

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3696874号

(P3696874)

(45) 発行日 平成17年9月21日(2005.9.21)

(24) 登録日 平成17年7月8日(2005.7.8)

(51) Int. Cl.⁷

GO 1 N 33/543

F I

GO 1 N 33/543 5 9 1

GO 1 N 33/543 5 2 5 U

GO 1 N 33/543 5 2 5 W

請求項の数 6 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2004-364868 (P2004-364868)	(73) 特許権者	594199337
(22) 出願日	平成16年12月16日(2004.12.16)		オルソークリニカル ダイアグノスティクス、インコーポレイティド
(62) 分割の表示	特願平7-101040の分割		アメリカ合衆国、ニューヨーク 14650、ロチェスター、インディゴ クリーク
原出願日	平成7年4月25日(1995.4.25)		ドライブ 100
(65) 公開番号	特開2005-164603 (P2005-164603A)	(74) 代理人	100077517
(43) 公開日	平成17年6月23日(2005.6.23)		弁理士 石田 敬
審査請求日	平成16年12月16日(2004.12.16)	(74) 代理人	100092624
(31) 優先権主張番号	232920		弁理士 鶴田 準一
(32) 優先日	平成6年4月25日(1994.4.25)	(74) 代理人	100087871
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100082898
			弁理士 西山 雅也

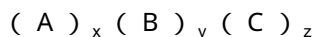
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 水溶性ポリマー

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

a) バナジウム I V イオンと、b) 以下の一般構造式 (I) :



〔上式中、Aは、アクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-t-ブチルアクリルアミド、1-ビニルイミダゾール、N-ビニルピロリドン、N-メチロールアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルアクリレート及び2,3-ジヒドロキシプロピルアクリレートから成る群より選ばれた親水性モノマーの重合体を表し、

Bは、スルホネート基、スルフェート基、カルボキシレート基、ホスホネート基、ホスフェート基、-ジケトン基、第一、第二又は第三アミン基、カルボニル基、カルボキシ基及びヒドロキシル基から成る群より選ばれたアニオン性基又は金属錯体形成性基又はリガンド形成性基を含有するモノマーから選ばれたモノマーの重合体を表し、

Cは、免疫検定用分析要素に適合する他の任意のモノマーから誘導された反復単位を表し、

xは20~98重量%であり、

yは2~80重量%であり、そして

zは0~20重量%である〕

で示される反復重合単位とを含有する水溶性ポリマー。

【請求項2】

Bが、スルホネート、-ジケトン及び第一アミンから成る群より選ばれた成分を有す

10

20

るモノマーの重合体であり、且つCがアクリルニトリル、マレイミド、メタクリルアミド又はN - t - ブチルアクリルアミドを表す、請求項1記載のポリマー。

【請求項3】

Bが、N - (3 - アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド、2 - アセトアセトキシエチルメタクリレート、N - (2 - アセトアセトキシエチル)アクリルアミド、N - (2 - アセトアセトアミドエチル)メタクリルアミド、2 - アクリルアミド - 2 - メチルプロパンスルホン酸ナトリウム、3 - アクリロイルオキシプロパン - 1 - スルホン酸ナトリウム、2 - アミノエチルメタクリレート塩酸塩、N - (3 - アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩、アクリル酸、メタクリル酸、3 - (p - ビニルベンジルチオ)プロピオン酸、2 - ホスファートエチルアクリレート、2 - ホスファートエチルメタクリレート、3 - 10
ホスファートプロピルアクリレート、3 - ホスファートプロピルメタクリレート、2 - スルファートエチルメタクリレート又はN - (m - 若しくはp - ビニルベンジル)ニトリロニ酢酸の重合体を表す、請求項1記載のポリマー。

【請求項4】

ポリマーが、バナジウムIVイオンと、ポリ〔アクリルアミド - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕、ポリ(アクリルアミド - コ - アクリル酸)、ポリ(アクリルアミド - コ - 2 - アクリルアミド - 2 - メチルプロパンスルホン酸ナトリウム)、ポリ〔アクリルアミド - コ - N - t - ブチルアクリルアミド - コ - N - (3 - アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩〕及びポリ〔アクリルアミド - コ - 2 - アクリルアミド - 2 - メチルプロパンスルホン酸ナトリウム - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕から成る群より選ばれた第二のポリマーとを含有する、請求項2記載のポリマー。 20

【請求項5】

前記ポリマーが、ポリ〔アクリルアミド - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕{モノマー重量比70/30}、ポリ(アクリルアミド - コ - アクリル酸){モノマー重量比90/10}、ポリ〔アクリルアミド - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕{モノマー重量比80/20}、ポリ〔アクリルアミド - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕{モノマー重量比90/10}、ポリ〔アクリルアミド - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕{モノマー重量比95/5}、ポリ(アクリルアミド - コ - 2 - アクリルアミド - 2 - メチルプロパンスルホン酸ナトリウム){モノマー重量比20/80}、ポリ〔アクリルアミド - コ - N - t - ブチルアクリルアミド - コ - N - (3 - アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩〕{モノマー重量比45/45/10}又はポリ〔アクリルアミド - コ - 2 - アクリルアミド - 2 - メチルプロパンスルホン酸ナトリウム - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕{モノマー重量比50/45/5}から選ばれた、請求項4記載のポリマー。 30

【請求項6】

請求項1記載のポリマーと西洋ワサビペルオキシダーゼ又はその複合体を含む組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、免疫検定用要素とその免疫検定における使用に関する。

【背景技術】

【0002】

自然の免疫学的反応を利用する免疫検定法は、臨床化学における分析手法として広く採用されている。それらの反応の特異性ゆえ、免疫検定法は、生物学的流体中に非常に低濃度で存在する生物学的アナライトを定量するのに特に有利である。こうしたアナライトには、例えば、抗原、抗体、治療薬、麻薬、酵素、ホルモン、タンパク質、等が含まれる。

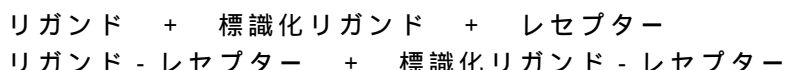
【0003】

本明細書では、検定の標的であるアナライトをリガンドと称し、また標識化したアナラ 50

イトを標識化リガンド（このようなりガンドの免疫能誘導体及びアナログを含む）と称する。本明細書では、このリガンドや標識化リガンドを特異的に認識しそれらと反応して複合体を形成する化合物を、レセプターと称する。レセプターとリガンド又は標識化リガンドはコンジュゲートペアを形成する。このペアのいずれの成分もレセプター又はリガンドとして機能することができる。

【0004】

競争的結合免疫検定法では、所定量の適当なレセプターと反応させるために、標識化リガンドを標識されていないリガンドと競争するように配置する。結合している又は結合されていない（すなわち、遊離の）標識化リガンドのいずれかの信号測定値から、未知濃度のリガンドを定量することができる。反応は以下のように進行する。



10

【0005】

免疫検定用分析要素は知られている。一般に、このような要素は、リガンドに対する抗体のようなレセプターを粒状層内に固定化して含む。さらに、要素は、結合した種又は結合されていない種との相互作用により試料中のリガンド濃度と相関付けられる信号をもたらす試薬系を含有することが普通である。使用に際しては、試料を酵素標識化リガンドと手作業で組み合わせて、要素に適用する。しばらくして、標識化リガンドに対する基質を含む溶液を粒状層へ適用する。この基質との反応は、酵素標識により触媒されて反応生成物を形成し、これが最終的に信号色を発色させる。この色の反射濃度を、試料中のリガンドの濃度と相関付けることができる。同様の信号発生系は、その他周知の常用の標識、例えば、放射性標識、発色団、蛍光団、安定ラジカル並びに酵素のコファクター、インヒビター及びアロステリックエフェクター、についても知られている。

20

【0006】

多層免疫検定要素は、上記の免疫検定原理を利用して血清試料中のアナライトを測定する薄膜要素である。これらの要素では、発色速度は存在するアナライト量に逆相関する。また、発色速度は、固定化抗体に結合した薬物標識酵素の活性に直接比例する。免疫検定が安定な検量を維持するには、規定の検量期間中には、どのスライドにおいても酵素活性（測定値）が失活するようなことがあってはならない。

【0007】

免疫検定要素は、50個の別々の要素を含有し、必要な時にそこから1個の要素を取り出すことができるプラスチック製の「カートリッジ」として顧客へ供給される場合が多い。これらの要素は互いの上に積み重ねられているので、カートリッジ内の下部49個の要素はすべてその上面が上部の要素によってカバーされることになる。しかしながら、その積重ね体における最上部の要素にはこのようなカバーがないため、その要素の表面は、他の49個の要素はさらされることのない環境因子にさらされることになる。例えば、カートリッジが製造中に取り扱われている場合やカートリッジが臨床分析装置の要素供給部にある場合に、最上部（第一）の要素は残りの要素よりも多くの空気流や光にさらされる。

30

【0008】

使用する前の保存時には、カートリッジ自体が、ホイルでライニングされた封止袋の中に保存される。しかしながら、最上部の要素は、他の49個の要素よりも封止袋内部の残留空気や湿分になお多くさらされる。

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

カートリッジ内の要素に共通の試験流体を反応させた場合、最上部（第一）の要素において観測される発色速度は、同じカートリッジ内の最上部要素よりも下段の要素に同じ試験流体を適用した場合に観測される発色速度よりも、常に低いことがわかった。

本発明の目的は、カートリッジの最上部に当たる第一の要素の低い発色速度を実質的に排除することにある。

50

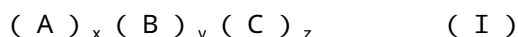
【課題を解決するための手段】

【0010】

この目的は、(a) 標識化リガンド区域と、(b) 展開区域と、(c) 直径0.1~5 μmの高分子ビーズに共有結合されている、リガンド及び前記標識化リガンドに対する固定化レセプターを所定濃度で含有するレセプター区域とを担持する支持体を含む前記リガンドを測定するための乾式免疫検定用分析要素であって、前記要素がバナジウムIV(V⁴⁺)イオンを含有する水溶性ポリマーを含み且つ前記区域が同じ層にあっても別々の層にあってもよいことを特徴とする乾式免疫検定用分析要素を提供することによって、実質的に達成される。

【0011】

この目的はまた、a) バナジウムIVイオンと、b) 以下の一般構造式(I)で示される反復重合単位とを含有する水溶性ポリマーによって達成される。

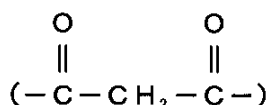


上式中、Aは、アクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-t-ブチルアクリルアミド、1-ビニルイミダゾール、N-ビニルピロリドン、N-メチロールアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルアクリレート及び2,3-ジヒドロキシプロピルアクリレートから成る群より選ばれた親水性モノマーの重合体を表し、

Bは、スルホネート基、スルフェート基、カルボキシレート基、ホスホネート基、ホスフェート基、ジケトン基：

【0012】

【化1】



【0013】

第一、第二又は第三アミン基、カルボニル基、カルボキシ基及びヒドロキシル基から成る群より選ばれたアニオン性基又は金属錯体形成性基又はリガンド形成性基を含有するモノマーから選ばれたモノマーの重合体を表し、

Cは、免疫検定用分析要素に適合する他の任意のモノマーから誘導された反復単位を表し、

xは20~98重量%であり、

yは2~80重量%であり、そして

zは0~20重量%である。

【0014】

さらにこの目的は、水性液体試料中の免疫学的に反応性のリガンドを検定する方法であって、

A. 本発明による乾式免疫検定用分析要素を提供する工程、

B. 前記要素の最上部区域又は層の有限領域と液体試料とを接触させて、(1) 固定化リガンド-レセプター複合体及び(2) 固定化酵素標識化リガンド-レセプター複合体を形成させる工程、

C. 前記有限領域と基質溶液とを接触させて、発色を触媒する工程、並びに

D. リガンドの濃度を比色定量的に測定する工程、

を含む免疫検定法によって達成される。

【0015】

本発明の要素は、標識化リガンド区域と、展開区域と、レセプター区域とを含む。これらの各種区域は、一つの塗布層にあっても別々の塗布層にあってもよい。例えば、展開区域とレセプター区域は、単一の層にあっても、別々の層にあってもよい。別々の層は、支

10

20

30

40

50

持体上で任意の順序で配置することができる。或いは、支持体の直上にレセプター層があり、そのレセプター層の直上に展開層があり、そしてその展開層の上に標識化リガンド区域があるように層を個別に配置してもよい。レセプター区域が完全に別の層を形成する場合、その層は以下に記載するタイプのバインダーをさらに含む。この要素は、以下に記載するようなさらに別の層を含むこともできる。このような層はどれも、以下に簡単に記載するように当該技術分野で知られている塗布技術を使用して塗布することができる。

【0016】

標識化リガンドの区域又は層をグラビア塗布することで、(1) 標識化リガンド塗布組成物の未乾燥塗布量を最小限に抑え、その標識化リガンドとレセプターとが予め接触しないようにし、と同時に標識化リガンドが均一に被覆されるように十分に湿潤性を維持すること、及び(2) a) 実質的にすべての塗布溶剤を除去し、b) 展開層の多孔性と展開時間に悪影響を及ぼさないようにし、且つ c) 十分な酵素活性を維持するように、迅速な乾燥を実現することができる。

10

【0017】

抗体と標識化リガンドの互いの相対親和性も、前結合を最小限に抑える上で重要な因子である。この因子は、当業者であればよく知っているように、標識化リガンドの構造を操作すると共に抗体を慎重に選択することにより制御される。

【0018】

一般に、要素に必要な標識化リガンドの塗布量は、以下の手順に従う各特異的免疫検定について実験的に決められる。

20

(1) 免疫検定を実施した際に許容できる免疫検定性能を達成するのに必要な標識化リガンドの濃度を、その標識化リガンドを含む分析要素を試料に接触させることにより決める。検定性能は、(a) 検定が20分未満で実施することができ、(b) 検定のダイナミックレンジが、検出可能な最低リガンド濃度と最高リガンド濃度とが臨床的に有用な濃度範囲をカバーするようなものであり、しかも(c) そのダイナミックレンジ全体にわたり臨床的に有意なりガンド濃度を検出することができる場合に、許容できるものとなる。

(2) 同じ分析要素について上記の許容できる検定性能を達成するのに必要な標識化リガンドの塗布量を、以下の手順で実験的に決める。

A. 斑点状に付けた標識化リガンドの最適量を確立するために用いられた要素の粒状レセプター区域の上に直接、上記(1)において標識化リガンドを斑点状に付ける際に用いた標識化リガンド濃度の何分の一か、数倍か、又はこれと同じ濃度の被覆量 (g/m^2) で標識化リガンドを塗布する。

30

B. 既知濃度のリガンドを含有する試験試料により一連の検定を行う。

C. その検定結果を既知濃度のリガンドと比較する。

D. 段階(2)Cの結果により標識化リガンド被覆量を変更して必要なだけ段階Bと段階Cを繰り返し、標識化リガンドの必要な被覆量を決める。

【0019】

標識化リガンドによって、その被覆量は、標識化リガンドを分析要素上に直接斑点状に付着することによって同じ検定を実施した場合に必要な標識化リガンド濃度よりも少量とすること、これと同等とすること、或いはこれの数倍(2x、3x、4x、等)とすることができる。

40

【0020】

上記のガイドラインを採用し、以下の被覆及び乾燥プロトコールによって慎重に制御されたグラビア塗布手順をうまく実施した。本発明の要素における標識化リガンド塗膜はグラビア装置(日本国、Yasui 製)で調製した。どの実施例についても採用した乾燥条件は、第一乾燥セクションだけで 120°F (49°C) とした。第二セクションは使用しなかった。使用したグラビアシリンダーは 295 セル/インチ (1.344×10^8 セル/ m^2) を含有した。これらのセルは、深さが $19\ \mu\text{m}$ 、幅が $72\ \mu\text{m}$ 、そしてセル間のランド幅が $12\ \mu\text{m}$ であった。このシリンダーは、塗布装置速度 $50\ \text{ft}/\text{分}$ ($15.24\ \text{m}/\text{分}$) の直接グラビア法により、ビーズ展開区域へ標識化リガンドを含有する塗布組成物を

50

約 4.3 g/m^2 送ることができる。グラビア塗布技術の当業者であれば、上記の手順をどのグラビア塗布装置へも容易に適合させることができる。

【0021】

標識化リガンドのための塗布組成物は以下のとおりとした。

未乾燥被覆量 4.3 g/m^2 に対する標識化リガンド塗布組成物

成分	乾燥被覆量 g/m^2
MOPSバッファー	0.0045
BSA(牛血清アルブミン)	0.000215
ポリ(アクリルアミド)	0.00108
4'-ヒドロキシアセトアニリド	0.000325
標識化リガンド*	0.000016

10

* 標識化リガンドは $4 \sim 64 \mu\text{g/m}^2$ の範囲で塗布した。

【0022】

要素の残りの層は、当該技術分野で周知の塗布技法によって塗布することができる。前結合を最小限に抑えるため、それぞれ別々の層又は区域を個別に塗布して乾燥させてから、次の層又は区域を適用することを薦める。

【0023】

展開区域は、別々の層として塗布した場合、多孔性であって、レセプター層の上に塗布される。展開区域は、必須成分として、塩又は配位金属錯体を形成するためのバナジウム I V イオンを有するモノマーの反復重合体を含む水溶性ポリマーを含有する。このイオンはバナジル (VO^{2+}) イオンとして存在することができる。一般に、このポリマーは、a) バナジル (VO^{2+}) イオンを含有するアニオン性モノマーの反復体を含むポリマー塩又は b) バナジル (VO^{2+}) イオンとリガンドを形成した異種原子を有するポリマーである。

20

【0024】

スルホネート、スルフェート、カルボキシレート、ホスフェート及びホスホネートなどのアニオン性基を含有するモノマーを用いて、本発明に用いられるポリマー塩を形成する。-ジケトン、アミン、スルフヒドリル、カルボニル、カルボキシ及びヒドロキシなどの異種原子リガンド錯体形成基を含有するモノマーを用いて、ポリマーリガンド錯体を形成する。

30

【0025】

有用な水溶性ポリマー塩及びポリマーリガンド錯体は、以下の一般構造式 (I) で示されるポリマーによって形成される。



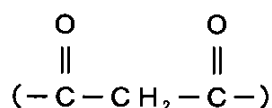
上式中、Aは、アクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-t-ブチルアクリルアミド、1-ビニルイミダゾール、N-ビニルピロリドン、N-メチロールアクリルアミド、2-ヒドロキシエチルアクリレート及び2,3-ジヒドロキシプロピルアクリレートから成る群より選ばれた親水性モノマーの重合体を表し、

Bは、スルホネート基、スルフェート基、カルボキシレート基、ホスホネート基、ホスフェート基、-ジケトン基：

40

【0026】

【化2】



【0027】

第一、第二又は第三アミン基、カルボキシル基、カルボニル基及びヒドロキシル基から成

50

る群より選ばれたアニオン性又は金属錯体形成性又はリガンド形成性基を含有するモノマーから選ばれたモノマーの重合体を表し、

Cは、免疫検定用分析要素に適合する他の任意のモノマーから誘導された反復単位を表し、

xは20～98重量%であり、

yは2～80重量%であり、そして

zは0～20重量%である。

【0028】

上記のBの定義に該当するモノマーとして、N-(3-アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド、2-アセトアセトキシエチルメタクリレート、N-(2-アセトアセトキシエチル)アクリルアミド、N-(2-アセトアセトアミドエチル)メタクリルアミド、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸ナトリウム、3-アクリロイルオキシプロパン-1-スルホン酸ナトリウム、2-アミノエチルメタクリレート塩酸塩、N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド塩酸塩、アクリル酸、メタクリル酸、3-(p-ビニルベンジルチオ)プロピオン酸、2-ホスファトエチルアクリレート、2-ホスファトエチルメタクリレート、3-ホスファトプロピルアクリレート、3-ホスファトプロピルメタクリレート、2-スルファトエチルメタクリレート及びN-(m-若しくはp-ビニルベンジル)ニトリロ二酢酸が挙げられる。

10

【0029】

アミン基含有モノマーは、典型的には、アミン酸付加塩($-NH_2 \cdot HX$ 、Xは酸のアニオン)として導入される。このコポリマーは、上記の定義範囲内にある別のアニオン性及びヘテロイオン基含有モノマーの混合物を含むことができる。しかしながら、このポリマーは水溶性でなければならない。

20

【0030】

-ジケトンモノマーとそれを含有するポリマーについては、イーストマン・コダック社の米国特許第3,459,790号、同第3,488,708号、同第2,865,893号、同第2,860,986号、同第2,904,539号、同第3,554,987号、同第3,658,878号、同第3,929,482号、同第3,939,130号、同第4,346,231号、同第4,438,278号、同第4,421,915号及び同第3,904,418号明細書に記載されている。好ましいモノマーは米国特許第4,438,278号明細書に記載されているものである。

30

【0031】

本発明に用いられるポリマーは、室温において、ポリマーの水溶液(典型的には、固形分約5～25%のポリマー反応混合物)と、金属イオンの塩又は塩溶液(約20～100%溶液)、好ましくは硫酸バナジルの塩又は塩溶液とを、金属塩対錯生成基(すなわち、Bがアニオン性基、アミン基又は-ジケトン基のような錯生成基を1個有する場合のモノマーB)の比率が約0.1:1から最大で約1:1、好ましくは約1:1となるようにして、単に混合することによって調製される。

【0032】

展開層に用いられる他の材料は、例えば米国特許第4,258,001号明細書に記載されているように乾式分析要素の製造技術分野ではよく知られている。このような層には、布、紙、等々でできた巨大多孔質層が含まれる。好ましい粒状層は、ビーズ展開層(BSL)である。この層は、本発明の要素において使用した際に、希釈された又は希釈されていない試験試料(例、1～100mL)を収容するのに適した多孔性を有するように構築することが簡単にできる。展開層は、等方的に多孔性であって、その特性が、区域を構成する粒子間の連続した空間によって作り出されていることが好ましい。「等方的に多孔性」とは、展開層が、適用された流体を層全体の全方向において均一に展開することを意味する。

40

【0033】

ビーズ展開層をはじめとする有用な展開層は、米国特許第4,670,381号、同第

50

4, 258, 001号及び同第4, 430, 436号明細書に記載されている。特に有用な展開層は、米国特許第4, 258, 001号明細書に記載されている有機高分子粒子とそれ用の高分子接着剤とで形成された粒状構造を有するものである。展開層に有用な有機高分子粒子は、一般に、粒径が約10~40 μm 又はそれ以下の熱に安定な球形ビーズである。

【0034】

これらの粒子は、必要な特性を有する、天然高分子及び合成高分子の両方を含む様々な有機高分子を含むことができる。しかしながら、これらの粒子は、上記の特許明細書に記載されている付加高分子を1種以上含むことが好ましい。

【0035】

レセプター区域は、別々の層として塗布する場合には、支持体の上で調製され塗布される。レセプターは、その表面反応性基（求核性の遊離アミノ基及びスルフヒドリル基）を介して高分子粒子に共有結合される。

【0036】

小さな高分子粒子へレセプターを結合させる一般的手順には、周知の反応を利用して選ばれたレセプターをビーズへ共有結合させる方法が含まれる。例えば、ハロアルキル、2-置換活性化エチルスルホニル及びビニルスルホニルといった多くの側基を利用して、レセプターをビーズへ直接結合させることができる。一般に、緩衝化した水溶液（一般にpH約5~約10）において、高分子粒子濃度約0.1~約40重量%（好ましくは約0.1~約10重量%）として、ビーズとレセプターを混合する。レセプターの量は、高分子ビーズに対する比率で約0.1:1000~約1:10、好ましくは約1:100~約1:10とする。混合は、約5~約50、好ましくは約5~約40の温度で約0.5~約48時間実施する。適当ないずれの緩衝液でも使用できる。

【0037】

場合によっては、リガンドを共有結合させるために外表面の反応性側基を修飾又は活性化しなければならないこともある。例えば、1992年7月22日発行の欧州特許第308235号明細書及び米国特許第5,155,166号明細書に記載されているように、カルボジイミド又はカルバモイロニウム化学を利用して、カルボキシル基を活性化しなければならない。

【0038】

しかしながら、カルボキシル基を含有する単分散高分子ビーズへのレセプターの結合は、2段階で行われる。第一段階は、粒子の水性懸濁液をカルボジイミド又はカルバモイロニウム化合物と接触させて、カルボキシル基の代わりに中間の反応性基を有する反応性中間体高分子粒子を得るものである。この段階は、所望のpHを付与する適当な酸又は緩衝液を利用して好適なpHで行われる。一般に、pHは6未満であるが、これは反応が進行できるかぎり重要なことではない。pHは約3.5~約7の間にあることが普通である。粒子表面のカルボキシル基に対するカルボジイミド又はカルバモイロニウム化合物のモル比は、約10:1~500:1である。

【0039】

この方法の第二段階において、第一段階で形成された反応性中間体に、反応性のアミン基又はスルフヒドリル基を含有するレセプターを接触させる。これにより、粒子とレセプターの間で共有結合が形成される。高分子粒子に対するレセプターの重量比は、一般に約1:1000~約1:1、好ましくは約1:100~約1:10である。

【0040】

他の場合として、外表面のエポキシ基を加水分解して、免疫学的種に含まれるアミン基に対するカップリング剤として作用しうる臭化シアンと反応することができるジオール化合物を形成させることができる。アルデヒドはアミンと直接に反応してシッフ塩基を形成することができ、続いてこれを還元することにより共有結合を形成することができる。別法として、アルデヒドを酸化して酸にし、そして先にカルボキシル基について記載した化学を利用してアミド結合を形成させてもよい。

10

20

30

40

50

【0041】

反応性のアミン又はスルフヒドリルを含有するレセプターは、そのレセプターが、高分子ビーズ表面の反応性基と、又は該高分子が反応性カルボキシル基を有する場合には該粒子表面のカルボキシル基とカルボジイミド若しくはカルバモイロニウム化合物との反応で形成された中間体と、反応する反応性のアミン基又はスルフヒドリル基をそれぞれ含有するがぎり、いずれのレセプターでも単分散高分子ビーズに結合させることができる。

【0042】

レセプター表面のアミン基又はスルフヒドリル基と直接に反応し易い反応性基を有する小さな高分子ビーズを、必要であれば適当な緩衝液中で、レセプターと単に混合して反応させる。

10

【0043】

レセプター用のビーズを選定することができるポリマーには、ポリ(m-及びp-クロロメチルスチレン)、ポリ(スチレン-コ-m-及びp-クロロメチルスチレン-コ-2-ヒドロキシエチルアクリレート)(モル比67:30:3)、ポリ(スチレン-コ-m-及びp-クロロエチルスルホニルメチルスチレン)(モル比95.5:4.5)、ポリ{スチレン-コ-N-[p-(2-クロロエチルスルホニルメチル)フェニル]アクリルアミド}(モル比99.3:0.7)、ポリ(m-及びp-クロロメチルスチレン-コ-メタクリル酸)(モル比95:5、98:2及び99.8:0.2)、ポリ(スチレン-コ-m-及びp-クロロエチルスルホニルメチルスチレン-コ-メタクリル酸)(モル比93.5:4.5:2)、ポリ{スチレン-コ-N-[p-(2-クロロエチルスルホニルメチル)フェニル]アクリルアミド-コ-メタクリル酸}(モル比97.3:0.7:2)、ポリ(スチレン-コ-m-及びp-クロロメチルスチレン)(モル比70:30)、ポリ[スチレン-コ-3-(p-ビニルベンジルチオ)プロピオン酸](モル比97.6:2.4)、ポリ(スチレン-コ-ビニルベンジルクロリド-コ-アクリル酸)(モル比85:10:5)、ポリ(スチレン-コ-アクリル酸)(モル比99:1)、ポリ(スチレン-コ-メタクリル酸)(モル比90:10)、ポリ(スチレン-コ-アクリル酸-コ-m-及びp-ジビニルベンゼン)(モル比89:10:1)、ポリ(スチレン-コ-2-カルボキシエチルアクリレート)(モル比90:10)、ポリ(メチルメタクリレート-コ-アクリル酸)(モル比70:30)、ポリ(スチレン-コ-m-及びp-ビニルベンズアルデヒド)(モル比95:5)及びポリ(スチレン-コ-m-及びp-ビニルベンズアルデヒド-コ-メタクリル酸)(モル比93:5:2)が含まれる。

20

30

【0044】

要素は適当な支持体に担持される。レセプター層は支持体上に塗布されるが、支持体とレセプター層の間にゼラチン/バッファー層のような中間層があってもよい。支持体は、寸法安定性のよい適当ないずれの材料であってもよいが、好ましくは非孔質且つ透明(すなわち、放射線透過性の)材料であって、約200~約900nmの波長の電磁放射線を透過するものである。個々の要素について、その所期の検出様式(反射、透過又は蛍光分光分析)に適合するように支持体を選ぶべきである。有用な支持体材料として、ポリスチレン、ポリエステル[例、ポリ(エチレンテレフタレート)]、ポリカーボネート、セルロースエステル(例、酢酸セルロース)、などが挙げられる。

40

【0045】

レセプター層用の高分子量バインダーは、カナダ国特許第1,240,445号明細書に記載されており、本明細書ではこれを参照することにより取り入れることとする。有用なポリマーは、N-イソプロピルアクリルアミドのようなN-アルキル置換アクリルアミドの重合体を約30~97重量%含む冷却ゲル化性ポリマーである。その他の有用なN-アルキル置換アクリルアミドとして、N-n-ブチルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド及びN-n-プロピルアクリルアミドが挙げられる。これらのバインダーの有用性を例示するために実施例ではポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-コ-メタクリル酸-コ-N,N'-メチレンビスアクリルアミド)を使用する。

【0046】

50

高分子量バインダーは、さらに1分子当たり2個以上の付加重合性基を有する1種以上の架橋性モノマーの重合体を約3～25重量%含む。これらの架橋性モノマーは当該技術分野では一般によく知られている。好ましい架橋性モノマーは、N-アルキル置換アクリルアミドとの重合を促進するためにアクリルアミド基又はメタクリルアミド基を含有する。

【0047】

有用な架橋性モノマーの例として、N, N'-メチレンビスアクリルアミド、N, N'-メチレンビスメタクリルアミド、エチレンジメタクリレート、2, 2-ジメチル-1, 3-プロピレンジアクリレート、ジビニルベンゼン、モノ〔2, 3-ビス(メタクリロイルオキシ)プロピル〕ホスフェート、N, N'-ビス(メタクリロイル)ウレア、トリアリルシアヌレート、アリルアクリレート、アリルメタクリレート、N-アリルメタクリルアミド、4, 4'-イソプロピリデンジフェニレンジアクリレート、1, 3-ブチレンジアクリレート、1, 4-シクロヘキシレンジメチレンジメタクリレート、2, 2'-オキシジエチレンジメタクリレート、ジビニルオキシメタン、エチレンジアクリレート、エチリデンジアクリレート、プロピリデンジメタクリレート、1, 6-ジアクリルアミドヘキササン、1, 6-ヘキサメチレンジアクリレート、1, 6-ヘキサメチレンジメタクリレート、フェニルエチレンジメタクリレート、テトラメチレンジメタクリレート、2, 2, 2-トリクロロエチリデンジメタクリレート、エチレンビス(オキシエチレン)ジアクリレート、エチレンビス(オキシエチレン)ジメタクリレート、エチリデントリメタクリレート、プロピリデントリアクリレート、ビニルアリルオキシアセテート、1-ビニルオキシ-2-アリルオキシエタン、2-クロトノイルオキシエチルメタクリレート、ジアリルフタレート及び2-(5-フェニル-2, 4-ペンタジエノイルオキシ)エチルメタクリレートが挙げられる。

【0048】

これらの冷却ゲル化可能な高分子量バインダーは、さらに親水性モノマーの重合体を0～60重量%含むことができる。5～35重量%の量も有用である。親水性モノマーはカナダ国特許第1, 240, 445号明細書に記載されている。特に、このようなモノマーは、ヒドロキシ、ピロリドン、アミン、アミド、カルボキシ、スルホ、カルボン酸塩、スルホン酸塩及び硫酸塩基から選ばれる基を一つ以上有する。一般に、これら塩基の対イオンはアルカリ金属又はアンモニウムである。有用な親水性モノマーは、アクリル酸及びメタクリル酸並びにそれらの塩、2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホネート、2-ヒドロキシエチルアクリレート、2-ヒドロキシエチルメタクリレート、2-ヒドロキシプロピルアクリレート、2-ヒドロキシプロピルメタクリレート並びにグリセリルメタクリレートである。

【0049】

さらに、上記のバインダーは、押出ホッパー塗布の際のシャー薄化(shear thinning)より実現される非常に低いバインダー粘度のため、レセプター層の塗膜を均一に形成させることを可能にする。上記のバインダーによると、均一な塗膜を形成した直後にバインダーの粘度が上昇して、実質的に「固化した層」をもたらす、それが未乾燥搬送時やバインダーの乾燥時に安定で均一のまま残る。

【0050】

レセプターは、ポリ(ビニルアルコール)；牛血清アルブミン；アラビアゴム；分子量8000～400, 000のポリ-N-ビニルピロリドンのホモポリマー；並びにアクリルアミド、メタクリルアミド、N-アルキル置換アクリルアミド、N-アルキル置換メタクリルアミド、1-ビニルイミダゾール、2-アルキル置換-1-ビニルイミダゾール、2-ヒドロキシアルキル置換-1-ビニルイミダゾール、N-ビニルピロリドン、ヒドロキシアルキルアクリレート、ヒドロキシアルキルメタクリレート、アクリル酸及びメタクリル酸から成る群より選ばれた2種以上のモノマーを含む水溶性ビニル付加コポリマー(該コポリマー中のアルキル及びヒドロキシアルキルは、メチル、エチル、プロピル及びヘキシルのような炭素原子数1～6のイオンを有する)から成る群より選ばれた高分子量バ

10

20

30

40

50

インダー中に分散させることもできる。

【0051】

要素は、さらに別の層、例えば、電子移動剤のような他の必要な添加剤を含有するゼラチン/バッファー層及び別々の又は合体した試薬/展開層を、1層以上含むことができる。

【0052】

要素の展開層又は試薬層又はゼラチン/バッファー層は、1種以上の合成又は天然のバインダー物質、例えば、ゼラチン又は他の天然コロイド、ホモポリマー及びコポリマー、例えば、ポリ(アクリルアミド)、ポリ(ビニルピロリドン)、ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド)、ポリ(アクリルアミド-コ-N-ビニル-2-ピロリドン)及び類似のコポリマーに、1種以上の試薬を分散させた指示組成物を含有することができる。この指示組成物は、レセプター層に分散させることもできる。

10

【0053】

所望であれば、その他の任意の層、例えば、下塗層、放射線遮断層、等を含めてもよい。要素のすべての層は互いに液絡している、すなわち、流体及び試薬並びに流体中の未複合化反応生成物は、隣接する層の重畳領域間を通過することができる。

【0054】

要素の層は、界面活性剤、増粘剤、バッファー、硬膜剤、酸化防止剤、カプラー溶剤、その他当該技術分野で知られている他の物質をはじめとする、他の望ましいが任意である各種成分を含有することができる。これら成分の量についても、当業者であれば適宜決めることができる。

20

【0055】

この要素を使用して、生物学的流体(例、全血、血清、血漿、尿、髄液、ヒト又は動物組織の懸濁液、排泄物、唾液、リンパ液、等)のような液体中の低濃度の免疫学的に反応性のあるリガンドを測定することができる。これらのリガンドは、約 10^{-15} モル程度の低濃度で、最も一般的には約 10^{-11} ~約 10^{-4} モルの濃度で測定することができる。

【0056】

このように(定量的又は定性的に)測定できるリガンドには、治療薬(例、フェノバルビタール、ジゴキシン、ジギトキシン、テオフィリン、ゲンタマイシン、キニジン、フェニトイン、プロパノロール、カルバマゼピン、トブラマイシン、リドカイン、プロカインアミド、等)、天然又は合成ステロイド(例、コルチゾール、アルドステロン、テストステロン、プロゲステロン、エストリオール、等)、ホルモン(例、甲状腺ホルモン、ペプチドホルモン、インシュリン、等)、タンパク質(例、アルブミン、IgG、IgM、フェリチン、血液凝固因子、C反応性タンパク質、アイソエンザイム、アポリポタンパク質、等)、抗原、モノクローナル抗体をはじめとする抗体、その他レセプターと固有に反応する種、が含まれる。本発明は、ジゴキシン、フェニトイン、テオフィリン、カルバマゼピン又はフェノバルビタールのような治療薬や、チロキシン又はトリヨードチロニンのようなホルモンの測定に特に有用である。

30

【0057】

検定は、リガンドに結合して標識化リガンドを形成することができるいずれの酵素標識を用いても実施することができる。グルコースオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ〔例、西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)、アミン富化西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)〕、アルカリ性ホスファターゼ及びガラクトシダーゼ、などの酵素が好ましい標識である。

40

【0058】

特定の標識に対する適当な基質を決めることは、臨床化学分野の当業者であれば適宜なしうることである。基質は、酵素標識によって直接に作用される物質であるか、又は標識の酵素反応を含む一連の反応に関与する物質であることができる。例えば、酵素標識がペルオキシダーゼである場合、基質は過酸化水素に適当な還元剤を合わせたものである。一例としてグルコースオキシダーゼを使用した場合、基質のグルコースは、約0.01モル

50

$/m^2$ 、好ましくは約 $0.001 \sim 0.1$ モル/ m^2 を生成するように、試薬層中に存在させるか又は基質溶液として添加するのが一般的である。当業者であれば、検定に用いた酵素標識の量に対する特定の基質の量を調節する方法は周知である。

【0059】

試薬層は、標識によって触媒される反応の結果として検出可能な種を提供する1種以上の試薬を含む指示組成物を含有することができる。検出可能な種は、発色するもの、放射性であるもの、蛍光性であるもの、又は化学発光性のものであることができる。本発明の目的では、酵素標識化リガンドアナログと基質との酵素反応の結果として比色法的に検出可能な種を提供する比色用指示組成物を使用して本発明を例示することとする。

【0060】

指示組成物は、酵素反応の際に検出可能な色素を生成する単一化合物であっても、またそのような色素を生成する試薬混合物であってもよい。例えば、基質としてグルコースを、酵素標識としてグルコースオキシダーゼを使用した場合、比色用指示組成物は、色素を提供する被酸化性化合物とカプラーを含むことができる。別法として、比色用組成物は、ロイコ色素と、ペルオキシダーゼ又はグルコースオキシダーゼがグルコースをグルコン酸へ転化した際に生じる過酸化水素の生成の結果として検出可能な色素を生成する別の適当な過酸化化合物とを含むことができる。有用なロイコ色素は、当該技術分野では周知であって、例えば、米国特許第4,089,747号明細書(1978年5月16日にBruschに発行)及びBabbらの1984年5月21日出願の米国特許出願第612,509号明細書に記載されているものが含まれる。比色用指示組成物の特定の量やその各種成分については、当業者であれば適宜なしうる事項である。

【0061】

標識化リガンドは、既知の出発物質と手順を採用して調製すること、或いは市販品として入手することができる。一般に、リガンドは標識(例、酵素部分)に共有結合を介して結合される。

【0062】

免疫検定は、手作業であっても自動化されたものであってもよい。一般に、液体中のリガンドの量は、要素を供給ロール、チップパケット又は他のソースから取り出して、その展開層の有限領域に液体試料(例、 $1 \sim 100 \mu L$)を物理的に接触させることによって測定される。接触される有限領域は、一般に約 $150 mm^2$ 以下である。

【0063】

リガンドの量は、複合化リガンドアナログを直接に検出するか、又は酵素標識と基質の酵素反応の結果形成された検出可能な種を検出するのに適した装置に要素を通過させることによって測定される。例えば、これらの種は、周知の手順を採用して適当な分光光度計で検出することができる。酵素反応では、得られた生成物は、例えば、試験試料を接触させた有限領域における反射濃度又は透過濃度の変化速度を測定することによって定量される。測定される領域の直径は約 $3 \sim 5 mm$ であることが一般的である。液体試料中のリガンドの量は、有限領域において測定された標識の量に反比例する。一般に、標識の測定は、基質溶液の適用後に行われる。

【実施例】

【0064】

以下の実施例によって本発明の実施を説明する。

バナジウムIVを含有するポリマーの調製

調製例 1

硫酸バナジルとポリ〔アクリルアミド-コ-N-(3-アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕(重量比70/30)の錯体。

ポリ〔アクリルアミド-コ-N-(3-アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕(重量比70/30)の12.5%水溶液(100g、 β -ジケトン基 0.017 モル)を、室温で、3.3g、 0.017 モルの $VOSO_4 \cdot H_2O$ で処理し、穏やかに攪拌して、すぐに使用できる青い溶液を調製した。

10

20

30

40

50

【 0 0 6 5 】

調製例 2

硫酸バナジルとポリ(アクリルアミド - コ - アクリル酸) (重量比 90 / 10) の錯体

。 20 mL の水に 2.7 g の硫酸バナジルを含む溶液を、200 mL の水に 10 g (乾燥) のポリ(アクリルアミド - コ - アクリル酸) (重量比 90 / 10) を含む溶液へ加え、室温で穏やかに攪拌して、すぐに使用できるポリマー / 金属錯体の青い溶液を調製した。

【 0 0 6 6 】

同様に、以下のポリマーを用いて硫酸バナジルの錯体を調製した。

調製例 3 : ポリ〔アクリルアミド - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル) メタクリルアミド〕 {モノマー重量比 80 / 20} 10

調製例 4 : ポリ〔アクリルアミド - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル) メタクリルアミド〕 {モノマー重量比 90 / 10}

調製例 5 : ポリ〔アクリルアミド - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル) メタクリルアミド〕 {モノマー重量比 95 / 5}

調製例 6 : ポリ(アクリルアミド - コ - 2 - アクリルアミド - 2 - メチルプロパンスルホン酸ナトリウム) {モノマー重量比 20 / 80}

調製例 7 : ポリ〔アクリルアミド - コ - N - t - ブチルアクリルアミド - コ - N - (3 - アミノプロピル) メタクリルアミド塩酸塩〕 {モノマー重量比 45 / 45 / 10}

調製例 8 : ポリ〔アクリルアミド - コ - 2 - アクリルアミド - 2 - メチルプロパンスルホン酸ナトリウム - コ - N - (3 - アセトアセトアミドプロピル) メタクリルアミド〕 {モノマー重量比 50 / 45 / 5} 20

【 0 0 6 7 】

比較例 1

血清試料中のフェノバルビタールの免疫検定を実施するための、バナジウム I V (V^{4+}) 含有ポリマーを含まない要素をポリ(エチレンテレフタレート) 支持体上に製作した。この要素は以下の配置と成分を有した。

層	成分物質	乾燥被覆量 (g/m ²)	
グラビア	標識	16×10^{-6}	30
	マゼンタ色素	0.0269	
	MOPSバッファー (pH 7.0)	0.0045	
	B S A	2.15×10^{-4}	
	ポリアクリルアミド	1.08×10^{-3}	
	TX-100	4.3×10^{-3}	
	トレハロース	0.215	
ビーズ展開層	TES バッファー (pH 7.0)	0.219	40
	ジメドン	0.45	
	マンニトール	1.0	
	B S A	1.0	
	グリセロール	2.0	
	接着ポリマー	2.58	
	高分子ビーズ (20-40 μ M)	130.0	
レセプター層	高分子バインダー	1.4	50
	ロイコ色素	0.20	
	ジメドン	0.05	
	Tetronic T908	0.02	
	Olin 10G	0.01	
	TES バッファー (pH 7.0)	0.10	
	TX-100	0.02	
	抗体ビーズ	0.10	

ゲル	ゼラチン	10.0
	3',5'-ジクロロ-4'-	
	ヒドロキシアセトアニリド	0.22
	TES バッファー (pH 7.0)	4.58
	TX-100	0.020
	BVSME	0.150

【0068】

上記要素に記載され以下の手順で用いられた成分は以下の通りである。

標識：1992年3月16日出願の米国特許出願第851,435号及び同第851,436号明細書（本明細書ではこれらを参照することにより取り入れることとする）の記載に従い調製された実施例6に記載のフェノバルビタール/アミン富化西洋ワサビペルオキシダーゼ複合体（標識F）とした。この標識は、長い結合鎖を有するフェノバルビタールハプテンとアミン富化西洋ワサビペルオキシダーゼのコンジュゲートである。 10

【0069】

マゼンタ色素：4,5-ジヒドロキシ-3-(6,8-ジスルホ-2-ナフチルアゾ)-2,7-ナフタレンジスルホン酸ナトリウム塩 (KAN 905783)

MOPS：3-(N-モルフォリノ)プロパンスルホン酸バッファー

BSA：牛血清アルブミン

TX-100：Union Carbide 社より市販されているオクチルフェノキシポリエトキシエタノール界面活性剤、Triton X-100界面活性剤 20

TES：N-[トリス(ヒドロキシメチル)メチル]-2-アミノエタンスルホン酸バッファー

接着ポリマー：ポリ(メチルアクリレート-コ-2-アクリルアミド-2-メチルプロパンスルホン酸ナトリウム-コ-2-アセトアセトキシエチルメタクリレート)

高分子ビーズ：平均粒径20~40 μmのポリ(ビニルトルエン-コ-メタクリル酸)

高分子バインダー：ポリ(N-イソプロピルアクリルアミド-コ-ヒドロキシエチルメタクリレート-コ-N,N'-メチレンビスアクリルアミド)

ロイコ色素：4,5-ビス(4-ジメチルアミノフェニル)-2-(3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシフェニル)イミダゾール

Tetronic T908：BASF社より市販されているエチレンオキシドとプロピレンオキシドのブロックコポリマーである非イオン性界面活性剤 30

Olin 10G：Olin Chem.社より市販されている1分子当たり平均で約10個のグリシドール単位を有するイソノニルフェノキシポリグリシドール界面活性剤

抗体ビーズ：カルバマゼピンに対する抗体を共有結合させたポリ[スチレン-コ-3-(p-ビニルベンジルチオ)プロパン酸]の高分子粒子

BVSME：ビス(ビニルスルホニルメチル)エーテル

DTPA：ジエチレントリアミン5酢酸

【0070】

これらの要素を含むカートリッジを製作し、実験室用の作業台上に一晩配置しておいた。実験室の照明は一晩中つけておいた。次の日、これらの要素をプロトタイプの自動化された薄層免疫検定分析装置で試験した。10 μg/mLのフェノバルビタールを含有する試験溶液10 μLを要素へ適用した。次いで、その要素を37で5分間インキュベートした後、Na₂HPO₄(10 mM、pH 6.8)、4'-ヒドロキシアセトアニリド(5 mM)、ヘキサデシルピリジニウムクロリド(0.1%)、H₂O₂(8.8 mM)及びDTPA(10 μM)を含有する洗浄流体10 μLをスライドへ適用した。この流体は、未結合標識を検出領域から洗い流すと共に、HRP触媒発色反応を開始させる。その後、要素を37のインキュベーターに配置して、670 nmにおける反射濃度を3秒毎に読み取った。これらの読みから発色速度を算出した。その結果を以下に示す。 40

最上部スライドの速度 (n = 3)	0.0367 Dt / 分
非最上部スライドの速度 (n = 15)	0.0725 Dt / 分

最上部スライドの損失率% - 49%

最上部スライドは、カートリッジ内の他のスライドよりも顕著に低い発色速度を示した。
* n = 試験したスライドの数。Dt / 分の値は試験したスライドの数についての平均値である。

【0071】

比較例 2

最上部要素において観測される速度低下は、それらをカートリッジから取り出し、作業台上に配置することにより、カートリッジにおける最上部要素が受ける環境因子（例、光、空気）への暴露を増加することによっても誘発されうる。これは、カートリッジ内の最上部において観測されたよりもさらに大きな速度損失をもたらした。

10

【0072】

比較例 1 に記載した形式のフェノバルビタール要素を実験室用作業台上に一晩配置しておいた。同じ要素を含有するカートリッジも製作し、同様に同じ実験室用作業台上に一晩配置しておいた。実験中、実験室の照明はつけたままにしておいた。次の日、比較例 1 に記載したようなプロトタイプの自動化薄層免疫検定分析装置においてこれらの要素を試験した。以下の結果が得られた（カートリッジ内の最上部要素の速度はこのデータ分析には入れなかった）。

作業台上の要素の速度 (n = 10)	0.0118 Dt / 分
カートリッジ要素の速度 (n = 15)	0.0725 Dt / 分
作業台上の要素の損失率%	- 84%

20

この種の暴露はカートリッジ内の最上部要素が受けるものよりもはるかに厳しいものであるが、環境因子が発色速度に与える影響を検討するのに便利な実験系を与えた。

【0073】

比較例 3

本発明のポリマーによってもたらされる酵素安定性の改善は、薄膜コーティングを用いた別の検定において明白であった。この例では、ポリ（エチレンテレフタレート）支持体の上に以下の構成の薄膜を製作した。

層	成分物質	乾燥被覆量 (g/m ²)
ビーズ展開層	TES バッファー (pH 7.0)	0.219
	接着ポリマー	2.58
	高分子ビーズ (20-40 μM)	130.0
レセプター層	高分子バインダー	1.4
	ロイコ色素	0.20
	ジメドン	0.05
	Tetronic T908	0.02
	Olin 10G	0.01
	TES バッファー (pH 7.0)	0.10
	TX-100	0.02
ゲル	ゼラチン	10.0
	TES バッファー (pH 7.0)	4.58
	TX-100	0.020
	BVSME	0.150

30

40

【0074】

この要素を用いて以下のプロトコールでHRPの安定性を測定した。上記の薄層から製作した3個の要素の各々に、約 3×10^{-8} MのHRPを含有する10 mMリン酸ナトリウムバッファー (pH 7.0) の溶液 10 μLを斑点状に付着させた。これらの要素を暗い引出しの中に一晩入れておいた。次の日、それらの要素を引出しから取り出し、そして試験管中の10 mMリン酸ナトリウム、0.15 M塩化ナトリウム、0.1%牛血清アルブミンを含むpH 7.0の溶液 1 mLに各要素を浸漬することによりHRPを抽出した。この試験管をボルテックスで攪拌し〔ポリ（エチレンテレフタレート）支持体から薄膜成分

50

を分離し)た後、得られた懸濁液を遠心分離して溶液を分離した。この溶液中の活性HRPの量は、100 μ Lのアリコートを採取し、これを、10mMのリン酸ナトリウム(pH6.8)、10mMのジエチレントリアミン5酢酸、5mMの4'-ヒドロキシアセトアニリド、1.25%のポリビニルピロリドン、0.01%の4,5-ビス(4-ジメチルアミノフェニル)-2-(4-ヒドロキシ-3-メトキシフェニル)イミダゾール系ロイコ色素及び8.8mMの過酸化水素を含む溶液800 μ Lと5mMの4'-ヒドロキシアセトアニリドとを予め含有する分光光度計のキュベットに添加することによって測定した。青色が発生し、その速度を670nmにおいて分光光度法で測定した。この発色速度は、抽出物中の活性酵素の量に直接比例した。

【0075】

上記の場合(HRPを10mMのリン酸バッファー(pH7.0)の溶液で要素に適用した場合)において、上記プロトコールを実施した後に要素から抽出した活性酵素の量(抽出された活性HRPの画分)を、その要素に適用した活性酵素の量と比較した。以下の結果が得られた。

HRP溶液：リン酸バッファー

抽出された活性HRPの画分：0.27

保持されたHRP活性%：27%

【0076】

本発明の実施例

実施例1及び2

最上部要素の発色速度が低いため、この要素で試験されたアナライト試料の予測値は不正確となる。このような状況を軽減するため、要素の成分構成を改善して、環境的因子が最上部要素に悪影響を及ぼさないようにした。コーティング中にバナジウムIVを含有するポリマーを内蔵させると、作業台上に一晩配置しておいた要素の発色速度が、環境への暴露に対して非常に耐性となることがわかった。

【0077】

比較例1の成分構成を使用してフェノバルピタル要素を製作したが、但し、調製例5の硫酸バナジルとポリ〔アクリルアミド-コ-N-(3-アセトアセトアミドプロピル)メタクリルアミド〕{モノマー重量比95/5}の錯体を、乾燥被覆量0.45g/m²でビーズ展開層中に含ませた。比較例1及び2に記載したものと同一実験において、この新規構成の要素を実験室用作業台上に直接に一晩配置し、またこれらの新規要素を含有するカートリッジを製作し、このカートリッジについても作業台上に一晩配置しておいた。実験室の照明は一晩つけたままにしておいた。次の日、比較例1に記載したようなプロトタイプの自動化薄層免疫検定分析装置においてこれらの要素を試験した。以下の結果が得られた(カートリッジ内の最上部要素の速度はこのデータ分析には入れなかった)。

【0078】

実施例1

カートリッジ内の最上部要素は、この新規構成を採用して製作すると速度低下を受けにくかった。比較例1に記載した同様の実験(カートリッジ内の最上部要素を同じカートリッジ内の最上部ではない要素と比較する実験)において、以下の結果が得られた。

最上部要素の速度(n=3)	0.0540Dt/分
非最上部要素の速度(n=15)	0.0578Dt/分
最上部要素の損失率%	-7%

【0079】

この実験において、非最上部要素に対する最上部要素の損失率%(-7%)は、最初の構成(比較例1の-49%)に対して改善された。

【0080】

実施例2

この新規構成は、要素を作業台上に開放しておいた場合でもはるかに良好に保護された。

10

20

30

40

50

作業台上の要素の速度 (n = 10)	0.0338 Dt / 分
カートリッジ要素の速度 (n = 15)	0.0578 Dt / 分
作業台上の要素の損失率 %	- 42 %

新規構成を採用した損失率 42 % は、最初の構成 (比較例 2) の損失率 84 % に対してはるかに改善された値である。

【0081】

実施例 3

本発明の化合物を、比較例 3 の HRP とリン酸バッファーを含む溶液へ、バナジル ($V O^{2+}$) が 1 mM になるように添加し、そして比較例 3 のプロトコールを実施した。以下の結果が得られた。

HRP 溶液	活性 HRP 抽出画分	保持 HRP 活性 %
調製例 1	0.55	55 %
調製例 3	0.57	57 %
調製例 4	0.53	53 %
調製例 6	0.61	61 %
調製例 7	0.61	61 %

【0082】

本発明の化合物が存在した場合の保持された HRP 活性 % (55 ~ 61 %) は、リン酸バッファーのみを含有する溶液の場合 (27 %) に比べて非常に改善された値である。

【0083】

実施例 4

血清試料中のチロキシンを検定するための要素をポリ (エチレンテレフタレート) 支持体上に製作した。実施例 3 と同様に、但しフェノバルビタールに対する抗体の代わりにチロキシン抗体ビーズを使用して、要素を使用した。グラビア層はトレハロースをまったく含有しなかった。ビーズ展開層は、 0.22 g/m^2 の 3', 5'-ジクロロ-4'-ヒドロキシアセトアニリドと、 1.0 g/m^2 の BSA の代わりに 0.9 g/m^2 の牛の - グロブリン (BGG) と、 0.1 g/m^2 の Tetronic T908 界面活性剤を含有した。レセプター層は、 0.80 g/m^2 の高分子バインダーを有し、またゲル層は 0.44 g/m^2 の 3', 5'-ジクロロ-4'-ヒドロキシアセトアニリド及び 0.165 g/m^2 のフロセミド (furosemide) を有した。

【0084】

要素における標識はチロキシン西洋ワサビペルオキシダーゼとした。それは、西洋ワサビペルオキシダーゼと、1992年6月26日出願の米国特許出願第 904,614 号明細書 (本明細書ではこれを参照することにより取り入れる) の調製例 1 及び中間調製 1 に従い調製された N-[4-(3-スクシンイミドキシカルボニルプロピオニル)ピペラジノカルボニルメトキシアセチル]チロキシンメチルエステルとの複合体である。

【0085】

本発明の調製例 1、2 及び 3 で調製したポリマーを含有する塗布要素を、再湿潤濃度 2 mM で別々の要素のビーズ展開層内に取り込ませた。

コーティング番号	調製ポリマー
1	1
2	2
3	3

これらコーティングを切り出して、要素として搭載した。これらの要素を含有するカートリッジを製作し、そして比較例 1 に記載したように試験したが、但し、各要素には $9.2 \mu\text{g/dL}$ のチロキシンを含有する試験溶液 10 mL を適用した。以下の結果が得られた。

【0086】

コーティング 1 :

最上部要素の速度 (n = 3)	0.0705 Dt / 分
------------------	---------------

非最上部要素の速度 (n = 15)	0 . 0 7 1 9 D t / 分
最上部要素の損失率 %	1 . 9 %
<u>コーティング 2 :</u>	
最上部要素の速度 (n = 3)	0 . 0 6 8 7 D t / 分
非最上部要素の速度 (n = 15)	0 . 0 7 1 3 D t / 分
最上部要素の損失率 %	3 . 6 %
<u>コーティング 3 :</u>	
最上部要素の速度 (n = 3)	0 . 0 7 1 8 D t / 分
非最上部要素の速度 (n = 15)	0 . 0 7 2 2 D t / 分
最上部要素の損失率 %	1 . 6 %

10

【 0 0 8 7 】

これらのどのコーティングの最上部要素においても、観測された損失率は非常に小さい値であった。

本発明をその好ましい実施態様を特に参照しながら詳細に説明してきたが、本発明の精神及び範囲内の改変、変型が可能であることを理解されたい。

フロントページの続き

- (74)代理人 100081330
弁理士 樋口 外治
- (72)発明者 ダニエル エス・ダニエル
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14617, ロチェスター, セント ポール プールバード 3
051
- (72)発明者 デビット エー・ヒルボーン
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14467, ヘンリエッタ, サザン ヒルズ サークル 10
- (72)発明者 カルバン アール・メッシング
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14559, スペンサーポート, ブルーム ロード 1326
- (72)発明者 イグナツィオ エス・ポンティセロ
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14534, ピッツフォード, コッパー ウッズ 21
- (72)発明者 スーザン ジェイ・ダニエルソン
アメリカ合衆国, ニューヨーク 14609, ロチェスター, ラクロイックス コート 9

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 特開昭57-182165(JP, A)
特開昭51-148015(JP, A)
特開平03-191799(JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
G01N 33/48 - 33/98

专利名称(译)	水溶性聚合物		
公开(公告)号	JP3696874B2	公开(公告)日	2005-09-21
申请号	JP2004364868	申请日	2004-12-16
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断, 雷法团去开球		
当前申请(专利权)人(译)	奥索 - 临床诊断, 雷法团去开球		
[标]发明人	ダニエルエスダニエル デビットエーヒルボーン カルバンアールメッシング イグナツィオエスポンティセロ スーザンジェイダニエルソン		
发明人	ダニエル エス.ダニエル デビット エー.ヒルボーン カルバン アール.メッシング イグナツィオ エス.ポンティセロ スーザン ジェイ.ダニエルソン		
IPC分类号	G01N33/536 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/54386		
FI分类号	G01N33/543.591 G01N33/543.525.U G01N33/543.525.W G01N33/536.C		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	08/232920 1994-04-25 US		
其他公开文献	JP2005164603A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提高免疫分析中分析元素的耐环境性。ZSOLUTION：水溶性聚合物含有钒IV离子(a)和重复偏振单元(b)，由式(1)表示：(A)x(B)y(C)z其中A是亲水性单体的聚合物，选自丙烯酰胺，N-异丙基丙烯酰胺等；B是选自含有阴离子基团，金属络合物形成基团的单体或选自磺酸盐基团，β-二酮基团，伯，仲或叔胺基团等的配体形成基团的单体的聚合物。；C是重复单元，衍生自与用于免疫测定的分析元件匹配的任何其他单体；x为20-98重量%；y为2-80重量%；并且z为0-20重量%。Z