

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4898061号
(P4898061)

(45) 発行日 平成24年3月14日(2012.3.14)

(24) 登録日 平成24年1月6日(2012.1.6)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/566 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 37/00 (2006.01)

GO 1 N 33/566

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/68 Z

GO 1 N 33/53 M

GO 1 N 37/00 1 O 2

請求項の数 37 (全 23 頁)

(21) 出願番号 特願2001-581125 (P2001-581125)
 (86) (22) 出願日 平成13年4月11日(2001.4.11)
 (65) 公表番号 特表2003-532118 (P2003-532118A)
 (43) 公表日 平成15年10月28日(2003.10.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/011773
 (87) 国際公開番号 W02001/084153
 (87) 国際公開日 平成13年11月8日(2001.11.8)
 審査請求日 平成20年4月10日(2008.4.10)
 (31) 優先権主張番号 09/551,496
 (32) 優先日 平成12年4月18日(2000.4.18)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 300004500
 アイデックス ラボラトリーズ インコー
 ポレイテッド
 アメリカ合衆国 メイン州 ウェストブル
 ック アイデックス ドライブ ワン
 (74) 代理人 100062144
 弁理士 青山 稔
 (72) 発明者 スコット・エム・クラーク
 アメリカ合衆国04107メイン州ケーブ
 ・エリザベス、プレントウッド・ロード6
 番
 (72) 発明者 ロバート・エイチ・スバ
 アメリカ合衆国04062メイン州ウィン
 ダム、ポーブ・ロード215番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多重独立流路を持つ統合診断用のデバイスおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(1) 液体試料中の分析物または該分析物に対する結合パートナーに結合した分析物を捕獲することができる固相を用い、(2) 未結合物質を該固相から洗浄した後に、該分析物またはその結合パートナーに結合した該分析物を検出する、該分析物の存在または量を測定するアッセイを行うためのデバイスであって、

(a) 固相ゾーン(c)への試料の進入または送達のための第1の流路；

(b) 液体経路材料を含む第2の流路、該流体経路材料は、該液体試料に対して実質的に不浸透性であるが、洗浄試薬との接触によって浸透性とされた場合に、それは該試料についての第2の流路を規定し；

(c) 該第1および第2の流路の交点における、該液体試料に対して浸透性である固相ゾーン、ここに、該固相ゾーンは該分析物またはその結合パートナーに結合した該分析物に対する結合パートナーを含み、該固相は該分析物またはその結合パートナーに結合した該分析物の捕獲および検出の双方で用いられ；

それにより、該流体経路材料が該洗浄試薬の第2の流路への導入によって親水性とされるまで、該液体試料は、最初に、該第1の流路に沿ってのみ該流体経路材料へではなく該固相ゾーンへ流動し、それにより、洗浄試薬は第2の流路を通して固相ゾーンから未結合物質を移動させ；および

(d) 単一の分析物につき単一の試料をテストするための手段、または複数の分析物につき単一の試料をテストするための手段；

10

20

を含む該デバイス。

【請求項 2】

第 1 の流路がキャピラリー空間を通る請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 3】

第 1 の流路が、少なくとも 1 つの乾燥されたコンジュゲート可溶性結合試薬を含有する請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 4】

コンジュゲート可溶性結合試薬が標識または受容体に結合した請求項 3 記載のデバイス。

【請求項 5】

第 1 の流路が標識または受容体に結合した分析物を含有する請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 6】

さらに、該試料を該デバイスに添加するに先立って、少なくとも 1 つの標識または受容体に結合した分析物が試料に添加される請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 7】

該試料を該デバイスに添加するに先立って、少なくとも 1 つの該分析物に対する結合パートナーが試料に添加される請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 8】

該少なくとも 1 つの結合パートナーが標識または受容体に結合した請求項 7 記載のデバイス。

【請求項 9】

結合パートナーが抗原、抗体、リガンド、受容体、核酸分子、化学反応体、およびその断片を含む請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 10】

固相が、ガラス繊維マット、不織布合成マット、焼結された粒状構造体、注型された膜材料、押し出された膜材料、成形された開口細孔ナイロン構造体、注型された開口細孔ナイロン構造体、成形された開口細孔ニトロセルロース構造体、注型された開口細孔ニトロセルロース構造体、ガラス粒子の粒状材料、ポリマー粒子の粒状材料、および電気化学的ディテクターよりなる群から選択される請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 11】

該デバイスの活性化の後に、洗浄試薬が少なくとも 1 つの穿孔可能な容器から送達される請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 12】

該洗浄試薬が少なくとも 1 つの洗浄試薬、少なくとも 1 つの基質試薬、少なくとも 1 つの洗浄 / 基質試薬、および少なくとも 1 つの洗浄試薬および少なくとも 1 つの基質試薬を含む組成物よりなる群から選択される請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 13】

さらに、該流体経路材料とは独立した吸収剤材料よりなる吸収剤ブロックを含む請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 14】

さらに、該固相の上流または該固相の真上に位置する試料進入ポートを含み、試料をカップ構造体または試料吸収チップを介して適用する請求項 1 記載のデバイス。

【請求項 15】

(a) 試料を、(i) 分析物の第 1 の結合パートナー(ここに、該第 1 の結合パートナーは、検出可能な標識を含む)、(i i) 該分析物の第 2 の結合パートナー(ここに、該第 2 の結合パートナーは、受容体分子を含む)、および(i i i) 固相材料(ここに、該受容体分子の結合パートナーは該固相材料に非拡散的に結合している)と接触させ;

(e) 該分析物ならびに該第 1 および第 2 の結合パートナーならびに該分析物間で免疫複合体を形成し、ここに、該受容体分子は、該固相上でその結合パートナーに結合して、固定化された複合体を形成し、ここに、該固相は、最初は試料に対して非浸透性である第 2

10

20

30

40

50

の流体経路材料と接触し；

(f) 該第2の流体経路材料に沿って界面活性剤を含有する洗浄試薬を流動することにより該固相から未結合反応体を除去し、ここに、該界面活性剤は、該洗浄試薬が、該第2の流体経路材料を通して流動するのを可能とし；次いで、

(g) 該第1の結合パートナーに結合した標識を検出することを特徴とする液体試料中の分析物の検出のためのアッセイ方法。

【請求項16】

該検出工程が、第2の流体経路材料を通して基質試薬を流動させることを含むことを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項17】

該分析物の第1および第2の結合パートナーのうちの少なくとも1つが、該固相と流体連絡した第1の流体経路材料上で乾燥したコンジュゲート可溶性結合パートナーであることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項18】

該分析物の第1および第2の結合パートナーのうちの少なくとも1つが、該試料と該固相との接触に先立って、該試料に添加されることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項19】

該界面活性剤が、水混和性有機溶媒であることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項20】

該固相が、アビジンまたはストレプトアビジンを含み、該第2の結合パートナーがビオチンを含むことを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項21】

該第1の結合パートナーが、試料送達チャンネルにあることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項22】

該洗浄試薬が少なくとも1つの洗浄試薬、少なくとも1つの基質試薬、少なくとも1つの洗浄/基質試薬、ならびに少なくとも1つの洗浄試薬および少なくとも1つの基質試薬を含む組成物よりなる群から選択されることを特徴とする請求項15記載の方法。

【請求項23】

(a) 試料と、(i) 分析物に対する第1の免疫学的結合パートナー、ここに、該第1の免疫学的結合パートナーは、検出可能な標識を含み、および(ii) 固相に非拡散的に固定化された該分析物の第2の免疫学的結合パートナーとを接触させ；

(h) 該第1および第2の免疫学的結合パートナーが該分析物との免疫複合体を形成するのを可能とし、ここに、該固相は、最初は該試料に非浸透性の材料を含む第2の流体経路と接触し；

(i) 界面活性剤が、洗浄試薬が該第2の流路を通して流動するのを可能とするように、該第2の流路に沿って界面活性剤を含有する洗浄試薬を流動することにより該固相から未結合反応体を除去し；次いで、

(g) 該免疫複合体に結合した標識を検出することを特徴とする液体試料中の分析物の測定のためのアッセイ方法。

【請求項24】

該検出が、該第2の流路を通して基質試薬を流動させることを含むことを特徴とする請求項23記載の方法。

【請求項25】

該洗浄試薬が、少なくとも1つの洗浄試薬、少なくとも1つの基質試薬、少なくとも1つの洗浄/基質試薬、および少なくとも1つの洗浄試薬および少なくとも1つの基質試薬を含む組成物よりなる群から選択されることを特徴とする請求項23記載の方法。

【請求項26】

該界面活性剤が、水混和性有機溶媒であることを特徴とする請求項23記載の方法。

【請求項27】

10

20

30

40

50

該第 1 の免疫学的結合パートナーが、該第 1 の流路内で乾燥した可溶性試薬であることを特徴とする請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 8】

該第 1 の免疫学的結合パートナーが、該試料が該デバイスに添加される前に該試料に添加されることを特徴とする請求項 2 3 記載の方法。

【請求項 2 9】

(a) 試料および分析物に対する第 1 の結合パートナーの混合物を形成し、ここに、該第 1 の結合パートナーは検出可能な標識を含み；

(k) 該第 1 の結合パートナーが、該分析物と複合体を形成するのを可能とし；

(l) 該複合体と、固相上に非拡散的に固定化された分析物または標識または受容体に結合した分析物とを接触させ、ここに、該固相は、最初は該試料に対して非浸透性である第 2 の流体経路材料と接触し；

(m) 界面活性剤が、洗浄試薬が該第 2 の流路を通して流動することを可能とするように、第 2 の流体経路物質に沿って、界面活性剤を含有する洗浄溶液を流動させることにより、該固相から未結合反応体を除去し；

(n) 該固相に結合した標識を検出する工程を含む液体試料中の分析物の測定のためのアッセイ方法。

【請求項 3 0】

該固相に結合した標識の検出が、該分析物の濃度に対して標識の量の障害を関連付けることを含むことを特徴とする請求項 2 9 記載の方法。

【請求項 3 1】

(a) 試料および分析物に対する第 1 の結合パートナーの混合物を形成し、ここに、該第 1 の結合パートナーは、検出可能な標識、および受容体分子に共有結合した分析物または分析物類似物を含む第 2 の試薬を含み；

(o) 該第 1 の結合パートナー、該分析物および受容体に結合した該分析物または標識または受容体に結合した分析物が複合体を形成するのを可能とし；

(p) 該複合体と、固相上に非拡散的に固定化された受容体分子の結合パートナーとを接触させ、ここに、該固相は、最初は該試料に対して非浸透性である第 2 の流体経路材料と接触し、

(q) 界面活性剤が、該洗浄剤が該第 2 の流路を通して流動することを可能とするように、該第 2 の流体経路材料に沿って、界面活性剤を含有する洗浄溶液を流動させることにより該固相から未結合反応体を除去し；次いで

(r) 該固相に結合した標識を検出することを特徴とする液体試料中の分析物の測定のためのアッセイ方法。

【請求項 3 2】

さらに、該分析物の濃度に対して該固相に結合した標識の量の障害を関連付けることを含むことを特徴とする請求項 3 1 記載の方法。

【請求項 3 3】

(a) 試料および検出可能な標識に結合した分析物または標識または受容体に結合した分析物を含むコンジュゲート可溶性結合パートナーの混合物を形成し；

(b) 該コンジュゲート可溶性結合パートナーに、該分析物との複合体を形成させ；

(c) 該混合物と、固相上に非拡散的に固定化された分析物の結合パートナーとを接触させ、ここに、該固相は、最初は該試料に対して非浸透性である第 2 の流体経路材料と接触し；

(d) 界面活性剤が、該洗浄試薬が該第 2 の流路を通して流動するのを可能とするように、第 2 の流路に沿って、界面活性剤を含有する洗浄溶液を流動させることによって該固相から未結合反応体を除去し；次いで

(e) 該固相に結合した標識を検出する工程を含むことを特徴とする液体試料中の分析物の測定のためのアッセイ方法。

【請求項 3 4】

さらに、該分析物の濃度に対して標識の量の障害を関連付けることを特徴とする請求項 3 3 記載の方法。

【請求項 3 5】

(s) 試料と、検出可能な標識に結合した分析物または標識または受容体に結合した分析物、および受容体分子に結合した分析物に対する可溶性結合パートナーを含む第 2 の試薬のコンジュゲートとの混合物を形成し；

(t) 分析物の該可溶性結合パートナーに、該分析物との、およびコンジュゲート可溶性結合パートナーとの複合体を形成させ；

(u) 該混合物と、固相上に非拡散的に固定化された受容体分子の結合パートナーとを接触させ、ここに、該固相は、最初は該試料に対して非浸透性である第 2 の流体経路材料と接触し；

(v) 界面活性剤が、該洗浄試薬が該第 2 の流路を通して流動するのを可能とするように、該第 2 の流体経路材料に沿って、界面活性剤を含有する洗浄溶液を流動させることにより、未結合反応体を該固相から除去し；

(w) 固相に結合した標識を検出する工程を含むことを特徴とする液体試料中の分析物の測定のためのアッセイ方法。

【請求項 3 6】

さらに、該分析物の濃度に対して標識の量の障害を関連付けることを特徴とする請求項 3 5 記載の方法。

【請求項 3 7】

(1) 液体試料中の分析物または該分析物に対する結合パートナーに結合した分析物を捕獲することができる固相を用い、(2) 未結合物質を該固相から洗浄した後に、該分析物またはその結合パートナーに結合した該分析物を検出する、該分析物の存在または量を測定するアッセイを行うための方法であって、

(a) 液体試料を、その中に少なくとも 1 つの固定化された試薬を含有する固相と流体連絡して第 1 の流路と接触させ、ここに、該固相は、第 2 の流体経路材料とさらに流体連絡し；

(b) 最初に該第 1 の流路から該固相に該液体試料を流動させ、ここに、該第 2 の流体経路材料は、該液体試料に対して最初は不浸透性あるが、該第 2 の流体経路材料が洗浄試薬、基質試薬または組み合わされた洗浄 / 基質試薬と接触すると該試料に対して浸透性とされ、

(c) 該第 2 の流路を通じて洗浄試薬、基質試薬または洗浄 / 基質試薬を流動させることにより、該固相から未結合物質を除去し、

(d) 該固相上の分析物の存在または量を測定することを含むことを特徴とする該方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の背景

1. 発明の分野

本発明は、流体試料中の対象の特定の分析物の存在または量を測定するアッセイを行うデバイスおよび方法に関する。本発明のデバイスは、単一のユーザー始動工程と同時に開始される少なくとも 2 つの分離した別個の流路を用いて、測定された量の試料をアッセイする。これらの経路は、反応ゾーンへアッセイ試薬を連続的に送達し、引き続き、洗浄または基質および洗浄試薬を該ゾーンに連続的に送達するように調時される。これら本発明のデバイスおよび方法は、単一のテストフォーマットにおいて、1 または複数の分析物の定性的、半定量的または定量的測定に用いることができる。それらは、ELISA、ゾル粒子および他のアッセイフォーマットで実行することができ、同時複数分析物アッセイに特に適している。これら本発明のデバイスおよび方法は、調時された工程を含まず、最小限のユーザー介入、ほとんどの場合、単一の始動工程を含む試薬の制御された自己送達を提供する。

【0002】

2. 背景

多くの先行技術アッセイデバイスおよびシステムは、例えば、希釈することによって、ユーザーが該デバイスに添加する試料量を測定または管理することを必要とする。多くの先行技術デバイスまたはシステムは、ユーザーが、調時された工程のシーケンスを実行し、および/または該アッセイを行うために、該デバイスに対して複数の物理的介入を行うことも必要とする。

【0003】

ベヒラーら(Buechler et al.)、米国特許第5,458,852および5,885,527号(それぞれ、1995年および1999年)は、多孔質膜を用いない診断デバイスを開示する。当該デバイスを用いるアッセイ方法において、流体流動は単一方向性であって、反応および検出は別個のゾーンで行われる。過剰試料/コンジュゲート混合物を用いて該検出ゾーンを洗浄する。本発明のアッセイの多様性を制限するような、独立した非試料洗浄の使用は教示も示唆もされていない。同様にベヒラーは第2の流路の作製を教示も示唆もしていない。ベヒラーにおける時間ゲートは流体経路中の遅延機構として機能し、流体流動を向け直さず、すなわち、異なる流体が反応ゾーンを通して連続的に流動することを許容する。ベヒラーらの方法およびデバイスは、複数の試薬、異なる洗浄および基質試薬を使用することを許容せず、酵素増幅アッセイに用い得ない。

【0004】

ボンク(Vonk)、米国特許第5,185,127号は、吸収剤材料上の疎水性膜上の(分析物のバインダーを含有する)親水性膜を含むフィルター積層を開示する。該膜は試料を通さないが、該試料が混合された湿潤剤(例えば、アセトン、表面活性剤、洗剤またはアルコール、最も好ましくはメタノール)を通す。試料を当該デバイスに添加し、該疎水性膜の上でトラップする。その後、該湿潤剤を添加し、混合したときに、該試料混合物が該吸収剤材料まで浸透するようにする。洗浄および基質を添加することができる。このデバイスの他の不利な点は、(1)残留試料または洗浄用に規定された流体経路が教示も示唆もされず、(2)所定量の反応成分または洗浄の制御された送達が許容されず、および(3)そのような成分の連続的送達が許容されないことである。

【0005】

クラーク(Clark)、米国特許第5,726,010号、米国特許第5,726,013号および米国特許第5,750,333号(1998)は、流体試料中の対象の分析物を検出する固相結合三次複合体の形成を使用するアッセイ方法およびデバイスを開示する。クラークの重要な特徴は、クラマトグラフィック結合アッセイにおける可逆流動の使用である。分析物含有溶液は該デバイスに適用され、次いで、延在する流動マトリクスに沿って、先ず1の方向に、次いで反対方向にキャピラリー流動によって搬送される。該流動マトリクスは4つの異なる領域を含む。領域1は、分析物含有溶液が標識抗体と混合される場所である。領域2は、検出ゾーンとも呼ばれ、固相に固定化された別の抗体を含有する。領域3は、洗浄溶液を適用する部位を含有する。領域4は、領域1の近くに位置する吸収性貯蔵器を含有し、該流動を逆方向にする。分析物の存在または量を検出する手段も該デバイスに含まれる。クラークは工程を自動化しない。ユーザーは試料体積を測定し、それを該デバイスに適用し、タイマーを監視および制御し、次いで、物理的に該デバイスを始動させる。流動を逆にするメカニズムは自動化調時を可能としない。

【0006】

本発明のアッセイおよびデバイスは先行技術の欠点を克服し、ユーザーが試料測定または単一の始動工程以上に介入することなく、最大限の結果を提供する。本発明のアッセイは、試料中の複数の分析物の同時検出が望まれる状況に特に適合する。本発明のアッセイは、安定で、室温保存が可能で、製造および使用が容易で、テストあたり低コストで利用可能な単位剤形である。それらは液体および乾燥試薬の両方のためのパッケージングを完全に統合する。さらに、特許請求されたデバイスは試薬送達のために自己調時するので、オペレータの関与が最小限である。

【0007】

定義

分析物 - 検出すべき分子。例えば、本明細書で用いる分析物は、リガンド、単一の化合物または受容体もしくは抗体に対して少なくとも 1 の抗原決定部位を共通して持つ複数の化合物である。

キャピラリティー - 接着力および凝集力ならびに表面張力により生じる固体と接する液体の動き。キャピラリティーは固体表面、液体表面または両方に影響され得る。

疎水性表面 - 水または水性試料に有効に濡れないいずれの表面。

親水性表面 - 水または水性試料に濡れるいずれの表面。

コンジュゲート可溶性結合試薬 - 固体支持体、すなわち、試料送達チャンネル上にデポジットされ乾燥され、および対象の分析物に対して特定の結合親和性またはそれと化学反応性を有する試薬。試料適用により、該コンジュゲート可溶性結合試薬は可溶化し、流動し始め得る。コンジュゲート可溶性結合試薬は、該試料中に存在すれば、分析物と反応し得る。アッセイフォーマットに依存して、1 のコンジュゲート可溶性結合試薬は検出可能標識で標識し、もう一つは結合試薬で標識し得る。以下、これらの様々なアッセイフォーマットをより詳細に記載する。

【 0 0 0 8 】

固相ゾーン - 少なくとも 2 つの流体流路の断面の材料または表面。

試料 / コンジュゲート混合物 - 試料溶液および可溶化されたコンジュゲート結合試薬を含む液体混合物。

固定化された捕獲試薬 - 固体サポートに結合され、対象の分析物が、または可能性として、該コンジュゲート試薬のうちの 1 つの受容体、例えば、アビジン、のいずれかに対して特定の結合親和性またはそれと化学反応性を有する分子。

試料送達チャンネル - 該コンジュゲート可溶性結合試薬が乾燥され、そこを流れて液体試料が流動する親水性手段。

ソックレット - 粒状固相を用いる場合、固相を含有する親水性メッシュ材料。

固相 - 該固定化された捕獲試薬が結合される親水性材料。

第 2 の流体経路材料 - 第 2 の流路を与える疎水性材料。第 2 の流体経路材料の例は、吸水性材料、プラスチック、またはいずれの他の疎水性ポリマーである。界面活性剤含有洗浄溶液が該第 2 の流体経路材料を流れて流動するとき、その表面張力が低下し、試料 / コンジュゲート混合物が、今や親水性になっている該第 2 の流体経路材料を流れて流動するようにする。

洗浄試薬 - 未結合の物質を該固相領域から除去するように働く液体試薬。本明細書で用いるとき、該洗浄試薬は、界面活性剤(a surfactant)のごとき界面活性剤(a surface active agent)または該洗浄試薬が疎水性表面に濡れるようにすることができないいずれの他の成分を含有する。洗浄試薬のいくつかの他の例は、アルコール、例えば、メタノール、またはいずれの他の水混和性溶媒である。

基質試薬 - 検出可能な発色反応を引き起こすことによって分析物検出を容易にするように働く液体試薬。基質試薬の 2 番目の機能は未結合物質を該固相領域から除去することにある。

洗浄 / 基質試薬 - 本発明のいくつかの具体例において、該洗浄試薬は検出剤も含有して、単一溶液を該第 2 の流路を通して該固相ゾーンに送達することができる。

流動橋 - 該ソックレット、第 2 の流体経路材料および該吸収性貯蔵器の間に確立された液体流動接続。該流動橋は、該第 2 の流路中の液体が該吸収性貯蔵器に流動することを可能にする。

ランセット / 芯 - 液体試薬容器、すなわち、該洗浄および基質試薬容器または組合された洗浄 / 基質試薬容器の封に穿孔することが可能な成分。該ランセットは芯も含み、それはそれらの貯蔵容器からのおよび第 2 の流体経路材料への該液体試薬の流動を容易にする。

【 0 0 0 9 】

発明の概要

本発明は流体試料中の特定の対象の分析物の存在または量を測定するアッセイを実行する

10

20

30

40

50

ためのデバイスおよび方法に向けられる。本発明のデバイスは、固相を含み、それは当該固相から未結合の物質を洗浄後、該対象の分析物を捕獲することが可能である。該デバイスの１の局面において、２つの分離した流路が、単一のユーザー始動工程で該デバイス内に連続して確立される。第１の流路は（該サンプ中に存在していれば）該対象の分析物を搬送し、可溶性結合試薬を該固相にコンジュゲートさせる。分析物が存在していれば、分析物：コンジュゲート複合体が形成され、固定化される。

【００１０】

この第１の流路によって搬送された試料の量は、該デバイスに添加された試料の量によってではなく、該固相の吸収能によって決定され、ユーザーが該試料を測定する必要を取り除く。該試料／コンジュゲート混合物が第２の流路に流入しないように妨げられている。何故ならば、該キャピラリティーおよび該第２の流路の表面エネルギーが、それがこの混合物に濡れないように妨げているからである。

10

【００１１】

該第２の流路は、洗浄試薬が未結合コンジュゲートおよび試料を該固相から該吸収剤に移せるようにし、所望により、検出試薬を送達できるようにする。該第２の流路に沿った洗浄試薬の流動は該第１の流路への試料の添加直後に、該デバイスのユーザー始動によって開始される。洗浄試薬が該固相に移動し、それを通して、およびその周りを流動したとき、それは未結合試薬を除去し、それを該吸収剤に運ぶ。その結果、該固相中の該試料および試薬のインキュベーション時間は、該第２の流路に沿った洗浄試薬の流動時間によって決定され、特定の時刻にユーザーが介入する要求を取り除く。

20

【００１２】

一つの具体例において、第１の流路は試料進入ポート、粒状除去用フィルターエレメント、乾燥試薬を含有する開口キャピラリチャネル、粒状固相を含む。該第２の流路は該第１と交差し、洗浄試薬貯蔵器、吸収剤ブロック、および該貯蔵器から延在する第２の流体経路材料を含み、該固相に接し、最終的に該吸収剤に接する。試料は該第２の流体経路および吸収剤に流入しないように妨げられる。何故ならば、該第２の流体経路材料の表面エネルギーが試料の表面張力と比較して低く、それを疎水性にしているからである。該洗浄溶液は、それが第２の流体経路材料を濡らせるようにする表面活性剤を含有し、かくして、該固相から、試料結合試薬混合物も該第２の流体経路材料に流入するようにする。

30

【００１３】

本発明は多くのアッセイフォーマットに適用することができ、サンドイッチ免疫アッセイ、コロイド状金またはゾル粒子アッセイ、不均一遺伝子捕獲アッセイおよび競合アッセイを含む。

一つの具体例において、サンドイッチアッセイは分析物結合試薬を該固相上に固定化し、次いで、該第１の流路中で標識化分析物結合試薬を乾燥させることによって実行し得る。競合アッセイの具体例において、該第１の流路は該試料によって溶解された標識化分析物を含有するであろう。また、該分析物結合試薬は該固相上に固定化される。これらの具体例のそれぞれにおいて、該アッセイは、「遺伝子捕獲」フォーマットにおいて実行するようにさらに改良され得る。そこでは、該固相結合試薬が、代りに、ビオチンのごとき遺伝子リガンドにコンジュゲートされ、および（他のアッセイ試薬と共にまたは別々にかのいずれかで）該第１の流路中で乾燥され、ならびに（アビジンのごとき）遺伝子リガンド結合試薬は該固相上に固定化される。

40

【００１４】

本発明のもう一つの局面は、プラスチックハウジングおよび流体および／または洗浄溶液を送達する手段を含む免疫アッセイデバイス用のサブアセンブリーを含む。このサブアセンブリーは疎水性ポリマーから形成される構造体を含む。該疎水性ポリマーは、有機溶媒中の溶液として入っている非水溶性界面活性剤で選択的に処理され、表面の部分が親水性になっている。該表面が水性液体に接したとき、それは該処理領域に沿ってのみ流動し、規定された液体流路を作り、それによって、試料／コンジュゲート溶液を該固相に送達する。

50

【 0 0 1 5 】

特許請求されたデバイスのもう一つの局面はソックレットと呼ばれる固相サブアセンブリーを含む。該ソックレットは、該試料および液体試薬に対して浸透性であるが、粒状固相物質が当該構造体から出ないように妨げる構造体内部に捕獲する粒状固相物質を含む。

【 0 0 1 6 】

好ましい具体例の詳細な記載

アッセイ方法

本発明は、試料中の少なくとも 1 の標的分析物の存在を検出する診断デバイスおよび方法を含む。図 1 は、本発明による 1 の好ましい具体例の側面を示す。一般に、本発明のデバイスは約 1 ~ 3 0 m m の厚さ、約 3 ~ 1 5 c m の長さ、約 1 ~ 1 0 c m の幅を有する。デバイスサイズは審美的、人間工学的および性能的な多数の因子によって決定される；例えば、幅は試料送達チャンネル 1 0 2 の数に影響され、長さは所望される結果を得るまでの時間に影響され、および厚さは貯蔵器および吸収剤ブロック材料の選択に影響される。図 1 に描写されたデバイスは本発明のデバイスのいくつかの一般的特徴を示す。該デバイスは種々のエレメント：試料進入ポート 1 0 0、プレフィルター 1 0 1、1 以上の試料送達チャンネル 1 0 2、ソケット 1 0 4、固相 1 0 5、第 2 の流体経路材料 1 0 8、洗浄試薬貯蔵器 1 0 9、基質試薬貯蔵器 1 1 0 を含む。該洗浄試薬貯蔵器 1 0 9 および該基質試薬貯蔵器 1 1 0 は両方ともランセット 1 1 4 A および B を有し、それらは開放機構および芯を有する。

【 0 0 1 7 】

図 1 を参照すると、該試料は該試料進入ポート 1 0 0 に添加され、プレフィルター 1 0 1 を通って流動する。該試料進入ポート 1 0 0 は、試料を受け、当該アッセイを開始するための望ましい場所にそれを送達するデバイスハウジング中のいずれの開口でもあり得る。複数の試料送達チャンネル 1 0 2 も該デバイス中に組み込むことができる。例えば、1 の試料が複数の分析物の存在につきテストされるならば、一旦該試料が適用されれば、等分割量が複数の試料送達チャンネルに入れるように該デバイスを設計する。以下、複数の試料送達チャンネルを持つデバイスをより詳細に説明する。一旦、該試料がプレフィルター 1 0 1 を通過すれば、該試料は乾燥されたコンジュゲート可溶性結合試薬 1 0 3 が配置されている該親水性試料送達チャンネル 1 0 2 に流入する。該液体試料が試料送達チャンネル 1 0 2 に進入したとき、該コンジュゲート可溶性結合試料 1 0 3 は該試料溶液に溶解し可動化される。該試料とコンジュゲートとを混合して、結合反応が開始するようにする。アッセイフォーマットに依存して、結合試薬と該試料中の分析物との間で複合体が形成されるであろう。これらの結合相互作用は形成するまで継続し、一方、試薬は該試料送達チャンネル 1 0 2 を流動し続ける。

【 0 0 1 8 】

一旦、該試料 / コンジュゲート混合物が試料送達チャンネル 1 0 2 の遠位端部に到達すれば、該試料 / コンジュゲート混合物は該固相 1 0 5 に流動する。この具体例は、粒状固相材料を保持する親水性メッシュであるソックレット 1 0 4 を用いる。本発明は、例えば、非粒状固相材料が選ばれた場合、ソックレットなしで実行することができる。図 2 は固相 1 0 5 を収納するソックレット 1 0 4 を用いる好ましい具体例を描写する。選択された流体材料の物理的特性、特に、それらのキャピラリティーおよび表面エネルギーが、該試料 / コンジュゲート混合物が試料送達チャンネル 1 0 2 から固相 1 0 5 に引き込まれることを保証する。親水性固相 1 0 5 の飽和が、（該試料中に存在すれば）該分析物、コンジュゲート結合試薬 1 0 3、（およびこれらの要素のプリフォームド複合体）の間の相互作用を可能にして、固相 1 0 5 に不可逆的に結合する固定化された捕獲試薬と組み合わせる。該対象の分析物が該試料中に存在するならば、コンジュゲート可溶性結合試薬 - 対象の分析物 - 固定化された捕獲試薬複合体が形成され固相 1 0 5 に固定化される。

【 0 0 1 9 】

一旦、該固相が飽和すれば、該第 1 の流路内の流動が完了し、流動が停止する。何故ならば、該固相 1 0 5 は、該試料に濡れていない第 2 の流体経路材料 1 0 8 内部に収納されて

いるからである。第2の流体経路材料108は、かくして、該試料の流動に対する「バリア」として作用し、該試料が該第1の流路内のみを流動し、それを飽和させるが、該第2の流路に進入しないようにする。この第2の流体経路材料108は該第2の流路の構成要素である。このように、該デバイスによってテストされる試料の体積は、固相105に吸収される試料の体積によって正確に制御される。該デバイス自体がテストされる試料の体積を制御するので、当該テストオペレータは、該試料を正確に計り取る必要から免ぜられる。

【0020】

コンジュゲート可溶性結合試薬103を含有する試料での固相105の飽和は、前記の結合反応が起るようにする。該結合反応が起っているの時間は、該試料混合物が固相105内に滞在する時間によって決定される。該試料滞在時間は該第2の流路の第2の流体経路材料108内を流動する洗浄溶液109の到着によって制御される。

10

【0021】

該第2の流路は、以下のように、洗浄試薬109および/または基質試薬110を該固相105に送達する。該第2の流路に沿った流動は、始動ボタン106を押すことによって該デバイスが始動されたときに開始する。図4を参照すると、該洗浄試薬109および該基質試薬110の貯蔵器はランセット114AおよびBによって穿孔され、該洗浄および基質試薬は同時に開放される。洗浄試薬109および/または基質試薬110は該第2の流体経路材料108内に流入し、そこを通過して該固相105に向かう。該第2の流体経路材料108は最初疎水性であるが、洗浄試薬109は濡れることが可能であり、この材料108を通過して流動する。何故ならば、該洗浄試薬は該第2の流体経路材料の表面張力を変化させる界面活性剤を含有し、該第2の流体経路材料108を親水性材料に「変換」するからであり、かくして、該洗浄試薬109が流動するようにする。該洗浄試薬109がソックレット104に到達したとき、洗浄試薬109の一部は該第2の流体経路材料108に沿って流動し続け、該ソックレット104を通過し、該芯112を通過して、該吸収剤111に流入する。このように、該ソックレット104と該吸収剤との間に、今や該洗浄溶液によって親水性にされた第2の流体経路材料108を用いて、流動橋を確立する。この流体性の橋は該第2の流路とソックレット104との間の「バリア」を排除し、ソックレット104内に含有される試料および未結合試薬を吸収剤111に流入させる。一旦、第2の流路が確立されれば、固相105の効率的な洗浄が行われる。何故ならば、洗浄試薬109は、固相105の上方、周囲および内部を流動し、固相105内の試料および未結合試薬を吸収剤111に流入させるからである。

20

30

【0022】

図3は該第1の流路をより詳細に描写する。矢印は、試料進入ポート100への試料添加後の流路を示す。図4は該第2の流路をより詳細に描写する。図4は該第2の流路の概略側面図であり、矢印で流体の動きを描写する。この具体例において、該第2の流体経路材料108が親水性になり、残留試料は該試料送達チャネル102から吸収剤111に引き込まれる。何故ならば、該第2の流体経路材料108の一部が試料送達チャネル102に接しているからである。

【0023】

該第1および第2の流路に対して選択された材料間の相互作用は該第2の流路を作製するのに重要である。一旦、該流路間の境界が取り除かれると、吸収剤ブロック111は十分なキャピラリティーを生じ、該試薬を吸収剤111に引き込み、該第1の流路から第2の方向に流動する分離された第2の流路を維持する。液体をこの新たな方向から送達して、該流路間の境界の開口を制御する。

40

【0024】

洗浄工程はいずれの未結合試薬の除去に対しても重要であり、非特異的結合を減少させ、それによって、アッセイ能力を増強する。特許請求された本発明のデバイスは清浄な洗浄溶液の制御された送達を可能にするように設計される。一つの好ましい具体例において、この制御された送達は固相105および該洗浄試薬貯蔵器の配置（すなわち、両者間の距

50

離)に依存する。

【0025】

もう一つの好ましい具体例において、該デバイスは、固相105の配置を考慮することなく、該洗浄溶液による該流路間の境界の開口を工作するいくつかの異なる方法で製造し得る。例えば、流路を該固相の下方ではなく、該固相接触ゾーンの周囲に工作することができる。いくつかの洗浄/基質試薬が該吸収剤に到達し、それゆえ、試料洗浄を開始し得ることを保証する第2の流路を工作する多くの方法がある。

【0026】

該コンジュゲート可溶性結合試薬103が基質を必要とするならば、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼを用いるならば、該基質試薬は該洗浄試薬の流路に続く。該固相上で発色される色は、該試料中に存在する対象の分析物のレベルに比例する。あるいは、用いるディテクターコンジュゲート結合試薬103は、例えば、コロイド状金もしくは蛍光性タグにコンジュゲートした基質または電気化学的ディテクターを必要としない。この場合、該基質試薬貯蔵器は該デバイスのパーツとして含まれないであろう。

10

【0027】

図1に対するなもう一つの代替具体例において、電気化学的センサーで該分析物が検出されるように、該デバイスを修飾し得る。該固相105およびソックレット104は、該固相担体パーツ上の凹部に印刷された一組の電極(動作、対向および参照電極)に置き換えられる。印刷された導電性経路は該デバイスの端部にまで延在する。試料送達チャンネル102は、(所望により、キャピラリティー誘導材料または構造体を含有する)電極上の部分に作製されたキャピラリー空間に流入する。疎水性吸収性材料108は該空間の上部を含む。該固定化された試薬103は該動作電極の表面に付着される。

20

【0028】

図1に対するこの代替具体例において、該進入ポート100に適用された試料はプレフィルタ101を通り、該試料送達チャンネル102に沿って移動し、コンジュゲート可溶性結合試薬103を溶解する。該試料/コンジュゲート混合物は該電極上の空間に流入し、そこで、流動が停止し、結合反応が起る。該デバイスの始動が該第2の流体経路材料108に沿った洗浄溶液の流動を開始させる。該洗浄溶液が該電極上の領域に到達したとき、未結合分析物を含有する試料溶液を該第2の流路に流入させ、該吸収剤111に移動させる。さらなる洗浄試薬109は該電極上の空間を通して流動し、未結合試薬を効率的に除去する。必要であれば、基質試薬110は該第2の流路に沿って連続的に流動し、さらに検出試薬を供給する。結合した分析物の量を電気化学的に検出する。該電極は電極カバー部上に印刷し得、該第1の流路は、該第2の流路材料108中のダイカットホール107を通過する。なお、表面に依存して他の検出方法がこのデバイスに適用し得るであろう。例えば、当該部分が透明物質で作製されていれば、表面プラズモン共鳴を該結合表面上で測定し得るであろう。

30

【0029】

デバイスの構成要素

試料進入ポート

該試料進入ポート100はプラスチックハウジング中の開口であり、そこから該試料を添加する。一つの具体例において、試料進入ポート100は固相105の上流に位置する。試料を本発明のデバイスに適用することができる様々な方法がある。試料進入の一例は、該デバイスの上部に備えられた試料進入ポートを取り囲む隆起した表面を含むカップ構造を含む。この例において、試料はピペッターまたはシリンジのごとき計量分配装置から該カップ構造に滴下する。該カップ構造は該試料を試料進入ポート100の周囲に含有させるように働く。もう一つの例において、該試料は試料吸収チップを用いて該デバイスに適用することができる。この例において、該デバイスの狭い端部を該デバイス内に試料を直接吸収するように適合させる。液体浸透性液体チャンネルを該装置内部に備えて、該試料を該デバイスの先端から試料送達チャンネル102に移動させる。この例の利点は、試料を分割するのに計量分配装置が必要でないことである。この例において、該デバイス内に含ま

40

50

れるチャンネル構造および固相の総容積は必要とされる試料の体積を制御する。

【0030】

プレフィルター

試料進入ポート100はプレフィルター101を含有してもしなくてもよい。本発明のデバイスがプレフィルター101を含むのであれば、その主な機能は、デバイスを詰まらせ、潜在的にアッセイ結果に干渉し得るいずれの大きな物質をも除去することにある。プレフィルター101は、該デバイスの残余部が全血に適用可能であれば、赤血球を除去するのに十分な程の小さい穴が開いている必要はない。しかしながら、赤血球を除去する必要がある、またはさらなる分離が所望されるのであれば、用いるプレフィルター101は、この目的のために当該分野で利用可能なものであろう。好ましい具体例において、単層の親水性媒体を用いる。

10

多重分析物テストのための好ましい具体例において、該試料は該プレフィルター101を通過していくつかの試料送達チャンネル102に移動する。チャンネル102のそれぞれは該プレフィルター101に接するが、チャンネル102同士はそうではなくて互いに独立している。この独立が流体的相互作用、および独立したアッセイ間の試薬の相互汚染をを最小限化する。多くの代替が可能であり、望ましいアッセイのタイプに依存する。

【0031】

試料送達チャンネル

好ましい具体例において、該第1の流路は乾燥コンジュゲート可溶性試薬103を含有する親水性試料送達チャンネル102を含む。好ましい具体例は、該試料送達チャンネル内に乾燥コンジュゲート可溶性試薬を含み、本発明のいくつかの具体例は、試料が該デバイスに添加される前に、該試料にコンジュゲート可溶性試薬を添加することを含む。該試料送達チャンネル102の幾何および表面処理は、該試料がプレフィルター101から該固相105まで移動する時間を制御するように設計される。例えば、プラスチック製キャピラリーチャンネルはコロナ処理によって、または非水溶性表面活性剤での処理によって親水性にし得る。該第1の流路も、乾燥コンジュゲート結合試薬を含有する単一または複数の従来の免疫アッセイストリップのごとき吸収性材料を含む他の材料を含む。

20

該試料送達チャンネル102は、試料を該プレフィルターから該試料送達チャンネルに引き込むのに十分なキャピラリティーを発生するように設計することができる。この場合、システムを設計するとき、各構成要素、プレフィルター101および試料送達チャンネル102の全キャピラリティーを考慮して試料の流動が試料送達チャンネル102の方向であるようにすべきである。この場合、該システムが作動し、そこで、流体の流動は、流体の流動を誘発する外力に頼るのではなく、該デバイスおよびその構成要素の物理的特性によって決定される。

30

【0032】

該試料送達チャンネルの主な機能はコンジュゲート結合試薬103の貯蔵器として働き、それらが均等に該試料中に分配されることを保証することにある、また、該試料/試薬混合物の該固相への導管として働くことにある。試料送達チャンネル102の設計は該コンジュゲートの均等分配を与えるのに重要である。いくつかの具体例において、該試料が該コンジュゲートチャンネルを通過するときに、表面トポグラフィーを当該部分に組み込むことによって、該試料の混合を促進することが望まれるであろう。

40

【0033】

遺伝子捕獲系において、該試料送達チャンネルは、該チャンネル内にデポジットされ、乾燥された2つの異なる試薬を有することができる。該試薬は検出可能標識が付着された第1の免疫学的結合試薬（当該コンジュゲート）および受容体分子が付着された第2の免疫学的結合試薬である。

【0034】

固相材料

該固相105は、該結合試薬および該分析物によって形成された反応生成物を結合させる試薬で被覆された材料を含む。固相材料はガラス繊維マット、不織布合成マット、焼結粒

50

状構造体、注型もしくは押し出し膜材料または該材料内での接着をの存在で特徴付けられる他の材料であろう。該固相 105 はナイロンまたはニトロセルロースのごとき形成された（成形または注型された）開口細孔構造体であってもよい。該固相 105 はガラス粒子またはポリマー粒子のごとき粒状材料であってもよい。固相 105 は（電極または別の知覚表面のごとき）表面であってもよく、該表面と該流路材料とによって境界される規定された流体空間を持つ。

【0035】

該固相材料は、該デバイスに組み込まれる前に、種々の形状に切り込まれるか、切断されるか、ダイカットされるか、または穿孔されるであろう。生物学的試薬は、所望の形状に形成する前か後に、該材料に塗布することができる。生物学的試薬は不動態的にかまたは共有的にかのいずれかで該材料に付着させることができる。該固相アセンブリーの代替形状の例は、円形、方形／矩形形状、扁平楕円形状または三角形状であろう。

10

【0036】

もう一つの具体例において、該固相 105 は粒状材料であり、それは内部接着を含有する構造体に予備形成されない。この具体例において、粒状固相 105 はソックレット内に捕獲される。この具体例において、該固相材料は、無機または有機粒状物、ガラスビーズ、ポリマー粒子よりなる群から選択される。サンドイッチ免疫アッセイの場合、好ましい固相マトリクスは、ビオチン化された結合試薬に対する受容体 - 結合パートナーであるアビジンで共有的に被覆され、およびそれを有するガラスビーズである。

20

【0037】

ソックレット

ソックレット 104 は、液体試薬の流動を阻害することなく固相 105 を物理的に捕獲する親水性メッシュ材料である。この特別の具体例において、ソックレット 104 は該試料および液体試薬に対して浸透性であるが、該粒状固相材料が該構造体から出ないようにする。

【0038】

第 2 の流体経路材料

一つの具体例において、該第 2 の流体経路材料 108 は疎水性媒体によって規定され、その媒体は吸収性材料、プラスチック、不織布ポリエステル繊維材料、または試料／試薬の流動用の経路を備えるように形成されたいずれの他の疎水性構造体を含む。好ましい具体例において、多孔質の第 2 の流体経路材料 108 は洗浄試薬貯蔵器に接触して配置され、固相 105 に接するように延在し、さらに芯 112 および吸収剤 111 にまで延在する。該第 2 の流体経路材料 108 は固相 105 を収納するソックレット 104 を取り囲む（図 1 を引用）。第 2 の流体経路材料 108 中のダイカットホール 107 は、試料が該試料送達チャネル 102 から固相 105 に移動するようにする。複数の固相 105 アセンブリーの場合、各個数のダイカットホール 107 は該第 2 の流体経路材料 108 中に作製され、該試料が該第 2 の流体経路材料 108 を通って固相 105 に送達されるようにする。好ましい具体例において、該第 2 の流体経路材料 108 は検出試薬用の流体導管としても働き、洗浄試薬 109 が基質試薬 110 の前に流動することを保証するように構築される。

30

40

【0039】

吸収剤

吸収剤 111 は過剰な試薬の貯蔵器として働き、それは総試料体積および全ての他の液体試薬の総体積のうち過剰体積の液体を収容することが可能である。代替の具体例において、該過剰試薬貯蔵器は、過剰な液体を保持する成形容器、または折り畳まれているか、もしくは、そうではなくて過剰試薬貯蔵器内に作製されている該第 2 の流体経路材料の継足し部分である。

【0040】

試薬系

該コンジュゲート可溶性結合試薬 103 を試料送達チャネル 102 内で乾燥させ、該試料

50

によって溶解させる。サンドイッチ免疫アッセイの例において、好ましい試薬は第 1 および第 2 のコンジュゲート可溶性結合試薬 103 を含む。第 1 のコンジュゲート可溶性試薬 103 は、検出可能標識にコンジュゲートされた抗体（または抗原）であろう。該検出可能標識は、コロイド状金もしくは着色ラテックス粒子のごとき光吸収性粒子、リン光性分子、蛍光性分子または西洋ワサビペルオキシダーゼのごとき酵素であろう。なお、当該検出可能信号は電気化学的またはアッセイ読出しとして当該分野で用いられるいずれの他の信号であり得る。第 2 のコンジュゲート可溶性試薬 103 は、ビオチンのごとき受容体にコンジュゲートされた抗体（または抗原）であろう。あるいは、本明細書に記載されたアッセイについての結合パートナーは抗原、抗体、リンガンド、受容体、核酸分子、化学反応体、これらの断片、および導通アッセイ (conducting assays) について当該分野で使用

10

される試薬のごとき他のものを含み得る。
該試料中のコンジュゲート可溶性結合試薬 103 の濃度は、該試料による該コンジュゲート可溶性結合試薬 103 の溶解速度、該試料の流速、および試料送達チャネル 102 に適用されたコンジュゲート可溶性結合試薬の量に影響される。

【0041】

記載された発明のさらなる具体例は、反応体もしくは基質を固相 105 上に固定化し、次いで、生成物質を検出することによるか、または該反応体もしくは基質を該第 1 の流路に拡散的にもしくは非拡散的に固定化し、次いで、該固相ゾーン中で生成物質を検出することによる酵素的または化学的反応のアッセイを含む。

【0042】

20

本発明の様々な具体例

図 9 に描写されたもう一つの具体例において、該第 1 の流路は試料進入ポート 81 を含み、それは乾燥結合試薬を含有する 2 つの親水性試料送達 / キャピラリーチャネル 82 のそれぞれと流体連絡している。各チャネル 82 の遠位端部は親水性固相 85 の下側と流体連絡している。

【0043】

該第 2 の流体経路は、1 つの疎水性吸収性材料 90 に始まり、それは洗浄試薬を疎水性吸収性材料 90 から疎水性チャネル 88 へと引き出すキャピラリーアレイ構造体 89 に接合されている。このチャネルは 2 つの疎水性試薬チャネル 87 に分れ、それらは該固相 85 周囲の環状カップ形状疎水性空間 86 に連結する。この空間の遠位側には、1 組の疎水性退出チャネル 84 が連結され、それらはホール 83 に挿入された芯に続く。該芯は該デバイス下の吸収剤ブロック（図示せず）と流体連絡している。

30

【0044】

操作において、試料は該ポート 81 に進入し、該チャネル 82 に流れ落ち、次いで、該乾燥試薬を溶解する。流動は該チャネルまで落ち続け、そこで、該固相 85 が飽和したときに、流動が停止する。該試料 / 試薬混合物の流動は該第 2 の流路に流入しない。何故ならば、該第 2 の流路の表面は疎水性だからである。

【0045】

試料の添加と同時に、該デバイスを始動し、吸収性材料 90 に沿って洗浄試薬の流動を開始させる。該洗浄試薬がキャピラリーアレイ構造体 89 に到達したとき、それは該疎水性吸収性材料 90 から該疎水性チャネル 88 に移動する。該流動が環状カップ形状疎水性空間 86 に到達したとき、該洗浄試薬の一部が固相 85 周囲を通過し、該退出チャネルに行く。これらの表面が該洗浄試薬に濡れることで、それらが親水性になり、次いで、該固相 85 中の試薬が該流出チャネル 84 へと、および該芯 80 へと引き込まれ、引き続き、残留物を洗浄する。酵素増幅アッセイの場合、基質溶液は該第 2 の流路に沿って、該洗浄試薬の後に続いて流動する。

40

【0046】

該コンジュゲート可溶性結合試薬のうち一つの標識が酵素である場合、該基質は該疎水性吸収性材料 90 に沿って、該洗浄試薬に引き続いて貯蔵器から流動する。該基質試薬流体経路は該洗浄試薬流体経路に続き、それゆえ、該第 2 の流路の一部である。該アッセイは

50

、該固相 8 5 中の酵素標識が基質と反応したときに完了する。

【 0 0 4 7 】

図 1 0 に描写された本発明のもう一つの具体例において、全ての流路は疎水性吸収性材料 1 5 0 の単一片上に作製される。図 1 0 に示すごとく、疎水性吸収性材料 1 5 0 のストリップは非水溶性表面活性剤で印刷されて、試料進入ポート 1 5 1、試料送達チャンネル 1 5 2、および固相ゾーン 1 5 3 を含む第 1 の親水性流路を作製する。試料は試料進入ポート 1 5 1 に適用され、該第 1 の流路に沿って移動し、試料送達チャンネル 1 5 2 中にデポジットされたコンジュゲート可溶性結合試薬を溶解する。試料 / コンジュゲート混合物が固相ゾーン 1 5 3 に到達したとき、該試料中の分析物および分析物 / 試薬複合体は該固相ゾーン 1 5 3 に付着された固定化された試薬に結合する。(該非水溶性表面活性剤の限界によって規定される) 固相ゾーン 1 5 3 は飽和し、流動が停止する。表面活性剤を含有する洗浄試薬は(オペレータによって、または前記例に記載された方法によって)該遠位端部ゾーン 1 5 4 に適用され、吸収性材料 1 5 0 に沿って移動して、それを親水性にする。該洗浄試薬が固相ゾーン 1 5 3 に到達したとき、固相ゾーン 1 5 3 内の試料溶液が吸収性材料 1 5 0 を通って吸収剤 1 5 5 に移動するようにする。さらなる洗浄試薬が固相ゾーン 1 5 3 を通って移動し、全ての未結合試薬を除去する。基質試薬が必要ならば、それは該洗浄試薬の後に遠位端部ゾーン 1 5 4 に適用され、該洗浄試薬の後に続いて流動する。

あるいは、この具体例における流体経路は親水性吸収性材料のシートから切断し、疎水性吸収性材料 1 5 0 に結合させ得る。吸収性材料 1 5 0 の下側は親水性吸収剤 1 5 5 に接する。

【 0 0 4 8 】

単一または多重分析物テスト用の代替構造体

図 5 A は、単一試料進入ポート 1 0 0、単一試料送達チャンネル 1 0 2 および単一固相 1 0 5 アセンブリーを描写する。この構造体は試料あたり単一の分析物をテストするのに有用である。このフォーマットには制御は存在しない。複数単位のこの構造体を単一デバイス内に配置して、複数試料につき単一のテストを実行することができる。複数チャンネルの使用は非常に万能である。例えば、コロイド状金サンドイッチアッセイを酵素増幅競合アッセイと並べて設計し得る。あるいは、チャンネルを陽性および陰性対照のために用いることができる。

【 0 0 4 9 】

図 5 B は、単一試料進入ポート 1 0 0、2 つの分離した試料送達チャンネル 1 0 2 および 2 つの分離した固相 1 0 5 アセンブリーを持つ構造体を示す。それは 2 以上の独特の分析物について単一の試料を、または単一の分析物と対照とについて単一の試料をテストするのに用い得る。様々なアッセイフォーマットをこの構造体と同時に用いることができる。複数単位のこの構造体を単一デバイスに組み込んで、複数の分析物について複数の試料をテストすることができる。

【 0 0 5 0 】

図 5 C は、単一試料進入ポート 1 0 0、単一コンジュゲートチャンネル 1 0 2 および 2 つの分離した固相 1 0 5 アセンブリーを持つ構造体の例を示す。この構造体は、2 つの固相 1 0 5 に存在する生物学的試薬が異なり、特に 1 の固相 1 0 5 が他方に対する対照として作用する免疫アッセイフォーマットにおいて使用するのに最も有用である。

【 0 0 5 1 】

デバイスの操作

図 6 は特許請求された本発明のデバイスの 1 つの具体例を描写する。ユーザーは、少なくとも該試料送達チャンネル 1 0 2、プレフィルター 1 0 1 および固相 1 0 5 を満たすのに十分な体積(例において約 3 0 マイクロリットル)の試料を該試料進入ポート 1 0 0 に添加し、始動ボタン 1 0 6 を押してデバイスを始動する。該始動工程は該ランセット / 芯が該洗浄試薬 1 0 9 および基質試薬 1 1 0 容器上の封を破ってこれらの試薬の流動を開始させる。該試料は該フィルターエレメント 1 0 1 通って、該試料送達チャンネル 1 0 2 に流入する。該試料は乾燥コンジュゲート可溶性結合試薬 1 0 3 を溶解し、反応を開始させる。反

応混合物は固相 105 に流入し、そこで、第 2 期の結合反応、すなわち、分析物 - コンジュゲート可溶性結合試薬複合体の固相 105 への固定化が起る。該第 1 の流路は該固相の遠位端部で停止する。該固相 105 中でのインキュベーション時間は該第 2 流体経路材料 108 に沿った洗浄溶液 109 の通過時間によって決定される。洗浄試薬 109 は該固相 105 から未結合試薬を除去し、基質試薬 110 が該洗浄溶液 109 の後に連続的に続き、そして信号を発する。

【0052】

任意具体例

他の標識

用いる標識が着色粒子、例えば、コロイド状金、または蛍光性もしくは電気化学的タグである場合、基質は必要なく、アッセイは該洗浄試薬が該固相結合ゾーンから未結合の試薬を除去した後に完了する。

10

【0053】

半定量アッセイ

半定量アッセイにおいては、時々、該分析物アッセイ信号を対照反応において発せられたものと比較することによって、デバイスおよび試料のバラツキを補償することが望ましい。この場合、テスト反応および対照反応に対する試薬は該試料送達チャネル中で一緒に乾燥させることができる。この具体例におい、その後、該試料送達チャネルに切り込みを入れ、それぞれが該反応の 1 に特異的な 2 つの固相結合ゾーンに供給する。

【0054】

20

定量アッセイ

定量アッセイにおいて、該反応の時限工程を正確に制御することによって、正確性および増強された感度を達成することができる。このアッセイデバイスの正確性は、該試料が該試料送達チャネルに滞在する時間、該試料 / 試薬混合物が該固相に滞在する時間および洗浄後該アッセイが読み出される時間を制御する機器を開発することによって向上させることができる。

【0055】

実験手順

実施例 1

この実施例は、試料中のイヌ心系状虫抗原を検出するための本発明の方法およびデバイスに関する。

30

【0056】

抗心系状虫 - 酵素コンジュゲートの調製：西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) (20 mg) を pH 4.5 にて 100 倍モル当量の過ヨウ素酸ナトリウムで酸化し、次いで、1.25 当量量のアフィニティー精製ニワトリ抗心系状虫抗体と混合する。1.5 時間の反応後、該 HRP - 抗体コンジュゲートを 100 倍モル当量の水素化ホウ素ナトリウムで還元することによって安定化させ、さらに、0.5 時間インキュベートした。コンジュゲート希釈剤中 1 mg / ml タンパク質濃度にてコンジュゲートを貯蔵した。この HRP - 抗体コンジュゲートは、使用前に該デバイスの試料送達チャネル中で乾燥されるコンジュゲート可溶性結合試薬のうちの 1 つである。

40

【0057】

ビオチン化抗心系状虫抗体の調製：アフィニティー精製ウサギ - 抗心系状虫抗体 (20 mg) をアルカリ性 pH にて 15 モル当量のビオチン - アミドカプロイル - NHSEステルと反応させた。未反応ビオチンを透析によって分離した。抗体ビオチン化はアビジン結合のごとき標準方法を用いて決定することができる。このビオチン化抗体は使用前に該デバイスの試料送達チャネル中で乾燥される第 2 のコンジュゲート可溶性結合試薬である。

【0058】

固相の調製：1.4 kg のホウケイ酸ガラス球 (65 μ ± 10 μ 直径) を 1.4 L の 1% アミノプロピルトリエトキシシラン水溶液 (1 w / v) と 4 時間攪拌して、アミノプロピルガラスを製造する。粗孔質焼結ガラスロート上で 5 L の水で洗浄し、50 にて一晚硬

50

化させた後、600 gのアミノプロピルガラスを600 mLの50 mM バルビツール酸バッファー、pH 3.3中4.4%の固体カルボキシルラテックス(87 nm直径、430 μ 当量/g) 50 mLと攪拌した。該ラテックスは、該ガラス懸濁液中に、40 mg/mL EDC水溶液を30分間を開けて2回10 mL添加して攪拌することによってアミノプロピルガラスを被覆し、次いで、さらなる時間反応させた。2 Lの0.2 M NaCl、引き続き8 Lの水で洗浄することによって、得られたラテックス被覆ガラスから未結合ラテックスを除去する。ニュートラアビジン(neutravidin)で該ラテックスガラスを被覆するために、洗浄されたラテックス被覆ガラス(699 g)を600 mLの50 mM MES(2-N-(モルホリノエチルスルホン酸))バッファー、pH 6.0中に懸濁させ、10 mLの29 mg/mL水性ニュートラアビジンと攪拌し、その後、30分間を開けて、14.5 mLの40 mg/mL EDC水溶液を2回添加し、次いで、さらなる時間反応させた。0.1%ツイーン20を含有する2 LのバッファーA(5 mM リン酸カリウム、0.1% EDTA、pH 8.0)、引き続き0.5 M NaClを含有する2 LのバッファーA、最後に2 LのバッファーAで洗浄することによって、得られたニュートラアビジン-ラテックス-ガラスから未結合ニュートラアビジンを除去した。

【0059】

記載された固相はいくつかの利点を有する。該ガラス粒子によって決定される孔径は、赤血球が捕えられることなく容易に流動することを許容しつつ、高いキャピラリティーを与える。ラテックス粒子でガラスを被覆することで表面積を増大させて、より大量の試薬を固定化し、かくして、より高速な結合反応を許容する。該ラテックスは非特異的結合も低減し、試薬との容易なカップリングを許容する表面を与える。最後に、原料が安価であり、簡単に入手でき、バルクプロセスで最終固相の調製を許容する。

【0060】

該アッセイデバイスは以下のように組み立てられる(図1参照)：

1. 5.5 μ lの固相105のスラリーを各2スポット固相担体上にデポジットし、乾固する。
2. 予備成形ナイロンメッシュソックレット(Saatitech PA-3121)104を該乾燥固相105上に熱固着した。
3. 2つの0.093"ホールの開いた疎水性不織布ポリエステル(Ahlstrom 6627)108のストリップを該固相105上に熱固着した。この疎水性材料は該デバイスの第2の流体経路材料108として働く。
4. 各試料送達チャネル102は、BioDot QuantiBiojetを用いて、ジアセトンアルコール中のBrij 72界面活性剤の2.5%溶液680 nLをデポジットすることによって親水性にした。
5. パーツを乾燥させ、212 nLの50%スクロースを該表面活性剤層の上にデポジットし、引き続き、乾燥させた。
6. 双方ともコンジュゲート可溶性結合試薬103として働く、ニワトリ-抗心糸状虫-酵素コンジュゲート(100 nL、1 mg/mL)およびビオチン化ウサギ抗心糸状虫抗体(50 nL、1 mg/mL)を工程5のパーツの試料送達チャネル102の一部中にデポジットし、乾燥させた。
7. ガラス繊維プレフィルター(Ahlstorm 8980)101を該試料進入ポート101上に置き、プラスチックカバーを該デポジット抗体上に超音波溶接して、試料送達チャネルアセンブリー102を作製した。
8. 該固相アセンブリー105と該試料送達チャネルアセンブリー102とを互いに熱固着によって付着させた。
9. 吸収剤芯(Filtrona R-14545、接着ポリエステル/ポリエチレン、0.078"直径)を該デバイスのホール内に置き、吸収剤酢酸セルロースブロック111をこれらの芯に保持した。

【0061】

イヌ心糸状虫抗原を含有する血清試料を組み立てられたデバイスのプレフィルターに添加

10

20

30

40

50

した。該試料は該試料送達チャネルに流入し、該デポジット抗体を溶解し、該抗体が該抗原と反応するのを容易にした。反応混合物はさらに、該固相まで該試料送達チャネルを流れ落ち、そこで流動が停止した。該反応混合物中のビオチン化抗体は該固相に結合し、該抗原と抗体-酵素コンジュゲートとの免疫複合体を捕獲した。図9は、この実験で形成された免疫複合体を描写する。

【0062】

該試料の添加と同時に、疎水性ポリエステルのストリップの端部を0.025Mクエン酸、0.15M NaCl、0.5%ケーソン(Kathon)、1%トリトンX-100、0.75%乾燥ミルク、15%BSA(30%液体ストックから)を含有する表面活性剤含有洗浄試薬250 μ lを含有する貯蔵器に接触させて配置する。該洗浄試薬をpH7.0にし、0.2ミクロンフィルターで濾過する。該洗浄試薬は疎水性ポリエステルのストリップを通して移動し始める。該洗浄試薬が疎水性ポリエステルのストリップの該固相に近接する領域に到達したとき、それは該固相内に移動し、未結合抗体を除去する。該洗浄試薬は疎水性ポリエステルのストリップを通して該吸収剤芯およびブロックへと移動し続け、該抗体を連れて行く。該洗浄試薬貯蔵器が空になったとき、疎水性ポリエステルのストリップは250 μ lのTMB基質溶液(Moss、TMBM1000)を含有する第2の貯蔵器に接触させて配置し、それは該洗浄試薬に続いて該ストリップを通して移動する。該基質試薬が該固相に到達したとき、それは該洗浄溶液と置き替り、該固相中で、結合した抗体-酵素コンジュゲートの量に比例して、青く発色する。陰性血清試料を用いて同様のデバイスを稼働させたときは、可視的な色は発色しなかった(図10を参照)。

【0063】

【表1】

流動	時間
固相への試料	10～15秒間
固相への洗浄試薬	30秒間
試料除去の完了	1分45秒間
分析物を含有する試料について目視可能な色	強い陽性については3分間 弱い陽性については6分間

【0064】

実施例2

実施例1のデバイスは、コンジュゲートとしてHRPを用いる代りに、蛍光性標識または着色粒子、例えば、コロイド状金をニワトリ-抗心糸状虫抗体に付着させて用いることによって、簡素化し得る。この場合、基質試薬は省略し得、未結合試薬を洗い去った後、信号を見る。

【0065】

実施例3

単一試薬中で複数の分析物を検出するために、単一試料進入ポートから複数の試料送達チャネルに供給することによって、多重チャネルデバイスを構築する(図7)。各試料送達チャネルは異なるコンジュゲート結合試薬を含有して、異なる分析物を検出する。かくして、4つの固相容器は互いに隣接するように構築される。該アセンブリーは4つの試料送達チャネルでプラスチックパーツに付着される。

【図面の簡単な説明】

【図1】 本発明による一つの具体例の側面図。

【図2】 本発明による好ましい具体例の分解側面図。

【図 3】 本発明による好ましい具体例の第 1 の流路の概略側面図。

【図 4】 本発明による好ましい具体例の第 2 の流路の概略図

【図 5】 単一または複数分析物テストのための本発明によるいくつかの代替物を描写する概略図。

【図 6】 本発明による一つの具体例の三次元図。

【図 7】 本発明による一つの具体例のアッセイ構成要素を描写する概略図。

【図 8】 実施例 1 の具体例を用いたアッセイ結果の写真。

【図 9】 本発明によるもう一つの具体例を描写する概略図。

【図 10】 本発明によるもう一つの具体例を描写する概略図。

【符号の説明】

10

8 1 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの試料進入ポート、
 8 2 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの試料送達 / キャピラリーチャンネル、
 8 3 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの芯が通るホール、
 8 4 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの疎水性退出チャンネル、
 8 5 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの親水性固相材料、
 8 6 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの環状カップ形状疎水性空間、
 8 7 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの疎水性試薬チャンネル、
 8 8 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの疎水性チャンネル、
 8 9 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスのキャピラリーアレイ構造体、
 9 0 . . . 図 9 の具体例を具現するデバイスの疎水性吸収性材料、

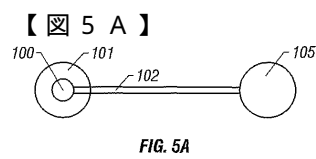
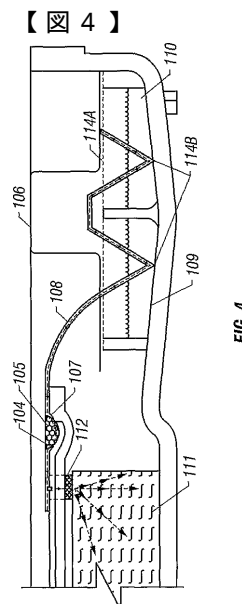
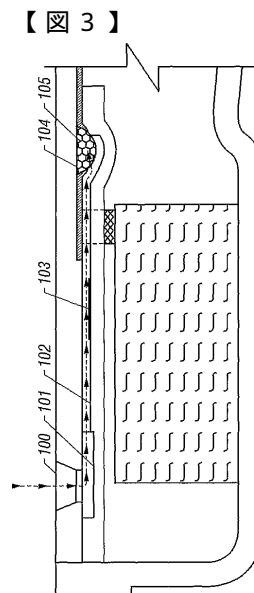
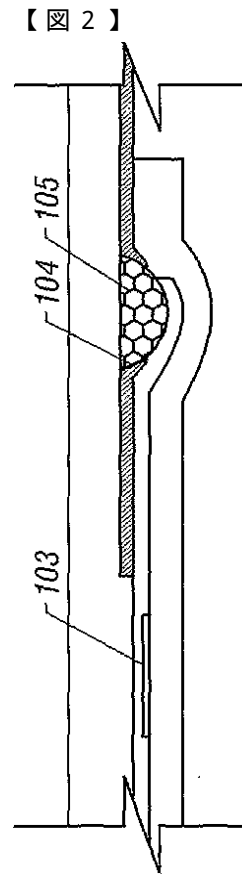
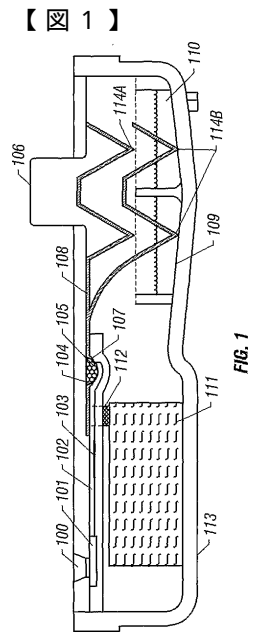
20

1 0 0 . . . 試料進入ポート、
 1 0 1 . . . プレフィルター、
 1 0 2 . . . 試料送達チャンネル、
 1 0 3 . . . コンジュゲート（可溶性）結合試薬、
 1 0 4 . . . ソックレット、
 1 0 5 . . . 固相、
 1 0 6 . . . 始動ボタン、
 1 0 7 . . . 第 2 の流体経路材料中のダイカットホール、
 1 0 8 . . . 第 2 の流体経路材料、
 1 0 9 . . . 洗浄試薬、
 1 1 0 . . . 基質試薬、
 1 1 1 . . . 吸収剤、
 1 1 2 . . . 芯、
 1 1 3 . . . プラスチックハウジング、
 1 1 4 A . . . ランセット、
 1 1 4 B . . . ランセット、

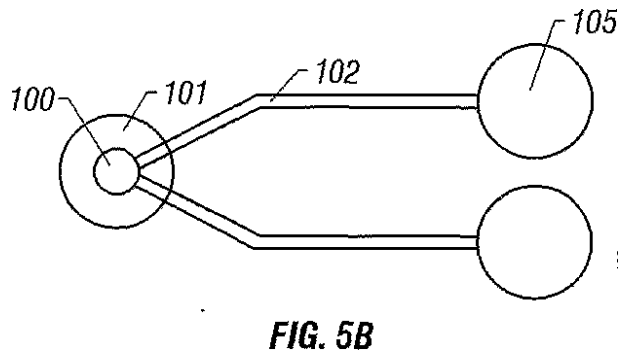
30

1 5 0 . . . 図 10 の具体例を具現する疎水性吸収性材料、
 1 5 1 . . . 図 10 の具体例を具現する試料進入ポート、
 1 5 2 . . . 図 10 の具体例を具現する試料送達チャンネル、
 1 5 3 . . . 図 10 の具体例を具現する固相ゾーン、
 1 5 4 . . . 図 10 の具体例を具現する遠位端部ゾーン、
 1 5 5 . . . 図 10 の具体例を具現する吸収剤。

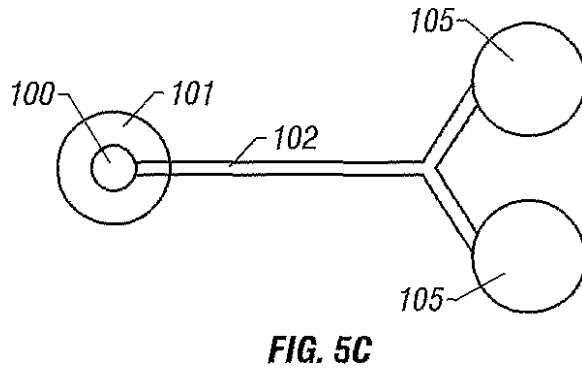
40



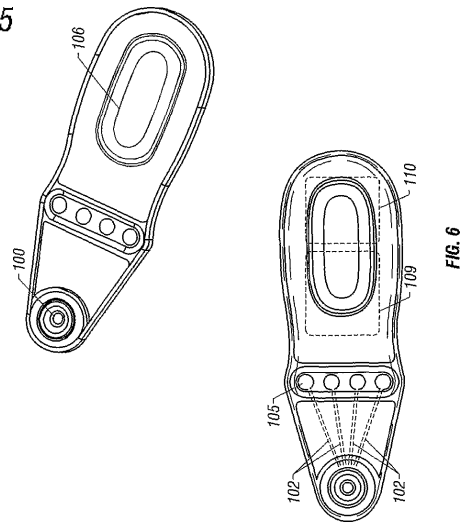
【図 5 B】



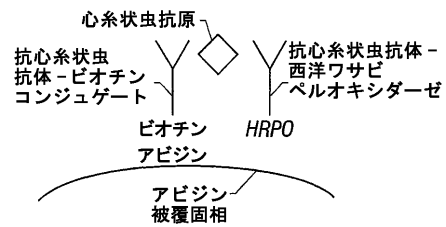
【図 5 C】



【図 6】

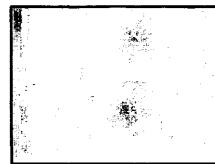


【図 7】



【図 8】

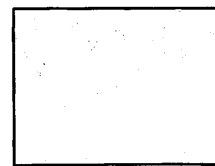
CHTW 1
強い心糸状虫陽性



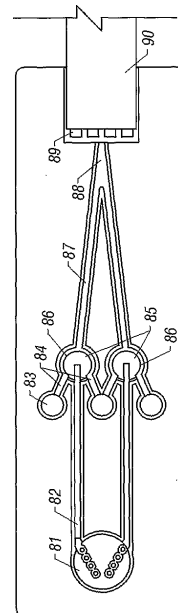
CHTW 3
弱い心糸状虫陽性

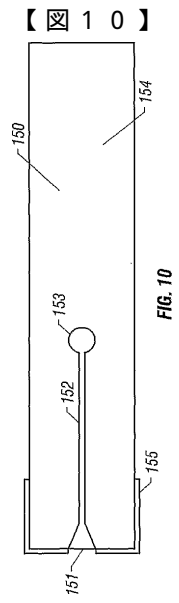


CHTW 4
心糸状虫陰性



【図 9】





フロントページの続き

- (72)発明者 マイケル・アール・ケブロン
アメリカ合衆国 0 4 0 8 4 メイン州スタンディッシュ、リッジ・ビュー・ドライブ 2 6 番
- (72)発明者 スタニスラウ・パースキー・ジュニア
アメリカ合衆国 0 4 0 4 8 メイン州ライムリック、ストーン・ヒル・ロード 4 2 8 番
- (72)発明者 アーウィン・エフ・ワークマン・ジュニア
アメリカ合衆国 0 4 1 7 0 メイン州ケーブ・エリザベス、ハンツ・ポイント・ロード 3 番

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特開昭 5 9 - 1 0 2 3 8 8 (J P , A)
特開平 0 3 - 1 1 8 4 7 3 (J P , A)

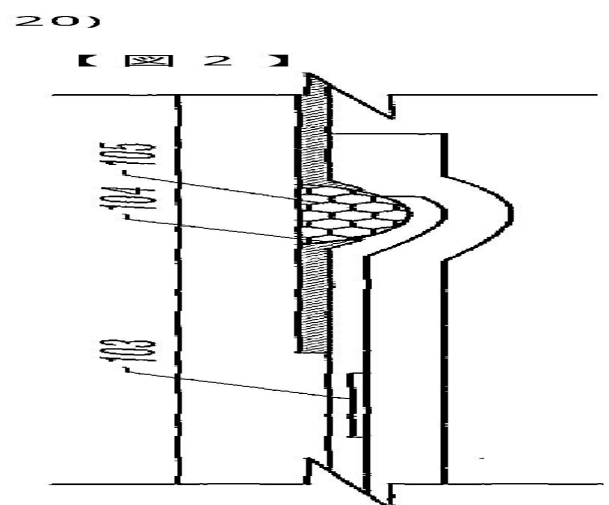
- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)
G01N 33/53-33/566

专利名称(译)	用于具有多个独立流动路径的集成诊断的装置和方法		
公开(公告)号	JP4898061B2	公开(公告)日	2012-03-14
申请号	JP2001581125	申请日	2001-04-11
[标]申请(专利权)人(译)	艾德克斯实验室公司		
申请(专利权)人(译)	IDEXX Laboratories , Inc.的		
当前申请(专利权)人(译)	IDEXX Laboratories , Inc.的		
[标]发明人	スコットエムクラーク ロバートエイチスバ マイケルアールケプロン スタニスラウバースキージュニア アーウィンエフワークマンジュニア		
发明人	スコット・エム・クラーク ロバート・エイチ・スバ マイケル・アール・ケプロン スタニスラウ・バースキー・ジュニア アーウィン・エフ・ワークマン・ジュニア		
IPC分类号	G01N33/566 C12M1/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N37/00 G01N33/543 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/54366 Y10T436/11 Y10T436/12 Y10T436/255		
FI分类号	G01N33/566 C12M1/00.A C12Q1/68.Z G01N33/53.M G01N37/00.102		
优先权	09/551496 2000-04-18 US		
其他公开文献	JP2003532118A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于进行测定以确定流体样品中特定目标分析物的存在或量的装置和方法。在根据本发明的装置中，通过单个用户激活步骤在装置中顺序地建立两个单独的流动路径。第一流动路径递送感兴趣的分析物（如果存在于样品中）并将可溶性结合试剂缀合至固相。如果存在分析物，则形成并固定分析物：缀合物复合物。通过该第一路径递送的样品体积由固相的吸收容量确定，而不是由添加到设备中的样品量确定，从而使用户无需测量样品。防止样品/共轭混合物进入第二流动路径，因为第二流动路径的毛细管作用和表面能阻止其被该混合物润湿。第二流路允许洗涤试剂从中除去未结合的缀合物和样品固相到吸收剂，并任选地输送检测试剂。本发明可适用于许多测定形式，包括夹心免疫测定，胶体金或溶胶颗粒测定，异质通用捕获测定和竞争测定。在一个实施方案中，可以通过将分析物结合试剂固定在固相上，并在第一流动路径中干燥标记的分析物结合试剂来进行夹心测定。在竞争性测定实施方案中，第一流动路径将包含被样品溶解的标记分析物，并且分析物结合试剂固定在固相上。

在这些实施方案的每一个中，可以进一步修改测定以“通用捕获”形式，其中固相结合试剂与诸如生物素的通用配体缀合，并在第一流动路径中干燥（一起或在与其它测定试剂分开），并将通用配体结合试剂（如抗生物素蛋白）固定在其上固相。本发明的另一方面包括用于免疫测定装置的子组件，其包括塑料外壳和用于输送流体和/或洗涤溶液的装置。该子组件包括由疏水性聚合物形成



的结构，所述疏水性聚合物用水不溶性表面活性剂选择性地处理，所述水不溶性表面活性剂已在有机溶剂中作为溶液施加，使得表面的一部分具有亲水性当表面与含水液体接触时，其仅沿着处理区域流动，产生限定的流体流动路径，从而将样品/共轭溶液输送到所述固相。