

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2007-524813

(P2007-524813A)

(43) 公表日 平成19年8月30日(2007.8.30)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B	
GO 1 N 33/532 (2006.01)	GO 1 N 33/532 Z	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 31 頁)

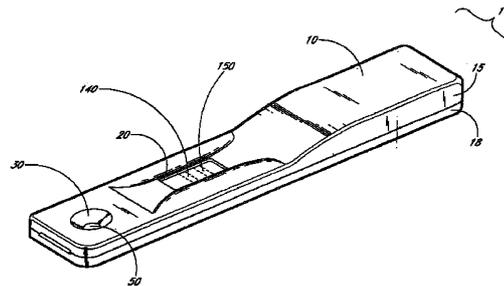
(21) 出願番号	特願2006-509248 (P2006-509248)	(71) 出願人	505449829 アドバンテッジ ダイアグノスティックス コーポレーション アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 85, サニーベール, サン アレソ アベニュー 764
(86) (22) 出願日	平成16年3月19日 (2004.3.19)	(74) 代理人	100107489 弁理士 大塩 竹志
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月5日 (2005.12.5)	(72) 発明者	チャールトン, デーヴィッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 940 87, サニーベール, セサミ ドライ ブ 1206
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/008355		
(87) 国際公開番号	W02005/003732		
(87) 国際公開日	平成17年1月13日 (2005.1.13)		
(31) 優先権主張番号	10/456,771		
(32) 優先日	平成15年6月6日 (2003.6.6)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプル中の分析物についての診断試験

(57) 【要約】

検出デバイスおよび方法が提供される。診断デバイスは、好ましくは、試験領域140を有する試験片を備える。分析されるサンプルは、試験領域と接触し、この試験領域は、目的的分析物に特異的な結合パートナーを含む。分析物は、サンプル中に存在する場合、試験領域中の固定化結合パートナーに結合し、引き続いて結合体と接触する。結合体は、分析物に特異的に結合し、分析物の存在の視覚的示唆を提供する。このデバイスは、患者における特定の疾患または障害（例えば、HIVまたは肝炎）の診断のために使用され得る。これらはまた、個体が妊娠しているか否かを決定するために使用され得る。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

液体サンプル中の目的の分析物を検出するための診断試験片であって、該試験片が、以下

結合体供給源領域であって、該目的の分析物を結合するように構成された結合体を含む、結合体供給源領域；

サンプル適用領域であって、該結合体供給源領域の下流に配置され、該液体サンプルを受け入れるように構成された、サンプル適用領域；および

試験領域であって、該結合体供給源領域の下流に配置され、該目的の分析物に特異的な固定化結合剤を含む、試験領域、

10

## 【請求項 2】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記サンプル適用領域が、前記試験領域を含む、試験片。

## 【請求項 3】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記目的の分析物が、抗体である、試験片。

## 【請求項 4】

請求項 3 に記載の試験片であって、前記目的の分析物が、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）に対する抗体である、試験片。

## 【請求項 5】

請求項 3 に記載の試験片であって、前記目的の分析物が、C型肝炎ウイルス（HCV）に対する抗体である、試験片。

20

## 【請求項 6】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記目的の分析物が、抗原である、試験片。

## 【請求項 7】

請求項 6 に記載の試験片であって、前記目的の分析物が、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）である、試験片。

## 【請求項 8】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記結合体供給源領域が、乾燥結合体を含む、試験片。

30

## 【請求項 9】

請求項 8 に記載の試験片であって、前記結合体供給源領域が、乾燥結合体を含み、該試験片と流体連絡している、結合体パッドを含む、試験片。

## 【請求項 10】

請求項 8 に記載の試験片であって、前記結合体供給源領域が、該試験片の一部である、試験片。

## 【請求項 11】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記結合体供給源領域を洗浄緩衝液と接触させることによって、前記結合体が前記試験領域へと流れる、試験片。

## 【請求項 12】

請求項 11 に記載の試験片であって、前記洗浄緩衝液が、遮断剤タンパク質および非イオン性界面活性剤を含む、試験片。

40

## 【請求項 13】

請求項 12 に記載の試験片であって、前記洗浄緩衝液が、0.1%カゼインおよび1% Triton X100を含む、試験片。

## 【請求項 14】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記結合体が、結合成分および標識を含む、試験片。

## 【請求項 15】

請求項 14 に記載の試験片であって、前記結合成分が、プロテイン A である、試験片。

## 【請求項 16】

50

請求項 14 に記載の試験片であって、前記標識が、コロイド金、コロイド銀、コロイドブラックおよび着色ラテックス粒子からなる群より選択される、試験片。

【請求項 17】

請求項 16 に記載の試験片であって、前記標識が、コロイド金である、試験片。

【請求項 18】

請求項 17 に記載の試験片であって、前記コロイド金が、約 20 ~ 約 80 ナノメートルの粒子サイズを有する、試験片。

【請求項 19】

請求項 3 に記載の試験片であって、前記結合体が、コロイド金に結合したプロテイン A を含む、試験片。

10

【請求項 20】

請求項 6 に記載の試験片であって、前記結合体が、コロイド金に結合した抗体を含む、試験片。

【請求項 21】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記試験片が、ニトロセルロース膜を含む、試験片。

【請求項 22】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記試験片が、前記試験領域の下流に配置されるコントロール領域をさらに備え、該コントロール領域が、前記結合体に結合し得る固定化コントロール結合剤を含む、試験片。

【請求項 23】

請求項 22 に記載の試験片であって、前記コントロール領域が、固定化ウサギ IgG を含む、試験片。

20

【請求項 24】

請求項 22 に記載の試験片であって、前記コントロール領域が、固定化プロテイン A を含む、試験片。

【請求項 25】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記結合体供給源領域と流体連絡している緩衝液パッドをさらに備える、試験片。

【請求項 26】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記試験領域の下流の位置に前記膜と流体連絡する吸着パッドをさらに備える、試験片。

30

【請求項 27】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記サンプル適用領域の直接上に配置されたサンプルフィルターをさらに備える、試験片。

【請求項 28】

サンプル中の抗 HIV 抗体の検出のための試験片であって、以下：

試験領域および該試験領域の下流に配置される結合体供給源領域；

該試験領域に結合された固定化抗原であって、該固定化抗原が、約 0.1 ~ 約 0.5  $\mu$ g の HIV 抗原を含む、固定化抗原；および

該結合体供給源領域に拡散可能に結合された結合体であって、該結合体が、抗体に結合するように構成されている、結合体、を含む、試験片。

40

【請求項 29】

請求項 28 に記載の試験片であって、前記 HIV 抗原が、GP120、P24 および GP36 からなる群より選択された 1 つ以上の抗原を含む、試験片。

【請求項 30】

請求項 28 に記載の試験片であって、前記結合成分が、プロテイン A を含む、試験片。

【請求項 31】

請求項 30 に記載の試験片であって、前記プロテイン A が、コロイド金に結合されている、試験片。

50

## 【請求項 3 2】

液体サンプル中の目的の抗体を検出する方法であって、該方法が、以下：

試験片の試験領域と該サンプルとを接触させる工程であって、該試験領域が、該目的の抗体に特異的な固定化抗原を含む、工程；および

引き続き、該試験領域と、該目的の抗体に結合するように構成された結合体とを接触させる工程、

を包含する、方法。

## 【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の方法であって、前記結合体が、プロテイン A を含む、方法。

## 【請求項 3 4】

請求項 3 3 に記載の方法であって、前記プロテイン A が、コロイド金に結合されている、方法。

10

## 【請求項 3 5】

請求項 3 2 に記載の方法であって、前記目的の抗体が、抗 HIV 抗体である、方法。

## 【請求項 3 6】

請求項 3 5 に記載の方法であって、前記試験領域が、HIV - 1 抗原および HIV - 2 抗原からなる群より選択された固定化抗原を含む、方法。

## 【請求項 3 7】

請求項 3 6 に記載の方法であって、前記 HIV - 1 抗原が、GP120 および P24 からなる群より選択される、方法。

20

## 【請求項 3 8】

請求項 3 6 に記載の方法であって、前記 HIV - 2 抗原が、GP36 である、方法。

## 【請求項 3 9】

請求項 3 2 に記載の方法であって、前記液体サンプルが、全血、血清、および血漿からなる群より選択される、方法。

## 【請求項 4 0】

免疫診断妊娠試験片であって、以下：

液体サンプルを受け入れるためのサンプル適用領域；

固定化第 1 抗 hCG 抗体を含む試験領域；および

hCG に結合するように構成された結合体を含む、結合体供給源領域、  
を備え、該結合体供給源領域が、該サンプル適用領域および該試験領域の上流に配置されている、妊娠試験片。

30

## 【請求項 4 1】

請求項 4 0 に記載の妊娠試験片であって、前記サンプル適用領域と流体連絡している芯をさらに備える、妊娠試験片。

## 【請求項 4 2】

請求項 4 0 に記載の妊娠試験片であって、尿サンプルを収集するためのカップをさらに備える、妊娠試験片。

## 【請求項 4 3】

請求項 4 0 に記載の妊娠試験片であって、前記結合体が、第 2 hCG 抗体を含む、妊娠試験片。

40

## 【請求項 4 4】

請求項 4 3 に記載の妊娠試験片であって、前記第 2 hCG 抗体が、コロイド金に結合されている、妊娠試験片。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

(発明の分野)

本発明は、サンプル中の分析物の検出のための側流式迅速視覚化試験に関する。

## 【背景技術】

50

## 【 0 0 0 2 】

( 関連技術の説明 )

側流式試験デバイスは、当該分野において公知であり、サンプル（例えば、体液）中の目的の分析物の存在を検出するための臨床診断において使用され得る。しかし、このようなデバイスは、代表的に、比較的大きなサンプル容量および多くの量の結合体を必要としている。これらはまた、試験結果が読み出され得るまで長い待ち時間がかかっている。

## 【 発明の開示 】

## 【 課題を解決するための手段 】

## 【 0 0 0 3 】

( 発明の要旨 )

1つの局面において、サンプル中の目的の分析物の検出のために、免疫診断試験片が適用される。いくつかの実施形態において、分析物は、抗ヒト免疫不全ウイルス（HIV）抗体または抗C型肝炎ウイルス（HCV）抗体のような抗体である。他の実施形態において、分析物は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン（hCG）のような抗原である。

10

## 【 0 0 0 4 】

診断試験片は、好ましくは、目的の分析物を結合するように構成された結合体を含む、結合体供給源領域、結合体供給源領域の下流に配置され、液体サンプルを受け入れるように構成された、サンプル適用領域；および試験領域を備える。この試験領域は、結合体供給源領域の下流に配置され、目的の分析物に特異的に結合可能な固定化結合剤を含む。例えば、目的の分析物が抗体である場合、ポジティブ試験領域は、好ましくは、固定化抗原を含む。目的の分析物が抗原である場合、ポジティブ試験領域が、好ましくは、固定化抗体を含む。結合体は、目的の分析物に結合し得る第1結合成分および第2視覚化成分を含む。

20

## 【 0 0 0 5 】

試験に使用されるサンプルは、任意の液体であり得る。好ましいサンプルとしては、例えば、血液、血清、血漿、唾液および尿が挙げられる。サンプルは、ポジティブ試験領域に適用され、続いて、結合体が、結合体供給源領域から流れる。結合体が、膜を横切って流れ、ポジティブ試験領域に結合された任意の分析物と接触して、可視シグナルを生じる。

## 【 0 0 0 6 】

好ましい実施形態において、試験片は、固定化HIV抗原を有する試験領域を備え、抗HIV抗体の検出のために使用される。この実施形態において、この試験は、患者のHIV感染の診断のために有用である。別の好ましい実施形態において、試験片は、固定化HCV抗原を有する試験領域を備え、サンプル中の抗HCV抗体の検出のために使用される。この実施形態において、この試験は、患者におけるHCV感染の診断に有用である。さらなる実施形態において、試験片は、固定化抗hCG抗体を有する試験領域を備える。この実施形態において、この試験は、固体が妊娠しているか否かを決定するのに有用である。

30

## 【 0 0 0 7 】

結合体供給源領域は、好ましくは、乾燥結合体を含む。例えば、この結合体供給源領域は、結合体が乾燥されている結合体パッドであり得る。この結合体パッドは、好ましくは、膜と流体連絡している。いくつかの実施形態において、この結合体パッドは、サンプル適用領域へのサンプルの添加の後に、膜と流体連絡するように移動する。別の実施形態において、結合体供給源領域は、結合体が乾燥している膜の一部である。

40

## 【 0 0 0 8 】

乾燥結合体は、好ましくは、再懸濁され、結合体供給源領域と洗浄緩衝液とを接触させることによって流される。1つの実施形態において、この洗浄緩衝液は、約0.1%遮断剤（好ましくは、カゼインのような遮断タンパク質）を含む。洗浄緩衝液はまた、好ましくは、約0.1%の界面活性剤（好ましくは、Triton X 100<sup>TM</sup>のような非イオン性界面活性剤）を含む。1つの実施形態において、洗浄緩衝液は、約0.025% H

50

E P E S、約 0.85% 塩化ナトリウム、約 0.1% E D T A、約 1% マンニトール、約 0.1% カゼインおよび約 1% T r i t o n X 1 0 0<sup>T M</sup> 界面活性剤を含む。

【0009】

さらなる実施形態において、結合体は、緩衝液中に懸濁される。結合体を含む緩衝液を結合体供給源領域に添加することによって、結合体は、試験領域に流れる。

【0010】

特定の実施形態において、結合体は、コロイド金に結合されたプロテイン A を含む。他の実施形態において、結合体は、コロイド金に結合した抗体（好ましくは、モノクローナル抗体）を含む。好ましくは、コロイド金は、約 20 ~ 約 80 ナノメートルの粒子サイズを有する。

10

【0011】

別の実施形態において、試験片は、さらに、試験領域の下流の膜上に配置されたコントロール領域をさらに備える。このコントロール領域は、好ましくは、この結合体に結合し得るコントロール結合剤を含む。例えば、目的の分析物が抗体であり、結合体がプロテイン A のような抗体結合剤を含む場合、コントロール結合剤は、ウサギ I g G であり得る。目的の分析物が抗原であり、結合体が抗原に特異的なモノクローナル抗体を含む場合、コントロール結合剤は、例えば、プロテイン A であり得る。

【0012】

試験片は、1つ以上のさらなる成分を含み得る。緩衝液パッドは、結合体供給源領域と流体連絡し得、その結果、洗浄緩衝液を緩衝液パッドに添加すると、結合体が、結合体供給源領域から、膜を横切って流れ、試験領域と接触する。吸収片および吸収剤パッドが、膜の下流に配置され得、膜を通過する場合に過剰の緩衝液を吸収する。乾燥剤もまた、過剰な液体および水分を吸収するために、膜の近くにあり得る。

20

【0013】

試験片は、必要に応じて、ハウジング（例えば、プラスチックハウジング）内に存在し得る。ハウジングは、好ましくは、試験領域およびコントロール領域の上に配置されるサンプルウィンドウ、および試験領域の上流に配置される緩衝液ウィンドウを備える。

【0014】

液体サンプル中の分析物を検出するための方法もまた提供され、この方法は、サンプルを膜の試験領域に適用する工程、および引き続いて、試験領域と目的の分析物に結合し得、結合を示す視覚的シグナルを提供する結合体とを接触させる工程を包含する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0015】

（好ましい実施形態の詳細な説明）

診断デバイスおよび診断方法が、サンプルにおける分析物の存在を迅速に決定するために、提供される。サンプル中の抗体または抗原の検出のための免疫診断デバイスに関して一般的に記載されるが、当業者は、本発明が、目的とする任意の分析物を検出するために容易に改変され得ることを、認識する。

【0016】

過去に、免疫診断デバイスは、代表的には、抗体の存在について分析されるべきサンプルと、結合体と事前混合することを伴った。例えば、いくつかのデバイスにおいて、乾燥した結合体が、液体サンプルを添加することによって溶解され、そのサンプルとその結合体との事前混合が可能になった。検出されるべき抗体は、そのような抗体が存在する場合には、上記結合体と結合した。それは、固定した抗原を含む下流試験領域において可視化された。しかし、この系において、上記結合体と、上記サンプル中の他の抗体または他の化合物との非特異的相互作用は、その結合体のシグナルの消滅をもたらした。結果として、大量の結合体が、必要であった。使用した結合体が大量であったことが原因で、その反応は、完了するのに長い時間がかかり、その試験の結果を得るための時間が延びた。さらに、その試験の感度は、可視的なポジティブシグナルを生じるためには、かなりの量の抗原がその試験領域において必要である程度であった。

40

50

## 【0017】

本発明は、上記試験領域を上記サンプルと直接接触させて、固定された結合剤に対して、目的とする何らかの分析物が特異的に結合するのを可能にすることによって、先行技術における問題を克服する。例えば、目的とする抗体は、固定された抗原に結合し得る。その後、結合体が、緩衝液とともに試験領域に供給される。その緩衝液の溶媒の先頭面は、その試験領域において結合していない結合体を押し出し、それによりその結合体との非特異的相互作用を減少させる。結果として、必要な結合体量が、有意に減少し、その反応速度が、それにより増加する。さらに、その反応の感度が、増加し、それにより、上記試験領域において、より少ない抗原しか使用しないことが可能になる。

## 【0018】

記載されるデバイスおよび方法は、例えば、患者において疾患または障害（例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）または肝炎ウイルス）を診断するために使用され得る。これらのデバイスおよび方法はまた、個体が妊娠しているか否かを決定するために使用され得る。他の使用は、下記の開示に基づいて当業者にとって明らかである。

## 【0019】

（定義）

他のように規定されない限り、本明細書中で使用されるすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の当業者によって一般的に理解されるのと同じ意味を有する。本明細書中に記載されるものと類似するかまたは等価である任意の方法、デバイス、および材料が、本発明の実施において使用され得る。

## 【0020】

「目的の分析物」とは、サンプルにおいてその存在が同定されるべき、任意の分子または化合物である。分析物としては、ウイルス抗原、細菌抗原、ホルモン（例えば、インスリン、卵胞刺激ホルモン（FSH）、甲状腺刺激ホルモン、レラキシン、ソマトトロピン、およびゴナドトロピン）、酵素、免疫グロブリン、サイトカイン、薬物、癌抗原、抗原性多糖、および核酸が挙げられ得るが、これらに限定されない。提供される方法および装置を使用してサンプル中で同定され得る他の分析物は、当業者にとって明らかである。目的とする特に好ましい分析物としては、抗HIV抗体、抗HCV抗体、およびヒト絨毛性腺刺激ホルモン（hCG）が挙げられる。

## 【0021】

用語「結合体」とは、目的の分析物に結合して検出可能なシグナルを生成するように構成された、組成物を指す。その結合体は、代表的には、標識に結合体化している結合成分を含む。その結合成分は、その結合体が、目的の分析物に結合し、必要に応じて、コントロール化合物に結合することを、可能にする。その標識は、検出可能なシグナル（好ましくは、視覚的シグナル）を生成する。一実施形態において、その視覚的シグナルは、その結合体が分析物に結合した際にのみ生成される。好ましい実施形態において、目的の分析物は、抗体であり、上記結合体は、抗体に結合することが可能な結合成分である。例えば、第一結合成分は、プロテインAであり得るが、抗体に結合することが可能な他の分子が、使用され得る。別の実施形態において、目的の分析物は、抗原であり、その結合体の結合成分は、その抗原に結合可能な抗体を含む。好ましくは、その抗体は、モノクローナル抗体である。

## 【0022】

その標識は、上記結合成分に付着または結合体化され得、かつ検出可能なシグナルを生成し得る、任意の分子または化合物である。好ましい標識は、コロイド状金である。あるいは、その標識は、例えば、染色ラテックス粒子、コロイド状銀もしくは他のコロイド状金属、コロイド状ブラック、または当該分野で公知の他の成分であり得る。好ましくは、その標識は、目的の分析物に結合成分が結合する能力に干渉しないような粒径を有する。例えば、その結合成分がプロテインAである場合、その標識は、好ましくは、約5nm～約120nm、より好ましくは約20nm～約80nmの粒径を有する。

## 【0023】

10

20

30

40

50

上記結合体は、好ましくは、その結合体を安定化させて保存し得る、「結合体緩衝液」中にて調製される。一実施形態において、結合体緩衝液中で調製された後、その結合体は、以下により詳細に記載されるように、「結合体パッド」上へと乾燥され得る。基材上へと乾燥される結合体は、「拡散可能に結合」していると見なされる。上記結合体は、その結合体が、例えば、緩衝液と接触することによって拡散または流動させられることが可能である場合に、「拡散可能に結合」している。例えば、乾燥によって結合体供給源領域に拡散可能に結合している結合体は、緩衝液を用いて可溶化され得、それにより、試験片の膜に沿って流動させられ得る。

**【0024】**

「コントロール結合体」は、その結合成分がコントロール化合物に特異的である、結合体である。コントロール結合体は、その結合体のすべてが試験線上の分析物に結合してコントロールとして役立つために利用できない可能性がある場合に、好ましくは使用される。そのコントロール化合物は、代表的には、分析されているサンプル中にあることが公知であり、かつコントロール縞 ( s t r i p e ) 上のコントロール結合剤に結合することが可能である、化合物である。必要に応じて、そのコントロール結合体の結合成分は、試験膜のコントロール領域中に存在する化合物にとって特異的であり得る。

10

**【0025】**

結合体は、好ましくは、「結合体供給源領域」に存在する。結合体供給源領域は、代表的に、この領域に拡散可能に結合された結合体 (例えば、乾燥結合体) を含む。あるいは、この結合体領域は、緩衝液 (例えば、洗浄緩衝液または結合体緩衝液) 中に懸濁された結合体を含み得る。1つの実施形態において、結合体供給源領域は、試験膜と流体連絡する結合体パッド (乾燥結合体を含む) である。別の実施形態において、結合体供給源領域は、結合体が乾燥された試験膜の一部である。さらなる実施形態において、結合体供給源領域は、試験膜と流体連絡している緩衝液パッドであり、この緩衝液パッドに、結合体を含む緩衝液が添加され得る。結合体供給源領域は、代表的に、試験膜上の試験領域の上流に配置され、その結果、結合体を含む溶液の添加の際または拡散可能に結合した結合体の可溶化の際に、結合体は、試験膜を横切って流れ、試験領域と接触する。

20

**【0026】**

結合体は、好ましくは、さらに以下に詳細に記載されるように、「洗浄緩衝液」を用いて可溶化される。簡単に述べると、洗浄緩衝液は、好ましくは「遮断剤 ( b l o c k i n g a g e n t ) 」を含む緩衝化溶液である。遮断剤は、当該分野で周知であり、非特異的相互作用 (例えば、非特異的抗体結合) を減少させる任意の分子または化合物を含む。好ましい遮断剤は、カゼインおよびウシ血清アルブミン ( B S A ) のようなタンパク質である。使用され得る他の遮断剤は、市販され、当業者に明らかである。

30

**【0027】**

「サンプル緩衝液」は、好ましくは結合体を含まない緩衝化溶液である。いくつかの実施形態において、サンプル緩衝液は、遮断剤を含むが、他の実施形態では遮断剤を含まない。サンプル緩衝液は、以下にさらに詳細に考察されるように、必要に応じて、サンプルの添加の前に膜に適用され得る。

**【0028】**

「試験膜」は、試験領域および必要に応じてコントロール領域を含む固体支持体である。分析されるサンプルは、代表的に、試験領域およびコントロール領域と接触するように、試験膜に直接適用される。試験膜は、分析物結合剤およびコントロール結合剤が結合され得る任意の固体支持体であり得る。好ましくは、試験膜は、ニトロセルロースである。

40

**【0029】**

試験膜は、液体に対して側流式経路を提供する。試験膜および試験片の他の成分は、液体 (例えば、液体サンプルまたは緩衝液) が1つの成分から別の成分に流れ得る場合、「流体連絡」していると言われる。試験片の成分が互いに接触している場合、これらは流体連絡している。しかし、当業者によって認識されるように、2つの特定の成分間の直接の接触は、流体連絡のために必要とされない。

50

## 【0030】

「試験領域」「試験片」および「試験ライン」は、相互に交換可能に使用され、分析物結合剤が結合する試験膜上の領域をいう。

## 【0031】

「分析物結合剤」、「特異的結合パートナー」または「結合成分」は、目的の分析物に特異的に結合するように構成される任意の分子または化合物である。例えば、制限ではなく、分析物結合剤は、抗原、抗体、レセプター、他のポリペプチド、ペプチド、ハプテン、レクチン、核酸（オリゴヌクレオチドを含む）、または低分子を含み得る。1つの実施形態において、分析物結合剤は、サンプルにおいて検出される抗体に特異的である抗原である。別の実施形態において、分析物結合化合物は、目的の抗原に特異的である抗体である。

10

## 【0032】

「コントロール領域」、「コントロール片」および「コントロールライン」は、相互に交換可能に使用され、コントロール結合剤が結合する膜上の領域をいう。

## 【0033】

「コントロール結合剤」は、結合体またはコントロール結合体に特異的に結合し得る任意の分子または化合物である。

## 【0034】

「試験片」は、サンプル中の分析物の存在を検出するために使用され得る完全な装置をいう。試験片は、好ましくは、少なくとも、試験領域およびコントロール領域を有する試験膜を含む。以下に記載されるように、試験片は、プラスチックハウジングのようなハウジング内に存在し得る。あるいは、試験片は、ハウジング無しで使用され得る。ハウジング内に存在する場合、試験片およびハウジングは、一緒に、「試験カード」と呼ばれ得る。

20

## 【0035】

「試験カードウインドウ」および「サンプルウインドウ」とは、サンプルが適用され得る試験カードのプラスチックハウジング内の穴をいう。試験カードウインドウは、好ましくは、試験領域およびコントロール領域の上に配置される。試験カードウインドウはまた、好ましくは、試験結果の視覚化を可能にする。

## 【0036】

「緩衝液ウインドウ」は、緩衝液が適用され得る試験カードのプラスチックハウジング内の穴をいう。1つの実施形態において、緩衝液ウインドウは、好ましくは、緩衝液が、緩衝液パッドに適用され得るよう配置される。別の実施形態において、緩衝液ウインドウは、試験膜への直接の緩衝液の適用を可能にするよう配置される。

30

## 【0037】

「容量インジケータウインドウ」とは、視覚化可能サンプル容量インジケータを見ることができ試験カードのプラスチックハウジング内の穴をいう。容量インジケータウインドウは、サンプルウインドウの下流に配置される。サンプル容量インジケータは、受容可能なサンプル容量が試験領域に接触したことのシグナルを出す。サンプル容量インジケータは、例えば、容量インジケータウインドウのすぐ上流の膜に適用されたメチレンブルーまたは他の着色化合物であり得る。サンプル容量インジケータウインドウは、サンプルの移動によって容量インジケータウインドウを横切って運ばれ、ウインドウの視覚的シグナルを生じる。他の実施形態において、サンプル容量インジケータは、サンプルと接触した場合に色を変化する化合物（例えば、pHインジケータ）である。代表的に、サンプル容量インジケータは、大きなサンプル容量が必要な場合（例えば、目的の分析物がサンプル中に低濃度で存在すると考えられる場合）に使用される。例えば、サンプル容量インジケータは、好ましくは、尿がhCGの存在について分析される場合に使用される。

40

## 【0038】

「サンプル」とは、目的の分析物の存在について分析される任意の物質をいう。サンプルは、好ましくは、液体形態である。例示的なサンプルとしては、制限されないが、全血

50

、血漿、血清、唾液および尿のような体液が挙げられる。以下にさらに詳細に説明されるように、サンプルは固体であり得る。しかし、この場合、サンプルは、好ましくは、試験において使用される前に可溶化されるかまたは抽出される。

【0039】

「サンプル適用領域」は、サンプルが適用される膜上の位置である。サンプル適用領域は、好ましくは、結合体供給源領域の下流および試験領域の上流に配置される。より好ましくは、サンプル適用領域は、試験領域を含む。サンプルは、サンプル適用領域に、直接的（例えば、ピペットによって）または間接的（膜と接触する芯（wick）を通して）に適用され得る。

【0040】

用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、例えば、所望の結合特異性を保持する限り、全抗体ならびに単鎖抗体、抗体フラグメント、およびキメラ抗体を含むが、これらに制限されない。

【0041】

（試験カード）

本明細書中に開示される診断デバイスは、好ましくは、図1～3に示されるように、試験カード1を含む。図1は、プラスチックハウジング10を備える試験カード1を示し、一緒にパチンと閉じられた上側部分15および下側部分18を有する。プラスチックハウジング10の上側部分15内に2つの開口部（サンプルウインドウ20および緩衝液ウインドウ30）が存在する。サンプルウインドウ20は、プラスチックハウジング10内に含まれる膜のサンプル適用領域へのサンプルの適用を可能にする。サンプル適用領域は、好ましくは、試験領域140を含む。コントロール領域150は、好ましくは、膜の試験領域140の下流に位置する。緩衝液ウインドウ30によって、結合体供給源領域50への緩衝液の適用が可能になる。膜は、以下に詳細に記載される試験片の一部である。

【0042】

さらなる任意の容量インジケータウインドウ（図示せず）が、いくつかの実施形態において試験領域の下流に配置される。容量インジケータウインドウによって、使用者は、存在する場合、試験領域の下流の膜上にインジケータを視覚化（例えば色変化）することを可能にする。インジケータが、十分な容量のサンプルが試験領域と接触していること、および使用者が（例えば、緩衝液を結合体供給源領域に適用することによって）以下に記載されるように、結合した分析物を検出するために試験領域と結合体を接触させることを進め得ることのシグナルを出す。

【0043】

図2は、試験カード1の上面図を示し、プラスチックハウジング10内のサンプルウインドウ20および緩衝液ウインドウ30を示す。膜140の試験領域は、サンプルウインドウ20を介してアクセス可能であり、結合体供給源領域50は、緩衝液ウインドウ30を通してアクセス可能である。コントロール領域150は、試験領域140の下流に位置する。矩形のサンプルウインドウ40および円形の緩衝液ウインドウ30を示しているが、ウインドウは、任意の形状またはサイズであり得る。しかし、これらは、好ましくは、サンプルを膜40のサンプル適用領域に、そして緩衝液を結合体供給源領域50に方向付けるような形状およびサイズである。さらに、サンプルウインドウは、試験領域140（ポジティブ試験結果が得られる場合）およびコントロール領域150の視覚化を可能にするように構成される。

【0044】

図3は、例示的な試験カード1の側面図を示す。プラスチックハウジング10の上側部分15および下側部分18を示す。緩衝液ウインドウ（図示しない）に対して遠位のプラスチックハウジング10の上側部分15の拡大端部（60）によって、吸収材料（例えば、試験カード（1）内の吸収剤パッドまたは乾燥錠剤）の配置を可能にする。拡大端部（60）のサイズは、使用される吸収材料の量に依存し、次いで、これは、試験に使用されるサンプルおよび緩衝液の容量に依存する。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 4 5 】

( 試 験 片 )

試験片は、少なくとも1つの試験領域を有する試験膜を備える。目的の分析物に特異的な分析物結合剤は、試験領域に結合されるかまたはそれ以外で固定される。試験領域の少なくとも一部は、目的の分析物がサンプル中に存在する場合、試験の完了時に可視化される。特定の実施形態において、試験領域は、固定化抗原を含み、そしてこの試験は、生物学的流体のようなサンプル中の特定の抗体の同定を可能にする。別の実施形態において、試験領域は、結合された抗体を含み、この試験は、サンプル中の特定の抗原の同定を可能にする。

## 【 0 0 4 6 】

サンプルを結合体供給源領域から下流（例えば、結合体パッドの下流）に位置するサンプル適用領域に適用する。好ましい実施形態において、サンプル適用領域は、試験領域を含む。しかし、他の実施形態において、サンプル適用領域は、試験領域の上流に配置され、サンプルは、サンプル適用領域から試験領域に流れる。

## 【 0 0 4 7 】

試験片の好ましい実施形態は、図4に示される。目的の分析物（例えば、抗体）の存在についてサンプルを試験するための試験片100は、好ましくは、結合体パッド120と接触する緩衝液パッド110を備える。結合体パッド120は、次いで、試験領域140およびコントロール領域150を備える試験膜130と接触する。この膜130は、次いで、吸収剤パッド160と接触する。吸収剤パッド160は、必要に応じて、さらなる吸収紙170と接触する。吸収剤パッド160および/または任意の吸収紙170は、任意の乾燥剤180（例えば、乾燥錠剤）とさらに接触し得る。

## 【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態において、除去可能なフィルターホルダー190が試験片100に結合される。フィルターホルダー190は、濾紙200を備える。フィルターホルダー190が試験片100に結合される場合、濾紙200は、サンプル適用領域上に直接配置され、これは、好ましくは、試験領域140およびコントロール領域150を備える。

## 【 0 0 4 9 】

分析物がサンプル中に存在する場合、試験の完了時に視覚的にポジティブな読みを確実にするために、十分なサンプルが試験領域に提供されなければならない。従って、サンプル中に低濃度であると推定される分析物（例えば、尿中のhCGのような抗原）について、より多くのサンプル容量が必要とされる。試験片100は、より多くのサンプル容量を受け入れるように構成され得る。1つのこのような実施形態は、図7に示され、ここでサンプルカップ500が試験片100に結合される。サンプルカップ500は、一定容量の液体サンプルを保持するための容器を備える。代表的には、サンプルカップは、サンプルがサンプルカップ500から流れ出て、試験膜130と接触することを可能にする底の開口部を有する。従って、サンプルカップ500は、サンプルがサンプルカップ500から試験膜130のサンプル適用領域に流れ、試験領域140およびコントロール領域150に接触するように、配置される。好ましくは、サンプル適用領域は、試験領域140およびコントロール領域150を備え、そしてサンプルカップ500は、試験領域140およびコントロール領域150上に直接配置される。サンプルカップ500は、必要に応じて、試験膜に接触する前に、サンプルが通過するフィルターを備え得る。

## 【 0 0 5 0 】

サンプルは、試験カードに結合される間、サンプルカップ内に堆積され得る。別の実施形態において、サンプルは、試験カップに配置され、そして試験カップは、引き続いて、試験カードに結合され、そしてサンプルがサンプル適用領域に流れ得る。

## 【 0 0 5 1 】

検出可能な量の分析物（存在する場合）を含む一定量のサンプルが、結合体が試験領域140に流れる前に、試験領域140に接触することを確実にすることが望ましい。試験領域140およびコントロール領域150の下流に配置される、サンプル容量インジケー

10

20

30

40

50

タ（例えば、インジケータ色素）を使用して、十分な量のサンプルが試験領域およびコントロール領域 150 に接触したことを決定し得る。例えば、インジケータ色素（例えば、メチレンブルー）は、試験膜の下流の吸収剤パッド 160 または吸収紙 170 に適用され得る。吸収剤パッド 160 または吸収紙 170 に沿った液体サンプルの流れによって、色素が、流れ、視覚化シグナル（例えば、可視青色）を作り出す。シグナルは、試験カードの容量インジケータウインドウ（図示せず）を通して観察され得る。

#### 【0052】

いくつかの実施形態（特に、大きなサンプル容量（約 50  $\mu$ l より多い）が適用される）において、結合体パッド 120 は、試験膜 130 と流体連絡していない。1つのこのような実施形態は図 7 に示される。結合体パッド 120 および試験膜 130 の分離は、サンプルが試験領域 140 に接触する前に、結合体およびサンプルが混合すること防ぐ。サンプルが試験領域 140 およびコントロール領域 150 に接触した後、結合体パッド 120 は、試験膜 130 と流体連絡するように動く。次いで、緩衝液を試験を開始するために、緩衝液パッド 110 に適用する。緩衝液は、緩衝液ウインドウを通して直接、または緩衝液を保持するアンブル 300 を破壊して、緩衝液を緩衝液パッド 110 に流すことによって、緩衝液パッド 110 に適用され得る。1つの実施形態において、緩衝液は、結合体パッド 120 が膜 130 と流体連絡するように移動する前に、緩衝液パッド 110 に適用される。代替の実施形態において、緩衝液は、結合体パッド 120 に直接適用される。

10

#### 【0053】

結合体パッド 120 が膜 130 と流体連絡するように移動される方法は、いかなる方法にも制限されない。1つの実施形態において、使用者が、結合体パッド 120 および必要に応じて緩衝液パッド 110 が結合するハウジングの可動部分をスライドさせ、従って、結合体パッド 120 を膜 130 に接触させる。結合体パッド 120 を試験膜 110 と流体連絡へと移動させるための機構はまた、好ましくは、緩衝液アンブル 300 を破壊する。この機構によってまた、サンプルカップ 500 が試験片 110 から除去され得る。

20

#### 【0054】

乾燥錠剤 180 は、好ましくは、吸収紙 170 と流体連絡している。乾燥錠剤 180 の大きさは、試験膜 130 に適用されるサンプルの全量を吸収し得るように選択される。乾燥剤および任意の他の吸収材料は、サンプル適用領域の下流に配置され、試験領域を横切るサンプルの流れを促進する。

30

#### 【0055】

他の実施形態において、サンプルカップは、液体サンプルと接触する芯と交換される。サンプルが、芯に沿って試験膜のサンプル適用領域に流れ、試験領域およびコントロール領域に接触する。特定の実施形態において、芯は、尿の流れに配置され、分析物（例えば、hCG）の存在について尿を分析する。これらの実施形態において、結合体パッドは、好ましくは、サンプルが芯に適用される時間の間、試験膜と流体連絡されない。十分なサンプルが試験領域と接触した後、結合体パッドは、試験膜と接触するように移動する。結合体パッドを移動するための機構はまた、芯を除去するために役立ち得る。引き続いて、緩衝液は、試験を開始するために、緩衝液パッドに添加されるか、または結合体パッドに直接添加される。緩衝液は、上記のように、緩衝液ウインドウを通して緩衝液パッドに直接添加され得る。あるいは、緩衝液は、試験カード内のアンブルに存在し、アンブルを破壊するかまたはそれ以外で開くことによって、緩衝液パッドおよび/または結合体パッドに流れる。

40

#### 【0056】

試験片は、好ましくは、図 2 に示され、上記されるように、ハウジング内に含まれる。

#### 【0057】

図 5 は、サンプル中の目的の分析物の存在を示す、ポジティブな試験結果を示す。膜 130 の試験領域 140 は、サンプルウインドウ 20 を横切る線として可視である。さらに、コントロール領域 150 は、サンプルウインドウ 20 を横切る線として可視であり、結合体供給源領域 50 から試験領域 140 を横切って流れたことを示す。対照的に、ネガテ

50

イブな結果は、図6に示される。ネガティブな結果では、コントロール領域150のみが、サンプルウインドウ20を横切る線として可視である。再び、コントロールは、結合体供給源領域50から試験領域140を横切って流れたことを示す。従って、試験領域140で線が無いことは、結合した目的の分析物が無いという結果である。

**【0058】**

(試験片の使用)

目的の分析物の存在について試験されるサンプルは、試験領域と接触するように、試験膜のサンプル適用領域に適用される。好ましい実施形態において、サンプルは、膜に適用され、結合体が試験領域に接触する前に、試験領域に接触し得る。従って、サンプル中の目的の分析物は、存在する場合、結合体の結合の前に、試験領域内の分析結合剤に結合する機会を有する。

10

**【0059】**

試験片がハウジング内にある場合、サンプルは、好ましくは、サンプルウインドウを通して適用される。この場合、この膜は、サンプルウインドウを通してアクセス可能なサンプル適用領域を備える。好ましくは、サンプル適用領域は、少なくとも1つのポジティブ試験領域を備える。より好ましくは、サンプル適用領域は、試験領域およびコントロール領域を備える。あるいは、サンプルは、芯またはカップを通して適用され得、その結果、サンプルは、膜のサンプル適用領域へと流れ、試験領域およびコントロール領域と接触する。

**【0060】**

試験片がハウジング内に存在しない場合、サンプルは、膜のサンプル適用領域(好ましくは、試験領域およびコントロール領域を含む)に直接適用され得る。あるいは、サンプルは、試験領域から上流のサンプル適用領域において膜に適用され得、そして試験領域に接触するように、膜を横切って流れ得る。しかし、好ましくは、サンプルは、膜への結合体の添加の前に、試験領域に接触し得る。

20

**【0061】**

1つの実施形態において、サンプルは、サンプルカップに収集されるかまたは配置される。カップは、ハウジングに結合され、サンプルが、膜のサンプル適用領域に流れ得、試験領域およびコントロール領域と接触する。サンプルカップは、好ましくは、約10 $\mu$ lを越えるサンプル容量が使用される場合に使用される。サンプルカップは、必要に応じて、膜に接触する前に、サンプルが通過するフィルターを備える。

30

**【0062】**

さらなる実施形態において、サンプルは、膜と接触する芯に適用される。芯によって、サンプルは、膜のサンプル適用領域に進み、試験領域およびコントロール領域に接触する。芯は、好ましくは、ガラス紙、ポリエステル、セルロース、またはサンプルが試験領域を含む膜に移動することを可能にする別の材料から構成される。試験カードがハウジング内にある場合、芯は、ハウジングから突出し得、サンプルの適用のために芯へとアクセス可能である。例えば、特定の分析物の存在が尿中で決定される(例えば、hCG)場合、芯は、試験される被験体の尿の流れ内に配置され得る。別の実施形態において、芯は、分析されるサンプル(例えば、唾液のような体液)と接触し得る。

40

**【0063】**

試験されるサンプルは、好ましくは、液体形態の膜のサンプル適用領域に適用される。分析され得る例示的なサンプルとしては、限定されないが、血清、血漿、全血、唾液および尿が挙げられる。固体または半固体のサンプルは、適用の前に可溶化され、膜に適用されるかまたは抽出され得る。

**【0064】**

他の実施形態において、好ましくは、結合体を含まないサンプル緩衝液が、サンプルの適用の前に膜に適用される。いくつかの実施形態において、サンプル緩衝液は、遮断剤を含む。好ましくは、サンプル緩衝液は、サンプル適用領域において膜に適用される。1~25 $\mu$ lのサンプル緩衝液が、好ましくは、膜に適用され、より好ましくは、約1~約1

50

0  $\mu$  l、なおより好ましくは、約 1 ~ 5  $\mu$  l が適用される。特定の実施形態において、5  $\mu$  l のサンプル緩衝液は、膜のサンプル適用領域に適用され、続いて、5  $\mu$  l の血清、血漿、全血または他の液体サンプルが適用される。洗浄緩衝液の適用の前のサンプル緩衝液の添加は、以下に記載されるように、H C V の試験においておよび粘性のあるサンプルが使用される場合に、特に好ましい。サンプル緩衝液の使用は、試験の感度を増加し、粘性のあるサンプルをより速く流す。

**【0065】**

サンプル緩衝液は、好ましくは、緩衝化剤および保存剤を含む。必要に応じて、サンプル緩衝液はまた、1つ以上の洗浄剤および/または糖を含み得る。任意の緩衝化剤が、好ましくは、サンプル緩衝液の所望の pH を維持する量で使用され得る。好ましくは、サンプル緩衝液の pH は、約 7.2 ~ 約 7.6 である。例えば、制限されないが、緩衝液は、H E P E S、T r i s およびリン酸緩衝液からなる群より選択され得る。好ましい実施形態において、サンプル緩衝液は、約 0.01% ~ 約 0.5% の H E P E S、より好ましくは、約 0.02 ~ 約 0.05% の H E P E S を含む。別の実施形態において、サンプル緩衝液は、約 0.01% ~ 約 0.5% のホスフェート、より好ましくは、約 0.02 ~ 約 0.05% のホスフェートを含む。当業者は、所望の pH を維持するために、緩衝化剤の量を調節し得る。

10

**【0066】**

サンプル緩衝液はまた、好ましくは、アジ化ナトリウムまたは P r o c l i n のような保存剤を含む。好ましい実施形態において、サンプル緩衝液は、約 0.1% ~ 約 1.0% のアジ化ナトリウム、より好ましくは、約 0.1% ~ 約 0.2%、なおより好ましくは約 0.2% のアジ化ナトリウムを含む。

20

**【0067】**

試験されるサンプルの性質に依存して、サンプルは、必要に応じて、フィルターを通して膜に適用される。好ましくは濾過される例示的なサンプルとしては、全血、糞便サンプル、尿、食物抽出物およびゴミ ( d i r t ) 抽出物が挙げられる。1つの実施形態において、全血は、膜フィルターを通して適用される。フィルターは、混入物を除き、分析物 (例えば、抗体) の通過を可能にし、従って、試験の感度を増加する。フィルターは、好ましくは、必要に応じて、試験カードまたは試験片に結合され得るホルダーに収容される。試験カードに結合される場合、フィルターは、好ましくは、サンプルウインドウのすぐ上に結合される。フィルター媒体は、濾過されるサンプルの型に基づいて選択される。このような選択は、当業者の能力の範囲内である。例えば、全血サンプルについて、フィルター材料は、制限されないが、P a l l B T S - S P 3 0 0 <sup>T M</sup> であり得る。

30

**【0068】**

上で考察されるように、フィルターは、好ましくは、除去可能なフィルターホルダーによって試験片に結合されるが、特定の適用について、フィルターは、永久的に固着され得る。フィルターホルダーは、代表的に、試験カードのハウジング上にパチンと閉じられたデバイスである。このデバイスの設計および型は、変動し得るが、代表的には、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレンまたは他のプラスチックから形成される。

**【0069】**

試験領域は、目的の分析物の特異的結合を可能にする結合剤 (好ましくはタンパク質) でコーティングされた膜の一部である。例えば、ポジティブ試験領域は、目的の抗体に対して特異的な抗原でコーティングされ得る。特定の実施形態において、試験領域は、以下の実施例にさらに詳細に記載されるような、結合 H I V 抗原または肝炎抗原を含む。試験領域が抗原を含む場合、好ましくは、約 0.025 ~ 約 0.4  $\mu$  g の抗原が使用される。

40

**【0070】**

他の実施形態において、目的の抗原に特異的な抗体が、試験領域に固定される。抗体は、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体であり得る。試験領域が抗体を含む場合、好ましくは、約 0.1 ~ 約 20  $\mu$  g の抗体が適用され、より好ましくは、約 0.2 ~ 約 2  $\mu$  g、さらにより好ましくは約 0.5 ~ 約 1  $\mu$  g が適用される。特定の実施形態におい

50

て、試験領域は、hCGに対する抗体（好ましくは、hCGに対するモノクローナル抗体）を含む。

【0071】

結合剤は、任意の所望のパターンで膜に適用され得る；従って、ポジティブ試験の可視的結果は、任意の形状であり得る。好ましい実施形態において、試験領域は、線形であり、膜の1つの側から他の側に延びる線を形成し、その結果、ポジティブな結果が得られる場合、垂直な線が、サンプルウインドウを横切って現れ、サンプル中の分析物の存在を示す。他の実施形態において、試験領域は、「+」のような記号のように形付けられる。

【0072】

単一の試験片において1つより多くの型の分析物を試験することが可能である。この場合において、さらなるポジティブ試験領域は、試験膜で調製される。例えば、第2のポジティブ試験領域は、第2の型の抗体に対する抗原または第2の型の抗原に対する抗体を含み得る。さらなるポジティブ試験領域における結合剤は、最初の試験領域における結合剤と必ずしも同じ型ではない。従って、第1の試験領域における結合剤が抗体であり得、一方、第2の試験領域の結合剤が抗原であり得る。このようにして、サンプルは、1つより多くの型の分析物の存在について分析され得る。

10

【0073】

各さらなるポジティブ試験領域は、上記第1の試験領域とは異なる形状であり得、使用者にそのポジティブな結果の本性を容易に区別することを可能にし得る。試験されようとするさらなる分析物の型に依存して、種々の分析物を結合するさらなる結合体が必要であり得る。例えば、目的の分析物が2つの異なる抗体である場合、プロテインAを含む単一の結合体を使用され得る。しかし、1つの分析物が抗体であり、第2の分析物が抗原である場合、2つの異なる結合体が必要とされ、その1つは特異的にその抗体に結合する結合体であり、1つはその抗原に特異的に結合する結合体である。

20

【0074】

コントロール領域（control area）は、好ましくは、その結合体に結合するコントロール結合剤を含む。そのコントロール領域を上記ポジティブ試験領域の下流に配置することにより、このコントロール領域での反応は、その結合体がこの試験領域を過ぎて移動したことを示す。なぜなら、そのコントロール領域では、目的の分析物が存在していれば、その結合体は、反応するために利用可能であったからである。その結合体が、抗体を認識するよう設計される場合、そのコントロール領域は、好ましくは、ウサギIgGのような免疫グロブリンを含む。その結合体が抗体を含む場合、そのコントロール領域は、好ましくは、プロテインAのような抗体結合剤を含む。そのコントロール領域は、任意の所望の形状（例えば、線または符号（例えば「-」））であり得る。

30

【0075】

他の実施形態では、上記コントロール領域は、コントロール結合体に結合するコントロール結合剤を含む。例えば、そのコントロール領域は、-galを含み得、そしてそのコントロール結合体が、金に結合した -ガラクトシダーゼを含み得る。

【0076】

その結合剤およびコントロール結合剤は、当該分野で公知の任意の方法により試験膜に付与され得る。それらは、代表的には、ポンプ分配システムを用いてその試験膜にスプレーするか、または接触させるかのように、その試験膜を上記結合剤と接触させることにより、付与され得る。このようなシステムは、例えば、Kinematic Automationから市販されている。

40

【0077】

そのサンプルが、上記試験領域に接触する場合、目的の分析物がそのサンプル中に存在していれば、それは試験領域で、その結合剤と結合する。過剰の未結合の分析物は、以下に示されるように、その膜に沿っての緩衝液の移動により、試験領域から洗い去られる。

【0078】

そのサンプルが、その膜に付与されると、洗浄緩衝液が、試験膜に付与される。好まし

50

くは、約1～約20滴、より好ましくは約1～5滴の洗浄緩衝液が最初に付与される。その反応物を透明にするために必要ならば、さらなる洗浄緩衝液が、その後、付与され得る。

#### 【0079】

上記洗浄緩衝液は、好ましくは、上記結合体を上記試験領域へ運ぶ。洗浄緩衝液は、上記試験膜に直接付与され得る。しかし、好ましい実施形態では、洗浄緩衝液は、上流緩衝液パッドに付与され、そこから洗浄緩衝液が試験膜に流れる。その緩衝液パッドは、その緩衝液を含み得、そして洗浄緩衝液が所望の速度で上記膜へ流れることを可能にし得る任意の材料から作製され得る。例えば、その緩衝液パッドは、ガラス紙、セルロースおよびポリエステルからなる群より選択される1つ以上の材料から構成され得る。好ましい実施形態では、その緩衝液パッドは、Whatman GF/DVAガラス紙である。当業者は、上記側流式試験細片のハウジングの設計、所望の流量、およびその緩衝液パッドによって保持されるべき緩衝液の量のような因子に基づき、上記緩衝液パッドについての適切な材料を選択し得る。

10

#### 【0080】

この洗浄緩衝液は、例えば、ピペットまたは点滴器を用いて、この緩衝液パッドに直接付与され得る。しかし、別の実施形態では、適切な量の洗浄緩衝液が、この緩衝液パッドに隣接している容器中に存在している。例えば、この洗浄緩衝液は、ガラスアンプルまたはプラスチックアンプル中に含まれ得る。試験サンプルの添加に続いて、この洗浄緩衝液を含む容器が割られるかまたは別なやり方で開けられ、この洗浄緩衝液がその緩衝液パッドに接触することを可能にする。

20

#### 【0081】

この洗浄緩衝液の組成は、その試験の感度を高めるために変更され得る。好ましくは、この洗浄緩衝液は、緩衝剤、保存剤、洗浄剤、糖類およびバックグラウンド結合および/または非特異的結合を低減する作用をする他の物質を含む。

#### 【0082】

その緩衝液の所望のpH、好ましくは約7.2～約7.6を維持する任意の緩衝液が使用され得る。例えば、そして限定ではなく、その緩衝液は、HEPES、Tris、およびリン酸緩衝液からなる群より選択され得る。好ましい実施形態では、この洗浄緩衝液は、約0.01%～約0.5%のHEPES、より好ましくは約0.02～0.2%のHEPES、そしてさらにより好ましくは約0.02～0.05%のHEPESを含む。特に好ましい実施形態では、上記洗浄緩衝液は、0.025%のHEPESを含む。

30

#### 【0083】

この洗浄緩衝液はまた、保存剤（例えば、アジ化ナトリウムまたはProclin）を含む。好ましい実施形態では、この洗浄緩衝液は、約0.1～約0.5%のアジ化ナトリウム、より好ましくは約0.1～約0.2%のアジ化ナトリウムを含む。

#### 【0084】

塩化ナトリウムまたは同等の塩は、好ましくは約1%、より好ましくは約0.85%の濃度で存在する。EDTAは、好ましくは約0.1%の濃度で存在し得る。糖類（例えば、マンニトール）もまた、存在し得る。好ましいマンニトール濃度は、約1%～約5%である。好ましい実施形態では、そのマンニトール濃度は、約1%である。

40

#### 【0085】

遮断剤が、好ましくは上記洗浄緩衝液中にさらに存在する。この遮断剤は、当該分野で公知の任意の遮断剤であり得る。好ましくは、この遮断剤は、タンパク質（例えば、カゼインまたはウシ血清アルブミン（BSA））である。この遮断剤は、好ましくは、この洗浄緩衝液中に、約0.01～約0.5%、より好ましくは約0.02～0.2%の濃度で存在する。特に好ましい実施形態では、カゼインが、この洗浄緩衝液中に、約0.1%の濃度で存在し得る。

#### 【0086】

この洗浄緩衝液はまた、代表的には、洗浄剤、好ましくは非イオン性洗浄剤（例えば、

50

T r i t o n X 1 0 0 <sup>T M</sup> または T w e e n ) を含む。好ましくは、その洗浄剤は、好ましくは、この洗浄緩衝液中に、約 0.05 ~ 約 1%、より好ましくは約 0.1 ~ 0.5% の濃度で存在する。特に好ましい実施形態では、その洗浄緩衝液は、T r i t o n X 1 0 0 を、約 0.1% の濃度で含む。

【0087】

この洗浄緩衝液の pH は、約 7 と 8 との間、より好ましくは約 7.2 と 7.6 との間調整される。特に好ましい実施形態では、その洗浄緩衝液の pH は、約 7.2 である。

【0088】

試験片はまた、結合体供給源領域を備える。好ましい実施形態では、以下に記載されるように、その試験片は、結合体パッドを備え、そこに結合体が乾燥されている。洗浄緩衝液が、上記緩衝液パッドからこの結合体パッドに流れ、その洗浄緩衝液がこの結合体と接触する。この結合体パッドは、今度は、試験膜と接触している。しかし、いくつかの実施形態では、この結合体パッドは、上記サンプルの添加の後でその膜と接触するようにされる。特に、大容量のサンプルが使用される場合、好ましくは、そのサンプルがその試験領域に接触したあとで、この結合体パッドが、その膜と接触するようにされる。

10

【0089】

十分な洗浄緩衝液が、上記緩衝液パッドに付与され、拡散可能なようにその結合体パッドに結合された結合体を溶解させ、その結合体を試験膜に沿って、試験ラインおよびコントロールラインへ流す。使用されるべき緩衝液の量は、その結合体パッドに結合された結合体の量、膜の寸法および分析されようとするサンプルの量のような因子に基づいて、当業者によって決定され得る。好ましくは、上記緩衝液パッドが約 2 cm x 5 mm である場合、約 1 ~ 10 滴の緩衝溶液、より好ましくは約 2 ~ 5 滴、そしてさらにより好ましくは 3 ~ 4 滴の緩衝溶液がこの緩衝液パッド付与される。

20

【0090】

代替の実施形態では、結合体パッドは存在しない。1つの代替の実施形態では、上記結合体は、上記洗浄緩衝液中に、約 0.2 OD ~ 約 1.0 OD / ml の範囲の濃度で存在する。その結合体を含む洗浄緩衝液は、上記緩衝液パッドに付与され得る。従って、その結合体は、洗浄緩衝液とともにこの緩衝液パッドから上記膜へ流れ、その膜で、その結合体は試験領域およびコントロール領域と接触する。別の実施形態では、結合体を含む洗浄緩衝液が、直接試験膜に付与される。その結合体を含む洗浄緩衝液は、サンプル中に存在し得、そのサンプルを割るかまたは別なやり方で開けることにより、上記膜へ流され得る。その結合体を含む洗浄緩衝液は、好ましくは、試験領域の上流の地点で、その膜に付与される。しかし、いくつかの実施形態では、結合体を含む洗浄緩衝液は、サンプルが付与された後に、直接にその試験領域に付与される。

30

【0091】

別の実施形態では、その結合体は、試験領域およびコントロール領域を備える膜に、拡散可能に（例えば、乾燥により）直接結合される。洗浄緩衝液が、次いでその膜と接触している緩衝液パッドに付与され得るか、またはその試験膜に直接付与され得る。この洗浄緩衝液は、乾燥した結合体を溶解し、それを試験膜に沿って試験領域およびコントロール領域へ運ぶ。

40

【0092】

結合体を含む洗浄緩衝液は、好ましくは、サンプルが付与され、サンプル中に存在する任意の分析物が固定化された結合剤と結合する機会を得た後で、上記試験領域と接する。従って、この洗浄緩衝液は、好ましくは、試験領域へのサンプルの付与の後で、試験片に付与される。

【0093】

上に詳細に記載された結合体は、試験での使用のために、結合体緩衝液中の希釈により調製される。好ましくは、作用結合体は、結合体を、結合体緩衝液中に約 3 OD / ml に希釈することにより調製される。この結合体緩衝液の組成は、その結合体の性質に依存して変更され得る。例示的な結合体緩衝液は、H E P E S、T r i s、リン酸緩衝液または

50

当該分野で公知の他の類似の緩衝液のような緩衝液を含む。好ましい結合体緩衝液は、約 0.02 ~ 約 0.2 % の H E P E S 緩衝液、より好ましくは約 0.025 % の H E P E S 緩衝液を含む。その結合体緩衝液はまた、塩、好ましくは塩化ナトリウムを含み得る。塩化ナトリウムは、約 0.1 %、より好ましくは約 0.85 % の濃度で添加される。保存剤（例えば、アジ化ナトリウムまたは P r o c l i n）もまた、その結合体緩衝液中に約 0.1 ~ 約 0.2 % の濃度で含まれ得る。

【0094】

この結合体緩衝液は、好ましくは、E D T A（約 0.1 %）、約 0.02 ~ 0.2 %、より好ましくは約 0.15 % の濃度のカゼイン、約 0.5 ~ 約 3 %、より好ましくは約 1 % の濃度のウシ血清アルブミン（B S A）、約 1 ~ 約 5 %、より好ましくは約 1 % の濃度のマンニトール、約 1 ~ 約 5 %、より好ましくは約 1 % の濃度のスクロースを含む。T r i t o n X 1 0 0 はまた、好ましくは約 0.1 ~ 0.5 %、より好ましくは約 0.1 % の濃度でこの緩衝液に含まれ得る。

10

【0095】

この結合体緩衝液は、好ましくは、約 7.2 ~ 7.6、より好ましくは約 7.2 の p H に調整される。

【0096】

1つの実施形態では、結合体緩衝液中での結合体の希釈による作用結合体の調製に続いて、この作用結合体は、例えば真空乾燥により結合体パッド上で乾燥される。この結合体パッドは、好ましくは、試験片での使用のために適切な寸法の片に裁断される。以下の実施例では、この結合体パッドは、5 mm x 5 mm 片に裁断される。

20

【0097】

この結合体パッドは、好ましくは、ガラス繊維、ガラス紙、ポリエステルまたはセルロース紙から構成される。このような材料は、当該分野で周知であり、例えば、M i l l i p o r e、S & S および W h a t m a n から入手可能である。好ましい実施形態では、この結合体パッドは、市販のガラス繊維結合体パッド G F C P 2 0 3 0 0 0（M i l l i p o r e）である。

【0098】

上記のように、上記洗浄緩衝液は、乾燥した結合体を溶解し、それを結合体パッドから試験膜に沿って試験領域およびコントロール領域を過ぎて流す。

30

【0099】

この試験膜は、タンパク質または他の結合剤が、共有結合によるかまたは非共有結合により結合され得る任意の材料であり得、そしてその材料に沿って結合体が洗浄緩衝液とともに流れ得る。この試験膜は、好ましくはニトロセルロース膜である。より高流量またはより低流量を伴う他の膜は、所望の感度ならびに試験時間および費用のような因子に基づき、当業者により、試験膜としての使用のために選択され得る。

【0100】

上記結合体が洗浄緩衝液とともに膜を横切って流れるにつれて、それは試験領域と接触する。目的の分析物が存在し、この試験領域で結合剤に結合されていると、緩衝液中の結合体は、その分析物に結合する。

40

【0101】

試験領域で結合しない結合体を含む洗浄緩衝液は、膜を横切ってコントロール領域まで流れ続ける。結合体は、コントロール結合剤に結合する。この洗浄緩衝液はまた、未結合のサンプルを、試験領域およびコントロール領域から運ぶ。

【0102】

未結合の結合体および未結合のサンプルを含む洗浄緩衝液は、次いで上記膜の下流端に接触している吸収剤パッドへ流れる。この吸収剤パッドは、当該分野で公知の任意の吸収剤材料から作製され得る。好ましくは、この吸収剤パッドは、吸収紙（例えば、S & S 9 0 0<sup>T M</sup>紙）である。他の吸収紙は、当該分野で周知であり、この試験片の最終の配置に依存して、当業者により選ばれ得る。

50

## 【0103】

上記洗浄緩衝液は、この吸収剤パッドを通り、そしてこの吸収剤パッドに接触している吸収紙の中へ流れ続ける。大容量の緩衝液が吸収されねばならない場合、この吸収紙が、好ましく使用される。

## 【0104】

モレキュラーシーブ乾燥剤タブレットもまた、この試験片に組込まれ得る。1つの実施形態では、未結合の結合体を伴う緩衝液は、吸収紙からその紙が接触している乾燥剤タブレットに流れる。この乾燥剤タブレットは、吸収された流体を保持し、そして試験片への逆流を防止する。

## 【0105】

この乾燥剤タブレットはまた、使用前にこの試験片を乾燥状態に保つ。好ましい乾燥剤タブレットは、Sud-Chemieから入手可能な0.395g.Tri-Sorbタブレット(製品番号43-01)である。

10

## 【0106】

当業者は、この試験片の最終の配置(サンプルおよび使用されようとする緩衝液の総容量を含む)に依存して、上記吸収剤パッド、吸収紙および乾燥剤タブレットのための適切な寸法および材料を選択し得る。

## 【0107】

この試験片全体は、好ましくは、ハウジング(例えば、プラスチック製ハウジング)内に収容される。上記のように、1つの実施形態では、このハウジングは、サンプルウインドウを備え、それを通してサンプルは、試験領域およびコントロール領域を備える膜に添加され得る。このハウジングはまた、緩衝液ウインドウを備え得、それを通して緩衝液パッドまたは上記膜に緩衝液が付与され得る。このハウジングはまた、容量インジケータウインドウを備え得、それを通して、十分なサンプル容量が試験領域と接触していることを示すシグナルが目視され得る。十分なサンプル容量は、その分析物がサンプル中に存在する場合、その試験の完了時に試験領域で可視シグナルが生成されるに十分な目的の分析物(存在する場合)を含むと見積もられる容量である。例えば、尿中のhCGを検出するための試験については、十分量は、200 $\mu$ lの尿である。

20

## 【0108】

試験の結果は、好ましくは、その試験片への洗浄緩衝液の添加の約1~約5分後に読み取られる。1つの実施形態では、結果は、洗浄緩衝液の添加の約2~4分後、より好ましくは約3~4分後に読み取られる。特に好ましい実施形態では、結果は、洗浄緩衝液の添加の1分後に読み取られる。図7に示すように、ポジティブの結果に対しては、試験ライン(300)が見えるようになる。可視コントロール縞(400)は、その試験が正しく機能したことを示す。図6に図示されるように、そのコントロールライン(400)が見えるが試験ラインが見えない場合、ネガティブの結果が示される。

30

## 【実施例】

## 【0109】

(実施例1 HIV試験カードの作製)

ヒト免疫不全ウイルスに対する抗体の検出のための側流式迅速視覚化試験を調製した。この試験片の配置は、本質的に図1に図示されたとおりである。

40

## 【0110】

この試験片は、両側に接着剤を塗布したプラスチック製裏材料(6cm $\times$ 5mm)を備えた。このプラスチック製裏材料は、厚みが2milと20milとの間であった。

## 【0111】

試験ラインおよびコントロールラインを、ポンプ分配システム(Kinematic Automation)を用いてスプレーすることにより、ニトロセルロース膜(Millipore HF09004)上に調製した。この試験ラインは、HIV抗原の縦の線を備えた。このHIV抗原は、5%トレハロースを含むPBS中で調製した、約0.5~約1.0mg/mlの濃度の、HIV-1組換え型糖タンパク質抗原(GP120(約0

50

・15 mg/ml) および P24 (約0.1 mg/ml) ) ならびに HIV-2 組換え型糖タンパク質抗原 (GP36 (約0.5 mg/ml) ) の混合物であった。約0.1 ~ 約0.5 µg の総量の抗原を縦ラインの試験領域に付与した。

【0112】

単独の HIV-1 または HIV-2 抗原をその試験ラインに含む他の試験片を、調製した。

【0113】

全ての試験片について、コントロール領域は、垂直線状のコントロール抗体を含んだ。このコントロール抗体は、5%トレハロースを含むPBS中で1 mg/mlになるまで希釈したウサギIgGであった。結合体が結合する際に可視的なコントロール線を生じるために十分な総量のコントロール抗原を、コントロール領域に適用した。 10

【0114】

各試験片について、適切なニトロセルロース膜を、約2.5 cm x 5 mmの大きさまで切断し、プラスチックの裏打ちに付着した。

【0115】

コロイド状金に付着しているプロテインA (Sigmaから市販されている) を、この試験のための結合体として使用した。この結合体を、結合体緩衝液中で約3 OD/mlの濃度まで希釈した。その結合体緩衝液は、0.25% HEPES、0.85% 塩化ナトリウム、0.1% アジ化ナトリウム、0.1% EDTA、0.1% カゼイン、1% ウシ血清アルブミン、1% マンニトール、5% スクロース、および0.1% Triton X 100を含んだ。この緩衝液を、pH 7.2になるように調整した。 20

【0116】

結合体を、ガラス繊維結合体パッド (Millipore GFCP203000) に適用した。これを、乾燥させて、5 mm x 5 mmの片になるように切断した。片を、各試験片の試験領域に最も近いニトロセルロース膜の端部に付着した。

【0117】

その後、Whatman GF/DVAガラスペーパー緩衝液パッド (2 cm x 5 mm) を、各試験片の乾燥した結合体パッドに付着させて、緩衝液パッドとして役立てた。

【0118】

S & S 900ペーパー製の吸収剤パッド (2 cm x 5 mm) を、コントロール領域に最も近いニトロセルロース膜の端部に付着し、さらなる吸収紙 (2.5 cm x 5 mm; S & S 470) を、この吸収剤パッドに付着した。その後、この吸収紙を、0.395 gの乾燥剤錠剤 (Tri-Sorb, Sud-Chemie) と接触させた。 30

【0119】

その試験片を、プラスチックハウジング中に配置し、図1~6に示されるのと同様の試験カードを作製した。このプラスチックハウジング (10) は、試験領域 (140) とコントロール領域 (150) とを露出している試験ウィンドウ (20)、ならびに緩衝液パッドのすぐ上にある緩衝液ウィンドウ (30) を含んだ。このプラスチックハウジングはまた、試験線およびコントロール線の位置を示すように印がついていた。

【0120】

この試験カードを、個別にホイル中に包装した。 40

【0121】

(実施例2: HIVについての試験)

血清または血漿を、適切な静脈穿刺技術を使用して、HIVについて試験すべき患者から得た全血サンプルから調製した。サンプルを、2 ~ 8 にて保存して24時間以内に使用するか、または-20 にて凍結して2週間以内に使用した。凍結サンプルを、使用前に融解した。

【0122】

実施例1に記載されるようなHIV試験カードを、上記のホイルパックから取り出した。このHIV試験カードは、コントロール領域上にHIV-1抗原とHIV-2抗原との 50

混合物を含んだ。

【0123】

0.025% HEPESと0.2%アジ化ナトリウムとを含む、約5 $\mu$ Lのサンプル緩衝液を、試験カードウィンドウの中心を通して上記膜に適用した。

【0124】

試験すべき血清または血漿を含むサンプルピペットを、上記試験カード上の試験ウィンドウの上の垂直位置において保持し、5 $\mu$ Lのサンプルを、そのウィンドウの中心にある膜上に配置した。

【0125】

4滴の洗浄緩衝液(0.025% HEPES、0.85%塩化ナトリウム、0.1% EDTA、1%マンニトール、0.1%カゼイン、1% Triton X100、pH7.2)を、この緩衝液パッドに添加した。3分間後に、この反応が完了しなかった場合には、さらに1滴の緩衝液を、この緩衝液パッドに添加した。 10

【0126】

この試験の結果を、最初の緩衝液を添加した1分間後～5分間後に読取った。

【0127】

図5に示されるように、ポジティブの結果は、サンプルウィンドウを通る2つの可視的な線(試験線(140)およびコントロール線(150))を含む。2つの線が眼に見える場合には、それらの線の一方が他方よりも暗い場合でさえ、ポジティブの結果が、得られる。ネガティブの結果は、図6に示されるように、サンプルウィンドウを通る1本のコントロール線によって示される。 20

【0128】

(実施例3: HCV試験カード)

C型肝炎ウイルスの診断のための試験片を、実施例1においてのように調製した。しかし、コア(0.3mg/ml)と、NS3(0.4mg/ml)と、NS4(0.1mg/ml)とを含む、C型肝炎抗原混合物(HIV抗原ではない)を、上記膜上の試験線中に噴霧して、試験領域を作製した。合計約0.4 $\mu$ gのHCV抗原混合物を、試験線に適用した。1mg/mlになるように希釈したウサギIgGを、コントロール線に噴霧した。

【0129】

(実施例4: HCVについての試験)

実施例3に記載されるようなHCV試験カードを、上記のホイルパックから取り出した。このHCV試験カードは、試験領域上にHCV抗原を含んだ。

【0130】

リン酸緩衝液と0.2%アジ化ナトリウムとを含む、約5 $\mu$ Lのサンプル緩衝液を、試験カードウィンドウの中心を通して上記膜に適用した。

【0131】

血清または血漿を、全血サンプルから調製した。試験すべき血清または血漿を含むサンプルピペットを、上記試験カード上の試験ウィンドウの上の垂直位置において保持し、5 $\mu$ Lのサンプルを、そのウィンドウの中心にある膜上に配置した。 40

【0132】

4滴の洗浄緩衝液(0.025%リン酸塩、0.85%塩化ナトリウム、0.1% EDTA、1%マンニトール、0.1%カゼイン、1% Triton X100、pH7.2)を、この緩衝液パッドに添加した。3分間後に、この反応が完了しなかった場合には、さらに2滴の緩衝液を、この緩衝液パッドに添加した。

【0133】

この試験の結果を、最初の緩衝液を添加した1分間後～5分間後に読取った。

【0134】

図5に示されるように、ポジティブの結果は、サンプルウィンドウを通る2つの可視的な線(試験線(140)およびコントロール線(150))を含む。2つの線が眼に見え 50

る場合には、それらの線の一方が他方よりも暗い場合でさえ、ポジティブの結果が、得られる。ネガティブの結果は、図6に示されるように、サンプルウィンドウを通る1本のコントロール線によって示される。

【0135】

(実施例5：妊娠試験)

側流式視覚的高速妊娠試験を、調製する。その試験片の配置は、本質的に実施例7に示される通りである。

【0136】

各試験片は、両面に接着剤を有するプラスチック製裏打ち(6cm×5mm)を含む。このプラスチック製裏打ちは、厚さが、約2milと約20milとの間である。

10

【0137】

試験線およびコントロール線を、ポンプ分配系(Kinematic Automation)を用いて噴霧することによって、ニトロセルロース膜(Millipore HF09004)上に調製する。その試験線は、ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)に対する抗体(好ましくは、モノクローナル抗体)の垂直な線を含む。hCGに対する抗体は、例えば、Research Diagnostics Inc.(RDI-CBL74; New Jersey, USA)、Charles River Labsおよび他の供給源から、広汎に市販されている。またはそのような抗体を、標準的な手順を使用して調製し得る。総量が約0.2μg~約1μgの抗体を、試験領域に垂直線状に適用する。

20

【0138】

コントロール線は、プロテインAの垂直線を含む。結合体が結合する際に可視的なシグナル線を生じるために十分な総量(代表的には、約0.25μg)のプロテインAを、コントロール線に適用する。

【0139】

各試験片について、適切なニトロセルロース膜を、約2.5cm×5mmの大きさまで切断し、プラスチックの裏打ちに付着する。

【0140】

hCGに対する第二抗体を、この試験用の結合体のためのコロイド状金に付着する。コロイド状金-hCG抗体結合体は、例えば、Research Diagnostics Inc.から市販されている。あるいは、hCG抗体結合体を、周知の方法(例えば、本明細書中に参考として援用される、米国特許第6,485,982号参照)を使用して、調製し得る。この結合体を、結合体緩衝液中で約3OD/mlの濃度まで希釈する。その結合体緩衝液は、好ましくは、0.25%HEPES、0.85%塩化ナトリウム、0.1%アジ化ナトリウム、0.1%EDTA、0.1%カゼイン、1%ウシ血清アルブミン、1%マンニトール、5%スクロース、および0.1%Triton X100を含む。この緩衝液を、pH7.2になるように調整する。

30

【0141】

結合体を、ガラス繊維結合体パッド(Millipore GFCEP203000)に適用する。これを、乾燥させて、5mm×5mmの片になるように切断する。

40

【0142】

Whatman GF/DVAガラスペーパー緩衝液パッド(2cm×5mm)を、各試験片の乾燥した結合体パッドに付着させて、緩衝液パッドとして役立てる。

【0143】

S&S 900ペーパー製の吸収剤パッド(2cm×5mm)を、コントロール領域に最も近いニトロセルロース膜の端部に付着し、さらなる吸収紙(2.5cm×5mm; S&S 470)を、この吸収剤パッドに付着する。その後、この吸収紙を、サンプル体積のうちのかなりの部分を吸収して試験領域全体にわたるサンプルおよび分析物を汲み出すことが可能な乾燥剤錠剤(Tri-Sorb, Sud-Chemie)と接触させる。

【0144】

50

メチレンブルーまたは別のインジケータを、その試験領域の下流にて、吸収剤パッドまたは吸収紙の一方に配置する。この体積インジケータの移動は、正確な試験を可能にするために十分なサンプルが、試験領域と接触したことのシグナルである。

【0145】

その試験片を、プラスチックハウジング中に配置して試験カードを作製する。このプラスチックハウジングは、試験領域とコントロール領域との上に試験ウィンドウを含み、試験結果の可視化を可能にする。このプラスチックハウジングはまた、体積インジケータウィンドウを備え、このウィンドウを通して、その体積インジケータの移動が、観察され得る。

【0146】

いくつかの試験カードにおいて、サンプルカップが、試験ウィンドウの上に取り付けられる。そのサンプルカップは、サンプルが、サンプルウィンドウを通して試験膜のサンプル適用領域へと流れるのを可能にする出口を備えた、サンプルを保持するための容器を備える。そのサンプルカップはまた、その出口中にフィルターを備え得る。サンプルを上記膜に添加した後、そのカップを取り外して、試験結果を観察し得るようにする。

【0147】

他の試験カードにおいて、上記ハウジングの端部または側面から突出する、芯が存在する。この芯は、それに沿ってサンプルがサンプル適用領域および試験領域へと流れ得る、経路を提供する。

【0148】

上記ハウジングはまた、上記結合体パッドが上記膜と流体連絡するように移動することを可能にする機構を有する。

【0149】

いくつかの試験カードにおいて、洗浄緩衝液を含むアンプルもまた、上記ハウジングにおいて上記結合体パッドの上流に配置させる。他の試験カードにおいて、緩衝液を、緩衝液ウィンドウを通して緩衝液パッドに添加する。

【0150】

上記結合体パッドを試験膜と接触するように移動させる機構を作動させると、上記アンプルが破壊されて、緩衝液が上記結合体パッドへと流される。好ましくは、約5滴の洗浄緩衝液が、上記結合体パッドと接触する。上記機構を作動させるとまた、上記ハウジングからサンプルカップまたは芯が取り除かれる。

【0151】

上記プラスチックハウジングは、サンプルウィンドウ中において試験線およびコントロール線を示すように印が付いている。

【0152】

(実施例6：サンプルカップを用いる妊娠試験の使用)

サンプルカップを用いる側流式視覚的高速妊娠試験を、実施例5に記載されるように調製する。

【0153】

被験体由来の尿を、収集し、約500 $\mu$ lを、サンプルカップに添加する。このサンプルカップは、サンプルウィンドウの上で試験カードに取り付けられている。体積インジケータウィンドウにおいて青色が観察された場合には、上記の機構が作動されて、上記結合体パッドは、上記膜と流体連絡させられる。これにより、緩衝液を含むアンプルが破壊されて、試験が開始される。このサンプルカップを取り外し、その試験結果を、1分間後～5分間後にサンプルウィンドウにおいて可視化する。

【0154】

図5において示されるように、ポジティブの結果は、サンプルウィンドウを通る2つの可視的な線(試験線(140)およびコントロール線(150))を含む。2つの線が見える場合には、それらの線の一方が他方よりも暗い場合でさえ、ポジティブの結果が、得られる。ネガティブの結果は、図6に示されるように、サンプルウィンドウを通る1

10

20

30

40

50

本のコントロール線（150）によって示される。

【0155】

（実施例6：芯を用いる妊娠試験の使用）

芯を用いる側流式視覚的高速妊娠試験を、実施例5において記載されるように調製する。

【0156】

被験体は、その尿の流れに上記芯を配置する。体積インジケータウィンドウにおいて観察される青色は、十分なサンプル体積が、試験領域と接触したことを示す。

【0157】

上記ハウジング上の機構が作動されて、上記結合体パッドは、上記膜と流体連絡させられる。これによってまた、ハウジング内側にある緩衝液を含むアンプルが破壊され、緩衝液が結合体パッドへと流されることによって、試験が開始される。この芯を取り外し、その試験結果を、1分間後～5分間後にサンプルウィンドウにおいて可視化する。

10

【0158】

図5において示されるように、ポジティブの結果は、サンプルウィンドウを通る2つの可視的な線（試験線（140）およびコントロール線（150））を含む。2つの線が見える場合には、それらの線の一方が他方よりも暗い場合でさえ、ポジティブの結果が得られる。ネガティブの結果は、図6に示されるように、サンプルウィンドウを通る1本のコントロール線によって示される。

【0159】

本発明は、特定の好ましい実施形態を参照して記載されているが、本発明の範囲から逸脱することなく、種々の変更がなされ得、その構成要素が均等物で置換され得ることが、当業者によって理解される。さらに、本発明の必須範囲から逸脱することなく、特定の状況に対して本発明中の技術を適合させるために、多くの改変がなされ得る。従って、本発明は、開示されるいかなる特定の実施形態にも限定されず、本発明は、添付される特許請求の範囲の範囲内にあるすべての実施形態を包含することが、意図される。

20

【図面の簡単な説明】

【0160】

【図1】図1は、本発明の1つの局面に従う試験カードを示す。

【図2】図2は、本発明の1つの局面に従う試験カードの上面図を示す。

30

【図3】図3は、本発明の1つの局面に従う試験カードの側面図を示す。

【図4】図4は、1つの実施形態に従う試験片を含む成分の断面図を示す。

【図5】図5は、目的の分析物がサンプル中で検出されたことを示すポジティブな結果を有する試験カードを示す。

【図6】図6は、目的の分析物がサンプル中で検出されなかったことを示すネガティブな結果を有する試験カードを示す。

【図7】図7は、本発明のさらなる局面に従ったサンプルカップを有する試験片を示す。

【 図 1 】

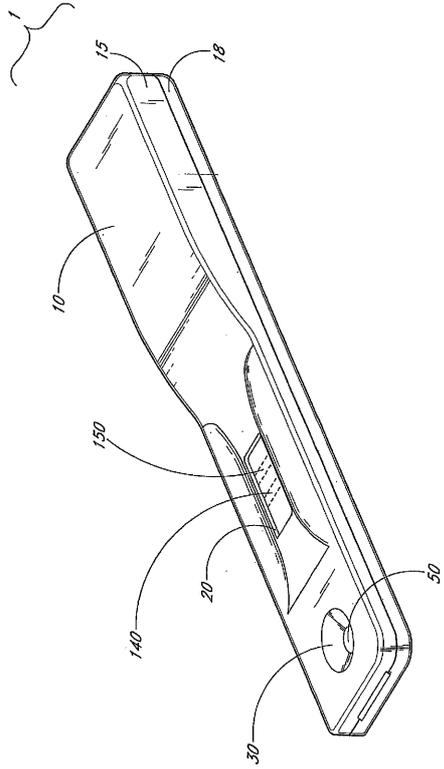


FIG. 1

【 図 2 】

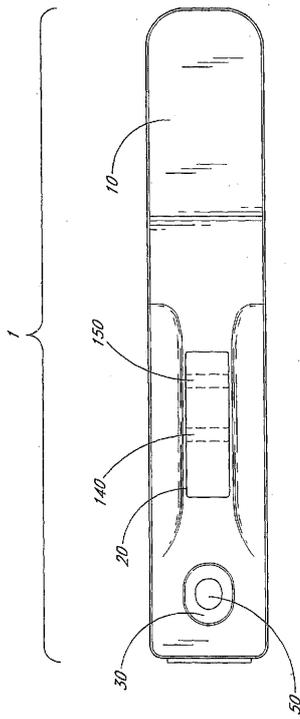


FIG. 2

【 図 3 】

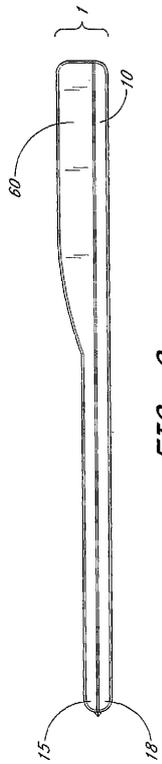


FIG. 3

【 図 4 】

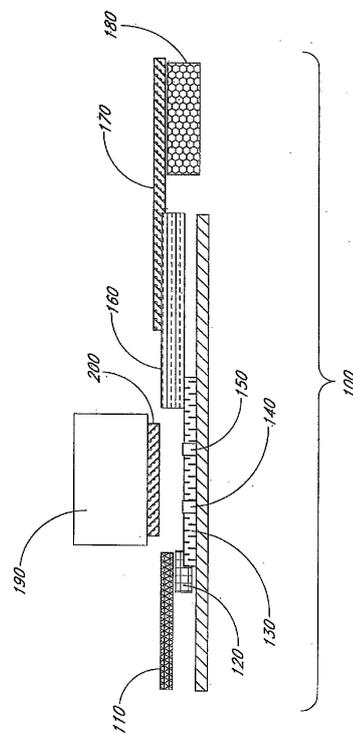


FIG. 4

【 図 5 】

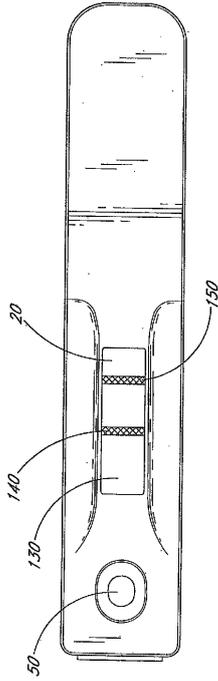


FIG. 5

【 図 6 】

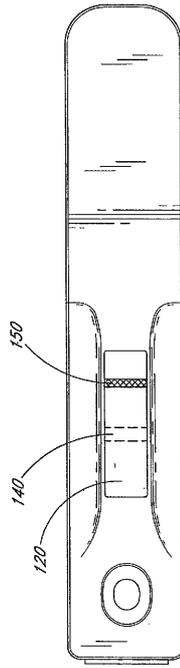


FIG. 6

【 図 7 】

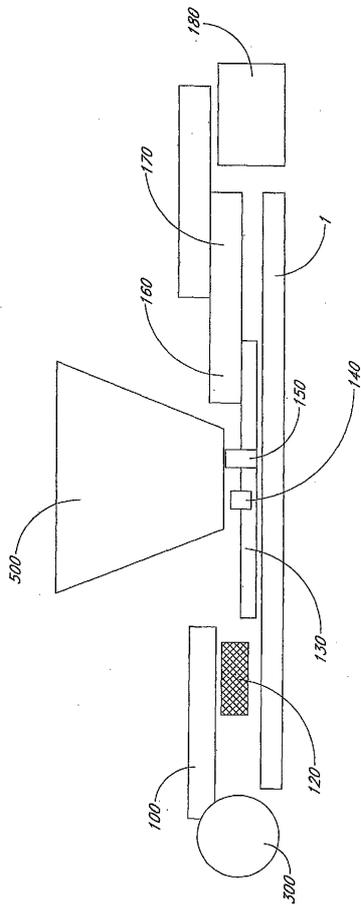


FIG. 7

## 【手続補正書】

【提出日】平成19年3月16日(2007.3.16)

## 【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

液体サンプル中の目的の分析物を検出するための診断試験片であって、該試験片が、以下

結合体供給源領域であって、該目的の分析物を結合するように構成された結合体を含む、結合体供給源領域；

サンプル適用領域であって、該結合体供給源領域の下流に配置され、該液体サンプルを受け入れるように構成された、サンプル適用領域；および

試験領域であって、該結合体供給源領域の下流に配置され、該目的の分析物に特異的な固定化結合剤を含む、試験領域、を備える、診断試験片。

【請求項2】

請求項1に記載の試験片であって、前記サンプル適用領域が、前記試験領域を含む、試験片。

【請求項3】

請求項1に記載の試験片であって、前記目的の分析物が、抗体または抗原である、試験片。

【請求項4】

請求項3に記載の試験片であって、前記目的の分析物が、ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に対する抗体、C型肝炎ウイルス(HCV)に対する抗体、およびヒト絨毛性性腺刺激ホルモン(hCG)からなる群より選択される、試験片。

【請求項5】

請求項1に記載の試験片であって、前記結合体供給源領域が、乾燥結合体を含む、試験片。

【請求項6】

請求項5に記載の試験片であって、前記結合体供給源領域が、(a)乾燥結合体を含み、該試験片と流体連絡している、結合体パッドを含むか、または(b)該試験片の一部である、試験片。

【請求項7】

請求項1に記載の試験片であって、前記結合体供給源領域を洗浄緩衝液と接触させることによって、前記結合体が前記試験領域へと流れる、試験片。

【請求項8】

請求項7に記載の試験片であって、前記洗浄緩衝液が、遮断剤タンパク質および非イオン性界面活性剤を含む、試験片。

【請求項9】

請求項8に記載の試験片であって、前記洗浄緩衝液が、0.1%カゼインおよび1% Triton X100を含む、試験片。

【請求項10】

請求項1に記載の試験片であって、前記結合体が、結合成分および標識を含む、試験片。

【請求項11】

請求項14に記載の試験片であって、前記結合成分が、プロテインAである、試験片。

【請求項12】

請求項10に記載の試験片であって、前記標識が、コロイド金、コロイド銀、コロイドブ

ラックおよび着色ラテックス粒子からなる群より選択される、試験片。

【請求項 1 3】

請求項 1 2 に記載の試験片であって、前記標識が、コロイド金である、試験片。

【請求項 1 4】

請求項 1 3 に記載の試験片であって、前記コロイド金が、約 20 ~ 約 80 ナノメートルの粒子サイズを有する、試験片。

【請求項 1 5】

請求項 3 に記載の試験片であって、前記目的の分析物は抗体であり、ここで前記結合体が、コロイド金に結合したプロテイン A を含む、試験片。

【請求項 1 6】

請求項 3 に記載の試験片であって、前記目的の分析物は抗原であり、ここで前記結合体が、コロイド金に結合した抗体を含む、試験片。

【請求項 1 7】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記試験片が、ニトロセルロース膜を含む、試験片。

【請求項 1 8】

請求項 1 に記載の試験片であって、前記試験片が、前記試験領域の下流に配置されるコントロール領域をさらに備え、該コントロール領域が、前記結合体に結合し得る固定化コントロール結合剤を含む、試験片。

【請求項 1 9】

請求項 1 8 に記載の試験片であって、前記コントロール領域が、( a ) 固定化ウサギ Ig G、または ( b ) 固定化プロテイン A を含む、試験片。

【請求項 2 0】

請求項 1 に記載の試験片であって、( a ) 前記結合体供給源領域と流体連絡している緩衝液パッド、( b ) 前記試験領域の下流の位置に前記膜と流体連絡する吸着パッド、および / または ( c ) 前記サンプル適用領域の直接上に配置されたサンプルフィルターをさらに備える、試験片。

【請求項 2 1】

サンプル中の抗 HIV 抗体の検出のための試験片であって、以下：

試験領域および該試験領域の下流に配置される結合体供給源領域；

該試験領域に結合された固定化抗原であって、該固定化抗原が、約 0.1 ~ 約 0.5  $\mu$ g の HIV 抗原を含む、固定化抗原；および

該結合体供給源領域に拡散可能に結合された結合体であって、該結合体が、抗体に結合するように構成されている、結合体、を含む、試験片。

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の試験片であって、前記 HIV 抗原が、GP120、P24 および GP36 からなる群より選択された 1 つ以上の抗原を含む、試験片。

【請求項 2 3】

請求項 2 1 に記載の試験片であって、前記結合成分が、プロテイン A を含む、試験片。

【請求項 2 4】

請求項 2 3 に記載の試験片であって、前記プロテイン A が、コロイド金に結合されている、試験片。

【請求項 2 5】

液体サンプル中の目的の抗体を検出する方法であって、該方法が、以下：

試験片の試験領域と該サンプルとを接触させる工程であって、該試験領域が、該目的の抗体に特異的な固定化抗原を含む、工程；および

引き続いて、該試験領域と、該目的の抗体に結合するように構成された結合体とを接触させる工程、

を包含する、方法。

【請求項 2 6】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記結合体が、プロテイン A を含む、方法。

【請求項 2 7】

請求項 2 6 に記載の方法であって、前記プロテイン A が、コロイド金に結合されている、方法。

【請求項 2 8】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記目的の抗体が、抗 HIV 抗体である、方法。

【請求項 2 9】

請求項 2 8 に記載の方法であって、前記試験領域が、HIV - 1 抗原および HIV - 2 抗原からなる群より選択された固定化抗原を含む、方法。

【請求項 3 0】

請求項 2 9 に記載の方法であって、前記 HIV - 1 抗原が、GP 1 2 0 および P 2 4 からなる群より選択され、前記 HIV - 2 抗原が、GP 3 6 である、方法。

【請求項 3 1】

請求項 2 5 に記載の方法であって、前記液体サンプルが、全血、血清、および血漿からなる群より選択される、方法。

【請求項 3 2】

免疫診断妊娠試験片であって、以下：

液体サンプルを受け入れるためのサンプル適用領域；

固定化第 1 抗 hCG 抗体を含む試験領域；および

hCG に結合するように構成された結合体を含む、結合体供給源領域、

を備え、該結合体供給源領域が、該サンプル適用領域および該試験領域の上流に配置されている、妊娠試験片。

【請求項 3 3】

請求項 3 2 に記載の妊娠試験片であって、前記サンプル適用領域と流体連絡している芯をさらに備える、妊娠試験片。

【請求項 3 4】

請求項 3 2 に記載の妊娠試験片であって、尿サンプルを収集するためのカップをさらに備える、妊娠試験片。

【請求項 3 5】

請求項 3 2 に記載の妊娠試験片であって、前記結合体が、第 2 hCG 抗体を含む、妊娠試験片。

【請求項 3 6】

請求項 3 5 に記載の妊娠試験片であって、前記第 2 hCG 抗体が、コロイド金に結合されている、妊娠試験片。

【 国際調査報告 】

60601160023



1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/08355
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC: G01N 33/53(2006.01) G01N 33/533(2006.01)  USPC: 436/518 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 436/518  Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched  Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EAST, NPL		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,656,503 A (MAY et al) 12 August 1997 (12.08.1997) see entire document.	1-3, 6-10, 14-27, 32-34, 39-44
Y		4-5, 12, 13, 28-38
X	US 2001/0023076 A1 (GUAN et al) 20 September 2001 (20.09.2001) see entire document.	1-44
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 26 April 2006 (26.04.2006)		Date of mailing of the international search report 31 MAY 2006
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner of Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Bao-Thuy L. Nguyen <i>Janice Ford for</i> Telephone No. (571) 272-1600

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

14. 9. 2006

---

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

专利名称(译)	样品中分析物的诊断测试		
公开(公告)号	<a href="#">JP2007524813A</a>	公开(公告)日	2007-08-30
申请号	JP2006509248	申请日	2004-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	优势诊疗技术公司		
[标]发明人	チャールトンデーヴィッド		
发明人	チャールトン, デーヴィッド		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/558 G01N2333/16 G01N2333/18 G01N2333/59		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.N G01N33/531.B G01N33/532.Z		
优先权	10/456771 2003-06-06 US		
其他公开文献	JP4851321B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

提供了检测装置和方法。诊断装置优选地包括具有测试区域140的测试条。待分析的样品与测试区域接触，测试区域包含对目标分析物特异的结合配偶体。当存在于样品中时，分析物与测试区域中的固定化结合配偶体结合，随后与缀合物接触。缀合物特异性结合分析物并提供分析物存在的视觉指示。该装置可用于诊断患者的特定疾病或病症（例如HIV或肝炎）。它们还可用于确定个体是否怀孕。

