

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3712978号  
(P3712978)

(45) 発行日 平成17年11月2日(2005.11.2)

(24) 登録日 平成17年8月26日(2005.8.26)

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>

F I

GO 1 N 33/53  
GO 1 N 33/543

GO 1 N 33/53 E  
GO 1 N 33/543 5 O 1 A  
GO 1 N 33/543 5 O 1 D  
GO 1 N 33/543 5 9 7

請求項の数 11 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2001-576459 (P2001-576459)  
(86) (22) 出願日 平成13年4月6日(2001.4.6)  
(65) 公表番号 特表2003-531378 (P2003-531378A)  
(43) 公表日 平成15年10月21日(2003.10.21)  
(86) 国際出願番号 PCT/US2001/011314  
(87) 国際公開番号 W02001/079844  
(87) 国際公開日 平成13年10月25日(2001.10.25)  
審査請求日 平成14年11月20日(2002.11.20)  
(31) 優先権主張番号 09/548,883  
(32) 優先日 平成12年4月13日(2000.4.13)  
(33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 591099809  
バイオラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルズ, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000  
(74) 代理人 100077517  
弁理士 石田 敬  
(74) 代理人 100092624  
弁理士 鶴田 準一  
(74) 代理人 100087871  
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】 甲状腺障害の多被検体診断試験

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

単一の患者試料を分析して甲状腺障害を示す4つの生物学的マーカーのレベルを同時に測定する方法において、

(a) 単一の患者試料を第1懸濁液中で磁気応答性材料から構成された粒子混合物とインキュベートし、前記粒子混合物はグループ(i)~(iv) :

- (i) 抗甲状腺刺激ホルモンで被覆された粒子、
- (ii) 抗トリヨードチロニンで被覆された粒子、
- (iii) 抗チロキシンで被覆された粒子、および

(iv) 希釈剤と甲状腺ペルオキシダーゼおよび抗ヒトIgGから成る群から選択されるメンバーとの混合物で被覆された粒子、

から構成されており、各グループはフローサイトメトリーにより各他のグループと区別可能であり、

(b) 前記粒子を前記第1懸濁液から回収し、そして前記回収された粒子を第2懸濁液の中で、標識化された結合性メンバーの混合物とインキュベートし、前記標識化された結合性メンバーの混合物は、

- (1) 標識化された抗甲状腺刺激ホルモン、

(2) 標識化されたアナログ組成物、前記アナログ組成物に対して抗トリヨードチロニンおよび抗チロキシンは免疫学的結合アフィニティーを有するが、前記免疫学的結合アフィニティーはトリヨードチロニンに対する抗トリヨードチロニンのそれおよびチ

10

20

ロキシシンに対する抗チロキシシンのそれよりも小さい、および

(3) グループ(iv)の粒子が甲状腺ペルオキシダーゼで被覆されているとき、標識化されたヒトIgG、またはグループ(v)の粒子が抗ヒトIgGで被覆されているとき、標識化された甲状腺ペルオキシダーゼ、

を含んでなり、前記希釈剤は生物学的マーカーおよび前記標識化された結合性メンバーに対して不活性であり；そして

(c)前記粒子を前記第2懸濁液から回収し、こうして回収された前記粒子に結合した標識の量を検出すると同時に、こうして検出された標識の量を前記標識が結合するグループに対してフローサイトメトリーにより補正し、これにより甲状腺刺激ホルモン、トリヨードチロニン、チロキシシン、および抗甲状腺ペルオキシダーゼのレベルを個々に表す値を得る；

10

ことを含んでなる方法。

【請求項2】

グループ(iv)の前記粒子を前記希釈剤と抗ヒトIgGとの混合物で被覆し、そして前記標識化された結合性メンバー(3)が標識化された甲状腺ペルオキシダーゼである、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

グループ(iv)の前記粒子を前記希釈剤と甲状腺ペルオキシダーゼとの混合物で被覆し、前記標識化された結合性メンバー(3)が標識化された抗ヒトIgGであり、

前記粒子混合物が、グループ(v)をさらに含んでなり、これは希釈剤とチログロブリンとの混合物で被覆された粒子から成り、そして

20

工程(c)が甲状腺刺激ホルモン、トリヨードチロニン、チロキシシン、抗甲状腺ペルオキシダーゼ、および抗チログロブリンのレベルを個々に表す値を同時に得ることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

(b)(2)の前記標識化されたアナログ組成物が抗トリヨードチロニンおよび抗チロキシシンの両方に対して免疫学的結合アフィニティーを有する単一の種である、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記単一の種が標識化されたN-t-ブチルオキシカルボニル-3,5-ジヨード-L-チロニン、標識化されたN-アセチル-3-ヨード-L-チロシン、標識化されたN-t-ブチルオキシカルボニル-3',3,5-トリヨード-L-チロニン、標識化されたN-t-ブチルオキシカルボニル-3,5-ジヨード-L-チロシン、標識化されたN-アセチルフェニルアラニル-3,5-ジヨード-L-チロシン、標識化されたN-アセチル-3,5-ジブromo-L-チロシン、および標識化されたN-アセチル-3,5-ジヨード-L-チロシンから成る群から選択されるメンバーである、請求項4に記載の方法。

30

【請求項6】

(b)(2)の前記標識化されたアナログ組成物が2つの別個の種の組合わせであり、一方は抗トリヨードチロニンに対する免疫学的結合アフィニティーを有し、そして他方は抗チロキシシンに対する免疫学的結合アフィニティーを有する、請求項1に記載の方法。

40

【請求項7】

前記希釈剤がウシ血清アルブミン、ブタゼラチン加水分解物、キーホールリンペットヘモシアニン、アミン誘導化デキストラン、およびポリアクリル酸から成る群から選択されるメンバーである、請求項1に記載の方法。

【請求項8】

一方のサブグループが他方のサブグループよりも実質的により大きい感度を提供し、これにより低い濃度のTSHを測定するために有効であるように、グループ(i)が互いに粒度により区別される2つのサブグループから構成されている、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

一方のサブグループが他方のサブグループよりも実質的により大きい感度を提供し、こ

50

れにより低い濃度のTSHを測定するために有効であるように、グループ(i)が抗甲状腺刺激ホルモンのコーティングにより互いに区別される2つのサブグループから構成されている、請求項1に記載の方法。

【請求項10】

単一の試料を分析して甲状腺障害を示す4つの生物学的マーカーのレベルを同時に測定するための組成物において、この組成物は、下記グループ(i)~(iv)：

- (i) 抗甲状腺刺激ホルモンで被覆された粒子、
- (ii) 抗トリヨードチロニンで被覆された粒子、
- (iii) 抗チロキシンで被覆された粒子、および
- (iv) 希釈剤と甲状腺ペルオキシダーゼおよび抗ヒトIgGから成る群から選択される

メンバーとの混合物で被覆された粒子、  
から構成された磁気応答性材料の粒子の混合物を含んで成り、  
ここで、各グループの粒子は他の各グループの粒子から、サブパラグラフ(i)、(ii)、(iii)及び(iv)の被覆から独立のフローサイトメトリーにより区別可能な性質により区別可能である、  
ことを特徴とする組成物。

10

【請求項11】

単一の試料を分析して甲状腺障害を示す4つの生物学的マーカーのレベルを同時に測定するための試験系において、

- (a) 下記後ループ(i)~(iv)から構成される粒子の混合物：

- (i) 抗甲状腺刺激ホルモンで被覆された粒子、
- (ii) 抗トリヨードチロニンで被覆された粒子、
- (iii) 抗チロキシンで被覆された粒子、および
- (iv) 希釈剤と甲状腺ペルオキシダーゼおよび抗ヒトIgGから成る群から選択される

メンバーとの混合物で被覆された粒子、  
ここで、各グループの粒子は他の各グループの粒子から、サブパラグラフ(i)、(ii)、(iii)及び(iv)の被覆から独立のフローサイトメトリーにより区別可能な性質により区別可能である、

20

- (b) 下記(1)、(2)及び(3)を含んで成る標識された結合メンバーの混合物：

- (1) 標識化された抗甲状腺刺激ホルモン、
- (2) 標識化されたアナログ組成物、ここで、このアナログ組成物に対して抗トリヨードチロニンおよび抗チロキシンは免疫学的結合アフィニティーを有するが、前記免疫学的結合アフィニティーはトリヨードチロニンに対する抗トリヨードチロニンのそれおよびチロキシンに対する抗チロキシンのそれよりも小さい、および
- (3) グループ(iv)の粒子が甲状腺ペルオキシダーゼで被覆されているとき、標識化されたヒトIgG、またはグループ(v)の粒子が抗ヒトIgGで被覆されているとき、標識化された甲状腺ペルオキシダーゼ、

ここで、前記希釈剤は生物学的マーカーおよび前記標識化された結合性メンバーに対して不活性である、

を含んで成る試験系。

30

40

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

甲状腺障害は最も普通の内分泌学的疾患である。甲状腺産生ホルモンが少なすぎる甲状腺機能低下は代謝速度を正常速度の半分に減少させることがあるが、甲状腺ホルモンが過剰に産生される甲状腺機能亢進はそれを2倍にすることができる。8~9百万人のアメリカ人は甲状腺機能低下およびその関連する疾患に悩まされている。このような疾患は、75歳を超える5人の女性のうちの1人に影響を与える橋本甲状腺炎(慢性リンパ性甲状腺炎)、非中毒性甲状腺腫(クレンチ病)、およびリーデル甲状腺炎を包含する。ほぼ350,000人のアメリカ人はグレーブス病(中毒性甲状腺腫または甲状腺中毒症)、中毒性小結節性甲状腺

50

腫、新生児甲状腺機能亢進、および医原性甲状腺機能亢進の形態の甲状腺機能亢進を患う。

【0002】

甲状腺障害を検出する方法は生物学的マーカーとして血流中のいくつかの種を利用し、それらのレベルを障害の存在および種類の指示として測定する。トリヨードチロニン(T3)およびチロキシン(T4)はマーカーの2つである。甲状腺機能低下の症状において、これらのマーカーのレベルは低く、それぞれ、血清中において通常1.1~2.9nmol/Lおよび64~142nmol/Lであるが、甲状腺機能亢進の症状においてそれらは増加する。

【0003】

他のマーカー、甲状腺刺激ホルモン(TSH)は、0.5~5mIU/Lの正常血清レベルに関して、甲状腺機能低下の症状において増加し、甲状腺機能亢進の症状において減少することによって反対方向に変化する。ある種の症状、顕著には橋本甲状腺炎において、抗チログロブリン(抗Tg)抗体および抗甲状腺ペルオキシダーゼ(抗TPO)抗体(後者はまた抗ミクロソーム抗体と呼ばれる)は、追加のマーカーであり、また増加するが、抗Tg測定を使用しない抗TPOの測定はしばしば適切であると考えられる。他の試験は基底代謝速度の測定および甲状腺の閉じた経皮的生検を包含する。

10

【0004】

血清被検体により甲状腺障害を診断するために、こうして医師は4つまたは5つのマーカーのレベルを検出することを必要とする。各マーカーについて個々の手法を使用することは、材料、装置、および労力において費用のかかる仕事であり、そしてエラーのリスクは実行する手法の数に比例する。対照的に、医師が単一の試験においてマーカーのすべてを検出することができる場合、コストはより少なく、エラーの確率は有意に減少し、そして反復試験の必要性のリスク(および患者から追加の血液試料を必要とする厄介さ)は少なくなるであろう。さらに、診断、処理、および回収にかかる時間を実質的に短縮することができる。

20

【0005】

不都合なことには、統合されたまたは同時の試験手法の開発は、こうして、多被検体の分析の実行を必要とする技術および特定のマーカーの性質の差によりさらに不能化されてきている。マーカーのすべてではなく、いくつかは他のものよりも低い濃度で存在し、したがってより大きい感度のアッセイを必要とする。各々はある種類のイムノアッセイにより検出することができるが、イムノアッセイの化学は被検体毎に異なり、そして異なる試薬が異なる時間に添加される。事実これらの差を受け入れ、かつマーカーの各々について個々の値を提供し、しかも単一の反応混合物中で実行できるアッセイを開発することは1つの課題である。

30

【0006】

発明の要約

すべての5つのマーカーまたは抗Tg含まないすべての5つのマーカーの個々のレベルを検出する単一反応混合物のマルチプレクスアッセイ(multiplexed assay)は、複数のグループに従い互いに異なる粒子の単一混合物を使用することによって実行することができることが今回発見され、各グループはフローサイトメトリーにより他のグループとの区別を可能とする独特な性質を有し、そして各グループは検出すべき被検体の1つに対して選択的アフィニティーを有する免疫学的結合性メンバーの表面コーティングを支持する。

40

【0007】

粒子の1つのグループ(およびいくつかの場合において、広い範囲の検出を達成するために2つのグループ)はこうして抗TSHで被覆され、第2グループはT3に対する抗体で被覆され、第3グループはT4に対する抗体で被覆され、そして第4グループはTPOまたは抗ヒトIgGで被覆される。試料をTgについてアッセイする場合、こうして各グループは個々の被検体に対して向けられる個々の被検体を目的とする独特のコーティングと、フローサイトメトリーによる区別を可能とする追加の独特の特性との両方を有する。

【0008】

50

粒子の全体の混合物を試料の中に懸濁させ、そして懸濁液を適当な時間の間インキュベートして免疫反応を発生させる。次いで粒子を回収し、標識化された結合性メンバーの溶液の中に再懸濁させる。標識化された結合性メンバーは、標識化された抗TSH、FT3またはFT4粒子上の抗体がT3またはT4に対するよりもアナログに対して低いアフィニティーを有するように選択されたT3およびT4の標識化されたアナログ、および標識化された抗ヒトIgGまたは標識化されたTP0を包含する。最後の結合性メンバーは、粒子の第4グループをTP0で被覆する場合、およびまた前述の第5グループが存在する場合、標識化された抗ヒトIgGであり、そして粒子の第4グループが抗ヒトIgGで被覆する場合、標識化されたTP0であろう。

**【0009】**

再懸濁された粒子の表面において免疫学的反応が起こるために十分な時間が経過した後、粒子を第2懸濁液から回収し、粒子に結合した標識の量を検出すると同時に、粒子をフローサイトメトリーにより区別する。こうして試料中のTSH、T3、T4、および必要に応じて、抗Tgの量について個々の値が得られ、すべては試薬の添加、インキュベーション、粒子回収工程、洗浄工程、および各被検体についての検出工程を実行する共通のアッセイ混合物から得られる。こうして、このアッセイはTSHについてのサンドイッチアッセイをT3およびT4についての逐次競合アッセイおよびTP0（およびTg、含める場合）についての血清学的アッセイと組み合わせる。

**【0010】**

こうして、本発明のアッセイは、TSHについてのサンドイッチ型イムノアッセイを抗TP0および抗Tgについての血清学的アッセイと組み合わせる。サンドイッチアッセイと逐次競合アッセイとの組み合わせは、2つの抗体（TSH）に対する結合を可能とするために十分に大きい分子、およびこのような抗体の結合（T3およびT4）を可能とするために十分に小さい分子を同時に検出することを可能とする。サンドイッチアッセイおよび逐次競合アッセイと血清学的アッセイとの組み合わせは、抗原被検体および抗体被検体の同時検出を可能とする。

**【0011】**

さらに、種々の被検体のレベルは他よりも大きい感度のいくつかの必要なアッセイとともにかなり異なるので、アッセイのいくつか、顕著には抗TP0および抗Tgのアッセイのシグナルを低下させることによって調節を行う。それぞれの粒子のグループの粒子上の追加の被覆メンバーとして希釈剤を使用し、これにより免疫学的反応の反応速度を低下させることによって、この調節は達成される。好ましい態様において、標識化された結合性メンバーを添加する懸濁液にポリエチレングリコールを添加して、反応速度を増加し、こうしてアッセイのTSH部分の感度を増加することによって、追加の調節を行う。他の好ましい態様において、2つの相互に区別可能な粒子のグループをTSHの測定に使用し、各粒子のグループを分析範囲の異なる部分について最適化する。

**【0012】**

本発明の他の面において、前述の方法において互いに異なるグループに分割された粒子の単一混合物を使用することによって、2つのマーカー、TSHおよびT4の個々のレベルを単一試料において検出する。本発明のこの面は、TSHについてのサンドイッチ型アッセイをT4についての逐次競合アッセイと組み合わせる。

本発明の追加の目的、特徴、および利点は、下記の記載から明らかとなるであろう。

**【0013】**

本発明および特定の態様の詳細な説明

すべての5つのマーカーについての本発明によるアッセイは第1図に絵画的に表示されている。被覆された粒子の混合物11は、粒子の6つの異なるグループを含有し、そして円の内部の文字A（およびA'）～Eを有しかつ抗体または抗原が結合した円の列により表されている。各文字はフローサイトメトリーにより他と区別可能な粒子の異なるグループ（AおよびA'も互いに区別可能である）を表示し、そして円に結合した構造は粒子上のコーティングを表す。

**【0014】**

10

20

30

40

50

粒子A、A'、B、およびCは抗TSH（AおよびA'の両方）、抗T3（B）、および抗T4（C）抗体で被覆された表面を有し、各抗体は横側の「Y」構造により表され、「Y」構造はその1つのFab鎖上に示された各抗体の特異性を有する。粒子Dは、それぞれ、TP0およびTgで被覆されており、各々は特定の抗原の略号を取り囲むダイヤモンド形により表されている。「A」粒子は、TSHコーティングの密度および粒度が異なるために、「A'」と感度が異なる。

【0015】

アッセイすべき試料12は、粒子の列11の右の列により表されている。試料12は被検体TSH、T3、T4、抗TP0、および抗Tgを含有する。TSH、T3、およびT4は、それぞれ、上部における3つのダイヤモンド形構造列により表され、そして抗Tgは、それぞれ、下部における2つの「Y」構造により表されている。

10

インキュベーション、粒子の回収、および洗浄後、下記の粒子混合物13が生ずる：

粒子上の抗TSHコーティングを通して粒子に結合した試料からのTSHを有する「A」および「A'」粒子。粒子に結合したTSHをもたない「A」および「A'」粒子上のいくつかの部位が残留するが、これら部位は粒子上に存在してさえ、アッセイの残部に参加しないので、示されていない。

【0016】

粒子上の抗T3コーティングを通して粒子に結合した試料からのT3を有する「B」粒子。粒子に結合したT3をもたない「B」粒子上のいくつかの部位が残留する。これらの部位は流れ図において別の粒子として示されており、後述するように、アッセイの連続する工程において結合反応を行う。

20

粒子上の抗T4コーティングを通して粒子に結合した試料からのT4を有する「C」粒子。粒子に結合したT4をもたない「C」粒子上のいくつかの部位が残留する。これらの部位は同様に流れ図において別の粒子として示されており、後述するように、アッセイの連続する工程において結合反応を行う。

【0017】

粒子上の抗TP0抗原コーティングを通して粒子に結合した試料からの抗TP0を有する「D」粒子。ここで再び、粒子に結合したTP0抗体をもたない「D」粒子上のいくつかの部位が残留するが、アッセイの残部に参加せず、したがって示されていない。

粒子上の抗Tg抗原コーティングを通して粒子に結合した試料からの抗Tgを有する「E」粒子。ここでまた、「E」粒子上に存在する部位のすべてがTg抗体に結合するようになるわけではなく、これらの遊離部位はアッセイの残部において非結合のままであり、したがって示されていない。

30

【0018】

この粒子混合物を標識化された結合性メンバーの混合物14とともに再懸濁させる。この混合物は(i)標識化された抗TSH、(ii)抗T3および抗T4の両方に結合するT3およびT4の標識化されたアナログ（しるし「T3/4」を含有するダイヤモンド形により表されている）またはそれぞれ抗T3および抗T4に優先的に結合するT3およびT4の個々の標識化されたアナログ（それぞれ、しるし「T3A」および「T4A」列により表されている）、および(iii)標識化された抗ヒトIgGを包含する。これらの標識化された結合性メンバーの各々上の標識は星印により表されている。「T3/4」により表される標識化されたアナログは、抗T3および抗T4の両方がT3またはT4それ自体に対して有するよりも低いアフィニティーを有するものである。したがって、アナログは、既にT3およびT4に結合するようになっていない抗体にのみ結合する。個々の標識化されたアナログT3AおよびT4Aについて同一のことが適用される。

40

【0019】

インキュベーション、粒子の回収、および洗浄後、下記のものを包含する粒子混合物15が生ずる：

サンドイッチアッセイの結果を表す「A」および「A'」粒子、粒子表面上の抗TSHコーティングと標識化された抗TSHとの間に位置する被検体TSH、こうして標識は試料中のTSHの

50

量の直接的指示を与える。

逐次競合アッセイの結果である、標識化および非標識化「B」の混合物、標識化された「B」粒子（どの標識化されたアナログを使用するかに依存して、2つの代替物が示されている）は、被検体T3が結合するようにならず、これにより試料中のT3の量の逆数の指示を与える部位を表す。

【0020】

逐次競合アッセイの結果である、標識化および非標識化「C」の混合物、標識化された「C」粒子（どの標識化されたアナログを使用するかに依存して、2つの代替物が示されている）は、被検体T4が結合するようにならず、これにより試料中のT4の量の逆数の指示を与える部位を表す。

10

間接的または「抗原捕捉」血清学的アッセイの結果を表す「D」粒子、粒子表面上の抗TP0コーティングと標識化された抗ヒトIgGとの間に位置する被検体抗TP0、こうして標識は試料中の抗TP0の量の直接的指示を与える。

間接的または「抗原捕捉」血清学的アッセイの結果を表す「E」粒子、粒子表面上の抗Tgコーティングと標識化された抗ヒトIgGとの間に位置する被検体抗Tg、こうして標識は試料中の抗Tgの量の直接的指示を与える。

【0021】

第2図は、抗TP0についての直接的または「クラス捕捉」血清学的アッセイを使用する、本発明による他のアッセイ、わずかに4つのマーカー被検体、TSH、T3、T4、および抗TP0についての1つのアッセイの絵画的表示である。このアッセイにおける粒子混合物21は、粒子の5つの異なるグループのみを含有し、そして第1図において使用する同一の記号法のタイプを使用して、円の内部の文字A（およびA'）～Eを有しかつ抗体または抗原が結合した円の列により表されている。粒子A、A'、B、およびCは第1図に示すものと同一である。粒子Dは、試料中のすべてのIgG抗体に結合する、抗ヒトIgGで被覆されている。

20

【0022】

しかしながら（後述するように）、後に添加される標識化された結合性メンバーのうちで、IgG抗体に結合し、こうしてD粒子に結合するただ1つは標識化されたTP0であり、こうして抗TP0を有するD粒子のみが検出されるであろう。他のIgG抗体に結合するD粒子はアッセイの残部に参加せず、したがって、図示されていない。このアッセイの好ましい態様において、D粒子のコーティングの中に希釈剤を使用しない。アッセイすべき試料22は検出すべき4つの被検体を含有するとして示されている。

30

【0023】

粒子および試料のインキュベーション、粒子の回収、および洗浄後、下記のものを含む粒子混合物23が生ずる：

第1図におけるような「A」、「A'」、「B」、および「C」粒子、コーティングを形成するために使用した結合性メンバーを通してそれに結合した試料からの被検体を有し、結合した被検体をもたず、アッセイの残部に参加する、これらの粒子上の部位を表す、追加の「B」および「C」。

【0024】

粒子上のIgGコーティングを通して粒子に結合した試料からの抗TP0を有する「D」粒子。標識化された抗ヒトIgGを標識化されたTP0で置換することによって、第1図のアッセイの標識化された結合性メンバーと異なる、標識化された結合性メンバーの混合物24と、粒子混合物を再懸濁させる。第1図におけるように、これらの結合性メンバーのすべては星印により表されている。

40

【0025】

インキュベーション、粒子の回収、および洗浄後、下記のものを含む最終粒子混合物25が生ずる：

サンドイッチアッセイの結果を表す「A」および「A'」粒子、粒子表面上の抗TSHコーティングと標識化された抗TSHとの間に位置する被検体TSH、こうして標識は試料中のTSHの量の直接的指示を与える。

50

## 【0026】

逐次競合アッセイの結果である、標識化および非標識化「B」の混合物、標識化された「B」粒子（どの標識化されたアナログを使用するかに依存して、2つの代替物が示されている）は、被検体T3が結合するようにならず、これにより試料中のT3の量の逆数の指示を与える部位を表す。

逐次競合アッセイの結果である、標識化および非標識化「C」の混合物、標識化された「C」粒子（どの標識化されたアナログを使用するかに依存して、2つの代替物が示されている）は、被検体T3が結合するようにならず、これにより試料中のT3の量の逆数の指示を与える部位を表す。

## 【0027】

逐次競合アッセイの結果である、標識化および非標識化「C」の混合物、標識化された「C」粒子（どの標識化されたアナログを使用するかに依存して、2つの代替物が示されている）は、被検体T4が結合するようにならず、これにより試料中のT4の量の逆数の指示を与える部位を表す。

直接的または「クラス捕捉」血清学的アッセイの結果を表す「D」粒子、粒子表面上の抗IgGコーティングと標識化された抗TP0との間に位置する被検体抗TP0、こうして標識は試料中の抗TP0の量の直接的指示を与える。

## 【0028】

マーカー抗TP0および抗Tgは典型的な血清試料の中に高い濃度で存在するが、TSHは低い濃度で存在するので、アッセイにおいて、抗TP0および抗Tgアッセイにおいて使用する粒子のための共被覆材料として希釈剤を使用することによって利益が得られる。希釈剤は結合のために有効な部位について競合し、したがって粒子上のTP0およびTgのコーティング密度を低下するので、そのように呼ばれる。これにより、アッセイの精度を実質的に低下させないで、これらの粒子について実行されるアッセイからのシグナルが減少する。こうして、希釈剤は、試料中のいずれの被検体または他のアッセイ試薬との特異的結合に関係しない物質である。

## 【0029】

こうして、被検体およびアッセイにおいて使用する標識化された結合性メンバーに対して不活性であるコーティングとして、粒子に適用できる任意の物質を希釈剤として使用することができる。例はウシ血清アルブミン、ブタゼラチン加水分解物、キーホールリンペクトヘモシアニン、アミン誘導化デキストラン、およびポリアクリル酸である。ウシ血清アルブミンは好ましい例である。希釈剤の使用量を変化させることができる。粒子表面上の結合部位についてTP0およびTgと競合し、かつ許容可能な正確度で複製できるアッセイを生成する、任意の量を使用することができる。

## 【0030】

高い陽性と低い陽性とを区別すると同時になお十分なアッセイ感度を達成することができる（すなわち、陰性と低い陽性とを区別することができる）レベルに抗TP0シグナルを減少するために、グループ（iv）粒子上のTP0コーティング密度は好ましくは約 $0.3 \text{ ng/cm}^2$  約 $50 \text{ ng/cm}^2$ の範囲内、最も好ましくは約 $0.5 \text{ ng/cm}^2$  ~ 約 $50 \text{ ng/cm}^2$ の範囲内である。抗Tgを包含するアッセイにおいて、同一範囲のコーティング密度を使用することができる。

## 【0031】

アッセイを改良する他の手段はTSHアッセイの感度を増加させることである。これは最終結合反応を実行する懸濁液にポリエチレングリコール（PEG）を添加することによって達成することができる。こうして、初期アッセイ試薬を試料とインキュベートした後回収した標識化された結合性メンバーおよび粒子を、添加剤としてPEGを含有する緩衝液の中に懸濁させる。これはPEGが存在するために反応速度を増加させることによって、TSHアッセイからのシグナルを増加させる。

## 【0032】

使用するPEGの分子量は、PEGが反応混合物の中に完全に溶解するかぎり、本発明に対して

10

20

30

40

50

決定的ではない。最適な分子量および比率は、アッセイ混合物および手法の他のパラメータに依存して変化することがある。しかしながら、ほとんどの場合において、PEGの分子量は約2,000～約20,000、好ましくは約5,000～約10,000(最も好ましくはほぼ8,000)の範囲であり、そして量は緩衝液の約0.5重量%～約4.0重量%、好ましくは約2.0重量%～約3.0重量%の範囲であろう。

#### 【0033】

PEGの量もまた変化することができるが、最も有効な結果について、TSHアッセイの感度に対して最大の利益を提供すると同時に非特異的結合の増加を最小にする量を選択する。複合体希釈剤における重量百分率を増分的に0から5%に増加させ、各々を使用してTSHアッセイを実行し、そして非特異的結合レベルをPEGレベルの関数として観測することによって、最適な量を決定することができる。次いで、非特異的結合をほとんど、あるいはまったく増加させないことによって達成される、最高のPEGレベルを選択すべきである。PEGの添加は、また、TSHおよびT4のみを検出する本発明の態様において有効である。これらのアッセイについてPEGの好ましいタイプおよび量は、前述したものと同一である。

10

#### 【0034】

本発明のある態様において、大きい動力的範囲を受け入れるTSH検出における柔軟性は、TSHグループについて粒子の2つの区別可能なサブグループを使用することによって達成され、ここで2つのサブグループの一方はTSHの高い濃度を測定し、そして他方は低い濃度を測定するためのものである。大きい粒子は比較的小さい粒子よりも高い感度を提供し、そしてより高いコーティング濃度を有する粒子について同一のことが当てはまる(粒度の差を無視して)ことが発見された。

20

#### 【0035】

こうして、TSHの低い濃度および高い濃度の両方の測定を可能とするために、粒子の2つのサブグループは粒度、コーティング密度または両方が異なることができる。特に好ましい態様において、一方サブグループは他のサブグループの粒子よりも大きい粒度および高い抗体コーティング濃度の両方を有する粒子を含有するであろう。次いで、前者のサブグループはTSHの比較的低い濃度の測定に特に有効であるが、後者は比較的高い濃度の測定に特に有効である。こうして、2つのサブグループは組み合わせにおいてアッセイの動力的範囲を増加させるであろう。

#### 【0036】

また、緩衝液はアッセイ試薬を安定化するタンパク質を含有することができる。適当なタンパク質の例は、ほぼ生理学的pHにおける緩衝化生理食塩水中のウシガンマグロブリンである。

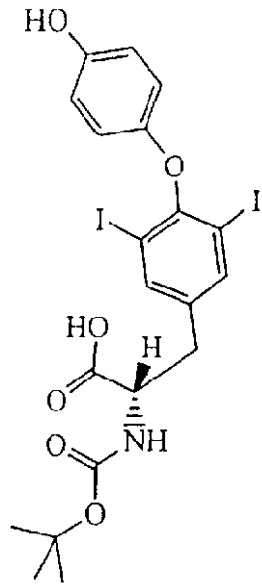
30

標識化された結合性メンバーは、抗T3および抗T4の両方に対して免疫学的結合アフィニティを有するが、T3またはT4それ自体に対して低いアフィニティを有する組成物を包含し、これにより組成物は既に抗体に結合するようになったT3またはT4を置換しない。こうして、組成物はT3およびT4の両方の構造的アナログまたは各々の別々の構造的アナログであろう。使用できるT3およびT4の構造的アナログの例は次の通りである：

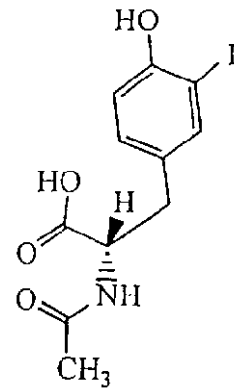
#### 【0037】

#### 【化1】

40

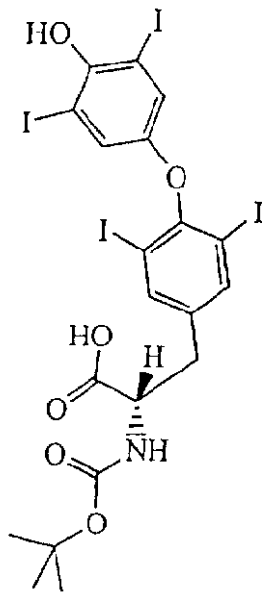


N-tert-ブチルオキシカルボニル  
-3,5-ジイオド-L-チロニン

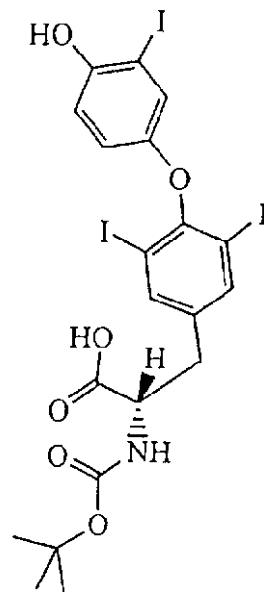


N-アセチル-3-イオド-L-チロシン

10



N-tert-ブチルオキシカルボニル  
-L-チロキシン



N-tert-ブチルオキシカルボニル  
-3',3,5-トリイオド-L-チロニン

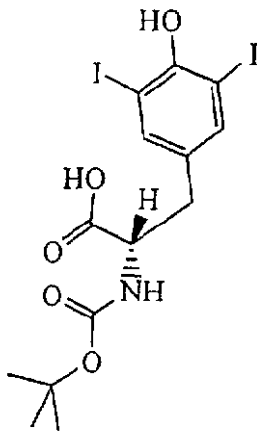
20

30

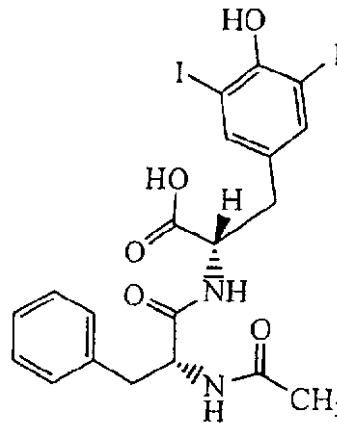
【 0 0 3 8 】

【 化 2 】

40

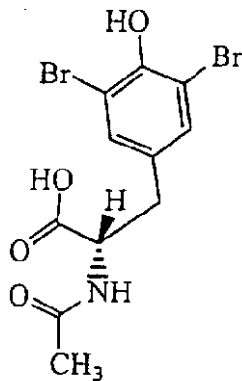


N-tert-ブチルオキシカルボニル  
-3,5-ジイオド-L-チロシン

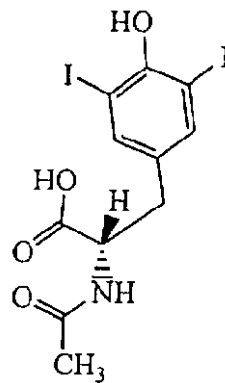


N-アセチルフェニルアラニル  
-3,5-ジイオド-L-チロシン

10



N-アセチル-3,5-ジブromo-L-チロシン



N-アセチル-3,5-ジイオド-L-チロシン

20

#### 【0039】

本発明の実施において使用する粒子は微視的サイズであり、ポリマー材料から形成されていることが好ましい。微小粒子として有効である粒子は生物学的試料の成分に対して不活性であり、かつ微小粒子表面に添付される結合性メンバーのコーティング以外のアッセイ試薬に対して不活性である。適当な微小粒子材料は、また、最小の自己蛍光を有し、固体であり、試料の中に不溶性であり、かつアッセイにおいて使用する緩衝液、溶媒、担体、希釈剤、または懸濁剤の中に不溶性であり、そして好ましくは共有結合を通して、適当なコーティング材料に添付ことができるであろう。

#### 【0040】

適当なポリマーの例は、ポリエステル、ポリエーテル、ポリオレフィン、ポリアルキレンオキsid、ポリアミド、ポリウレタン、多糖類、セルロース、およびポリイソプレンである。多数のポリマーにおいて、架橋は微小粒子に構造的完全性および剛性を付与するために有効である。微小粒子のサイズ範囲は変化ことができ、そして粒度範囲は本発明に対して決定的ではない。ほとんどの場合において、微小粒子は約0.3マイクロメートル～約100マイクロメートル、好ましくは約0.5マイクロメートル～約40マイクロメートルの範囲であろう。

#### 【0041】

アッセイの粒子回収および洗浄の工程を促進するために、粒子は好ましくは磁気応答性材料、すなわち、磁場に対して応答する任意の材料を含有する。次いで、インキュベーション

30

40

50

ン後または洗浄工程後、懸濁液をインキュベートする反応器に磁場を付与し、粒子を反応器の壁に付着させ、これによりデカンテーションまたは吸引により液体の除去を可能とすることによって、固相および液相を分離する。本発明において問題の磁気応答性材料は、常磁性材料、強磁性材料、フェリ磁性材料、およびメタ磁性を包含する。常磁性材料は好ましい。例は鉄、ニッケル、およびコバルト、ならびに金属酸化物、例えば、 $\text{Fe}_3\text{O}_4$ 、 $\text{BaFe}_{12}\text{O}_{19}$ 、 $\text{CoO}$ 、 $\text{NiO}$ 、 $\text{Mn}_2\text{O}_3$ 、および $\text{CoMnP}$ である。

#### 【0042】

磁気応答性材料をポリマー全体を通して分散させ、ポリマー表面上のコーティングとしてまたは表面上の2またはそれ以上のコーティングの1つとして適用するか、あるいは材料を粒子に固定する他の方法で組込みまたは添付することができる。粒子中の磁気応答性材料の量は決定的ではなく、広い範囲にわたって変化であることができる。この量は微小粒子の密度に影響を与えることがあるが、液相と固相との間の接触を最大とする目的でかつフローサイトメトリーを促進するために、量および粒度の両方は微小粒子を懸濁させて維持ことの容易さに影響を与えることがある。

10

#### 【0043】

微小粒子中の磁気応答性材料の過剰量は、アッセイの結果を妨害するために十分に高いレベルで自己蛍光を発生させることがある。したがって、磁気応答性材料の濃度は材料から発散する自己蛍光を最小するために十分に低いことが好ましい。これらの事実を考慮して、本発明による粒子中の磁気応答性材料は好ましくは全体として粒子の約0.05～約75重量%の範囲である。より好ましい重量百分率の範囲は約2%～約25%、なおより好ましい重量百分率の範囲は約2%～約8%である。

20

#### 【0044】

適当なアッセイ試薬を使用する粒子表面の被覆は、静電的誘引、特異的アフィニティー相互作用、疎水性相互作用、または共有結合により達成することができる。共有結合は好ましい。慣用手段、特に官能基を含有するモノマー、例えば、唯一のモノマーとしてまたはコモノマーとして働くモノマーを使用することによって、アッセイ試薬の共有結合のための官能基でポリマーを誘導化であることができる。適当な官能基の例は、アミン基(- $\text{NH}_2$ )、アンモニウム基(- $\text{NH}_3^+$ または- $\text{NR}_3^+$ )、ヒドロキシル基(- $\text{OH}$ )、カルボン酸基(- $\text{COOH}$ )、およびイソシアネート基(- $\text{NCO}$ )である。カルボン酸基をポリオレフィンの中に導入するために有用なモノマーは、例えば、アクリル酸およびメタクリル酸である。

30

#### 【0045】

粒子表面上の反応性基の密度を増加させかつ立体障害性を減少させる手段として、結合基を使用することができる。これはアッセイの範囲および感度を増加させるであろう。また、必要に応じて本発明の特定の被覆材料を固定するために、固相表面に特定のタイプの反応性基を付加する手段として結合基を使用することができる。適当な有用な結合基の例は、ポリリシン、ポリアスパラギン酸、ポリグルタミン酸およびポリアルギニンである。

#### 【0046】

一般に、高い自己蛍光を示す粒子の使用を回避するように注意すべきである。慣用重合技術により広範な種類の出発モノマーから形成された粒子は、多くて低レベルの自己蛍光を示すので、一般に適当である。逆に、多孔度を増加する、それゆえ表面積を増加するように改質された粒子、すなわち、文献において「巨大孔質(macroporous)」として言及されている粒子は、高い自己蛍光を示すので、望ましくない。粒度が増加しかつジビニルベンゼンモノマーの百分率が増加するとともに、自己蛍光は増加することが考えられる。

40

#### 【0047】

本発明による微小粒子のマルチプレクシングは、アッセイが4つの甲状腺障害マーカー、5つの甲状腺障害マーカー、またはマーカー+他の化合物、例えば、インターフェロンに対して向けられるかどうかによって依存して、微小粒子を4つ、5つ、またはそれ以上のグループに割り当てることによって達成される。粒子の各グループは、そのグループをフローサイト

50

メトリーにより他のグループと区別可能とする、独特の弁別パラメーターである。

【0048】

弁別パラメーターの1つの例は粒子直径であり、種々のグループは非オーバーラッピング直径の部分範囲により定められる。直径の部分範囲の幅および隣接する部分範囲の平均直径間の間隔は、フローサイトメトリーによる部分範囲の弁別を可能とするように選択され、そしてフローサイトメトリーの使用および計装における当業者にとって明らかであろう。この明細書において、用語「平均直径」は数平均直径を意味する。ほとんどの場合において、好ましい部分範囲幅は平均直径の約±5%CVまたはそれより小さく、ここで「CV」は「変動係数」を意味し、粒子直径/平均粒子直径×100の標準偏差として定義される。

【0049】

種々の部分範囲の中の平均直径間の最小間隔は微小粒子の粒度分布、異なるアッセイ試薬を取り付ける目的で粒度により微小粒子を分離する容易さ、およびフローサイトメトリー装置の型および感度に依存して変化することがある。ほとんどの場合において、異なる部分範囲の平均直径が部分範囲の1つの平均直径の少なくとも約6%、好ましくは部分範囲の1つの平均直径の少なくとも約8%、最も好ましくは部分範囲の1つの平均直径の少なくとも約10%だけ離れているとき、最良の結果が達成されるであろう。他の好ましい部分範囲の幅の関係は、各部分範囲内の粒子直径の標準偏差が隣接する部分範囲の平均直径の分離の1/3より小さい関係である。

【0050】

粒子の種々のグループを区別するために使用できる弁別パラメーターの他の例は蛍光である。粒子の中に種々の蛍光材料を組み込むことによって、弁別は達成され、粒子の中に種々の蛍光材料は異なる蛍光発光スペクトルを有し、そしてこの基準で区別される。

【0051】

蛍光は、事実、グループを互いに区別する手段および粒子について実行されるアッセイのための検出手段の両方として使用することができる。異なる発光スペクトルを有する蛍光材料の使用は、グループを互いに区別する手段として、そしてまたグループの分類をアッセイ検出と区別する手段として働くことができる。グループを区別する手段として使用できる蛍光物質の例は蛍光であり、そしてアッセイ検出に使用できる物質の例はフィコエリトリンである。この例の使用において、異なる粒子グループを互いに区別するために異なる濃度の蛍光を使用して、これらの粒子グループを染色することができるが、フィコエリトリンはアッセイにおいて使用する種々の標識化された結合性メンバー上の標識として使用される。

【0052】

粒子の種々のグループを区別するために使用できる弁別パラメーターのなお他の例は光散乱、光放射、または光散乱と光放射との組み合わせである。副角光散乱(side angle light scatter)は、粒度、粒状性、吸収および表面粗さとともに変化するが、前方角光散乱は主として粒度および屈折率により影響を受ける。こうして、これらの量の変化は種々のグループを区別する手段として働く。微小粒子の中に蛍光物質を組み込み、そして異なる蛍光強度を有するか、あるいは異なる波長の蛍光を放射する蛍光物質を使用することによって、あるいは組み込まれる蛍光物質の量を変化させることによって、光放射を変化させることができる。種々の異なる波長の蛍光放射を使用することによって、波長の差を使用して粒子グループを互いに区別することができるが、また1つのグループを他のグループと区別する標識と、標識化された結合性メンバー中の標識を区別することができる。

【0053】

上記の変法において、アレイ中の各微小粒子はそれとアソシエートした少なくとも3つの弁別パラメーターを有する、すなわち、2つの別々の波長の蛍光放射と一緒に副散乱を有するように、微小粒子は2またはそれ以上の蛍光色素をそれらの中に組み込んで有する。例えば、微小粒子は蛍光色素、例えば、Cy5をオレンジ色蛍光色素、例えば、Cy5.5と一緒に含有するように作ることができる。追加の蛍光色素を使用して、この系をさらに拡張することができる。こうして、各微小粒子は変化する波長において複数の蛍光色素を含有する

10

20

30

40

50

することができる。

【0054】

粒子の種々のグループを区別するために使用できる弁別パラメーターのなお他の例は吸収である。光を微小粒子に適用するとき、粒子による光の吸収は側方に（副角）散乱した光の強度により大部分示されるが、前方散乱光の強度は比較的影響を受けない。結局、微小粒子に関連する種々の着色色素間の吸収の差は、側方に散乱した光の強度の差を観測することによって決定される。

粒子の種々のグループを区別するために使用できる弁別パラメーターのなお他の例は、各グループ中の粒子の数である。各グループの粒子の数を既知の方法で変化させ、そして種々のアッセイ応答を有する粒子の計数を決定する。各応答を有する粒子の数により、種々の応答を特定のアッセイに関連させる。

10

【0055】

上記例が例示するように、多数のパラメーターまたは特性を弁別パラメーターとして使用して、1つのグループの微小粒子を他のグループの微小粒子と区別することができる。弁別パラメーターは、粒度、粒子の組成、光散乱に影響を与える粒子の物理的特性、異なる発光スペクトルおよび/または散乱特性を微小粒子に与える励起可能な蛍光色素または着色色素、または1または2以上の蛍光色素の異なる濃度から生ずる。

【0056】

区別可能な微小粒子のパラメーターが蛍光色素または色であるとき、それを微小粒子の表面上に被覆し、微小粒子の中に埋め込みか、あるいは微小粒子の材料の分子に結合させることができる。こうして、ポリマー材料を蛍光性色素と組み合わせるか、あるいは微小粒子に色素を含浸させることによって、蛍光性微小粒子を製造することができる。既に組込まれた色素を有し、これにより本発明において使用するために適当な微小粒子は、供給会社、例えば、スフェロテック・インコーポレーテッド（Spherotec, Inc.）（米国イリノイ州リバティビル）およびモレキュラー・プローブ・インコーポレーテッド（Molecular Probes, Inc.）（米国オレゴン州オイゲン）から商業的に入手可能である。

20

【0057】

標識化された結合性メンバーにおいて使用する標識は、検出可能なシグナルを放射する任意の標識であることができる。前述したように、多数の発光団は文献に報告されており、こうしてこの分野において知られており、そして多数はバイオテクノロジー産業に対する供給会社から容易に入手可能である。発光団についての文献源は、Cardullo他、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8790 - 8794 (1988); Dexter, D. L., J. of Chemical Physics 21: 836 850 (1953); Hochstrasser他、Biophysical Chemistry 45: 133 141 (1992); Selvin, P., Methods in Enzymology 246: 300 334 (1995); Steinberg, I., Ann. Rev. Biochem. 40: 83 114 (1971); Stryer, L., Ann. Rev. Biochem. 47: 819 846 (1978); Wang他、Tetrahedron Letters 31: 6493 - 6496 (1990); Wang他、Anal. Chem. 67: 1197 1203 (1995) を包含する。

30

発光団の例のリストは次の通りである：

【0058】

4 - アセトアミド - 4' - イソチオシアナトスチルベン - 2、2' ジスルホン酸アクリジン、  
アクリジンイソチオシアネート、  
5 - (2' - アミノエチル) アミノナフタレン - 1 - スルホン酸 (EDANS)、  
4 - アミノ - N - [(3 - ビニルスフホニル) フェニル] ナフタルイミド - 3, 5 - ジスルホン酸、  
N - (4 - アニリノ - 1 - ナフチル) マレイミド、  
アントアニルアミド、  
BODIPY、  
ブリリアントイエロー、  
クマリン、

40

【0059】

50

- 7- アミノ - 4 - メチルクマリン (AMC、クマリン120)、  
 7- アミノ - 4 - トリフルオロメチルクマリン (AMC、クマラン151)、  
 シアニン色素、  
 シアノシン、  
 4' , 6 - ジアミジノ - 2 - フェニルインドール (DAPI)、  
 5, 5'' - ジプロモピロガロール - スルホナフタレイン (プロモピロガロール・レッド)、  
 7 - ジエチルアミノ - 3 - (4' - イソチオシアナトフェニル) - 4 - メチルクマリン、  
 ジエチレントリアミンペンタアセテート、  
 4, 4' - ジイソチオシアナトジヒドロースチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸、  
 【0060】 10  
 4, 4' - ジイソチオシアナトスチルベン - 2, 2' - ジスルホン酸、  
 5 - [ジメチルアミノ]ナフタレン - 1 - スルホニルクロリド (DNS、ダンシルクロリド)  
 、  
 4 - (4' - ジメチルアミノフェニルアゾ)安息香酸 (DABCYL)、  
 4 - ジメチルアミノフェニルアゾフェニル - 4' - イソチオシアネート (DABITC)、  
 エオシン、  
 エオシンイソシアネート、  
 エリスロシンB、  
 エリスロシンイソチオシアネート、  
 エチジウム、 20  
 【0061】  
 5 - カルボキシフルオレセイン (FAM)、  
 5 - (4, 6 - ジクロロトリアジン - 2 - イル)アミノフルオレセイン (DTAF)、  
 2' , 7' - ジメトキシ - 4' , 5' - ジクロロ - 6 - カルボキシフルオレセイン (JOE)、  
 フルオレセイン、  
 フルオレセインイソチオシアネート、  
 フルオレスカミン、  
 IR144、  
 IR1446、  
 マラカイト・グリーン・イソチオシアネート、 30  
 4 - メチルウムベリフェロン、  
 【0062】  
 オルソクレソルフタレン、  
 ニトロチロシン、  
 パラロサニリン、  
 フェノール・レッド、  
 B - フィコエリトリン、  
 o - フタルジアルデヒド、  
 ピレン、  
 ピレンブチレート、 40  
 スクシニミジル1 - ピレンブチレート、  
 クアントドット、  
 リアクティブ・レッド (Cibacron<sup>TM</sup> ブリリアント・レッド3B - A)、  
 6 - カルボキシ - X - ローダミン (ROX)、  
 【0063】  
 6 - カルボキシローダミン (R6G)、  
 リッサミンローダミンBスルホニルクロライドローダミン (Rhod)、  
 ローダミンB、  
 ローダミン123、  
 ローダミンXイソチオシアネート、 50

スルホローダミンB、  
 スルホローダミン101、  
 スルホローダミン101のスルホニルクロライド (Texas Red)、  
 N, N, N', N' - テトラメチル - 6 - カルボキシローダミン (TAMRA)、  
 テトラメチルローダミン、  
 テトラメチルローダミンイソチオシアネート (TRITC)、  
 リボフラミン、  
 ロゾール酸、  
 ランタニドキレート誘導体。

【 0 0 6 4 】

発蛍光団 (または他の標識) は、各被検体について異なる標識と組合わせて使用することができる。しかしながら、好ましくは、単一標識週齢のすべては標識化された結合性メンバーについて使用し、もっぱら個々の粒子グループを互いに区別する弁別パラメーターにより、アッセイを弁別する。

これらの発蛍光団の任意のものを前述の結合性メンバーに取り付けて、本発明の実施において使用するためのアッセイ試薬を形成することは、慣用の共有結合により、発蛍光団上および結合性メンバー上に適当な官能基を使用して達成される。このようなグループおよび結合を形成する反応の認識は、当業者にとって容易に明らかである。

【 0 0 6 5 】

フローサイトメトリーの方法および計装はこの分野において知られており、そして知られているものを本発明の実施において使用することができる。一般に、フローサイトメトリーは、一度にただ1つの粒子がセンサーの領域を通過するような方法において、微小粒子の懸濁液を流れとして光線および電気光学的センサーに通過させることにある。各粒子がこの領域を通過するとき、光線は粒子の存在により混乱され、そして生ずる散乱した蛍光性の光を検出する。計装により光学的信号を使用して、各粒子が属するサブグループを標識の存在および量と一緒に同定し、こうして個々のアッセイの結果が達成される。

【 0 0 6 6 】

例は次の通りである: McHugh, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Methods in Cell Biology* 42, Part B (Academic Press, 1994); McHugh他, "Microsphere - Based Fluorescence Immunoassays Using Flow Cytometry Instrumentation," *Clinical Flow Cytometry*、編者Bauser, K.D.他 (米国マリイランド州バルチモア: Williams and Williams, 1993)、pp. 535 - 544; Lindmo他, "Immunometric Assay Using Mixture of Two Particle Types of Different Affinity," *J. Imm. Meth.* 126: 183 - 189 (1990); McHugh, "Flow Cytometry and Application of Microsphere - Based Fluorescence Immunoassays," *Immunochemica* 5: 116 (1991); Horan他, "Fluid Phase Particle Fluorescence Analysis: Rheumatoid Factor Specificity Evaluated by Laser Flow Cytometry," *Immunoassay in the Clinical Laboratory*, 185 - 189 (Liss 1979); Wilson他, "A New Microsphere - Based Immunofluorescence Assay Using Flow Cytometry," *J. Imm. Meth.* 107: 225 - 230 (1988); Fulwyler他, "Flow Microsphere Immunoassay for the Quantitative and Simultaneous Detection of Multiple Soluble Analytes," *Meth. Cell Biol.* 33: 613 - 629 (1990); Coulter Electronics Inc., 英国特許第1,561,042号 (1980年2月13日発行); およびSteinkamp他, *Review of Scientific Instruments* 44 (9): 1301 - 1310 (1973)。

【 0 0 6 7 】

同様に、自動化アッセイの一部として磁場を適用し、それを除去する方法および計装はこの分野において知られており、そして文献において報告されている。文献の報告の例は次の通りである: Forrest他, 米国特許第4,141,687号 (Technicon Instruments Corporation, 1979年2月27日発行); Ithakissios, 米国特許第4,115,534号 (Minnesota Mining and Manufacturing Company, 1978年9月19日発行); Vlioger, A.M.他, *Analytical Biochem*

10

20

30

40

50

hemistry 205 : 1 - 7 ( 1992 ) ; Dudley、Journal of Clinical Immunoassay 14 : 77 82 ( 1991 ) ; および Smart、Journal of Clinical Immunoassay 15 : 246 251 ( 1992 ) 。この節および前の節におけるすべての引用文献は、引用することによって本明細書の一部とされる。

#### 【 0 0 6 8 】

本発明に従い分析できる試料は、定量しようとするマーカーを含有する任意の生物学的試料を包含する。例は血清、血液溶出液、血漿、脳脊髄液、尿、および抽出液である。試料はヒト試料、例えば、成人の患者ならびに子供および乳児からの試料であることができ、そしてそれらは一般に哺乳動物、例えば、家庭のイヌおよび他のペットならびに家畜類、および動物園の動物からの試料であることができる。

10

#### 【 0 0 6 9 】

##### 実施例

下記の実施例は例示を目的とし、いかなる方法においても本発明を限定または規定しない。これらの実施例において使用した緩衝液は次の通りであった：

洗浄緩衝液：50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4、150mMの塩化ナトリウム、0.1%のアジ化ナトリウムおよび0.1%のツイーン - 20。

FT4粒子の被覆緩衝液：50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4、150mMの塩化ナトリウム、0.1%のアジ化ナトリウム、0.1%のツイーン - 20および0.5%のウシガンマグロブリン。

#### 【 0 0 7 0 】

粒子希釈剤：50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4、150mMの塩化ナトリウム、0.1%のアジ化ナトリウムおよび0.25%のウシガンマグロブリン。

20

貯蔵緩衝液：50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4、150mMの塩化ナトリウム、0.1%のアジ化ナトリウム、0.1%のツイーン - 20および1%のウシ血清アルブミン。

複合体緩衝液：50mMのリン酸塩緩衝液pH7.4、150mMの塩化ナトリウム、0.1%のアジ化ナトリウム、2.75%のポリエチレングリコール8000および0.25%のウシガンマグロブリン。

#### 【 0 0 7 1 】

実施例において使用した粒子および材料は次のようにして調製した：

##### 12 $\mu$ mの粒子を使用する抗TSHによる粒子の被覆

マイクロフージ管の中に4.23mgの12 $\mu$ mの色素添加磁気粒子を入れた。次いで1mlの25mMの2 - ( N - モルホリノ ) - エタンスルホン酸 ( MES ) pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を3回洗浄した。このペレットに、388 $\mu$ lの脱イオン水、160 $\mu$ lの0.5MのMES緩衝液、184 $\mu$ lの脱イオン水中の94.33mg/mlのN - ヒドロキシルホスクシンイミド ( NHSS ) および200 $\mu$ lの脱イオン水中の50mg/mlの1 - エチル - 3 - ( 3 - ジメチルアミノプロピル ) カーボジイミド塩酸塩 ( EDC ) を添加した。管を30分間攪拌し、次いで遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。次いで1mlの25mMのMES pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を2回洗浄した。

30

#### 【 0 0 7 2 】

ペレットに、129.8 $\mu$ lの脱イオン水、25 $\mu$ lの0.5 $\mu$ lの0.5MのMESおよび70.2 $\mu$ lの抗TSH抗体 ( 3586 $\mu$ g、5.5mg/ml ) を添加した。この管を4時間攪拌し、次いで100 $\mu$ lの25MのMES pH6.2中の250mMのエタノールアミン溶液を添加した。次いで管を30分間攪拌し、750 $\mu$ lの貯蔵緩衝液を添加し、次いで遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。次いで1mlの貯蔵緩衝液を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を5回洗浄した。次いで貯蔵緩衝液 ( 1ml ) を添加し、緩衝液を4 に保持した。

40

#### 【 0 0 7 3 】

##### 8 $\mu$ mの粒子を使用する抗TSHによる粒子の被覆

マイクロフージ管の中に2.82mgの8 $\mu$ mの色素添加磁気粒子を入れた。次いで1mlの25mMの2 - ( N - モルホリノ ) - エタンスルホン酸 ( MES ) pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を3回洗浄した。このペレットに、388 $\mu$ lの脱イオン水、160 $\mu$ lの0.5MのMES緩衝液、184 $\mu$ lの脱イオン水中の94.33mg/mlのN - ヒドロキ

50

シスルホスクシンイミド (NHSS) および200 $\mu$ lの脱イオン水中の50mg/mlの1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カーボジイミド塩酸塩 (EDC) を添加した。管を30分間攪拌し、次いで遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。

【0074】

次いで1mlの25mMのMES pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を2回洗浄した。ペレットに、25 $\mu$ lの0.5 $\mu$ lのMESおよび225 $\mu$ lの0.257mg/mlの抗TSH抗体および1.716mg/mlのウシ血清アルブミンの溶液を添加した。この管を4時間攪拌し、次いで100 $\mu$ lの25MのMES pH6.2中の250mMのエタノールアミン溶液を添加した。次いで管を30分間攪拌し、750 $\mu$ lの貯蔵緩衝液を添加した。管を遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。次いで1mlの貯蔵緩衝液を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を5回洗浄した。次いで貯蔵緩衝液 (1ml) を添加し、緩衝液を4 に保持した。

10

【0075】

TP0による粒子の被覆

マイクロフージ管の中に2.82mgの8 $\mu$ mの色素添加磁気粒子を入れた。次いで1mlの25mMの2 - (N - モルホリノ) - エタンスルホン酸 (MES) pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を3回洗浄した。このペレットに、388 $\mu$ lの脱イオン水、160 $\mu$ lの0.5MのMES緩衝液、184 $\mu$ lの脱イオン水中の94.33mg/mlのN - ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHSS) および200 $\mu$ lの脱イオン水中の50mg/mlの1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カーボジイミド塩酸塩 (EDC) を添加した。管を光から保護して30分間攪拌し、次いで遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。

20

【0076】

次いで1mlの25mMのMES pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を2回洗浄した。ペレットに、25 $\mu$ lの0.5MのMESおよび225 $\mu$ lの1.72 $\mu$ g/mlのTP0および1.716mg/mlのウシ血清アルブミンの溶液を添加した。次いで、この管を光から保護して4時間攪拌した。この時において、25MのMES pH6.2中の250mMのエタノールアミン溶液 (100 $\mu$ l) を添加し、管を光から保護して30分間攪拌した。貯蔵緩衝液 (750 $\mu$ l) を添加し、上清を遠心し、ピペットで除去し、廃棄した。次いで1mlの貯蔵緩衝液を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を5回洗浄した。次いで貯蔵緩衝液 (1ml) を添加し、緩衝液を4 に保持した。

30

【0077】

抗FT4による粒子の被覆

マイクロフージ管の中に5.64mgの8 $\mu$ mの色素添加磁気粒子を入れた。次いで1mlの25mMの2 - (N - モルホリノ) - エタンスルホン酸 (MES) pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を3回洗浄した。このペレットに、388 $\mu$ lの脱イオン水、160 $\mu$ lの0.5MのMES緩衝液、184 $\mu$ lの脱イオン水中の94.33mg/mlのN - ヒドロキシスルホスクシンイミド (NHSS) および200 $\mu$ lの脱イオン水中の50mg/mlの1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カーボジイミド塩酸塩 (EDC) を添加した。

【0078】

管を光から保護して30分間攪拌し、次いで遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。次いで1mlの25mMのMES pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を2回洗浄した。ペレットに、25 $\mu$ lの0.5M、2.73mg/mlの抗T4抗体および196.7 $\mu$ lの脱イオン水を添加した。次いで、この管を光から保護して4時間攪拌し、25MのMES pH6.2中の250mMのエタノールアミン溶液 (100 $\mu$ l) を添加した。管を光から保護して30分間攪拌し、750 $\mu$ lのFT4粒子被覆緩衝液を添加した。管を遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。次いで1mlのFT4粒子被覆緩衝液を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を5回洗浄した。次いで管に1mlのFT4被覆緩衝液を添加し、管を4 に保持した。

40

【0079】

抗FT3による粒子の被覆

50

マイクロフージ管の中に5.64mgの8 $\mu$ mの色素添加磁気粒子を入れた。次いで1mlの25mMの2 - (N - モルホリノ) - エタンスルホン酸 (MES) pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を3回洗浄した。このペレットに、388 $\mu$ lの脱イオン水、160 $\mu$ lの0.5MのMES緩衝液、184 $\mu$ lの脱イオン水中の94.33mg/mlのN - ヒドロキシルホスクシンイミド (NHSS) および200 $\mu$ lの脱イオン水中の50mg/mlの1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カーボジイミド塩酸塩 (EDC) を添加した。管を光から保護して30分間攪拌し、次いで遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。

【0080】

次いで1mlの25mMのMES pH6.2を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を2回洗浄した。ペレットに、99 $\mu$ lの7.8mg/mlの抗T3抗体および151 $\mu$ lの25MのMES pH6.1を添加した。次いで、この管を光から保護して4時間攪拌し、100 $\mu$ lの25MのMES pH6.2中の250mMのエタノールアミン溶液を添加した。次いで管を光から保護して30分間攪拌し、750 $\mu$ lのFT4粒子被覆緩衝液を添加した。次いで管を遠心し、上清をピペットで除去し、廃棄した。次いで1mlのFT4粒子被覆緩衝液を添加し、遠心し、そして上清をピペットで除去することによって、粒子を5回洗浄した。次いで管にFT4被覆緩衝液 (1ml) を添加し、管を4 に保持した。

【0081】

フィコエリトリン (抗TSH - PE) で標識化された抗TSHの調製

スルホスクシンイミジル6 - [3' - (2 - ピリジルジチオ) - プロピオンアミド] ヘキサノエート (スルホ - LC - SPDP) (4.4mg) を2mlの50mMのPBS (2.2mg/ml) 中に溶解した。この溶液を250 $\mu$ lの50mMのPBS中の40mg/mlのB - フィコエリトリン溶液に添加し、生ずる溶液を周囲温度において暗所で2.5時間放置した。マイクロフージの中に、2.58mgの抗TSH抗体を添加した。スルホスクシンイミジル4 - [N - マレイミドメチル] - シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - SMCC) (4.4mg) を2mlの50mMのPBS中に溶解した。

【0082】

次いでこの溶液 (49.6 $\mu$ l) を直ちに抗TSH抗体溶液に添加し、生ずる溶液を周囲温度において暗所で1時間放置した。インキュベーション時間が経過した後、50mMのPBS中のジチオスレート (DTT) の770mg/mlの溶液 (62.1 $\mu$ l) をPE + スルホ - LC - SPDP反応混合物に添加し、生ずる溶液を周囲温度において暗所で30分間インキュベートした。PE + スルホ - LC - SPDP + DTT反応混合物および抗TSH + スルホ - SMCC反応混合物を、4回交換の1リットルの50mMのPBSに対して別々の透析した (透析溶液の交換の間隔30分、周囲温度、光から保護した)。透析した溶液を混合した。

【0083】

抗体 - PE混合物を一夜光から保護して4 に保持した。次の日に、N - メチルマレイミドの溶液 (50mMのPBS中の2mg/ml) (10 $\mu$ l) を抗体 - PE混合物に添加し、生ずる混合物を周囲温度において1時間インキュベートした。この時間後、サイズ排除カラムを使用するHPLCにより混合物を精製した (ガードカラム: SEC400 80 $\times$ 7.8mm、カラム: SEC400 80 $\times$ 7.8mm、移動相: 50mMのPBS、流速: 1ml/分)。組合わせた画分に、ウシ血清アルブミン (固体) および10%のNaN<sub>3</sub> (脱イオン水中) をそれぞれの生ずる濃度が10mg/mlおよび0.1%となるように添加した。

【0084】

N - t - ブトキシカルボニル - 3, 5 - ジョードチロシン - フィコエリトリン (DITboc - PE) の調製

ジメチルスルホキシド溶液中のN - t - ブトキシカルボニル - 3, 5 - ジョードチロシンN - ヒドロキシルスクシンイミドエステルの369mg/mlの溶液 (10 $\mu$ l) を、700 $\mu$ lの50mMのリン酸塩緩衝液、pH7.5中の1.43mg/mlのB - フィコエリトリン溶液に添加した。この混合物を周囲温度において光から保護して4時間おだやかに攪拌した。この時間後、サイズ排除カラムを使用するHPLCによりこの混合物を精製した (ガードカラム: SEC400 80 $\times$ 7.8mm、カラム: SEC400 80 $\times$ 7.8mm、移動相: 50mMのPBS、流速: 1ml/分)。

【0085】

10

20

30

40

50

N - アセチル化オキシカルボニル - 3, 5 - ジヨードチロシン - フィコエリトリン (MITboc - PE) の調製

167  $\mu$ l のジメチルホルムアミド (DMF) 中に 10mg の N - アセチル - 3 - ヨードチロシンを溶液させることによって、溶液を調製した。この溶液 (97  $\mu$ l) を 6.6mg の 1 - エチル - 3 - (3 - ジメチルアミノプロピル) カーボジイミド塩酸塩 EDC に添加した。この混合物に、64  $\mu$ l の DMF 中の N - ヒドロキスクシンイミドを添加した。生ずる混合物を周囲温度において渦形成装置上に 75 分間配置した。この時間後、97  $\mu$ l のこの混合物を 1ml の 50mM の PBS 中の 12mg/ml の B - フィコエリトリンに移した。生成物混合物を箔中に包み、周囲温度において渦形成装置上に一夜配置した。次の日に、移動相として 50mM の PBS を使用する G 75 - 120 サイズ排除カラム (1.5  $\times$  50cm) により、生成物を精製した。

10

**【 0 0 8 6 】**

TSH (高範囲および低範囲の両方の粒子を使用する)、TP0、FT4、および FT3 についてのマルチプレスアッセイ

1. 抗 TSH 被覆粒子 (両方の粒度) および TP0 被覆粒子をマイクロフージの中に入れ、ここで 1ml の粒子希釈剤を添加し、遠心し、上清をピペットで除去することによって、粒子を 3 回洗浄した。次いで抗 T4 被覆粒子および抗 T3 被覆粒子をペレットに添加し、次いでこれをほぼ  $2 \times 10^5$  粒子 / ml / 範囲に希釈する。

2. 試料 (100  $\mu$ l) および工程 1 の粒子混合物 (100  $\mu$ l) をタイターチューブ (Bio-Rad Laboratories, Inc., 米国カリフォルニア州ハーキュレス、カタログ No. 223 - 9390) の中に入れ、すべてのタイターチューブをラックの中に入れる。

20

**【 0 0 8 7 】**

3. タイターチューブのラックを加熱ブロック中で 37  $^{\circ}$ C において連続的に渦形成しながら 15 分間インキュベートして、粒子を懸濁させて保持する。この期間の間、光を排除する。

4. インキュベーション後、タイターチューブのラックを磁気セパレーターの中に入れ、ここで粒子を 3 分間放置し、その時間内に粒子は磁気によりタイターチューブの側面に引き付けられる。

5. 上清を吸引する。

6. 洗浄緩衝液 (300  $\mu$ l) を各タイターチューブに添加する。

7. 粒子を 3 分間磁気によりタイターチューブの側面に引き付けさせて置く。

30

8. 上清を吸引する。

9. 工程 6 ~ 8 をさらに 3 回反復する。

**【 0 0 8 8 】**

10. 粒子に 50  $\mu$ l の抗 TSH - PE および DITboc - PE 複合体 + 抗ヒト IgG - PE (この標識化抗体は Jackson ImmunoResearch Laboratories、米国ペンシルベニア州ウェストグローブから入手可能である) の混合物を添加し、複合体希釈剤で希釈する。

11. タイターチューブのラックを加熱ブロック中で 37  $^{\circ}$ C において連続的に渦形成しながら光を排除して 15 分間インキュベートして、粒子を懸濁させて保持する。

12. インキュベーション後、タイターチューブのラックを磁気セパレーターの中に入れ、ここで粒子を 3 分間磁気によりタイターチューブの側面に引き付けて保持する。

40

**【 0 0 8 9 】**

13. 上清を吸引する。

14. 洗浄緩衝液 (300  $\mu$ l) を各タイターチューブに添加する。

15. 粒子を 3 分間磁気によりタイターチューブの側面に引き付けさせて置く。

16. 上清を吸引する。

17. 工程 14 ~ 16 をさらに 1 回反復する。

18. 粒子を 35  $\mu$ l の洗浄緩衝液の中に懸濁させる。

19. マルチプレスモードで LX 計装 (Luminex Corporation、米国テキサス州オースチン) により読取るまで、タイターチューブを光遮断ボックスの中に入れて置く。

このアッセイ手法を使用して発生した TSH、TP0、FT4、および FT3 についての標準曲線を、

50

それぞれ、第3図、第4図、第5図、および第6図に示す。

【0090】

FT4およびFT3についてのマルチプレスアッセイ手法

1. 抗T4被覆粒子および抗T3被覆粒子をマイクロフージの中に入れ、ほぼ $2 \times 10^5$ 粒子/mlの範囲に希釈する。
2. 試料(100 $\mu$ l)および工程1の100 $\mu$ lの粒子混合物をタイターチューブ(Bio-Rad Laboratories, Inc., 米国カリフォルニア州ハーキュレス、カタログNo. 223-9390)の中に入れる。すべてのタイターチューブをラックの中に入れる。
3. タイターチューブのラックを加熱ブロック中で37 $^{\circ}$ Cにおいて連続的に渦形成しかつ光を排除しながら15分間インキュベートして、粒子を懸濁させて保持する。
4. インキュベーション後、粒子希釈剤で希釈したMITboc-PE(50 $\mu$ l)を添加する。

10

【0091】

5. ラックを加熱ブロックに戻し、光を排除しながら連続的に15分間渦形成させる。
6. タイターチューブのラックを磁気セパレーターの中に入れ、ここで粒子を3分間磁気によりタイターチューブの側面に引き付けさせる。
7. 上清を吸引する。
8. 洗浄緩衝液(300 $\mu$ l)を各タイターチューブに添加する。
9. 粒子を3分間磁気によりタイターチューブの側面に引き付けさせて置く。
10. 上清を吸引する。
11. 工程8~10をさらに2回反復する。
12. 次に複合体希釈剤で希釈したDITboc-PEを添加する。
13. タイターチューブのラックを加熱ブロック中で37 $^{\circ}$ Cにおいて連続的に渦形成しながら光を排除して15分間インキュベートして、粒子を懸濁させて保持する。

20

【0092】

14. 次にタイターチューブのラックを磁気セパレーターの中に入れ、ここで粒子を3分間磁気によりタイターチューブの側面に引き付けて保持する。
15. 上清を吸引する。
16. 洗浄緩衝液(300 $\mu$ l)を各タイターチューブに添加する。
17. 粒子を3分間磁気によりタイターチューブの側面に引き付けさせて置く。
18. 上清を吸引する。
19. 工程16~18をさらに2回反復する。
20. 粒子を35 $\mu$ lの洗浄緩衝液の中に懸濁させる。
21. マルチプレスモードでLX計装によりタイターチューブを読取る。

30

このアッセイ手法を使用して発生したFT4およびFT3についての標準曲線を、それぞれ、第7図および第8図に示す。

【0093】

以上の説明は例示を目的して提供された。当業者にとって明らかなように、本明細書に記載する操作条件、材料、手法の工程および他のパラメーターは、本発明の範囲および精神から逸脱しないで、それ以上の変更または置換が可能である。また、本発明の特徴を他の被検体および被検体の組合わせに適用して、単一の試料および単一の反応混合物について異なる型の免疫学的アッセイを同時に実行することができる。

40

【図面の簡単な説明】

【図1】 第1図は、種々の粒子、結合性メンバー、および起こる結合反応のタイプを示す、本発明による1つのアッセイの流れ図である。

【図2】 第2図は、種々の粒子、結合性メンバー、および起こる結合反応のタイプを再び示す、本発明による他のアッセイの流れ図である。

【図3】 第3図は、本発明によるTSH、TP0、FT3およびFT4についてのマルチプレスアッセイから発生したTSHについての標準曲線である。

【図4】 第4図は、本発明によるTSH、TP0、FT3およびFT4についてのマルチプレスアッセイから発生したTP0についての標準曲線である。

50

【図5】 第5図は、本発明によるTSH、TP0、FT3およびFT4についてのマルチプレスアッセイから発生したFT3についての標準曲線である。

【図6】 第6図は、本発明によるTSH、TP0、FT3およびFT4についてのマルチプレスアッセイから発生したFT4についての標準曲線である。

【図7】 第7図は、本発明によるFT3およびFT4についてのマルチプレスアッセイから発生したFT3についての標準曲線である。

【図8】 第8図は、本発明によるFT3およびFT4についてのマルチプレスアッセイから発生したFT4についての標準曲線である。

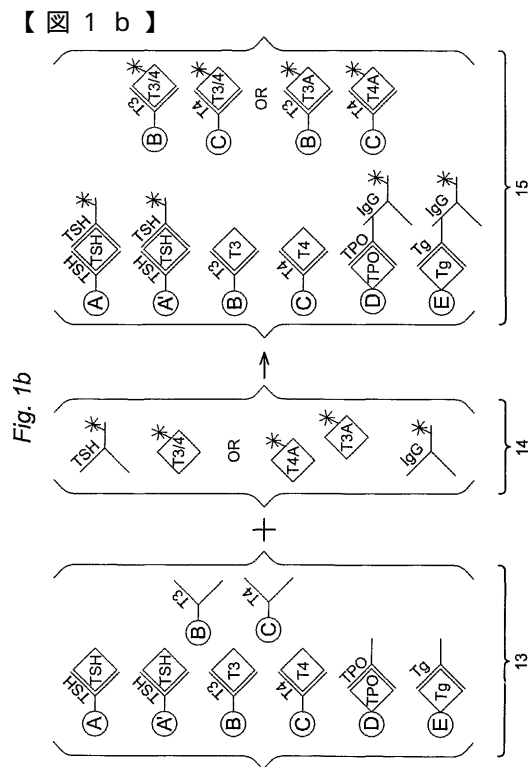
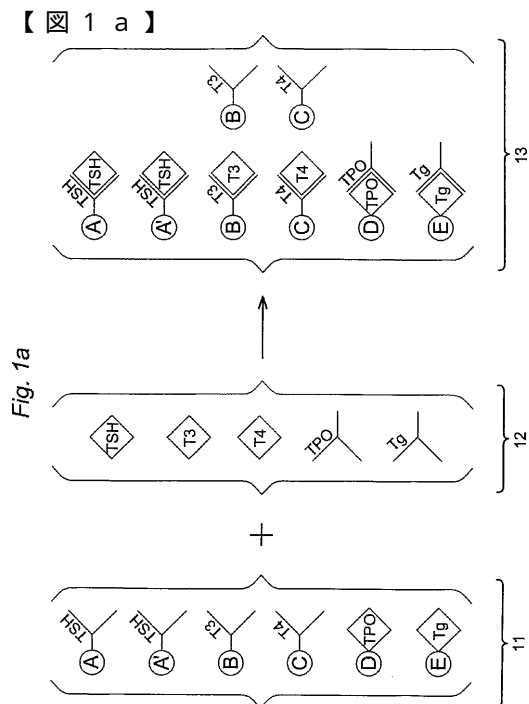
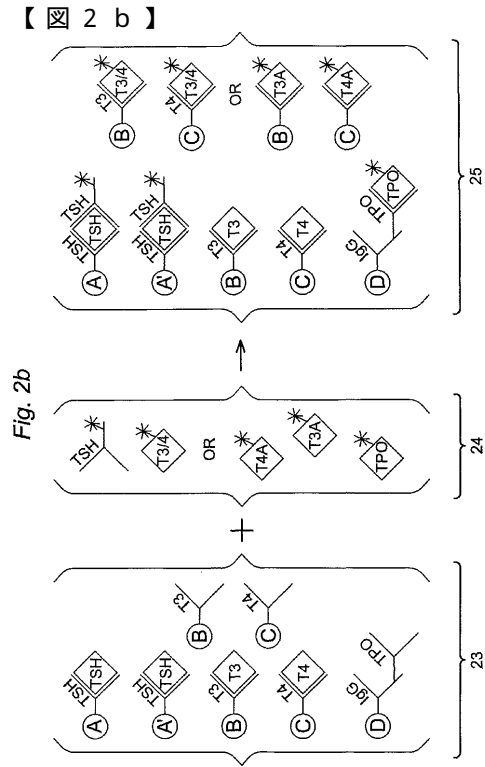
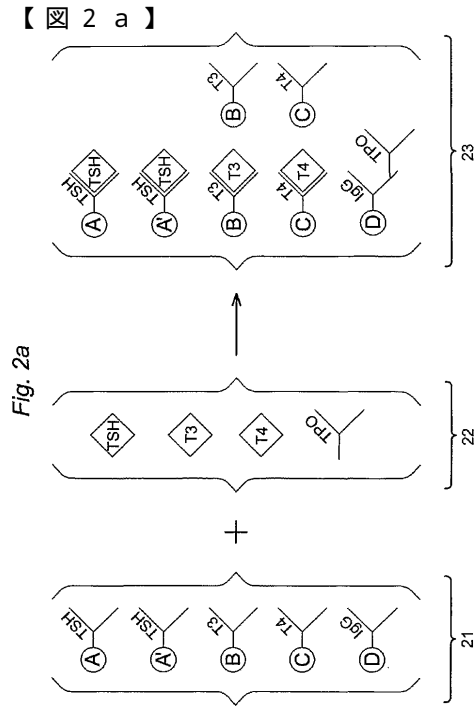
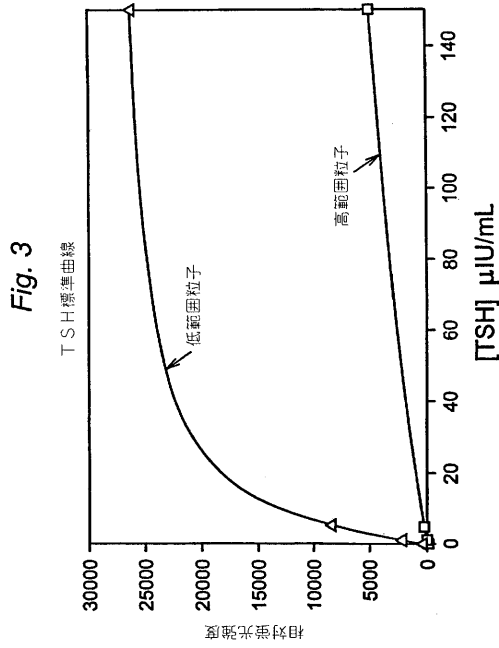


Fig. 1a

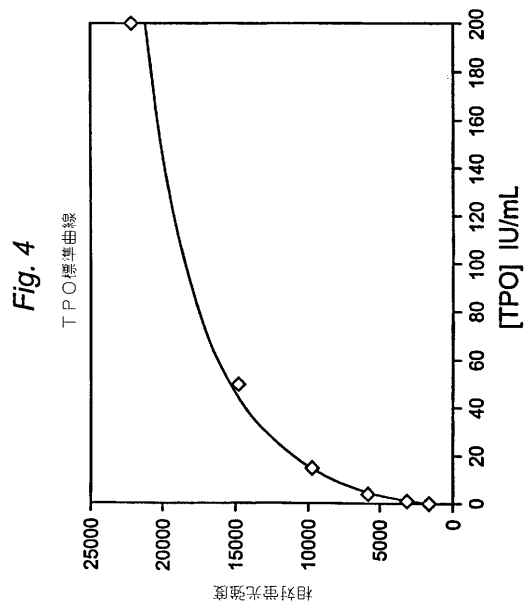
Fig. 1b



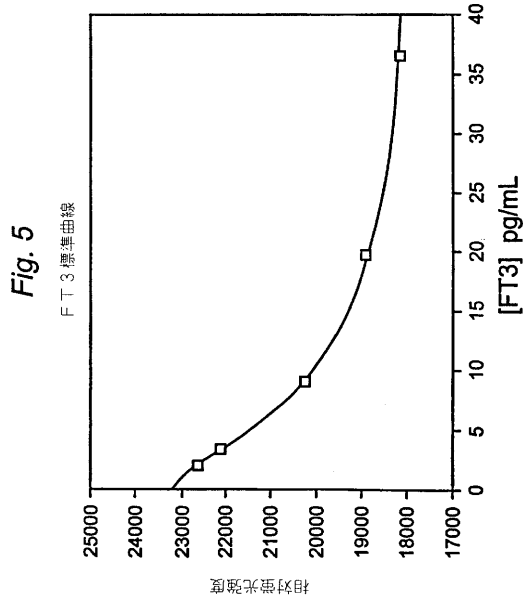
**【 図 3 】**



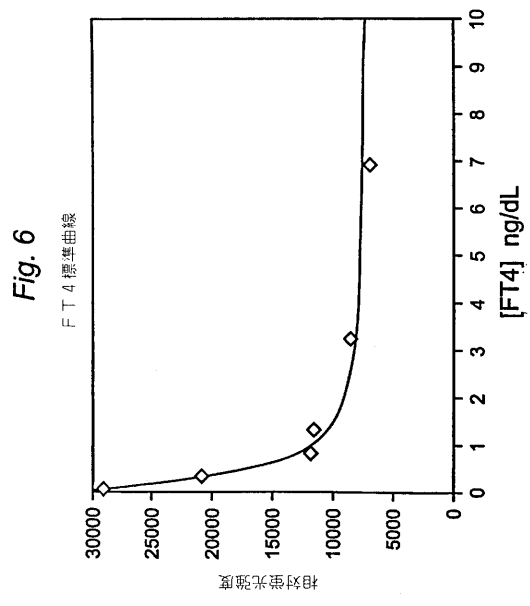
**【 図 4 】**



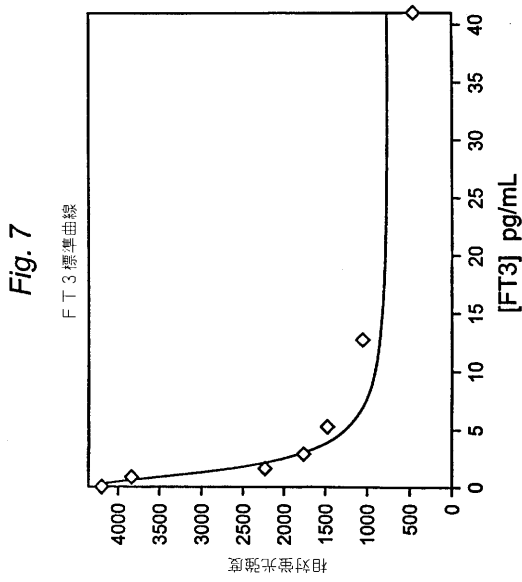
【 図 5 】



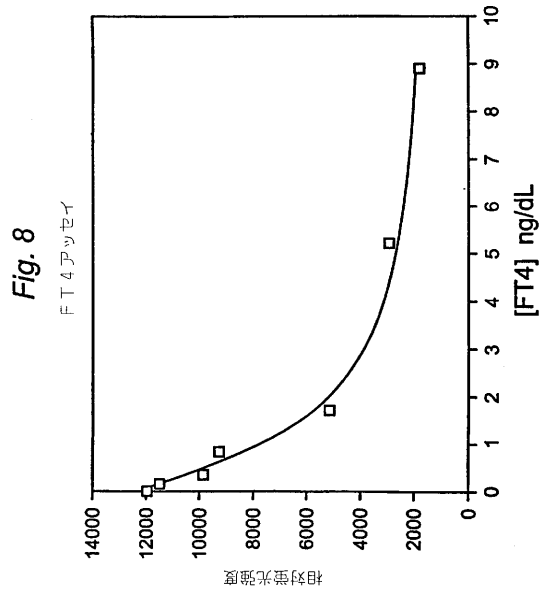
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



## 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 ワトキンス, マイケル アイ.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 5 6 8 8 , バカビル, ローリング ヒルズ レーン 4 2 1  
9
- (72)発明者 チャン, スクナン エス.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 6 1 0 , オークランド, バーノン ストリート 1 3 1 ,  
アパートメント 4
- (72)発明者 デル ロザリオ, レナート ビー.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 1 0 , ベニシア, ケンブリッジ ドライブ 9 0 0 , ア  
partment 1 4 6
- (72)発明者 ナイト, ティモシー ダレン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 5 1 0 , ベニシア, マッコール ドライブ 4 9 5
- (72)発明者 ミランダ, パトリシア エー.  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 4 9 4 9 , ノバート, カーノウスティック ハイツ 4 5

審査官 加々美 一恵

- (56)参考文献 Cytometry , 1 9 9 8 年, Suppl. 9 , p132-133 CT76  
Clinical Endocrinology , 1 9 9 0 年, Vol.33 , p751-760  
Experimental Cell Biology , 1 9 8 8 年, Vol.56, No.4 , p196-200  
Journal of Clinical Endocrinology , 1 9 9 7 年, Vol.82, No.2 , p500-507  
Cytometry , 1 9 9 8 年, Suppl. 9 , p132-133 CT76  
Clinical Endocrinology , 1 9 9 0 年, Vol.33 , p751-760  
Experimental Cell Biology , 1 9 8 8 年, Vol.56, No.4 , p196-200  
Journal of Clinical Endocrinology , 1 9 9 7 年, Vol.82, No.2 , p500-507

(58)調査した分野(Int.Cl.<sup>7</sup>, D B 名)

G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	甲状腺疾病的多学科诊断测试		
公开(公告)号	<a href="#">JP3712978B2</a>	公开(公告)日	2005-11-02
申请号	JP2001576459	申请日	2001-04-06
[标]申请(专利权)人(译)	比奥-雷德实验室股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室 , Incorporated的雷开球德		
当前申请(专利权)人(译)	生物 - Rad实验室 , Incorporated的雷开球德		
[标]发明人	ワトキンスマイケルアイ チャンスクナンエス デルロザリオレナートビー ナイトティモシーダレン ミランダパトリシアエー		
发明人	ワトキンス,マイケル アイ. チャン,スクナン エス. デル ロザリオ,レナート ビー. ナイト,ティモシー ダレン ミランダ,パトリシア エー.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N15/00 G01N15/14 G01N33/543 G01N33/78		
CPC分类号	G01N15/14 G01N33/78 Y10S435/973		
FI分类号	G01N33/53.E G01N33/543.501.A G01N33/543.501.D G01N33/543.597		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	09/548883 2000-04-13 US		
其他公开文献	JP2003531378A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

生物样品中甲状腺疾病的几种生物标志物的免疫学检测通过单一测试进行，结合夹心型，序贯竞争性和血清学测定，使用分类为可通过流式细胞术区分的组的颗粒，一组用于每种标记物的测定。每组颗粒涂有不同的免疫结合成员，涂层密度，共涂层材料和特殊缓冲溶液用于调整典型样品中每种标记物的灵敏度和动态范围的差异。

