

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6675976号  
(P6675976)

(45) 発行日 令和2年4月8日 (2020. 4. 8)

(24) 登録日 令和2年3月13日 (2020. 3. 13)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/50 (2006. 01)

GO 1 N 33/50 J

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 A

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 B

GO 1 N 33/76 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 2 1

GO 1 N 33/76

請求項の数 29 (全 36 頁)

(21) 出願番号 特願2016-515950 (P2016-515950)  
 (86) (22) 出願日 平成26年10月1日 (2014. 10. 1)  
 (65) 公表番号 特表2016-532077 (P2016-532077A)  
 (43) 公表日 平成28年10月13日 (2016. 10. 13)  
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2014/052960  
 (87) 国際公開番号 W02015/049508  
 (87) 国際公開日 平成27年4月9日 (2015. 4. 9)  
 審査請求日 平成28年12月2日 (2016. 12. 2)  
 審判番号 不服2018-12400 (P2018-12400/J1)  
 審判請求日 平成30年9月14日 (2018. 9. 14)  
 (31) 優先権主張番号 1317458.6  
 (32) 優先日 平成25年10月2日 (2013. 10. 2)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 英国 (GB)

(73) 特許権者 510269573  
 エス・ピー・ディー・スイス・プレジジョン・  
 ダイアグノステイクス・ゲー・エム・  
 ベー・ハー  
 スイス国、ジュネーブ、ツエー・ハー 1  
 2 1 3、プテイーランシー、ルート・ドウ  
 ・サン・ジョルジュ・4 7  
 (74) 代理人 110001195  
 特許業務法人深見特許事務所  
 (72) 発明者 マッカーシー、デイビッド  
 イギリス、エム・ケイ・4 4 3・ユー・  
 ピー ベッドフォードシャー、ベッドフォ  
 ード、プライオリティー・ビジネス・パー  
 ク、エス・ピー・ディー・ディベロップメ  
 ント・カンパニー・リミテッド内  
 最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 改善された妊娠検査デバイスおよび方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト女性被験者において妊娠を検出する検査デバイスであって、  
 前記被験者のサンプル中の h C G の絶対量または相対量を測定する第 1 のアッセイ手段と、  
 前記被験者のサンプル中の F S H の絶対量または相対量を測定する第 2 のアッセイ手段と、  
 前記被験者のサンプル中のプロゲステロン代謝物の絶対量または相対量を測定する第 3 のアッセイ手段と、  
 前記第 1 から第 3 のアッセイ手段の各々に動作可能に接続され、前記第 1 から第 3 のアッセイ手段の各々からアッセイ信号値を受けるコンピュータコントロール手段と、  
 検査結果をユーザーに表示するためのアッセイ結果ディスプレイとを含み、  
 前記コンピュータコントロール手段は、  
 h C G、F S H およびプロゲステロン代謝物の以前の計測を参照せずに、  
 h C G アッセイ信号値が下限 h C G 閾値より小さい場合、前記被験者が妊娠していないことを意味すると解釈し、  
 h C G アッセイ信号値が上限 h C G 閾値より大きい場合、F S H およびプロゲステロン代謝物に対するアッセイの信号値にかかわらず、前記被験者が妊娠していることを意味すると解釈し、  
 h C G アッセイ信号値が下限 h C G 閾値以上で上限 h C G 閾値以下の場合、F S H お

10

20

よびプロゲステロン代謝物のアッセイ信号値に依存して、前記被験者が妊娠しているか妊娠していないか解釈し、

解釈の結果を検査結果として前記アッセイ結果ディスプレイに出力するようにプログラムされており、

前記第 1 のアッセイ手段は、h C G に結合する結合試薬を含み、前記第 2 のアッセイ手段は、F S H に結合する結合試薬を含み、前記第 3 のアッセイ手段は、プロゲステロン代謝物に結合する結合試薬を含む、検査デバイス。

【請求項 2】

1 つ以上のラテラルフロー検査ストリップおよび/またはマイクロフルイディクススペースのアッセイを含む、請求項 1 に記載の検査デバイス。

10

【請求項 3】

前記コンピュータコントロール手段は、マイクロプロセッサまたは特定用途向け集積回路（以下 A S I C と称す）を含む、請求項 1 ～ 2 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 4】

前記コンピュータコントロール手段は、アナライトアッセイ信号値とそれらのそれぞれのあらかじめ決められた閾値とを比較することにより検査結果を決定するアルゴリズムを用いてプログラムされている、請求項 3 に記載の検査デバイス。

【請求項 5】

ポイントオブケアデバイスまたは「自己検査用」デバイスである、請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

20

【請求項 6】

単回使用後に廃棄される、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 7】

1 つ以上のマイクロフルイディクスまたはラテラルフローアッセイ検出ゾーンに照射する 1 つ以上の光源と、前記検出ゾーンにより反射または透過された光を検出する 1 つ以上の光検出器とを含む、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 8】

h C G に対する第 1 および第 2 の h C G アッセイを含み、前記第 1 の h C G アッセイが前記第 2 の h C G アッセイより高感度のアッセイであり、それにより、前記検査デバイスが広範囲にわたる h C G 濃度を測定できる、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

30

【請求項 9】

前記第 1 の h C G アッセイおよび前記第 2 の h C G アッセイが、個別のラテラルフロー検査ストリップ上または個別のマイクロ流体アッセイ流路上で行われる、請求項 8 に記載の検査デバイス。

【請求項 10】

前記第 1 の h C G アッセイおよび前記第 2 の h C G アッセイが、同一のラテラルフロー検査ストリップ上または同一のマイクロ流体アッセイ流路上で行われる、請求項 8 に記載の検査デバイス。

40

【請求項 11】

プロゲステロン代謝物アッセイにより検出される前記プロゲステロン代謝物がプレグナジオールまたはその誘導体を含む、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 12】

前記プロゲステロン代謝物アッセイにより検出される前記プロゲステロン代謝物がグルクロニドを含む、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 13】

前記プロゲステロン代謝物アッセイにより検出される前記プロゲステロン代謝物がプレグナジオール - 3 - グルクロニドを含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の検査

50

デバイス。

【請求項 1 4】

1 つの追加の h C G 閾値をさらに含む、請求項 1 に記載の検査デバイス。

【請求項 1 5】

妊娠している被験者の妊娠のおよその在胎期間を表示するように適合化および構成されている、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 1 6】

妊娠している被験者の在胎期間を 1 ~ 2 週間、2 ~ 3 週間、または 3 週間以上の間隔で表示する、請求項 1 5 に記載の検査デバイス。

【請求項 1 7】

前記デバイスが適正に機能しているかを示すコントロール機能をさらに含む、請求項 1 ~ 1 6 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 1 8】

前記検査デバイスの要素のほとんどまたはすべてと、ハウジングを越えて突出してサンプルの適用を可能にするサンプル適用部材上のサンプル適用ゾーンとを収容する防水性ハウジングを含む、請求項 1 ~ 1 7 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 1 9】

共通のサンプル適用ゾーンに適用されたサンプルが 2 つ以上の個別の流路に進入し、前記 2 つ以上の個別の流路のそれぞれで少なくとも 1 つの異なるアナライトアッセイが行われるように、前記共通のサンプル適用ゾーンを含む、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 2 0】

h C G、F S H、およびプロゲステロン代謝物のそれぞれのアッセイがすべて、単一の共通流路上に提供される、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 2 1】

黄体形成ホルモンの絶対量または相対量を測定する第 4 のアッセイ手段および / またはヒト胎盤性ラクタゲンの絶対量または相対量を測定する第 5 のアッセイ手段を追加的に含む、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 2 2】

外部アッセイ結果読取りデバイスを含む、請求項 1 ~ 2 1 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 2 3】

前記外部アッセイ結果読取りデバイスがカメラを含む、請求項 2 2 に記載の検査デバイス。

【請求項 2 4】

前記外部アッセイ結果読取りデバイスがスマートフォンまたは他のデジタルハンドヘルド読取りデバイスを含む、請求項 2 2 または 2 3 に記載の検査デバイス。

【請求項 2 5】

以下に示される特徴 ( i ) ~ ( v i i ) :

( i ) 9 9 % 以上の感度、

( i i ) 9 9 % 以上の特異度、

( i i i ) 検査日が妊娠初期の場合でも ( i ) および ( i i ) を満たすこと、

( i v ) 検査の実施 / アッセイデバイスの使用が単一の時点で 1 回の場合でも ( i ) および ( i i ) を満たすこと、

( v ) アッセイデバイス / 方法が外的情報をなんら必要としないこと、および

( v i ) 前記被験者が閉経周辺期および / または閉経後の女性を含む場合でも ( i ) および ( i i ) を満たすこと

のうちの少なくとも 1 つを提供する、請求項 1 ~ 2 4 のいずれか一項に記載の検査デバイス。

【請求項 2 6】

ヒト女性被験者において妊娠を検出する方法であって、前記被験者のサンプルと、請求項 1 ~ 25 のいずれか一項に記載の検査デバイスとを接触させる工程を含む方法。

【請求項 27】

ヒト女性のサンプルで行われた hCG、FSH、およびプロゲステロン代謝物のアッセイの信号値を解析し、

hCG、FSH およびプロゲステロン代謝物の以前の計測を参照せずに、

hCG アッセイ信号値が下限 hCG 閾値より小さい場合、前記被験者が妊娠していないことを意味すると解釈し、

hCG アッセイ信号値が上限 hCG 閾値より大きい場合、FSH およびプロゲステロン代謝物に対するアッセイの信号値にかかわらず、前記被験者が妊娠していることを意味すると解釈し、

hCG アッセイ信号値が下限 hCG 閾値以上で上限 hCG 閾値以下の場合、FSH およびプロゲステロン代謝物のアッセイ信号値に依存して、前記被験者が妊娠しているか妊娠していないか解釈し、

解釈の結果を検査結果としてアッセイ結果ディスプレイに出力するようにプログラムされており、

前記 hCG のアッセイは、hCG に結合する結合試薬によって行われ、前記 FSH のアッセイは、FSH に結合する結合試薬によって行われ、前記プロゲステロン代謝物のアッセイは、プロゲステロン代謝物に結合する結合試薬によって行われる、電子プログラマブルデバイス。

【請求項 28】

妊娠している被験者の妊娠のおよその在胎期間を表示するように適合化および構成されている、請求項 27 に記載の電子プログラマブルデバイス。

【請求項 29】

妊娠している被験者の在胎期間を 1 ~ 2 週間、2 ~ 3 週間、または 3 週間以上の間隔で表示する、請求項 28 に記載の電子プログラマブルデバイス。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、妊娠検査デバイス、妊娠検査の実施方法、およびかかるデバイスの製造方法に関する。

【背景技術】

【0002】

流体サンプル中のアナライトの検出のために、単純なラテラルフローイムノアッセイデバイスの開発および商品化が行われてきた（たとえば、欧州特許第 2 9 1 1 9 4 号明細書を参照されたい）。かかるデバイスは、典型的には、対象のアナライトに結合可能な乾燥可動性標識結合試薬を含む多孔性担体と、標識結合試薬の下流の検出ゾーンに提供された同様にアナライトに結合可能な固定化結合試薬とを含む。検出ゾーンでの固定化標識結合試薬の検出は、サンプル中のアナライトの存在の指標となる。

【0003】

他の選択肢として、対象アナライトがハプテンである場合、イムノアッセイデバイスで競合反応を利用する。この場合、標識アナライトまたはアナライトアナログが、検出ゾーンでの固定化結合試薬への結合に関して、サンプル中に存在するアナライトと競合する。他の選択肢として、アッセイデバイスで阻害反応を利用する。この場合、固定化アナライトまたはアナライトアナログが検出ゾーンに提供され、アッセイデバイスがアナライトに対する可動性標識結合試薬を含む。

【0004】

アッセイデバイスは、2 種以上のアナライトの存在および/または量を検出する。たとえば、乱用薬物の存在を検出するアッセイの場合、デバイスは、全薬物パネルを決定可能でありうる。かかるラテラルフローイムノアッセイデバイスは、一般に複数の検出ゾー

10

20

30

40

50

ンを備え、かかるゾーンは、アッセイデバイス内の単一または複数のラテラルフロー担体上に提供される。

【 0 0 0 5 】

アッセイ結果の決定は、従来は目視により行われてきた。しかしながら、かかるデバイスではユーザーが結果を解釈する必要があるため、とくに検出ゾーンの濃度がわずかである低アナライトレベルでは、望ましくない程度に主観性が入り込む。

【 0 0 0 6 】

このため、アッセイ結果を決定するように配置された光学的検出手段の他に、アッセイ結果を表示する表示手段も含むデジタルデバイスが開発されてきた。流体サンプル中のアナライトの濃度および/または量を決定するためのアッセイ検査ストリップと組み合わせて使用されるデジタルアッセイリーダーは公知であり、同様に、一体型デジタルアッセイリーダーを含むアッセイデバイスも公知である。かかるデバイスの例は、欧州特許第 1 4 8 4 6 0 1 号明細書に開示されている。

【 0 0 0 7 】

発光ダイオード ( L E D ) などの光源からの光が多孔性担体の一部上に照射され、反射光または透過光のいずれかが光検出器により検出される。典型的には、リーダーは、担体の種々のゾーンに照射するための 2 つ以上の L E D を有し、複数の L E D のそれぞれに対応する光検出器が提供される。欧州特許第 1 4 8 4 6 0 1 号明細書には、デバイス中の光検出器の数の低減を可能にするバッフル配置を含む、ラテラルフロー検査ストリップのデジタル読取りデバイスの光学配置が開示されている。

【 0 0 0 8 】

上記のタイプのアッセイ技術は、「自己検査用」妊娠検査デバイスに実装されてきた。これは、典型的には、妊娠している可能性があると推測する女性を使用するデバイスである。このため、使用しやすいように ( 医学的訓練または技術的訓練をなんら必要とすることなく ) 設計しなければならず、典型的には 1 回使用後使い捨て可能である。デバイスは、通常、ラテラルフローイムノアッセイデバイスであり、検査は、通常、ラテラルフローアッセイスティックのサンプリング部を尿サンプルに接触させることによりで開始される。アッセイスティックのサンプリング部は、容器内の尿サンプル中に浸漬されうるか、またはより典型的にはユーザーがサンプリング部上に直接排尿しうる。次いで、女性がさらなる工程をなんら必要とすることなくアッセイが行われ、結果が示されて眼により読み取られるか、または結果がデジタルデバイスにより読み取られ、アッセイ結果読取り手段により決定され、たとえば液晶ディスプレイ ( L C D ) などのディスプレイを利用してユーザーに表示される。

【 0 0 0 9 】

このような従来の妊娠検査は、サンプル中のヒト絨毛性ゴナドトロピン ( h C G ) を測定することにより行われる。h C G は発生中の胚により産生され、サンプル中の h C G 濃度が一定の閾値を超えると陽性 ( すなわち「妊娠」 ) の結果がもたらされる。

【 0 0 1 0 】

改善された妊娠検査、とくに、改善された自己検査用妊娠検査の必要性が存在する。すなわち、多くの女性は、妊娠しているかをできるだけ早く知りたいと思っているため、尿などのサンプル中の非常に低濃度の h C G を検出可能な非常に高感度の検査の必要性が存在する。しかしながら、このことは問題を引き起こす。なぜなら、h C G は、ときには妊娠以外の理由で比較的低濃度で尿中に存在することがあり、その結果、非常に高感度の妊娠検査は、偽陽性の結果を与える ( すなわち、アッセイの特異度が減少する ) おそれがあるからである。

【 0 0 1 1 】

この実例として、非妊娠関連 h C G が尿サンプル中に存在しうる。より特定的には、h C G は、閉経周辺期および閉経後の女性の尿中に存在し、かつ発生中の胚ではなく下垂体に由来しうる。この下垂体由来 h C G または他の非妊娠関連 h C G の検出は、妊娠検査では妊娠に関して偽陽性の結果をもたらすであろう。多くの国々では、女性は、たとえば仕

10

20

30

40

50

事または他の取組みの都合上、第1子をもうける時期をより遅い時期まで延ばす。このため、「家庭用」または自己検査用の妊娠検査デバイスに対する小さいが有意な市場は、高齢の女性により占められ、これらの女性は、閉経周辺期または閉経後のグループに属するため、高感度のhCGアッセイを使用すると偽陽性の結果を生じやすい。一研究によれば、OTC妊娠検査薬の販売の10%までは、40歳を超える女性が対象となってきた(Leavitt SA 2006, "A private little revolution: the home pregnancy test in American Culture". Bull. Hist. Med. 2006; 80: 317-45)。

【0012】

世界保健機関(World Health Organization)によれば、「閉経」および「閉経周辺期」の公認の定義は以下のとおりである。

10

【0013】

閉経(自然閉経)は、卵巣濾胞活動の喪失に起因する月経の永久的停止として定義される。自然閉経は、他の明らかな病理学的または生理学的原因が存在せずに12ヶ月間連続した無月経の後に生じたものであると認識される。閉経は、思い返してみたときにのみ確信をもってその事象の1年以上後に分かる最終月経期(FMP)を伴って生じる。

【0014】

閉経周辺期 - この用語は、閉経直前の期間(閉経に近づく内分泌学的、生物学的、および臨床的特徴が始まるとき)および閉経後の最初の1年間を含む。

【0015】

20

したがって、本目的では、閉経周辺期の女性は、同様に以上のWHOの定義に準拠した閉経周辺期にある女性として定義され、閉経後の女性は、以上のWHOの定義に準拠した閉経を生じた女性として定義される。

【0016】

自己検査用または「家庭用」の妊娠検査は、女性が試験結果を受け取って適切な処置を確実に講じられるように信頼できるものである必要がある。望ましい信頼性の目標は99%の確度である(すなわち、偽陽性率と偽陰性率との合計が1%以下である)。現在利用可能な自己検査用または家庭検査用のデバイスは、99%の感度で25mIU/ml以上の濃度の尿中hCGを検出可能である。かかるデバイスは、所望の99%の確度の目標を達成可能であるが、被験者が予想する自分の月経開始日(すなわち、月経出血が予想される初日)以降に使用した場合に限られる。なぜなら、その時点から、ほぼすべての妊娠女性は、25mIU/ml以上の尿中hCG濃度を有し、かつ非妊娠関連hCGレベルは、通常このレベルには決して達しないからである。しかしながら、女性が自分の予想月経日前に自己検査用デバイスを使用すると、尿中hCG濃度が検査により検出可能なレベルにまだ達していないため、偽陰性の結果となる可能性がある。したがって、現在利用可能な従来の自己検査用妊娠検査デバイスは、予想月経日前に使用したときは99%の確度ではない。実際には、排卵後の10日間の尿中hCGのメジアンレベルは、約8.4mIU/mlであり、この日からサンプルの約10%のみが>25mIU/mlのhCG濃度を有するであろう。したがって、このように妊娠の早い時期に25mIU/mlの感度を有する従来の自己検査用デバイスを用いると、非常に低い妊娠検出率になるであろう。排卵の11日後、メジアンレベルは19.8mIU/mlまで上昇するため、この段階では女性の50%未満が陽性の結果になるであろう。より後の検査の検出率は、25mIU/mlの検査感度に基づいて、約70%(12日目)、80%(13日目)、および約100%(14日目)になるであろう。より高感度の検査を単に使用しただけでは解決にはならない。なぜなら、この場合、非妊娠関連hCGを検出する可能性が増加して偽陽性の結果を生じるリスクが増加し、その結果、検査は依然として99%の確度にならないであろうからである。

30

40

【0017】

したがって、予想月経日よりも早い妊娠の時点で使用した時でさえも、99%の確度で妊娠を検出可能な妊娠検査デバイス、とくに自己検査用または家庭検査用のデバイスの

50

必要性が存在する。

【0018】

異なる場面で、多くの国々では、出産可能年齢のほぼすべての女性患者に対して、発生中の胎児を害するおそれのあるいかなる医学的介入を行う前にも、血清中hCG検査がルーチン的に行われる。閉経周辺期および閉経後の女性において、「下垂体」hCGに起因する血清中hCGレベルの上昇の問題が認識されている。Snyderら(Clinical Chemistry 2005 51, 1830-1835)は、妊娠していない女性の血清中hCG濃度の年齢に伴う変化を調べて、予想されるhCGの結果よりも高いことを解釈する一助として血清中濾胞刺激ホルモン(FSH)測定の利用を検討した。これらの研究者は、血清中hCG測定と、被験者の年齢についての知見と、血清中FSH測定との組合せを利用して、「偽陽性」妊娠の結果を低減または回避することが可能であることを示唆した。しかしながら、これらの研究者は、自己検査用妊娠検査に取り組んでおらず、とくに、非常に早い段階で妊娠を検出することには取り組んでいなかった。

10

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0019】

第1の態様では、本発明は、ヒト女性被験者において妊娠を検出する検査デバイスを提供する。かかる検査デバイスは、

被験者のサンプル中のhCGの絶対量または相対量を測定するアッセイ手段と、

被験者のサンプル中のFSHの絶対量または相対量を測定するアッセイ手段と、

20

被験者のサンプル中の1種以上のプロゲステロン代謝物の絶対量または相対量を測定するアッセイ手段と

を含む。

【0020】

サンプルは、全血、血漿、血清、尿などの任意の好適な体液でありうる。しかしながら、尿サンプルがきわめて好ましい。なぜなら、かかるサンプルは、容易に取得可能であり、侵入的手順を行う必要がないからである。その他に、尿サンプルを使用すれば、ユーザーによる自己検査が容易になる。

【0021】

これとの関連では、サンプル中に存在するアナライトの量は、絶対的に(たとえば、単位体積あたりの数値により)または相対的に(たとえば、あらかじめ決められた閾値の参照により)決定されうる。特定的には、「1種以上のプロゲステロン代謝物の相対量」とは、サンプル中の異なるプロゲステロン代謝物の濃度を互いに比較するが、1種以上のかかるアナライトの濃度をあらかじめ決められた閾値と比較しないでもよいことを意味することが意図される。アッセイ手段は、それらのそれぞれのアナライトを測定するように適合化および構成されるが、以下で説明されるように、1つのアッセイ手段を2種以上の異なるアナライトを測定するように適合化および構成しうる。

30

【0022】

説明すると、受胎後、女性はずでに妊娠しているため、さらなる排卵周期は不要である。したがって、受胎後、FSH産生の抑制により濾胞形成が阻害される。それゆえ、妊婦では、上昇レベルのhCGおよび低レベルのFSHが観測されることが予想されよう。したがって、FSHの測定を利用することにより、わずかに上昇したレベルのhCGの検出の有意性を解釈するのに役立つ。とくに、これが非妊娠関連源によることが推測される場合に役立つ。

40

【0023】

さらに説明すると、妊娠の最初の10~12週間の間、黄体により産生されたプロゲステロンは、子宮内膜を保持することにより妊娠の継続を可能にする。プロゲステロンレベルは、月経周期の黄体期の一部で上昇するが、このレベルは、妊娠が起こらないと(すなわち、被験者が月経を生じると)低下してベースラインレベルに戻る。しかしながら、プロゲステロン(およびその尿代謝物)レベルは、妊娠が起こると上昇状態を維持して妊娠

50

期間を通じて上昇し続けるであろう。その結果、プロゲステロン（およびその尿代謝物）は、妊娠の追加確認としてhCGの補助剤として使用可能である。

【0024】

検査デバイスは、好ましくは、アッセイ結果を解釈して妊娠検査のアウトカムを決定するための手段、好ましくは、検査のアウトカムを表示するための表示手段をさらに含むであろう。

【0025】

第2の態様では、本発明は、ヒト女性被験者において妊娠を検出する方法を提供する。かかる方法は、被験者のサンプルと、以上に定義された第1の態様に係る検査デバイスとを接触させる工程を含む。以上に述べたように、サンプルは、好ましくは尿サンプルである。

10

【0026】

本発明の好ましい特徴を以下でさらに詳細に説明する。これらは、第1の態様に係る検査デバイスとの関連で説明されているが、文脈上とくに規定されないかぎり、第2の態様に係る方法にも同じようにあてはまることは明らかであろう（その逆も同様である）。

【0027】

検査デバイスは、液体サンプルが流動しうる1つ以上の作製されたキャピラリーチャネル（典型的には規定の口径のもの）を有するマイクロフルイディクススペースのアッセイを含みうるが、検査デバイスは、より好ましくはラテラルフローアッセイを含む。検査デバイスは、マイクロ流体アッセイおよびラテラルフローアッセイの両方を含みうる。一実施形態では、検査デバイスは、3つの各アナライト（すなわち、hCG、FSH、およびプロゲステロン代謝物）のそれぞれ1つに対してそれぞれ1つのアッセイを有する3つのラテラルフローアッセイを含む。

20

【0028】

いくつかの実施形態では、1つの特定のアナライトに対して2つ以上のアッセイを有することが望ましいこともある。たとえば、一方のアッセイはマイクロフルイディクスアッセイでありうるとともに、他方のアッセイはラテラルフローアッセイでありうる。他の選択肢として、アナライトに対するアッセイは両方とも、マイクロフルイディクスアッセイでありうるかまたはラテラルフローアッセイでありうる。アナライトに対するアッセイが両方ともラテラルフローアッセイである場合、それらは、単一のラテラルフロー検査ストリップ上またはそれぞれのラテラルフロー検査ストリップ上で行われうる。

30

【0029】

たとえば、hCGレベルは、妊娠初期に指数関数的に増加するため、妊娠被験者の尿サンプル中のhCG濃度は、被験者がどの程度長い期間妊娠しているかに依存してかなり変化しうる。したがって、サンプル中のhCG濃度を広範な濃度範囲にわたり決定できるように、hCGに対して比較的高感度のアッセイである1つのアッセイと、hCGに対して比較的低感度のアッセイである1つのアッセイとを提供することが望ましいこともある。（説明すると、高レベルのアナライトは、フック効果として知られる厄介な問題を引き起こしうる。これは、アッセイ範囲が限られていることに起因して高感度のアッセイで正確さもたらしうるため、低減感度のアッセイを提供して非常に高いアナライトレベルで正確な測定を行えるようにすることが有益でありうる）。

40

【0030】

通常、プロゲステロンは、検出可能量で尿中に存在しない。その代わりに、それは代謝されて、種々のプロゲステロン代謝物が尿中に排出される。したがって、本発明に係るアッセイは、尿中の1種以上のプロゲステロン代謝物を測定するように適合化される。プロゲステロン代謝物は、4つのグループ、すなわち、プレグナンジオール類、プレグナノロン類、プレグナンジオン類、およびプレグナンジオールよりも高い極性の化合物を含有する最後のグループに分類されうる。理論上、これらの4つのグループのいずれか1つに由来する1種以上の代謝物が、本発明での測定に好適でありうる。好ましい例としては、プレグナノロン（3-ヒドロキシ-5-プレグナン-20-オン）およびプレグナンジ

50



オール（５ - プレグナン - ３ - ２０ - ジオール）が挙げられる。後者の化合物は、一般に最高濃度で尿中に存在するプロゲステロン代謝物であるため、検査するのにとくに好ましい（Cooke, I. D. 1976, Progesterone and its metabolites. In: Lorraine, J. A. & Bell, E. T. (eds) "Hormone Assays and their Application" pp 447 - 508）。たとえば、プレグナンジオールおよびプレグナノロンへの参照が、文脈上とくに規定されないかぎり、それらの一般に存在する誘導体を包含することは、当業者には自明であろう。特定的には、プロゲステロン代謝物は、通常はグルクロニドとして、ときにはスルフェートとして尿中に存在する。それゆえ、たとえば、プレグナンジオールへの本明細書での参照は、とくにプレグナンジオール - ３ - グルクロニド（「P - 3 - G」）（ときにはPdGとしても参照される）を包含する。さらに、「プロゲステロン」または「プロゲステロンアッセイ」への本明細書での参照は、文脈上とくに規定されないかぎり、とくにプロゲステロン代謝物およびプロゲステロン代謝物のアッセイをそれぞれ包含することが意図される。

10

#### 【 0 0 3 1 】

プロゲステロンの種々の代謝物間の構造相同性つまり抗原類似性の程度が非常に高くなりうることは分かるであろう。したがって、免疫学ベースのアッセイでは、第１の結合親和性で特定のプロゲステロン代謝物に結合する抗体は、第１の結合親和性よりも有意に低いこともある第２の結合親和性で異なるプロゲステロン代謝物に結合しうるため、抗体はある程度交差反応しうる。他の選択肢として、ヒト尿中に存在する特定のプロゲステロン代謝物に対して他のプロゲステロン代謝物よりもかなり高い結合親和性（たとえば、少なくとも１０倍以上）を有する高特異的抗体を利用することが可能である。したがって、「プロゲステロン代謝物」のアッセイでは、いくつかの異なるプロゲステロン代謝物が頻繁に検出されうる。異なるプロゲステロン代謝物に対する任意の試薬の交差反応性の程度は、本発明に決定的に重要ではないが、以下で説明されるように、とくにこの特徴を試薬の選択および適切な「閾」値の選択に反映させる必要がありうることは、当業者であれば分かるであろう。

20

#### 【 0 0 3 2 】

同様に、尿中に存在しうるヒトF S Hのいくつかの変異体（たとえば、単離された鎖などの断片）、およびたとえば異なるグリコシル化度を有する異なるアイソフォーム（Walton W. J. et al., J Clin Endocrinol Metab., 86, 3675 - 85, 2001、Dahl, K. D. and Stone M. P. J Andrology, 13, 11, 1992、およびBaenziger, J. U. and Green E. D Biochem. et Biophys. Acta, 947, 287 - 306, 1988を参照されたい）が存在し、免疫学ベースのアッセイでは、F S Hの単一の変異体、断片、もしくはアイソフォームに比較的特異的に結合する抗体を利用しうるか、または許容しうる程度に高い親和性でいくつかの異なるヒトF S H変異体に結合するそれほど特異的でない抗体を利用しうる。この場合も、このことは、アッセイで選ばれる試薬の選択および／または閾値の選択に影響を及ぼしうるが、一般的には本発明の機能にそれほど重要ではない。類似の見解は、h C Gおよびその変異体にもあてはまる。

30

40

#### 【 0 0 3 3 】

一般的には、本発明の根底をなす概念は、非常に高感度のh C Gアッセイを用いて非常に早い時期に妊娠を検出できるようにすること、かつF S Hおよびプロゲステロン代謝物の追加測定により被験者の年齢についての知見を必要とすることなく検査の特異度を許容しうる程度に高いレベルに維持できるようにすること（すなわち、非妊娠関連源由来のh C Gの検出に起因する多数の偽陽性の結果を回避できるようにすること）である。アッセイデバイスは、単純なP o Cとして、より特定的には使用のために医学的訓練または技術的訓練をなんら必要としない自己検査用デバイスとして、とくに好適である。特定的には、アッセイデバイスは、好ましくは１回使用後使い捨て可能である。さらに、デバイスは

50

、望ましくは、デバイスを十分量の尿サンプルに接触させた後はさらなるユーザー介入をなんら必要とすることなく種々のアッセイが自動で行われる、単純なラテラルフローデバイスまたはマイクロフルイディクススペースのデバイスである。デバイスは、デジタルデバイスであることがさらに好ましい。すなわち、デバイスは、アッセイのアウトカムを読み取ってユーザーに表示する。

【0034】

特定のには、本発明に係るアッセイデバイスは、好ましくは自己検査用または家庭検査用のデバイスである。好ましい実施形態では、アッセイデバイスは、予想月経日前に使用した場合でも 99% の確度を有する。より特定のには、本発明に係るアッセイデバイスは、予想月経日より 2 日ほど早く使用した場合でも、好ましくは予想月経日より 3 日ほど早く使用した場合でも、好ましくは予想月経日より 4 日ほど早く使用した場合でも、好ましくは予想月経日より 5 日ほど早く使用した場合でも、より好ましくは予想月経日より 6 日ほど早く使用した場合でも、99% の確度を達成しうる（たとえば、LH ピークまたは LH サージを基準にして計算される）。

【0035】

hCG の検査で陽性（妊娠）の可能性がある結果が示唆された場合（すなわち、尿中 hCG があらかじめ決められた閾値を超えるサンプルの場合）、これを FSH アッセイおよびプロゲステロン代謝物アッセイの結果により確認（または否定）することが可能である。それゆえ、たとえば、hCG レベルがあらかじめ決められた閾値をわずかに超えた場合、上昇した FSH レベルおよび低いプロゲステロン代謝物レベルを伴えば、被験者は妊娠していないことが示唆される（かつ、上昇した hCG レベルは非妊娠関連起源であることが示唆される）。

【0036】

このように、本発明は、高感度（すなわち、妊娠被験者の 99% 以上を検出する）、高特異度（すなわち、1% 以下の偽陽性率）で妊娠を検出可能な、さらに被験者が閉経周辺期および閉経後の女性を含む場合でさえも、さらに驚くべきことに妊娠の非常に早い段階の単一の時点（日）で（すなわち予想月経日前でさえも）かつ他の外的情報（たとえば被験者の年齢など）をなんら用いることなく、こうした結果を達成可能な妊娠検査を提供する。

【0037】

本発明の他の利点は、被験者が非常に高レベルの hCG コア断片を有する場合にポイントオブケアの hCG ベースの妊娠検査デバイスで起こりうる偽陰性の結果を回避しうることである。この問題は、当技術分野で認識されており、たとえば、Gronowski ら（2009 Clinical Chemistry 55, 1389 - 1394）により記載されている。この理由は、過剰のコア断片の阻害作用により引き起こされる不自然に低い hCG シグナルが、過剰のコア断片の影響を受けない FSH およびプロゲステロン代謝物のアッセイ結果により補償されることにある。

【0038】

有利には、本発明に係るアッセイデバイス / 方法により行われる（少なくとも）3 つのアナライトアッセイのそれぞれに、単一の尿サンプルを用いて検査サンプルが提供される。便宜上、3 つのアナライトアッセイはすべて、好ましくは単一の尿サンプルをアッセイデバイスに適用して、実質的に同時に行われる。これは、適宜、とくに以下に記載の実施形態を用いて達成可能である。

【0039】

本目的では、3 つのアナライト検査は「実質的に同時に」行われ、その際、検査は、同一の排尿エピソードに由来する尿サンプルを用いて行われ、かつアッセイの結果は、互いに 3 分以内、好ましくは互いに 5 分間以内、より好ましくは互いに 10 分以内、最も好ましくは互いに 60 秒以内に読み取られる。望ましくは、3 つのアナライト検査はすべて、ユーザーが尿サンプルを検査デバイスのサンプル接触部に適用することにより実質的に同時に（すなわち互いに 60 秒以内に）開始される。

## 【0040】

好ましい実施形態では、本発明の種々の態様は、以下の特徴の1つ以上（望ましくはすべて）を有する。

## 【0041】

- (i) 99%以上の感度、
- (ii) 99%以上の特異度、
- (iii) 検査日が妊娠初期（すなわち、本明細書に定義される予想月経日前）の場合でも(i)および(ii)を達成する能力、
- (iv) 検査の実施/アッセイデバイスの使用が単一の時点（すなわち単一日）で1回の場合でも(i)および(ii)を達成する能力、
- (v) アッセイデバイス/方法が外的情報（たとえば、女性の年齢または被験者のなんらかの病歴、たとえば、hCG、FSH、またはプロゲステロンの事前の測定）をなんら必要としないこと、ならびに
- (vi) 被験者が閉経周辺期および/または閉経後の女性（本明細書に定義されるとおり）を含む場合でも(i)および(ii)を達成する能力。

10

## 【0042】

本明細書の目的では、妊娠「初期」とは、女性において排卵時またはその近傍で出現し検出される黄体形成ホルモンのピークレベル[「LHピーク」]を基準にして計算される予想月経日前を意味する。説明すると、予想月経日は、通常、LHピークの15日後であると推定される。

20

## 【0043】

本発明者らは、本発明に係る装置および方法を用いれば、閉経周辺期および閉経後の女性の場合でも、単一の時点でのアッセイから99%以上の感度および99%以上の特異度で真の妊娠状態を確認できるはずであると推定した。

## 【0044】

予想月経日は、一定の時点を基準にして計算可能である。特定的には、予想月経日は、LHサージ日（すなわち、LHレベルの明確な顕著な増加が周期の最初に検出される日）を基準にして計算可能であり、このLHサージイベントは、通常、LHピークの約12～24時間前に起こる。予想月経日はまた、最終月経日に通常の周期の長さ（日数単位）を加えることにより計算されうる。予想月経日を計算する他の方法は、最終月経日に28日

30

## 【0045】

一般的に言えば、特定の時間が経過した後、アナライトアッセイ結果が決定されよう（必ずというわけではないが、通常はサンプルをアッセイデバイスのサンプリング領域と接触させた時刻を基準にして決定される）。アナライトアッセイ結果が決定される時刻は、 $t_E$ として参照されうる。アッセイ結果読取りデバイスは、いつ $t_E$ に達するかを決定するためにある種の一体型タイミング手段を含みうる。タイミング手段は、サンプルをアッセイデバイスと接触させることにより自動で作動されうるか（たとえば、電流の流れを可能にする液体サンプルにより）、またはユーザーにより（たとえば、スイッチなどを押し）もしくは任意の他の便利な手段により駆動されうる。アッセイ反応は、適宜 $t_E$ で平衡に達しうるが、このことは必須ではない。アナライトアッセイのすべてで一斉に同時に $t_E$ に達しうるか、または異なるアナライトでは $t_E$ は異なりうる。

40

## 【0046】

いくつかの実施形態では、 $t_E$ でアナライトアッセイシグナルが依然として上限閾値を下回る場合、アッセイ結果は陰性である（対象アナライトの存在がシグナルの生成をもたらす方式で）。アッセイの終点は、必ずしも反応の終了時でなくてもよい。実際上、通常は反応が終了する前に終点 $t_E$ に達したとみなされよう。

## 【0047】

終点 $t_E$ は、特定の時点を基準にしてリーダーにより適宜決定されうる（すなわち、 $t_E$ は、アッセイ開始後の特定の時間で、たとえば、リーダーの作動後および/またはリー

50

ダーへのアッセイスティックの挿入後および／または検査スティックへのサンプルの適用後に特定の時間間隔で生じるとみなされうる)。例示の目的では、 $t_E$  は、典型的にはアッセイ開始の1～10分後、好ましくは1～5分後に生じよう。

【0048】

望ましくは、アッセイ結果リーダーは、中間シグナルを得る場合は検査測定を繰り返すようにプログラムされよう。単純な実施形態では、測定は $t_E$ で繰り返される。しかしながら、好ましくは、測定は、終点前に1回以上繰り返される。最も好ましくは、リーダーデバイスは、シグナルが上限閾値を超えるまでまたは $t_E$ に達するまで(いずれか早いほう)、規則的間隔(たとえば、1秒間隔または5秒間隔)で測定を繰り返すようにプログラムされる。

10

【0049】

アッセイ結果リーダーが、さらなるユーザー入力を行うことなくあらかじめ決められた時点で自動で測定を行えるように、クロックまたは他のタイミングデバイスをリーダーに組み入れることが望ましい。

【0050】

それゆえ、たとえば、最初の時点 $t_0$ で、繰り返し測定を行う必要があれば、以上に記載したように、その後任意の所望の時間間隔でシグナルが上限閾値を超えるまでまたは $t_E$ に達するまで測定を行うように、リーダーをプログラムしうる。

【0051】

その他に、クロックまたは他のタイミングデバイスは、読取りデバイスによるシグナル蓄積速度の決定を容易にする。2つ以上の時点(既知の時間分離)でシグナル量の測定を行えば、シグナル蓄積速度を容易に計算しうる。

20

【0052】

シグナル蓄積の速度または量は、絶対的にまたは相対値として(たとえば、任意選択で実質的に同時反応から得られる対照値または他の比較値と比較して)測定可能であることに留意すべきである。

【0053】

特定のには、アッセイ結果リーダーは、いくつかの実施形態では、 $t_E$ に達する前に1つ以上のアナライトアッセイ読み値が特定の関連閾値レベルを十分に上回るまたは下回る(必要に応じて)場合、アッセイ結果(すなわち、妊娠しているかまたは妊娠していないか)を決定しうる。このようなアッセイ結果の「早期」決定は、欧州特許第1484613号明細書に記載されている。たとえば、本例では、サンプル中のF S H量があらかじめ決められた上限閾値を超えた場合(妊娠が決して観測されないレベル)、F S Hアッセイシグナルは非常に迅速に発生するため、このことから、アッセイ結果リーダー(またはヒト観測者)は、おそらくh C Gアッセイおよび／またはプロゲステロン代謝物アッセイの結果の解析を待たずに、 $t_E$ 前にアッセイのアウトカムを「妊娠していない」結果として決定しうる。同様に、サンプル中のプロゲステロン代謝物レベルが非常に低い場合(たとえば、 $1 \mu\text{g} / \text{m l}$ 未満)、強いプロゲステロン代謝物アッセイシグナルは非常に迅速に発生するため、この場合もおそらくh C Gアッセイおよび／またはF S Hアッセイを読み込むことなく、プロゲステロン代謝物アッセイの $t_E$ に達する前に「妊娠していない」として早期にアッセイ結果を決定しうる。

30

40

【0054】

アッセイ結果の「早期」決定は、3種のアナライト(すなわち、h C G、プロゲステロン代謝物、およびF S H)がいずれも $t_E$ に達する前に行われうるか、または3種のアナライトの任意の2つの組合せ(すなわちh C Gとプロゲステロン; h C GとF S H; またはプロゲステロンとF S H)が $t_E$ に達する前に行われうるか、または3種のアナライトの1つのみが $t_E$ に達する前に(すなわち、3種のアナライトの他の2種の $t_E$ でもしくはその後で)行われうる。

【0055】

同様に、3つのアナライトアッセイすべてまたは3つのアナライトアッセイの任意の1

50

つまたは3つのアナライトアッセイの任意の2つの組合せに、下限、中間、および上限の閾値が存在しうる。

【0056】

検査デバイスには、少なくとも1つの流路、好ましくは少なくとも2つの流路、典型的には3つさらには4つの流路が含まれよう。

【0057】

「流路」という用語は、本発明の目的では、液体を第1の位置から第2の位置に搬送可能な基材を意味し、たとえば、キャピラリーチャネル、マイクロ流体経路、またはラテラルフロー多孔性担体などの多孔性担体でありうる。多孔性担体は、リニア配置もしくはスタック配置でオーバーラップされていてもよいかまたは流体結合されている1つもしくは複数の多孔性担体材料を含みうる。多孔性担体材料は、同一であっても異なってもよい。検査デバイスによる種々のアッセイは、個別の基材上に提供されうるか、または1つのアッセイの流路に沿って搬送される液体が異なるアッセイの流路と交差できないように共通の基材上に提供されうる。たとえば、第1および第2のアッセイは、第1および第2の流路が互い隔離されるように同一の多孔性担体上に提供されうる。これは、たとえば、第1および第2のアッセイが分離されるように多孔性担体の一部をレーザーカットして非多孔性にすることにより達成されうる。他の選択肢として、同一の多孔性担体上に2つ以上（典型的には本質的に平行）の流路が提供されるようにストリップに沿って非多孔性ブロッキング材料を適用しうる。他の実施形態では、2種さらには3種の異なるアナライトに対する検査を単一の流路で行いうる。たとえば、hCGを検査するための試薬が単一の流路に含まれうるとともに、progesterone代謝物を検査するための試薬もまた含まれうる。他の選択肢として、hCGおよびFSHを検査するための試薬が単一の流路に含まれうるか、またはFSHおよびprogesterone代謝物を検査するための試薬が単一の流路に含まれうる。特定のには、流路は、2つの検出ゾーン（各アナライトに対して1つずつ）を含みうる。この場合、標識試薬は、一般的にはサンプル中の各アナライトの濃度に比例（正比例または反比例）して蓄積する傾向がありうる。

【0058】

検査デバイス内の1つまたは複数の流路は、ラテラルフロー多孔性担体を含みうる。多孔性担体として利用しうる好適な材料は、ニトロセルロース、アセテート繊維、セルロースもしくはセルロース誘導体、ポリエステル、ポリアミド、ポリオレフィン、またはガラス繊維を含む。多孔性担体は、ニトロセルロースを含みうる。これには、事前化学処理を行うことなく結合試薬を確実に固定できるという利点がある。たとえば、多孔性固相材料が紙を含む場合、抗体の固定は、たとえば、CNBr、カルボニルジイミダゾール、またはトreshilクロリドを用いて、化学結合により行われうる。

【0059】

本発明に係るアッセイデバイス/方法では、典型的には1種以上の結合試薬が利用される。典型的には、hCGアッセイでは、hCGに結合する結合試薬が利用され、FSHアッセイでは、FSHに結合する結合試薬が利用され、progesterone代謝物アッセイでは、progesterone代謝物に結合するさらに他の結合試薬が利用される。アッセイは、特定のには、標識結合試薬の使用を含みうる。他の箇所でも説明されるように、hCGおよびFSHの両方に結合する標識結合試薬が使用されうる。なぜなら、これらの2つの分子は、いくつかの共通した構造を有するからである。

【0060】

本目的では、「結合試薬」という用語は、結合対のメンバー、すなわち、分子の一方が化学的および/または物理的手段を介して第2の分子と結合する2つの異なる分子のメンバーを意味する。2つの分子は、それらの互いの結合が、それらの結合パートナーと、類似の特徴を有する他のアッセイ成分とを識別可能であるという意味で、関連付けられている。結合対のメンバーは、リガンドとレセプター（抗リガンド）、結合対メンバーと結合対パートナーなどとして参照される。分子はまた、分子の凝集の結合対メンバーでありうる。たとえば、第2の抗体とその対応する抗原との免疫複合体に対して生成される抗体は

、免疫複合体の結合対メンバーであると考えられうる。

【0061】

抗原と抗体との結合対メンバーの他に、他の結合対は、例として、ビオチンとアビジン、炭水化物とレクチン、相補的ヌクレオチド配列、相補的ペプチド配列、エフェクター分子とレセプター分子、酵素補因子と酵素、酵素阻害剤と酵素、ペプチド配列とその配列または全タンパク質に特異的な抗体、高分子酸と高分子塩基、色素とタンパク質結合剤、ペプチドと特異的タンパク質結合剤（たとえば、リボヌクレアーゼ、Sペプチド、およびリボヌクレアーゼSタンパク質）などを含むが、これらに限定されるものではない。さらに、特異的結合対は、元の特異的結合性メンバーのアナログであるメンバーを含みうる。

【0062】

標識結合試薬との関連で用いられるときの「標識」とは、目視手段または機器手段により検出可能なシグナルを生成可能な任意の物質を意味する。本発明で使用するのに好適な種々の標識は、化学的手段または物理的手段のいずれかを介してシグナルを生成する標識、たとえば、光学的に検出可能な標識を含む。かかる標識は、酵素および基質、色素原、触媒、蛍光化合物、化学発光化合物、電気活性種、色素分子、放射性標識、ならびに粒子標識を含む。粒子標識は、磁氣的または電気化学的手段により検出可能な磁気標識または電子荷電標識を含みうる。標識は、結合試薬に共有結合されうる。特定的には、標識は、光学的に検出可能なものに由来しうる。好ましい光学的に検出可能な標識は、以下のようにコロイド金属粒子標識および色素担持粒子を含む。

【0063】

標識は、コロイド金属粒子、たとえば、金ゾル、銀ゾル、白金ゾル、銀増強金ゾル、炭素ゾル、もしくは炭素ナノ粒子、コロイド半金属もしくは非金属粒子、たとえば、テルルもしくはセレン、または染色もしくは着色粒子、たとえば、色素が組み込まれたポリマー粒子もしくは色素ゾルを含みうる。色素は、任意の好適な色たとえば青色でありうる。色素は蛍光性でありうるか、または量子ドットを含みうる。好適な蛍光材料は当業者に周知である。色素ゾルは、Foron Blue SRP (Sandoz) および Resolin Blue BBL S (Bayer) などの市販の疎水性色素から調製されうる。好適なポリマー標識は、ポリスチレン、ポリビニルトルエン、ポリスチレン-アクリル酸、ポリアクロレインなどの一連の合成ポリマーから選択されうる。使用されるモノマーは、通常、水不溶性であり、モノマーミセルが形成されるように水性界面活性剤で乳化され、次いで、エマルジョンへの開始剤の添加により重合が誘導される。実質的に球状のポリマー粒子が生成される。かかるポリマー粒子の理想サイズ範囲は、約  $0.05\ \mu\text{m}$  ~ 約  $0.5\ \mu\text{m}$  である。例示的な実施形態によれば、標識は、ことから  $0.02\ \mu\text{m}$  ~  $0.25\ \mu\text{m}$  の範囲内の好ましい粒子平均直径を有する金コロイドである。

【0064】

乾燥結合試薬は、マイクロフルイディクスデバイスの流路内に提供されうるか、またはラテラルフロー型デバイスの検出ゾーンを構成する多孔性担体材料の上流に提供された多孔性担体材料上に提供されうる。上流の多孔性担体材料はマクロ多孔性でありうる。マクロ多孔性担体材料は、非特異的結合を最小限に抑えるために、およびマクロ多孔性担体が液体サンプルにより湿潤状態になった後に標識試薬の自由移動を促進するために、低タンパク質結合性もしくは非タンパク質結合性にすべきであるか、またはBSAまたはPVAなどの試薬を利用して容易にブロック可能にすべきである。マクロ多孔性キャリア材料は、必要であれば、より親水性にするために、および液体サンプルの迅速な取込みを促進するために、界面活性剤または溶媒で前処理可能である。さらに、標識試薬を安定化させるために、およびその可動化を支援するために、1種以上の糖（たとえば、スクロース、トレハロース）を使用しうる。これらは、標識試薬を多孔性担体に適用するのに用いられる溶液の一部として流路および/または多孔性担体材料に適宜適用されうる。マクロ多孔性担体の好適な材料は、ポリエチレンおよびポリプロピレンなどのプラスチック材料または紙またはガラス繊維などの他の材料を含む。標識結合試薬を検出可能粒子で標識する場合、マクロ多孔性担体は、粒子標識の最大粒子サイズの少なくとも10倍の細孔サイズを

10

20

30

40

50

有しうる。より大きい細孔サイズは、標識試薬のより良好な放出を与える。

【0065】

検査デバイスには、3つ以上の流路、すなわち、各アナライトアッセイのそれぞれの流路が適宜含まれよう。しかしながら、2つ以上のアナライトアッセイが（おそらく、以下に記載される任意選択の共通のサンプル適用ゾーンの他に）共通の流路を共有しうるようにすることが可能である。流路には、典型的には、尿サンプルなどの水性流体が輸送されるキャピラリーチャンネルもしくは他のマイクロ流体フローチャンネルまたは1つ以上の多孔性部材が含まれよう。

【0066】

一実施形態では、検査デバイスは、3つの個別のラテラルフローアッセイストリップ（各アナライトアッセイに対して1つずつ）を含む。他の実施形態では、検査デバイスは、2つのラテラルフローアッセイストリップを含みうる。この場合、ストリップの一方は、アナライトの1つ（たとえばhCG）のアッセイを行う役割を果たし、他方のストリップは、他の2つのそれぞれのアナライトのそれぞれのアッセイを行う役割を果たす。また、1つの流路またはラテラルフロー検査ストリップを用いて3種のアナライトすべてを検査する実施形態も想定可能である。

10

【0067】

検査デバイスは、特定のには、サンプル適用ゾーンを含みうる。これは、尿などの水性サンプルを適用しうる多孔性（典型的には吸収性）材料のゾーンである。サンプル適用ゾーンは共通のゾーンでありうる。すなわち、共通のサンプル適用ゾーンに適用された液体サンプルは、2つ以上の異なるアッセイ流路に輸送されうる。

20

【0068】

典型的には、サンプルは、ユーザーがサンプル適用ゾーン上に直接排尿することによりサンプル適用ゾーンに適用される。

【0069】

好ましい実施形態では、アッセイデバイスは、アッセイの機能要素およびアッセイ試薬のほとんどまたはすべてを収容するハウジングを含む。ハウジングは、防水性合成プラスチック材料から適宜作製され、好ましくは実質的に不透明である。所望の不透明度レベルを達成するために、プラスチック材料に不透明化剤を添加しうる。ハウジングを形成するのに好適な合成プラスチック材料は、特定のには、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリスチレンコポリマー、ポリオレフィン、ポリプロピレン、ポリエチレン、およびアクリロニトリルを含む。ハウジングは、望ましくは、2つ以上の部分で形成されうる。これらの部分は、ハウジングの集合部分内またはそれらの間に収容されたアッセイデバイス要素の残りの大部分（またはすべて）と連結一体化される。ハウジングの各部分は、スナップ嵌合処理などの従来の締結手段によりまたはプラスチック溶接などにより連結締結されうる。

30

【0070】

好ましい実施形態では、アッセイデバイスは、ハウジング（典型的には、上述の特徴を有する）を含み、サンプル適用部またはゾーンは、尿サンプルをサンプル適用部またはゾーンに適用するのを容易にするためにハウジングを越えて延在する。ハウジングを超えて延在するサンプル適用部またはゾーンは、使用前、除去可能キャップにより覆われていてもよい。キャップはまた、好ましくは、不透明または透明または半透明であってもよい合成プラスチック材料で形成されうる。典型的には、キャップは、サンプルがサンプル適用ゾーンに適用された後、再配置される。

40

【0071】

アッセイ流路の遠位下流端に吸収性「シンク」を提供することが可能である。共通のシンクを提供してもよいし、シンクを各アッセイの遠位端に提供してもよい。吸収性シンクは、好ましくは、たとえばCF7 Whatman紙などの高吸収性材料を含んでいてもよく、検出ゾーンの近傍からいずれの非結合標識も除去するのに十分な吸収能を提供すべきである。多孔性固相材料が検出ゾーンを越えて延在する長さを有していれば、かかる

50

シンクの代わりとして十分でありうる。高吸収性シンクを提供する利点は、過剰の標識結合試薬がそれぞれのアッセイの流路から除去または実質的に除去されることである。これは、それぞれのゾーンの近傍で非結合標識結合試薬の程度を最小限にする効果を有するため、異なる量の標識結合試薬を有しうるデバイスでアッセイ流路の利用を可能にする。

#### 【0072】

検査デバイスには、サンプル充足インジケータ（たとえば、PCT / 欧州特許出願公開第2013 / 061178号明細書に記載される）、「フラッド防止」パッド（たとえば、国際公開第2012 / 069610号パンフレットに開示される）、アッセイコントロールとしてサンプル流量を使用（たとえば、欧州特許第1,484,611号明細書、米国特許第6,194,222号明細書に開示される）、陽性または陰性の結果の「早期」決定（たとえば、欧州特許第1,484,613号明細書、米国特許第5,679,584号明細書に開示される）、電子デバイスの自動「ウェイクアップ」（たとえば、サンプルによりデバイスが湿潤されると電気回路が完成して自動作動する）、ならびにデジタルアッセイ進行メータの使用（たとえば、欧州共同体意匠登録第1367304号など）またはサンプルが検査デバイスに適用された時の視覚的表示および / またはアッセイが開始された時の視覚的表示をユーザーに与える「色変化ウィック」など（たとえば、国際公開第2003 / 058245号パンフレット）を含めて（限定されるものではないが）、従来の自己検査用または家庭検査用の妊娠検査デバイスでごく普通に見られる当業者に公知の他の特徴が適宜含まれよう。検査デバイスは、有利には防水包装で消費者に提供されよう。包装は、任意選択でシリカゲルのサシェなどのように乾燥剤をさらに含む。

#### 【0073】

アッセイ対象は、機械的強度および好適な剛性を提供するために、なんらかの支持体またはバッキング層上に適宜支持されよう。支持体とアッセイ対象は、適宜、検査スティックとして参照および提供されうる。3つのアッセイ対象はすべて、単一のスティック上、または2つ、3つ、さらには4つ（すなわち、1つのアナライトに対して2つ以上のスティック）の検査スティック上に存在しうる。1つもしくは複数の検査スティックは、ユーザーにより検査デバイスに挿入されるように適合化および構成されうるか、または1つもしくは複数の検査スティックは、より好ましくは、検査スティックが検査デバイスにあらかじめ挿入もしくは装填された状態で消費者により購入される検査デバイスの構成部分を形成する。

#### 【0074】

アッセイ結果は、外部アッセイ結果読取り手段によりもしくはユーザーにより直接、読み取られうるか、またはより好ましくは、検査デバイスには、アッセイの結果を読み取るための一体型アッセイ結果リーダーが含まれよう。アッセイ結果リーダーは、好ましくは、3つのアナライトアッセイ結果すべてを読み取る。アッセイ結果リーダーには、有利には、電子部品とくにマイクロプロセッサなどのデジタル電子部品が含まれよう。典型的には（必ずというわけではないが）、アッセイ結果は、光学手段により読み取られる。すなわち、検出ゾーンで反射および / または透過された光量が測定される。この場合、光学標識試薬は、サンプル中のアナライト濃度に比例（正比例または反比例）して蓄積する傾向がある。他の選択肢として、アッセイ結果は、たとえば、磁氣的または電気化学的測定により読み取られうる。明らかに、アッセイ結果の読取り方法は、アッセイ試薬の標識に使用される標識の性質に依存しうる。

#### 【0075】

外部アッセイ結果読取り手段は、専用の結果読取りデバイス（たとえば、欧州特許第1066530号明細書に記載のものに類似する）を含みうる。他の選択肢として、外部アッセイ結果リーダーは、好ましくはカメラを備えた移動電話または他の携帯電子機器（たとえばタブレットコンピューター）などのように「非専用」でありうる。この場合、アッセイ結果は、可視標識により発生されたシグナル強度を測定することにより読み取られる。

#### 【0076】



アッセイ結果リーダーは、外部アッセイ結果リーダーであるか一体型アッセイデバイス／アッセイ結果リーダーの一部を形成するにかかわらず、アッセイ結果を読み取って解釈しうるか、またはアッセイデータを解釈するためにアッセイ結果データを離れた位置にあるデバイスに伝送しうる。アッセイデータは、離れた位置にあるデバイスにリアルタイムで伝送されうる。データは、インターネット接続を介して伝送されうるか、または物理的にリモートデバイスに輸送されるメモリーデバイス（たとえば、「フラッシュ」ドライブなど）に記憶されうるか、またはデータは、無線通信手段（たとえば、Bluetooth（登録商標）、近距離無線通信〔NFC〕など）により伝送されうる。

【0077】

マイクロプロセッサは、光学読取り要素もしくは他のアッセイ結果読取り要素の操作を制御しうるとともに、アナライトのそれぞれの関連アッセイシグナル閾値を用いて適宜プログラムされるかまたはかかる閾値にアクセス可能であり、実際のアッセイシグナル値をあらかじめ決められた閾値と比較して、妊娠検査のアウトカムを決定するようにアッセイ結果を解釈する。

【0078】

それゆえ、アッセイ結果リーダーは、アッセイ結果の読取りに必要な要素を含む。検査デバイスにはまた、有利には、妊娠検査のアウトカムをユーザーに表示のためのアッセイ結果ディスプレイが含まれよう。典型的には、ディスプレイにはLCDが含まれようが、他のタイプのディスプレイも可能である（たとえば、「電子インク」の使用）。アッセイデバイス（より特定のにはその要素）を操作するのに電源を必要とする実施形態では、好ましくはアッセイデバイスに電池などの一体型電源が備えられよう。非常に小さくかつ安価な電池は、市販品として容易に入手可能である。デバイスはまた、一体型電源に接続してデバイスを作動させるためのスイッチを備えうる。

【0079】

代替実施形態では、アッセイ結果は、従来の「自己検査用」妊娠検査から公知の方法でユーザーにより直接読み取られうる。たとえば、ユーザーは、アッセイ検出ゾーンを覆う1つ以上のウィンドウを調べて、検出ゾーンの1つ以上（またはすべて）で検出可能シグナルの存在または不在を決定しうる。ユーザーが検出ゾーンを調べられるように、各検出ゾーンは、不透明なハウジング内に個別のウィンドウを備えうる。他の選択肢として、大きいウィンドウにより検出ゾーンの2つ以上（またはすべて）を収容しうる。典型的には、かかるユーザー読取りデバイスでは、ユーザーによりラテラルフローアッセイまたはマイクロフルイディクスアッセイの検出ゾーンが直接調べられよう。他の方式では、ユーザーは、カラーチャートまたはインジケータを基準にして結果を決定しうる。検査デバイスには、適宜、アッセイ結果を読み取るための説明書またはガイダンスと一緒に備えられよう（デバイスによりユーザーのアッセイ結果が解釈されない場合）。たとえば、かかる直接読取り目視検査の解釈を容易にするために、ユーザーに印刷されたカラーチャートが提供されよう。

【0080】

妊娠検査スティック／ディスプレイ付きアッセイ結果リーダーデバイスの組合せは、「デジタル妊娠検査」として参照されうるとともに、かかるデジタル検査デバイスは、市販されており、本開示の利点を生かして本発明に係る検査デバイスを提供するように適合化されうる。

【0081】

マイクロプロセッサは、望ましくは、アッセイ結果読取り要素によりアッセイ結果を読み取り、アッセイ結果を解釈し、および結論をユーザーに表示するように、プログラムされよう。

【0082】

アッセイ結果を読み取るための要素には、好ましくは、少なくとも1つの光源と少なくとも1つの光検出器が含まれよう。少なくとも1つの光源は、好ましくは発光ダイオード（LED）である。少なくとも1つの光検出器は、好ましくはフォトダイオードまたはフ

10

20

30

40

50

オートランジスターである。光源は、アッセイの検出ゾーンに照射される。このゾーンは、アッセイの実施時、アッセイに適用されたサンプル中の対象アナライトの濃度に依存して標識物質を蓄積する傾向がある。標識物質は、アナライトの濃度と正の相関を有して蓄積しうる（すなわち、アナライトの濃度が高いほど、検出ゾーンに蓄積する標識の量は多い）。典型的には、当業者に周知のサンドイッチアッセイ方式が利用される。他の選択肢として、標識物質の蓄積は、アナライトの濃度と負の相関を有して蓄積しうる（すなわち、アナライトの濃度が高いほど、検出ゾーンに蓄積する標識の量は少ない）。かかる負の相関は、競合型または阻害型のアッセイに特有であり、この型のアッセイは、対象アナライトがハプテンである場合および／または小さすぎて2つの異なる抗体への同時結合に対処できない場合（たとえば、プロゲステロン代謝物の場合）に利用されることが多い。

10

#### 【0083】

F S Hおよびh C Gは両方とも、 および サブユニットを含むヘテロ二量体分子である。F S Hおよびh C Gの サブユニットは、本質的に同一であるため、 サブユニットに対する抗体は、F S Hおよびh C Gの両方に結合しうる。したがって、これらの2つの分子のアッセイでは、たとえば、可動性直接標識（すなわち、光学的に検出可能）抗体でありうる共通の試薬が潜在的に利用されうる。それぞれの検出ゾーンは、 サブユニット（F S Hとh C Gとで異なる）に特異的な固定化捕捉抗体を含みうる。明らかに、これはサンドイッチ型免疫学的アッセイに関するものであるが、他のアッセイ方式も周知であり、その代わりに使用可能である。

#### 【0084】

20

サンプルが高レベルのh C Gを含有する場合（たとえば、妊娠が比較的進行している被験者によりサンプルが提供されるため）、共通の サブユニットに特異的な抗体には高レベルのh C Gが「殺到」し、F S Hへの結合に利用可能な抗体の量が実質的に低減されるため、サンプル中に存在するF S Hの量が過小評価される可能性がある。実際には、このことは、おそらくなんら問題を引き起こさないであろう。なぜなら、かかる高レベルのh C Gは、ほぼ常に（> 99.9%）妊娠に起因し、F S Hアッセイ結果のいかにかわらず、検査デバイスにより適正な検出および解釈が行われるであろうからである。h C Gアッセイで二重 サブユニット特異的抗体対およびF S Hアッセイで二重 特異的抗体対を使用することも可能である。この方式では、高アナライトレベルで見られた以上の効果が打ち消されるであろう。

30

#### 【0085】

コストを最小限に抑える必要性を考慮して（とくに、単回使用後にデバイスが廃棄される実施形態では）、単一の光検出器を用いて、少なくとも2つ、好ましくは3つの異なるアッセイの検出ゾーンから発せられる光を検出することが好ましい。光が真に検出ゾーンに由来するものではないことは分かるであろう。すなわち、光は、光源から発せられるが、場合により、検出ゾーンを介して反射および／または透過され、結果的にそこから発せられたように見える。典型的には、必ずというわけではないが、各検出ゾーンには、L E Dなどのそれぞれの光源が照射される。

#### 【0086】

L E Dなどの単一の光源を用いて、少なくとも2つの異なるアッセイ、可能であれば3つの異なるアッセイの検出ゾーンに照射することが可能である。しかしながら、複数のL E Dを提供することも可能である。たとえば、それぞれの各検出ゾーンに照射するために1つのL E Dを提供しうる。複数のL E Dを提供する場合、これらは、同一の色照射を生成しうるか、または異なる波長の照射を生成しうる。L E D（または他の光源）の数が検出ゾーンの数に等しいか、さらにはそれを上回る実施形態が存在しうる。他の選択肢として、1つのL E Dで2つの検出ゾーンに照射するさまざまなジオメトリーを用いて、L E Dの数が検出ゾーンの数を下回るようにすることが可能である。

40

#### 【0087】

デバイスは、典型的には、参照ゾーンを利用しうる。これは、マイクロフルイディクスアッセイまたはラテラルフローアッセイの流路の一部であり、検出ゾーンから得られた読

50

み値の参照として使用される。参照ゾーンの使用は当業者に周知である。特定的には、デバイスは「共有」参照ゾーンを利用しうる（欧州特許第2,031,376号明細書に開示される）。この場合、参照ゾーンは、少なくとも1つが異なる流路上に位置する2つ以上の検出ゾーンの参照として使用される。

#### 【0088】

マイクロプロセッサまたはコンピューターコントロールにより光源を1つ以上の検出ゾーンに逐次的に照射し、それぞれの検出ゾーンを介して反射および/または透過された光を識別できるようにしうる。一実施形態では、光源は、異なる時間で異なる波長の光を発し、光検出器は、異なる波長を識別する。追加としてまたは他の選択肢として、光学バップル（固定または調整可能）を用いて特定の光源によりに照射される領域を制御しうる。使用可能な光学配置の種類についてのより詳細な内容は、たとえば、欧州特許第1,484,601号明細書、米国特許第6,055,060号明細書、および米国特許第5,889,585号明細書に開示されている。疑問を生じないように述べておくが、本明細書で用いられる「光」という用語は、ヒト観測者の眼に見える電磁スペクトルの部分の放射線を単に意味することが意図されるのではなく、たとえば、紫外線および赤外線を含むことが意図される。それにもかかわらず、スペクトルの可視部で要素および感度を操作することが好ましいこともある。

10

#### 【0089】

マイクロプロセッサ手段またはコンピューターコントロール手段には、アッセイ結果読取りデバイスによる結果の解釈およびユーザーへの適切な結論（たとえば、妊娠しているか妊娠していないか）の表示を可能にするために、好ましくは、アッセイ結果と比較されるいくつかの記憶されたアナライト閾値が含まれよう。マイクロプロセッサ手段またはコントロール手段は、有利には、試験結果を測定し、それをあらかじめ決められた閾値と比較し、および結論を表示するアルゴリズムでプログラムされよう。

20

#### 【0090】

一実施形態では、マイクロプロセッサ手段またはコントロール手段により、最初にhCGアッセイ結果が決定され、あらかじめ決められた下限hCG閾値と比較されよう。決定されたhCGアッセイ結果があらかじめ決められた下限hCG閾値を下回る場合、被験者は妊娠していないことがただちに確認されうるとともに、この結果はディスプレイによりユーザーに示されうる（たとえば、NOT PREGNANTという語もしくはは任意の言語の対応する語を生成することにより、または直観的記号、たとえば、マイナス記号もしくははゼロを利用して）。

30

#### 【0091】

しかしながら、測定hCGアッセイ結果があらかじめ決められた下限閾値を上回る場合、アッセイ結果リーダーはFSHアッセイ結果の測定に進みうる。FSHアッセイ結果からサンプル中のFSH濃度があらかじめ決められた閾値を上回ることが示唆された場合、被験者は妊娠していないことが確認されうるとともに、これは以上に記載したようにユーザーに示されうる。

#### 【0092】

しかしながら、サンプル中の測定FSHレベルがそれぞれのあらかじめ決められた閾値を下回る場合、アッセイ結果リーダーはプロゲステロン代謝物アッセイ（この場合、P3Gのアッセイ）の結果を測定しうる。アッセイ結果からサンプル中のP3G濃度がそれぞれのあらかじめ決められる閾値を下回ることが示唆された場合、被験者は妊娠していないことが確認されうる。サンプル中のP3G濃度があらかじめ決められた閾値を上回る場合、被験者は妊娠しているため、アッセイ結果リーダーによりディスプレイを介して適切な結論がユーザーに表示されよう。

40

#### 【0093】

閾値は、絶対アナライト濃度として（すなわち、単位体積あたりの量またはIUにより）および/または吸光度値としてまたは任意の他の便利な方法により、本発明に係るデバイスに記憶されうる。

50

## 【 0 0 9 4 】

一実施形態では、デバイスは、 $hCG$  /  $FSH$  / プロゲステロンアナライトの1つ、2つ、または3つすべてに対する上限および下限の閾値を備えうる。たとえば、一実施形態では、デバイスは上限 $hCG$ 閾値および下限 $hCG$ 閾値を有しうる。測定 $hCG$ 濃度が上限 $hCG$ 閾値を上回る場合、デバイスは、 $FSH$  / プロゲステロンアッセイの結果を解析することなく被験者が妊娠していることを宣言しうる。かかる宣言は、 $hCG$ アナライトアッセイ結果が上限閾値を上回ることが明らかである場合、デバイスにより「早期」に行われうる（たとえば、アッセイが平衡に達する前）。他の実施形態では、「妊娠」結果は、 $FSH$ およびプロゲステロンのアッセイ結果をチェックすることによりさらに確認される。

10

## 【 0 0 9 5 】

$hCG$ アッセイ結果が下限 $hCG$ 閾値を下回る場合、デバイスは被験者が妊娠していないことを宣言する（ $FSH$ およびプロゲステロンのアッセイ結果による確認を併用してまたは併用せずに）。 $hCG$ アッセイ結果が下限 $hCG$ 閾値を上回るが、上限 $hCG$ 閾値を上回らない場合、デバイスは、妊娠または非妊娠の決定を下すために $FSH$ およびプロゲステロンのアッセイ結果が必要とされよう。デバイスは、かかる $FSH$ およびプロゲステロンのアッセイ結果を逐次的に（たとえば、最初に一方のアナライト、次いで他方のアナライトの順で）または並列に調べうる。

## 【 0 0 9 6 】

特定のには、デバイスは、 $FSH$ および/またはプロゲステロンのアッセイに対する上限または下限の閾値を有しうる。特定の場合に複数の閾値のどれを適用すべきかの選択は、他の2つのアッセイで検出されるアナライトの絶対濃度または相対濃度に依存すると考えられるため、「加重」または「補償」のスキームが利用されうる。たとえば、上限および下限の $hCG$ 閾値の中間範囲の上側にあると決定された $hCG$ 濃度は、デバイスにより下限プロゲステロン閾値を適用して妊娠しているか/妊娠していないかの決定を下すことにより、比較的低いプロゲステロン濃度を「補償」しうる。反対に、たとえば、低い $FSH$ および/または高いプロゲステロンは、サンプル中の比較的低い $hCG$ 濃度を補償しうる。

20

## 【 0 0 9 7 】

アッセイ対象の測定および/またはアッセイ結果の解釈は、アッセイデータが1つ以上の計算または他のタイプの処理に付される1つ以上のデータ処理工程を含みうる。かかる処理は、典型的には外部または一体型のアッセイ結果リーダーの一部を形成するマイクロプロセッサなどのデジタル電子デバイスにより適宜行われよう。たとえば、データ処理は比の計算を含みうる。特定のには、処理工程は、 $FSH$ ：プロゲステロン代謝物またはその逆の比の計算を含みうる。比は、測定シグナル濃度もしくは他の好適な関連パラメーターから導出されるそれぞれのアナライトの相対シグナル強度または濃度計算値に基づきうる。より特定のには、「ボーダーライン」 $hCG$ シグナル強度または導出 $hCG$ 濃度は、 $FSH$ ：プロゲステロン代謝物（またはその逆）の比を計算することにより検証またはチェックされうる。

30

## 【 0 0 9 8 】

さらに、デバイスは、 $hCG$ 、 $FSH$ 、およびプロゲステロンの他に、他のアナライトをアッセイしうる。これらの他のアナライトは、特定のには、ホルモン、たとえば、 $LH$ 、 $hPL$ （ヒト胎盤性ラクトゲン）、および/またはリラキシンおよび/またはエストロゲンまたはそれらの代謝物などを含みうる。かかるホルモンの他の例は甲状腺刺激ホルモン（ $TSH$ ）である。 $TSH$ は、かかるホルモンのすべてが他のホルモンのサブユニットに非常によく類似したサブユニットを含むという点で、 $hCG$ 、 $FSH$ （および $LH$ ）に関連付けられる。 $TSH$ はまた、 $TSH$ に特有のサブユニットを含む。尿中の $TSH$ レベルは、すでに測定されているが（たとえば、Yoshida et al., 1988 Endocrinol. Jpn. 35, 733-739を参照されたい）、濃度は若干低い。かかる1種以上の追加のアナライトの濃度もまた、おそらく $hCG$  /  $FSH$  /

40

50

プロゲステロンアナライトの1つ以上の適用可能な閾値の選択に影響を及ぼすことから、妊娠しているか／妊娠していないかの決定を下す際にデバイスにより考慮されうる。1種以上のさらなるアナライトと、hCG、FSH、およびプロゲステロンの1種以上との比が測定されうる。特定のには、hCGとFSHとの比（またはその逆）が測定されうる。他のアナライトの測定は、以下に記載の本発明の精密化にとくに有用でありうる。

#### 【0099】

以上に記載の基本原理の精密化では、被験者が妊娠しているか否かだけではなく、（妊娠している場合には）受胎後のおよその経過期間から見た妊娠の程度（すなわち在胎期間）についても、ユーザーに示すことが望ましいであろう。これは、日数、より好ましくは週数を示すことにより表されうる。次の3つの間隔、すなわち、1～2週間、2～3週間、および>3週間の1が適宜表示されうる。これを容易にするために、検査デバイスは、有利には、受胎後のそれぞれの週数に対応する複数の異なるhCG濃度閾値（より正確にはhCGアッセイ検査結果閾値）を備えうる。これを達成する方法は、国際公開第2009/147437号パンフレットに開示されている。この場合も、この実施形態を容易にするために、検査デバイスは、広範囲にわたりhCG濃度を検査可能であることが望まれうるとともに（たとえば、hCGに対して比較的高感度の試験および比較的低感度の試験の両方を含めることにより）、これを達成する好適な方法は、国際公開第2008/122796号パンフレットに記載されている。妊娠の在胎期間の推定は、hCGに加えて他のアナライトたとえばhPL（国際公開第2012/055355号パンフレットを参照されたい）および／またはプロゲステロン代謝物の濃度を測定することにより容易になりうる。

#### 【0100】

いくつかの実施形態では、検査デバイスはまた、なんらかのコントロール機能を含むことが望ましいであろう。このことは、検査が適正に機能したことを示すなんらかの指標を提供するために自己検査用デバイスで従来から行われている。

#### 【0101】

典型的には、コントロール機能には、コントロールゾーンの使用が含まれよう。このゾーンでは、十分なサンプルが検査デバイスのサンプル適用ゾーンに適用された場合、標識試薬が蓄積する傾向がある。従来的には、標識試薬は、検査ストリップの上流部または近位部に放出可能に乾燥形態で堆積され、サンプルにより再水和されると可動化され、コントロールゾーンに固定された特異的捕捉剤により捕捉される標識抗体または他の試薬であろう。コントロールは、十分なサンプルが検査デバイスに適用されたかの指標となり、検査試薬がその結合性を適正な程度に維持していたかの指標となり、かつ、標識試薬が十分な程度に可動化されたかの指標となる。

#### 【0102】

次に、例示的な実施例を介しておよび添付の図面を参照して、本発明の種々の特徴をさらに説明する。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0103】

【図1】図1は、本発明に係るデバイスの一実施形態の分解図である。

【図2】図2は、本発明に係るデバイスの異なる実施形態で使用されるアッセイ検査ストリップの種々の方式を例示している。

【図3】図3は、本発明に係るデバイスの異なる実施形態で使用されるアッセイ検査ストリップの種々の方式を例示している。

【図4】図4は、本発明に係るデバイスの異なる実施形態で使用されるアッセイ検査ストリップの種々の方式を例示している。

【図5】図5は、本発明に係るデバイスの異なる実施形態で使用されるアッセイ検査ストリップの種々の方式を例示している。

【図6】図6は、本発明に係るデバイスに有用なアルゴリズム／論理ツリーの一実施形態を概略的に示している。

## 【発明を実施するための形態】

## 【0104】

## 実施例 1

最初の実験では、合計 50 個のサンプルが [hCG] 2.5 mIU/ml を有していた閉経周辺期および閉経後の 119 名の妊娠していない志願者 (PP、年齢 41 ~ 90 歳) コホートで、ならびにうまく妊娠して満期に至った Day - 7 EMP (予想月経停止) から Day + 3 EMP までの 72 名 (21 ~ 40 歳) の妊娠している志願者から、尿中 hCG、尿中 FSH、および尿中 P3G を測定した。サンプルを検査し、利用可能な場合で、合計 589 個の妊娠初期サンプル (「EPS」) が得られ、そのうち 434 個は PerkinElmer (登録商標) Delphia (登録商標) アッセイにより評価して [hCG] 2.5 mIU/ml を有していた。

10

## 【0105】

これらの結果を分析したところ、10 mIU/ml 以下の FSH 閾値および少なくとも 4 µg/ml の P3G 閾値の両方と組み合わせて少なくとも 2.5 mIU/ml の尿中 hCG 閾値レベルを用いて妊娠を定義することにより、真の妊娠が 100% 陽性予測で予想可能であった (妊娠していないコホート中に偽陽性は存在しなかった)。この研究により確証される妊娠の定義に用いた 3 種のアナライトの閾値レベルは、より大きなデータセットでは変化する可能性があるが、FSH および P3G と組み合わせて hCG を用いることにより、妊娠に由来する hCG と下垂体に由来する閉経周辺期および閉経後の hCG とを識別可能であったことが結果から示される。

20

## 【0106】

これらの閾値を用いた結果を以下の表 1 に示す。

## 【0107】

## 【表 1】

<b>グループ A</b> 閉経周辺期/閉経後 (PP) (n = 119)	[hCG] ≥ 2.5 mIU/ml (n = 50)	[FSH] ≥ 10 mIU/ml & [P3G] < 4 µg/ml
41-45 歳 (n = 5)	n = 1	偽陽性なし
45-50 歳 (n = 16)	n = 4	偽陽性なし
50-55 歳 (n = 25)	n = 5	偽陽性なし
>55 歳 (n = 73)	n = 40	偽陽性なし
<b>グループ B</b> 妊娠初期サンプル (n = 589)	[hCG] ≥ 2.5 mIU/ml (n = 434)	[FSH] < 10 mIU/ml & [P3G] ≥ 4 µg/ml
<b>概要:</b>		
カットオフ 2.5 mIU/ml hCG	カットオフ 10 mIU/ml FSH & 4 µg/ml P3G	100% 陽性予測

30

40

## 【0108】

表 1 に示される結果は非常に有意である。グループ A では、非常に高感度の hCG 検査 (2.5 mIU/ml 程度の少ない hCG を検出する) が、FSH およびプロゲステロン代謝物 (P3G) の検査と組み合わせた場合、統計的に有意な女性のサンプルでゼロの偽陽性率を与え、一方、グループ B では、妊娠している被験者すべてを同定するのに成功したことが示される。

## 【0109】

## 実施例 2

本発明の一実施形態では、妊娠検査デバイスには、hCG サンドイッチアッセイが第 1 のストリップ上にフォーマットされてニストリップニトロセルロース (NC) フォーマッ

50

トで構築されたラテラルフローイムノアッセイが含まれよう。F S H サンドイッチアッセイおよび競合 P 3 G アッセイは、2つの個別の捕捉ゾーンを有する第2の個別のストリップ上にフォーマットされよう。両方のストリップは、両方のニトロセルロースストリップに接触する多孔性媒体に接触する共通のサンプル適用ゾーンを介して同時に処理されよう。N C 捕捉ゾーン上では対象アナライトの量に対応してシグナル反応（結合標識）がデバイスによりデジタル方式で測定されよう。アナライトのレベルに依存して内蔵アルゴリズムによりデジタル表示応答（妊娠しているか／妊娠していないかおよび／または在胎期間）がスクリーン上に与えられエンドユーザーに示されよう。

【0110】

可能なアルゴリズムの一例を図6に概略的に示す。図6に示されたアルゴリズムは1つの実施形態にすぎず、多くの他の実施形態が使用されうることにも留意すべきである。図6に示された絶対アナライト濃度は単に例示されたものであり、他のアナライト閾値が利用されうることにも留意すべきである。

【0111】

### 実施例3

一実施形態の分解図を示す図1を参照して、本出願に係るデバイスは、合成プラスチック材料で形成されたツーパーツハウジングを含む。ハウジングは、頂部2および底部4を有する。ハウジングは、ポリカーボネートまたはポリプロピレンなどの不透明プラスチック材料で形成される。必要であれば、不透明化剤を組み込んでよい。

【0112】

ハウジング内には小さいボタン電池6などの電源があり、これによりプリント回路基板集合体（PCBA）8上に取り付けられた要素に電力が送られる。これらは、特定的には、1つ以上のLED、フォトダイオード、液晶ディスプレイ10を含む。PCBA8上に取り付けられた要素は、ハウジング内に取り付けられた2つのラテラルフローアッセイストリップ上で行われたアッセイ結果を読み取るのに必要なものを含む。ストリップの1つ12は、hCGアッセイを行うためのものであり、他方のストリップ14は、をストリップングする、F S H および プレグナ ジオール - 3 - グルクロニド（P3G）の両方のアッセイを行うためのものである。

【0113】

ハウジングの頂部および底部2、4は、協同して上述の要素の周りに実質的に湿分不透過性のシールを形成する。尿サンプルは、サンプリングウィック16によりラテラルフローアッセイストリップ12、14に達する。サンプリングウィック16の一方の端領域は、アッセイストリップ12、14のそれぞれの近接端領域と液体フロー連通している（サンプリングウィックが共通のサンプル適用ゾーンとして作用するように）。

【0114】

サンプリングウィック16の対向端領域は、ハウジングの一方の端のアーチャーを貫通してかつそれを越えて突出しているため、サンプルをサンプリングウィックに適用することが可能である。サンプリングウィックの突出部は、取外し可能なキャップ18により保護されている。このキャップは、収容されるハウジングの端と協同して滑嵌合係合を形成するように形状決めおよび寸法決めが行われている。

【0115】

例示された実施形態では、尿サンプルをサンプリングウィック16に適用するために、ユーザーは、キャップ18を取り外してウィック上に直接排尿する。ウィックは、吸収性材料で作製されているため、サンプルは、ウィックに吸収され、ウィックに沿って受動手段により流動してアッセイストリップ12、14に流入する。次いで、ユーザーは、任意選択でキャップ18を再配置する。サンプルがアッセイストリップに沿って流入するのを支援するために、アッセイストリップは、その遠位端（すなわち、サンプリングウィック16からさらに離れた端は）で高吸収性材料の「シンク」パッド20と液体フロー連通している。

【0116】

10

20

30

40

50

ラテラルフローアッセイは、従来方式で進行し、検査ストリップ 12、14 上の検出ゾーンにアナライト濃度依存的に（場合に応じて比例または反比例して）標識結合試薬の蓄積をもたらし、これは、PCBA8 上に取り付けられたアッセイ結果読取り要素により検出され読み込まれる。マイクロプロセッサASICなどは、読み値の解析および解釈を行って、ハウジングの頂部2の好適な位置に形成されたウィンドウまたはアパーチャー21を介してユーザーに見えるLCD10上にアッセイ結果を表示する。

#### 【0117】

使用前、ラテラルフロー検査ストリップ12、14を乾燥状態に維持することが重要であるため、PCBAは、ハウジングの内側から湿分を吸収する乾燥剤22のための容器を備えている。

#### 【0118】

##### 実施例4

図2を参照して、この実施例は、2つの異なるラテラルフローアッセイストリップが本発明に係るデバイスと組み合わせて使用されるかまたはその構成部分を形成する実施形態に関する。

#### 【0119】

図2では、ストリップの一方30は、hCGの高感度アッセイを行うために使用される。他方のストリップ32は、FSHおよびP3Gの両方のアッセイを行うために使用される。尿サンプルは、共通のサンプリング部材（明確さを期して省略した）からアッセイストリップ30、32の両方に進入し、矢印34により示された方向にストリップに沿って流動する。それらの近位端（すなわち、尿サンプルが最初に遭遇する端）では、両方のストリップがガラス繊維コンジュゲートパッド36を有し、遠位端に向って両方のストリップが高吸収性「シンク」38と液体フロー連通しており、これによりサンプルがアッセイストリップに沿って流動するようになる。両方のストリップはまた、「シンク」38を越えて一対の位置合せ孔40を含む。これらのことから、デバイス内でストリップの適正な位置決めが容易になり、その結果、とくに、アッセイストリップをデバイスのアッセイ結果読取り要素により適正に読み取ることが可能になる。対をなす位置合せ孔40は対称ではないため、ストリップが偶発的に互いに交換されることはありえないことに留意されたい。

#### 【0120】

ストリップ30を参照して、コンジュゲートパッド36には、金ゾル（42）にコンジュゲートされた可動性抗hCGサブユニットモノクローナル抗体が充填されている。このコンジュゲートは、コンジュゲートパッド上で乾燥され、サンプルにより湿潤されると放出される。

#### 【0121】

検出ゾーン44は、hCGのサブユニットに特異的な固定化モノクローナル抗体を含む。それゆえ、サンプル中に存在するhCGはいずれも、標識コンジュゲートに結合し、当業者の熟知するところであろう方法で、検出ゾーンで「捕捉」抗hCG抗体とのサンドイッチを形成する。

#### 【0122】

点線により境界付けられたゾーン46は、参照ゾーンを表し、アッセイ結果読取り手段は、このゾーンを使用してアッセイ読み値を校正する。同一の参照ゾーン46は、hCGアッセイ読み値と、さらにはストリップ32上のFSHおよびP3Gのアッセイで得られた読み値との両方を校正するために使用されうる（すなわち、共通の参照ゾーンが使用されうる）。

#### 【0123】

ストリップ32を参照して、ガラス繊維コンジュゲートパッドは、2つの異なるコンジュゲート48を有し、一方は、抗FSHサブユニットモノクローナル抗体にコンジュゲートされた金ゾルであり、他方は、抗P3Gモノクローナル抗体にコンジュゲートされた金ゾルである。（この実施例では、抗hCGおよび抗FSHは同一の抗体クローンで

10

20

30

40

50



ある)。

【0124】

固定化抗F S H サブユニットモノクローナル抗体は、F S H検出ゾーン50で捕捉抗体として使用され、一方、固定化P 3 G - オボアルブミンコンジュゲートは、P 3 G検出ゾーン52で捕捉分子として使用されている。

【0125】

各アッセイストリップ30、32の本体は、参照番号54により示されるようにニトロセルロースで形成される。

【0126】

この実施形態では、P 3 G検出ゾーン52は、F S H検出ゾーン50の下流に示されているが、2つの検出ゾーンの相対位置を逆転しうることが想定されうる。

10

【0127】

さらなる変形形態は、h C GおよびP 3 Gのアッセイが1つのストリップ上で行われ、かつ個別のストリップがF S Hアッセイに使用される、フォーマットである。

【0128】

実施例4A

他のアッセイ方式を想定することが可能である。これは、この変形形態では、コンジュゲートパッド36上に堆積された可動性コンジュゲートの1つが、P 3 G - オボアルブミンコンジュゲート(抗P 3 G m A bの代わりに)で標識された金ゾルであり、P 3 G検出ゾーン52の固定化捕捉分子が、固定された抗P 3 G m A bであることを除いて、図2に示されかつ実施例4で説明されたものと本質的に同一である。この構成では、サンプル中のP 3 Gは、検出ゾーン52での捕捉抗体への結合に関して標識コンジュゲートと競合する。

20

【0129】

実施例5

図3を参照して(同じ要素は図2で使用する参照数字を共有する)、この実施形態では、3つのアッセイはすべて、単一のアッセイストリップを用いて行われる。ガラス繊維コンジュゲートパッド36は、共通の抗h C G および抗F S H 金ゾルコンジュゲートならびに抗P 3 G m A b金ゾルコンジュゲート(それぞれ42、48)で充填されている。

30

【0130】

h C G検出ゾーン44は、固定化抗h C G m A bを含む。F S H検出ゾーン50は、固定化抗F S H m A bを含み、P 3 G検出ゾーン52は、固定化P 3 Gオボアルブミンコンジュゲートを含む。

【0131】

以上と同様に、検出ゾーンの相対位置は変化させうる。また、実施例4Aと同様に、可動性P 3 G試薬は、P 3 G - オボアルブミンコンジュゲートで標識された金ゾルでありうるとともに、P 3 G検出ゾーン52は、固定化抗P 3 G抗体を含みうる。

【0132】

さらに他の変形形態は容易に想定することが可能である。可動性コンジュゲートが、h C Gに対する サブユニット特異的モノクローナル抗体にコンジュゲートされた第1の金ゾルと、F S Hに対する サブユニット特異的モノクローナル抗体にコンジュゲートされた第2の金ゾルとを含みうる。それぞれの検出ゾーンは、固定化抗h C G および抗F S H 抗体を含む。他の潜在的な変形形態は、可動性コンジュゲートおよび固定化捕捉抗体の両方で抗h C G サブユニット抗体を使用することであり、ただし、2つの抗体が異なるエピトープに結合し、それゆえ、h C Gへの結合に関して互いに干渉も競合もしないことを条件とする。F S Hはまた、可動性コンジュゲートおよび固定化捕捉抗体の両方で抗F S H サブユニット特異的抗体を用いて同様にアッセイ可能である。

40

【0133】

実施例6

50

図4に概略的に示されたこの実施例では、個別のラテラルフローアッセイストリップが、各アナライトに対して提供される。hCGは、ストリップ100上でアッセイされ、FSHは、ストリップ102上でアッセイされ、およびP3Gは、ストリップ104上でアッセイされる。同じ要素は、図2と同一の参照数字を共有する。

#### 【0134】

サンプルは、共通のサンプリング部材（明確さを期して省略した）を介して3つのアッセイストリップすべてに適用される。共通の「シンク」パッド38は、各アッセイストリップの遠位端に向かって液体フロー接触している。この実施形態では、図2とは対照的に、各アッセイストリップ100、102、104は、それ自体の参照ゾーン46を有する。その他に、各アッセイストリップは、結合試薬がその結合性を維持する範囲内で、手順コントロールゾーン60（アッセイが適正に行われたかの指標となる）を有する。

#### 【0135】

##### 実施例7

さらに他の実施形態が図5に例示されている。これもまた、3つのアッセイストリップを利用する。しかしながら、3つのストリップの2つは、hCGレベルを測定するためのものであり、それゆえ、ストリップの1つ110は、高感度hCGアッセイであり（低レベルのhCGを検出するために）、ストリップの1つ112は、低感受性hCGアッセイであり（高レベルのhCGを検出するために）、および第3のストリップ114は、FSHおよびP3Gの両方をアッセイするためのものである。同じ要素は、図2に共通する参照数字により示される。

#### 【0136】

ストリップ112上のhCGアッセイの感度を減少させるために、コンジュゲートパッド36は、抗hCG mAbにコンジュゲートされた可動性金ゾルだけでなく（42'）、サンプル中に存在するhCGに結合する遊離（非標識）抗hCG mAbでも充填され、それゆえ、検出ゾーン44に位置する固定化抗hCG 捕捉抗体と競合する。それゆえ、サンプル中の高レベルのhCGアナライトで、アッセイ系に殺到することはない。この場合、非標識抗hCG モノクローナル抗体は、「スカベンジャー」剤として作用している。スカベンジャー剤は、抗体である必要はないが、hCGに結合して検出ゾーンでの標識試薬の堆積を（間接的に）妨害する任意の非標識剤でありうる。スカベンジャー剤は、たとえば、流路上/流路内に固定されうるか、標識コンジュゲートと混合されうる（可動形態で）。

#### 【0137】

高感度および低感度の両方のhCGアッセイを用いることにより、デバイスは広範な濃度範囲にわたりhCGを正確に測定可能になり、この配置は、被験者が妊娠していることを示す結果をデバイスが表示可能であるだけでなく、被験者がどのくらい長期間妊娠しているか（たとえば、受胎からの週数で）に関する定量的推定値をユーザーに示すことも可能である実施形態に役立つ。

#### 【0138】

上記の実施例は種々のラテラルフローアッセイフォーマットの使用を例示しているが、類似のアッセイ構成でマイクロフルイディクススペースのアッセイまたはラテラルフローおよびマイクロフルイディクスの両方をベースとするアッセイが利用可能であることは明らかであろう。

#### 【0139】

##### 実施例8

この実施例には、図4に示される本発明に係るデバイスで使用するのに好適なラテラルフローアッセイストリップの製造工程を記載する。

#### 【0140】

##### アッセイ試薬の製造：

##### A．金ゾル標識抗体の調製：

##### 1．P3Gアッセイ：

10

20

30

40

50

方法：

ホウ酸緩衝液（20 ml、20 mM、pH 8.5）を80 nm金ゾル溶液（20 ml、 $A_{550\text{ nm}} = OD 6.85$ 、BBI International）に添加し、金ゾルを含有する最終溶液を10 mMホウ酸緩衝液中OD 3.425で与えた。

【0141】

抗P3G抗体の溶液（クローン#5806：2、Alerre San Diego、40 ml、10 mMホウ酸緩衝液中160  $\mu\text{g/ml}$ ）を、室温で30分間にわたりマグネチックスターラーにより金ゾル溶液と急速に混合した。

【0142】

30分間混合した後、610  $\mu\text{l}$ の65.6  $\text{mg/ml}$  - カゼイン溶液を反応混合物に添加し、室温でさらに30分間にわたり混合を継続した。 10

【0143】

反応混合物中の - カゼインの最終濃度は0.5  $\text{mg/ml}$ であった。

ゾル溶液をファルコンチューブ（50 ml）に注加し、溶液を遠心分離した（4,000 g、10分、15℃）。

【0144】

透明上清をデカントし、ペレット化ゾルを撈拌し超音波処理した。

ゾル溶液をエッペンドルフチューブに移し、遠心分離した（4,000 g、7分、15℃）。

【0145】

上清を注意深く除去し、ペレット化ゾルを撈拌し超音波処理し、洗浄緩衝液を添加してゾルを再懸濁させた（1 ml、10 mMホウ酸緩衝液中0.5  $\text{mg/ml}$  - カゼイン）。再懸濁後、溶液を遠心分離した（4,000 g、7分、15℃）。 20

【0147】

上清を除去し、ペレット化ゾルを撈拌し超音波処理し、ゾルを少量の貯蔵緩衝液に再懸濁させ（PBS中0.5  $\text{mg/ml}$  BSA + アジド [PBSA]）、最終体積を2 mlに調整した。最初の実験では貯蔵緩衝液中0.5  $\text{mg/ml}$  BSAを使用した。BSAの存在がP3Gアッセイを妨害することが判明した。したがって、続いて、BSAの代わりに貯蔵緩衝液中0.5  $\text{mg/ml}$  カゼインを使用した。P3Gアッセイ成分を他のアッセイの成分に接触させうる本発明の実施形態では（たとえば、P3GアッセイおよびhCGおよび/またはFSHアッセイの両方を単一のアッセイ流路またはラテラルフローストリップ上で行う場合）、P3Gアッセイが影響を受けるのを防ぐために、他のアッセイでもBSAの使用を回避することが必要であろう。 30

【0148】

550 nmで吸光度を測定することによりゾル調製物の最終ODを決定した。

2. hCGアッセイおよびFSHアッセイ：

方法：

ホウ酸緩衝液（20 ml、20 mM、pH 8.5）を80 nm金ゾル溶液（20 ml、 $A_{550\text{ nm}} = OD 6.85$ 、BBI International）に添加し、金ゾルを含有する最終溶液を10 mMホウ酸緩衝液中OD 3.425で与えた。 40

【0149】

抗 - hCG抗体の溶液（クローン#3299：4、Alerre San Diego、40 ml、10 mMホウ酸緩衝液中20  $\mu\text{g/ml}$ ）を、室温で30分間にわたりマグネチックスターラーにより金ゾル溶液と急速に混合した。

【0150】

30分間混合した後、610  $\mu\text{l}$ の65.6  $\text{mg/ml}$  - カゼイン溶液を反応混合物に添加し、室温でさらに30分間にわたり混合を継続した。反応混合物中の - カゼインの最終濃度は0.5  $\text{mg/ml}$ であった。

【0151】

ゾル溶液をファルコンチューブ（50 ml）に注加し、溶液を遠心分離した（4,000 g、10分、15℃）。 50

0 g、10分、15 )。

【0152】

上清をデカントし、ペレット化ゾルを撈拌し超音波処理した。

ゾル溶液をエッペンドルフチューブに移し、遠心分離した(4, 000 g、7分、15 )。

【0153】

上清を注意深く除去し、ペレット化ゾルを撈拌し超音波処理し、洗浄緩衝液を添加してゾルを再懸濁させた(1 ml、10 mM ホウ酸緩衝液中 0.5 mg/ml - カゼイン)。再懸濁後、溶液を遠心分離した(4, 000 g、7分、15 )。

【0155】

上清を除去し、ペレット化ゾルを撈拌し超音波処理し、ゾルを少量の貯蔵緩衝液に再懸濁させ(PBSA中 0.5 mg/ml BSA)、最終体積を2 mlに調整した。

【0156】

550 nmで吸光度を測定することによりゾル調製物の最終ODを決定した。

B. ニトロセルロース上に固定される試薬の調製:

以下の実施例ではオボアルブミンのP3Gコンジュゲートの調製および使用が記載されているが、P3Gの他のタンパク質コンジュゲートまたは合成高分子コンジュゲートを利用しうることが想定されうる。P3Gのタンパク質コンジュゲートには、ウシ血清アルブミン、免疫グロブリンG、ゼラチン、および - カゼインが含まれるが、これらに限定されるものではない。高分子担体の代表例には、ポリアリルアミン、ポリビニルアルコール、ポリリシン、およびポリエチレンイミンが含まれる。

【0157】

P3Gアッセイ:

オボアルブミンのP3Gコンジュゲートの調製(P3G対オボアルブミンのモル比10:1)。

【0158】

方法

NHS活性化P3Gエステルの調製(10 mg P3G、10% DMSOスケール)

NHS活性化P3Gエステルの調製に水溶性カルボジイミド(EDC)を使用した。P3G(2.0136 × 10<sup>-5</sup> モルP3G)よりもモル過剰のEDC(1.1 × )および NHS(1.5 × )を用いて反応を行った。

【0159】

反応を行う全体積は600 μlであった。

48 mgのEDCを3.39 mlのDMSO(99.7%エクストラドライ、Acros、Cat # 3484400)に溶解させることにより、EDC(1-エチル-3-[3-ジメチルアミノプロピル]カルボジイミドヒドロクロリド、Thermo Scientific、Cat # 77149、M.W. = 191.7)の14.153 mg/ml溶液を調製した。

【0160】

29 mgのNHSを2.5 mlのDMSOに溶解させることにより、NHS(N-ヒドロキシスクシンイミド、Sigma Aldrich、Cat # 130672、M.W. = 115.09)の11.6 mg/ml溶液を調製した。

【0161】

10 mgのP3G(5 - プレグナン - 3 , 20 - ジオールグルクロニド、P3G、Sigma、Cat # P3635、M.W. = 496.63)をガラスバイアル中に秤取りし、300 μlのEDCおよび以上で調製した300 μlのNHS溶液を添加して、P3Gの1.1倍超のEDCおよび1.5倍超のNHSを含有する反応混合物を与えた。反応混合物を暗所、室温で4時間撈拌し、反応を20 で一晩(約16 hrs)進行させた。

【0162】

無水DMSO (400  $\mu$ l) を以上の溶液に添加して全体積1000  $\mu$ lの溶液を作製した。

【0163】

P3GからP3G-NHSエステルへの転化率を100%と仮定すれば、1000  $\mu$ l中に $2.0136 \times 10^{-5}$ モルの活性化エステルが存在しよう。それゆえ、この溶液の100  $\mu$ lには $2.0136 \times 10^{-6}$ モルが含まれよう。

【0164】

P3G-オボアルブミンコンジュゲートの調製

100  $\mu$ lの活性エステル ( $2.0136 \times 10^{-6}$  モル) を使用した。

【0165】

92.4 mgのオボアルブミンを20.858 mlのPBSに溶解させることによりPBS緩衝液 (PBS錠剤、Sigma、Cat # P4417) 中のオボアルブミンの4.43 mg/ml 溶液 (Sigma、Cat # A5503 > 98%、MW = 44,000) を調製し、この溶液の2 mlを用いて10倍希釈調製物を得た。

【0166】

NHS活性化P3G溶液 (100  $\mu$ l) を添加する直前にDMSO (100  $\mu$ l) をオボアルブミン溶液に添加した。それゆえ、反応混合物中のDMSOの最終濃度は10% (v/v) に維持された。

【0167】

反応溶液を室温で3.5時間攪拌した。3.5時間反応した後、1 M トリス緩衝液 pH 7.4 (100  $\mu$ l) を溶液に添加して反応をクエンチした。

【0168】

次いで、P3G-オボアルブミンを遠心分離し、透明上清を除去し、PBSAであらかじめ平衡化されたPD-10カラム (GE Healthcare、Cat # 17-0851-01) で精製した。

【0169】

- コンジュゲート溶液 (2.5 ml) を平衡化カラムの頂部に適用し、溶液をすべてゲル床に流入させた。

【0170】

- 次いで、溶出緩衝液 (PBSA、3 ml) をカラムに適用し、フロースルーを清浄ガラス容器中に捕集した。このフロースルーは、精製P3G-オボアルブミンコンジュゲートを含有していた。

【0171】

タンパク質濃度を決定するために0.7の吸光係数 ( $A_{280}^{0.1\%}$ ) を使用した。次いで、P3G-オボアルブミンコンジュゲートを3 mg/ml に濃縮してニトロセルロース上に固定した。

【0172】

1. hCGアッセイ:

抗-hCG抗体 (クローン # 3468: 2、Alere San Diego) をPBSA中で3 mg/ml に希釈した後、ニトロセルロース上に固定した。

【0173】

2. FSHアッセイ:

抗-FSH抗体 (クローン # 5948: 2、Alere San Diego) をPBSA中で3 mg/ml に希釈した後、ニトロセルロース上に固定した。

【0174】

C. 特異的結合物質の調製ならびに位置決めおよび固定の手段:

方法

1. P3Gアッセイ:

1.1 PVAブロッキング緩衝液 (pH 9) を調製した (Tris塩基20 mM (Sigma)、PVA 1% w/v (PVA 80%加水分解、9~10 K MW (Sigma

10

20

30

40

50

)、Tween 20 0.05% w/v (Sigma)、およびNaCl 150 mM (Sigma)。

【0175】

1.2 2.5 mlのエタノール (Sigma) が添加された47.5 mlのPVAブロッキング緩衝液に2% w/vのスクロース (Sigma) を添加することによりPVAブロッキング溶液を調製した。

【0176】

1.3 プレスカッターを用いて白色バッカー付きニトロセルロース (Whatman) シートを35 cm × 40 mmバンドにカットし、バンドの一端を6 mmのピッチでホールパンチした (多種多様なピッチ寸法を使用しうるが、ここに示した例では6 mmのホールピッチを使用した)。

10

【0177】

1.4 バイオドットプロッターをセットして1 μl / cmのプロット量で3 mg / mlの濃度でニトロセルロースバンド上の所望の位置にP3G-オボアルブミンコンジュゲートをプロットした。

【0178】

1.5 プロット後、55 でバンドを乾燥させ、PVAブロッキング溶液を用いてブロックし、次いで65 で乾燥させ、密閉フویلパウチに乾燥剤と共に室温で一晩貯蔵した。

【0179】

20

2. hCGアッセイ:

第C. 1節の工程1. 1 ~ 1. 3 (両端を含む) に従った。

【0180】

バイオドットプロッターをセットして1 μl / cmのプロット量で3 mg / mlの濃度でニトロセルロースバンド上の所望の位置に3468抗体をプロットした。

【0181】

プロット後、55 でバンドを乾燥させ、PVAブロッキング溶液を用いてブロックし、次いで65 で乾燥させ、密閉フویلパウチに乾燥剤と共に室温で一晩貯蔵した。

【0182】

3. FSHアッセイ:

30

第C. 1節の工程1. 1 ~ 1. 3 (両端を含む) に従った。

【0183】

バイオドットプロッターをセットして1 μl / cmのプロット量で3 mg / mlの濃度でニトロセルロースバンド上の所望の位置に5948抗体をプロットした。

【0184】

プロット後、55 でバンドを乾燥させ、PVAブロッキング溶液を用いてブロックし、次いで65 で乾燥させ、密閉フویلパウチに乾燥剤と共に室温で一晩貯蔵した。

【0185】

D. 金ゾル標識結合試薬の調製およびその固定手段 (実施形態1の実施例に使用するために):

40

方法

1. P3Gアッセイ:

第A. 1節で調製した5806被覆ゾルコンジュゲートを遠心分離機により遠心沈降させ、上清を除去した。得られたペレットを攪拌し、超音波処理し、次いで、金のODが所望の値 (この実施例ではOD80) になるように金ゾルコンジュゲートスプレー緩衝液中にペレットを再構成した。以下の実施例で使用した金ゾルコンジュゲートスプレー緩衝液 (pH7.6) は、10 mM トリス (Sigma)、5% w/v スクロース (Sigma)、および0.5% (w/v) BSA\* (Proliant Biologicals, SKU#68700) を含有していた。しかしながら、同様に使用可能なスプレー緩衝液の他の例では、希釈剤溶液中にその他の物質を有していてもよく、以上の実施例に列挙さ

50

れた成分をより高いまたはより低いレベルで有していてもよい。(したがってカゼインを 0.5 % w / v に変化させた)。

【0186】

G041 Millipore ガラス繊維 (Surrewick (登録商標)) を 26 mm × 35 cm にカットして、バイオドットスプレーリグに装着した。

【0187】

バイオドットスプレーリグをセットしてガラス繊維上の所望の位置でガラス繊維に 5806 被覆ゾルコンジュゲートを含浸 / 注入した。この実施例では、ガラス繊維に各スプレーパスで 1.65  $\mu$ l / cm のプロット量で OD80 コンジュゲートの 4 回の逐次パスでスプレーした。

10

【0188】

金ゾルが注入されたガラス繊維を 55 で乾燥させ、密閉フイルパウチ内に乾燥剤と共に室温で一晩貯蔵した。

【0189】

2. hCG アッセイ:

ここでは 3299 被覆金ゾル (第 A. 2 節を参照されたい) を使用したことおよびゾルコンジュゲートの OD が OD111 であったこと以外は以上と同様に、hCG アッセイ用に金ゾルが含浸 / 注入されたガラス繊維バンドを調製した。ここに挙げられた実施例では、1.65  $\mu$ l / cm のプロット量で金コンジュゲートを 2 パスでガラス繊維にスプレーした。

20

【0190】

3. FSH アッセイ:

FSH アッセイでは、1.65  $\mu$ l / cm の用量で OD62 金コンジュゲートの 2 回の逐次パスを用いて 3299 被覆金ゾル (第 A. 2 節を参照されたい) をガラス繊維上にスプレーした。投与されたバンドを以上の実施例と同等に乾燥させて貯蔵した。

【0191】

E. アッセイストリップの構築 / 生成: 単ーストリップアッセイチップ構築物 (チップ / ストリップあたり 1 回のアッセイ) の実施例

方法

1. P3G アッセイ:

30

kinematic Universal Laminator Module アセンブリユニットを利用して P3G アッセイ要素をアッセイチップ (ストリップ) に集合させた。

【0192】

バックングラミネート (Ferrisgate) をキネマティックカードプラテン上に配置し、固定化 P3G - オボアルブミン (第 C. 1 節) を有するブロック化ニトロセルロースバンドを所定の位置でバックングラミネートに固着した。

【0193】

5806 ゾルコンジュゲートが注入されたガラス繊維 (第 D. 1 節) のバンドをニトロセルロースバンド上で 2 mm オーバーラップさせてバックングラミネートに固着した。

40

【0194】

ローラーマットによりチップのすべての要素とバックングラミネートとの良好な接触を保証した。

【0195】

次いで、バイオドットカッターを用いてバンドを 6 mm の個別チップにカットし、使用できる状態までフイルパウチ内に乾燥剤と共に貯蔵した。

【0196】

2. hCG アッセイ:

3468 が固定されたニトロセルロースバンド (第 C. 2 節) および 3299 金ゾルコンジュゲートが含浸されたガラス繊維バンド (第 D. 2 節) を使用した以外は P3G アッ

50

セイと同等に、hCGアッセイ要素を集合させた。

【0197】

次いで、バイオドットカッターを用いてバンドを6mmの個別チップにカットし、使用できる状態までフویلパウチ内に乾燥剤と共に貯蔵した。

【0198】

3.FSHアッセイ：

5948が固定されたニトロセルロースバンド（第C.3節）および3299金ゾルコンジュゲートが含浸されたガラス繊維バンド（第D.3節）を使用した以外はP3Gアッセイと同等に、FSHアッセイ要素を集合させた。次いで、バイオドットカッターを用いてバンドを6mmの個別チップにカットし、使用できる状態までフویلパウチ内に乾燥剤と共に貯蔵した。

【0199】

実施例9

この実施例では、本発明に係るデバイスに有用な例示的なアルゴリズムに関するさらに詳しい情報を提供する。

【0200】

本発明に係るアッセイデバイスは、妊娠に対する特異度を維持しつつ、従来の自己使用妊娠検査と比較して予想月経日前により高い妊娠検出率を提供する。それは、hCGに対してより高い感度を有するだけでなく、非常に低いhCG濃度で妊娠に対する特異度を維持するために、FSHおよび1種以上のプロゲステロン代謝物も測定することにより、これを達成する。閉経周辺期および閉経期の女性では上昇したレベルのhCGが見られることもあるため、過度に高感度のhCG検査では偽陽性の結果を生じる可能性がある。FSHは、高レベルが閉経周辺期および閉経後の状態に関連付けられるため、妊娠を除外するものとして作用し、一方、プロゲステロン代謝物（たとえば、P3G）は、高いレベルが妊娠中で見られるため、妊娠を確定するものとして作用する。

【0201】

この概念の単純な一実施形態では、デバイスは、以下の表2にまとめられているように機能しうる。この実施例では、アッセイされるプロゲステロン代謝物はP3Gである。

【0202】

【表2】

表2

hCG アッセイ	FSH アッセイ	P3G アッセイ	アッセイ
hCG ≥ 上限 hCG 閾値	N/A	N/A	妊娠している
hCG ≥ 下限 hCG 閾値および < 上限 hCG 閾値	FSH < FSH 閾値	P3G ≥ P3G 閾値	妊娠している
		P3G < P3G 閾値	妊娠していない*
	FSH ≥ FSH 閾値	P3G ≥ P3G 閾値	妊娠していない*
		P3G < P3G 閾値	妊娠していない
hCG < 下限 hCG 閾値	N/A	N/A	妊娠していない

\* FSH アッセイ結果とプロゲステロン代謝物アッセイ結果との相反を生じる事例の可能性は非常に低いと予想される。かかる状況では、デバイスは、典型的には、「妊娠していない」との結果を宣言するようにプログラムされ、かつ/またはユーザーは、後で再検査するように指示されうる。

【0203】



検査はすべて、アッセイ検査として特定され、検出された濃度により表される。発色可視ラインの強度の検査では、ラインの強度がアナライト濃度の増加に伴って低減する競合アッセイに対しては、論理を反転させなければならない。

【0204】

より徹底したアルゴリズムを用いることにより、おそらく改善された性能を達成しうるであろう。F S Hレベルまたはプロゲステロン代謝物レベルの重要性（加重）は、h C Gレベルに依存する可能性があり、かつ／または使用されるF S Hおよびプロゲステロン代謝物の検査に用いられる閾値は、h C Gレベルに依存しうる。より複雑な場合、F S H閾値はh C G濃度に依存する可能性があり、プロゲステロン代謝物閾値はF S Hレベルに依存する可能性がある（その逆も同様である）。

10

【0205】

アルゴリズムは、図6に概略的に表される。図を参照して、アルゴリズム／論理ツリーは、2つのラテラルフロー検査ストリップを含む本発明に係る検査デバイスの一実施形態に関する。第1のストリップは、h C Gのアッセイを行うために使用され、第2のストリップは、F S HのアッセイおよびP 3 Gのアッセイを行うために使用される。

【0206】

論理ツリーでは、第1のアッセイ結果リーダーは、h C Gアッセイ結果を調べて、アッセイシグナルを2.5 m I U / m lのh C G濃度に対応するあらかじめ決められたシグナル値と比較する。アッセイ結果が2.5 m I U / m lの閾値を下回る場合、リーダーは検査被験者が「妊娠していない」とただちに示しうる（図中「<」記号に従う）。[しかしながら、3種のアナライトアッセイのすべての結果が決定されるまで、全体的アッセイのアウトカム（すなわち「妊娠している」または「妊娠していない」）は、必ずしもユーザーに示されなくてもよい]。他の選択肢として、決定された尿サンプル中h C G濃度が2.5 m I U / m lの閾値以上である場合、リーダーはF S Hアッセイ結果（第2のアッセイストリップ上の第1の検査ラインまたは検出ゾーン）のチェックに進む。2.5 m I U / m lを上回るh C G濃度は非妊娠関連源に起因する可能性があるため、アッセイの全般的アウトカムの「早期」決定は、h C Gアッセイ結果のみに基づいて行うことはできないであろう。

20

【0207】

F S Hアッセイは、10 m I U / m lの閾値を有する。サンプル中の決定されたF S H濃度が10 m I U / m lの閾値以上である場合、アッセイデバイス／リーダーは「妊娠していない」として検査の結果を宣言する。反対に、サンプル中のF S H濃度が10 m I U / m lの閾値を下回る場合、アッセイデバイス／リーダーは継続してP 3 Gアッセイ結果を調べることになる。

30

【0208】

P 3 Gアッセイ結果は、第2のラテラルフローアッセイストリップ上の第2の検査ラインまたは検出ゾーンから読み取られる。P 3 Gアッセイからサンプル中のP 3 G濃度が4  $\mu$  g / m lを下回ることが示唆された場合、被験者は「妊娠している」と宣言される。

【0209】

特定の実施形態に対して選択される精密なシグナル値または閾値濃度は、少なくとも部分的には、利用されるアッセイの特異的特性（たとえば、試薬、フローマトリックス、コンジュゲート濃度など）に依存するであろうから、以上に規定された閾値は、他の実施形態ではわずかに異なることもあるが、相対量は一般的には同一であろうことは、当業者には明らかであろう。

40

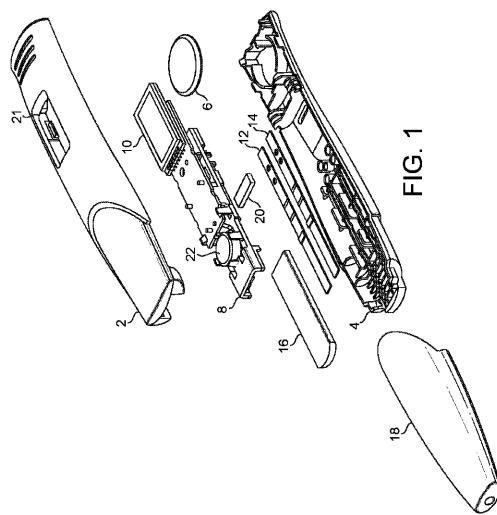
【0210】

さらに、図には、h C G、F S H、およびP 3 Gのアッセイ結果を逐次的に検査またはチェックするアッセイデバイス／読み取り手段が示されている。それぞれのアッセイ結果が任意の順序でまたは実質的に同時に検査されうることは明らかであろう。さらに、アナライトの濃度が関連閾値濃度をはるかに上回る（または下回る、適宜）のであれば、3種のアナライトアッセイすべての結果を知ることが必ずしも必要ではなく、1または2つのア

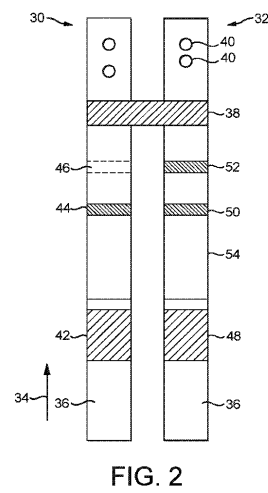
50

ッセイ結果の「早期」決定により、全体的アッセイ結果のアウトカム（すなわち「妊娠している」または「妊娠していない」）を決定しうる。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

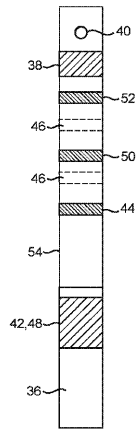


FIG. 3

【図 4】

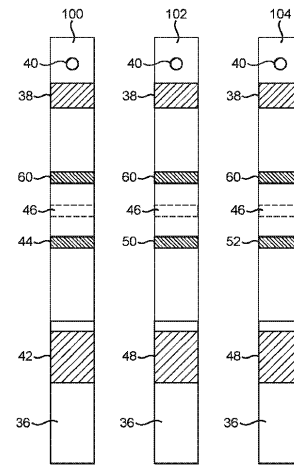


FIG. 4

【図 5】

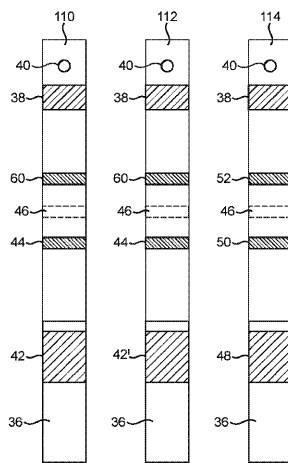


FIG. 5

【図 6】

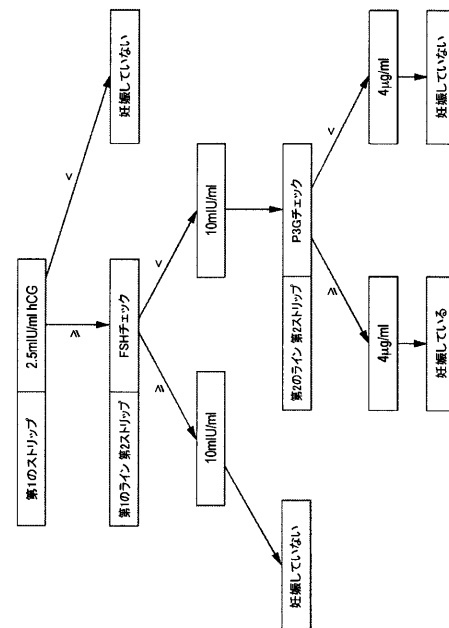


図 6

---

フロントページの続き

(72)発明者 イーペン, サジ  
イギリス、エム・ケイ・４４ ３・ユー・ピィ ベッドフォードシャー、ベッドフォード、プライ  
オリティー・ビジネス・パーク、エス・ピー・ディー・ディベロップメント・カンパニー・リミテ  
ッド内

## 合議体

審判長 伊藤 昌哉

審判官 渡戸 正義

審判官 福島 浩司

(56)参考文献 米国特許出願公開第２０１３／０２１７１３６（ＵＳ，Ａ１）  
特開２０１３－０９２５２９（ＪＰ，Ａ）  
特表２０１２－５０８８９２（ＪＰ，Ａ）  
特許第３６４０９７０（ＪＰ，Ｂ２）  
特表２００２－５１０７９９（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)

G01N33/48-33/98

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAplus, BIOSIS, EMBASE, MEDLINE (STN)