

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4331895号  
(P4331895)

(45) 発行日 平成21年9月16日(2009.9.16)

(24) 登録日 平成21年6月26日(2009.6.26)

(51) Int.Cl.

F I

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 D

請求項の数 25 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願2000-540438 (P2000-540438)	(73) 特許権者	500139981
(86) (22) 出願日	平成10年12月30日 (1998.12.30)		ファディア・アクチボラゲット
(65) 公表番号	特表2002-509252 (P2002-509252A)		Phadia AB
(43) 公表日	平成14年3月26日 (2002.3.26)		スウェーデン751 37ウブサラ、ボッ
(86) 国際出願番号	PCT/SE1998/002464		クス6460
(87) 国際公開番号	W01999/036777	(74) 代理人	100062144
(87) 国際公開日	平成11年7月22日 (1999.7.22)		弁理士 青山 稔
審査請求日	平成17年8月18日 (2005.8.18)	(74) 代理人	100067035
(31) 優先権主張番号	9704933-2		弁理士 岩崎 光隆
(32) 優先日	平成9年12月30日 (1997.12.30)	(72) 発明者	イブ・メンデルーハルトヴィッグ
(33) 優先権主張国	スウェーデン(SE)		スウェーデン、エスエー756 55ウ
		(72) 発明者	ブサラ、ラベニウスヴェーゲン28番
			イェルゲン・グスタフソン
			スウェーデン、エスエー753 37ウ
			ブサラ、トゥーナガータン7デー番
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 新規キャリブレーターの使用法および本キャリブレーターを含む装置および試験キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

生物特異的親和性反応の利用を含む、サンプル中の検体の決定のための横向きフロー方法であって、以下の段階：

i . 反応体 I - - - 検体' - - - 反応体 \*

からなる複合体を横向きフローマトリックスで形成させ、ここで、

a . 反応体 \* および反応体 I は検体に生物特異性を示し、

b . 反応体 \* は分析的に検出可能であり、

c . 検体' は検体または検体関連反応体であり、続いて

ii . 複合体中の反応体 \* 由来の検出可能なシグナルを測定し、そして

iii . サンプル量と、各々標準量の検体に対応する 1 個またはそれ以上の量のキャリブレーター値との比較により、サンプル中の検体の量の獲得すること

を含み、

A) キャリブレーター値の測定前に、( i ) キャリブレーターまたは( ii ) キャリブレーター用結合剤がマトリックスに結合されており、キャリブレーター用結合剤がマトリックスに結合されている場合、キャリブレーターが添加されるか、マトリックスに予め保持(deposit)されたキャリブレーターがキャリブレーター値決定時に放出され、そしてマトリックスが反応体 \* のキャリブレーターへの結合が起こる液体媒体に不溶性である；

B) キャリブレーターおよび検体が、同等な結合部位を介して反応体 \* に生物特異的に結合できる能力を有する、

10

20

C) a . マトリックスが、同じプロセスフローに位置する 2 個またはそれ以上のキャリブレーションゾーン (C Z 1、C Z 2、C Z 3 . . . ) を呈示するフローマトリックスであり、該ゾーンの少なくとも二つが検体の異なる標準量に対応する、  
 b . (i) 各キャリブレーションゾーンが検体の標準量に対応する量でキャリブレーターを含む、または(ii) 各キャリブレーションゾーンがキャリブレーター結合剤を含み、キャリブレーター結合剤の量およびキャリブレーターの量は検体の標準量に対応する、そして  
 c . 反応体 \* が、反応体 \* がキャリブレーションゾーンを介して輸送されることによりキャリブレーターに結合する ;  
 D) 反応体 \* のマトリックスキャリブレーターへの結合のための 2 個またはそれ以上の C Z への輸送が、検出ゾーン (D Z) に向かうこのプロセスフローを介して行われる ことを特徴とする、方法。

10

【請求項 2】

キャリブレーターがキャリブレーター値の決定前にマトリックスに結合していることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

キャリブレーター用結合剤がキャリブレーター値の決定前にマトリックスに結合していることを特徴とする、請求項 1 記載の方法。

【請求項 4】

該キャリブレーター用結合剤が、特異的結合対のメンバーの一方であり、特異的結合対の他のメンバーがキャリブレーターに結合または接合していることを特徴とする、請求項 1 または 3 に記載の方法。

20

【請求項 5】

一つの同じプロセスフローに沿って

a . 各々がマトリックスキャリブレーターまたはマトリックスキャリブレーター結合剤を呈示する 2 個またはそれ以上のキャリブレーションゾーン (C Z)、  
 b . いずれもキャリブレーションゾーンと同位置でなく、捕獲体が堅く固定され、それが反応体 I または反応体 I に生物特異的に直接的または間接的に結合できる生物特異的親和性反応体である、1 個またはそれ以上の検出ゾーン (D Z)、  
 c . C Z および D Z の上流に位置し、それに反応体 \* が予め保持し得る反応体 \* 適用ゾーン  $A_{R*Z}$ 、  
 d . i . 検出ゾーンの上流または同位置  
 ii .  $A_{R*Z}$  の下流または上流または同位置 ( $A_{SZ} / A_{R*Z}$ )  
 iii . キャリブレーションゾーンの上流、下流または同位置  
 に位置するサンプル適用ゾーン ( $A_{SZ}$ ) が存在することを特徴とし、  
 反応体 \* が予め保持されていない場合、反応体 \* が  $A_{R*Z}$  に添加されるか、反応体 \* が予め保持している場合、緩衝液が  $A_{R*Z}$  に添加され、サンプルが  $A_{SZ}$  に添加され、検体および反応体 \* が同時に D Z に到着するように、または検体が D Z に反応体 \* の前に到着するように予め混合されている、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 6】

キャリブレーションゾーン群 (C Z) がキャリブレーター結合剤を呈示し、キャリブレーターがキャリブレーションゾーン群の上流に予め保持されていることを特徴とする、請求項 5 記載の方法。

40

【請求項 7】

プロセスフローが 2 個またはそれ以上の該キャリブレーションゾーンを含むことを特徴とする、請求項 5 または 6 に記載の方法。

【請求項 8】

プロセスフローが 2 個またはそれ以上の該キャリブレーションゾーン を含み、サンプル中の検体のレベルを：

a . 1 個またはそれ以上の別々に得られたキャリブレーター値を呼び出し、そして  
 b . 該検出ゾーンと同じプロセスフローに位置するキャリブレーションゾーンのキャリブレ

50

ーター値(陽性内部キャリブレーター = PIC)を、1個またはそれ以上の別々に得たキャリブレーター値と比較し、

c. 検出ゾーンからの測定シグナルを、別々のキャリブレーター値由来のPICの測定シグナルの偏差に適用し、続いて

d. 1個またはそれ以上の別々に得たキャリブレーター値と比較することにより、サンプル中の検体のレベルを獲得すること

により得ることを特徴とし、または段階cおよびdに関して、何を適合させ、何を比較するかは逆であることもある、請求項5または6に記載の方法。

【請求項9】

a.  $A_S Z$ は(i)  $A_R * Z$ と共通である( $= A_S Z / A_R * Z$ )または(ii)  $A_R * Z$ の上流に位置する、そして

b. (i)の別法として、共通ゾーン  $A_S Z / A_R * Z$  に添加される前にサンプルが反応体<sup>\*</sup>と予め混合されている、またはサンプルを予備保持した反応体<sup>\*</sup>を含む共通ゾーン  $A_S Z / A_R * Z$  に適合させ、(ii)の別法として、サンプルを  $A_S Z$  に添加し、それは  $A_R * Z$  の上流に位置し、それが予め保持した反応体<sup>\*</sup>を含むことを特徴とする、請求項5から8のいずれかに記載の方法。

【請求項10】

検出ゾーンが粒子を介してマトリックスに固定されている場合、反応体<sup>\*</sup>が分析的に検出可能な基および/またはキャリブレーターまたはキャリブレーター結合剤および/または捕獲体の粒子を有することを特徴とする、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

検体が反応体Iまたは反応体<sup>\*</sup>に方向付けされた抗体であり、

a. 検体が反応体Iに方向付けされた抗体である場合、反応体<sup>\*</sup>が検体に方向付けされた抗体であり、反応体Iが抗原および/またはハプテンである、そして

b. 検体が反応体<sup>\*</sup>に方向付けされた抗体である場合、反応体<sup>\*</sup>が抗原またはハプテンであり、反応体Iが検体に方向付けされた抗体である

ことを特徴とする、請求項1から10のいずれかに記載の方法。

【請求項12】

検体が抗原であり、反応体<sup>\*</sup>および反応体Iが検体に方向付けされた抗体であることを特徴とする、請求項1から10のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

アレルギーまたは自己免疫疾患の関連物質をインビトロで測定することを特徴とする、請求項1から12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

サンプル中の検体の量に比例した量で反応体<sup>\*</sup>を含む複合体を形成させることによる、複合した、反応体<sup>\*</sup>(=分析的検出可能反応体)に関連する測定シグナル値を、サンプル中の検体の量の測定のために生物特異的親和性反応を用いる分析法の実施に関連して、サンプル中の検体の実際の量に変えるための装置であって：

a. 反応体<sup>\*</sup>の輸送のためのプロセスフローの領域があるフローマトリックスを呈示し、そして該領域に

i. マトリックスに堅く固定されたキャリブレーター、またはキャリブレーター用結合剤を含む2個またはそれ以上のキャリブレーターゾーン(CZ1、CZ2...)が存在し、キャリブレーターまたはキャリブレーター結合剤の量が各々少なくとも二つのキャリブレーターゾーンに関して異なり、キャリブレーターは、反応体<sup>\*</sup>がキャリブレーターゾーンを通過して1個またはそれ以上の検出ゾーン(DZ)に向かって輸送されるとき、反応体<sup>\*</sup>が結合し得る結合部位を呈示し、

ii. 該2個またはそれ以上のキャリブレーターゾーンの上流に位置する反応体<sup>\*</sup>の適用ゾーン( $A_R * Z$ )を呈示する

ことを特徴とする、装置。

【請求項15】

10

20

30

40

50

キャリブレーター結合剤がマトリックスに堅く固定され、装置がキャリブレーターゾーンの上流に予め保持しているキャリブレーターを含むことを特徴とする、請求項 1 4 記載の装置。

【請求項 1 6】

装置が  $A_R * Z$  に予め保持された反応体  $*$  を含むことを特徴とする、請求項 1 4 または 1 5 記載の装置。

【請求項 1 7】

プロセスフローが  $A_R * Z$  の下流または同位置に位置する検出ゾーン ( $DZ$ )、それを介して反応体  $*$  が  $DZ$  に結合できる堅く固定された捕獲体、および該  $DZ$  の上流または同位置に位置するサンプル適用ゾーン  $A_S Z$  を含むことを特徴とする、請求項 1 4、1 5 または 1 6 に記載の装置。

10

【請求項 1 8】

$A_R * Z$  が  $A_S Z$  の上流または下流または同位置に位置することを特徴とする、請求項 1 7 に記載の装置。

【請求項 1 9】

堅く固定された捕獲体が検体または検体関連反応体に生物特異的親和性を有することを特徴とする、請求項 1 7 から 1 8 のいずれかに記載の装置。

【請求項 2 0】

堅く固定された捕獲体が、検体または検体関連反応体に生物特異的親和性を有する第 2 反応体に生物特異的親和性を有することを特徴とする、請求項 1 7 から 1 8 のいずれかに記載の装置。

20

【請求項 2 1】

該 2 個またはそれ以上のキャリブレーターゾーンが  $DZ$  の上流に位置することを特徴とする、請求項 1 7 から 2 0 のいずれかに記載の装置。

【請求項 2 2】

$A_S Z$  が全てのキャリブレーターゾーンの上流に位置することを特徴とする、請求項 1 7 から 2 1 のいずれかに記載の装置。

【請求項 2 3】

請求項 1 4 から 2 2 のいずれかに記載の装置を含むことを特徴とする、キット。

【請求項 2 4】

キットが反応体  $*$  を含むことを特徴とする、請求項 2 3 記載のキット。

30

【請求項 2 5】

該装置がマトリックスに結合したキャリブレーター結合剤を有するとき、キットがキャリブレーターを含むことを特徴とする、請求項 2 3 または 2 4 記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

技術分野

本発明は、サンプル中の検体の測定の過程に関する方法に関し、該過程は生物特異的親和性反応の利用に関する。本方法は：

i . 反応体  $I$  - - - 検体' - - - 反応体  $*$

40

( a . 反応体  $*$  および反応体  $I$  は検体' に生物特異性を示す、そして

b . 反応体  $*$  は分析的に検出可能である)

からなる複合体の形成、続く

ii . 複合体中の反応体  $*$  由来の検出可能なシグナルの測定(サンプル値)、そして

iii . 各々、既知の量の検体(標準量)に対応する 1 個またはそれ以上の量のキャリブレーター(キャリブレーター量)に別々に結合可能である対応する反応体  $*$  由来のシグナル(キャリブレーター値)と、サンプル値との比較による検体の量の獲得の段階を含む。

【0002】

検体' は、検体それ自体(サンプル中)、または検体関連反応体、即ち、サンプル中の検体の量に相関する量で複合体に包含される添加された生物特異的親和性反応体である。反応

50

体<sup>\*</sup>および反応体Ⅰは、同時に検体'に結合できる。これは、それらが空間的に離れた結合部位に結合することを意味する。

【 0 0 0 3 】

このタイプの分析法は、とりわけ、いわゆるフローマトリックスで行われており、それにより検体を含む反応体がマトリックスを通るプロセスフローを通り検出ゾーン(DZ)に運ばれ(=フロー方法論)、そこで反応体<sup>\*</sup>がサンプル中の検体の量に相関する量で捕獲される。捕獲は、DZのマトリックスに堅く固定された反応体(捕獲体)を介して起こる。捕獲体は、反応体Ⅰであるか、または反応体Ⅰ、もしくは、所望により1個またはそれ以上の反応体を介して、反応体Ⅰに生物特異的親和性を有する他の反応体に生物特異的親和性を有する反応体であり得る。

10

【 0 0 0 4 】

生物特異的親和性を示す反応体(検体を含む)(バイオアフィン反応体)は、反応体対：抗原／ハプテン - 抗体；ビオチン - アビジン／ストレプトアビジン；核酸の二つの相補的一本鎖等の個々のメンバーを意味する。抗体として、Fab、Fab<sub>2</sub>'、一本鎖Fv抗体(scFv)等のような抗原結合抗体フラグメントが考慮される。当該反応体は、天然に存在する必要はなく、合成的に製造した分子／結合剤でもあり得る。

【 0 0 0 5 】

当該試験法のタイプは、特にいわゆる免疫化学測定法に関連して、少なくとも用いる反応体対の一部がタンパク質構造を示す生物特異的親和性反応体を主に用いている。

生物特異的親和性反応体は、主に水性媒体(水のような)中で行う。

20

【 0 0 0 6 】

以前に使用のキャリブレーター

慣用的に、キャリブレーターおよび分析体は、しばしば両方とも反応体<sup>\*</sup>に結合することが可能である。キャリブレーター上の反応体<sup>\*</sup>に結合する当該結合部位は、しばしば、検体の対応する結合部位と同等な結合特性を有する。実施に際し、これは、キャリブレーターおよび検体が構造的に等しいか類似であり、反応体<sup>\*</sup>に関して互いに交差反応する結合部位を有することを意味する。互いにある反応体に関して／ついて交差反応する結合部位は同等である。

【 0 0 0 7 】

キャリブレーター量は、先行技術では、一般に標準量と等しい。

30

異なる検体量／濃度(標準量)に対応するキャリブレーター値は、しばしば用量 - 反応曲線(検量線)またはアルゴリズムに編集される。

“サンプル値をキャリブレーター値と比較する”なる表現は、比較が、数個のキャリブレーター値に対応する検量線および／またはアルゴリズムで行われることも包含し得る。

【 0 0 0 8 】

キャリブレーターおよび検体はしばしば同じ物質である。例外がある。抗体測定において、一つのそして同じキャリブレーターがしばしば数個の抗体特異性に関して操作されるが、ただし、キャリブレーター物質はそれが測定する抗体の定常ドメインを呈示するように選択する。例えば、Abbott WO97/27486参照。

【 0 0 0 9 】

40

先行技術の欠点

先行技術は、通常、サンプルに対応する方法で既知の量の検体(標準量)を流すことによる、サンプルと並行の数個のキャリブレーター値の測定を含む。これは、全てのランの5 - 20%がキャリブレーターランであることを導く。キャリブレーターランの数、恐らく、また各キャリブレーターランの反応段階の数の減少により、時間および試薬の消費が節約できる。

【 0 0 1 0 】

異なる特性および濃度を有するキャリブレーターおよびサンプル溶液に依存する問題がしばしば起きる。これは、キャリブレーターをしばしば緩衝液中で測定し、サンプルの分析を血清または血漿サンプルで行う免疫学的試験で特に明白である。濃度および粘性の差が

50

異なる反応を産生する(とりわけ、“リカバリー”および平行性として測定される)。加えて、フロー法中の粘性が、移動/流動速度に影響するため、非常に重要になる。この差異は補うことができるが、同時に、システムを妨害に対してより感受性にし、従ってアッセイ間の変化を増加する。流れを用いる試験の他の問題は、温度および湿度変動等に依存する流れの変化の可能性である。

【0011】

上記の問題は、EP-A-253,464に記載され、固相上の試験ゾーンおよび対照ゾーンを使用するアッセイ法によりある程度解決している。

【0012】

本発明の目的

10

本発明の第1の目的は、現在最初に記載の種類の試験で使用されているキャリブレーション法の改善である。

本発明の他の目的は、主に、試薬の必要な消費量の減少および/またはキャリブレーター値を得るための測定の数の減少による、キャリブレーターの使用の単純化である。

【0013】

本発明の第3の目的は、特に、フロー法に関し、キャリブレーターとサンプル溶液の間および違う時間および/または違う場所で行うランの間で存在し得る差異の補正を可能にすることである。

【0014】

本発明

20

これらの目的が、キャリブレーターを適切なプロトコールにしたがってキャリブレーター値の測定を開始する前にマトリックスに結合させた場合に達成できることを、理解した。このタイプのキャリブレーターは、以下、マトリックスキャリブレーターと呼ぶ。本発明の最初の主な態様は、したがって、最初に記載の方法にしたがった方法であり、キャリブレーター値の測定の開始前に、反応体<sup>\*</sup>のキャリブレーターへの結合が起こる液体媒体に不溶性のマトリックスに、キャリブレーターまたはキャリブレーターに結合できる試薬が結合しているという特徴的性質を有する。これは、キャリブレーターまたはキャリブレーター結合剤が、各々、通常、製造者により既にマトリックスに結合されており、マトリックスキャリブレーターがキット内の直ぐに使用できる成分として配送されることを意味する。キャリブレーターとマトリックスの間の結合は、通常、サンプルを流したときの検体<sup>\*</sup>と反応体Iの間に得られるものと違う種類である。

30

【0015】

マトリックスキャリブレーターは、反応体<sup>\*</sup>のキャリブレーターへの輸送が、いわゆるフローマトリックス中の流れ(プロセスフロー)の手段により、マトリックスキャリブレーターまたはキャリブレーター結合剤を含むマトリックスのゾーン(キャリブレーターゾーン、CZ)まで起こるとき、非常な利点を提供する。

【0016】

キャリブレーター結合剤がマトリックスに結合したとき、キャリブレーターは検出ゾーンから離れたゾーン内のマトリックスに可動性(拡散性)に予め保持(deposit)されているか、サンプルと一緒にまたは別々に添加し得る。

40

【0017】

キャリブレーター結合剤は通常特異的結合対(反応体対)のメンバーの一方であり、結合対の他方のメンバーはキャリブレーター物質に結合しているか、接合している。このような特異的結合対は、当業者に既知であり、例示的に：抗原-抗体およびハプテン抗体、ビオチン-アビジンまたは-ストレプトアビジン、レクチン-糖、ホルモン-ホルモンレセプター、核酸二本鎖のような免疫学的結合対を記載し得る。

【0018】

フローマトリックス

フローマトリックスは反応体が輸送される空間を画定する。このように、マトリックスは、その中を伸びる単一流路(キャピラリーのような)の内部表面、流路のシステムを有する

50

多孔性マトリックスの内部表面(多孔性マトリックス)等であり得る。このタイプのマトリックスはフローマトリックスと呼ばれる。マトリックスはモノリス、シート、カラム、膜、キャピラリー寸法を有する単一流路またはこのような流路の統合システムの形等で存在し得る。それらは、カラム包装、圧縮繊維に詰められた粒子の形等でも存在し得る。マトリックスの内部表面、即ち、流路の表面は親水性であり、水性媒体(主に水)がマトリックスに吸収され、輸送され得る。流路の最小内部直径は(円柱状横断面を有する導管の直径として測定して)、使用する反応体がマトリックスを通して輸送されるのに十分大きくなければならない。つまみの規定は、マトリックスが相互に関係する流路のシステムを有する場合、 $0.4 - 1000 \mu\text{m}$ 、好ましくは $0.4 - 100 \mu\text{m}$ の間の最小内部直径の流路を有するものの中から、適当なマトリックスを選択可能とするものである。広い間隔( $1000 \mu\text{m}$ まで)の上部に最小内部寸法を有する流路は、外部からの圧力/吸引により駆動される流れのとき主として興味深い。

10

#### 【0019】

目的のマトリックスは、ポリマー、例えば、ニトロセルロース、ナイロンなどから構築される。マトリックスの物質ならびに、流路の物理的および幾何学的設計は流れに沿って変化し得、マトリックスのどの特定部位を使用するかに依存する(Pharmacia AB W096/22532; Medix W094/15215)。

#### 【0020】

マトリックスの流れに沿って、サンプル、反応体、緩衝液等の適用のための1個またはそれ以上のゾーン( $A_S Z$ 、 $A_R Z$ 、 $A_B Z$ 等)、およびキャリブレーターおよび/または検出のための1個またはそれ以上のゾーン(各々 $C Z$ および $D Z$ )が存在し得る。

20

#### 【0021】

当該試験のタイプで使用し得る種々のフローマトリックスが先の特許公報に記載されている。例えば、Behringwerke US4,861,711、Unilever 88/08534、Abbott US 5,120,643および4,740,468、Becton Dickinson EP 284,232、および4,855,240; Pharmacia AB WO 96/22532参照。

#### 【0022】

##### プロセスフロー

流れの方向は、サンプルおよび/または反応体の適用ゾーンから、存在するキャリブレーターおよび検出ゾーン(各々 $C Z$ および $D Z$ )に向かう。正確にプロセスフローがどのゾーンを通過するかは当該試験プロトコールにより決定される。プロセスフローは放射状に広がり、円形周辺の形の流れ先端の点またはその一部から出発し得る。プロセスフローはまたバンドの形のゾーンから出発し得、流れの方向に垂直の真直ぐな流れ先端を有し得る。

30

#### 【0023】

あまり好ましくない変法において、プロセスフローは同時にキャリブレーターゾーンまたは検出ゾーンでもある反応体の適用ゾーンから前進する。この変法において、流れは好ましくは適用ゾーンから放射状に広がり、更なるキャリブレーターゾーンおよび/または検出ゾーンを通過し得る。

#### 【0024】

マトリックスを通る流れは、毛管力の作用により、例えば、実質的に乾燥したマトリックスで始めることにより達成し得る。吸収体を、補助のために流れの一番端に置いて良い。負荷された電場の手段により、溶解成分を適用のゾーンから検出/キャリブレーターゾーンに輸送し得る。

40

利用する流れは好ましくは横向きであり、即ち、マトリックスの上部表面と並行である。マトリックスの奥へのような他のタイプの流れも使用し得る。

#### 【0025】

##### フローマトリックスのキャリブレーターおよび検出ゾーン

好ましい態様で使用するフローマトリックスは、キャリブレーターを備えた1個またはそれ以上の別のゾーンを有する(キャリブレーターゾーン、 $C Z 1$ 、 $C Z 2$ 、 $C Z 3$ 等)。

50

各キャリブレーターゾーンは、流れが通過したときにゾーン内で検出する反応体<sup>\*</sup>からの測定シグナル(キャリブレーター値)が、サンプル中の一定量(標準量)に明白に対応するような量でマトリックスキャリブレーターに含まれる。

【0026】

キャリブレーターは、以前に当該試験のタイプで行っていたのと同じ方法で選択し得る。フロー法を使用して、キャリブレーターゾーンを輸送するサンプル(検体)のために計画して、キャリブレーターは検体に結合しないように選択すべきである。キャリブレーターが検体と結合できる場合、サンプルの適用のゾーンに関連してキャリブレーターゾーンの位置の特別な要求が加わる。下記参照。

【0027】

キャリブレーターゾーンに結合しているキャリブレーターの量は、対応する標準量と同じである必要はない。これは、キャリブレーター物質がマトリックスに結合したとき、反応体<sup>\*</sup>に対する結合活性がしばしば変化するためである。

【0028】

異なる特異性であるが同じ種由来である抗体、同じIgクラスであるまたはIgサブクラスである抗体の決定が望ましい場合、キャリブレーターが種、クラスまたはサブクラスに独得な結合部位を呈示するキャリブレーターが好ましい。概して、これは抗体の測定のためのキャリブレーターが当該抗体の不変ドメイン、哺乳類抗体では主にIg(Fc)の部分に存在するエピトープを呈示することを意味する。

【0029】

一つのそして同じマトリックスは、1個またはそれ以上のキャリブレーターゾーンと共に1個またはそれ以上の検出ゾーン(DZ1、DZ2、DZ3等)を呈示し得る。検出ゾーンにおいて、検体および反応体<sup>\*</sup>を含む複合体は、最初に記載のDZに堅く固定された捕獲体を介してマトリックスに結合する。反応体Iがマトリックスに捕獲体を介して結合する場合、反応体Iは開始からマトリックスに固定されている必要はなく、検出ゾーンから離れた領域またはゾーン内のマトリックスに可動性(分散性)に予め保持しているか、サンプルと同時にまたは別々に添加し得る。

【0030】

同じフローマトリックスに数個のキャリブレーターおよび/または検出ゾーンが存在する場合、数個のゾーンが同じプロセスフローに沿って位置する場合に、本発明の大きな利点が達成される。

【0031】

一つのそして同じマトリックスに数個の検出ゾーン(DZ1、DZ2、DZ3等)が存在する場合、これらは異なる検体に対応し得る。同じ結合部位を有する検体に関して同じキャリブレーターを利用できる。検体が同じ結合部位を欠く場合、各検体に対して一つのキャリブレーターが必要である。全ての検体が同じ同等な結合部位を有する場合、最も単純な条件が考えられる。同じキャリブレーター、同じキャリブレーターゾーンおよび同じ反応体<sup>\*</sup>を、その時は全ての検体に使用し得る。

【0032】

キャリブレーターゾーンおよび検出ゾーンは、種々の方法(方形、円形、直線状、点形等)で幾何学的に設計し得る。ゾーンは互いに別々の配置を有し得る。良い配置は、共通の流れが、連続的にまたは同時に数個のゾーン、特に異なる種類のゾーン(DZおよびCZ)を通過するものである。連続通過の例は、同じプロセスフローにおいて互いの後に位置する並行ゾーンである。同時通過の例は、プロセスフローが対応する円の中心から放射状に拡散する場所である同じ円形周囲で互いに隣接して位置するゾーンである。これらの変法の組合わせを使用し得、すなわち、円形周囲のゾーンから離れて、また最初に記載の円形周囲と同一中心である円の周囲にまたゾーンが存在する。同時通過はまたプロセスフローの出発点から同じ距離で互いに隣接して位置する検出およびキャリブレーターゾーンを有する直線流れ先端で達成し得る。

【0033】

10

20

30

40

50



数個の検出ゾーンおよび/またはキャリブレーターゾーンが同じプロセスフローに位置する場合、これらのゾーンの測定シグナルは、一つのそして同じ試験ラン/試薬適用により得られる得る。同じプロセスフロー中に数個のキャリブレーターゾーンが存在する場合、用量-反応曲線(キャリブレーター曲線)またはアルゴリズムを反応体\*の同じ適用により得られた値に関して構築し得る。同じフロー中に検出ゾーンと共に存在するキャリブレーターゾーンは、陽性内部キャリブレーター(PIC)として機能し得る。

#### 【0034】

一つの変法において、マトリックスは、1個またはそれ以上の別々に得られるキャリブレーター値との組み合わせにおいて、少なくとも一つのキャリブレーターゾーン(CZ1、CZ2等(陽性内部キャリブレーター))および少なくとも一つの検出ゾーン(DZ1、DZ2等)を呈示するものとして利用する。別々に得られるキャリブレーター値は、サンプルを流す同じ条件を言及する必要はない。別々のキャリブレーター値で、キャリブレーション曲線およびアルゴリズムは長期間使用することを意図し、マスター値、マスター曲線およびマスターアルゴリズムを各々対照とする。

#### 【0035】

別々に得られたキャリブレーター値の使用は：

- i. サンプルおよび反応体\*を、DZおよびCZの両方を呈示するマトリックス中の検出ゾーン(DZ)および陽性内部キャリブレーター(PIC、CA)を通過させる、
- ii. CZ(PIC値、CZ)およびDZの測定シグナルの決定、
- iii. PIC値と別に得た対応するキャリブレーター値との比較、それにより偏差は、サンプルを流した条件下と別々のキャリブレーター値を適用させた標準条件の間の偏差となる、
- iv. サンプルの測定シグナル(サンプル値)の、別々に得たキャリブレーター値に適切な条件への適合、および次いで
- v. サンプルの適合させた測定シグナルと別々のキャリブレーター値の比較による、サンプル中の検体量の獲得を含む。

#### 【0036】

あるいは、別々のキャリブレーター値を条件における偏差に適合させ、次いで測定サンプル値を適合させたキャリブレーター値と直接比較し得る。これは、上記段階(iv)および(v)と同じである(特許請求の範囲では逆に呼んでいる)。段階(iv)と(v)は、もちろん、対応するキャリブレーション曲線またはアルゴリズムに、これらとサンプルの値との比較により検体のレベルを計算するために適合させるための別法として包含される。

#### 【0037】

上記したものは、もちろん、キャリブレーター用結合剤がマトリックスのキャリブレーションゾーンに結合している場合にも当て嵌まる。

#### 【0038】

同じプロセスフロー中のキャリブレーターおよび検出ゾーンは、以前のサンプルとキャリブレーターとの間の差異に基づく誤りの源を減少する。同じプロセスフロー中の陽性内部キャリブレーターおよび数個のキャリブレーターゾーンは、別々のランの間の流れの変化を、完全にまたは部分的に補う。測定結果の広がり減少され、同時に、内部および外部因子が完全にまたは部分的に補い得る。異なる組成を有するサンプルとキャリブレーターによる問題は排除される。手近な患者での試験で、内部キャリブレーターは、どれが陽性反応を構成するか、および今日これらのタイプの試験で得られていない品質保証を提供するかに関して、明確な限界を提供できる。

#### 【0039】

キャリブレーターのマトリックスへの固定は、共有結合的結合または物理的吸着、生物特異的親和性等を介して行い得る。この分野での先行技術と同様に、本発明はキャリブレーターに方向付けされた生物特異的親和性反応体のマトリックスへの共有結合的結合のような、結合タイプの組み合わせを利用し得る。特に、ピオチニル化キャリブレーターと組合わせた物理的吸着または共有結合的結合ストレプトアビジン、または同様に結合したキャリ

10

20

30

40

50

プレートに方向付けされた抗体を特記し得る。キャリブレーターのマトリックスへの固定は、キャリブレーターが共有結合的に、物理的吸着作用によりまたは生物特異的等の結合で結合しているマトリックス中ノ上に保持した粒子を介して行い得る。マトリックスへの粒子の結合は、そのサイズが、それらがマトリックスを介して輸送できないように選択されるためかまたは物理的吸着のためである。とりわけ、Abbott/Syntex US 4,740,468; Abbott EP 472,376; Hybritech EP 437,287およびEP 200,381; Grace & Co EP 420,053; Fuji Photo Film US 4,657,739; Boehringer Mannheim WO 94/06012参照。

#### 【0040】

捕獲体は、キャリブレーターに適用されたものと同じ原理で検出ゾーンに結合し得る。一つのそして同じプロセスフローにおいて、キャリブレーターおよび捕獲体は同じ方法でまたは異なる方法でその各々のゾーンに結合し得る。上記でキャリブレーターと捕獲体の固定に関して述べているのは、もちろん、またキャリブレーター物質用結合剤の固定についても適用できる。例えば、上記のビオチニル化キャリブレーター物質と物理的または共有結合的結合したストレプトアビジンの組合わせを使用し得る。

10

#### 【0041】

サンプル適用ゾーン( $A_s Z$ )

サンプル適用ゾーンはキャリブレーターゾーンに対して上流または下流、好ましくは上流に位置し得る。マトリックスキャリブレーターが、検体に結合するように選択されている場合、サンプル適用ゾーンはマトリックスキャリブレーターの下流に位置すべきである。検出ゾーンに関連して、サンプル適用ゾーンは、有用な態様においては常に上流に位置すべきである。

20

あるあまり好ましくない態様において、サンプルをキャリブレーターまたは検出ゾーンに適用することが考えられる。

#### 【0042】

反応体 $^*$ ( $A_R Z$ )および他の生物特異的親和性反応体( $A_R Z$ )適用ゾーン

反応体適用ゾーン( $A_R Z$ )は常にキャリブレーターゾーンの上流に位置すべきである。プロセスフロー中に検出ゾーンがある場合、生物特異的親和性反応体の適用ゾーンの順序は、検体 $^*$ が、反応体 $^*$ の前にまたは同時にその検出ゾーンに輸送されることを確実にしなければならない。1個またはそれ以上の反応体を同じ適用ゾーンに添加し得る。適用ゾーンがサンプルと少なくとも一つの反応体(反応体 $^*$ としておくが)で共通である場合、適用は、同時に、例えば、サンプルと反応体をゾーンに適用する前に混合しておくことにより行い得る。望ましい場合、サンプルの適用前に、意図されるように、混合物が検体またはサンプル中の他の成分に結合するようにプレインキュベートする。種々のプロトコルの知識により、当業者はどのゾーンを必要とするか、および可能なその順序を容易に決定できる。

30

#### 【0043】

反応体Iが溶解形で存在する場合、検出ゾーンに堅く固定された捕獲体が存在すると同時に、マトリックスはその適用ゾーンを有する。捕獲体が反応体Iと結合するために付加的な生物特異的親和性反応体を必要とする場合(下記“技術分野”参照)、これらの反応体の適用ゾーンが存在する。捕獲体でないとき、反応体Iおよび他の付加的反応体の適用ゾーンは、反応体Iが検体 $^*$ の前にまたは同時に検出ゾーンに到達するように位置しなければならない。反応体Iが可溶性形である場合、捕獲体は好ましくは特異的結合対の一つのメンバーであり、その他のメンバーは反応体Iに結合または接合している。例示的な特異的結合対は、抗原-抗体およびハプテン-抗体、ビオチン-アビジンまたは-ストレプトアビジン、レクチン-糖、ホルモン-ホルモンレセプター、核酸二本鎖のような免疫学的結合対である。

40

#### 【0044】

キャリブレーターと反応体Iが可溶性形であり、次いで、特異的結合対を介してマトリックスに結合する場合、これら二つの結合対はもちろん異なる。

あるあまり好ましくない態様において、生物特異的親和性反応体(反応体 $^*$ を含む)をキャ

50

リブレーターまたは検出ゾーンに適用し得る。“プロセスフロー”なる標題の項参照。

【0045】

本方法に使用する反応体は、その各々のゾーンに予め保持されているか、測定法の実行に関連して添加し得る。予めの保持は、液体の流れが開始するか、ゾーンを通過するまで、適用ゾーンの外側に広がらないような方法で、前もっての当該反応体の適用を含む。

【0046】

反応体の予めの保持は、それ自体既知の方法で行い得る(Behringwerke US 4,861,711; Unilever WO 88/08534; Abbott US 5,120,643; Becton Dickinson EP 284,232)。予め保持させた反応体が、液体が当該適用ゾーンを通過するときに容易に溶解しなければならないという事実を考慮することは重要である。早い溶解を達成するために、速く溶解する物質の中にノと共に反応体を包含させるノ共保持させることは一般的である。このタイプの物質はしばしば、ヒドロキシ、カルボキシ、アミノ、スルホネート等の極性およびノまたは荷電基を有する親水性である。特に、例えば、炭水化物構造、モノ-、ジ-およびオリゴサッカライドを含む単純糖ならびに対応する糖アルコール(マンニトール、ソルビトール等)を有する、親水性の速く溶解するポリマーを特記し得る。当該適用ゾーンを、最初に速く溶解する物質の層で被覆し、その上で、恐らく速く溶解する物質の更に一つの層の添加に続いて、反応体を適用するのは一般的な実施である。別法は、速く溶解する物質の粒子内に反応体を包含させ、次いでマトリックスの当該ゾーンに保持させることによる。

【0047】

緩衝液ゾーン( $A_B Z$ )

必要な緩衝システムは、サンプルおよび反応体と同時に添加する溶液に包含され得る。伝統法において、緩衝液の添加は、他の全ての適用ゾーンの上流に位置する適用ゾーンで行われる。これは、しばしばサンプル適用ゾーンと同じである。本発明において、緩衝液は原則として輸送の流れに沿った任意の位置に添加し得る。下記参照。

【0048】

同時PCT出願“2つまたはそれ以上の位置における添加を含む分析法ならびにその装置および試験キット”(SE9704934-0が基礎)において、一つの変法が本発明の好ましい態様を提供するものである発明を記載する。この出願は、本明細書に引用して包含させる。この別の特許出願における発明は、フローマトリックス中の二つの連続ゾーン( $A_Z 2$ および $A_Z 1$ )由来の液体が、混合せずに互いの後に移動し得るという発見に基づく。これは、上流に位置する液体の適用ゾーン( $A_Z 2$ )の前にまたは本質的に同時に下流に位置するゾーン( $A_Z 1$ )に液体を適用した場合に達成される。この発見は、液体中に存在する反応体の、検出ゾーンに向かうゾーンワイズな移動の達成の能力により導かれた。サンプル適用ゾーン( $A_S Z$ )が反応体適用ゾーン( $A_R Z$ )の下流に位置し、液体が $A_R Z$ にサンプルが $A_S Z$ に適用される場合、検体は反応体を含む液体が移動する前に検出ゾーンに移動する。 $A_R Z$ と $A_S Z$ の間に液体単独(緩衝液)の適用のための一つのゾーン( $A_B Z$ )が存在する場合、検出ゾーンDZの洗浄が検体および反応体の捕獲の間に得られる。このような中間緩衝ゾーン( $A_B Z$ )は下流に位置するゾーンに適用する反応体(検体を含む)が、上流に位置する適用ゾーンから出発して、反応体の前にDZに到着することも確実にし得る。後者は、マトリックス自体が下流に位置するゾーンに適用されている反応体を妨害する場合、重要であり得る。

【0049】

反応体はゾーンに適用する液体に包含され得る。あるいは、液体の適用に関して、対応する液体を適用するゾーンまたは、これと下流に位置する最も近いゾーンの間に位置するゾーンにおいて予め保持させ得る。サンプル(検体)は通常液体の形で適用される。

【0050】

本発明の態様は、フローマトリックスにおける当該タイプの連続法、即ち、キャリブレーターゾーンに加えてマトリックスも検出ゾーンに添加され、サンプルノ検体を、反応体含有液体の前に検出ゾーンに輸送させる方法のために特に興味深い。

【0051】

分析的に検出可能な反応体(反応体<sup>\*</sup>)

通常、反応体の分析検出性は、それが分析的検出可能基を含むため、得られる。しばしば使用される基の例は、酵素活性基(酵素、共同因子、補酵素、酵素基質等)、フルオロフォア、クロモフォア、化学ルミネセンス、放射活性基等である。生物特異的親和性反応体の手段により検出される基はまた通常この範疇に入り、例えば、ビオチン、ハプテン、Igクラス、IgサブクラスおよびIg種特異的決定基等である。本発明において、表面が生物特異的親和性反応体で被覆されている粒子が特に良好であると証明されている。粒子はフルオロフォア基のような前記の検出可能な基を含み得、またはそれらは着色され(=発色体基を含む)得る。有用な粒子は、しばしば0.001 - 5 μm、好ましくは0.01 - 5 μmの間のサイズを有する。粒子は球状および/または単分散または多分散であり得る。それらはコロイド状特徴、いわゆるゾル(即ち、0.001 - 1 μmの間のサイズを有する、通常球状および単分散である)を有し得る。既知の具体的な標識基は金属粒子(金ゾルのような)、非金属粒子(SiO<sub>2</sub>、炭素、ラテックス、殺した赤血球および細菌のような)である。ある場合、粒子が利用条件下で非沈降可能でなければならないことを強調する(Pharmacia AB, WO 96/22532参照)。

#### 【0052】

また、Unilever, WO 88/08534; Abbott, US 5,120,643; Becton Dickinson, EP 284,232を参照。

#### 【0053】

マトリックスキャリブレーターの開発と関連して、我々は：

(a) 検出可能基が上記のように粒子である反応体<sup>\*</sup>、そして

(b) 捕獲体が粒子(固定粒子)を介してマトリックスに結合し、マトリックスを介した粒子の輸送を可能にするサイズを有する検出ゾーン

を同時に利用した場合、良好な結果が得られ得ることを、驚くべきことに発見した。

#### 【0054】

我々は、標識粒子および固定粒子が実質的に同じサイズである機能システムを達成しており、これは、マトリックスにより画定される流路より小さい限り、多分、標識粒子が固定粒子よりも大きくてもよく、逆もあり得ることを意味する。システムは、反応体<sup>\*</sup>の予めの保持有りまたは無しで機能する。この態様は、同時継続PCT出願の“粒子を使用した分析法および本方法を使用するための試験キット”(SE9704935-7が基礎)に詳述する。また、この後者の出願は引用して本明細書に包含させる。本発明に適用して、これは、反応体<sup>\*</sup>が上記aにしたがった分析的検出可能基としての粒子を有し、キャリブレーターおよび/または捕獲体が上記bにしたがった粒子を介してマトリックスに結合することを意味する。

#### 【0055】

関連試験プロトコール

本発明は、主に非競合的(非障害)試験変法に適応されるが、複合体が反応体Iと反応体<sup>\*</sup>の間の検体関連反応体を形成させることを含む場合、競合的(障害)試験変法にも適用し得る。プロトコールは同時または連続変法として流し得る。同時法は、反応体<sup>\*</sup>および検体<sup>'</sup>が、検出ゾーンに向かって少なくとも輸送の間の一部分同時輸送され、好ましくは後者に同時に到達することを意味する。連続法は、検体<sup>'</sup>が、検出ゾーンに向かう輸送の少なくとも一部分、反応体<sup>\*</sup>の前を移動し、好ましくは検出ゾーンに反応体<sup>\*</sup>の前に到着することを意味する。説明的例示は下記に示す。“-”は最初からのマトリックスへの堅い固定に関する。“- - -”は生物特異的親和性を介した結合に関する。反応体<sup>\*</sup>が利用する結合部位に関して単官能性であることが仮定される。

#### 【0056】

A. サンドイッチプロトコール：反応体I(=捕獲体)および反応体<sup>\*</sup>は検体(=検体<sup>'</sup>)に生物特異的親和性を有する。xはマトリックス上の反応体Iのモル数である。yは、反応体Iを介してマトリックスに捕獲されている検体<sup>'</sup>のモル数である(=反応体<sup>\*</sup>のモル)。形成される複合体：

マトリックス[ - 反応体 I ]<sub>x-y</sub>[ - 反応体 I - - - 検体' - - - 反応体\* ]<sub>y</sub>

【 0 0 5 7 】

B . サンドイッチプロトコール：反応体 II (= 捕獲体) は反応体 I に生物特異的親和性を有し、それは検体 (= 検体') に生物特異的親和性を有する。反応体\* は検体に生物特異的親和性を有する。x はマトリックス上の反応体 II のモル数である。y は、反応体 II - - - 反応体 I を介してマトリックスに捕獲されている検体' のモル数である (= 反応体\* のモル)。z + y は反応体 II を介してマトリックスに捕獲されている反応体 I のモル数である。形成される複合体：

マトリックス[ - 反応体 II ]<sub>x-z-y</sub>[ - 反応体 II - - - 反応体 I ]<sub>z</sub> - [ - 反応体 II - - - 反応体 I - - - 検体' - - - 反応体\* ]<sub>y</sub>

10

【 0 0 5 8 】

C . 阻害タイプのプロトコール：反応体 I は検体アナログ (= 捕獲体) であり、検体の結合部位と同等な結合部位を有する。検体' は検体および反応体 I に生物特異的親和性を有する反応体である。反応体\* は検体' に生物特異的親和性を有する。検体' はサンプル中の検体の量に比例した量で形成された複合体中に包含される。x はマトリックス上の反応体 I のモル数である。y は、反応体 I を介してマトリックスに捕獲されている検体' のモル数である (= 反応体\* のモル数)。形成される複合体：

マトリックス[ - 反応体 I ]<sub>x-y</sub>[ - 反応体 I - - - 検体' - - - 反応体\* ]<sub>y</sub>

【 0 0 5 9 】

サンプル中の検体

20

本発明は、主に最初に記載のタイプの生物特異的親和性反応体(検体)の測定に適している。非常な利点があるが、共通デノミネーターとして少なくとも一つの同等な結合特性を有する結合部位を有する、多様な形で存在する検体に関して得られる。

【 0 0 6 0 】

非競合的方法(サンドイッチ)に関して、検体は抗原(アレルゲンを含む)に方向付けされた抗体、またはハプテン(上記試験プロトコール A および B)であり得る。この場合の反応体 I は抗体が方向付けされた抗原またはハプテンであり、反応体\* は検体に方向付けされた抗体である。あるいは、反応体\* は抗原またはハプテン、および反応体 I は検体に方向付けされた抗体である。非競合的方法に関して、検体はまた抗原であり、反応体\* および反応体 I は検体に方向付けされている。検体 - 抗原の例として、免疫グロブリン、恐らく、特定の I g クラスまたは I g サブクラスを記載し得る。検体が抗体または免疫グロブリンである場合、反応体\* および反応体 I は、各々、I g A、I g D、I g E、I g G または I g M および / または存在する場合、サブクラス(例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4)のような I g に特異的な決定基および / または特定種に生物特異的親和性を示し得る。これは、反応体\* および反応体 I が、各々、通常、検体が抗体または免疫グロブリンであるとき、これらの特性のいくつかを示す抗体であることを意味する。

30

【 0 0 6 1 】

競合的変異体は、主に、低分子量検体に適用可能である。上記試験プロトコール C において、検体は、反応体 I がマトリックスに結合した抗原 / ハプテン、検体' が抗原 / ハプテンに方向付けされた抗体、および反応体\* が検体' に方向付けされた抗体である場合、抗原 / ハプテンであり得る。

40

【 0 0 6 2 】

自己免疫疾患およびアレルギーに関連する検体の発生および / または量の測定を可能にすることが、発明者にとって特に興味深い。I g E または I g G クラスの抗 - アレルゲン抗体の測定が特に興味深く、後者の場合、好ましくは記載のサブクラスのいくつかに重きを置く。アレルゲン特異的抗体の測定は、I g E 介在アレルギーの診断と関連して用い得る。

【 0 0 6 3 】

サンプル

適切なサンプルは、生物学的起源、例えば、異なる体液(全血、血清、血漿、唾液、尿、

50

涙液、髄液等)、生理学的組織の抽出物、細胞培養培地、生物学における加工方法、食糧、環境(環境分析サンプル)等から由来し得る。サンプルは、例えば、マトリックス、関与する試験プロトコル等に適合するように予備処置し得る。

#### 【0064】

本発明の第2の態様

本発明の本態様は、マトリックスキャリブレーターが中心点を構成する試験装置に関連する。マトリックスキャリブレーターは、複合的、分析的検出可能反応体(=反応体<sup>\*</sup>)に関する測定シグナル値(サンプル値)を、生物特異的親和性反応に用いる分析法に関連して、サンプル中の検体の実際の量に変えるための分析法に使用する。本方法態様において、反応体<sup>\*</sup>がサンプルの検体の量に関連した量で複合体化する。本装置を使用し得る分析法の最も重要なタイプは、本発明の方法を使用するもの、即ち、反応体 I - - - 検体' - - - 反応体<sup>\*</sup>を含む複合体を形成するものである。反応体 I、検体'、反応体<sup>\*</sup>および - - - は、方法態様と同じ意味である。

10

#### 【0065】

本装置は：

a) 反応体<sup>\*</sup>の輸送のためのプロセスフローの領域があるフローマトリックスを呈示し、そして該領域は

i. マトリックスに堅く固定されたキャリブレーター、またはキャリブレーター用結合剤を含む1個またはそれ以上のキャリブレーターゾーン(CZ1、CZ2等)(キャリブレーターまたはキャリブレーター結合剤の量が各々少なくとも二つのキャリブレーターゾーンに関して異なり、キャリブレーターは、反応体<sup>\*</sup>がキャリブレーターゾーンを通して輸送されるとき、反応体<sup>\*</sup>が結合し得る結合部位を呈示する)

20

ii. 該1個またはそれ以上のキャリブレーターゾーンの上流に位置する反応体<sup>\*</sup>の適用ゾーン(A<sub>R</sub>・Z)

を含むことを特徴とする。

#### 【0066】

キャリブレターの代わりにキャリブレーターゾーン/ゾーン群がキャリブレーター物質用結合剤を含む場合、本装置はまた好ましくは：

b) A<sub>S</sub>Zの下流に可動性(拡散性)に予め保持されたキャリブレーターを含む。

30

好ましくは、本装置は：

c) A<sub>R</sub>・Zに予め保持し得る反応体<sup>\*</sup>を含むキットに包含される。

#### 【0067】

プロセスフローは、またA<sub>R</sub>・Zの下流またはそれと同一場所に位置する(a)検出ゾーン(DZ)(それを介して反応体<sup>\*</sup>がDZに結合し得る堅く固定された捕獲体が存在する)、および該DZの上流またはそれと同一場所に位置する(b)サンプル適用ゾーン(A<sub>S</sub>Z)も含み得る。A<sub>R</sub>・ZはA<sub>S</sub>Z(存在する場合)の上流または下流または同じ場所に位置し得、好ましくは上流または下流である。A<sub>S</sub>ZおよびDZがキャリブレーターゾーンと同じプロセスフローに存在する場合、存在するキャリブレーターゾーンの、A<sub>S</sub>Zは好ましくは上流に、およびDZは好ましくは下流に位置する。

40

#### 【0068】

好ましい態様において、堅く固定された反応体(捕獲体)は、分析的に検出可能な検体または検体関連反応体に生物特異的親和性を有する。検体関連反応体は、主に競合的試験変異体に関する。

#### 【0069】

キャリブレーター物質は、本発明の方法態様と同じ方法で選択される。選択したキャリブレーター物質が検体に生物特異的親和性を示す場合、対応するキャリブレーターゾーンはA<sub>S</sub>Zの上流に位置すべきである。

#### 【0070】

50

キャリブレーター、ゾーン、反応体、マトリックス、プロセスフロー、試験プロトコール、サンプル等の更なる詳細は、本発明の方法態様の記載から明らかである。

本発明は、種々の好ましい態様を示す多くの実施例で説明する。本発明は、特許請求の範囲によりおよび明細書の記載により定義される。

#### 【 0 0 7 1 】

##### 実施例

実施例 1：炭素粒子接合体およびマトリックスに結合したキャリブレーターによる樺(birch)特異的 I g E の測定

##### 方法および材料

フェニルデキストランのポリスチレン粒子への吸着：

10

フェニルデキストラン(置換度：5 個のモノサッカライド単位当り 1 フェニル基 = 2 0 %、Mw デキストラン 4 0 , 0 0 0、Pharmacia Biotech AB, Uppsala, Sweden)をポリスチレン粒子(0.49  $\mu$ m Bangs Laboratories, USA)に、脱イオン化水に、1) 5mg/ml、10 % 粒子懸濁液、RT 1 h、2) 5mg/ml、5 % 粒子懸濁液、RT 1 h、3) 20mg/ml、1 % 粒子懸濁液、RT 一晚、15 h で攪拌下溶解させたフェニルデキストランとインキュベーションすることにより吸着させた。粒子を続いて 2 回脱イオン水で洗浄した。粒子懸濁液を各インキュベーション間に遠心し、洗浄した(12,100  $\times$  g、25 分、Beckman, J-21, JA-20, 10,000rpm)。粒子懸濁液を最後に超音波処理した(超音波浴、Branson 5210, 5分)。

#### 【 0 0 7 2 】

20

ヒト I g E (h I g E) のポリスチレン粒子への結合(= h I g E 粒子)：ヒト I g E をフェニルデキストラン被覆ポリスチレン粒子に、C D A P (1 - シアノ - 4 - ジメチルアミノ - ピリジニウムプロミドと結合させた(Kohn J and Wilchek M, FEBS Letters 154(1), (1983) 209-210)。

#### 【 0 0 7 3 】

h I g E の脱塩および緩衝液の交換を、N a H C O<sub>3</sub>、0.1 M、p H 8.5 中のゲル濾過(PD-10, Pharmacia Biotech AB, Sweden)により行った。30 % (容量) アセトン中の 2 % 溶液である 27.8mg のポリスチレン粒子(上記)を 4.2ml C D A P (0.44 M) および 3.4ml T E A (0.2 M トリエチルアミン、Riedel-de Haen, Germany) で活性化した。C D A P を 60 秒の攪拌中で、および T E A を 120 秒で添加した。粒子を 30 % (容量) アセトンで洗浄し、12,100  $\times$  g (25 分、Beckman, J-21, JA-20, 10,000rpm) で遠心した。25mg の h I g E を活性化粒子に、一晚、+ 4 で攪拌しながらインキュベーションして結合させた。次いで、粒子を遠心し、N a H C O<sub>3</sub> 緩衝液中のグルタミン酸 0.05 M およびアスパラギン酸 0.05 M で不活性化した。インキュベーションを一晚 + 4 で攪拌しながら行った。結合粒子を 0.1 M N a H C O<sub>3</sub> で、および 2 回 20 mM ホウ酸緩衝液 p H 8.5 で洗浄した。粒子濃度を対照としての非処理粒子と共に、A<sub>600nm</sub> で分光測光法で測定した。結合タンパク質の濃度は、結合中に存在する放射活性を有するヒト I g E により決定された。

30

#### 【 0 0 7 4 】

t 3 の抽出(樺花粉、Betula verrucosa)：樺花粉(Allergon, Sweden)の 1 部(重量)を、10 部(容量)の 0.1 M リン酸緩衝液(1 / 10 と表示)、p H 7.4 で抽出した。抽出は、2 時間、+ 4 のシェーカー机上で続いた。抽出物を 4000 rpm で 1.75 時間遠心した。濾過後、溶液を PD-10 カラムに付し、0.1 M N a H C O<sub>3</sub>、p H 7.5 で溶出した(1 / 14 と表示)。

40

#### 【 0 0 7 5 】

t 3 抽出物のポリスチレン粒子への結合(t 3 粒子)：t 3 粒子(1 / 14)を C D A P (Kohn and Wilchek, FEBS Letters, 154 (1) (1983) 209-210) によりフェニルデキストラン被覆ポリスチレンに結合させた。30 % (容量) アセトン中のポリスチレン粒子(400mg、上記のようにフェニルデキストランで被覆)の 2 % 粒子懸濁液を、60mg の C D A P (30 % アセトン中 100mg/ml) および 0.48ml 0.2 M トリエチルアミン(Riedel-de Haen

50

、Germany)で活性化させた。CDAPを攪拌しながら添加し、TEAを90秒間滴下し、合計120秒攪拌した。反応を30%アセトン(4回量)添加により停止させ、12,400×g、35分遠心した。粒子を1回脱イオン水で洗浄した。0.1M NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.5中の32mlのt3抽出物を80mgの活性化粒子に添加し、結合を1時間、シェーカー机上で続けた。次いで、粒子を遠心し、その後、0.1M NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.5中の0.05Mアスパラギン酸および0.05Mグルタミン酸で不活性化した。シェーカー機で一晩、+4でインキュベーションした。粒子を1)0.1M NaHCO<sub>3</sub>、0.3M NaCl、pH 8.5；2)0.1M Na酢酸、0.2M NaCl、pH 5；3)0.1M NaHCO<sub>3</sub>、pH 8.5；および4)20mM Naホウ酸、pH 8.5中で遠心することにより洗浄した。

10

粒子濃度は、対照としての非処理粒子と共に、600nmで分光測光法で測定した。

#### 【0076】

抗ヒトIgE抗体の炭素粒子への吸着(炭素粒子接合体=反応体<sup>\*</sup>)：モノクローナル抗-hIgEを炭素粒子(sp100、Degussa, Germanyから)上に吸着させた。Pharmacia AB, WO 96/22532参照。調製された懸濁液を希釈剤で1ml当り400μgの炭素粒子になるように希釈した。

#### 【0077】

t3粒子の検出ゾーン内の膜への保持：ポリエステル裏打ちのあるニトロセルロースのシート(Whatman, 8μm、5cm幅)上に、4%の上記の結合粒子を、直線ゾーンとして1μl/sおよび1μl/cmの流れで、Linear Striper(IVEK Corporation)で適用した。シートを1時間、30で乾燥させ、その上でシートをゾーンに対する適当な角度で、0.5cm切片に切断した(Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation)。

20

#### 【0078】

キャリブレーターゾーンへのhIgE粒子の保持：ポリエステル裏打ちニトロセルロースシート(Whatman, 8μm、5cm幅)上に、hIgE粒子をLinear Striper(IVEK Corporation, USA)との並行キャリブレーターゾーンとして保持させた。流れは1μl/sおよび1μl/cmであった。キャリブレーターゾーンのみを有することが意図された切片を6個の並行ゾーンで被覆した。ゾーン内のhIgE濃度は0、0.84；3.4；14；54.2および217ng hIgE/0.5cmであった。保持開始前に、hIgE粒子をホウ酸緩衝液(20mM、pH 8.5、Dextran T5000 4.2%w/w、ソルビトール5.8%w/w)に希釈した。全てのゾーンはまた1%フェニルデキストラン被覆粒子を、各ゾーンに同じ量の粒子を産生するために含んだ。別のニトロセルロースシート上に、hIgE粒子(14ng hIgE/0.5cm、PIC=陽性内部キャリブレーター)を保持したゾーンおよび並行ゾーンにt3粒子が上記のように(検出ゾーン)存在した。保持はhIgE粒子に関して同じパラメーターで起こった。シートを1時間、30で乾燥させ、次いで、ゾーンに対して垂直に0.5cm幅の切片に切った(Singulator: Matrix 1201膜カッター、Kinematic automation, USA)。

30

#### 【0079】

試験法：切片を平なプラスチック表面に重ねた。切片の頂上(0.5cm)に吸収膜を置いた(3cm幅、Whatman, 17 Chr)。一定圧を得るために、金属重りを吸収膜上に置いた。下端から10mmに、2mm幅Inplastor切片を重ねた(予め接着させた(preglued)ポリエステルフィルム)。Inplastor切片は、膜の大きすぎる部分にわたり流れ出さないように、液体の適用を防止しなければならない。切片の下端に、30μlのサンプルを、あるいは緩衝液を適用した。サンプル量の吸入後、以下の成分を所定の順番で適用した：15μl緩衝液、上記のように接合した15μl炭素粒子および30+30μl緩衝液。緩衝液は：NaPO<sub>4</sub> 0.1M、BSA 3%、NaN<sub>3</sub> 0.05%、スクロース3%、NaCl 0.5%、フェニルデキストラン0.25%、ウシガンマグロブリン0.05%、pH 7.5であった。反応ゾーンの黒化の程度をウルトロスキャン(Ultroscan XL, Enhanced Laser Densitometer, LKB)で吸光度として測定した。

40

#### 【0080】

50



## 結果

A)別の切片上のサンプルとして結合ゾーン中の抗 - h I g E 抗体と流した I g E キャリブレーター(24)に対する保持 I g E キャリブレーター曲線上での活性決定。

## 【表1】

表1:

	I g E 保持量	計算KU/L	A b s (× 1 0 0 0)*	
1	0.84	0.27	46	10
2	3.4	0.48	109	
3	14	0.71	266(下記を陽性内部キャリブレーターとして使用)	
4	54.2	2.7	619	
5	217	66.3	1882	

\* = 炭素粒子接合体が結合した後の反応ゾーンの吸収

20

## 【0081】

B)患者サンプル中の樺特異的 I g E 抗体の決定を、標準曲線(24で流す)を調節するために、18、24および37で、陽性内部キャリブレーター(PIC)ありおよびなしで行った。

## 【表2】

表2:補正キャリブレーター曲線ありおよびなしの結果(KU/L)

	補正			補正なし			
	<u>18℃</u>	<u>24℃</u>	<u>37℃</u>	<u>18℃</u>	<u>24℃</u>	<u>37℃</u>	
サンプル1	1.3	1.1	1.4	0.83	1.1	1.8	30
サンプル2	6.9	5.5	6.7	5.1	8.6	20	

## 【0082】

結果は、陽性内部キャリブレーターを使用して、別々のランの可変性を補正することが可能であることを示す。加えて、結果は、予め保持させたキャリブレーターの使用が可能であることを示す。

## 【0083】

40

本実施例に示す態様は、1個またはそれ以上の以下の基準を満たすように修飾し得る、(a)適用ゾーンに予め保持させた反応体\*を有するおよび/または(b)反応体\*の適用ゾーンの下流または上流に位置するサンプル適用ゾーンを有する、(c)反応体\*およびサンプルの同時添加を可能にするゾーンを有する。

## 【0084】

実施例2:蛍光検出粒子および適用ゾーンに予め保持させたキャリブレーターでの樺特異的 I g E の測定

方法および材料

ストレプトアビジンのポリスチレン粒子への結合:

ストレプトアビジン(Amersham Pharmacia Biotech AB, Sweden)を、C D A P (1 - シアノ

50

- 4 - ジメチルアミノピリジニウムブロミド)(Kohn J and Wilcjek M, FEBS Letters 154 (1) (1983) 209-210)を有するフェニルデキストラン吸着ポリスチレン粒子に、h I g E に関して実施例 1 で上記の方法にしたがって結合させた。結合粒子を 3 回 5 0 m M N a P O<sub>4</sub>、0.05% N a N<sub>3</sub>、p H 7.4 で洗浄した。粒子濃度を対照としての非処理粒子と共に、A 6 0 0 nm で分光測光法で測定した。

#### 【 0 0 8 5 】

ストレプトアビジン - 結合粒子のニトロセルロース膜への保持：ポリエステル裏打ちのあるニトロセルロースのシート(Whatman, 8 μm、5 cm幅)上に：

1) 1 0 m M N a P O<sub>4</sub>、5 % スクロース、5 % デキストラン T 5 0 0 0、0.01% N a N<sub>3</sub>、p H 7.4 中で 1 % 粒子含量に希釈したストレプトアビジン結合粒子；

2) 5 0 m M N a P O<sub>4</sub>、1 0 % スクロース、0.05% N a N<sub>3</sub>、p H 7.4 で 4 % 粒子含量に希釈した実施例 1 にしたがった t 3 - 結合粒子

のゾーンのLinear Striper (IVEK Corporation)で適用した。保持流は 2.5 μL / cm および速度は 2 0 mm / 秒であった。

#### 【 0 0 8 6 】

保持物を 1 時間、3 0 ° で乾燥させ、シートを 0.5 cm幅切片に切った(Matrix 1201 Membrane Cutter, Kinematics Automation)。

#### 【 0 0 8 7 】

抗 - h I g E 抗体の検出粒子への結合：ペプシンでfab' 2 フラグメントに開裂された h I g E に対する抗体を、その表面にアルデヒド基を有する蛍光ポリスチレン粒子に結合させた(Molecular Probes C-17177 TransFluoroSpheres, アルデヒド - スルフェートミクロスフェア、0.1 μm、6 3 3 / 7 2 0、2 % 固体)。2 3 mgの抗体を、次いで、5 0 m M N a P O<sub>4</sub>緩衝液、p H 6.5 中で一晩、室温で 6 6 mgの粒子に結合させ、2 0 5 μLの N a C N B H<sub>4</sub>(5 M)を添加して、結合を 3 時間、室温で減少させた。遠心を 2 0 , 8 0 0 × g (Eppendorf 5417R中、1 4 , 0 0 0 rpm)で 5 0 分に行い、次いで、脱イオン水、p H 6.5 中の 0.05 M グルタミン酸および 0.05 M アスパラギン酸での不活性化を一晩、室温で攪拌しながら行った。2 0 , 8 0 0 × g、5 0 分の遠心後、遮断を、5 0 m M N a P O<sub>4</sub>、p H 7.4 中、0.2 % B S A で、0.05% N a N<sub>3</sub>と共にを行い、インキュベーションを + 4 ° で行った。次いで、遠心を再び 2 0 , 8 0 0 × g で 5 0 分に行い、続いて 2 回の遮断緩衝液(貯蔵にもまた使用した)での洗浄を行った。粒子濃度をフルオリメーター(Perkin-Elmer LS50B)で、元々の粒子で製造した標準曲線により決定した。結合中に結合したタンパク質は、結合中に存在する放射活性抗 - h I g E を有するとして決定された。

#### 【 0 0 8 8 】

h I g E のビオチニル化：h I g E のビオチニル化は、供給者(Pierce)が推奨する条件にしたがって行った。h I g E はPD-10(Amersham Pharmacia Biotech AB)で、0.15 M H P O<sub>4</sub>、0.15 M N a C l、p H 7.8 中でゲル濾過することにより脱塩した。0.9 5 mL(0.59 mg) h I g E に、0.010 mL ビオチン - LC-Sulfo-NHS(3.59 mM、Pierce)を添加した。次いで、インキュベーションを室温で 1 時間行い、結合反応を 4 0 μL の 2 M グリシンの添加により停止させた。次いで、混合物を、5 0 m M N a P O<sub>4</sub>、0.15 M N a C l、p H 7.4 で平衡化したPD-10ゲル濾過カラムに適用した。収率および濃度を、I-125-標識 h I g E が結合に包含されるため、放射活性から計算した。h I g E の濃度は免疫クロマトグラフィーおよびUniCAP tIgE(Pharmacia & Upjohn Diagnostics AB, Sweden)で分析した。

#### 【 0 0 8 9 】

適用フィルターへのビオチニル化 I g E の保持：適用フィルターに、5 × 5 mm(Whatman F 075-14)を、5 0 m M N a P O<sub>4</sub>、0.15 M N a C l、6 % B S A、5 % ラクトース、5 % デキストラン T 5 0 0 0、p H 7.4 中に希釈したビオチニル化 I g E (1.6 ng) 0.006 mL を分配した。フィルターを 3 0 ° で 1 時間乾燥させた。

#### 【 0 0 9 0 】

試験法：切片を、台盤平面から約 1 6 ° 傾けて表面に重ねた。吸収膜(3.5 cm幅、Schleier

10

20

30

40

50

cher & Schuell, GB004)を膜の上端から0.5 cmに置いた。一定圧を得るために、金属重りを吸収膜上に置いた。次いで、サンプルおよび試験を、連続的に下記に記載のようにピペット輸送した。各サンプルおよび試薬容量を以下の容量をピペット輸送する前に膜に重ねた。

【0091】

- 1) 30  $\mu$ Lの50 mM  $\text{NaPO}_4$ 、0.15 M  $\text{NaCl}$ 、pH 7.4。
- 2) 予め保持させたビオチニル化IgEを有するフィルターを切片の底に置いた。
- 3) 30  $\mu$ Lの患者血清を各フィルターにピペット輸送した。
- 4) 20  $\mu$ Lの試験緩衝液(0.1  $\text{NaPO}_4$ 、0.15 M  $\text{NaCl}$ 、10%シュークロース、3% BSA、0.05% ウシガンマグロブリン、0.05%  $\text{NaN}_3$ 、pH 7.4)を  
10
- 5) 適用フィルターを除去した。
- 6) 試験緩衝液で希釈した20  $\mu$ Lの検出接合体(75  $\mu$ g/mL)。
- 7) 2  $\times$  30  $\mu$ Lの試験緩衝液。
- 8) 検出ゾーンの蛍光を、走査赤色レーザーフルオロメーター(635 nm)で反応領域(Vmm)として測定した。

【0092】

3個の陽性t3 - 血清を選択し、3個の異なる接合体バッチでトリプリケートで分析した。コンジュゲート2と流した異なるIgE粒子濃度(上記実施例1に記載)で被覆したニトロセルロースで得たシグナル領域を、キャリブレーション曲線として貯蔵した。  
20

【0093】

PIC補正は、t3の反応ゾーンのシグナルが、貯蔵キャリブレーション曲線(マスター曲線)に対して読み取る前に、PICexp/PICobsにより増幅されていたことを意味する。PICexpは、コンジュゲート2とのランで得たPICシグナルの平均として定義する。

【0094】

結果

未補正シグナルのマスター曲線に対する読取

【表3】

血清	濃度(KU/L)	接合体2	トリプリケート	CV間(%)
	接合体1	の平均	接合体3	
1	0.75	3.0	1.4	68
2	5.7	29.1	18.7	66
3	2.5	10.8	6.8	62

30

【0095】

PIC - 補正シグナルのマスター曲線に対する読取

40

【表4】

血清	濃度(KU/L)	接合体2	トリプレット	C V間(%)
	接合体1	の平均	接合体3	
1	2.5	3.5	1.9	2.9
2	14.2	19.5	20.7	1.9
3	3.6	5.3	6.1	2.6

10

## 【0096】

C V間(%)は異なる接合体で得た3つの平均の可変性として計算する。結果は、適用ゾーンに予め保持させたキャリブレーター物質が機能的であり、PICとしての使用が更に減少したアッセイ間可変性に寄与するという考えを示す。

---

フロントページの続き

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特開昭 6 2 - 2 3 1 1 6 8 ( J P , A )  
特開平 0 5 - 2 8 1 2 3 1 ( J P , A )  
特開平 0 8 - 2 6 2 0 2 3 ( J P , A )

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)  
G01N 33/543  
G01N 33/53