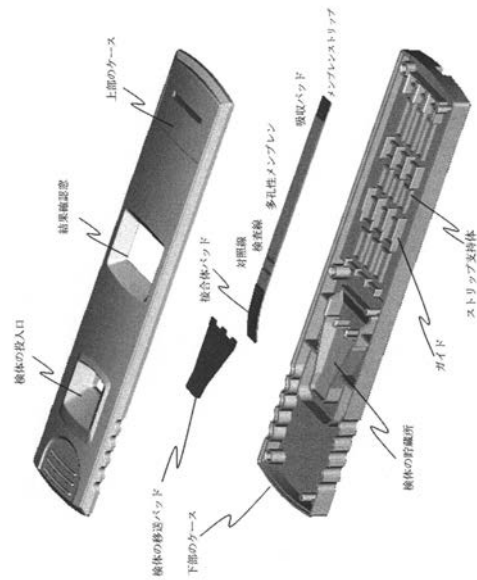
【 0 0 6 5 】

一方、前記結果から他の体積の凍結乾燥接合体が混在する場合、測定される信号の強さは、試料の濃度だけではなく、凍結乾燥接合体の体積によって影響を受けることが分かった。要するに、15 μL体積の凍結乾燥接合体を使用して糖化血色素の濃度が11.4%である試料に対して測定した値(1.1231)が、30 μL体積の凍結乾燥接合体を使用して糖化血色素濃度が9.5%である試料に対して測定した値(1.1231)と同様の値を示した。言い換えれば、お互い異なる体積の凍結乾燥接合体が混在した場合、測定した値が、ある濃度の試料に対するものであるか不明確であり、正確性を担保できないことを類推することができる。これは、均一体積で製造されてない凍結乾燥接合体を利用する場合、定量分析結果の正確性及び再現性が低くなり得ることを暗示する。

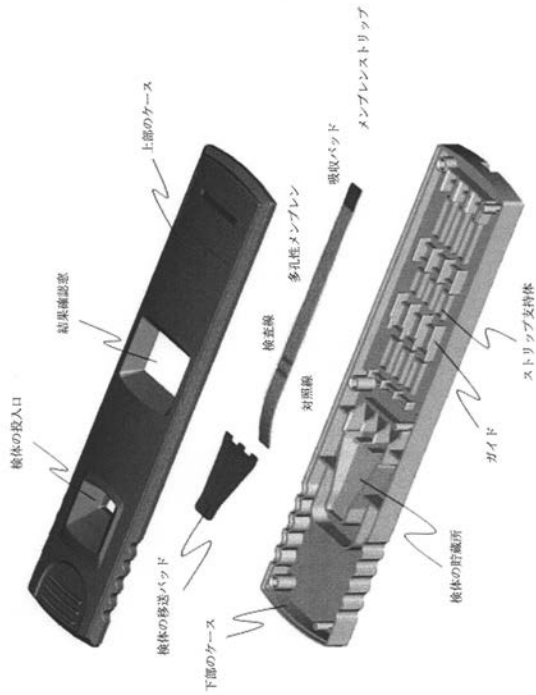
【 図 1 】



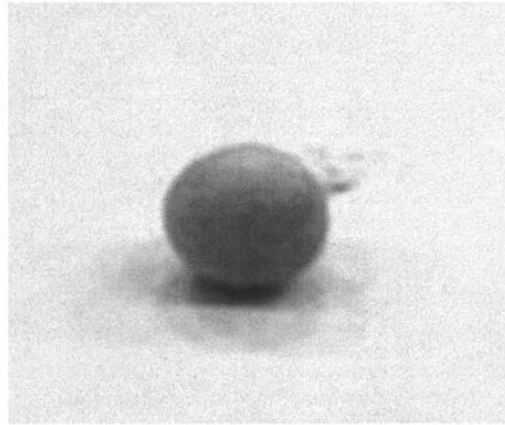
【 図 2 】



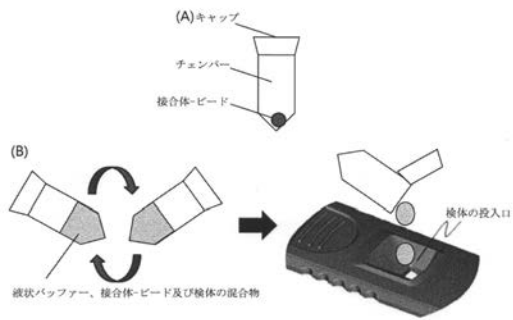
【 図 3 】



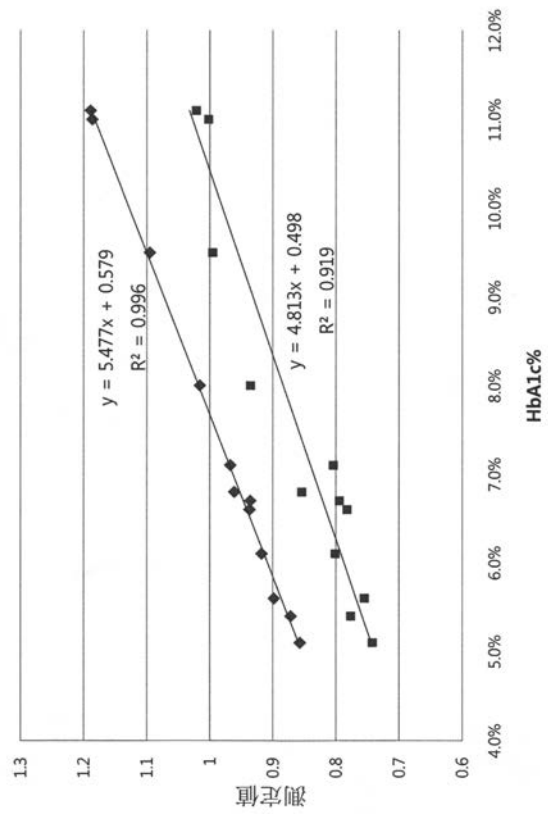
【 図 4 】



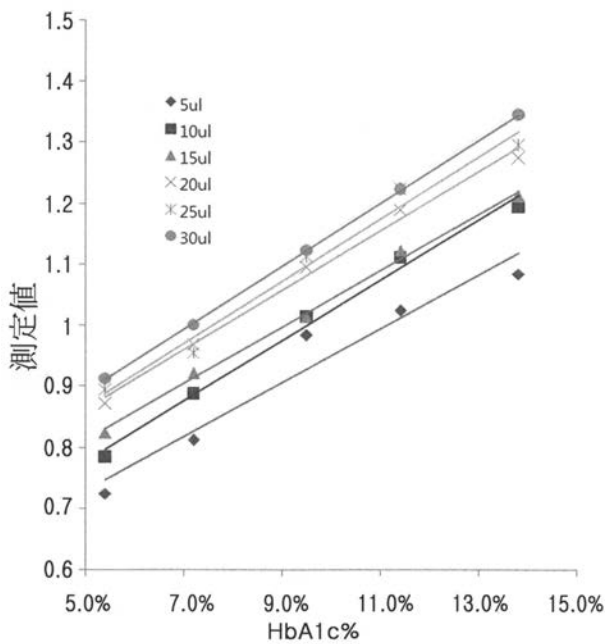
【 図 5 】



【 図 6 】



【図 7】



【手続補正書】

【提出日】平成28年12月27日(2016.12.27)

【手続補正 2】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

免疫クロマトグラフィー用の凍結乾燥接合体構造物と、
免疫クロマトグラフィー用ストリップとを備え、

前記凍結乾燥接合体構造物は、信号検出のための第 1 標識物質及び分析物質と反応する第 1 リガンドを含む第 1 接合体を含み、

前記第 1 標識物質と第 1 リガンドは、物理的又は化学的に連結されており、

前記凍結乾燥接合体構造物は、既知濃度の前記第 1 接合体が、溶媒内に分散されている分散液を均一体積の滴形態として急速冷凍させた後、凍結乾燥して溶媒を除去して形成され、急速冷凍された滴から溶媒が占める空間は、溶媒除去によって孔隙を形成し、

前記凍結乾燥接合体構造物は、前記免疫クロマトグラフィー用ストリップから分離されて配置されていることを特徴とする免疫分析用キット。

【請求項 2】

信号検出のための第 2 標識物質及びレポーター分子と反応する第 2 リガンドを含む第 2 接合体をさらに含む、前記第 2 標識物質と第 2 リガンドは、物理的又は化学的に連結されており、

前記第 2 標識物質は、前記第 1 標識物質と同一又は相異なるものである請求項 1 に記載の免疫分析用キット。

【請求項 3】

前記第 1 リガンドは、抗原、抗体、受容体又は前記受容体のリガンドである請求項 1 に記載の免疫分析用キット。

【請求項 4】

前記急速冷凍は、気化点が $-270 \sim -180$ である液体に滴下させて行う請求項 1 に記載の免疫分析用キット。

【請求項 5】

前記液体は、液体窒素又は液体ヘリウムである請求項 4 に記載の免疫分析用キット。

【請求項 6】

前記急速冷凍は、選択的にティスペンサーを用いて一定の体積で滴下させて行うことを特徴とする請求項 1 に記載の免疫分析用キット。

【請求項 7】

前記免疫クロマトグラフィーは、定性又は定量分析用である請求項 1 に記載の免疫分析用キット。

【請求項 8】

前記凍結乾燥接合体構造物は、即時又は 5 秒以内に緩衝液に完全に溶解される請求項 1 に記載の免疫分析用キット。

【請求項 9】

前記第 1 標識物質は、ラテックス粒子、金粒子、着色ポリスチレン微細粒子、酵素、蛍光性染料、伝導性高分子及び磁性粒子からなる群より選択される請求項 1 に記載の免疫分析用キット。

【請求項 10】

前記凍結乾燥接合体構造物を溶解させる緩衝液をさらに含む請求項 1 に記載のキット。

【請求項 11】

前記緩衝液は、接合体の溶解のための溶媒又はクロマトグラフィーの移動相として作用するものである請求項 10 に記載のキット。

【請求項 12】

前記緩衝液は、追加的に検体の希釈又は血球成分の溶解の機能を有するものである請求項 10 に記載のキット。

【請求項 13】

前記滴の体積は $5 \mu\text{L}$ 以上 $30 \mu\text{L}$ 以下であり、前記凍結乾燥接合体構造物は、70% 以上 90% 以下の孔隙率を有している請求項 1 に記載のキット。

【請求項 14】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、検体内の分析物質を捕獲するための検査線が形成された多孔性メンブレンパッド及び前記多孔性メンブレンパッドの一末端に検体移送のための駆動力を提供する吸収パッドを備えるものである請求項 1 に記載のキット。

【請求項 15】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、下部に固体支持体をさらに含むものである請求項 14 に記載のキット。

【請求項 16】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、追加的にケース内に固定されており、下部のケースには、ガイド及びストリップ支持部が備わっており；上部のケースには、検体の投入口及び検査線に相応する位置に結果確認窓を含む請求項 14 に記載のキット。

【請求項 17】

前記検査線は、検体内の分析物質に特異的に結合する第 3 リガンドが固定されている請求項 14 に記載のキット。

【請求項 18】

第 1 リガンドを通じて第 1 標識物質と結合した分析物質が、第 3 リガンドによって検査線に捕獲され、検査線上の第 1 標識物質からの信号を測定して検体内の分析物質の有無、

量又はいずれも測定できるものである請求項 17 に記載のキット。

【請求項 19】

前記免疫クロマトグラフィー用ストリップは、検査線の前又は後に、検体の展開を確認できる対照線をさらに含み、前記対照線は、レポーター分子が固定されているものである請求項 14 に記載のキット。

【請求項 20】

請求項 1 に記載された免疫分析用キットを用いて、検体内の分析物質を定性又は定量分析する方法として、

凍結乾燥接合体の構造体に緩衝液及び検体を同時に又は順次に加えて、接合体構造物の溶解及び接合体と検体の反応を同時に又は順次に行う段階；

前段階の結果物を免疫クロマトグラフィー用ストリップにローディングして展開させる段階；及び

検査線から第 1 標識物質の信号の有無を前記信号の強さの測定と同時に確認する段階を含むことを特徴とする分析方法。

【請求項 21】

前記検体は、全血、血清又は血漿であり、分析物質は、糖化血色素である請求項 20 に記載の方法。

フロントページの続き

(72)発明者 ホン スンユブ

大韓民国 446 - 559 キョンギド, ヨンインシ, キフング, マブットン, ウーリム アパート, 102 - 403

(72)発明者 ホワン ヘユン

大韓民国 443 - 380 キョンギド, スウォンシ, ヨントング, ウォンチョンドン, 71 - 1, アジョ アパート, ダ - 303

(72)発明者 イ ヒョキュン

大韓民国 443 - 472 キョンギド, スウォンシ, ヨントング, ヨントン 2 - ドン, シンナムシルシンウォン アパート, 644 - 904

专利名称(译)	用于免疫学分析的试剂盒和使用其的分析方法		
公开(公告)号	JP2017062258A	公开(公告)日	2017-03-30
申请号	JP2016234649	申请日	2016-12-02
[标]申请(专利权)人(译)	SD生物传感器		
申请(专利权)人(译)	Esudi生物传感器公司		
[标]发明人	チエヒヨンギル ホンスユブ ホワンヘユン イヒヨキユン		
发明人	チエヒヨンギル ホンスユブ ホワンヘユン イヒヨキユン		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/5436 G01N33/49 G01N33/532 G01N33/538 G01N33/558 G01N33/723 G01N33/90		
FI分类号	G01N33/543.501.K G01N33/543.541.Z G01N33/543.521 G01N33/531.A		
优先权	1020120058708 2012-05-31 KR		
其他公开文献	JP6387072B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于免疫测定的试剂盒，包括冻干的缀合物结构和用于免疫层析的条带。 解决方案：使用用于免疫层析的冻干缀合物结构固定化样品中的分析物质，冻干的缀合物结构，用于免疫测定的试剂盒，其包含用于免疫层析的条带和用于免疫测定的试剂盒定性或定量分析方法。 点域5

