

(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2008-524582  
(P2008-524582A)

(43) 公表日 平成20年7月10日(2008.7.10)

(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 U	
GO 1 N 33/569 (2006.01)	GO 1 N 33/569 F	
	GO 1 N 33/569 H	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2007-546641 (P2007-546641)  
 (86) (22) 出願日 平成17年9月28日 (2005. 9. 28)  
 (85) 翻訳文提出日 平成19年6月12日 (2007. 6. 12)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/034653  
 (87) 国際公開番号 W02006/065314  
 (87) 国際公開日 平成18年6月22日 (2006. 6. 22)  
 (31) 優先権主張番号 11/012, 759  
 (32) 優先日 平成16年12月15日 (2004. 12. 15)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504460441  
 キンバリー クラーク ワールドワイド  
 インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 ウィスコンシン州 54  
 956 ニーナ ノース レイク ストリ  
 ート 401  
 (74) 代理人 100082005  
 弁理士 熊倉 禎男  
 (74) 代理人 100067013  
 弁理士 大塚 文昭  
 (74) 代理人 100086771  
 弁理士 西島 孝喜  
 (74) 代理人 100109070  
 弁理士 須田 洋之

最終頁に続く

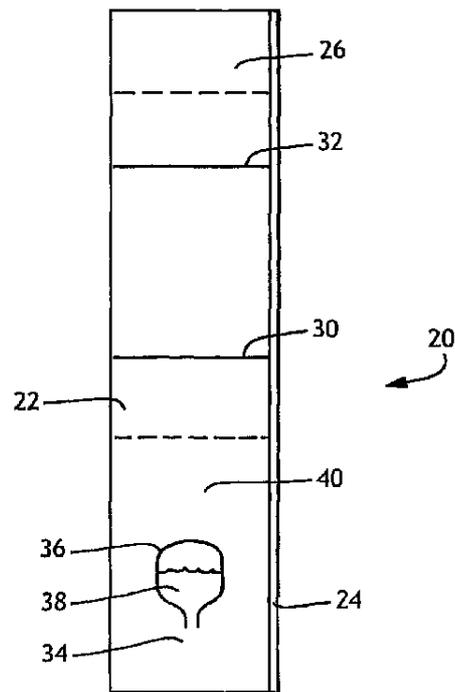
(54) 【発明の名称】 試料効率の高い横流型免疫学的検定装置

(57) 【要約】

【課題】 試験試料に存在する検体の存在又は量を検出するための分析装置を提供する。

【解決手段】 抱合体パッドと吸上げパッドとに連通した多孔性膜を有する、試験試料に存在する検体の存在又は量を検出するための横流型分析装置。多孔性膜は、検体及び検体-抱合体錯体の少なくとも一部分に結合して検出信号を発生するように構成された不動化した第1の捕捉試薬を有する検出区画を有する。対照区画が、多孔性膜の検出区画の下流に位置することができ、対照区画内に不動化した第2の捕捉試薬を有する。抱合体パッドは、検出区画の上流に位置し、検体に対して特異的な結合員を備えた検出プローブを有する。試料は、対照区画と検出区画の間に堆積される。緩衝液放出区画が、抱合体パッドの上流に位置し、検出プローブを検出区画及び対照区画に移動させる働きをする緩衝液の付加を装置に提供する。

【選択図】 図1



**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

試験試料に存在する検体の存在又は量を検出するための横流型分析装置であって、  
抱合体パッドと吸上げパッドとに連通した多孔性膜、  
を含み、  
前記多孔性膜は、  
前記検体及び検体 - 抱合体錯体の少なくとも一部分に結合して強度を有する検出信号を  
発生するように構成された第 1 の捕捉試薬が不動化される検出区画を形成しており、  
前記抱合体パッドは、前記検出区画の上流に位置し、かつ前記検体に対して特異的な結  
合員を備えた検出粒子を有し、  
緩衝液放出区画が前記抱合体パッドの上流に配置されて、前記検出プローブを前記検出  
区画に移動させる働きをする緩衝液を横流型分析装置に付加し、  
前記試料が、前記抱合体パッドと前記検出区画の間に配置される、  
ことを特徴とする装置。

10

**【請求項 2】**

前記抱合体検出粒子は、色素原、触媒、発光化合物、放射性化合物、可視ラベル、リポソ  
ーム、及びそれらの組合せから成る群から選択された物質を含むことを特徴とする請求項  
1 に記載の横流型分析装置。

**【請求項 3】**

前記抱合体検出粒子は、発光化合物を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の横流型分析  
装置。

20

**【請求項 4】**

前記抱合体検出粒子は、可視ラベルを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の横流型分析  
装置。

**【請求項 5】**

前記特異的結合員は、抗原、ハプテン、アプタマー、1 次又は 2 次抗体、ビオチン、及  
びそれらの組合せから成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の横流型分  
析装置。

**【請求項 6】**

前記第 1 の捕捉試薬は、抗原、ハプテン、タンパク質 A 又は G、ニュートラアビジン、  
アビジン、ストレプトアビジン、キャプトアビジン、1 次又は 2 次抗体、及びそれらの錯  
体から成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の横流型分析装置。

30

**【請求項 7】**

前記第 2 の捕捉試薬は、抗原、ハプテン、タンパク質 A 又は G、ニュートラアビジン、  
アビジン、ストレプトアビジン、キャプトアビジン、1 次又は 2 次抗体、及びそれらの錯  
体から成る群から選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の横流型分析装置。

**【請求項 8】**

前記検体は、サルモネラ種、髄膜炎菌群、肺炎連鎖球菌、カンジダアルビカンス、カン  
ジダトロピカリス、アスペルギルア、ヘモフィルスインフルエンザ、H I V、トリコモナ  
ス、及びプラスモディウムから成る群から選択された大きな病原体であることを特徴とす  
る請求項 1 に記載の横流型分析装置。

40

**【請求項 9】**

前記検体は、毒素、有機化合物、タンパク質、ペプチド、微生物、アミノ酸、核酸、ホ  
ルモン、ステロイド、ビタミン、薬物、薬物中間体又は副産物、細菌、ウイルス粒子、及  
び以上の物質のいずれかの代謝産物又はいずれかに対する抗体から成る群から選択され  
ることを特徴とする請求項 1 に記載の横流型分析装置。

**【請求項 10】**

前記多孔性膜、抱合体パッド、及び吸上げパッドは、単一の材料から作られることを特  
徴とする請求項 1 に記載の横流型分析装置。

**【請求項 11】**

50

試験試料に存在する検体の存在又は量を検出する方法であって、

i) 抱合体パッドと吸上げパッドとに液体連通した多孔性膜を含む横流型分析装置を準備する段階、

を含み、

前記抱合体パッドは、検体に対して特異的な結合員で抱合された検出粒子を有し、前記多孔性膜は、第1の捕捉試薬が不動化される検出区画と、第2の捕捉試薬が内部に不動化される対照区画とを形成し、

前記対照区画は、前記検出区画の下流に位置し、前記抱合体パッドは、前記多孔性膜の上流に位置し、かつ緩衝液放出区画が、該抱合体パッドの上流にあり、

ii) 前記検体を含有する試験試料を前記抱合体パッドと前記検出区画の間に接触させる段階と、

iii) 緩衝液を、該緩衝液が前記検出粒子を前記検出区画及び対照区画に運ぶこととなるように、前記緩衝液放出区画で放出する段階と、

iv) 検出信号を検出する段階と、

を更に含むことを特徴とする方法。

【請求項12】

前記抱合検出粒子は、色素原、触媒、発光化合物、放射性化合物、可視ラベル、リポソーム、及びそれらの組合せから成る群から選択された物質を含むことを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記抱合検出粒子は、可視ラベルを含むことを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項14】

前記特異的結合員は、抗原、ハプテン、アプタマー、1次又は2次抗体、ビオチン、及びそれらの組合せから成る群から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項15】

前記第1の捕捉試薬は、抗原、ハプテン、タンパク質A又はG、ニュートラアビジン、アビジン、ストレプトアビジン、キャプトアビジン、1次又は2次抗体、及びそれらの錯体から成る群から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項16】

前記第2の捕捉試薬は、抗原、ハプテン、タンパク質A又はG、ニュートラアビジン、アビジン、ストレプトアビジン、キャプトアビジン、1次又は2次抗体、及びそれらの錯体から成る群から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項17】

前記第2の捕捉試薬は、多価電解質を含むことを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項18】

前記検体は、サルモネラ種、髄膜炎菌群、肺炎連鎖球菌、カンジダアルビカンス、カンジダトロピカリス、アスペルギルア、ヘモフィルスインフルエンザ、HIV、トリコモナス、及びプラスモディウムから成る群から選択された大きな病原体であることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項19】

前記検体は、毒素、有機化合物、タンパク質、ペプチド、微生物、アミノ酸、核酸、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物、薬物中間体又は副産物、細菌、ウイルス粒子、及び以上の物質のいずれかの代謝産物又はいずれかに対する抗体から成る群から選択されることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項20】

試験試料に存在する検体の存在を検出するための横流型分析装置であって、

最初に抱合体パッド上に存在した検出粒子が、捕捉試薬を有する検出区画に位置する病原体まで移動される、

ことを特徴とする装置。

【発明の詳細な説明】

10

20

30

40

50

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、試験試料に存在する検体の存在又は量を検出するための分析装置に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

検体を分析的に検出することができるように、検出可能な成分でラベル付けした免疫反応物質を用いるいくつかの公知の免疫学的検定法が存在する。例えば、「サンドイッチ型」分析は、一般的に、検体に対する特定の結合員で抱合された染色ラテックス又は放射性同位元素のような検出可能プローブと試験試料を混合することを伴っている。抱合されたプローブは、検体との錯体を形成する。これらの錯体は、次に、抗体と検体の間に結合が起こって三元「サンドイッチ錯体」を形成する、不動化された抗体の区画に到達する。サンドイッチ錯体は、検体を検出するための区画に局限される。この技術を用いて、定量的又は半定量的な結果を得ることができる。代替的な技術は、「競合型」分析である。「競合型」分析では、ラベルは、典型的には、試料に存在するラベル付けされていないあらゆる検体に抗体を結合するように競合するラベル付けされた検体又は検体類似物である。競合分析は、一般的に、各々が一価であって1つの抗体分子のみと結合することができるハプテンのような検体の検出に用いられる。

10

## 【0003】

別の種類の分析は、検体が第1の線上に筋状に配置され、抱合粒子（例えば、ヤギ抗マウス又は「GAM」）上の抗体に特異的な抗体が隣に筋状に配置される障害/オーバーフロー分析である。この分析では、存在するあらゆる検体は、その検体に特異的な抗体（又は他の結合剤）を有する抱合粒子に結合することになる。検体のある一定の閾値量未満のレベルでは、粒子は、検体によって完全に覆われることにはならず、すなわち、完全に障害されることにはならず、従って、検体を用いて筋状に配置した第1の線において依然として錯体を形成することができることになる。この障害線は、検体が閾値レベル未満の時には、本質的に抱合体を除去/結合するように作用する。隣の線は、抱合粒子上の抗体を認識する抗体から成っており、「オーバーフロー」線として作用すると考えられる。これは、検体レベルが閾値レベルよりも高い場合に「のみ」粒子を結合する（それによって、色つきの線を形成する）。更に、異なる母集団の抱合粒子（例えば、それらの上にラビット抗体を有するようなもの）を捕捉するように筋状に配置されたヤギ抗ラビット（GAR）線のような陽性の対照線を用いることができる。この線は、試験が実行可能で適正に実行されている限り、常に形成すべきである。

20

30

## 【0004】

多くの検体に対して、流入又は横流型分析が一般的になってきているが、その多くは、横流型分析に特徴的な試料及びラベル又は抱合粒子の流れを可能にするために比較的大量の試料が必要である。より詳細には、現在利用可能な横流型分析は、試料堆積点の下流かつ検出区画の上流に位置する抱合体を用いる。試料自体は、抱合体を再懸濁してそれらを検出区画に運ぶ役割をしている。代替的に、付加的な希釈剤に試料を加えて試料を抱合体パッドに運び、抱合粒子を再懸濁するのを助け、次に検出区画に到達することができる。いずれの場合でも、粒子を再懸濁するのを助けるために、試料の付加は、典型的に抱合粒子の上流で行われる。「上流」及び「下流」とは、分析装置上の試料の流れの方向に対する品目の位置を意味することに注意されたい。

40

## 【0005】

これらの装置で達成される恩典にも関わらず、これらは、常に望ましい信号（線）強度を生成するとは限らない。これは、検体のレベルが低い時に信号が可視でない場合があるので、これを用いることができる状況を限定する。従来はまた、（血液）試料の赤色が強いために又は試料の流れに問題を引き起こすことがある試料の粘性のために信頼性を低くする場合がある。従って、より強い信号（線）強度を与え、並びに大量の試料を必要とすることなく信頼性のある結果を与えることができる分析の改善された技術に対する必要性が存在する。

50

## 【0006】

【特許文献1】米国特許第6、436、651号

【特許文献2】米国特許第4、275、149号

【特許文献3】米国特許第5、670、381号

【特許文献4】米国特許第5、252、459号

【発明の開示】

## 【0007】

本発明の一実施形態により、試験試料に存在する検体の存在又は量を検出するための分析装置を開示する。分析装置は、多孔性膜と液体連通した抱合体パッドを含み、この多孔性膜は、吸上げパッドとも連通している。抱合体パッド、多孔性膜、及び吸上げパッドは、全ての3つの区域の機能を有する単一の材料とすることができることも可能であることに注意すべきである。

10

多孔性膜は、例えばニトロセルロースのような検出プローブが通過することができる様々な材料のいずれから形成することができる。多孔性膜は、第1の捕捉試薬が不動化される検出区画を有する。第1の捕捉試薬は、検体及び検体抱合錯体の少なくとも一部分に結合して検出信号を発生するように構成される。第1の捕捉試薬は、抗原、ハプテン、タンパク質A又はG、ニュートラアビジン、アビジン、ストレプトアビジン、キャプトアビジン、1次又は2次抗体、及びそれらの錯体から成る群から選択することができる。第1の捕捉試薬は、例えば、検体と抱合検出プローブの間に形成された錯体に結合することができる。

20

## 【0008】

対照区画は、検出区画の下流の多孔性膜上に位置する。第2の捕捉試薬は、抱合体、抱合体-検体錯体、又は純粋なプローブに結合するように構成された対照区画内に不動化されて、分析が適正に行われていることを示す。一実施形態では、第2の捕捉試薬は、抗原、ハプテン、多価電解質、タンパク質A又はG、ニュートラアビジン、アビジン、ストレプトアビジン、キャプトアビジン、1次又は2次抗体、及びそれらの錯体から成る群から選択される。

## 【0009】

抱合体パッドは、検体の存在を信号で伝える検出プローブを収容する。抱合体パッドはまた、対照区画を示すためのプローブを含む他の異なるプローブ母集団を含むこともできる。必要に応じて、検出プローブは、色素原、触媒、発光化合物（例えば、蛍光、燐光等）、放射性化合物、可視ラベル、粒子（例えば、染色、金色、銀色、他の光学的に密な材料）、リポゾーム、及びそれらの組合せから成る群から選択された物質を含むことができる。特異的結合員は、抗原、ハプテン、アプタマー、1次又は2次抗体、ビオチン、及びそれらの組合せから成る群から選択することができる。

30

## 【0010】

膜から離れた抱合体パッドの端部と液体連通して、緩衝液放出区画が存在する。試料が抱合体と検出区画の間の装置上に堆積した後に、緩衝液は、緩衝液放出区画の上流から放出される。緩衝液は、抱合体パッドから検出区画に向かってプローブを洗い、検出区画では、プローブは、検体が存在する時には検体によって検出区画上で捕捉されることになり、陽性の結果をもたらす。試料が検体を含有しない場合には、検出線は、陰性であることになる。一部のプローブ（検出プローブと異なるプローブを含むこともある）を依然として含有する緩衝液混合物は、試薬が抱合体、抱合体-検体錯体、又は純粋なプローブを捕捉して分析が適正に機能していることを示す対照区画まで連続している。

40

吸上げパッドは、膜と液体連通しており、液体移動の推進力を提供する。

## 【0011】

本発明の方法は、粒子の上流である従来位置ではなく、粒子の下流に試料を加える段階を伴っている。試料を堆積した後に、粒子の上流の試験ストリップ上の点で希釈剤が放出される。希釈剤は、次に、粒子が試験ストリップを下って流れることができるように、粒子を再懸濁するのに要する流体を提供する。粒子に接触した後に、希釈剤-粒子混合物

50

は、分析の残りのために試料（例えば、血液）に接触する点まで下って流れる。本方法により、線信号強度が増大する場合もあることが見出されている。

【0012】

本発明の別の実施形態により、試験試料に存在する検体の存在又は量を検出する方法を開示する。本方法は、i) 抱合体パッドと吸上げパッドに液体連通した多孔性膜を有する横流型分析装置を準備する段階を含み、抱合体パッドは、検体に対して特異的な結合員で抱合された検出プローブを有し、多孔性膜は、第1の捕捉試薬が不動化された検出区画と、第2の捕捉試薬が内部に不動化される対照区画とを形成し、対照区画は、検出区画の下流に位置し、抱合体パッドは、多孔性膜の上流に位置し、緩衝液放出区画が、抱合体パッドの上流にあり、ii) 検体を含有する試験試料を抱合体パッドの下流の装置に接触させる段階と、iii) 緩衝液が検出プローブを試料付加区域まで、次に検出区画及び対照区画まで運ぶことになるように、緩衝液放出区画で緩衝液を放出する段階と、iv) 検出信号を検出する段階とを更に含む。

10

本発明の他の特徴及び態様は、以下でより詳細に説明する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0013】

本明細書で用いる場合、「検体」という用語は、一般的に、検出される物質を意味する。例えば、検体には、抗原性物質、ハプテン、抗体、及びその組合せを含むことができる。検体には、以下に限定されるものではないが、毒素、有機化合物、タンパク質、ペプチド、微生物、アミノ酸、核酸、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物（治療的な目的で投与されるもの、並びに違法に投与されるものを含む）、薬物中間体又は副産物、細菌、ウイルス粒子、イースト、真菌、プロトゾア、及び以上の物質のあらゆる代謝産物又は抗体が含まれる。一部の検体の特定の例には、フェリチン；クレアチニンキナーゼMB（CK-MB）；ジゴキシン；フェニトイン；フェノバルビタール；カルバマゼピン；バンコマイシン；ゲンタマイシン；テオフィリン；バルプロ酸；キニジン；黄体形成ホルモン（LH）；卵胞刺激ホルモン（FSH）；エストラジオール、プロゲステロン；C反応性タンパク質；リポカリン；IgE抗体；サイトカイン；ビタミンB2ミクログロブリン；糖化ヘモグロビン（Gly-Hb）；コルチゾール；ジギトキシン；N-アセチルプロカイナムイド（NAPA）；プロカイナムイド；風疹IgG及び風疹IgMのような風疹抗体；トキソプラズマ症IgG（Toxo-IgG）及びトキソプラズマ症IgM（Toxo-IgM）のようなトキソプラズマ症抗体；テストステロン；サリチル酸；アセトアミノフェン；B型肝炎ウイルス表面抗原（HBsAg）；抗B型肝炎コア抗原IgG及びIgM（抗HBC）のようなB型肝炎コア抗原抗体；ヒト免疫不全ウイルス1型及び2型（HIV1型及び2型）；ヒトT細胞白血病ウイルス1型及び2型（HTLV）；B型肝炎抗原（HBeAg）；B型肝炎抗原抗体（抗HBe）；インフルエンザウイルス；甲状腺刺激ホルモン（TSH）；チロキシン（T4）；総トリヨードチロニン（総T3）；遊離トリヨードチロニン（遊離T3）；ガン胎児性抗原（CEA）；リポタンパク質、コレステロール、及びトリグリセリド；及びフェトタンパク質（AFP）が含まれる。乱用薬物及び規制物質には、以下に限定されるものではないが、アンフェタミン；メタンフェタミン；アモバルビタール、セコバルビタール、ペントバルビタール、フェノバルビタール、及びバルビタールのようなバルビツレート；リブリウム及びバリウムのようなベンゾジアゼピン；ハシシュ及びマリファナのようなカンナビノイド；コカイン；フェンタニール；LSD；メタカロン；ヘロイン、モルヒネ、コデイン、ヒドロモルフォン、ヒドロコドン、メサドン、オキシコドン、オキシモルフォン及びアヘンのようなアヘン剤；フェンシクリジン；及びプロボキシフェンが含まれる。他の可能な検体は、米国特許第6、436、651号に説明されていると考えられる。

20

30

40

【0014】

本明細書で用いる場合、「試験試料」という用語は、一般的に、検体を含有することが疑われる材料を意味する。試験試料は、例えば、供給源から直接得られる材料、並びに、以下に限定されるものではないが、濾過、沈殿、希釈、蒸留、混合、濃縮、妨害化合物の

50

不活性化、試薬の付加、及び溶解などのような技術を用いて前処理した材料を含むことができる。試験試料は、血液、間質液、唾液、眼水晶体液、脳脊髄液、汗、尿、乳汁、腹水、粘液、滑液、腹腔液、膿液、又は羊水などを含む生理液のような生物学的供給源から由来する場合がある。生理液以外に、水及び食品などのような他の液体試料を用いることもできる。更に、検体を含有する固形材料懸濁液も試験試料として用いることができる。

#### 【0015】

一般的に、本発明は、試験試料に存在する検体の存在又は量を検出するための横流型分析装置に関する。

従来横流型法では、試料が粒子を再懸濁して試験を進行させるのを助けることができるように、試料は、一般的に、不動化された抱合粒子の位置の上流に付加される。しかし、これと対照的に、本発明は、例えば、血液に基づく分析のような少量の試料に伴う問題を減少又は消失させるために、新しい方法及び/又は試料を付加する位置を開示する。試料容量が更に限定される可能性がある特定の付加（例えば、血液に基づく付加及び綿球に基づく付加）の場合には、希釈剤を用いて試料と混合し、それによって必要な体液の量を低減することができる。これらの場合には、希釈剤自体により、不動化粒子を再懸濁させることができる。

10

#### 【0016】

公知の分析では、試料中の目標とする検体が、堆積点からそれを検出することができる点まで移動することが必要である。公知の分析では、抱合粒子を収容する区域を通して、次に検出区画まで試料を移動させる。これらの公知の分析の一部は、液体希釈剤又は「緩衝液」を用いて、試料を抱合粒子まで及び検出区画上に移動する。

20

公知の分析と対照的に、本発明の装置では、試料が抱合粒子の下流の堆積部位に移動することができる。その後、希釈剤（例えば、緩衝液）が放出され、最初に抱合体パッドに配置されていた粒子を粒子と検出区画の間に配置された試料まで移動する。

#### 【0017】

本発明者は、検出粒子を粒子の下流に加えられた試料まで希釈剤と共に移動させると、非常に少量の試料の使用を可能にすることを発見した。希釈剤は、非常に効率的に検出プローブを再懸濁させる働きをして、検出プローブが抱合体パッドの更に下流に膜に沿って移動して試験結果を与えることを可能にする。従来横流型装置に入れた液体試料は、抱合粒子を再懸濁するのに用いられるために、本方法は、経験に反するものである。更に、免疫測定のために試料及び粒子が接触して結合が起こることは、従来的には望ましいものである。しかし、驚くべきことに、試料が粒子の下流に付加され、次に希釈剤中の再懸濁抱合粒子により「追跡」される本方法では、実際に信号強度を増大させることができる場合がある。

30

#### 【0018】

装置は、抱合体パッドと、試料付加区画と、検出区画とを有する多孔性膜を利用する。検出区画は、不動化捕捉試薬を有する。試料付加区画は、不動化粒子の下流である抱合体パッド材料上の位置とすることができ、又は膜の前方位置（検出区画の上流）とすることができ、又は抱合体パッドと検出区画を備えた膜の間に位置する別の材料とすることができる。装置は、試料付加区画と、希釈剤放出区画と試料の間に位置する抱合体パッドとの前の装置の上流側端部に希釈剤放出区画を更に用いる。吸上げパッドは、装置の下流側端部の多孔性膜の反対端と液体連通している。使用時には、試料は、試料付加区画に付加され、ある一定期間後に希釈剤が放出される。希釈剤は、抱合粒子を再懸濁して試料まで及び更に下流の検出区画まで運搬され、検体の存在を示すものになる。

40

#### 【0019】

本発明を用いて検出することができる適切な検体の例には、以下に限定されるものではないが、毒素、有機化合物、タンパク質、ペプチド、微生物、アミノ酸、核酸、ホルモン、ステロイド、ビタミン、薬物（治療の目的のために投与されるもの、並びに違法な目的のために投与されるものを含む）、薬物中間体又は副産物、細菌、ウイルス粒子、イースト、真菌、プロトゾア、及び以上の物質のあらゆる代謝産物又は抗体が含まれる。一部の

50

検体の特定の例には、フェリチン；クレアチニンキナーゼMB（CK-MB）；ジゴキシ  
ン；フェニトイン；フェノバルビタール；カルバマゼピン；バンコマイシン；ゲンタマイ  
シン；テオフィリン；バルプロ酸；キニジン；黄体形成ホルモン（LH）；卵胞刺激ホル  
モン（FSH）；エストラジオール、プロゲステロン；C反応性タンパク質；リポカリン  
；IgE抗体；サイトカイン；ビタミンB2ミクログロブリン；糖化ヘモグロビン（Gly  
・Hb）；コルチゾール；ジギトキシン；N-アセチルプロカインアミド（NAPA）  
；プロカインアミド；風疹IgG及び風疹IgMのような風疹抗体；トキソプラズマ症IgG（Toxo-IgG）及びトキソプラズマ症IgM（Toxo-IgM）のようなト  
キソプラズマ症抗体；テストステロン；サリチル酸；アセトアミノフェン；B型肝炎ウイル  
ス表面抗原（HBsAg）；抗B型肝炎コア抗原IgG及びIgM（抗HBC）のよう  
なB型肝炎コア抗原抗体；ヒト免疫不全ウイルス1型及び2型（HIV1型及び2型）；  
ヒトT細胞白血病ウイルス1型及び2型（HTLV）；B型肝炎e抗原（HBeAg）；  
B型肝炎e抗原抗体（抗HBe）；インフルエンザウイルス；甲状腺刺激ホルモン（TSH）  
；チロキシン（T4）；総トリヨードチロニン（総T3）；遊離トリヨードチロニン  
（遊離T3）；ガン胎児性抗原（CEA）；リポタンパク質、コレステロール、及びトリ  
グリセリド；及びフェットタンパク質（AFP）が含まれる。乱用薬物及び規制物質には  
、以下に限定されるものではないが、アンフェタミン；メタンフェタミン；アモバルビタ  
ール、セコバルビタール、ペントバルビタール、フェノバルビタール、及びバルビタール  
のようなバルビツレート；リブリウム及びバリウムのようなベンゾジアゼピン；ハシシュ  
及びマリファナのようなカンナビノイド；コカイン；フェンタニール；LSD；メタカロ  
ン；ヘロイン、モルヒネ、コデイン、ヒドロモルフォン、ヒドロコドン、メサドン、オキ  
シコドン、オキシモルフォン及びアヘンのようなアヘン剤；フェンシクリジン；及びプロ  
ポキシフェンが含まれる。他の可能な検体は、米国特許第6、436、651号に説明さ  
れていると考えられる。

10

20

30

40

50

#### 【0020】

図1を参照して、形成することができる横流型分析装置20の一実施形態をより詳細に  
以下に説明する。「横流型」という用語は、同じ作用を有するように他の方法でこの装置  
を構成することができるので説明的なものであり、制限的な意味ではないことに注意す  
べきである。半径方向又は垂直方向流れ装置は、例えば、本発明の精神から逸脱すること  
なく本発明と同じ原理を用いて容易に考えることができる。図示のように、装置20は、  
任意的に硬質材料24によって支持された多孔性膜22を含む。多孔性膜22は、検出区画  
（又は線）30を有する。更に、多孔性膜22は、対照区画（又は線）32を有するこ  
とができる。

#### 【0021】

一般的に、多孔性膜22は、検出プローブが通過することができる様々な材料のいずれ  
かで形成することができる。例えば、多孔性膜22を形成するのに用いられる材料には、  
以下に限定されるものではないが、多糖類（例えば、紙のようなセルロース材料及び酢酸  
セルロース及びニトロセルロースのようなセルロース誘導體）のような天然、合成、又は  
合成的に修飾された天然由来の材料；ポリエーテルスルホン；ポリエチレン；ナイロン；  
ポリフッ化ビニリデン（PVDF）；ポリエステル；ポリプロピレン；シリカ；塩化ビニ  
ル、塩化ビニル-プロピレンコポリマー、及び塩化ビニル-ビニルアセテートコポリマー  
のようなポリマーを備える不活性化アルミナ、珪藻土、MgSO<sub>4</sub>、又は多孔性ポリマー  
マトリックス内に均一に分散された他の無機微粉化材料のような無機材料；天然由来（例  
えば、綿）及び合成（例えば、ナイロン又はレーヨン）の両方の布；シリカゲル、アガロ  
ース、デキストラン、及びゼラチンのような多孔性ゲル；及びポリアクリルアミドのよう  
なポリマーフィルムなどを含むことができる。1つの特定のな実施形態では、多孔性膜2  
2は、ニトロセルロース及び/又はポリエーテルスルホン材料で形成される。「ニトロセ  
ルロース」という用語は、セルロースの硝酸エステルを意味し、これは、ニトロセルロ  
ース単独とすることができ、又は硝酸並びに1～7炭素原子を有する脂肪族カルボン酸のよ  
うな他の酸の混合エステルとすることもできることを理解すべきである。適切な膜には、

米国マサチューセッツ州ビルリカ所在の「Millipore Corporation」から入手されるニトロセルロース膜「HF075」及び「HF120」が含まれる。

【0022】

装置20はまた、吸上げパッド26を収容することができる。吸上げパッド26は、一般的に、多孔性膜22全体を通して移動した流体を受け取る。当業技術で公知のように、吸上げパッド26は、毛管作用及び膜22を通る流体の流れを促進するのに役立たせることができる。

装置20は、希釈剤放出区画34を有する。一実施形態では、希釈剤放出区画34は、希釈剤リザーバ36を有し、その中に希釈剤38を保存することができる。代替的に、希釈剤38は、別のリザーバにより供給することができる。希釈剤28は、本発明で用いられる検出プローブを運び出すことになるあらゆる液体とすることができる。適切な希釈剤の例には、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)溶液(pH7.2)、トリス緩衝生理食塩水(TBS)溶液(pH8.2)、又は2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸(MES)(pH5.3)が含まれる。これらは、界面活性剤、水溶性ポリマー、タンパク質、非特異的な結合を防ぐ遮断剤、及び保存料のような他の添加物を含んで分析の性能を助けることができる。

10

【0023】

抱合体パッド40は、希釈剤放出区画34と液体連通し、希釈剤38が希釈剤放出区画34から移動すると、抱合体パッド40を横断して、抱合粒子を多孔性膜22の検出区画30及び対照区画32まで運ぶことになるように、希釈剤放出区画34と多孔性膜22の間に位置する。抱合体パッド40は、希釈剤が通過することができる材料で形成される。抱合体パッド40は、例えば、ガラス繊維で形成することができる。1つの抱合体パッド40しか示していないが、本発明には、他の抱合体パッドを用いることができることを理解すべきである。

20

【0024】

試験試料中の検体の検出を開始するために、使用者は、試験試料を抱合体パッド40と多孔性膜22の検出区画30部分との間の付加区画42に直接付加、接触、又は堆積させることができる。試料が付加区画42に接触した状態で、希釈剤放出区画34に希釈剤38が放出される。希釈剤38は、一体型リザーバにより付加ことができ、又はピペット又は当業者に公知の何らかの他の有効な手段のような別の供給源により付加することができる。希釈剤38は、多孔性膜22と液体連通した抱合体パッド40を通して付加区画42、検出区画30、及び対照区画32に進む。

30

【0025】

試験試料内の検体の存在又は不在を正確に検出することを容易にするために、所定の量の少なくとも1つの種類の抱合粒子が抱合体パッドに付加される。一般的に、視覚的に又は計測装置により検出可能な信号を生成することができるあらゆる物質を検出プローブとして用いることができる。様々な適切な物質には、色素原；触媒；発光化合物(例えば、蛍光、燐光等)；放射性化合物；コロイド金属(例えば、金)及び非金属粒子、染色粒子、酵素又は基質、又は有機ポリマーラテックス粒子を含む可視ラベル；リボゾーム又は信号生成物質を含む他の小胞などを含むことができる。検出プローブとして用いるのに適切な一部の酵素は、米国特許第4、275、149号に開示されている。酵素/基質システムの一例は、酵素であるアルカリフォスファターゼ及び基質であるニトロブルーテトラゾリウム-5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェート、又はその誘導体又は類似物、又は基質である4-メチルウンベリフェリル-ホスフェートである。他の適切な抱合粒子は、米国特許第5、670、381号及び第5、252、459号に説明されていると考えられる。一部の実施形態では、抱合粒子は、検出可能信号を生成する蛍光化合物を含むことができる。蛍光化合物は、蛍光分子、ポリマー、 dendrimer、粒子等とすることができる。例えば、適切な蛍光分子の一部の例は、以下に限定されるものではないが、蛍光色素、ユーロピウムキレート、フィコピリタンパク質、ローダミン、及びその誘導体及び類似物を含む。

40

50

## 【0026】

上述のような抱合粒子は、単独で用いることができ、又は微粒子（時に「ビーズ」又は「マイクロビーズ」と呼ばれる）と共に用いることもできる。例えば、核、マイコプラズマ、プラスミド、プラスチド、哺乳類の細胞（例えば、赤血球ゴースト）、単細胞微生物（例えば、細菌）、及び多糖類（例えば、アガロース）などのような天然由来の微粒子を用いることができる。更に、合成微粒子を用いることができる。例えば、一実施形態では、蛍光又は着色染料でラベル付けされたラテックス微粒子が用いられる。本発明ではあらゆるラテックス微粒子を用いることができるが、ラテックス微粒子は、一般的に、ポリスチレン、ブタジエンスチレン、スチレンアクリル-ビニルターポリマー、ポリメチルメタクリレート、ポリエチルメタクリレート、スチレン-無水マレイン酸コポリマー、ポリビニルアセテート、ポリビニルピリジン、ポリジビニルベンゼン、ポリブチレンテレフタレート、アクリロニトリル、塩化ビニル-アクリレートなど、又はそのアルデヒド、カルボキシル、アミノ、ヒドロキシル、又はヒドラジド誘導体で形成される。他の適切な微粒子は、米国特許第5、670、381号及び第5、252、459号に説明されていると考えられる。適切な蛍光粒子の市販の例には、「Molecular Probes, Inc.」により商品名「FluoSphere」（レッド580/605）及び「TransFluoSphere」（543/620）の下で販売されている蛍光カルボキシル化マイクロスフィア、並びにこれも「Molecular Probes, Inc.」から販売されている「Texas Red」及び5-及び6-カルボキシテトラメチルローダミンが含まれる。更に、適切な着色ラテックス微粒子の市販の例には、「Bang's Laboratory, Inc.」により販売されているカルボキシル化ラテックスビーズが含まれる。

10

20

## 【0027】

利用する時には、粒子の形状は、一般的に様々とする事ができる。例えば、1つの特定の実施形態では、粒子の形状は球状である。しかし、本発明では、平面、ロッド、円板、バー、管、不規則な形状などのような他の形状も考えられていることを理解すべきである。更に、粒子の大きさも様々とする事ができる。例えば、粒子の平均の大きさ（例えば、直径）は、約0.1ナノメートル～約1,000ミクロンの範囲とすることができる。一部の実施形態では、約1ナノメートル～約100ミクロン、一部の実施形態では、約10ナノメートル～約10ミクロンとすることができる。例えば、「ミクロン規模」の粒子が望ましいことが多い。利用する時には、このような「ミクロン規模」の粒子の平均の大きさは、約1ミクロン～約1,000ミクロンとすることができる。一部の実施形態では、約1ミクロン～約100ミクロン、一部の実施形態では、約1ミクロン～約10ミクロンとすることができる。同様に、「ナノ規模」の粒子を用いることができる。このような「ナノ規模」の粒子の平均の大きさは、約0.1～約80ナノメートルとすることができる。一部の実施形態では、約0.1～約5ナノメートル、一部の実施形態では、約1～約20ナノメートルとすることができる。

30

## 【0028】

一部の事例においては、検体に更に容易に結合することができるように、何らかの方法で粒子を修飾することが望ましい。このような事例では、粒子は、粒子に付着して抱合体粒子を形成するある一定の特異的結合員で修飾することができる。特異的結合員とは、一般的に、分子の一方が化学的及び/又は物理的に第2の分子に結合する特定の結合対の員、すなわち、2つの異なる分子を意味する。例えば、免疫反応性特異的結合員には、抗原、ハプテン、アプタマー、抗体（1次又は2次）、及び組換えDNA法又はペプチド合成によって形成されたものを含むその錯体を含むことができる。抗体は、モノクローナル又はポリクローナル抗体、組換えタンパク質又はその混合物又は断片、並びに抗体及び他の特異的結合員の混合物とすることができる。このような抗体の調製の詳細及びそれを特異的結合員として用いることに対する適合性は、当業者には公知である。他のよく用いられる特異的結合対には、以下に限定されるものではないが、ビオチン及びアビジン（又はその誘導体）、ビオチン及びストレプトアビジン、炭水化物及びレクチン、相補的ヌクレオ

40

50

チド配列（ターゲット核酸配列を検出するためのDNAハイブリッド形成分析に用いられるプローブ及び捕捉核酸配列を含む）、組換え法によって形成されるものを含む相補的ペプチド配列、エフェクター及びレセプター分子、ホルモン及びホルモン結合タンパク質、酵素補因子及び酵素、酵素阻害剤及び酵素等が含まれる。更に、特異的結合対には、元の特異的結合員の類似物である員を含むことができる。例えば、検体に共通の少なくとも1つのエピトープを有する限り、検体の誘導体又は断片、すなわち、検体類似物を用いることができる。

#### 【0029】

特異的結合員は、一般的に、様々な公知の技術のいずれかを用いて粒子に付着させることができる。例えば、特異的結合員を検出プローブ（例えば、粒子）に共有的に付着させることは、タンパク質カプリング反応を達成することができるカルボキシル、アミノ、アルデヒド、プロモアセチル、ヨードアセチル、チオール、エポキシ、及び他の反応又は連結官能基、並びに残留フリーラジカル及びラジカルカチオンを用いて達成することができる。更に、表面官能基は、粒子の表面に比較的高濃度の極性基を含むことができるために、官能化モノマーとして組み込むことができる。更に、抱合粒子は、合成後に官能化されることが多いが、ポリ（チオフェノール）のようなある一定の場合には、微粒子は、更に修飾することを必要とせずにタンパク質と直接共有結合することができる。

10

#### 【0030】

再び図1を参照すると、分析装置20は、検体又は抱合粒子-検体錯体に結合することができる第1の捕捉試薬が不動化される検出区画30を収容する。検体の結合は、検体が存在することを検出可能にする指示をもたらし、このような指示は、以下に説明するように、可視であるか又は様々な検出器又は読取器（例えば、蛍光読取器）のような他の手段を通して見ることができる。読取器はまた、検出区画での信号強度に基づいて検出部位での検体の相対量を判断するように設計することができる。

20

#### 【0031】

一部の実施形態では、第1の捕捉試薬は、生物学的捕捉試薬とすることができる。このような生物学的捕捉試薬は、当業技術で公知であり、以下に限定されるものではないが、抗原、ハプテン、タンパク質A又はG、ニュートラアビジン、アビジン、ストレプトアビジン、キャプトアビジン、1次又は2次抗体（例えば、ポリクローナル、モノクローナル等）、及びその錯体を含むことができる。多くの場合、これらの生物学的捕捉試薬は、抱合粒子上に存在する特異的結合員（例えば、抗体）に結合することができることが望ましい。

30

#### 【0032】

また、捕捉試薬には、様々な非生物学的材料を用いることが望ましい場合もある。例えば、一部の実施形態では、試薬には、多価電解質を含むことができる。多価電解質は、正味の正の電荷又は負の電荷を有することができ、又はほぼ中性の正味の電荷を含むこともできる。正味の正の電荷を有する多価電解質の一部の例には、以下に限定されるものではないが、ポリリジン（ミズーリ州セントルイス所在の「Sigma-Aldrich Chemical Co., Inc.」から市販されている）、ポリエチレンイミド；ポリ（ジメチルアミン-コ-エピクロロヒドリン）のようなエピクロロヒドリン官能化ポリアミン及び/又はポリアミドアミン；ポリジアリルジエチル-塩化アンモニウム；及び四級アンモニウム水溶性モノマーでグラフト化したセルロースコポリマー又はセルロース誘導体のようなカチオン性セルロース誘導体等が含まれる。1つの特定の形態では、四級アンモニウム水溶性モノマーを含有するセルロース誘導体である「CelQuat（登録商標）SC-230M」又は「H-100」（「National Starch & Chemical, Inc.」から入手可能）を用いることができる。正味の負の電荷を有する多価電解質の適切な一部の例には、以下に限定されるものではないが、ポリ（エチレン-コ-メタクリル酸ナトリウム塩）のようなポリアクリル酸が含まれる。更に、他の多価電解質を用いることができることを理解すべきである。両親媒性多価電解質（すなわち、極性部分及び非極性部分を有する）のようなこれらの一部は、ほぼ中性の正味の電

40

50

荷を有することができる。例えば、適切な両親媒性多価電解質の一部の例には、以下に限定されるものではないが、ポリ(スチリル - b - N - メチル 2 - ビニルピリジニウムヨージド)及びポリ(スチリル - b - アクリル酸)が含まれ、その両方は、カナダのドーバル所在の「Polymer Source, Inc.」から入手可能である。

#### 【0033】

第1の捕捉試薬は、検体と抱合粒子の間に形成される錯体のための静止結合部位として働く。より詳細には、抗体、抗原などのような検体は、一般的に、2つ又はそれよりも多くの結合部位(例えば、エピトープ)を有する。検出区画30に到達すると、これらの結合部位の1つは、プローブの特異的結合員によって占有される。しかし、検体の遊離結合部位は、不動化捕捉試薬に結合することができる。不動化捕捉試薬に結合すると、合成されたプローブは、新しい三元サンドイッチ錯体を形成する。

10

#### 【0034】

検出区画30は、一般的に、使用者が、試験試料内の特定の検体の濃度を更に良好に判断することができるように、あらゆる数の異なる検出領域を提供することができる。各領域は、同じ捕捉試薬を収容ことができ、又は複数の検体を捕捉するために異なる捕捉試薬を収容することもできる。例えば、検出区画30は、2つ又はそれよりも多くの異なる検出領域(例えば、線、ドット等)を含むことができる。検出領域は、分析装置20を通る試験試料の流れに実質的に垂直な方向の線の形態に配置することができる。同様に、一部の実施形態では、検出領域は、分析装置20を通る試験試料の流れに実質的に平行な方向の線の形態に配置することができる。

20

#### 【0035】

従来の横流型サンドイッチ装置では、非錯体化検体は、検出区画に位置する捕捉試薬に対して錯体化検体と競合し、検体の存在の指示を減少させると考えられる。時間に対する信号強度のグラフ表示では、この減少は、フックに似ており、従って、この現象は、「フック効果」として公知である。試験試料を抱合粒子の下流に配置すると、一部の検体は、抱合粒子と接触する前に捕捉試薬と錯体化することになる。それにより、一般的に、試薬の捕捉部位の全て又は実質的に全ては、検体に占有されることになる。抱合粒子は、検出区画に到達すると、実質的に新しい三元サンドイッチ錯体を形成する。この配列は、検体が事実上全ての捕捉試薬に結合し、(十分な検体が存在する場合)、かつ過剰な検出プローブが、事実上全ての捕捉試薬部位が錯体化検体を含有することを保証するので、以前の分析に見られた「フック効果」を消失させるのに役立つものである。

30

#### 【0036】

再び図1を参照すると、多孔性膜22は、検出区画30の下流に位置決めされた対照区画32を収容することができる。対照区画32は、一般的に、単一の異なる領域(例えば、線、ドット等)であるが、本発明では複数の領域も勿論考えられている。例えば、図示の実施形態では、単一の線が用いられている。対照区画32は、装置20を通る緩衝液及び検出プローブの流れに実質的に垂直な方向に配置することができる。同様に、一部の実施形態では、区画32は、装置20を通る流れに実質的に平行な方向に配置することができる。

40

#### 【0037】

その構成に関わらず、第2の捕捉試薬は、対照区画32内の多孔性膜22上に不動化することができる。第2の捕捉試薬は、検出区画30で第1の捕捉試薬に結合しないあらゆる抱合粒子、及び/又は検体/抱合化粒子錯体のための静止結合部位として働く。第2の捕捉試薬は、錯体化及び非錯体化抱合粒子の両方に結合することが望ましいので、第2の捕捉試薬は、通常は第1の捕捉試薬と異なっている。一実施形態では、第2の捕捉試薬は、第1の捕捉試薬と異なる生物学的捕捉試薬(例えば、抗原、ハプテン、タンパク質A又はG、ニュートラアビジン、アビジン、ストレプトアビジン、1次又は2次抗体(例えば、ポリクローナル、モノクローナル等)、及びその錯体)である。例えば、第1の捕捉試薬は、モノクローナル抗体(例えば、「CRP Mab1」とすることができ、第2の捕捉試薬は、アビジン(高カチオン性66、000ダルトン糖タンパク質)、ストレプト

50

アビジン（非グリコシル化52、800ダルトンタンパク質）、ニュートラアビジン（脱グリコシル化アビジン誘導体）、及び/又はキャプトアビジン（ニトロ化アビジン誘導体）とすることができる。この実施形態では、第2の捕捉試薬は、ビオチンに結合することができ、これは、第1の捕捉試薬のモノクローナル抗体（例えば、「CRP Mab2」と異なるモノクローナル抗体で抱合された検出プローブにビオチン化されるか又は収容される。

#### 【0038】

更に、対照区画32の第2の捕捉試薬に様々な非生物学的材料を用いることも望ましい場合がある。多くの事例において、このような非生物学的捕捉試薬は、残りの抱合化検出プローブ、及び/又は検体/抱合化プローブの全てを錯体化することをより良く保証するのに特に望ましいであろう。例として多価電解質材料がある。蛍光検出を用いて、検出及び対照区画の検体の存在を検出することができ、これはまた、一般的に、励起光子からの放出光子を単離する波長のフィルタ処理と、放出光子を示し、かつ記録可能な出力を通常電気信号又は写真画像として生成する検出器とを利用する。この種類の検出器の例には、分光蛍光光度計及びマイクロプレート読取器；蛍光顕微鏡；蛍光スキャナ；及びフローサイトメーターが含まれる。本発明に用いるのに適切な1つの蛍光検出器は、ニュージャージー州エジソン所在の「SPEX Industries, Inc.」から販売されている「Fluorolog I II 分光蛍光光度計」である。

10

#### 【0039】

必要に応じて、本発明には、「時間分解蛍光検出」として公知の技術を利用することもできる。時間分解蛍光検出は、ユーロピウム（Eu（I II））及びテルビウム（Tb（I II））のランタニドキレートのようなある一定の蛍光材料の蛍光特性を利用することによって放出源から又は散乱過程（励起放射の散乱からもたらされる）からの背景信号を低減するように設計されている。このようなキレートは、十分に短い波長でキレートを励起した後強い赤方シフトした狭帯域の長寿命発光を示すことができる。典型的に、キレートは、発色団が分子内でランタニドの近くに位置するために、強力な紫外線吸収帯を有する。発色団による光吸収に続いて、励起エネルギーは、励起発色団からランタニドに移行することができる。これは、次に、ランタニドの蛍光発光特性に従うことになる。パルス励起及び時間ゲート検出の狭帯域発光フィルタと組み合わせた使用は、ランタニドキレートのみからの蛍光の特異的な検出を考慮し、試料に存在する典型的に短寿命又は短波長発光の他の化学種からの発光を拒絶するものである。

20

30

#### 【実施例1】

#### 【0040】

この考えを以下の実験設定で試験した。すなわち、ヤギ抗マウス抗体（GAM）をリン酸緩衝生理食塩水（PBS）（pH7.2）で0.1mg/mlまで希釈し、「Kinematic 1600」コーティング機械を用いて分取率1ul/cm、ベッド速度5センチメートル/秒で「Millipore」ニトロセルロース「HF120」膜上に筋状に配置した。「Scipac」C反応性タンパク質（CRP）（英国ケント所在の「Sittingbourne」）を水で希釈して最終濃度2.6mg/mlにし、分取率1ul/cmでGAM試験線の下に筋状に配置した。このカードは、37で1時間放置して乾燥させた。

40

#### 【0041】

「VF2」（ニュージャージー州クリフトン所在の「Whatman Corp.」から）及び「GF33」（ガラス繊維）抱合体パッド材料（マサチューセッツ州ビルリカ所在の「Millipore Corp.」から）を手動のギロチンカッターを用いて30mm×34mmのバンドに切断した。抱合体のためのモノクローナル抗体は、「Mab1」（カタログ番号10-C07、米国マサチューセッツ州01742-3049、コンコード所在の「Fitzgerald Industries International, Inc.」から）であった、このCRP抗体は、20nm直径の金粒子に抱合された。得られる抱合体は、1:1でヤギ抗ラビット（GAR）抱合体金粒子（40nm直径）

50

と混合した。抗CRP原液抱合体は、光学密度(OD)3.2であり、従って、それがGARと1:1比で混合されると、OD1.6まで減少する。これを2mMの「Borax」(pH7.2)及び50%ショ糖(最終的に10%ショ糖)で更に希釈し、最終的なODを1.0にした。「Borax」は、有効な数少ない種類の緩衝液の1つであり、スクロース又は他の親水性材料は、その水中の高溶解度によって乾燥粒子の再懸濁を助けるものである。

#### 【0042】

抱合体は、「Kinematic 1600」コーティング機械を用いて「VF2」バンド上にこのバンドの縁から10mm離し、かつ対照バンドとして反対側の縁から3mm離して、5ul/cm、5センチメートル/秒でスプレーした。これらは、相対湿度20パーセント未満及び室温で一晩放置して乾燥させた。抱合体バンド及び吸上げ材料(Whatmanからの「CF6」)を20mm幅のバンドに切断し、筋状の「HF120」膜上に積層した。積層体バンドは、次に、計深棒を作るために「Kinematic 2360」を用いて4mm幅のストリップに切断された。

#### 【0043】

この実験には、EDTA処理全血又は校正生理食塩水(ワシントン州シアトル所在の「Kamaya standards」)のいずれかを用いた。「Scipac CRP」を全血に加えて、最終濃度を2.5、10、20、40、80、及び160ug/mlとした。「GF33」実験には、「Kamaya」標準生理食塩水を用いた。対照の試験ストリップに対しては、容積式ピペットを用いて1ulの量の全血を線の「VF2」パッドの底部からほぼ13mmに加え、一方、本発明の分析に対しては、1ulの血液をスプレーした抱合体バンドの直後(バンドの端部から~13mm)に加えた。次に、「PBS」を2%「TWEEN(登録商標)20」界面活性剤(Sigma-Aldrich Chemical Co.)と共に緩衝液リザーバの吸上げストリップの反対端に加え、ハウジングの蓋を所定位置にクランプで留めた。試験ストリップは、30分にわたって実施したままにし、その後視覚的に結果を読み取った。

#### 【0044】

本発明の分析により、試験線に遥かに強い信号が生じた。「阻害/オーバーフロー分析」のこの特別な場合の実施例に対しては、信号線として作用するGAM線は、検体(この場合、CRP)のレベルが増大するとその強度が増大するので、本方法を用いた時に遥かに強い信号を有していた。

上述のように、血液試料を試験ストリップの基線から13mmに付加することに加えて、血液試料に対する別の位置を評価した。これらは、試験ストリップの基線から測定すると5mm~29mmの範囲であった。これらの位置の全ては、試験信号の結果(例えば、線強度又は品質)に影響を及ぼす可能性がある。より詳細には、基線の近くに試料(例えば、血液)を付加するほど、背景が明瞭になり、従って、試験線での信号が改善することが見出された。このような信号の改善は、より強くより集中した線、優れた線品質、又は試験ストリップの他の区域上のより低い背景信号のいずれかの形をとった。

本発明をその特定のな実施形態に関して詳細に説明したが、当業者は、以上の理解が得られれば、これらの実施形態に対する代替、その変形、及びそれに対する均等物を容易に考えることができることは認められるであろう。従って、本発明の範囲は、特許請求の範囲及びそれに対するあらゆる均等物の範囲として理解されるべきである。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0045】

【図1】本発明の横流型分析装置の一実施形態の斜視図である。

#### 【符号の説明】

#### 【0046】

- 20 横流型分析装置
- 22 多孔性膜
- 30 検出区画

10

20

30

40

50

3 2 对照区画

【图 1】

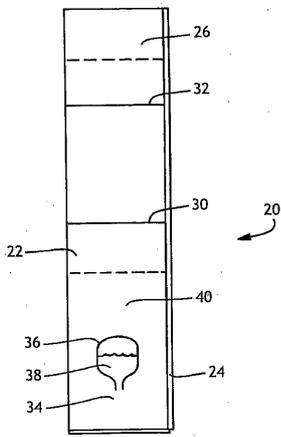


FIG. 1

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International Application No PC77US2005/034653										
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> G01N33/543												
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) G01N												
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 practical, search terms used)												
<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	WO 03/025573 A (PHARMACIA DIAGNOSTICS AB; MENDEL-HARTVIG, IB; BJOERKMAN, RUNE; RUNDSTR) 27 March 2003 (2003-03-27) abstract page 5, paragraph 2 - paragraph 5; claim 1 page 6, paragraph 1	1-20										
A	EP 0 703 454 A (UNIPATH LIMITED; UNILEVER N.V; UNILEVER PLC) 27 March 1996 (1996-03-27) the whole document	1-20										
A	WO 97/34147 A (BOEHRINGER MANNHEIM GMBH; BAUSBACK, JOERG) 18 September 1997 (1997-09-18) the whole document	1-20										
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.												
* Special categories of cited documents : <table border="0"> <tr> <td>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*E* earlier document but published on or after the international filing date</td> <td>*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</td> </tr> <tr> <td>*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)</td> <td>*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.</td> </tr> <tr> <td>*O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td>*Z* document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>			*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 document but 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	*Z* document member of the same patent family	*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
*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 document but 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	*Z* 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		Date of mailing of the international search report										
25 January 2006		03/02/2006										
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Weijland, A										

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/US2005/034653

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 03025573	A	27-03-2003	CA 2460072 A1	27-03-2003
			EP 1436621 A1	14-07-2004
			JP 2005503556 T	03-02-2005
EP 0703454	A	27-03-1996	AT 210298 T	15-12-2001
			AU 3652295 A	09-04-1996
			BR 9509029 A	28-10-1997
			CA 2199824 A1	28-03-1996
			CN 1166875 A	03-12-1997
			CZ 9700896 A3	15-10-1997
			DE 29515207 U1	23-11-1995
			DE 69524337 D1	17-01-2002
			DE 69524337 T2	17-10-2002
			DK 703454 T3	02-04-2002
			WO 9609553 A1	28-03-1996
			ES 2109199 A1	01-01-1998
			ES 2169107 T3	01-07-2002
			FR 2725024 A1	29-03-1996
			HK 1014270 A1	23-08-2002
			HU 77371 A2	30-03-1998
			IT T0950207 U1	24-03-1997
			JP 2000121639 A	28-04-2000
			JP 3171262 B2	28-05-2001
			JP 10503024 T	17-03-1998
			KR 251998 B1	01-06-2000
			NZ 293948 A	28-10-1999
			PL 319353 A1	04-08-1997
PT 703454 T	31-05-2002			
WO 9734147	A	18-09-1997	DE 19609838 A1	18-09-1997
			EP 0888548 A1	07-01-1999
			JP 2000506277 T	23-05-2000
			US 6335205 B1	01-01-2002

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, 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, IS, IT, LT, LU, LV, 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, KM, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ケイラー ローザン マリー  
 アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 1 3 1 カミング ウィリアムズバーグ ドライヴ 7 4 8  
 0

(72)発明者 ウェイ ニン  
 アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 0 7 5 ロズウェル サマーヒル ドライヴ 5 3 0

(72)発明者 チディベル - エズ チビューズ  
 アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 3 3 1 アトランタ サウスウエスト ウルフ クリーク  
 サークル 3 9 4 5

(72)発明者 フィースター ショーン レイ  
 アメリカ合衆国 ジョージア州 3 0 0 9 7 デュールース ステッドフォード レーン 5 2 5

(72)発明者 クリストファー ポール  
 イギリス シーエフ3 8 1エイジェイ サウス ウェールズ ロンダ シノン タフ ポンティ  
 プリード イフェイル イサフ パルク ナン セリン 4 7

专利名称(译)	具有高样品效率的横向流动免疫测定装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2008524582A</a>	公开(公告)日	2008-07-10
申请号	JP2007546641	申请日	2005-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	金佰利-克拉克环球有限公司		
申请(专利权)人(译)	金佰利Worldwide公司		
[标]发明人	ケイラーローザンマリー ウェイニン チディベルエズチビユーズ フィースターショーンレイ クリストファーポール		
发明人	ケイラー ローザン マリー ウェイ ニン チディベル-エズ チビユーズ フィースター ショーン レイ クリストファー ポール		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/558		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/53.U G01N33/569.F G01N33/569.H G01N33/543.541.Z		
代理人(译)	西岛隆义 须田博之		
优先权	11/012759 2004-12-15 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种用于检测测试样品中存在的分析物的存在或量提供的光谱仪。A具有在与结合垫和芯吸垫，用于检测测试样品中存在的分析物的存在或量的横向流动分析装置连通的多孔膜。多孔膜，分析物和分析物 - 用具有固定一个第一捕获试剂的检测部分被配置为产生检测信号耦合到至少所述共轭复数的一部分。对照隔室可位于多孔膜的检测隔室的下游，并具有固定在对照隔室中的第二捕获试剂。缀合垫位于检测隔室的上游，并具有检测探针，其具有对分析物特异的结合成员。将样品沉积在对照隔室和检测隔室之间。缓冲器释放区位于偶联物垫的上游，以提供可检测的探针与缓冲装置加入其中用来使所述检测区和控制区。点域1

