

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4851507号
(P4851507)

(45) 発行日 平成24年1月11日 (2012. 1. 11)

(24) 登録日 平成23年10月28日 (2011. 10. 28)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 2 1

GO 1 N 33/569 (2006. 01)

GO 1 N 33/569 F

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/569 H

GO 1 N 33/53 U

請求項の数 39 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2008-500982 (P2008-500982)
 (86) (22) 出願日 平成18年3月10日 (2006. 3. 10)
 (65) 公表番号 特表2008-533472 (P2008-533472A)
 (43) 公表日 平成20年8月21日 (2008. 8. 21)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2006/008688
 (87) 国際公開番号 W02006/099191
 (87) 国際公開日 平成18年9月21日 (2006. 9. 21)
 審査請求日 平成21年2月18日 (2009. 2. 18)
 (31) 優先権主張番号 60/660, 695
 (32) 優先日 平成17年3月11日 (2005. 3. 11)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/680, 884
 (32) 優先日 平成17年5月13日 (2005. 5. 13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507303136
 ケムバイオ ダイアグノスティック シス
 テムズ, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, ニューヨーク 1 1 7 6
 3, メドフォード, ホースブロック ロー
 ド 3 6 6 1
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100077517
 弁理士 石田 敬
 (74) 代理人 100087871
 弁理士 福本 積
 (74) 代理人 100087413
 弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 二経路免疫アッセイ装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

溶液と使用するため、及びマーカーを有するコンジュゲートと使用するための試験装置であって、液体サンプル中のリガンドの存在を判定することを目的とし、当該試験装置が以下の：

a) 溶液を受容するための第一位置を有し、そして当該溶液及び当該コンジュゲート用の第一移動経路を規定する第一吸着性ストリップ；

b) 上記第一吸着性ストリップとは区別される第二吸着性ストリップであって、上記液体サンプルを受容する第二位置を有し、そして上記第一移動経路とは区別される当該サンプル用の第二移動経路を規定する上記第二吸着性ストリップ；及び

c) 上記第一吸着性ストリップ及び／又は第二吸着性ストリップの上又は内に位置する試験部位であって、当該試験部位が固定されたりガンド結合メカニズムを有し、そして当該第一及び第二吸着性ストリップが互いに当該試験部位で接触し、そして上記液体サンプルを上記第二位置に適用することが、当該液体サンプルが試験部位へと横方向に流れるための時間を必要とし、そして適用した際に当該試験部位を即座に濡れさせないように、当該第二移動経路が第二位置から少なくとも当該試験部位へと横方向に伸張している、上記試験部位

を含む、前記試験装置。

【請求項 2】

以下の：

10

20

d) 前記第一位置に隣接する第一開口部、前記第二位置に隣接する第二開口部、及び前記試験部位に隣接する窓であって、当該窓を通して上記試験部位を見ることができる窓を規定するハウジング

をさらに含む、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 3】

前記コンジュゲートをさらに含み、ここで、前記第一吸着性ストリップが当該コンジュゲートを支持する、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 4】

前記リガンド-結合メカニズムが、前記リガンドに対する抗原又は抗体であり、そして前記コンジュゲートが、当該リガンドに対する抗原又は抗体、及び当該抗原又は抗体に結合されたマーカーを含む、請求項 3 に記載の試験装置。

10

【請求項 5】

前記マーカーが、可視スペクトルにおいて見ることができる着色マーカーである、請求項 4 に記載の試験装置。

【請求項 6】

前記第一及び第二吸着性ストリップのうちの 1 又は両方が対照部位を含む、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 7】

前記第一吸着性ストリップ及び前記第二吸着性ストリップが「T」型に配置される、請求項 1 に記載の試験装置。

20

【請求項 8】

前記第一吸着性ストリップ及び前記第二吸着性ストリップが「+」型に配置される、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 9】

前記第一吸着性ストリップが第一孔サイズを有し、そして前記第二吸着性ストリップが第二孔サイズを有する、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 10】

前記第二孔サイズが前記第一孔サイズより大きい、請求項 9 に記載の試験装置。

【請求項 11】

前記第一孔サイズが 3 ~ 20 μm であり、そして前記第二孔サイズが 20 ~ 40 μm である、請求項 10 に記載の試験装置。

30

【請求項 12】

前記第一及び第二吸着性ストリップのうちの 1 又は両方が対照部位を含み、そして前記窓が当該対照部位を見ることを可能にする大きさにされるか、又は当該対照部位を見ることを可能にするように第二窓が当該ハウジングに提供される、請求項 2 に記載の試験装置。

【請求項 13】

前記溶液をさらに含み、ここで当該溶液が緩衝液を含む、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 14】

前記溶液をさらに含み、ここで当該溶液が、緩衝液、及び前記リガンドに対する抗原又は抗体と当該抗原又は抗体に結合されたマーカーを有するコンジュゲートのサブシステムを含む、請求項 1 に記載の試験装置。

40

【請求項 15】

前記固定されたりガンド結合メカニズムが、HIV 抗原又は抗体を含む、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 16】

前記固定されたりガンド結合メカニズムが、妊娠、HIV、結核(TB)、プリオン、尿検査/薬剤、クラミジア、心臓病マーカー、癌マーカー、シャーガス病、口腔内細菌(SM/LC)、A 型連鎖球菌、A 型インフルエンザ、B 型インフルエンザ、アデノウイルス/ロタウイルス、CPV、FIV、FeLV、及び犬系状虫のうちの少なくとも 1 の試験

50

用の抗原、抗体、アプタマー、核酸、又は酵素を含む、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 17】

前記第一吸着性ストリップが第一膜及び第一裏打ちを含み、そして前記第二吸着性ストリップが第二膜及び第二裏打ちを含み、そして当該第一膜が当該第二膜と接触するように、当該第一吸着性ストリップ及び当該第二吸着性ストリップが配置される、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 18】

前記第一吸着性ストリップの上又は下に横たわっている第一粘着性裏打ちカードをさらに含む、請求項 17 に記載の試験装置。

【請求項 19】

前記第二吸着性ストリップの上又は下に横たわっている第二粘着性裏打ちカードをさらに含む、請求項 18 に記載の試験装置。

【請求項 20】

前記第一吸着性ストリップ及び前記第二吸着性ストリップは、前記第一吸着性ストリップ及び前記第二吸着性ストリップの両方をまとめる 1 の膜を含む、請求項 1 に記載の試験ストリップ。

【請求項 21】

前記試験装置が、前記液体サンプル中に複数の異なるリガンドの存在を判定するためのものであり、そして

前記試験部位が、上記複数の異なるリガンドのそれぞれに別々に結合するための複数の離して固定されたりガンド結合メカニズムを有する、

請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 22】

前記複数の離して固定されたりガンド結合メカニズムが、結核抗原及び少なくとも 1 の HIV 抗原を含む、請求項 21 に記載の試験装置。

【請求項 23】

前記複数の離して固定されたりガンド結合メカニズムが、p24 抗体並びに HIV 1 及び HIV 2 抗原の少なくとも 1 を含む、請求項 21 に記載の試験装置。

【請求項 24】

前記第一吸着性ストリップが、前記複数の異なるリガンドに対する抗原及び / 又は抗体、並びに当該抗原及び / 又は抗体に結合されたマーカーを含む複数の異なるコンジュゲートを支持する、請求項 21 に記載の試験装置。

【請求項 25】

前記固定されたりガンド結合メカニズムが、それぞれ異なる HIV 抗原又は抗体を含む少なくとも 4 個の線に配置される、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 26】

前記異なる HIV 抗原又は抗体が、少なくとも 4 個の p24、gp41、gp120、gp160、及び gp36 を含む、請求項 25 に記載の試験装置。

【請求項 27】

前記試験部位の少なくとも一部が、目に見える着色色素で染色される、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 28】

マーカーを有するコンジュゲートと用いるための試験装置であって、液体サンプル中のリガンドの存在を判定することを目的とし、以下の：

a) 溶液を受容するための第一位置を有し、そして当該溶液とマーカーを有する上記コンジュゲート用の第一移動経路を規定する第一吸着性ストリップ；

b) 上記第一吸着性ストリップとは区別される第二吸着性ストリップであって、上記液体サンプルを受容するための第二位置を有し、そして上記第一移動経路とは区別される当該サンプル用の第二移動経路を規定し、ここで当該第二移動経路が一時的な結合剤に結合された抗体のコンジュゲートを含み、上記リガンドが上記サンプル中に存在する場合に

10

20

30

40

50

当該抗体が当該リガンドに結合するように選択される、上記第二吸着性ストリップ；及び

c)前記第一吸着性ストリップ及び/又は前記第二吸着性ストリップの上又は中に位置する試験部位であって、当該試験部位が固定された結合剤を有し、上記一時的な結合剤及び当該固定された結合剤は、互いに選択的によく結合する能力について選択されており、当該第一及び第二吸着性ストリップが互いに当該試験部位で接触し、そして上記液体サンプルを上記第二位置に適用することが、当該液体サンプルが試験部位へと横方向に流れるための時間を必要とし、そして適用した際に当該試験部位を即座に濡れさせないように、当該第二移動経路が第二位置から少なくとも当該試験部位へと横方向に伸張している、上記試験部位

を含む、前記試験装置。

10

【請求項 29】

前記リガンドが前記サンプル内に存在する場合に、前記第一吸着性ストリップが、当該リガンドに結合するように選択された第二抗体に結合されたマーカのコンジュゲートを支持する、請求項 28 に記載の試験装置。

【請求項 30】

前記リガンドが p 24 抗原であり、一時的な結合剤に結合された抗体の前記コンジュゲートがビオチンに結合された p 24 モノクローナル抗体であり、そして前記固定された結合剤がストレプトアビジンである、請求項 29 に記載の試験装置。

【請求項 31】

前記リガンドが p 24 抗原であり、一時的な結合剤に結合された抗体の前記コンジュゲートがビオチンに結合された p 24 モノクローナル抗体であり、前記固定された結合剤がストレプトアビジンであり、そして第二抗体に結合されたマーカの前記コンジュゲートが、モノクローナル抗体とコンジュゲートした着色ラテックスである、請求項 29 に記載の試験装置。

20

【請求項 32】

前記第一吸着性ストリップ及び前記第二吸着性ストリップが、非平行配置に配置される、請求項 1 に記載の試験装置。

【請求項 33】

溶液と用いるため、そしてマーカを有するコンジュゲートと用いるための試験装置であって、液体サンプル中のリガンドの存在を判定することを目的とし、当該試験装置が以下の：

30

a)第一長さ及び第一幅を有し、ここで当該第一長さは当該第一幅より実質的に大きく、溶液を受容するための第一位置を有し、そして当該溶液及び上記コンジュゲート用の第一移動経路を規定する第一吸着性ストリップ；

b)第二長さ及び第二幅を有し、ここで当該第二長さは当該第二幅より実質的に大きく、第一吸着性ストリップとは区別される第二吸着性ストリップであって、液体サンプルを受容するための第二位置を有し、そして前記第一移動経路とは区別される当該サンプル用の第二移動経路を規定する、前記第二吸着性ストリップ；及び

c)前記第一及び第二吸着性ストリップのうちの少なくとも 1 の上又は中に位置する試験部位であって、当該試験部位が前記第一及び第二吸着性ストリップのうちの少なくとも 1 の上又は中に配置される固定されたリガンド結合メカニズムを有し、当該試験部位で当該第一吸着性ストリップと第二吸着性ストリップが互いに直接接触し、そして上記液体サンプルを上記第二位置に適用することが、当該液体サンプルが試験部位へと横方向に流れるための時間を必要とし、そして適用した際に当該試験部位を即座に濡れさせないように、当該第二移動経路が第二位置から少なくとも当該試験部位へと横方向に伸張している、上記試験部位

40

を含む、前記試験装置。

【請求項 34】

溶液と用いるため及びマーカを有するコンジュゲートと用いるための試験装置であって、液体サンプル中のリガンドの存在を判定することを目的とし、ここで当該試験装置が

50

以下の：

a) 溶液を受容するための第一位置を規定し、そして当該溶液及び上記コンジュゲート用の第一移動経路を規定する物質の第一部分；

b) 液体サンプルを受容する第二位置を規定し、そして上記第一移動経路に対して非平行である当該サンプル用の第二移動経路を規定する物質の第二部分；及び

c) 物質の上記第一及び／又は第二部分の上又は中に位置する試験部位であって、当該試験部位が、物質の前記第一及び／又は第二部分の上又は中に沈積される固定されたりリガンド-結合メカニズムを有し、そして当該物質の第一及び第二部分が当該試験部位において互いに接触し、そして上記液体サンプルを上記第二位置に適用することが、当該液体サンプルが試験部位へと横方向に流れるための時間を必要とし、そして適用した際に当該試験部位を即座に濡れさせないように、当該第二移動経路が第二位置から少なくとも当該試験部位へと横方向に伸張している、上記試験部位

10

を含む、前記試験装置。

【請求項 3 5】

前記第一及び第二移動経路が前記試験部位で交差する、請求項 3 4 に記載の試験装置。

【請求項 3 6】

リガンドの存在についてサンプルを試験する方法であって、以下の：

a) 以下の：

溶液を受容する第一位置を有し、そして当該溶液用及びマーカを有するコンジュゲート用の第一移動経路を規定する第一吸着性ストリップ、

20

液体サンプルを受容するための第二位置を有し、そして上記第一移動経路とは区別される当該サンプル用の第二移動経路を規定する第二吸着性物質、及び

上記第一吸着性ストリップ及び／又は前記第二吸着性ストリップの上又は中に位置する試験部位であって、当該試験部位が固定されたりリガンド結合メカニズムを有し、そして上記第一及び第二吸着性ストリップが当該試験部位において互いに接触し、そして上記液体サンプルを上記第二位置に適用することが、当該液体サンプルが試験部位へと横方向に流れるための時間を必要とし、そして適用した際に当該試験部位を即座に濡れさせないように、当該第二移動経路が第二位置から少なくとも当該試験部位へと横方向に伸張している、上記試験部位

を有する試験装置を取得し、

30

b) 上記サンプルを上記第二位置にアプライし；

c) 上記サンプルをアプライした後に、上記溶液を第一位置にアプライし；そして

d) 上記試験部位を検査して上記サンプル中における上記リガンドの有無の表示を判定する

を含む、前記方法。

【請求項 3 7】

前記試験装置が、前記第一位置に隣接する第一開口部、前記第二位置に隣接する第二開口部、及び前記試験部位に隣接する窓であって、当該窓を通して前記試験部位を見ることができる窓を規定するハウジングを有し、

前記サンプルをアプライすることが、上記第二開口部を通して上記第二位置に当該サンプルを加えることを含み、

40

前記溶液をアプライすることが、上記第一開口部を通して上記第一位置に溶液を加えることを含み、

前記検査が、上記窓を通した検査を含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

リガンドの存在についてサンプルを試験する方法であって、以下の：

a) 試験部位を有する試験装置に固定されたりリガンド結合メカニズム及び目に見える溶解性指標を提供し；

b) 上記サンプルを上記試験装置にアプライし；

c) 上記試験部位を観察して、上記目に見える指標の消失を観察し；

50

d) 上記目に見える指標の消失後、溶液を上記試験装置にアプライし；そして

e) 当該溶液をアプライした後に、上記試験部位を検査して上記サンプル中の上記リガンドの有無の表示を判定することを含み、ここで

前記試験装置が、以下の：

溶液を受容するための第一位置を有し、そして当該溶液用の及びマーカ-を有するコンジュゲート用の第一移動経路を規定する第一吸着性ストリップ、

サンプルを受容するための第二位置を有し、そして上記第一移動経路とは区別されるサンプル用の第二移動経路を規定する第二吸着性物質

を有し、ここで当該試験部位が上記第一吸着性ストリップ及び/又は第二吸着性ストリップの上又は中に位置し、そして当該第一及び第二吸着性ストリップが互いに当該試験部位で接触しており、そして

前記液体サンプルを前記第二位置に適用することが、当該液体サンプルが試験部位へと横方向に流れるための時間を必要とし、そして適用した際に当該試験部位を即座に濡れさせないように、当該第二移動経路が第二位置から少なくとも当該試験部位へと横方向に伸張している、前記方法。

【請求項 39】

前記検査が、前記試験部位を検査して、マーカ-を有するコンジュゲートが当該試験部位に捕捉されるかを判定することを含む、請求項 38 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、広く免疫アッセイ装置及び使用方法に関する。より具体的に、本発明は、体液中のリガンドの検出用クロマトグラフィー迅速試験ストリップに関する。

【背景技術】

【0002】

多くのタイプのリガンド-受容体アッセイは、例えば血液、尿、又は唾液などの体液中で、しばしば一般的にリガンドと呼ばれる様々な物質の存在を検出するために使用された。これらのアッセイは、抗原抗体反応に関し、放射性、酵素性、蛍光性、又は可視的観察可能なポリスチレン又は金属ゾルタグを含む合成コンジュゲートに関し、そして特別に設計された反応チャンバーに関する。これら全てのアッセイにおいて、選択されたリガンド又は抗原に特異的である受容体、例えば抗体、並びに、リガンド-受容体反応生成物の存在及びいくつかの場合には量を検出するための手段が存在する。定量的測定のために幾つかの試験が設計されるが、多くの場合、陽性/陰性の定性的表示のみが必要とされている。このような定性的アッセイの例として、血液型、多くのタイプの尿検査、妊娠検査、及び A I D S 検査が挙げられる。これらの検査では、凝集又は色の変化の存在などの観察指標が好ましい。

【0003】

定性的アッセイであっても、しばしば試験液体中に目的のリガンドが低濃度でしか存在しないことがあるので、かなり感度が高くない。特に、凝集並びにディップスティック及び変色検査などの他の迅速検出法では、偽陽性は面倒なことになることがある。これらの問題のため、いわゆる「サンドイッチ」アッセイ並びに金属ソル又は他のタイプの着色粒子を使用する他の感度の高い検出メカニズムが開発されてきた。

【0004】

「サンドイッチ」アッセイでは、抗原などの標的検体は、標識抗体と、固体支持体に固定された抗体との間に挟まれる。結合された抗原-標識抗体の複合体の存在及び/又は量を観察することにより読まれる。「競合」免疫アッセイでは、固体表面上に結合された抗体は、未知量の抗原検体を含むサンプルと接触され、そして同じタイプの標識抗原と接触される。固体表面上に結合された標識抗原の量を測定して、サンプル中の抗原検体の量を間接的な測定を提供する。

【0005】

これらの及び他のアッセイが、抗体及び抗原の両者を検出できるので、これらは一般的に免疫化学リガンド-受容体アッセイと、又は単に免疫アッセイと呼ばれる。

【0006】

固相免疫アッセイ装置は、サンドイッチ又は競合タイプのいずれであっても、血液、尿、又は唾液などの生物学的液体サンプル中の検体の高感度検出を提供する。固相免疫アッセイ装置は、リガンド-受容体対の1のメンバー、通常、抗体、抗原、又はハプテンが結合される固体支持体、を包含する。固体支持体の共通する初期の形態は、ラジオイムノアッセイ及び酵素免疫アッセイの分野によく知られていたポリスチレンのプレート、チューブ、又はビーズであった。この10年間で、ナイロン、ニトロセルロース、酢酸セルロース、グラスファイバー、及び他の多孔性ポリマーなどの多くの多孔性物質が固体支持体として使用されてきた。

10

【0007】

抗原、ハプテン、又は抗体などの免疫化学成分の固相担体として多孔性物質を使用する多くの自己含有性免疫アッセイキットが記載されてきた。これらのキットは通常、ディップスティック、フロースルー、又は移動性の構造である。

【0008】

ディップスティックアッセイのより一般的な形態では、家庭用妊娠及び排卵検出キットにより代表されるように、抗体などの免疫化学成分は固相に結合される。アッセイ装置は、インキュベートのために未知抗原検体を含むと疑われているサンプルに浸漬される。次に酵素標識抗体を、同時又はインキュベート時間の後に加えた。次に装置を洗浄し、そして酵素に対する基質を含む第二溶液に挿入する。酵素標識は、存在する場合、基質と相互作用して、固相上に沈澱として沈積するか、又は基質溶液における目に見える色の変化をもたらす着色生成物の形成を引き起こす。

20

【0009】

フロースルータイプの免疫アッセイ装置は、ディップスティックアッセイに付随するインキュベート及び厄介な洗浄ステップの必要性を取り除くように設計された。Valkirsら、米国特許第4,632,901号は、多孔性膜又はフィルターに結合された(標的抗原検体に特異的である)抗体を含む装置であって、当該膜又はフィルターに液体サンプルが加えられる装置を開示する。液体が膜を通過すると、標的検体が抗体に結合する。サンプルの添加後に標識抗体を添加する。標識抗体の視覚検出は、サンプル中の標的抗原検体の存在を指し示す。

30

【0010】

Koromら、EP-A 0 299 359は、調節デリバリーシステムとして機能する膜に標識抗体が取り込まれたフロースルー装置のバリエーションを開示する。

【0011】

ディップスティック及びフロースルータイプの免疫アッセイ装置が複数回の添加及び洗浄ステップを必要とすることにより、最小限の訓練しかうけていない人及び家庭でのユーザーが誤ったアッセイ結果を得る可能性を高める。

【0012】

移動型アッセイでは、膜に当該アッセイを行うために必要とされる試薬が染み込まれている。標識された検体が結合し、そしてアッセイの印が読まれる検体検出領域が提供される。例えば、Tomら、米国特許第4,366,241号及びZukら、米国特許第4,596,275号を参照のこと。しかしながら、検出領域への標識検体の通過を遮断する不所望の固体要素がサンプル中に存在するか又は形成されることにより、移動型アッセイの感度は頻繁に低下する。移動アッセイ装置が多すぎる液体サンプルで溢れさせた場合も、アッセイ感度が低下する。

40

【0013】

移動アッセイ装置は、通常、着色されたラベルに結合された試薬(コンジュゲート)を、装置内に含み、それによりさらに物質を加えることなくアッセイ結果の視覚検出を可能にする。例えば、Bernsteinの米国特許第4,770,853号を参照のこと。そのようなラベルの中

50

で、金ソル粒子、例えばLeuvingによる米国特許第4,313,734号の記載された金ソル粒子、Gribnauらによる米国特許第4,373,932号において記載される色素ソル粒子、Mayら、W08/08534により記載される着色ラテックス、及びCambellら、米国特許第4,703,017号によるリポソーム内にカプセル化された色素が挙げられる。これらの着色ラベルは、適切な固定法の点で一般的に限られている。さらに、これらは、比較的多量のリガンド分子を必要とし、そして高価な試薬を含み、それにより価格が高くなる。こうして、信頼性が高いが、高価でない迅速検出装置についての必要性が残る。正確な結果を提供する一方少量のサンプルを使用することができる高感度のアッセイについての必要性が未だ残っている。

【発明の開示】

【0014】

10

その結果、迅速検出免疫アッセイ装置を提供することは、本発明の目的である。

【0015】

簡単に使用でき、そして正確な結果を提供する免疫アッセイ装置を提供することは、本発明の別の目的である。

【0016】

コンジュゲートを運搬する緩衝溶液と同一の経路に沿って検体を移動することを必要としない免疫アッセイ装置を提供することは、本発明のさらなる目的である。

【0017】

簡単な構造の迅速検出免疫アッセイ装置を提供することも本発明の目的である。

【0018】

20

乾燥又は液体コンジュゲートシステムのいずれかを使用できる免疫アッセイ装置を提供することは本発明のさらなる目的である。

【0019】

本発明の別の目的は、少ないサンプル体積を用いる一方、正確な結果を提供する高感度免疫アッセイ装置を提供することは本発明の別の目的である。

【0020】

異なるタイプの体液について有用である高感度免疫アッセイ装置を提供することは本発明のさらなる目的である。

【0021】

以下に詳細に記載される本目的に沿って、乾燥及び液体コンジュゲート免疫アッセイ装置システムの両方が提供される。本発明のシステムは、以下の：

30

(乾燥コンジュゲートシステムの場合)緩衝溶液又は(液体コンジュゲートシステムの場合)コンジュゲート溶液を受容するための第一位置を有する第一吸着性物質であって、ここで第一吸着性物質が第一水平流路を規定する第一吸着性物質、

サンプルを受容する第二位置を有する第二吸着性物質であって、ここで第二吸着性物質が第一流路とは区別される第二水平流路を規定する第二吸着性物質、並びに

第一及び第二吸着性物質の結合部で、試験領域に配置される固定された抗原又は抗体又は他のリガンド結合性分子、例えばアプタマー、核酸などを有する試験線又は試験部位を有する試験セル

を含む。本明細書の目的では、「流路」又は「移動経路」と併せて使用される場合、「区別される」という用語は、「試験領域を除いて流路で繋がっていない」を意味すると理解すべきである。

40

【0022】

本発明の試験セルがハウジング内に提供される場合、当該ハウジングは、第一位置に隣接する第一開口部及び第二位置に隣接する第二開口部を与えられる。試験線上のハウジングに、観察窓が提供される。

【0023】

本発明の好ましい実施態様では、第一吸着性物質及び第二吸着性物質は、互いに重なる分離された小片であり、そして試験線は、接合部で吸着性物質の1又は両方にプリントされる。或いは、好ましいことではないが、第一及び第二吸着性物質は、互いに一体化する

50

ことができる。本発明のシステムは、好ましくは観察窓から見ることもできる対照線又は部位を含む。

【 0 0 2 4 】

本発明の実施態様の 1 セットに従って、本発明の吸着性物質(及び当該物質が提供されるハウジング)は、T 型に設計され、ここで緩衝液又は緩衝液コンジュゲート溶液を受容するための第一位置は前記 T の上の棒の 1 の末端付近に配置され、サンプルを受容する第二位置は、T の幹の末端付近に配置され、そして吸着性物質は交差部で互いに重なっている。本発明の別のセットの実施態様では、本発明の吸着性物質(及び物質が提供されるハウジング)は、+ 型にされる。ここで緩衝液又は緩衝液コンジュゲート溶液を受容する第一位置が 1 つ目の棒の末端付近に配置され、サンプルを受容する第二位置が第二の棒の 1 の末端の末端付近に配置され、そして吸着性物質が交差部で互いに重なる。もちろん、吸着性物質は、他の形に設計されても良く、そしてハウジングは、吸着性物質が配置される様式に関わらず、他の形、例えば長方形、正方形、不定形などの他の形を取ってもよい。

【 0 0 2 5 】

本発明の 1 の実施態様では、第一及び第二吸着性物質の物質、厚さ、及び長さは、試験部位に到達する液体サンプル及び液体緩衝液が試験部位に到達するタイミングを調節するように選択される。

【 0 0 2 6 】

本発明の乾燥コンジュゲート・システムでは、乾燥コンジュゲートは、第一開口部と試験部位との間で提供される。コンジュゲートは、緩衝液が第一開口部に加えられた場合に、吸着性物質が緩衝液をコンジュゲートに導き、次に当該コンジュゲートが緩衝液によって試験部位に運搬されるように、吸着性物質上又は中に保たれる。本発明の液体コンジュゲート・システムでは、緩衝液 - コンジュゲート液体サブシステム (buffer-conjugate liquid subsystem) が準備され、そして第一開口部に適用される。次に吸着性物質は、緩衝液 - コンジュゲートサブシステムを試験部位に導く。

【 0 0 2 7 】

本発明の 1 の方法に従って、

(乾燥コンジュゲートシステムの場合)緩衝溶液又は(液体コンジュゲートシステムの場合)コンジュゲート溶液を受容する第一位置を有する第一吸着性物質であって、ここで当該第一吸着性物質が第一水平流路を規定する第一吸着性物質、

サンプルを受容する第二位置を有する第二吸着性物質であって、ここで当該第二吸着性物質が、上記第一流路とは区別される第二水平流路を規定する第二吸着性物質、並びに第一吸着性物質と第二吸着性物質との接合部における試験領域に配置された固定された抗原又は抗体、或いは他のリガンド結合性分子、例えばアプタマー、核酸などを有する試験線又は試験部位、

を有する試験セルを含むシステムが提供される。所望される場合、緩衝液又はコンジュゲート溶液を受容する第一開口部、サンプルを受容する第二開口部、そして試験線上に観察窓を有するハウジングが提供される。目的のサンプルは、第二開口部又は位置に提供される。所望される時間の後に、緩衝溶液などの液体を第一開口部又は位置に加える。吸着性物質がコンジュゲートを支持する場合(つまり、乾燥コンジュゲートシステムにおいて)、液体は好ましくは単に緩衝溶液である。吸着性物質がコンジュゲートを支持しない場合(つまり、液体コンジュゲートシステムにおいて)、液体は好ましくは緩衝液コンジュゲート液体サブシステムである。いずれの場合でも、コンジュゲートが試験部位(及び提供される場合対照部位)に移動することを許容する十分な時間の後に、試験部位(及び提供される場合対照部位)は、サンプルが陽性であるか否かを決定するために検査される。

【 0 0 2 8 】

本発明のシステムが、血液、尿、唾液、及び糞便などの様々なタイプのサンプルと併せて使用することができ、そして任意のリガンドの存在を試験するために使用することができるということが認められよう。血液、唾液、又は糞便が提供される場合、第二穴を通して加えられる前に、血液、唾液、又は糞便は緩衝液で希釈されてもよいし、又は混合され

てもよい。或いは、ある場合では、穴を通してサンプルが加えられ、そして次に希釈剤が同じ穴を通して加えられてもよい。

【 0 0 2 9 】

本発明の試験セルは、細菌などの比較的大きな検体に対する従来のクロマトグラフィー免疫アッセイにおいて重大な問題であるサンプル中のコンジュゲートと検体との間の凝集 / 癒着問題を克服するので、従来技術より優れている。特に、従来のクロマトグラフィー免疫アッセイでは、細菌とコンジュゲート抗体との間の複合体は、試験線を移動させるのが困難であり、そして試験ストリップの底又はパッドに留まる傾向を有する。本発明においてコンジュゲートが単独で移動する一方、検体が試験部位への独自の経路を介して適用されるので、サンプルが試験部位に到達するまで検体とコンジュゲートとの間に複合体の結合が存在しない。結果として、本発明のシステムはかなり感度が高くそして特異性が高い。

10

【 0 0 3 0 】

本発明の更なる目的及び利点は、提供された図と一緒に詳細な説明を参照すれば当業者に明らかになるであろう。

【 発明を実施するための最良の形態 】

【 0 0 3 1 】

次に図 1、1 A、及び 1 Bを検討すると、免疫アッセイ装置試験セル 1 0 が提供され、そして以下の：第一及び第二穴 2 4、2 6、及び窓 2 8 を規定する上壁 2 1 を有する T 型ハウジング 2 0；並びにハウジング内で垂直流路及び水平流路を規定する第一及び第二吸着性又は吸水性物質 3 0、3 2 を含む。第一吸着性物質 3 0 は少なくとも 2、そして好ましくは 3 又は 4 の領域を含み、そして複数の物質から作成されてもよい。第一領域 3 1 (フィルター領域と呼ばれることもある) は、第一穴 2 4 に位置し、そして T の接合部に位置する第二領域 3 3 (試験領域と呼ばれることもある) に伸張している。第一領域 3 1 は、好ましくはフィルター 3 1 a、パッド 3 1 b を含む。ここで、当該パッド 3 1 b には、着色マーカーを伴う所望される抗原又は抗体を有するコンジュゲート 3 9 が沈積されそして固定されており、そして薄膜又は吸着性若しくは吸水性物質 3 0 の第一部は、プラスチック製の裏打ちを有するニトロセルロース (図示無し) から作成される。第一領域 3 1 は、緩衝溶液を受容するように適用されて、緩衝溶液がコンジュゲートに接触し、それによりコンジュゲートを移動させることを引き起こし、そしてコンジュゲートを運搬する緩衝溶液を第二領域 3 3 に導く (wick)。第二 (試験) 領域 3 3 は、薄膜 3 0 の第二位置を含み、当該膜上に (試験セルが抗体又は抗原の存在について試験するように設計されるかに依存して) 固定抗原又は抗体を有する試験線 5 0 が、当該技術分野に周知な様に好ましくはプリントされている。試験線 5 0 は、ハウジングに提供される透明なプラスチック製の窓 2 8 を通して見ることができる。薄膜 3 0 の第三部分を含むオプションの第三領域 3 5 (対照領域と呼ばれることもある) は、当該技術分野に周知な様にコンジュゲート抗原 (又は、幾つかの場合、コンジュゲート抗体に結合する抗体、又はさらにコンジュゲート抗体に結合する抗原) に対する抗体を典型的に含む対照線 6 0 でプリントされてもよい。第三領域 3 5 が提供される場合、窓 2 8 は、対照線 6 0 上まで伸張される。所望される場合、オプションの第四領域 3 7 (リザーバー領域と呼ばれることもある) は、当該技術分野に周知な様に導入リザーバー (wicking reservoir) として提供されても良い。第四領域 3 7 は、比較的厚い吸着ペーパー 3 1 d を含む。好ましくは、薄く好ましくは透明なプラスチックフィルム又はカード 3 8 A であって、吸着性物質を適所に維持する粘着性を有するものが、全ての領域の上に横たわっている。当該カード 3 8 は、穴 2 4 への液体のアクセスを遮らないように、穴 2 4 において開口部を有するように切られてもよい。

20

30

40

【 0 0 3 2 】

第二吸着性物質 3 2 は、複数の物質から形成されてもよく、そして好ましくは 2 個領域 6 1、6 3 を含む。第一領域 6 1 (フィルター領域と呼ばれることもある) は、フィルター又はパッド 6 2 並びに薄膜又は吸着性若しくは吸水性の物質 3 2 であって、裏打ち (図示せず) を伴うニトロセルロースから作成されるものの第一部分を含む。第一領域 6 1 は

50

、第二穴 26 に位置し、そして第二領域 63 に伸張する。第二領域 63 は、第一吸着性物質 30 の第二領域 33 と接触する薄膜 32 の第二部分を含む。図 1 A 及び図 1 B に示される様に、第一吸着性物質 30 は、第二吸着性物質 32 の上に横たわっており、その結果膜は（膜と接触する裏打ちに対して、又は互いに）互いに接触しており、そして試験線 50 は効果的に膜の間に位置する。こうして、試験線 50 は、第一吸着性物質 30 の第二領域 33 に加えて、又はその代わりに第二吸着性物質 32 の第二領域 63 上にプリントすることができる。所望される場合、薄いプラスチックフィルム又はカード 38 b であって、第二吸着性物質を適所に維持する粘着性を有するものが使用されてもよい。

【0033】

裏打ちを有する標準型のニトロセルロース・ストリップが第一及び第二膜として使用される場合、異なる孔サイズを有する膜が望ましい。例えば、そして以下に詳細に記載するように、膜 31 (コンジュゲートの移動用)は、 3μ の孔サイズを有し、そして膜 32 (サンプル移動用)は、 15μ の孔サイズを有する。膜 32 に適用されたサンプルは、移動し、そしてサンプル膜 32 に留まる傾向を有し、そしてコンジュゲート膜 31 に移動する傾向を有さない。

【0034】

図 1 の免疫アッセイは、好ましくは以下のように使用される。第一に、抗体(又は抗原)を含む可能性のあるサンプル(図示無し)は、第二開口部つまり穴 26 に提供され、そして第二吸着性物質 32 を通して、第一吸着性物質 30 の第二領域 33 と接触する第二領域 63 に移動することを可能にする。場合により、サンプルを穴 26 に提供した後に、好ましくは緩衝液などの液体の計測量を穴 26 に加えて、サンプルの移動を助ける。それとは関係なく、第一吸着性物質の第二領域 33 の上にプリントされるか又はその中に組み込まれた試験線 50 にサンプルは到達する。サンプル中の抗体(又は抗原)が(存在するならば)試験線 50 に固定された抗原(又は抗体)に結合する機会を与える所望の時間の後に、計量された好ましい液体、例えば緩衝液(図示無し)を第一開口部 24 に加える。コンジュゲートが試験部位 50 (及び提供される場合対照部位 60)に移動することを可能にするため、さらに十分な時間の後に、試験部位 50 (及び提供される場合対照部位 60)は、サンプルが陽性であるか否かを決定するために窓 28 を通して検査される。典型的に、試験部位及び対照部位 60 の両方が着色線を示す場合、サンプル中に抗体(又は抗原)の存在を示す陽性試験が得られる。対照部位 60 のみが着色線を示す場合、サンプル中に抗体(又は抗原)が存在しないことを示す陰性試験が得られる。

【0035】

本発明の方法は、穴 26 がサンプル(及び場合によりいくらかの緩衝液)を受容し、そして最初に使用され、そして穴 24 が緩衝溶液を受容し、そして二番目に使用されるということを示すように番号付けられ及び/又は記入されたハウジングを提供することにより、円滑にされる。

【0036】

免疫アッセイ 10 が以下のように機能するということが当業者により認識されよう。試験線 50 に膜の上に固定された抗原(又は抗体)が与えられるので、試験サンプルが当該抗原に対する抗体(又は上記抗体に対する抗原)を含むならば、当該抗体(又は抗原)は、試験線において上記抗原(又は抗体)に結合するであろう。その後、当該抗体に対する抗原(抗原に対する抗体)であって、着色されたマーカーに結合された抗原を含むコンジュゲート 39 が、試験線へと移動させられる場合、試験サンプルが試験線 50 に保持された抗体(又は抗原)を含むならば、コンジュゲートの抗原(又は抗体)は、当該抗体(又は抗原)へと結合し、そして着色されたマーカーにより、着色線が試験部位 50 に現れるであろう。試験サンプルが抗体(又は抗原)を含まない場合、コンジュゲートは試験部位 50 に結合する抗体(抗原)を有しておらず、そして着色線が試験部位 50 に現れないであろう。他方、対照線 60 に抗体(又は抗原)が与えられているので、コンジュゲートの抗原(又は抗体)は、常に対照線 60 の抗体(又は抗原)に結合し、それにより、コンジュゲートが対照部位 60 に到達したならば対照部位 60 に着色線が生じるであろう。こうして、十分な緩衝液が試験

セルに提供されるならば、着色線は対照部位 6 0 において常に生じ、それにより試験についての対照を提供する。

【 0 0 3 7 】

次に図 2 及び図 2 A について検討すると、本発明の第二実施態様が理解される。図 1、1 A、1 B、2、及び 2 A において、同じ番号が同様の要素について使用される。こうして、図 2 及び 2 A の第二実施態様と、図 1、1 A、及び 1 B の第一実施態様との間の主な違いは、試験セル 1 0 a の第二吸着性物質 3 2 a が(好ましくは、打ち抜きを介して)鍵の形をしているということであると認められよう。鍵型の配置では、領域 6 1 a は、第二狭小領域 6 3 a に収束しているような形にされる。結果として、領域 6 3 a は、試験線 5 0 の位置でほぼ独占的に第一吸着物質 3 0 の第二領域 3 3 に接触している。当業者により、図 2 の免疫アッセイ試験セル 1 0 a が同じ様式で使用され、そして実質的に図 1 の試験セル 1 0 と同じく機能するということが認められよう。

10

【 0 0 3 8 】

次に図 3 について検討すると、本発明の第三実施態様が理解される。図 1、1 A、1 B、及び 3 において、同じ番号が同様の要素について使用される。こうして、図 3 の第三実施態様の試験セル 1 0 b と、図 1、1 A、及び 1 B の第一実施態様の試験セル 1 0 との間の主な違いは、第一ニトロセルロース・ストリップ 3 0 が第二ストリップに接触する場所(試験部位 5 0 及び当該部位に隣接する狭い領域を除き)で、プラスチックなどの非孔性物質 9 9 のかなり薄い層が第二ニトロセルロースストリップ 3 2 上に横たわっている点である。結果として、ストリップ 3 0 及び 3 2 は互いに、試験線 5 0 の位置でほぼ独占的に接触している。当業者により、図 3 の免疫アッセイ試験セル 1 0 b が図 1 の試験セル 1 0 と同じ様式で使用され、そして実質的に図 1 の試験セル 1 0 と同じく機能するということが認められよう。

20

【 0 0 3 9 】

次に図 4 について検討すると、免疫アッセイ装置の第四実施態様が、試験セル 1 0' で示される(図 1 の試験セル 1 0 に対して少し改変される)。ここで当該セル 1 0' は、第一及び第二穴 2 4'、2 6'、及び窓 2 8' を規定する上部壁 2 1' を有する T 型ハウジング 2 0' ; 及びハウジング内に垂直流路、水平流路を規定する第一及び第二吸着性又は吸水性物質 3 0'、3 2' を含む。第一吸着性物質 3 0' は、少なくとも 2、そして好ましくは 3 又は 4 の領域を含み、そして複数の物質から作成されてもよい。第一領域 3 1' (フィルター領域と呼ばれることがある)は、第一穴 2 4' に位置し、そして「T」の結合部に位置する第二領域 3 3' (試験領域と呼ばれることがある)に伸張する。第一領域 3 1' は、好ましくはフィルター、パッド、及び薄膜を含む。ここで、当該パッド上又は中には、着色マーカーが取り付けられた所望される抗体又は抗原を有するコンジュゲート 3 9' が沈積されており、そして当該薄膜は裏打ちを有する(第二及びオプションの第三及び第四領域に伸張する)ニトロセルロースから一般的に製造される。第一領域 3 1' は、緩衝溶液を受容するように適用されて、緩衝溶液をコンジュゲートに接触させ、それにより、コンジュゲートを可動化し、そしてコンジュゲートを運搬する緩衝溶液を第二領域 3 3' へと導入する。第二領域 3 3' に試験線 5 0' をプリントし、以下に記載される様に、第二吸着性物質 3 2' の下に配置される。オプションの第三領域 3 5' (対照領域と呼ばれることがある)には、当該コンジュゲート抗原に対する抗体(又は、幾つかの場合、コンジュゲート抗体に結合する抗体、又はコンジュゲート抗体に結合する抗原)を典型的に含む対照線 6 0' が与えられてもよい。第三領域 3 5' が提供される場合、窓 2 8' は対照線 6 0' 上まで伸張される。所望される場合、任意の第四領域 3 7' (リザーバー領域と呼ばれることがある)は、当該技術分野に知られているように、導入リザーバーとして提供されてもよい。第四領域 3 7' は、比較的厚い吸収紙を含む。好ましくは、4 個の領域全ての下には、吸着物質を適所に維持する接着剤を有する薄いプラスチックフィルムが存在する。

30

40

【 0 0 4 0 】

第二吸着性物質 3 2' は、複数の物質から作られてもよく、そして好ましくは 2 個の領域 6 1'、6 3' を含む。第一領域 6 1' (フィルター領域と呼ばれる)は、第二穴 2 6' に位

50

置し、そして、第一吸着性物質 3 0' の第二領域 3 3' と接触する第二領域 6 3' に伸張する。所望される場合、第二吸着性物質 3 2' の第二領域 6 3' は、当該技術分野に周知であるように、固定された抗原又は抗体(試験セルが、抗体又は抗原の存在について試験するように設計されるかに依存して)を有する試験線 5 0' をプリントされてもよい。第二領域 6 3' 又は第二領域 3 3'、或いはその両方が試験線 5 0' に与えられるに関わらず、試験線 5 0' は、ハウジング内に提供された透明なプラスチックの窓 2 8' を通して見られてもよい。図 4 の線により示される様に(図 1 と比較のこと)、第二吸着性物質 3 2' は、第一吸着性物質 3 0' の上に横たわっており、その結果、両方の物質の薄い膜が、少なくとも試験線の位置で互いに接触する。第二吸着性物質 3 2' は、裏打ちを有する標準的なニトロセルロース・ストリップが提供されるように、図 1 と同じ形であってもよい。或いは、物質 3 2' は、試験線 5 0' の位置でほぼ独占的に第一吸着物質と接触するように、図 2 と同じ形であってもよい。代わりとして、物質 3 2' は、図 1 と同じ形にされてもよく、そして薄い非多孔性物質は、当該物質 3 0' 及び 3 2' が、試験線 5 0' の位置に互いにほぼ独占的に接触するように、図 3 と同様に提供することができる。

【 0 0 4 1 】

図 4 の免疫試験セル 1 0' が、同じ様式で使用されてもよく、そして実質的に図 1 の試験セル 1 0 と同じく機能することを当業者により認められよう。

【 0 0 4 2 】

図 5 について検討すると、免疫アッセイ装置試験セル 1 0'' が提供され、そして以下の：第一及び第二穴 2 4''、2 6''、及び窓 2 8'' を規定する上部壁 2 1'' を有する T 型ハウジング 2 0''；及びハウジング内に垂直流路を規定する T 型吸着性又は吸水性物質 3 0'' を含む。T 型吸着性物質 3 0' は、少なくとも、そして好ましくは 4 又は 5 の領域を含み、そして複数の物質から作成されてもよい。第一領域 3 1'' (フィルター領域と呼ばれることがある)は、第一穴 2 4'' に位置し、そして「T」の接合部に位置する第二領域 3 3'' (試験領域と呼ばれることがある)に伸張する。第一領域 3 1'' は、好ましくはフィルター、パッド、及び薄膜を含む。ここで、当該パッド上又は内には、着色マーカーが取り付けられた所望される抗体又は抗原を有するコンジュゲート 3 9'' が沈積され、そして固定されており、そして当該薄膜は、ニトロセルロース及びその裏打ちから一般的に製造される。第一領域 3 1'' は、緩衝溶液を受容するように適用されて、緩衝溶液をコンジュゲートに接触させ、それにより、コンジュゲートを可動化し、そしてコンジュゲートを運搬する緩衝溶液を第二領域 3 3'' へと導入する。第二(試験)領域 3 3' は、当業者に知られているように膜上に好ましくは固定された抗原又は抗体(試験セルが抗体又は抗原の存在について試験するように設計されているかに依存して)を有する試験線 5 0'' でプリントされる。試験線 5 0'' は、ハウジング内に提供される透明なプラスチックの窓 2 8'' を通して見られる。第三領域 6 1 (第一領域と呼ばれることもある)は、第二穴 2 6'' に位置し、第一及び第二領域により規定されるストリップに垂直であり、そして第二領域 3 3'' に伸びる。オプションの第四領域 3 5'' (対照領域と呼ばれることもある)は、当該技術分野に知られている様に、通常コンジュゲート抗原に対する抗体(又は幾つの場合、コンジュゲート抗体に結合する固体、又はコンジュゲート抗体に結合するさらなる抗体))を含む対照線 6 0'' をプリントされてもよい。第四領域 3 5'' が提供される場合、窓 2 8'' は対照線 6 0'' 上に伸張する。所望される場合、オプションの第五領域 3 7'' (リザーバー領域と呼ばれることがある)は、当該技術分野に知られているように、導入リザーバーとして提供されてもよい。第五領域 3 7'' は、比較的厚い吸収紙を含む。好ましくは、領域全ての下に、吸着物質を適所に維持する接着剤を有する薄いプラスチックフィルムが横たわっている。

【 0 0 4 3 】

図 5 の実施態様は、試験領域で互いの上に横たわる 2 個の分離された物質のストリップを用いる代わりに、領域 3 1''、3 3''、及び好ましくは 3 5'' 及び 3 7'' を有する第一水平ストリップ並びに試験領域 3 3'' で第一ストリップに接触する領域 6 1'' を有する第二(一体型(integral))ストリップを規定する 1 つの T 型膜が使用されると言う点でのみ図

10

20

30

40

50

1～4の実施態様と異なる。図5の実施態様は、水平流路が異なる孔サイズの物質で製造されることを可能にしない一方、第一領域及び第三領域が、第二(試験)領域を介することを除いて互いに流路で繋がっていないので、2個の区別される流路が維持される。

【0044】

次に図6について検討すると、免疫アッセイ装置試験セル110が提供され、そして以下の：第一及び第二穴124、126、及び窓128を規定する上壁121を有する+型ハウジング；及びハウジング内の垂直流路を規定する第一及び第二吸着性又は吸水性物質130、132を含む。第一吸着性物質130は、少なくとも2、そして好ましくは3又は4の領域を含み、そして複数の物質から製造されてもよい。第一領域131(フィルター領域と呼ばれることがある)は、第一穴124に位置し、そして+の接合部に位置する第二領域133(試験領域と呼ばれることもある)に伸張する。第一領域131は、好ましくは、フィルター、着色マーカーを取り付けられた所望の抗原又は抗体を有するコンジュゲート139が沈積されそして固定されるパッド、及び一般的にニトロセルロースから製造される薄膜を含む。第一領域131は、緩衝溶液を受容するように適合されて、緩衝溶液をコンジュゲートに接触させ、それによりコンジュゲートを可動化し、そしてコンジュゲートを運搬する緩衝溶液を第二領域133へと導入する。第二(試験)領域133は、好ましくは当該技術分野に知られているように、(当該試験セルが抗体又は抗原の存在を試験する様に設計されるかに依存して)膜上に固定された抗原又は抗体を有する試験線150が好ましくはプリントされる。試験線150は、ハウジング内に提供された透明なプラスチックの窓128を通して観察されうる。オプションの第三領域135(対照領域と呼ばれることもある)は、当該技術分野に知られているようにコンジュゲート抗原(又は幾つかの場合、コンジュゲート抗体に結合する抗体、又はコンジュゲート抗体に結合する更なる抗原)に対する抗体を一般的に含む対照線160をプリントされてもよい。第三領域135が提供される場合、窓128は対照線160上まで伸張する。所望される場合、オプションの第四領域137(リザーバー領域と呼ばれることもある)は、当該技術分野に周知である導入リザーバーとして提供されてもよい。第四領域137は、比較的厚い吸着紙を含む。好ましくは、(図1Aに見られる様式の)上に横たわっている領域は、吸着性物質を適所に維持する接着剤を有する薄いプラスチックフィルムである。

【0045】

第二吸着性物質132は、複数の物質から製造されてもよく、そして好ましくは少なくとも3個の領域161、163、165を含む。第一領域161(フィルター領域と呼ばれることもある)は、第二穴126に位置し、そして第一吸着性物質130の第二領域133と接触する第二領域163に伸張する。所望される場合、吸着性物質132は、物質130の第二領域133の代わりに又は当該領域に加えて、第二領域163に試験線150をプリントされてもよい。図6に点線により示唆されるように、第一吸着性物質130は、(図1の実施態様と同様に)第二吸着性物質132の上に横たわっている。或いは、第二吸着性物質132は、(図4の実施態様の同様に)第一吸着性物質130の上に横たわるように作成され、この場合、使用される粘着性フィルム及び他の要素は、正しく配置されるべきである。所望される場合、オプションの第三領域165(リザーバー領域とよばれることもある)は、導入リザーバーとして提供されうる。第四領域137は、比較的厚い吸着紙を含む。所望される場合、第二吸着性物質を適所に維持する接着剤を有する薄いプラスチックフィルムが、適所に第二吸着物質を有する薄いプラスチックフィルムが利用されてもよい。

【0046】

図7では、本発明の第七実施態様が見られる。図1、1A、1B、及び7では、同じ番号が同様の要素に使用される。こうして、図7の第七実施態様と、図1、1A、及び1Bの第一実施態様との間の主な違いは、2個の試験線50A及び50Bが第一吸着性物質30の領域33及び/又は第二吸着性物質32の領域63上にプリントされるということであると認識されよう。2個の試験線50A及び50Bは、好ましくは異なる固定抗原又は抗体を含む。例えば、当該線の内の一つ(例えば線50A)は、HIV1ペプチド及び/又

は g p 4 1 / g p 1 2 0 などの組換え抗原を含むことができ、一方他の線(例えば線 5 0 B)が、H I V 2 ペプチド及び / 又は g p 3 6 などの組換え抗原を含むことができる。別の実施例と同様に、これらの線の内の 1 つは、H I V 1、H I V 2、又は H I V 1 / 2 ペプチド及び / 又は組換え抗原を含むことができる一方、もう一方の線は結核菌抗原を含む。以下に記載されるように、線が、1 のコンジュゲート(例えばタンパク質 A)に結合しようとしな固定された抗体又は抗原を含む場合、着色マーカーを取り付けられた所望される抗原又は抗体を有する複数の異なるコンジュゲートを使用することが望ましいであろう。図 7 の免疫アッセイ試験セル 1 0 c が同じ様式で用いられ、そして、サンプル中の被験第一抗体(又は抗原)の存在を示す陽性試験が、試験線 5 0 A 及び対照部位 6 0 が着色線を示すときに得られ；サンプル中の被験第二抗体(又は抗原)の存在を示す陽性試験が、試験線 5 0 B 及び対照部位 6 0 が着色線を示す場合に得られ；そしてサンプル中の被験第一及び第二抗体(又は抗原)の両方の存在を示す陽性試験が、試験線 5 0 A 及び 5 0 B 並びに対照線 6 0 が着色線を示す場合に得られるという点を除いて、図 1 の試験セル 1 0 と実質的に同じく機能するということが当業者により認められよう。サンプル中に抗体(又は抗原)が存在しないことを示す「陰性」試験は、対照部位 6 0 のみが着色線を示し、(そして試験線 5 0 A 及び 5 0 B のいずれもが着色線を示さない)場合に得られる。不適切な試験は、対照部位が着色線を示さない場合に得られる。

【 0 0 4 7 】

図 8 では、本発明の第八実施態様が理解される。図 1、1 A、1 B 及び 8 では、同じ番号が同様の要素について使用される。こうして、図 8 の第八実施態様と、図 1、1 A、及び 1 B の第一実施態様との間の主要な違いは、3 個の試験線 5 0 A、5 0 B、5 0 C が第一吸着性物質の領域 3 3 及び / 又は第二吸着性物質 3 2 の領域 6 3 上にプリントされ、そして 2 個の異なるラテックスコンジュゲート 3 9 A、3 9 B が使用されるということが認められよう。3 個の試験線 5 0 A、5 0 B、及び 5 0 C が、好ましくは異なる固定抗原又は抗体を含む。例えば、線の一つ(例えば、線 5 0 A)は、p 2 4 モノクローナル抗体を含み、第二線(例えば、線 5 0 B)は、H I V 1 ペプチド及び / 又は g p 4 1 / g p 1 2 0 などの組換え抗原を含むことができる一方、第三の線(例えば、5 0 C)は、H I V 2 ペプチド及び / 又は g p 3 6 などの組換え抗原を含むことができる。この場合、2 個のコンジュゲート 3 9 A、3 9 B が提供され、ここでコンジュゲート 3 9 A は、存在する場合 H I V 1 及び H I V 2 抗体に結合するが、p 2 4 抗原には結合しないタンパク質 A とコンジュゲートするラテックスである。そしてここで、コンジュゲート 3 9 B は、存在する場合サンプル中の p 2 4 抗原に結合するが、H I V 1 及び H I V 2 ペプチド及び / 又は組換え抗原には結合しない p 2 4 モノクローナルにコンジュゲートするラテックスである。図 8 に示されるように、コンジュゲート 3 9 A 及び 3 9 B は移動経路の異なる位置に配置される(例えば、1 のパッドの 2 個の部分、又は 2 個の接続されたパッド)。しかしながら、コンジュゲート 3 9 A 及び 3 9 B は、混合物と同じ位置に適用されうということが認められよう。図 8 の免疫アッセイ試験セル 1 0 d が、同じ様式で使用されてもよく、そして H I V についての「陽性」試験が、1 以上の線 5 0 A、5 0 B、5 0 C での、及び対照線 6 0 での色が見えることにより示唆され、「陰性」試験が、対照線 6 0 にのみ色が見えることにより示唆され、そして「不適切な」試験は、着色が対照線 6 0 に存在しない場合に示唆されると言うことを除いて、図 1 の試験セル 1 0 と実質的に同じく機能することが当業者により理解されよう。

【 0 0 4 8 】

本発明の第九実施態様は図 9 に見られる。図 1、1 A、1 B、及び 9 では、同じ番号が同様の要素に使用される。こうして、図 9 の第九実施態様と図 1、1 A、及び 1 B の第一実施態様との間の主な違いは、第二吸着性物質 3 2 ' ' ' が、フィルター又はパッド 6 2 ' ' ' であって、その上に一時的な結合剤(interim binding agent)(マーカーを伴わない)に結合された抗体のコンジュゲート 3 9 ' ' ' を有するものを有する第一領域 6 1 ' ' ' (フィルター領域と呼ばれることがある)を含み、そして試験領域が固定された結合剤の試験線 5 0 を有するという点であることは明らかであろう。一時的な結合剤及び固定された結合剤は、

互いに極めて強く選択的に結合する能力について選択される。こうして、例えば、一時的な結合剤はビオチンであってもよく、そして固定された結合剤はストレプトアビジンであってもよい。サンプル移動経路におけるコンジュゲート 3 9''' は、その結果ビオチンに結合する p 2 4 モノクローナル抗体などの抗体であってもよい。同様に、緩衝液移動経路におけるコンジュゲート 3 9 は、好ましくは目的の抗原に結合する抗体(例えば、モノクローナル抗体)とコンジュゲートするラテックスマーカーである。

【 0 0 4 9 】

p 2 4 ウイルスを検出するために配置される図 9 の試験セル 1 0 e に関して、最初にサンプルは、第二吸着物質 3 2''' に加えられる。サンプルが p 2 4 モノクローナル抗体-ビオチンコンジュゲート 3 9''' に到達した際に、サンプル中に存在する場合 p 2 4 抗原(ウイルス)は、p 2 4 モノクローナル抗体-ビオチンコンジュゲートと結合し、そしてストリップ 3 2''' の試験領域 6 3''' に移動し、ここで当該ビオチンはストリップ 3 2''' 及び / 又はストリップ 3 1 上に配置された試験線 5 0 においてストレプトアビジンにより捕捉されるであろう。こうして、試験線 5 0 は、ビオチンに結合されたストレプトアビジンの複合体を有し、当該ビオチンは p 2 4 モノクローナル抗体に結合しており、当該抗体は次に p 2 4 抗原に結合している。次に緩衝液を第一吸着性物質 3 1 に加える。緩衝液は、ラテックスマーカー-モノクローナル抗体コンジュゲート 3 9 を試験領域 3 3 に運搬し、ここでコンジュゲート 3 9 のモノクローナル抗体は、既に存在する複合体に保持される p 2 4 抗原に結合し、それにより当該マーカーのため生じる着色線を提示する。抗原がサンプル中に存在しない場合、ビオチン-p 2 4 モノクローナル抗体コンジュゲート 3 9''' は、それでもストレプトアビジンに結合し、ストレプトアビジン、ビオチン、及び p 2 4 モノクローナル抗体の複合体を当該試験線に残す。しかしながら、ラテックスマーカーモノクローナル抗体コンジュゲート 3 9 が試験領域に達する場合、モノクローナル抗体は、結合する抗原を有さないであろう。こうして、マーカーコンジュゲート 3 9 は、試験線 5 0 に保持されることはなく、そして陰性試験が表されるであろう。

【 0 0 5 0 】

図 9 のシステムが、かなり高感度の試験をもたらす一次的な結合剤(例えば、ビオチン)と固定された結合剤(例えば、ストレプトアビジン)との高い親和性のため、従来の側方流動システムを超える大きな利点を提供するということが当業者により認められよう。

【 0 0 5 1 】

次に図 1 0 について検討すると、免疫試験キット 2 0 0 が提供され、そしてランセット 2 0 1、緩衝液パック 2 0 2、ループ 2 0 3、アルコールワイプ 2 0 4、絆創膏 2 0 5、及び試験装置又は試験セル 2 1 0 を含む。試験セル 2 1 0 は、他の実施態様の試験セルと類似しているが、ハウジングの代わりに提供される厚紙の裏打ち(cardboard backing) 2 1 5、及び吸着性物質の様々な部分の上に提供されるペーパーカバー 2 1 7 a、2 1 7 b、2 1 7 c などの一定の例外を有した。矢印は、吸着性物質から取り除くためにペーパーカバー 2 1 7 a、2 1 7 b を引く方向を示すために提供される。より具体的に、試験セル 2 1 0 は、垂直水平流路を規定する第一及び第二吸着性又は吸水性物質 2 3 0、2 3 2 を含む。第一吸着性物質 2 3 0 は、少なくとも 2 個、そして好ましくは 3 又は 4 個の領域を含み、そして複数の物質から製造されてもよい。第一領域 2 3 1 (フィルター領域と呼ばれることもある)は、第一吸着性物質の 1 の末端に配置され、そして T の接合部に位置する第二領域 2 3 3 (試験領域とよばれることもある)に伸張する。第一領域 2 3 1 には、好ましくはフィルター、所望の抗原又は抗体を有するコンジュゲート 2 3 9 が配置され、そして固定されるパッド、並びにプラスチック裏打ち(図示無し)を有するニトロセルロースから典型的に製造される吸着性又は吸水性物質 2 3 0 又は薄膜の第一部分を含む。第一領域 2 3 1 は、緩衝溶液を受容するように適合させて、緩衝溶液がコンジュゲートと接触することを引き起こし、それによりコンジュゲートを可動化し、そしてコンジュゲートを運搬する緩衝溶液を第二領域 2 3 3 に導入する。少なくとも第一領域の部分は、典型的にペーパーカバー 2 1 7 a によりカバーされる。第二(試験)領域 2 3 3 は、当該技術分野に周知な様に、膜上に固定された抗原又は抗体(例えば、H I V 1 / 2 検出用の g p 4 1 / g p

120及びgp36ペプチド)を有する1以上の試験線250(1つだけ示される)を好ましくはプリントされる薄膜230の第二部分を含む。試験線250の吸着性物質は、透明なプラスチックカバー(図示無し)によりカバーされていてもカバーされていなくともよい。薄膜230の第三部分を含むオプションの第三領域235(対照領域と呼ばれることもある)は、当該技術分野に知られているように、一般的にコンジュゲート抗原に対する抗体(又は、幾つかの場合、コンジュゲート抗体に結合する抗体、又はさらにコンジュゲート抗体に結合する抗原)を含む対照線260をプリントされてもよい。第三領域は、同様に、透明なプラスチックカバーによりカバーされてもカバーされていなくともよい。所望の場合、オプションの第四領域237(リザーバー領域と呼ばれることもある)は、当該技術分野に周知のように導入リザーバーとして提供されてもよい。第四領域237は、比較的厚い吸収紙を含み、そしてカバー217bによりカバーされてもよい。好ましくは、下に横たわる領域231、235、及び237は、吸着性物質を適所に維持する薄い粘着性のストリップ(図示なし)である。粘着性ストリップは、厚紙215の上に貼られる。

【0052】

第二吸着性物質232は、複数の物質から作られてもよいし、そして好ましくは2つの領域261、263を含む。第一領域261(フィルター領域とも呼ばれることがある)は、フィルター又はパッド262、並びに裏打ち層を有するニトロセルロース(図示せず)から一般的に作成される吸着性若しくは吸水性物質232又は薄膜の第一部分を含む。第一領域261は、第二領域262へと伸張している。第一領域の少なくとも1の部分は、典型的にペーパーカバー217cによりカバーされている。第二領域263は第一吸着性物質230の第二領域233と接触する薄膜232の第二部分を含む。第二吸着性物質232は、第一吸着性物質230の下に横たわっており、その結果当該膜は、互いに接触し、そしてその結果試験線250は効果的に膜の間に配置される。こうして、試験線250は、第一吸着性物質230の第二領域233の代わりに又は加えて、第二吸着性物質232の第二領域263上にプリントされうる。好ましくは、横たわっている領域261及び263が、第二吸着性物質を適所に維持する薄い吸着性ストリップ(図示せず)である。粘着性ストリップは厚紙215の上に置かれる。

【0053】

図10の試験装置210は、前に記載された実施態様の構成のいずれかを想定するように改変することができる。

【0054】

使用者は、キットの要素全てを含むブリストアパック(図示無し)を開け、(提供される場合)試験装置210からペーパーカバーを取り外し、アルコール・ワイブ・パッケージを開口し、そしてアルコールワイブ204で使用者の指を拭き取り、ランセットを取り、そして血液を得るために拭き取られた使用者の指に突き指すことにより、図10の試験キットを使用した。次に好ましくは、ループ203を使用することにより、使用者は一滴の血液(例えば、5 μ l)を回収し、そして当該血液滴を第二吸着物質232の領域261の非カバー部分に配置する。次に使用者は絆創膏のパッケージを開け、そして絆創膏205を突き刺された指に貼った。使用者は次に、緩衝液パック202を開け、そして1滴の緩衝液(例えば30 μ l)を領域261の血液と同じ位置に絞り出した。血液が試験領域263へと移動する所望の時間を待った後に、使用者は、2滴の緩衝液(例えば60 μ l)を第一吸着性物質230の第一領域231に加える。緩衝液を領域231に加えた後に所望の時間(例えば7分)を待った後に、試験線250及び対照線260を観察する。陽性試験は、試験線と対照線の両方で呈色が観察されることにより示される。陰性試験は、対照線で呈色され、そして試験線250で呈色されないことにより示される。対照線260で呈色がなければ、試験結果は不適切なものである。

【0055】

本発明の他の実施態様では、試験セル内に着色マーカーを取り付けられた所望の抗原又は抗体を有する乾燥コンジュゲートの沈積を提供する代わりに、試験セルは、乾燥コンジュゲートを全く含まない。むしろ、(湿潤)緩衝液-コンジュゲート・サブシステムが利用

10

20

30

40

50

され、そしてコンジュゲートパッド(31b-図1A)は必要とされず、その結果、薄いニトロセルロースストリップ又は他の吸着性物質が直接フィルターに結合されてもよい(31a-図1A)。こうしてサンプルがハウジング内の第二穴に入れられ、そして当該試験部位に移動を許容された後に、緩衝液-コンジュゲート・サブシステムは、ハウジング内の第一穴に入れられ、そして同様に試験部位に移動することを許容する。

【0056】

本発明のさらなる実施態様では、ハウジングの上部に提供される観察窓の代わりに、窓はハウジングの底に提供される。

【0057】

本発明の実施態様が、多くの異なる物質を用いて実現されうるということは、当業者により認められよう。例えば、かなり薄い、不活性フィルム、ストリップ、シート、又は膜を典型的に含む吸着性物質は、ニトロセルロース、フィルターペーパー、シリカから製造されてもよいし、又は例えば、微小孔又は微小顆粒、織布、不織布、又はその組合せから製造されてもよい。適切な物質の多くのタイプ及びそれらの組合わせは、Gordonらに対する米国特許第4,960,691号及びZukらに対する米国特許第4,956,275号において記載される。当該文献は両方ともその全てを本明細書に援用する。ニトロセルロース又は他の吸着性物質は、以前に記載される様に薄い非孔性の不活性プラスチック製の裏打ちを伴って提供されよう。

【0058】

こうして、本発明の更なる実施態様では、物質、第一及び第二吸着性物質の厚さ及び長さは、液体サンプル及び液体緩衝液(又は緩衝液-コンジュゲートサブシステム)が試験部位に達するタイミングを調節するために選択される。サンプル/検体及び緩衝液又は緩衝液コンジュゲートサブシステムの別々の移動経路を提供することにより、物質は、システムの感受性を高めるために選ばれてもよい。

【0059】

同様の文脈で、吸着性物質が、多くの様式のいずれかの形であってもよく、そして当該技術分野に知られているように多くの寸法のうちのいずれかを取ることができることが認められよう。こうして迅速な導入を促進するために、吸着性物質は、鍵型にすることができ、ここでストリップは、緩衝溶液を受容する第一穴、並びに試験部位及び対照部位で狭い幅を有し、そしてリザーバー領域で広い幅を有する。このような配置は、Charltonらに対する米国特許第5,979,921号に示される。当該文献はその全てを本明細書に援用される。いずれの場合でも、一般的に、試験ストリップは、幅よりは長さの点で実質的に大きく、そして厚さよりは幅の点で実質的に大きい。実際、本発明の少なくとも一定の実施態様では、試験領域でのストリップは、紙ほどの薄さ(例えば、1mmの厚さ)であるべきであり、そして試験及び対照線が容易に試験ストリップを通して観察することができるように、実質的に半透明であるべきである。

【0060】

さらに、ハウジング及び吸水性物質は、開放側方流動プラットフォーム(open lateral flow platform)に一体化することができる。ここで、射出成形ポリマー(injection molded polymer)に微小支柱(micro pillar)を提供し、微小支柱は、支柱の間で高さ、直径、形状、及び/又は距離を変えることにより溢流を正確に制御することを可能にする。このようなプラットフォームは、本質的に、ハウジングと吸着性導入物質に同じ物質を使用しており、そしてUppsalaのAmic AB、Swedenにより販売される。例えば、www.amic.se.を参照のこと。射出成形ポリマーは、一般的に透明でありうるので、ハウジング全体は、試験及び対照線/部位が観察される窓と考えられてもよい。

【0061】

構築された試験のタイプに依存して(例えば、妊娠、HIV、結核(TB)、プリオン、尿分析/薬剤、心臓マーカー、癌マーカー、シャーガス、クラミジア、口腔内細菌(SMLC)、A型インフルエンザ、B型インフルエンザ、アデノウイルス、ロタウイルス、A群連鎖球菌、他の細菌又はウイルスなど、及びさらにCPV、FIV、FeLV、及び犬

10

20

30

40

50

糸状虫などの獣医学適用)、目的の抗体(又は抗原)は異なり、そしてその結果試験ストリップにおいて使用される抗原(又は抗体)は、それに応じてあつらえる必要がある。同様に、コンジュゲートの抗原又は抗体は、それに応じてあつらえられる必要がある。幾つかの場合(例えばH I V)、コンジュゲートと同一の抗原が、試験ストリップ中に使用されてもよい。なぜならH I V抗体の結合部位は、試験部位で当該H I V抗原と結合し、そして、別のケースでは異なる抗原が必要とされる一方、それでもなお抗原-コンジュゲートに結合するための更なる結合部位を提供するからである。同様に、構築された試験のタイプに依存して対照部位が提供される場合、当該試験タイプに従ってあつらえられる必要がある。こうして、例えば、H I V抗体検出試験では、試験領域において同定されるリガンドがH I V 1及び/又はH I V 2抗体である場合、試験領域における抗原は、H I V 1(例えば、g p 4 1 / g p 1 2 0)とH I V 2 (g p 3 6)ペプチド及び/又は組換え抗原の混合物でありうる。コンジュゲートは、タンパク質A、タンパク質A/G、抗ヒトI g G / I g M、ペプチド、又は組換え抗原にコンジュゲートされた着色ラテックス又は金コロイドでありうる。

10

【 0 0 6 2 】

コンジュゲートのマーカーが、金属ゾルの様々なタイプ、着色ラテックス、様々な酵素のいずれかを含む多くの形態をとるということが、当業者により認められよう。本発明の好ましい実施態様が、裸眼で容易に見ることができる検出シグナルを提供する一方、本発明が紫外線放射又は蛍光顕微鏡などの他の技術により検出できる他のマーカーを包含するということが認められよう。こうして、本発明の試験セルを利用するシステムであって、蛍光顕微鏡又はデジタルなどの自動化リーダーにより読み取られるシステムが提供される。

20

【 0 0 6 3 】

本発明は、アッセイの特異性を損なうことなく、改善された感受性を提供する。この感受性の改善についての主な理由は、区別された移動経路のために試験領域へのサンプルの移動が改善されること、そしてコンジュゲートされたマーカーと試験領域の複合体との反応前に、試験領域の結合部位に検体を効果的に結合できることである。例えば、H I V試験の場合、第二吸着性ストリップに適用された血液血清サンプル中のH I V特異的抗体は、試験領域に移動し、そしてH I V試験線に結合する。体内の他の免疫グロブリン(I g G)は、試験領域に固定されたH I V抗原に結合しない。緩衝溶液を第一吸着性ストリップに加えて、ラテックス又は金とコンジュゲートされたタンパク質Aを試験領域へと移動させる場合、当該タンパク質Aコンジュゲートは、試験線においてH I Vペプチドにより既に捕捉されるH I V抗体のF C部分に結合するであろう。タンパク質AとH I V抗体のF C部分との間の結合はかなり強力であるので、検出するために少量のH I V抗体しか必要としない。これは、試験線に移動する前に血液サンプル中の全てのヒトI g G(H I V抗体を含む)がタンパク質Aに結合する従来の側方流動H I V試験システムとは対照的である。なぜなら、タンパク質Aは非特異的に全てのI g Gに結合してしまうからである。こうして、タンパク質A、I g G、金/ラテックス複合体の全部が、H I V抗原を含む試験線に移動するであろう。次にH I V抗体、タンパク質A、金/ラテックスコンジュゲートのみがH I V抗原に結合するであろう。しかしながら、サンプル中に大量の関係ないI g Gが存在し、そして少量のH I V抗体しか存在しないため、十分な量のH I V抗体がタンパク質Aに結合せず、そして呈色線が目に見えないという危険性がある。

30

40

【 0 0 6 4 】

本発明の増大された感受性は、標準迅速試験T B免疫アッセイ(T B S t a t - P a k I I)に対して、図10に実質的に示される本発明のT B免疫アッセイ(New Generation)により試験された。16のサンプルを作成し、2個のサンプルを各々8個の異なるレベルの抗体で作成した(32 U / m l、8 U / m l、2 U / m l、1 U / m l、1 / 2 U / m l、1 / 4 U / m l、1 / 8 U / m l、及び対照である0 U / m l)。比較試験の結果は、図11に見られ、本発明の免疫アッセイは、標準的な従来技術の試験に比較して少なくとも8倍の感度の増加を示した(つまり、本発明の免疫アッセイでは1 / 4 U / m lで陽性結果が検出さ

50

れ、そして従来技術の免疫アッセイでは、 2 U/ml で不確かな結果が検出された)。さらに、陰性サンプルの20の試験は、偽陽性の結果を示さなかった。

【0065】

本発明の増大された感受性は、図10に実質的に示される様に、本発明のHIV1及びHIV2免疫アッセイ(NG HIV試験)を、標準タイプの迅速試験HIV免疫アッセイ(HIV Stat-Pak)に対して比較することにより試験された。サンプルは、異なる希釈レベルで作成された(HIV-1について、 $1:64$ 、 $1:128$ 、 $1:256$ 、 $1:512$ 、 $1:1024$ 、 $1:2048$ 、 $1:4096$ 、 $1:8192$ 、及びHIV-2について、 $1:4$ 、 $1:8$ 、 $1:16$ 、 $1:32$ 、 $1:64$ 、 $1:128$ 、 $1:256$ 、 $1:512$ 、 $1:1024$ 、 $1:2048$)。比較試験の結果は図12に示され、本発明の免疫アッセイは、標準的な従来技術の試験に比べて、感度の点でおおよそ約4倍増加することを示す(つまり、HIV1について最も感度の高い陽性結果は、本発明の免疫アッセイでは $1:4096$ 希釈で検出され、そして最も感度の高い陽性結果は、従来技術の免疫アッセイについて $1:1024$ 希釈で検出され；そしてHIV2について最も感度の高い陽性結果は、本発明の免疫アッセイでは $1:512$ 希釈で、そして最も感度の高い陽性結果は、従来技術の免疫アッセイでは $1:128$ 希釈で検出される)。さらに、NG HIV試験の120の陰性サンプルの試験により、偽陽性の割合が割合が1%未満であることが示された。

【0066】

本発明の免疫アッセイ試験ストリップ装置が、従来技術の装置に比較してアッセイ時間の減少を提供することができると信じられている。特に、血液、糞便、又は唾液が、慣用のクロマトグラフィーストリップ試験においてかなりゆっくり移動することが知られている。しかしながら、本発明の免疫アッセイ試験ストリップ装置では、分離した移動経路がサンプルに提供されるので、使用される吸着性物質は、コンジュゲートの移動に関して迅速な移動を許容するために本発明の試験に関して特別に選択されてもよく、そしてその結果、アッセイ時間は従来技術に比較してかなり早くできる。例えば、第一吸着性物質30、30'、30''、130、230は、比較的小さい孔(非限定的に例示すると、 $20\text{ }\mu\text{m}$ 未満、そしてより好ましくは $3\sim15\text{ }\mu\text{m}$)を有する膜から作成されてもよく、一方第二吸着性物質32、32'、32''、132、232は、比較的大きい孔(非限定的に例示すると $20\text{ }\mu\text{m}$ より大きい、そしてより好ましくは $25\sim40\text{ }\mu\text{m}$)を有する物質から作成されてもよい。この様式では、検体を伴うサンプルは、その経路をより容易に移動することができ、一方同時に高感度の試験ストリップ線が比較的小さい孔の第一吸着性物質上に提供される。さらに、以前に記載される様に、第一吸着性物質の孔サイズよりも大きい孔サイズを第二吸着性物質に提供することにより、第二吸着性物質から第一吸着性物質への移動がかなり限定される。

【0067】

比較的小さい孔を有する吸着性ストリップ(膜)の例は、Advanced Microdevice of Ambala, Indiaから販売されるMDI-08($8\text{ }\mu\text{m}$)、MDI-10($10\text{ }\mu\text{m}$)、MDI-15($15\text{ }\mu\text{m}$)、及びWhatman, Inc., Floral Park, New Jerseyにより販売されるSP($3\text{ }\mu\text{m}$)、EP($5\text{ }\mu\text{m}$)、及びRP($8\text{ }\mu\text{m}$)を含む。比較的大きな孔を有する吸着性ストリップの例は、Schleicher & Bioscience, Inc. Keene, New Hampshireから販売されるP40($30\text{ }\mu\text{m}$)である。

【0068】

さらに、サンプルの不存在下でコンジュゲートされた粒子が移動することは、より均一かつ一貫した移動を与え、バックグラウンドを少なくする改善をもたらす。

【0069】

本発明の免疫アッセイ試験ストリップ装置の別の利点は、従来のクロマトグラフィー免疫アッセイにおいて大きな検体(例えば細菌)についての大きな問題であった、マーカークンジュゲートとサンプル中の検体との間の凝集/集合問題を克服するという点である。従来技術では、細菌とコンジュゲート抗体との間の巨大複合体は、試験線の移動について

困難性を有する。結果として、複合体は、ストリップの底又はパッドに留まる傾向を有する。本発明では、サンプル中の細菌は、(ろ過した後に)試験部位に直接適用され、そしてその場所に固定される。一方、マーカーコンジュゲートはサンプルを伴わずに試験部位へと自由に移動する。マーカーコンジュゲートが試験部位に到達した場合、試験部位に固定された抗体により既に捕捉された細菌は、コンジュゲートに結合する。こうして、本発明のシステムは、かなり感度が高く、そして特異的である。

【 0 0 7 0 】

本発明のさらに別の利点は、試験領域において分離した線としてプリントされる場合、高い感度で、かつ交差反応性のため生じる特異性、又は複数の検体の感度を損なうことなく、複数の感染性疾患についての試験を提供する能力である。特に、従来の側方流動アッセイでは、サンプルとコンジュゲートは一緒に移動する。複数の試験線が従来技術の装置において提供される場合、各線は検体を保持し、又は検体と交差反応して、それに続く線において可視結果が弱くなってしまっていた。対症的に、本発明では、幾つかの検体を含むサンプルは、コンジュゲートを伴わずに試験領域を移動し、そして数個の線に同時に到達する。こうして、検体は、等しく数個の線に結合でき、その結果同レベルの感度が維持できる。次に、コンジュゲートは、別々の移動経路に導入され、そしてすでに線に固定された複合体に結合することができる。例えば、患者サンプルにおいて、H I V 及び T B 抗体の同時検出では、H I V 抗原及び T B 抗原は、試験領域の分離線として固定され、そしてサンプルは試験領域に移動しそして結合するための 1 のストリップを提供する。緩衝液を次に他のストリップに加えて、タンパク質 A - 金又はラテックスが移動し、そして H I V 抗原 - 抗体複合体及び T B 抗原抗体複合体に結合することを可能にする。当該試験が高感度であるため、T B は存在すれば検出されるであろう。H I V 及び T B に共感染した患者では、T B についての抗体タイターは低くなりがちであるので、このことは重要である。

【 0 0 7 1 】

本発明の別の態様では、試験が複数の感染性疾患(例えば H I V 及び T B)について提供される場合、異なる着色ラテックス粒子は、コンジュゲート・パッド又は緩衝溶液中に提供される異なる抗原又は抗体にコンジュゲートするために使用することができる。結果として、異なる色の線が試験領域に現れ、1 の色(例えば赤色)は第一疾患(例えば H I V)に対応し、そして第二の色(例えば青色)は大に疾患(例えば T B)に対応する。

【 0 0 7 2 】

当業者により認められるように、サンプルを 1 の吸着性ストリップに提供してから、もう一方の吸着性ストリップに緩衝液を提供するまでの待ち時間は、サンプルの粘度並びにサンプルを受容する吸着性ストリップの様々な特性、例えば孔サイズ及びストリップ長に依存して変化しうる。こうして、典型的に、説明書が試験装置に含まれて、サンプル(及びオプションの緩衝溶液)をストリップに加えた後に所定の時間(例えば、5 分間)待って、緩衝溶液をもう一方のストリップに加えることを使用者に指示する。事象の最大割合に関して最大結果を得るために、実際に必要とされる時間よりも実質的に長い待ち時間が選択される。こうして、本発明の別の態様では、待ち時間を減らすために、可視的食品色素又は他の水溶性色素が、本発明の上に記載された実施態様のいずれかの試験部位に提供される。サンプル及びオプションの緩衝液が試験装置に提供される場合、サンプルが試験部位に移動する際に、試験部位の色素は希釈され、そして裸眼では見えなくなり、それにより、当該試験の効率に影響を与えることなく緩衝液を正確に他のストリップに加えるための可視的な指標を提供する。

【 0 0 7 3 】

試験部位に可視的色素を与えた試験装置では、使用者は、試験部位で色が消えた後に緩衝液を加えるように指示される。こうして、本発明の 1 の方法に従って、液体サンプル中のリガンドの存在を測定する試験装置に、固定されたりガンド結合メカニズム及び目に見える可溶性指標を与えた。サンプルを試験装置にアプライし、そして試験部位を観察して、可視指標が消失することを観察する。その後、溶液(緩衝液)を試験装置に適用する。

ある程度の時間の経過後に試験部位を検査して、サンプル中にリガンドが存在するか又は存在しないかの表示を判定する。

【 0 0 7 4 】

図 1 3 A - 1 3 G は、試験部位において可視的色素を利用する本発明に記載される H I V 1 / 2 試験カセット製品の合成写真 / 指示図である。試験製品は、以前に記載された実施態様のいずれかに従って実質的に構築され、そして 4 個の開口部又は窓を有するプラスチック製カセットハウジングを提供する。4 個の開口部の内の最初の一つは、S + B と記されており、そして試験サンプル + 緩衝液を受容するように提供される。4 個の開口部の 2 番目には、B と記されておられ、そして追加緩衝液を受容するように提供される。4 個の開口部のうち 3 番目には、1、2、3、4、及び 5 の数字が記されており、そして 5 個の異なる H I V 抗原又はペプチドに対応する試験線が提供される(好ましくは、それぞれ p 2 4、g p 4 1、g p 1 2 0、g p 1 6 0、及び g p 3 6)。C と記された 4 番目の開口部に対照線が提供される。第三の開口部において現れる試験線に目に見える様に色素(例えば青色)が提供される。第四の開口部において現れる対照線にも目に見えるように色素(例えば、緑色)が提供される。

【 0 0 7 5 】

図 1 3 A において示される装置は、好ましくは約 1 0 μ l の血清又は血液を S + B と記されたサンプルウェルに加えることにより使用される。次に、図 1 3 B に示される様に、好ましくは約 3 0 μ l の緩衝液を同じサンプルウェルに加える。試験領域へのサンプルの移動(典型的には、緩衝液の助けを伴う)は、試験線及び対照線において色素が消失することをもたらす。線から色素が消失することは、サンプルが試験領域に到達したことを確認する。その時点で、図 1 3 C に示される様に、好ましくは約 9 0 μ l の緩衝液を B と記された開口部に加えて、コンジュゲートマーカを試験領域へと移動させた。一定の時間後に結果を読み取ることができる。結果の 4 個の例は、図 1 3 D - 1 3 G に見られる。図 1 3 D において、対照線 C のみが観察され、それにより H I V 1 及び H I V 2 抗体についてサンプルが陰性であるという適正な結果を示す。図 1 3 E では、対照線及び線 1、2、3、及び 4 が観察され、それにより、4 個の異なる H I V 1 型の抗体に陽性であったが、H I V 2 型抗体に対して陰性であったという適正な結果を指し示す。図 1 3 F では、対照線及び線 5 が観察され、それによりサンプルが H I V 2 型抗体について陽性であったが、4 の異なる H I V 1 型抗体について陰性であったという適正な結果を示す。図 1 3 G では、対照線及び全ての線 1 ~ 5 が観察されて、それによりサンプルが 4 個の異なる H I V 1 型抗体について及び H I V 2 型抗体について陽性であったという適正な結果を示す。対照線 C が観察されない場合、試験結果は適正であるとは解釈されない。図 1 5 A ~ 1 5 D を参照することにより理解されるように、サンプルが 4 種全ての異なる H I V 1 型抗体を含む必要がなく、1 つは含む必要があるので、線 1 ~ 4 における 1、2、又は 3 本の線のみが陽性結果を示すということが起こりうるということも知られている。

【 0 0 7 6 】

図 1 4 A - 1 4 G は、本発明に記載される H I V 1 / 2 ディップスティック試験製品の合成写真 / 指示図である。図 1 4 A - 1 4 G は、窓を伴うプラスチック製のカセットを含む代わりに、図 1 4 A - 1 4 G の試験製品は、厚紙上のディップスティック製品であるという点を除いて、上で記載される図 1 3 A - 1 3 G に完全に一致する。

【 0 0 7 7 】

図 1 5 A - 1 5 G は、試験部位で目に見える色素を使用する本発明に記載される H I V 1 / 2 確認 / 試験カセット製品の合成写真 / 指示図である。図 1 3 A - 1 3 G の製品の 4 個の窓を備える代わりに、図 1 5 A - 1 5 G の製品に 5 個の開口部又は窓を備えるプラスチック・カセット・ハウジングが提供されるという点を除いて、確認 / 試験製品は、実質的に図 1 3 A - 1 3 G の製品と同じであり、そして以前に記載された実施態様のいずれかに従って実質的に構築される。5 個の開口部のうちの第一の開口部は、S + B と記されており、そして試験サンプル + 緩衝液を受容するように提供される。5 個の開口部のうちの 2 番目は B と記されており、そして追加緩衝液を受容するように提供されている。5 個の

開口部の内の3番目はTと記されており、そして4番目の窓に含まれるH I V抗原又はペプチドの全てを有する試験線に相当する。5個の開口部のうちの4番目には、1、2、3、4、及び5という数字が記されており、そして5個の異なるH I V抗原又はペプチドに対応する試験線が提供される(好ましくは、それぞれp 2 4、g p 4 1、g p 1 2 0、g p 1 6 0、及びg p 3 6)。Cと記される5番目の開口部には対照線が提供されている。2番目及び3番目の開口部に現れる試験線には、目で見ることができるよう色素(例えば青色)が与えられている。4番目の開口部に現れる対照線にも、目で見ることができるよう色素(例えば緑色)が与えられている。

【0078】

図15A-15Gのスクリーニング/確認試験製品は、図13A-13Gの製品と同じ様式で使用される。当該製品との間の違いは、3番目の窓Tが、デジタルであるスクリーニング結果、つまり、H I V抗体を含むサンプルに対して、含む又は含まないという結果を提供する点である。特に、試験線Tは、試験線1~5上に提供される抗原又はペプチドの全ての組合わせを含むので、他の試験線1~5のいずれかが確認されるかに注目すべきであろう。試験線1~5は、得られた結果についての詳細、つまり、どのH I V 1抗体(1つ又は複数)が検出されるか、そしてH I V 2抗体が検出されるか、を提供する。

【0079】

図16A-16Eは、本発明のH I V 1 / 2ディップスティックについて得られた実際の試験結果の写真である。図16Aで観察されるように、対照線及び1の線(G P 3 6)が観察され、サンプルがH I V 2型抗体について陽性である適正な試験であることを示唆する。図16Bは、観察可能な対照並びに第一及び第五試験線を示し、p 2 4抗原に結合するH I V 1抗体、及びH I V 2型抗体(g p 3 6抗原に結合する)についてサンプルが陽性であり、そして他のH I V 1抗体について陰性である適正な試験であることを示唆する。図16Cは、観察可能な対照及び第二試験線を示し、サンプルがg p 4 1抗原に結合するH I V 1抗体について陽性であり、そして他のH I V 1抗体及びH I V 2型抗体について陰性である適正な試験であることを示唆する。図16Dは、観察可能な対照並びに第一、第二、及び第四試験線を示し、サンプルがg p 2 4、g p 4 1、及びg p 1 6 0抗原に結合するH I V 1抗体について陽性であり、そして他のH I V 1抗体及びH I V 2型抗体について陰性である適正な試験であることを示唆する。図16Eは、観察可能な対照及び第一~第四試験線を示し、サンプルが試験された全てのH I V 1抗体とH I V 2抗体に対して陽性である適正な試験であることを示唆する。

【実施例】

【0080】

実施例1-H I V試験

サンプル及び緩衝液を受容するストリップ1の製造：

サンプルの回収及び輸送のための試験ストリップは以下のように調製された。20~30 μ mの孔サイズのニトロセルロース膜(5×25mm)(Whatman Inc., USA)をプラスチックカード上に積層した。セルロース紙(S&S, Germany)のサンプルパッドをP B S、8.4及びN P 4 0で処理し、そしてニトロセルロース膜に取り付けた。複数の試験ストリップ1を製造するために同じ方法を使用した。

【0081】

緩衝液のみを受容し、そしてコンジュゲート領域並びに試験及び対照線を備えるストリップ2の製造：

H I V 1及びH I V 2に対する抗体の検出用の試験ストリップは、以下のように製造される。合成H I V 1ペプチドg p 4 1、g p 1 2 0、及び合成H I V 2ペプチドg p 3 6はビオチン化され、そして次にアビジン(Zymed, Inc. USA)と混合される。このカクテルを0.2 μ mのフィルターによりろ過し、そしてI S O - F l o wプリンター(Imagine Technology, Inc. USA)を用いて0.25~0.50mg/mlの濃度で10~15 μ m孔サイズのニトロセルロース膜(MDI Ltd., Ambella, India)に固定して、試験線として使用した。タンパク質A(Zymed Inc., USA)の濃度0.25mg/mlを同じ様式で固定して、対照

線として使用した。37℃で1時間膜を乾燥した。膜の裏打ち(G&L, Inc. USA)に膜を積層した。コンジュゲートパッドを、多孔性ポリエステルマトリクス(Alstrom, Inc. USA)を用いて調製した。パッドは、約40nm及びOD60の紫色の金コロイド粒子を結合されたタンパク質Aであって、コンジュゲート緩衝液(50mM PBS、スクロース、BSA、VPA、Tween 20)に懸濁されたタンパク質Aをスプレーされ、そして37℃で1時間乾燥された。試験ストリップ(7.2×62mm)を、金コンジュゲートパッド、サンプルパッド(S&S Inc., Germany)及びシンクパッド(S&S Inc., Germany)を積層カードに取り付けられたニトロセルロース膜に取り付けることにより調製した。同じ方法を複数の試験ストリップを作成するために使用した。

【0082】

10

カセット中のストリップ1とストリップ2の組み立て：

ストリップ2(7.2×62mm)を、その積層カードを底に接触させ、そしてコンジュゲートパッド、サンプルパッド、試験及び対照線を上向きにしてカセットの底部分に配置した。次に、ストリップ1をカセットの底部分に配置した。試験部位においてストリップ1のニトロセルロース膜がストリップ2に接触するようにストリップ1を配置した。サンプル及び緩衝液用の分離された開口部を有し、かつ試験及び対照部位にまたがる窓を有するカセットの上部分は、次にカセットの底部分上に配置された。複数の組立品(以下に、化学生物DPP(二経路プラットフォーム)HIV1/2組立品と呼ばれる)を作成するために同じ方法を用いた。

【0083】

20

試験方法：

5µlの血清/血液をサンプルの開口部を通して加え、そして1滴(40~50µl)の緩衝液(PBS、pH8.5~9.5、鳥血清、EDTA、Tween 20)をすぐに同じ開口部を通して加えた。サンプルが試験領域に達し、そして着色線(性質対照)が消失するまで1~2分待った後に、3又は4滴(およそ130~150µl)の同じ緩衝液を、緩衝液開口部を通して加えた。15分後、試験結果を読んだ。2個のピンク色の線(試験及び対照)が出現することは陽性結果を示す。一本のバンドの出現(対照)は、陰性結果を示した。バンドが出現しないことは、不適切な結果であることを示唆する。

【0084】

試験結果：

30

BB Inc., USAから販売される市販の混合HIV1及びHIV2パフォーマンスパネル(Mixed HIV1 and HIV2 performance panel)(PRZ-204)を、上記の様に製造されそして組み立てられた組立品において試験して、以下の結果を得た。

【表 1】

PRZ-204 BBI	HIVの型	Chembio DPP HIV 1/2	ウエスタン プロット1 (Cambridge Biotech)	ウエスタン プロット2 (Genlabs)	ELIA 1/2 (Abbott)
1	1	陽性	陽性	不定	陽性
2	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
3	2	陽性	不定	陽性	陽性
4	2	陽性	陽性	陽性	陽性
5	1	陽性	陽性	不定	陽性
6	2	陽性	不定	陽性	陽性
7	1	陽性	陽性	不定	陽性
8	2	陽性	不定	陽性	陽性
9	1	陽性	陽性	不定	陽性
10	1	陽性	陽性	不定	陽性
11	2	陽性	陽性	陽性	陽性
12	2	陽性	陽性	陽性	陽性
13	1	陽性	陽性	不定	陽性
14	1	陽性	陽性	不定	陽性
15	2	陽性	不定	不定	陽性

10

20

【0085】

全てのサンプルは、Chembio DPP HIV 1/2 及び ELIA 1/2 Abbott 試験により正確に検出された。サンプル番号15は、ASTPHLD / CDC 判定 (MMWR 第三8巻、S-7、1989)を用いて判断すると、両方のウエスタンプロット試験で不定であったが、Chembio DPP HIV 1/2 及び ELIA 1/2 Abbott 試験で陽性であった。

【0086】

30

実施例 2 - 結核菌 (TB)

実施例 1 と同様の試験装置を、ストリップ 2 のみを改変することにより TB に対する抗体の検出用に製造した。ストリップ 2 を、HIV ペプチドの代わりに TB 組換え抗原 (F10、E6、P10、14、16) の混合物を 1.0 mg / ml の濃度で取得し、そして TB 組換え抗原を膜上の試験線において 0.5 μ l / cm で固定して、第一試験線 (T1) を与えることにより改変した。0.05 mg / ml の濃度の TB 抗原リボアラビンマンナン (LAM) からなり、そして 0.5 μ l / cm で固定された第二試験線 (T2) は、同様に試験領域に固定された。PBS 7.4 で希釈されたタンパク質 A (濃度 0.25 mg / ml) を同様に対照線として固定した。約 40 nm である紫色のコロイド金粒子をコンジュゲートされた抗ヒト IgM (Sigma, USA) 及びタンパク質 A / G (Pierce, USA) をコンジュゲートパッドにアブライした。

40

【0087】

試験方法：

TB 試験用の試験方法は、サンプル体積が 10 μ l の血清であるということを除き実施例 1 と同じである。

【0088】

試験結果：

全体で 300 の市販の TB サンプル (Zeptomatrix, Inc, USA) を、DPP TB 試験で評価した。全ての陽性サンプルは、培養陽性結果を有したが、サンプルの幾つかは、塗沫陰性であり、そして HIV 共感染されていた。75 % の全体の感度及び 90 % の特異性がそれ

50

ぞれ、固有のサンプルで達成された。

【0089】

実施例3-HIV確認ディップスティック

HIV1及びHIV2抗体の検出用の確認試験ストリップの形態の試験装置は、実施例1に提供された。しかしながら、ストリップ1及びストリップ2は任意のプラスチックハウジングを伴わない積層カード上に接着剤(G&L Inc, USA)を用いて取り付けられた(つまり、ディップスティック)。5個の異なるHIV1抗原(p24、gp41、gp120、gp160)及びHIV2(gp36)を、試験領域の5個の異なる線として固定した(0.25~0.50mg/ml)。これらの抗原は組換え、合成ペプチド及び天然抗原であった。0.25mg/mlの濃度にPBS7.4で希釈されたタンパク質Aを対照線として固定した。約40nmの紫色コロイド金粒子をコンジュゲートされたタンパク質A(Zymed, USA)を、コンジュゲートパッドにスプレーし、そして検出システムとして用いた。

10

【0090】

方法:

試験方法は、10µlの血清のサンプル体積が使用されることを除いて、実施例1と同じであった。

【0091】

結果:

市販のHIVパネルサンプル(BBI Inc, USA, Zeptometrix Inc, USA、及びTeragenix Inc USA)をこのアッセイで評価した。結果により、DPP HIV確認試験が、正確にHIV1及びHIV2サンプルを検出し、そしてウエスタンブロット及びEIAと100%の相関性を有したということが示された。

20

【0092】

実施例4-HIV試験

ストリップ1が各試験について長くされて、その結果ストリップ1及びストリップ2がT字を形成する代わりに、それらが+の配置を形成するという点で異なる実質的に実施例1の試験装置に同一である試験装置が製造された。結果は実施例1と同じであった。

【0093】

実施例5-HIV試験

試験及び対照線が、ストリップ2の代わりにストリップ1に適用されることを除いて実施例1と実質的に同じである試験装置が製造された。結果は実施例1と同じであった。

30

【0094】

実施例6-HIV試験

試験領域においてP24 HIV抗原に対するポリクローナル抗対が試験線上に固定され、そしてP24 HIV抗原に対するモノクローナル抗体がコロイド金にコンジュゲートされたことを除いて実施例1と同じ試験装置が製造された。結果は、血清サンプル中のピコグラムレベルのp24抗原が検出できることを示した。

【0095】

実施例7-レプトスピラ細菌

試験領域において、4個の組換えlij抗原(A、B、C、D)を混合し、そして試験線と同じ様に固定したと言う点を除いて、実質的に実施例1と同じである試験装置が製造された。コンジュゲートでは、タンパク質A/G(Pierce, USA)及び抗ヒトIgM(Sigma, USA)は、約40nmの紫色のコロイド金粒子とコンジュゲートし、コンジュゲートパッドにアプライした。ブラジル及びタイから得た300を超える固有のサンプルでは、急性期サンプルでは約70%、そして回復期サンプルでは約90%の全体感度を得られ、そして特異性は約95%であった。

40

【0096】

免疫アッセイの幾つかの実施態様、及びその使用方法が記載された。一方、本発明の特定の実施態様が記載される一方、本発明は、その範囲は当該技術が許容するのと同じ程度に広いこと、そして明細書が同様に読まれることが意図されるので、本発明がそれらに限

50

定されることを意図しない。こうして、明細書が抗原抗体反応を用いたリガンド結合を記載する一方、他のリガンド結合メカニズム、例えばアプタマー結合、核酸結合、酵素結合などが使用されてもよい。また、試験セルが、1のリガンドを試験するための1の線を有し、2個のリガンドを試験するための2個の線、3個のリガンドを試験するための3個の線、及び5個のリガンドを試験するための5個の試験線を有するように記載される一方、異なる数の線が異なる数のリガンドを試験するために利用されてもよいということが認められよう。このような場合、1のハウジングは、サンプルについての1の穴を用いて使用されてもよく、或いは、所望される場合複数の穴を利用することもできる。複数の穴が使用される場合、複数のストリップが提供される1以上のサンプルについて使用されてもよい。好ましくは、複数のストリップは、コンジュゲートの移動経路を提供する1のストリップと接触する(例えば、上又は下に横たわる)。サンプル移動に適用される2個の隣接するストリップ上に位置するか、又は当該ストリップに導く1の穴を提供することが可能であってもよい。さらに、試験セルが、サンプル及び緩衝溶液、又は緩衝液-コンジュゲート・サブシステムを受容するためにハウジングの上壁に穴を有するように記載された一方、1又は両方の穴がハウジングの末端の壁又は横壁に提供されてもよいということが認められよう。同様に、吸着性物質が、好ましくは薄いプラスチック製の裏打ちを含む様に記載された一方、プラスチック製の裏打ちは特定の位置にのみ提供することができるか、又は全く提供されないということが認められよう。部分的な裏打ちのみが提供されるか、又は裏打ちが提供されない場合、試験及び対照部位は、吸着性物質のいずれか又は両側に位置することができる。さらに、試験ストリップ及び対照ストリップが長方形の形で示される一方(つまり、線)、試験及び対照部位が円、四角、卵型、破線などの異なる形にすることができるということが認められよう。実際、試験部位及び対照部位は、互いに違うように配置することができる。また、本発明は、T型ハウジングを使用し、そして互いに垂直である吸着性物質を使用するように記載される一方、ハウジングが異なる形(例えば、長方形、ピストル型)を取ることができるということが認められよう。さらに、所望される場合、吸着性物質は、検体/サンプル及び緩衝液コンジュゲートサブシステムについて提供される区別される移動経路が提供される限り、互いに垂直である必要はない。こうして、例えば、Y型配置を提供することができる。実際、例えばサンプル領域と吸着性物質が試験線及び対照線並びにリザーバー上に位置し、そしてハウジングの壁により離され、そして試験及び対照線がもう一方のハウジング上の窓から見ることもできる、長方形配置を提供することも可能である。

【0097】

当業者は、ハウジングが、各試験線について離れた窓を含めるために更なる方法で改変されてもよいということが認められよう。また、コンジュゲートの移動経路、及び場合によりサンプルの移動経路に加えられる緩衝溶液の使用と合わせて記載される一方、1以上の緩衝液が、実施される試験(1つ又は複数)に依存して適宜、移動経路に加えられることが選択されてもよいということが認められよう。こうして、リン酸緩衝液又はTRIS(トリスヒドロキシメチルアミノメタン)緩衝液などの緩衝液がしばしば使用される。しかしながら、本発明は、水を含む任意の希釈剤を使用することを包含することを意図する。さらに、希釈剤は、必要に応じて、サンプルを吸着性物質に加える前に加えられ、そしてサンプルと混合されてもよいが、又はサンプルは、最初に沈積され、そしてその後希釈剤が加えられてもよい。同様に、コンジュゲートが移動することを引き起こすことができる任意の希釈剤が使用されてもよく、そして液体コンジュゲートシステムにおいてコンジュゲートと予め混合されてもよく、又は乾燥コンジュゲートシステムにおいて移動経路を移動できてもよい。その結果、当該技術分野により、さらに別の改変が、特許請求される本質と範囲から逸脱することなく、本発明に提供されうるということが当業者により認められよう。

【図面の簡単な説明】

【0098】

【図1】図1は、本発明の第一実施態様の上面概略図である。図1Aは、図1の線1A

10

20

30

40

50

- 1 A にそった断面図である。 図 1 B は、図 1 の線 1 B - 1 B にそった断面図である。

【図 2】図 2 は、本発明の第二実施態様の上面概略図である。 図 2 A は、図 2 の線 2 A - 2 A にそった断面図である。

【図 3】図 3 は、本発明の第三実施態様の断面図である。

【図 4】図 4 は、本発明の第四実施態様の上面概略図である。

【図 5】図 5 は、本発明の第五実施態様の上面概略図である。

【図 6】図 6 は、本発明の第六実施態様の上面概略図である。

【図 7】図 7 は、本発明の第七実施態様の上面概略図である。

【図 8】図 8 は、本発明の第八実施態様の上面概略図である。

【図 9】図 9 は、本発明の第九実施態様の上面概略図である。

10

【図 10】図 10 は、ハウジングを用いない本発明の実施の上面概略図である。

【図 11】図 11 は、典型的な従来技術の T B 試験装置に対する本発明の試験装置の感度の比較を示す表である。

【図 12】図 12 は、2 つの表と 1 のキー(key)を含む。当該表は、典型的な従来技術の H I V 1 試験及び H I V 2 試験装置に比較した本発明の試験装置の感度の比較を示す。

【図 13 A - B】図 13 A - 13 G は、本発明に記載される H I V 1 / 2 試験カセット製品の合成写真/指示図であり、図 13 A - 13 C は、試験製品の使用方法を示し、そして図 13 D - 13 G は生じうる様々な結果を示す。

【図 13 C】図 13 A - 13 G は、本発明に記載される H I V 1 / 2 試験カセット製品の合成写真/指示図であり、図 13 A - 13 C は、試験製品の使用方法を示し、そして図 13 D - 13 G は生じうる様々な結果を示す。

20

【図 13 D - E】図 13 A - 13 G は、本発明に記載される H I V 1 / 2 試験カセット製品の合成写真/指示図であり、図 13 A - 13 C は、試験製品の使用方法を示し、そして図 13 D - 13 G は生じうる様々な結果を示す。

【図 13 F - G】図 13 A - 13 G は、本発明に記載される H I V 1 / 2 試験カセット製品の合成写真/指示図であり、図 13 A - 13 C は、試験製品の使用方法を示し、そして図 13 D - 13 G は生じうる様々な結果を示す。

【図 14 A - B】図 14 A - 14 G は、本発明に記載された H I V 1 / 2 ディップスティック試験製品の合成写真/指示図であり、図 14 A - 14 C は試験製品の使用方法を示し、そして図 14 D - 14 G は生じうる様々な結果を示す。

30

【図 14 C】図 14 A - 14 G は、本発明に記載された H I V 1 / 2 ディップスティック試験製品の合成写真/指示図であり、図 14 A - 14 C は試験製品の使用方法を示し、そして図 14 D - 14 G は生じうる様々な結果を示す。

【図 14 D - E】図 14 A - 14 G は、本発明に記載された H I V 1 / 2 ディップスティック試験製品の合成写真/指示図であり、図 14 A - 14 C は試験製品の使用方法を示し、そして図 14 D - 14 G は生じうる様々な結果を示す。

【図 14 F - G】図 14 A - 14 G は、本発明に記載された H I V 1 / 2 ディップスティック試験製品の合成写真/指示図であり、図 14 A - 14 C は試験製品の使用方法を示し、そして図 14 D - 14 G は生じうる様々な結果を示す。

【図 15 A - B】図 15 A - 15 G は、本発明に記載された H I V 1 / 2 スクリーニング/確認試験カセット製品の合成写真/指示図であり、図 15 A - 15 C はスクリーニング/試験製品の使用方法を示し、そして図 15 D - 15 G は生じうる様々な結果を示す。

40

【図 15 C】図 15 A - 15 G は、本発明に記載された H I V 1 / 2 スクリーニング/確認試験カセット製品の合成写真/指示図であり、図 15 A - 15 C はスクリーニング/試験製品の使用方法を示し、そして図 15 D - 15 G は生じうる様々な結果を示す。

【図 15 D - E】図 15 A - 15 G は、本発明に記載された H I V 1 / 2 スクリーニング/確認試験カセット製品の合成写真/指示図であり、図 15 A - 15 C はスクリーニング/試験製品の使用方法を示し、そして図 15 D - 15 G は生じうる様々な結果を示す。

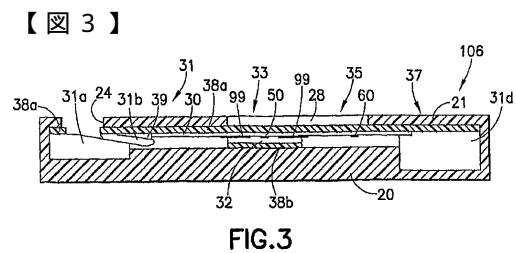
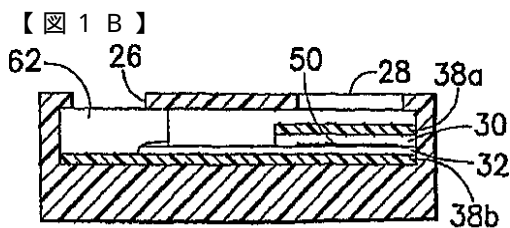
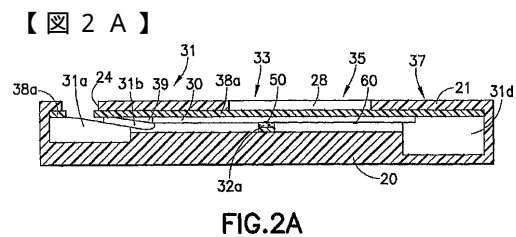
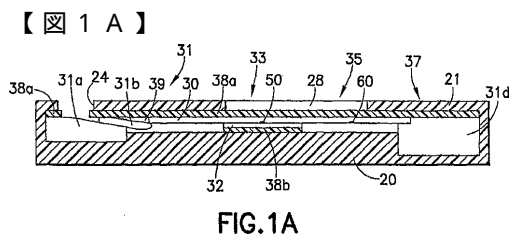
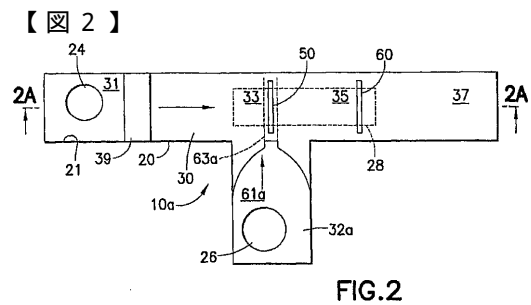
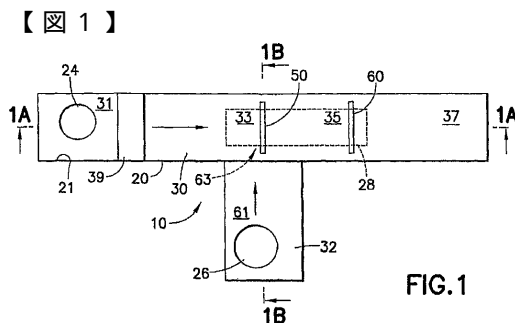
【図 15 F - G】図 15 A - 15 G は、本発明に記載された H I V 1 / 2 スクリーニング/確認試験カセット製品の合成写真/指示図であり、図 15 A - 15 C はスクリーニング/試

50

験製品の使用方法を示し、そして図15D-15Gは生じる様々な結果を示す。

【図16A - B】図16A-Eは、本発明の実際のHIV1/2ディップスティックで得られる試験結果の写真である。

【図16C - E】図16A-Eは、本発明の実際のHIV1/2ディップスティックで得られる試験結果の写真である。



【図 4】

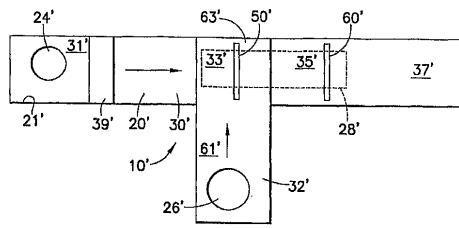


FIG.4

【図 5】

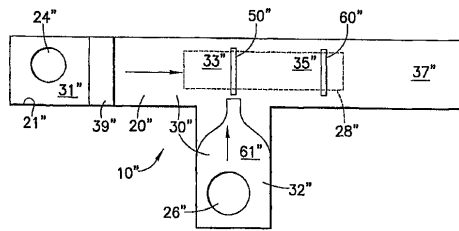


FIG.5

【図 6】

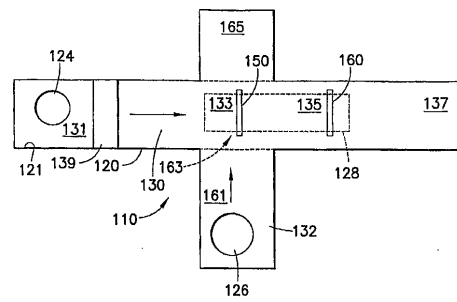


FIG.6

【図 7】

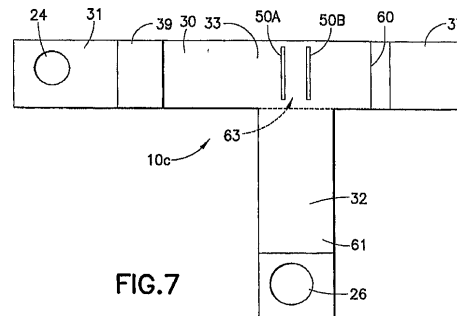


FIG.7

【図 8】

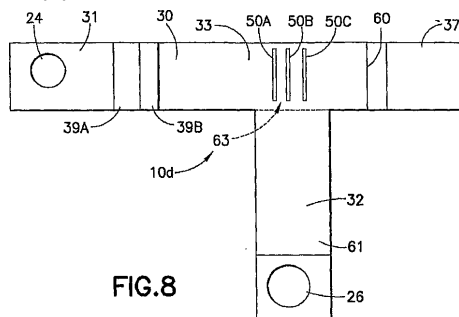


FIG.8

【図 9】

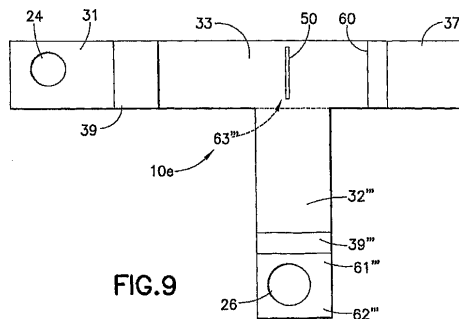


FIG.9

【図 10】

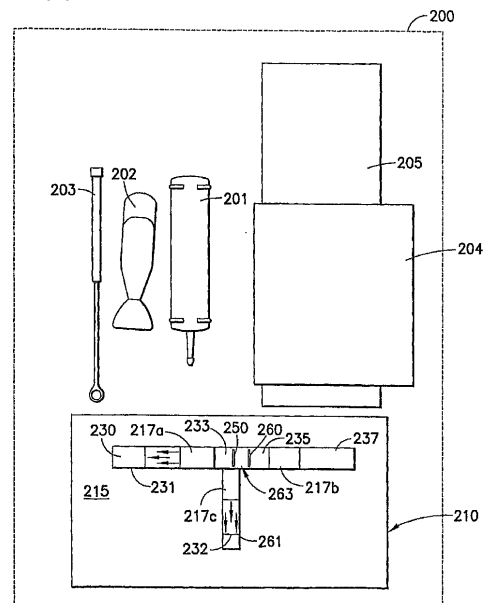


FIG.10

【図 1 1】

TB STAT-PAK II 対 NEW GENERATION TB アッセイ

サンプル：TBGL 対照

	TB STAT-PAK™ II	NEW GENERATION
32 U/ml	+++	+++
8 U/ml	++	++
2 U/ml	+/-	+
1 U/ml	-	+
1/2 U/ml	-	+
1/4 U/ml	-	+
1/8 U/ml	-	-
0 U/ml	-	-

注：1U/ml以下の希釈液は、2U/mlのサンプルから作成した

FIG.11

【図 1 2】

NEW GENERATION HIV試験の実験結果

	希釈度	NG HIV 試験	HIV STAT-PAK™
HIV-1	1:64	3	3
	1:128	3	2
	1:256	3	3
	1:512	2	2
	1:1024	1	1
	1:2048	1	N
	1:4096	1	N
	1:8192	N	N
HIV-2	1:4	3	3
	1:8	3	3
	1:16	3	2
	1:32	2	2
	1:64	2	1
	1:128	2	1
	1:256	2	N
	1:512	1	N
	1:1024	N	N
	1:2048	N	N

強度	結果
1	弱い陽性
2	中程度の陽性
3	強い陽性
N	陰性

FIG.12

【図 1 3 A - B】

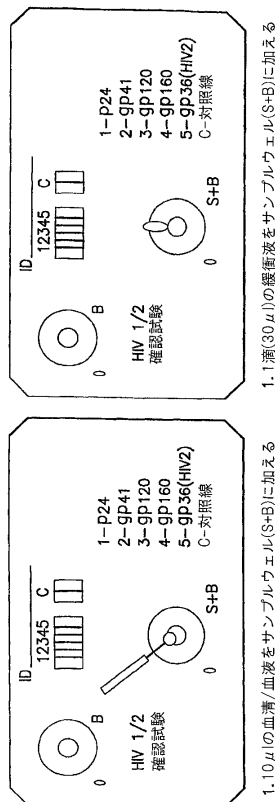
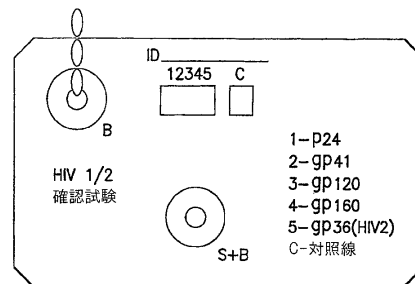


FIG.13B

FIG.13A

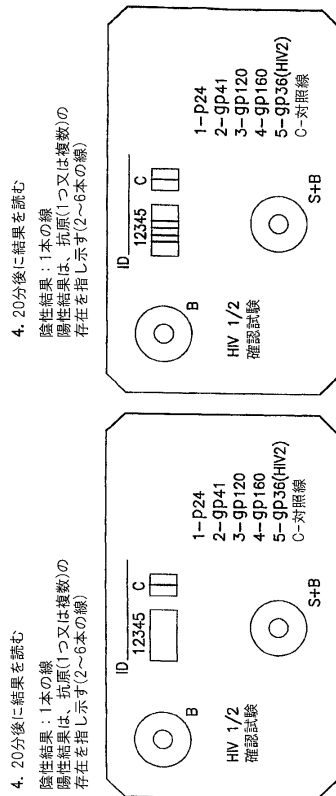
【図 1 3 C】



3. 着色線が完全に消失した際に3滴の緩衝液 (90 μ l)を緩衝液ウェル(B)に加える

FIG.13C

【図 1 3 D - E】

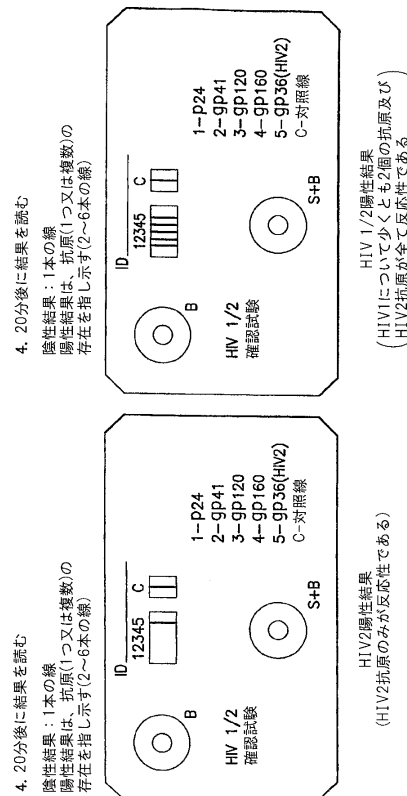


HIV1陽性結果
(少くとも2個のHIV1抗原が反応性である)

FIG.13E

FIG.13D

【図 1 3 F - G】

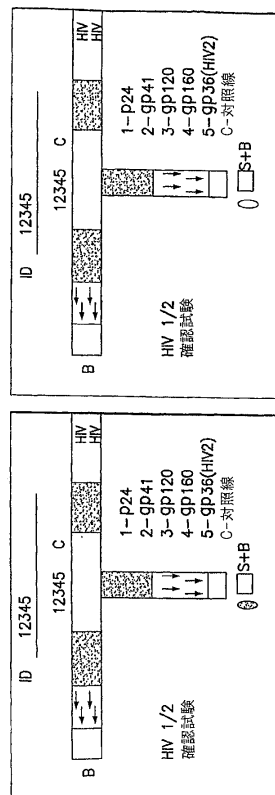


HIV 1/2陽性結果
(HIV1について少くとも2個の抗原及び
HIV2抗原が全て反応性である)

FIG.13G

FIG.13F

【図 1 4 A - B】



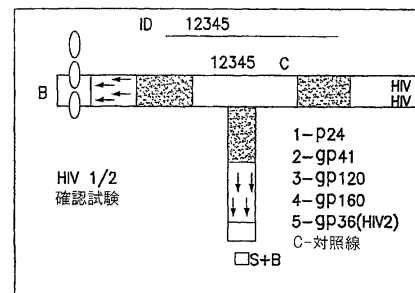
2. 1滴(30 μ l)の緩衝液をサンプルウェル(S+B)に加える

1. 10 μ lの血清/血液をサンプルウェル(S+B)に加える

FIG.14B

FIG.14A

【図 1 4 C】



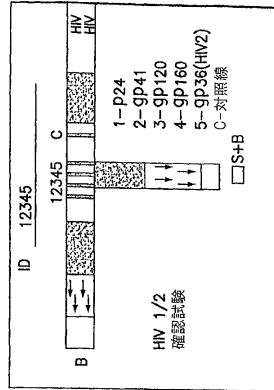
3. 着色線が完全に消失した際に3滴の緩衝液(90 μ l)を緩衝液ウェル(B)に加える

FIG.14C

【図14D - E】

4. 20分後に結果を読む

陰性結果：1本の線
陽性結果は、抗原(1つ又は複数の)
存在を指示示す(2～6本の線)



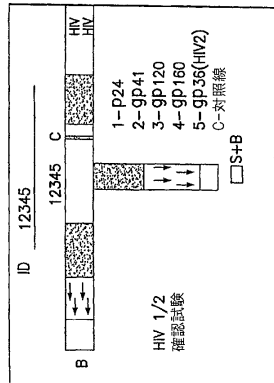
HIV1陽性結果

(少なくとも2個のHIV1抗原が反応性である)

FIG.14E

4. 20分後に結果を読む

陰性結果：1本の線
陽性結果は、抗原(1つ又は複数の)
存在を指示示す(2～6本の線)



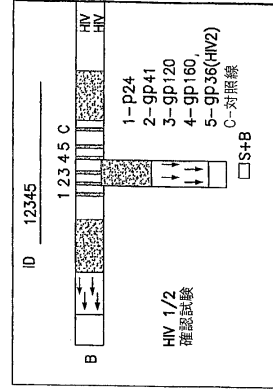
陰性結果

FIG.14D

【図14F - G】

4. 20分後に結果を読む

陰性結果：1本の線
陽性結果は、抗原(1つ又は複数の)
存在を指示示す(3～7本の線)

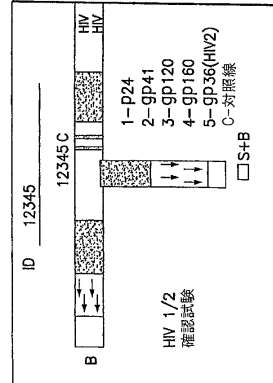


HIV 1/2陽性結果
(HIV1について少なくとも2個の抗原及び
(HIV2抗原が全て反応性である)

FIG.14G

4. 20分後に結果を読む

陰性結果：1本の線
陽性結果は、抗原(1つ又は複数の)
存在を指示示す(3～7本の線)



HIV2陽性結果
(HIV2抗原のみが反応性である)

FIG.14F

【図15A - B】

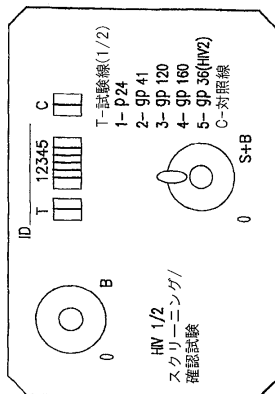
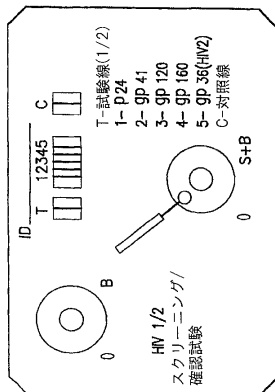
1. 1滴(30 μ l)の緩衝液をサンプルウェル(S+B)に加える1. 10 μ lの血清/血液をサンプルウェル(S+B)に加える

FIG.15B

FIG.15A

【図15C】

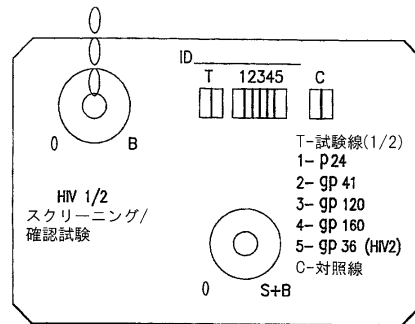
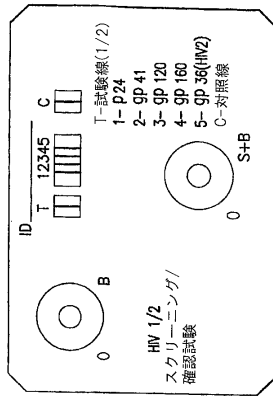
3. 着色線が完全に消失した際に3滴(90 μ l)の緩衝液を緩衝液ウェル(B)に加える

FIG.15C

【図 15 D - E】

4. 20分後に結果を読む

陰性結果：1本の線
陽性結果は、抗原(1つ又は複数の)
存在を指し示す(3〜7本の線)



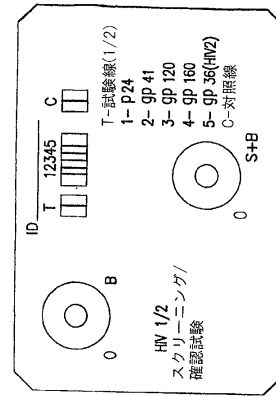
陰性結果
(T及びp24ととも2本のHIV1抗原が反応性である)

FIG.15E

【図 15 F - G】

4. 20分後に結果を読む

陰性結果：1本の線
陽性結果は、抗原(1つ又は複数の)
存在を指し示す(3〜7本の線)

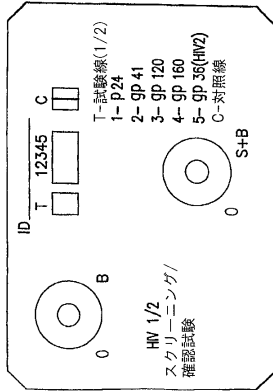


陰性結果
(T及びHIV1について少くとも2本の
抗原及びHIV2抗原が全て反応性である)

FIG.15G

4. 20分後に結果を読む

陰性結果：1本の線
陽性結果は、抗原(1つ又は複数の)
存在を指し示す(3〜7本の線)

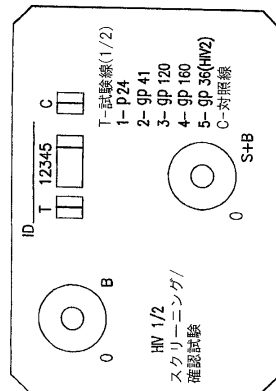


陰性結果

FIG.15D

4. 20分後に結果を読む

陰性結果：1本の線
陽性結果は、抗原(1つ又は複数の)
存在を指し示す(3〜7本の線)



陰性結果
(T及びHIV2抗原のみが反応性である)

FIG.15F

【図 16 A】

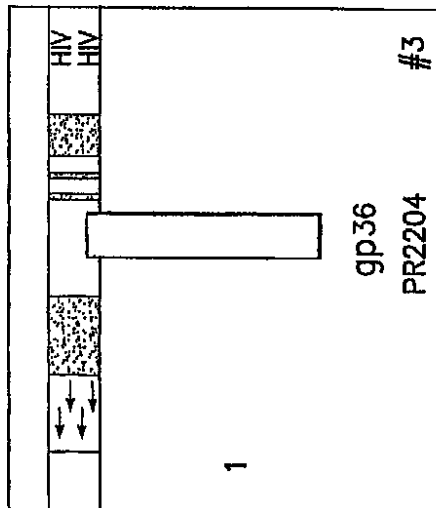


FIG.16A

【図 16 B】

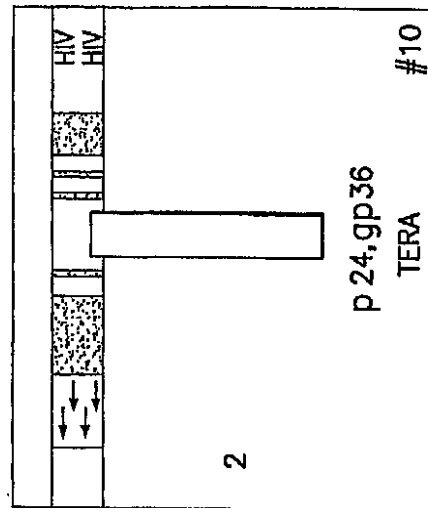


FIG.16B

【図 16 C】

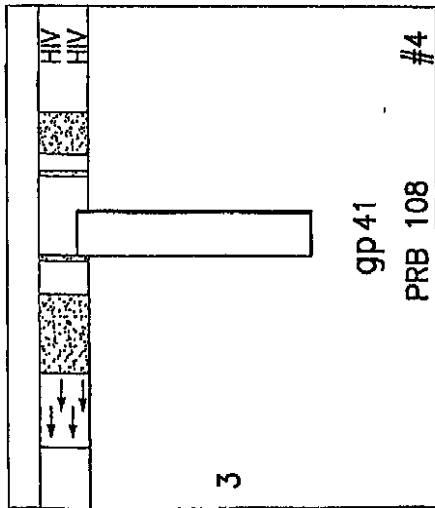


FIG. 16C

【図 16 D】

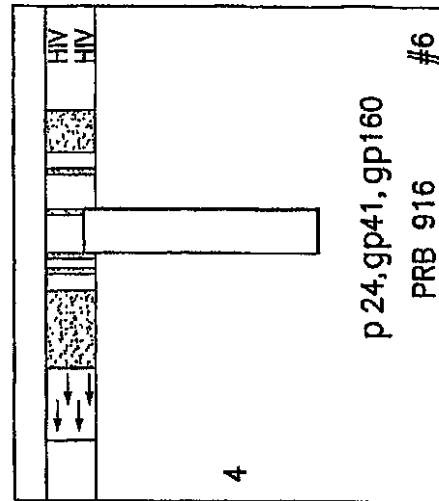


FIG. 16D

【図 16 E】

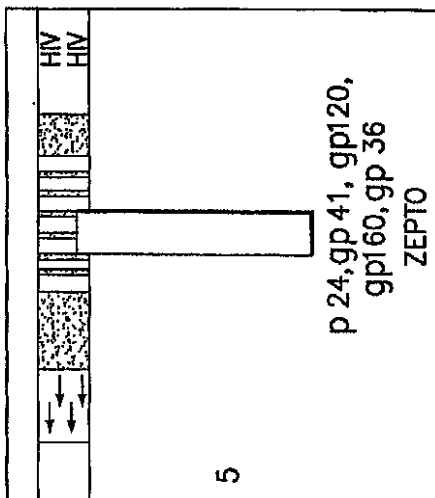


FIG. 16E

フロントページの続き

(31)優先権主張番号 11/172,298

(32)優先日 平成17年6月30日(2005.6.30)

(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/741,628

(32)優先日 平成17年12月2日(2005.12.2)

(33)優先権主張国 米国(US)

(74)代理人 100108903

弁理士 中村 和広

(72)発明者 エスファンディアリ, ヤパンバフシュ

アメリカ合衆国, ニューヨーク 11790, ストニー ブルック, ボーウェン プレイス 1

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開2001-337091(JP, A)

米国特許出願公開第2001/0023076(US, A1)

米国特許出願公開第2004/0161859(US, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

专利名称(译)	双路免疫分析装置		
公开(公告)号	JP4851507B2	公开(公告)日	2012-01-11
申请号	JP2008500982	申请日	2006-03-10
[标]申请(专利权)人(译)	生化诊断系统公司		
申请(专利权)人(译)	化生物凹模阿格诺棒系统，インコーポレイテッド		
当前申请(专利权)人(译)	化生物凹模阿格诺棒系统，インコーポレイテッド		
[标]发明人	エスファンディアリヤバンバフシュ		
发明人	エスファンディアリ,ヤバンバフシュ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/569 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54386 G01N33/558 Y10S435/805 Y10S436/807 Y10S436/81		
FI分类号	G01N33/543.521 G01N33/569.F G01N33/569.H G01N33/53.U		
代理人(译)	青木 笃 石田 敬 中村弘		
优先权	60/660695 2005-03-11 US 60/680884 2005-05-13 US 11/172298 2005-06-30 US 60/741628 2005-12-02 US		
其他公开文献	JP2008533472A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明的系统包括测试电池，其具有限定溶液的第一流动路径的第一吸附剂材料，限定与样品的第一流动路径不同的第二流动路径的第二吸附剂材料，以及具有固定的抗原或抗体的测试部位或其他配体结合分子，例如适体，核酸等，位于第一和第二吸附剂材料的连接处，用于鉴定一种或多种配体。第一和第二吸附剂条在测试位置处彼此接触。流感测试细胞可用于检测妊娠，HIV（包括不同的HIV抗原或多肽），结核病，朊病毒，尿液分析/药物，心脏标志物，癌症标志物，南美锥虫病，衣原体，牙菌（SM/LC），流感A，B型流感病毒，腺病毒，轮状病毒，链球菌A，其他细菌或病毒等，以及兽医应用如CPV，FIV，FeLV，心丝虫等，但不限于这些应用。

PRZ-204 BBI	HIVの型	Chemio DPP HIV 1/2	ウエスタン プロット1 (Cambridge Biotech)	ウエスタン プロット2 (Genlabs)	ELIA 1/2 (Abbott)
1	1	陽性	陽性	不定	陽性
2	陰性	陰性	陰性	陰性	陰性
3	2	陽性	不定	陽性	陽性
4	2	陽性	陽性	陽性	陽性
5	1	陽性	陽性	不定	陽性
6	2	陽性	不定	陽性	陽性
7	1	陽性	陽性	不定	陽性
8	2	陽性	不定	陽性	陽性
9	1	陽性	陽性	不定	陽性
10	1	陽性	陽性	不定	陽性
11	2	陽性	陽性	陽性	陽性
12	2	陽性	陽性	陽性	陽性
13	1	陽性	陽性	不定	陽性
14	1	陽性	陽性	不定	陽性
15	2	陽性	不定	不定	陽性