

(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2005-189246

(P2005-189246A)

(43) 公開日 平成17年7月14日(2005.7.14)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543	GO 1 N 33/543 5 2 1	2 GO 4 5
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50 N	
GO 1 N 33/72	GO 1 N 33/72 A	

審査請求 有 請求項の数 29 O L (全 16 頁)

(21) 出願番号	特願2005-55177 (P2005-55177)	(71) 出願人	595124734 クイデル コーポレーション
(22) 出願日	平成17年2月28日 (2005.2.28)		アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォル ニア サン デイエゴ マツクケラー コ ート 1 0 1 6 5
(62) 分割の表示	特願平7-221067の分割	(74) 代理人	100070002 弁理士 川崎 隆夫
原出願日	平成7年8月7日 (1995.8.7)		
(31) 優先権主張番号	08/287, 179	(72) 発明者	ハンス アール. ベーリンガー アメリカ合衆国 9 2 1 2 7 カリフォル ニア サン デイエゴ ミリカ レーン 1 7 9 3 7
(32) 優先日	平成6年8月8日 (1994.8.8)	(72) 発明者	ジャン エル. サブラン アメリカ合衆国 9 2 1 2 7 カリフォル ニア サン デイエゴ チーフテイン コ ート 1 8 0 7 5
(33) 優先権主張国	米国 (US)		最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 制御された感度の免疫クロマトグラフィー検定

(57) 【要約】

【課題】 糞便潜在血液のような被検体の検出のための、簡単で、正確で、再現性のある、制御された、かつ所定の検定感度を与える検定法を提供する。

【解決手段】 被検体の存在を検定する第1の工程として、所定量の被検体を抗体に結合させることを含み、検定感度の制御が可能な、改良された1段階免疫クロマトグラフィー検定法及びそのための装置である。

【選択図】 なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

液体サンプル中の被検体の存在の検出のための制御された感度を有する分析装置であって、

互いに隣接していて、互いに吸収性接触している複数の実質的に平坦な帯域を含んでなる 1 つまたはそれ以上の芯の材料を含んでなり、該帯域は、

該被検体に結合する第 1 の抗体をその上に所定量有するサンプル適用帯域；

視覚的に検出できる粒子に結合した該被検体に結合する第 2 の抗体を含んでなる移動化可能な複合体を含んでなる複合体帯域；および

該芯の材料上に不動化された該被検体に結合する第 3 の抗体を含んでなる検出帯域と

10

を含んでなり、  
その中に該被検体を含む液体サンプルが、該サンプル帯域に適用された時、閾値量の被検体が該第 1 の抗体に結合され、該液体サンプル中の未結合のままの被検体が、サンプル帯域から、移動化可能な複合体の該第 2 の抗体にそれが結合される該複合体帯域を通り、そして移動化可能な複合体に結合した被検体は、被検体が該第 3 の抗体に結合され、移動化可能な複合体に結合している被検体が不動化される検出帯域を通るようにしてなることを特徴とする分析装置。

## 【請求項 2】

該視覚的に検出できる粒子が、着色ラテックス粒子および金属ゾルからなる群から選択されることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

20

## 【請求項 3】

該視覚的に検出できる粒子が、直径約 0.1 μm 未満～約 100 μm の着色ラテックス粒子であることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

## 【請求項 4】

該芯の材料の 1 つが、ニトロセルロースであることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

## 【請求項 5】

該第 1 の抗体が、モノクロナールであることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

## 【請求項 6】

該第 2 の抗体が、モノクロナールであることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

## 【請求項 7】

該第 2 の抗体が、該第 1 の抗体と同じ抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

30

## 【請求項 8】

該第 1 の抗体が、ポリクロナールであることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

## 【請求項 9】

該第 3 の抗体が、該第 1 の抗体と同じ抗体であることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

## 【請求項 10】

該複合体帯域が、視覚的に検出できる粒子に複合化した抗原を含んでいる移動化可能な複合体をさらに含み、1 つの該芯の材料上にテスト完全帯域をさらに含んでなり、該テスト完全帯域は、該抗原に結合する第 4 の抗体を含んでなることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

40

## 【請求項 11】

該抗原が、ヤギ血清アルブミンであることを特徴とする請求項 10 記載の装置。

## 【請求項 12】

負の信号をさらに含み、該負の信号は、該検出帯域の芯の材料上に不動化された視覚的に検出できる粒子を含んでいることを特徴とする請求項 1 記載の装置。

## 【請求項 13】

該粒子が、水平線の芯の材料上で不動化されていて、該第 3 の抗体が、該水平線と交差する垂直線の芯の材料上で不動化されていることを特徴とする請求項 12 記載の装置。

## 【請求項 14】

互いに隣接していて、互いに吸収性接触している複数の実質的に平坦な帯域を含んでなる

50

1つまたはそれ以上の芯の材料を含んでなる装置を用いて液体サンプル中の被検体を検出する方法であって、該帯域は、

該被検体に結合する第1の抗体をその上に所定量有するサンプル適用帯域；  
視覚的に検出できる粒子に結合した該被検体に結合する第2の抗体を含んでなる移動化可能な複合体を含んでなる複合体帯域；および

該芯の材料上に不動化された該被検体に結合する第3の抗体を含んでなる検出帯域とを含んでなり、その中に該被検体を含む液体サンプルが、該サンプル帯域に適用された時、閾値量の被検体が該第1の抗体に結合され、該液体サンプル中の未結合のままの被検体が、サンプル帯域から、移動化可能な複合体の該第2の抗体にそれが結合される該複合体帯域を通り、そして移動化可能な複合体に結合した被検体は、被検体が該第3の抗体に結合され、移動化可能な複合体に結合している被検体が不動化される検出帯域を通るようにしてなり、該方法は：

装置のサンプル帯域に液体サンプルを適用し、；

サンプル帯域、複合体帯域および検出帯域を液体サンプルが横断するのに十分な時間待機し、；そして

検出帯域の外観に基づいて液体サンプル中の該被検体の存在または不在を決定する各工程を含むことを特徴とする方法。

#### 【請求項15】

支持体層上の抗原と抗体との相互作用を含む液体サンプル中の被検体の存在の検出のための1段階免疫クロマトグラフィー検定であって、検定に用いられる試薬の1種が、視覚的に検出できる粒子に結合している該被検体に結合する第1の抗体を含む移動化可能な複合体を含み、かつもう1種の試薬が、該支持体層上の所定の帯域で不動化されている該被検体に結合する第2の抗体を含んでなり、改良が、該液体サンプルを該第1のおよび第2の抗体に接触させる前に、該液体サンプルを、該被検体に結合する所定量の抗体と接触させる工程を含み、該抗体が、液体サンプルの適用前に該支持体層の所定の帯域に存在することを特徴とする1段階免疫クロマトグラフィー検定。

#### 【請求項16】

ヒトの糞便の液体サンプル中の血液の存在の検出のための制御された感度を有する分析装置であって、

互いに隣接していて、互いに吸収性接触している複数の実質的に平坦な帯域を含んでなる1つまたはそれ以上の芯の材料を含んでなり、該帯域は、

ヒトヘモグロビンに結合する第1の抗体をその上に所定量有するサンプル適用帯域；  
視覚的に検出できる粒子に結合したヒトヘモグロビンに結合する第2の抗体を含んでなる移動化可能な複合体を含んでなる複合体帯域；および

該芯の材料上に不動化されたヒトヘモグロビンに結合する第3の抗体を含んでなる検出帯域とを含んでなり、

その中にヘモグロビンを含む糞便のサンプルが、糞便の液体サンプルをつくる緩衝液に懸濁させられ、該液体サンプルが、該サンプル帯域に適用された時、閾値量のヘモグロビンが該第1の抗体に結合され、該液体サンプル中の未結合のままのヘモグロビンが、サンプル帯域から、移動化可能な複合体の該第2の抗体にそれが結合される該複合体帯域を通り、そして移動化可能な複合体に結合した被検体は、被検体が該第3の抗体に結合され、移動化可能な複合体に結合している被検体が不動化される検出帯域を通るようにしてなり、検出可能な信号を発生することを特徴とする分析装置。

#### 【請求項17】

該視覚的に検出できる粒子が、着色ラテックス粒子および金属ゾルからなる群から選択されることを特徴とする請求項16記載の装置。

#### 【請求項18】

該視覚的に検出できる粒子が、直径約0.1 μm未満～約100 μmの着色ラテックス粒子であることを特徴とする請求項16記載の装置。

10

20

30

40

50

## 【請求項 19】

該芯の材料の 1 つが、ニトロセルロースであることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

## 【請求項 20】

該第 1 の抗体が、モノクロナールであることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

## 【請求項 21】

該第 2 の抗体が、モノクロナールであることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

## 【請求項 22】

該第 2 の抗体が、該第 1 の抗体と同じ抗体であることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

## 【請求項 23】

該第 1 の抗体が、ポリクロナールであることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

10

## 【請求項 24】

該第 3 の抗体が、該第 1 の抗体と同じ抗体であることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

## 【請求項 25】

該複合体帯域が、視覚的に検出できる粒子と複合化した抗原を含んでいる移動化可能な複合体をさらに含み、該芯の材料上にテスト完全帯域をさらに含んでなり、該テスト完全帯域は、該抗原に結合する第 4 の抗体を含んでなることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

## 【請求項 26】

該抗原が、ヤギ血清アルブミンであることを特徴とする請求項 25 記載の装置。

20

## 【請求項 27】

負の信号をさらに含み、該負の信号は、該検出帯域の芯の材料上に不動化された視覚的に検出できる粒子を含んでいることを特徴とする請求項 16 記載の装置。

## 【請求項 28】

該粒子が、水平線の芯の材料上で不動化されていて、該第 3 の抗体が、該水平線と交差する垂直線の芯の材料上で不動化されていることを特徴とする請求項 27 記載の装置。

## 【請求項 29】

互いに隣接していて、互いに吸収性接触している複数の実質的に平坦な帯域を含んでなる 1 つまたはそれ以上の芯の材料を含んでなる装置を用いる、糞便の液体サンプル中の血液の検出のための方法であって、該帯域は、ヒトヘモグロビンに結合する第 1 の抗体をその上に所定量有するサンプル適用帯域；視覚的に検出できる粒子に結合したヒトヘモグロビンに結合する第 2 の抗体を含んでなる移動化可能な複合体を含んでなる複合体帯域；および、該芯の材料上に不動化されたヒトヘモグロビンに結合する第 3 の抗体を含んでなる検出帯域を含んでなり、その中にヘモグロビンを含む糞便のサンプルが、糞便の液体サンプルをつくるように緩衝液に懸濁され、該液体サンプルが、該サンプル帯域に適用された時、閾値量のヘモグロビンが該第 1 の抗体に結合され、該液体サンプル中の未結合のままのヘモグロビンが、サンプル帯域から、移動化可能な複合体の該第 2 の抗体にそれが結合される該複合体帯域を通り、そして移動化可能な複合体に結合した被検体は、被検体が該第 3 の抗体に結合され、移動化可能な複合体に結合している被検体が不動化される検出帯域を通るようにしてなり、検出可能な信号を発生させ、該方法が：

30

糞便の液体サンプルをつくるように糞便のサンプルを緩衝液に懸濁し、；

装置のサンプル帯域に糞便の液体サンプルを適用し、；

サンプル帯域、複合体帯域および検出帯域を液体サンプルが横断するのに十分な時間待機し、；そして

40

検出帯域の外観に基づいて液体サンプル中のヘモグロビンの存在または不在を決定する

各工程を含むことを特徴とする方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

50

## 【0001】

本発明は、被検体の存在を検定する第1の工程として被検体の所定量の結合を含み、よって検定感度の制御を考慮する、改良された1段階免疫クロマトグラフィー検定に関する。このシステムは、例えば、制御された感度を有する糞便潜在血液検定に有用である。

## 【背景技術】

## 【0002】

最近の技術的進歩は、広範囲のさまざまな被検体について、特に、抗原特性を発揮する分子についての検定を望み通りに行うことを可能とした。通常、現在使用されているほとんどの検定は、液体相または固体相のフォーマットで抗原物質を結合する抗体を使用する傾向がある。最近、『1段階』免疫検定が開発され、各種の被検体の検出に使用されている。

10

## 【0003】

1段階免疫クロマトグラフィー検定は、着色粒子または他の視認できる粒子の使用を含んでいる。例えば、サンプルが吸収性物質の基質に適用され、被検体が、可動着色ラテックス粒子を有する抗体に結合する。吸収性材料の長さを横断してサンプルがクロマトグラフィーのように横断するので、被検体が結合する粒子は、次に、それら自体、不動化された免疫試薬により結合される。

## 【0004】

検定感度は、受け入れ可能な精度で測定され得る被検体の最少量と定義される。検定感度が特に問題となる1つの領域は、潜在血液の存在を検出するための糞便物質の検定にある。少量の血液は、通常、ヒトの糞サンプル中に存在する。糞中の血液の増加した量は、病理学的出血を示す。現在利用できる検定は、糞便潜在血液の異常な量を検出するのに十分な感度ではないので糞便潜在血液のレベルが約1mgのヘモグロビン/1gの糞便に達してしまう。しかしながら、糞中の血液のもっと少ない量でも、異常出血を示している。よって、糞便潜在血液について現在利用できる検定は、糞中の血液の異常に高いレベルの存在を検出するのに十分な感度ではない。しかしながら、糞便潜在血液についての検定の感度は、糞中の血液の正常なレベルが正(positive)のテスト結果を与える点までに増加されるべきではない。

20

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

30

## 【0005】

したがって、糞便潜在血液のような被検体の検出のための簡単で、正確で、再現性のある、制御された、あらかじめ定められた検定感度を与える検定が必要とされている。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明の改良された免疫クロマトグラフィー検定は、抗体に所定量の被検体を結合させることを含んでいて、検定感度の制御を可能としている。本発明は、信号発生が、膜を通る粒子の移動の利用により得られる検定で有用であり、特に、制御された感度の糞便潜在血液検定として有用である。

## 【発明を実施するための最良の形態】

40

## 【0007】

本発明の1態様に従えば、サンプル中の被検体の存在の検出のための制御された感度を有する分析装置が提供される。該装置は、互いに隣接していて、互いに吸収性接触している複数の実質的に平坦な帯域を有する芯の材料と、サンプルの適用に先立ちサンプルパッドに適用された被検体に対する第1の抗体を所定量含むサンプル適用パッドと、移動性粒子に結合した被検体の第2の抗体を含む複合体帯域と、該芯の材料上に不動化された被検体の第3の抗体を含んでなる検出帯域とを含んでいる。被検体を含む液体サンプルが、該サンプルパッドに適用された時、閾値量の被検体が該第1の抗体に結合され、サンプル中の未結合のままの被検体が、サンプルパッドから、第2の抗体にそれが結合される複合体帯域を通り、そしてそれが第3の抗体に結合され、不動化される検出帯域を通るように

50

してなる。

【0008】

移動性粒子は、好ましくは、着色ラテックス粒子または金属ゾルであり、さらに好ましくは、着色ラテックス粒子である。芯の材料は、好ましくは、ニトロセルロースであり、第1と第2の抗体は、好ましくは、モノクロナールである。好ましい実施態様では、第2の抗体は、第1の抗体と同じである。もう1つの好ましい実施態様では、第1の抗体は、ポリクロナールである。さらにもう1つの好ましい実施態様では、第3の抗体は、第1の抗体と同じ抗体である。

【0009】

さらにもう1つの好ましい実施態様では、複合体帯域が、さらに、移動性粒子と複合化した抗原を含み、そして、装置が、さらに、抗原に対する第4の抗体を含んでいるテスト完全帯域を含んでなる。好ましくは、抗原はヤギ血清アルブミンである。もう1つの好ましい実施態様では、本発明の装置は、検出帯域の膜上に不動化された視覚的に検出できる粒子を含んでいる負(negative)の信号を含んでいる。粒子が、好ましくは、水平線の膜上で不動化されていて、第3の抗体が、水平線と交差する垂直線の膜上で不動化されている。

10

【0010】

本発明のもう1つの態様に従えば、互いに隣接していて、互いに吸収性接触している複数の実質的に平坦な帯域を有している芯の材料と、サンプルの適用に先立ちサンプルパッドに適用された被検体に対する第1の抗体の所定量を含むサンプル適用パッドと、移動性粒子に結合した被検体の第2の抗体を含んでいる複合体帯域と、芯の材料に不動化した第3の抗体を含んでいる検出帯域とを含んでなる装置を用いてサンプル中の被検体を検出する方法が提供される。被検体を含む液体サンプルが、サンプルパッドに適用された時、閾値量の被検体が第1の抗体に結合され、サンプル中の未結合のままの被検体が、サンプルパッドから、第2の抗体にそれが結合される複合体帯域を通り、そして第3の抗体にそれが結合され不動化される検出帯域を通る。本発明の方法は、装置のサンプルパッドに液体サンプルを適用する段階、サンプルパッド、複合体帯域および検出帯域をサンプルが横断するのに十分な時間待機する段階、並びに検出帯域の外観に基づいてサンプル中の被検体の存在または不在を決定する段階を含んでなる。

20

【0011】

本発明のもう1つの態様に従えば、支持体層上の抗原と抗体との相互作用を含むサンプル中の被検体の存在の検出のための1段階免疫クロマトグラフィー検定において、検定に用いられる試薬の1種が、被検体に対する第1の抗体が結合される第1の移動性の粒子を含み、もう1種の試薬が、支持体層上の第1の所定の帯域で不動化されている被検体に対する第2の抗体を含んでなり、サンプルを第1と第2の抗体に接触させる前に、サンプルを、被検体に対する所定量の抗体と接触させる段階を含んでなる改良が提供され、抗体が、サンプルの適用前に支持体層上の第2の所定の帯域に適用される。

30

【0012】

本発明のさらにもう1つの態様に従えば、ヒトの糞便のサンプル中の血液の存在の検出のための制御された感度を有する分析装置において、互いに隣接していて、互いに吸収性接触している複数の実質的に平坦な帯域を有する芯の材料と、サンプルの適用に先立ちサンプルパッドに適用されたヒトヘモグロビンに対する第1の抗体を所定量含むサンプル適用パッドと、移動性の粒子に結合したヒトヘモグロビンに対する第2の抗体を含んでなる複合体帯域と、芯の材料上に不動化されヒトヘモグロビンに対する第3の抗体を含んでなる検出帯域とを含んでいる分析装置が提供される。ヘモグロビンを含む糞便のサンプルが、緩衝液に懸濁させられ、サンプルパッドに適用された時、閾値量のヘモグロビンが第1の抗体に結合され、サンプル中の未結合のままのヘモグロビンが、サンプルパッドから、第2の抗体にそれが結合される複合体帯域を通り、かつ第3の抗体に結合され、不動化される検出帯域を通るようにしてなり、検出可能な信号を発生する。

40

【0013】

50

移動性粒子は、好ましくは、着色ラテックス粒子または金属ゾルであり、さらに好ましくは、着色ラテックス粒子である。芯の材料は、好ましくは、ニトロセルロースである。第1と第2の抗体は、好ましくは、モノクロナールである。好ましい実施態様では、第2の抗体は、第1の抗体と同じである。もう1つの好ましい実施態様では、第1の抗体は、ポリクロナールである。さらにもう1つの好ましい実施態様では、第3の抗体は、第1の抗体と同じである。

【0014】

もう1つの好ましい実施態様では、複合体帯域が、さらに、移動性粒子と複合化した抗原を含み、そして、装置が、さらに、抗原に対する第4の抗体を含んでいるテスト完全帯域を含んでなる。好ましくは、抗原はヤギ血清アルブミンである。

10

【0015】

さらにもう1つの好ましい実施態様では、本発明の装置は、検出帯域の膜上に不動化された視覚的に検出できる粒子を含んでいる負の信号をさらに含んでいる。粒子が、好ましくは、水平線の膜上で不動化されていて、第3の抗体が、好ましくは、水平線と交差する垂直線の膜上で不動化されている。

【0016】

本発明のさらにもう1つの態様に従えば、互いに隣接していて、互いに吸収性接触している複数の実質的に平坦な帯域を有している芯の材料と、サンプルの適用に先立ちサンプルパッドに適用されたヒトヘモグロビンに対する第1の抗体の所定量を含むサンプル適用パッドと、移動性粒子に結合したヒトヘモグロビンに対する第2の抗体を含んでいる複合体帯域と、芯の材料に不動化したヒトヘモグロビンに対する第3の抗体を含んでいる検出帯域とを含んでなる装置を用いて糞便のサンプル中の血液を検出する方法が提供される。ヘモグロビンを含む糞便のサンプルが、緩衝液中に懸濁され、サンプルパッドに適用された時、閾値量のヘモグロビンが第1の抗体に結合され、サンプル中の未結合のままのヘモグロビンが、サンプルパッドから、第2の抗体にそれが結合される複合体帯域を通り、そして第3の抗体にそれが結合され不動化される検出体帯域を通り、検出可能な信号を発生する。本発明の方法は、糞便のサンプルを緩衝液に懸濁させる段階、装置のサンプルパッドに糞便のサンプルを含む緩衝液を適用する段階、サンプルパッド、複合体帯域および検出帯域を緩衝液が横断するのに十分な時間待機する段階、並びに検出帯域の外観に基づいてサンプル中のヘモグロビンの存在または不在を決定する段階を含む。

20

30

【0017】

我々は、調節可能な分析感度を有する改良した1段階免疫クロマトグラフィー検定を見いだした。この改良点は、ここに参考のために入れたF a n e t a l . の米国特許第5,096,837号及び同第5,223,220号に開示の形式の免疫クロマトグラフィー検定に特に適用できる。しかしながら、この改良点は、信号発生が、膜を通る水平方向の粒子の移動の使用により得られるすべての検定に適用可能である。

【0018】

A. 抗体 - ラテックス複合体の準備

均一なラテックス粒子(『ULP』)は、通常、小径の極めて均一な球体である。典型的な直径は、約0.1 μm未満~約100 μmの範囲である。5 μmよりも小さな粒子は、通常、エマルジョン重合により得られる。

40

【0019】

例えば簡単な吸着または共有結合を介するタンパク質 - ラテックス複合体の基本的なプロセスは、着色ラテックス粒子の使用のように、本分野で周知であり、検定の分解能と読み取り性(readability)を増す。さまざまな複合体化の手順が、Bangs, L. B. の1989年、Amer. Assoc. Clin. Chem. 第41回全国会議(the 41st National Meeting)のワークショップで提出され、Seragen Diagnostics Inc., Indianapolis, INから印刷された形で入手可能な『均一ラテックス粒子(Uniform Latex Particles)』、またはGalloway, R. J. の『マイ

50

クロ微粒子テストと免疫検定の発達 (Development of Microparticle Tests and Immunoassays)』、Seradyn, Inc., Indianapolis, IN. に一般的用語で説明されている。

【0020】

被覆したラテックス粒子の1つの製造方法は、例えば、吸着法である。一般的言い方として、1) 純粋な試薬を使用すべきである; 2) 被覆に先立ち粒子を清浄にすべきである; 3) 粒子の定量的な表面被覆面積およびリガンド化学を測定すべきである。

【0021】

例えば、抗体-ラテックス複合体(『Ab-ラテックス』)は、次の方法により製造できる: 最も簡単な場合、適当なリガンドを緩衝液に溶解させ、ラテックス懸濁物に添加し、2、3分~24時間以上の間攪拌する。平衡化の後、ラテックスを遠心分離し、未吸着のリガンドを含む上澄みを捨てる。ラテックスは、新たな緩衝液中に再び懸濁させてから遠心分離し、上澄みを再び捨てる。これらの段階を繰り返し、ラテックスが、なんらの残留未吸着リガンドがなくなるまで洗浄されることが確認されるべきである。この際、ラテックス被覆プロセスは、完全であろうし、ラテックスは、ラテックス凝集検定に用いるのに準備される。

10

【0022】

共有カップリング(covalent coupling)は、ラテックス粒子表面へのリガンドまたはほかの物質の永久的結合あるいは共有結合を含む。共有カップリングが、より抜きの方法であるなら、リガンドをまずラテックス粒子にカップルさせ、次に、ラテックス粒子の懸濁物の安定性を保持し、さらに、タンパク質が変質するのを防がねばならない。(共有カップリング技術の一般的な説明およびより詳細な引用については、ここに参考としてあげるBangs, L. B. 『均一なラテックス粒子』を参照されたい。)

20

【0023】

上記の説明は、ラテックス粒子の状況についてであるが、ほかの合成粒子および金属コロイドまたは粒子(例えば金ゾル粒子)を限定することなく含むほかの粒子が使用できることが認識される。これらの粒子およびその製造方法は、本分野で周知である。

【0024】

B. BSA-ラテックス複合体の準備

ウシ血清アルブミン-ラテックス複合体(『BSA-ラテックス』)の準備は、BSAが用いられることを別にして、上記のように抗体-ラテックス(Ab-ラテックス)の準備と同様である。別法として、BSAの代わりにほかのタンパク質を用いてもよく、例えば、ラクトアルブミン、カゼイン、グロブリン、非特異的免疫グロブリン(これは、抗原-抗体反応で沈殿しない)および非特異的結合を阻害できる同様なアルブミンを含むほかのアルブミンを用いてもよい。

30

【0025】

C. GSA-ラテックス複合体の準備

ヤギ血清アルブミン-ラテックス複合体(『GSA-ラテックス』)の準備は、GSAがBSAの代わりに用いられることを別として、上記のBSA-ラテックスの準備と同様である。この場合も、他のタンパク質が、ヤギ血清アルブミンの代わりに用いられてもよく、それは、下記に詳述するように『テスト完全』信号または正の手順コントロール信号を発生する手段として用いられる。

40

【0026】

D. 複合体の混合物

Ab-ラテックス、BSA-ラテックスおよびGSA-ラテックスを、行うべきテストに応じて、さまざまな比で一緒に混合する。検定の性質に応じて、比をかなり変えることができ、アルブミンで標識付けしたラテックスの量が大きいほど非特異的結合の大きな減少がある。抗体を付着させないラテックスの量は、非特異的結合または疑似的な正を明白に減少させるのに有効な量であり得る。そのような量は、すぐにわかる実験的方法により容易に決定される。

50

## 【0027】

## E. 1 段階検定手順

## 1. 1 段階反応ユニットの調製

固相検定フォーマットでの本発明の使用の1例は、本質的に次のように進み得る。反応装置は、検定のための固体の支持体を含む固体の、典型的にはプラスチックのハウジングからなる。固体支持体は、好ましくは、液体を吸引する芯の材料からなる。好ましくは、ニトロセルロースのような膜ストリップが用いられる。膜は、好ましくは、孔の大きさ約8 $\mu$ を有するニトロセルロース膜のストリップからなるが、より大きなまたはより小さな孔の大きさも使用可能である。約3 $\mu$ ~約12 $\mu$ の範囲の孔の大きさが好ましい。

## 【0028】

膜の右端は、サンプルウエルと接触している。サンプルウエルは、膜に沿って右から左にサンプル液体の一樣な流れを与える吸収性パッドを含んでいる。別法として、反応ユニットは、サンプルの流れが、左から右に、または膜を横断する他の方向(orientation)となるように組み立てられることができる。

## 【0029】

検定の感度の制御を考慮に入れるため、テスト被検体に特異的なモノクロナールまたはポリクロナール抗体またはそのフラグメントを緩衝液中でサンプルパッドに沈殿させてから乾燥させる。被検体を含むサンプルをサンプルパッドに加えた時、パッドに沈殿した抗体が被検体のいくらかに結合するであろう。抗体に結合しない過剰の被検体は、サンプルパッドを通して進み、膜へと入り、膜に沈殿している抗体で被覆された移動性の着色ラテックス粒子と反応する。サンプルパッドに適用する抗体の量を変えることにより、被検体のベースラインすなわち閾値が設定される。この閾値レベルを越える量でサンプルに存在する被検体は、結合されずにサンプルパッドを通り膜へと進み、正の結果を与える。閾値レベルよりも少ない量でサンプル中に存在する被検体は、抗体に結合され、抗体で被覆された移動性の着色ラテックス粒子とは反応しないであろうし、負の結果が、当然の結果となろう。このことは、検定の感度が、反応装置の製造中にあらかじめ設定されることを可能とする。

## 【0030】

移動性粒子、たとえば、着色ラテックス粒子は、膜の第1の帯域、複合体帯域に適用される。これらの粒子は、所望の被検体を固定する適当な抗体と複合体を形成し、そして、サンプルパッドに適用したのと同じ抗体であり得る。この帯域は、非特異性結合を減じるBSA-ラテックスおよびGSA-ラテックス(正の手順コントロールとして働く)の複合体をも含み得る。

## 【0031】

膜上の第2の帯域、検出帯域では、第2の抗体が不動化される。この抗体も、被検体に対して向けられ、ポリクロナールまたはモノクローナールであり得る。被検体が閾値レベルよりも上でサンプル中に存在すると、第2の帯域の抗体は、被検体に結合し、これが、移動性の着色ラテックス粒子と複合化した抗体に結合する。結果は、膜の上の第2の帯域に不動化された視覚的に検出できる抗体-抗原-抗体複合体『サンドイッチ』である。

## 【0032】

また、第2の帯域には、通常は、水平線の形式である、不動化された『負の』信号が好ましくはある。この線は、好ましくは、膜上で不動化された視覚的に検出できる粒子例えば着色ラテックス粒子を含んでなる。好ましくは、上記の第2の抗体は、負の信号と交差する垂直線の膜の上で不動化されている。よって、被検体が、閾値レベルよりも大きな量でサンプル中に存在しないときは、水平な負の信号だけが、視認できる。被検体が、閾値レベルを越える量で存在するときは、被検体-抗体複合体が、第2の抗体に結合され、正または『+』の信号が膜の上に現れる。

## 【0033】

第3の試薬が用いられてもよく、好ましくは、膜状の第3の帯域、テスト完全帯域に付着される。この試薬は、サンプルが加えられた後第1の帯域から移動する粒子を固定し得

10

20

30

40

50

る。この第3の薬剤は、手順コントロールとして働き得、検定が完全であることを示すように働き得るか、または例えば第3の薬剤が不動化される帯域で検出可能な応答が起こるかどうかを適切に行うことを示すように働き得る。この第3の薬剤は、抗原-ラテックス複合体例えばGSA-ラテックス複合体を固定する抗体を含んでなる。

#### 【0034】

本発明のクロマトグラフィー検定テスト手順では、液体試験体が、第1の帯域に近接する固体の支持体に適用される。上記したように、サンプル中に存在する抗原の所定量が、サンプルパッド上に存在する抗体に結合する。流体が、毛管作用により膜の第1の帯域へと移動すると、それは、抗体を有するラテックス粒子または粒子と複合化したタンパク質を移動させる。閾値レベルを越えてサンプル中に存在する抗原は、ラテックス粒子上の抗体に結合する。次に流体は、膜を横断して粒子を次の1つの帯域または複数の帯域に移動させる。被検体が、閾値レベルを越えてサンプル中に存在すると、不動化した抗体/被検体/抗体-複合化粒子の『サンドイッチ』が形成され、検出できる結果が生じる。流体が膜を横断して粒子を移動させ続けると、流体と粒子は、第3の試薬(膜上に不動化される)と接触して結合する。すると、その帯域に検出可能な応答が起こるはずである:これは、テストが有効であることまたはテストが完全であることを示す。

10

#### 【実施例】

#### 【0035】

本発明は、好ましい実施態様の典型である以下の実施例によりよりよく理解できるが、これらの実施例は、本発明の範囲を制限するものと解釈されるべきものではない。

20

#### 【0036】

##### 例1

##### 糞便潜在血液反応ユニットの準備

本発明の1つの実施態様で用いられる検定反応ユニットは、プラスチックケーシングに収納した孔の大きさ8 $\mu$ を有するニトロセルロースの1cm $\times$ 5cmのストリップを含んでなる。吸収性サンプルパッドに、40 $\mu$ Lの捕獲溶液(capture solution)を加えた。捕獲溶液は、150~200 $\mu$ g/mLのモノクローナル抗ヒトヘモグロビン(抗-h Hb)、5mg/mLの親和性-精製済ウサギIgG、2%のカゼイン、5%のZwittergent(CalBiochem, La Jolla, CA)、0.22MのTris(Sigma Co., St. Louis, MO)および0.01mg/mLのフルオレセインを含んでなり、pH8.2であった。捕獲溶液は、反応ユニットのサンプルパッド上に付着させてから乾燥させた。

30

#### 【0037】

ラテックス抗ヒトヘモグロビン被覆溶液約3 $\mu$ L(2.0~3.5mg)を膜の第1の帯域に適用した。被覆溶液は、約0.30~0.34 $\mu$ mの青色ラテックス粒子に複合化した0.15~0.25%のモノクローナル抗ヒトヘモグロビン、0.5%のヤギ血清アルブミン-青色ラテックス複合体および被覆溶液の全ラテックス濃度を1.7%にするのに十分な量のウシ血清アルブミン-白色ラテックス複合体を含んでなるようにした。

#### 【0038】

正の線被覆溶液約0.5 $\mu$ Lを、垂直線の膜の第2の帯域に適用した。被覆溶液は、pH7.7で、4mg/mLの親和性精製済ウサギ抗ヒトヘモグロビンと0.01mg/mLのフルオレセインとをPBS/NaN<sub>3</sub>に含んでなるようにした。

40

#### 【0039】

この第2の帯域では、また、負の信号が、水平線の膜上に負のラテックス溶液0.5 $\mu$ Lを適用することによりつくられた。負のラテックス溶液は、pH8.5で、0.75%の青色のラテックスと0.2%のPEGとを40mMのほう酸塩に含んでなるようにした。

#### 【0040】

『テスト完全』信号は、膜の第3の帯域につくられた。PBS/NaN<sub>3</sub>に含むようにした0.5mg/mLの親和性精製済ウサギ抗ヤギアルブミン抗体を含んでなる溶液0

50

．5  $\mu$ L を、第3の位置で膜上に付着させた。

【0041】

反応ユニットを組み立てるため、膜をプラスチックのハウジングに入れた。ハウジングは、サンプル添加ウエルと膜の視認ができる開口部すなわち窓を含んでいた。膜をハウジングの中に入れ、サンプルパッドをサンプル添加ウエルの下方とし、膜の一端をサンプルパッドに接触させ、膜の第2と第3の帯域が、プラスチックケーシングの窓を通して視認できるようにした。

【0042】

例 I I

1 段階糞便潜在血液検定手順

0.0 ~ 25.0 mg / g の範囲の量のヒトヘモグロビンを、ヒトの糞便に加えた。検定の特異性の対照として、1.0 mg / g のウシヘモグロビンをヒト糞便に加えた。ヘモグロビンを含む糞便物質の各サンプル約12 mg を、1.25 mL の輸送緩衝液 ( t r a n s p o r t b u f f e r ) を含む管に入れた。輸送緩衝液は、pH 8.8 で、1.0 % のプロテアーゼを含まない B S A 、 2 m M の E D T A 、 5 0 m M の T r i s ( S i g m a C o . , S t . L o u i s , M O ) 、 0 . 8 8 % の N a C l 、 0 . 0 3 7 % のホルムアルデヒド、0.1 % の P r o c l i n 3 0 0 ( R o h m - H a s s , P h i l a d e l p h i a , P A ) および 0 . 1 % の N a N 3 を含んでるようにした。それぞれの管をふたをして10 ~ 15回振盪させて糞便物質を緩衝液に懸濁させた。

10

【0043】

糞便物質を含む緩衝液約200 ~ 250  $\mu$ L を、例1に記載の1段階反応ユニットのサンプルパッドに加えた。テスト結果は、反応ユニットへのサンプルの添加後、10分、30分および60分で読み取った。発生した信号は、負または正とした：結果は、プレプリントした青色の水平線だけが膜上の第2の帯域に視認できたとき負と判断し、青色が、膜上の第2の帯域の垂直線に視認できたとき正と判断した。それぞれのサンプルは、本発明の反応ユニットの3つの異なる製造ロットを用いてテストした。

20

【0044】

各サンプルは、また、H e m o c c u l t ( 登 録 商 標 ) S E N S A ( 登 録 商 標 ) ( S m i t h K l i n e D i a g n o s t i c s , S u n n y v a l e , C A ) および O C - H e m o d i a ( 登 録 商 標 ) ( E i k e n , J a p a n ) を用いて製造者の指示に従ってテストした。検定の結果を表1 ~ 3に示す。

30

【0045】

【表 1】

表 1

CARDS<sup>®</sup> O.S.<sup>®</sup> FOBT、SKD Homocult<sup>®</sup> SENSEA<sup>®</sup> および Eiken OC-Hemodia<sup>®</sup> の説明

mg Hb/g 糞便	CARDS <sup>®</sup> O.S. <sup>®</sup> FOBT(Lot #B01032)			SKD Homocult <sup>®</sup>	Eiken
	10 min 読み	30 min 読み	60 min 読み	SENSEA <sup>®</sup>	OC-Hemodia <sup>®</sup>
0.000	負	負	負	負	負
0.005	負	負	負	負	負
0.010	負	負	負	負	負
0.050	負	正/負*	正/負*	負	正
0.100	負	正	正	負	正
0.200	正	正	正	負	正
0.500	正	正	正	負	正
1.000	正	正	正	正	正
2.500	正	正	正	正	正
5.000	正	正	正	正	正
10.000	正	正	正	正	正
25.000	正	正	正	正	正
1.0 mg bov. Hb/g	負	負	負	正	負

\* 3つの反応ユニットのうち1つが正であり、3つの反応ユニットのうち2つが負であった。

【0046】

10

20

## 【表 2】

表 2

CARDS<sup>®</sup> O.S.<sup>®</sup> FOBT、SKD Hemocult<sup>®</sup> SENA<sup>®</sup> および Eiken OC-Hemodia<sup>®</sup> の説明

mg Hb/g 糞便	CARDS <sup>®</sup> O.S. <sup>®</sup> FOBT (Lot #B02001)			SKD Hemocult <sup>®</sup>	Eiken
	10 min 読み	30 min 読み	60 min 読み	SENA <sup>®</sup>	OC-Hemodia <sup>®</sup>
0.000	負	負	負	負	負
0.005	負	負	負	負	負
0.010	負	負	負	負	負
0.050	負	正	正	負	正
0.100	正	正	正	負	正
0.200	正	正	正	負	正
0.500	正	正	正	負	正
1.000	正	正	正	正	正
2.500	正	正	正	正	正
5.000	正	正	正	正	正
10.000	正	正	正	正	正
25.000	正	正	正	正	正
1.0 mg bov. Hb/g	負	負	負	正	負

10

20

【0047】

【表 3】

表 3

CARDS<sup>®</sup> O.S.<sup>®</sup> FOBT, SKD Homocult<sup>®</sup> SENSEA<sup>®</sup> および Eiken OC-Hemodia<sup>®</sup> の説明

mg Hb/g 糞便	CARDS <sup>®</sup> O.S. <sup>®</sup> FOBT (Lot #B04056.2)			SKD Homocult <sup>®</sup>	Eiken
	10 min 読み	30 min 読み	60 min 読み	SENSEA <sup>®</sup>	OC-Hemodia <sup>®</sup>
0.000	負	負	負	負	負
0.005	負	負	負	負	n.t.
0.010	負	負	負	負	負
0.050	正/負*	正	正	負	正
0.100	正	正	正	負	正
0.200	正	正	正	負	正
0.500	正	正	正	負	n.t.
1.000	正	正	正	正	n.t.
2.500	正	正	正	正	正
5.000	正	正	正	正	n.t.
10.000	正	正	正	正	n.t.
25.000	正	正	正	正	正
1.0 mg bov. Hb/g	負	負	負	正	負

\* 3つの反応ユニットのうちの1つが正であり、3つの反応ユニットのうち2つが負であった。

## 【0048】

表1～3に示したように、本発明の検定は、糞便中の0.050 mg/gのヘモグロビンの存在を検出する。 30

## 【0049】

## 例 I I I

## 1段階糞便潜在血液検定の感度

サンプルは、各種濃度のヒトヘモグロビンを輸送緩衝液に加えて準備した。サンプルは、例 I I Iについて上記に説明したように本発明の1段階糞便潜在血液検定を用いてテストした。サンプル添加30分後、それぞれの結果を負または正と判断した。サンプルは、本発明の反応ユニットの3つの異なる製造ロットを用いてテストした。

## 【0050】

サンプルは、また、前記 Hemocult SENSEA および OC-Hemodia を用いて製造者の指示に従ってテストした。検定の結果を表4に示す。本発明の検定は、0.5～1.0 μg/mLのヘモグロビンを含むサンプルについて正の結果を与えた。 40

## 【0051】

【表 4】

表 4

Serial Hemoglobin Dilutions を用いた CARDS<sup>®</sup>O.S.<sup>®</sup>FOBT の分析感度  
 REACTION UNIT ロット#B01032、#B02001、#B04056.2  
 SKD Hemocult<sup>®</sup> SENSEA<sup>®</sup> スライド ロット#50929A 実験 6/95  
 Eiken OC-Hemodia<sup>®</sup> ロット#33020 実験 3/94

HuHb 濃度 (ug/mL)	CARDS <sup>®</sup> O.S. <sup>®</sup> 説明 Lot #B01032	CARDS <sup>®</sup> O.S. <sup>®</sup> 説明 Lot #B02001	CARDS <sup>®</sup> O.S. <sup>®</sup> 説明 Lot #B04056.2	Homocult <sup>®</sup> SENSEA <sup>®</sup> 説明	OC-Hemodia <sup>®</sup> 説明
1000	正	正	負	正	正
500	正	正	正	正	正
250	正	正	正	正	正
100	正	正	正	正	正
50	正	正	正	正	正
25	正	正	正	正	正
10	正	正	正	負	正
5	正	正	正	負	正
2	正	正	正	負	正
1	正	正	正	負	正
0.5	負	負	正	負	正
0.1	負	負	負	負	負
0.025	負	負	負	負	負
輸送緩衝液	負	負	負	負	負

10

20

## 【0052】

30

検定結果と比較する目的または試薬の実行可能性 (viability) をテストする目的で対照溶液も用いられ得る。例えば、ヒトヘモグロビンを含む正の対照を用いることができる。ウシヘモグロビンを含む負の対照を用いることができる。これらの対照は、サンプルとして同じようにして反応ユニットでテストされるべきである。対照は、ここに記載の検定成分および試薬のいずれかまたは全てを有するようにキットの形式にしてよい。

本発明を特定の実施態様により説明したが、特許の保護範囲はこれらの特定の実施態様に限定されるものではなく、特許請求の範囲により決定されるのもであることを意図する。

---

フロントページの続き

(72)発明者 ヤー - チエン スー

アメリカ合衆国 9 2 0 2 4 カリフォルニア エンシニタス ユーゲニー アベニュー 8 6 5

(72)発明者 ベントリー タム

アメリカ合衆国 9 2 1 2 8 カリフォルニア サン デイエゴ ペブルブルツク レーン 1 4  
0 2 5

Fターム(参考) 2G045 AA25 CB04 DA51 DA77 FB03 FB15

专利名称(译)	具有可控灵敏度的免疫色谱测定		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005189246A</a>	公开(公告)日	2005-07-14
申请号	JP2005055177	申请日	2005-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	奎德尔公司税率西庸		
申请(专利权)人(译)	Kuideru企业庸列城		
[标]发明人	ハンスアールペーリンガー ジヤンエルサブラン ヤーチエンスー ベントリータム		
发明人	ハンス アール. ペーリンガー ジヤン エル. サブラン ヤー-チエン スー ベントリー タム		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/558 G01N33/72		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/726 Y10S435/962 Y10S435/967 Y10S435/97 Y10S436/81 Y10S436/824 Y10S436/825		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/50.N G01N33/72.A		
F-TERM分类号	2G045/AA25 2G045/CB04 2G045/DA51 2G045/DA77 2G045/FB03 2G045/FB15		
代理人(译)	川崎孝雄		
优先权	08/287179 1994-08-08 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

### 摘要(译)

要解决的问题：提供简单，准确和可控的测定，具有检测分析物的可重复性，例如粪便中的隐血，并且能够赋予规定的测定灵敏度。解决方案：提供免疫色谱测定，其包括将规定量的分析物与抗体结合，作为测定分析物存在的第一步，并且能够控制测定灵敏度，及其系统。Ž

CARDS<sup>®</sup> 0.5<sup>®</sup> FOBT, SKD Homocult<sup>®</sup> SENSEA<sup>®</sup> および Eiken OC-Hemodia<sup>®</sup> の説明

mg Hb/g 粪便	CARDS <sup>®</sup> 0.5 <sup>®</sup> FOBT(Lot: #801032)			SKD Homocult <sup>®</sup>	Eiken
	10 min 読み	30 min 読み	60 min 読み	SENSEA <sup>®</sup>	OC-Hemodia <sup>®</sup>
0.000	負	負	負	負	負
0.005	負	負	負	負	負
0.010	負	負	負	負	負
0.050	負	正/負*	正/負*	負	正
0.100	負	正	正	負	正
0.200	正	正	正	負	正
0.500	正	正	正	負	正
1.000	正	正	正	正	正
2.500	正	正	正	正	正
5.000	正	正	正	正	正
10.000	正	正	正	正	正
25.000	正	正	正	正	正
1.0 mg bov. Hb/g	負	負	負	正	負