(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4619372号
(P4619372)
(45)発行日　平成23年1月26日(2011.1.26)　(24)登録日　平成22年11月5日(2010.11.5)

(51)Int.Cl.　F I
GO1N 33/543 (2006.01)　GO1N 33/543 521

請求項の数 2　外国語出願　(全 15 頁)

(21)出願番号　特願2007-5044(P2007-5044)
(22)出願日　平成19年1月12日(2007.1.12)
(65)公開番号　特開2007-187664(P2007-187664A)
(43)公開日　平成19年7月26日(2007.7.26)
審査請求日　平成19年3月2日(2007.3.2)
(31)優先権主張番号　06000791.1
(32)優先日　平成18年1月14日(2006.1.14)
(33)優先権主張国　欧州特許庁(EP)

(73)特許権者　591003013
エフ．ホフマン－ラ　ロシュ　アーゲー
F．　HOFFMANN－LA　ROCHE　AKTIENGESELLSCHAFT
スイス・シーエイチ－４０７０バーゼル・グレンツアーヘルストラツセ１２４
(74)代理人　100091096
弁理士　平木　祐輔
(74)代理人　100096183
弁理士　石井　貞次
(74)代理人　100118773
弁理士　藤田　節

最終頁に続く

(54)【発明の名称】改良された対照区画を有する免疫学的試験素子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
液体サンプルに由来するアナライト測定用の免疫学的サンドイッチ試験の実施のための試験素子であって、
アナライト結合パートナーと標識とのコンジュゲートを保持する試薬区画であって、該標識は、視覚的、光学的もしくは電気化学的手段により直接的または間接的に検出可能であり、該コンジュゲートは液体サンプルによって溶解可能であるもの；
アナライトまたはアナライトを含有する複合体に対する解離不可能に固定化された結合パートナーを保持する検出区画；および
アナライト結合パートナーと標識とのコンジュゲートに対する解離不可能に固定化された結合パートナーを保持する対照区画
を有し、該対照区画が、アナライトまたはアナライトを含有する複合体に対する１以上の解離不可能に固定化された結合パートナーをさらに保持することを特徴とする、上記試験素子。
【請求項２】
液体サンプル由来のアナライトを検出するための方法であって、
請求項１に記載の試験素子にサンプルを付加し、
該サンプル中に存在すれば、アナライトを標識化コンジュゲートと反応させてアナライト－コンジュゲート複合体を形成させ、
検出区画中で、該アナライト－コンジュゲート複合体を、アナライトまたはアナライ

トを含有する複合体に対する解離不可能に固定化された結合パートナーに結合させ、
対照区画中で、アナライトと反応していない標識化コンジュゲートを、コンジュゲートに対する解離不可能に固定化された結合パートナーと結合させ、かつ
対照区画中で、アナライト－コンジュゲート複合体を、アナライトまたはアナライトを含有する複合体に対する解離不可能に固定化された結合パートナーに結合させる、上記方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、好ましくは免疫クロマトグラフ試験デバイス（テストストリップ）または免疫学的（微小流体もしくはキャピラリーギャップ）試験素子の形態で、新規な対照区画を有する、液体サンプルに由来するアナライト測定用の免疫学的サンドイッチ試験の実施のための試験素子に関する。

【背景技術】

【０００２】

血液、血清、血漿、尿、唾液、汗等の液体サンプルを分析するための診断アッセイは、多くの場合、試験の適切な実施およびその機能性を保証するべき対照機構を含む。

【０００３】

自動化された検査機器で診断試験を実行する場合、その機器自体が通常、試験が適切に実施されることを保証またはモニターするので、試験の内部に対照機構があることはかなり稀である。自動化された検査機器の場合、ピペッティング量またはインキュベーション時間および他のパラメータは、例えば、通常、自動分析装置によって自動的にモニターされる。（試薬ならびに機器に関する）試験の機能性は、通常、一連の測定内で追加的に対照サンプルを測定することによって保証される。

【０００４】

治療現場（point-of-care：ＰｏＣ）では、すなわち、専門化された検査室外での患者サンプルの測定の場合には、多くの場合、単回測定が実施される。このために使用される試験素子は通常、サンプルに再溶解されて実際の分析のために再活性化される乾燥試薬を含む。免疫クロマトグラフテストストリップまたは免疫学的キャピラリーギャップ試験素子のような免疫学的試験素子は、ＰｏＣ環境において、特に免疫学的アッセイの分野において有用であることが証明されている。免疫学的試験素子は、通常、視覚的にまたは測定機器（読み取り機）を用いて評価される、光学的に検出可能な反応に基づく場合が多い。湿式化学試験の場合には、自動化された検査機器によって実行されるいくつかの機能は試験の実施者が担当しなければならないため、試験の実施者が特別な責任を持つ（例えば、正確なサンプル量のピペッティングまたはアッセイ時間の遵守）。

【０００５】

しかし、ＰｏＣ環境において試験を実施する人々は、通常、特別に訓練を受けた従業者ではない。ＰｏＣ現場における試験は多くの場合、医師、看護師、医師の助手、薬剤師または患者自身によって実施される。一方、専門化された検査室（例えば、病院の中央検査室、大きな検査室など）では、アッセイは特別に訓練を受けた技術補佐員（例えばＭＴＡなど）によって実施される。

【０００６】

従って、これらの特別な「分散した」すなわちＰｏＣでの使用のために、試験の供給業者は、試験を実施する際の主要な操作ミス（例えば用量不足など）および/または試験の機能不良に対処し、使用者に無効な試験結果を気付かせる、いわゆる搭載型対照（on-board-control）を開発した。

【０００７】

いわゆるサンドイッチ法によって機能する免疫学的試験素子の特別な場合、「搭載型対照（on-board control）」は通常、対照ラインまたは対照区画（両用語は下記において同義的に用いられる）の形態で提供される。

【０００８】
これらの対照ラインまたは対照区画は、理想的な場合、十分なサンプル量が正しい試験性能のために使用されたこと、試験素子中に含浸されたかまたは乾燥された免疫化学的試薬がまだ移動可能な形態（すなわち試験素子中を移動できる形態）で存在したこと、および機能のために重要な試薬の免疫学的活性がまだ一定の範囲内にあったことを、使用者が確認することを保証する役割を果たす。その他に、対照ラインまたは対照区画は、不適切な試験性能または試験素子の使用不適格性の認識を可能にし、誤った試験結果が得られるのを防止する。
【０００９】
一般的な試験構造は以下の通りである。すなわち、
コンジュゲート区画（または試薬区画）は通常、試験素子中または試験素子上のサンプル付加区画と検出区画との間に位置する。サンプル付加区画およびコンジュゲート区画は同一とすることもできる。コンジュゲート区画はアナライトに対する免疫学的結合パートナー（一般的に抗体またはそのフラグメント）を保持し、これは再溶解および再分離することができ、従って、サンプル液によって移動させることができる。その結合パートナーは通常、シグナル生成酵素またはいわゆる直接標識（例えば、金または着色ラテックス粒子、蛍光標識など）に結合されている（いわゆるコンジュゲート）。
【００１０】
検出区画は、アナライト（またはアナライトから形成された複合体）に対する、不可逆的に固定化された第二の独立の結合パートナーを含む。
【００１１】
アナライトがサンプル中に存在する場合、それは従って、いわゆるサンドイッチ（すなわち固定化された結合パートナー、アナライトおよびシグナル生成結合パートナーの免疫複合体）の形態で検出区画に蓄積し、場合によりさらなる試薬を添加した後、可視化される。
【００１２】
（いわゆる間接的サンドイッチ法の代表例としての）ストレプトアビジン－ビオチン法の場合、第二の結合パートナーもまた、移動可能なビオチンコンジュゲートの形態でコンジュゲート区画に位置する。検出区画は不可逆的に固定化されたストレプトアビジンを保持する。
【００１３】
結合パートナーおよび標識またはビオチンの過剰なコンジュゲートは、サンプルとともに検出区画の「下流」に位置する廃液部（過剰なサンプルを吸収する役割を果たす、吸引区画）に運ばれる。
【００１４】
対照区画は通常、検出区画と廃液部との間に位置する。
【００１５】
下記の対照区画の機能原理が当業者に公知であり、それらの利点および欠点とともに記載される。
【００１６】
１．アナライト対照区画
検出区画と廃液部との間に位置する対照区画は、不可逆的に固定化されたアナライト（またはアナライト類似体）を保持する。過剰な結合パートナー－標識コンジュゲートは固定化されたアナライトまたはアナライト類似体に結合し、それにより対照ラインにおいて検出可能なシグナルをもたらす。
【００１７】
この機構としては現在は多くの場合ポリハプテン対照区画が適用されているため、その利点および欠点を第２項においてより詳細に記載する。
【００１８】
アナライト対照ラインの特有の欠点は、アナライト、例えば十分な量の抗原を生成する

ことがしばしば困難であり面倒であるという点である。
【００１９】
２．ポリハプテン対照区画
検出区画と廃液部との間に位置する対照区画は、コンジュゲート抗体に対するポリハプテンを保持する。
【００２０】
利点：試薬が移動できたことを保証し、正しいサンプル量に対する対照を提供することに加えて、対照区画でのシグナルの形成はまた、アナライト結合パートナーと標識とのコンジュゲートの免疫学的活性を保証する。
【００２１】
欠点：サンプル中のアナライト濃度が高い場合、抗原と結合する結合パートナー－標識コンジュゲートの能力が、対照区画に到達する前に既に飽和され、対照区画のポリハプテンはもはやコンジュゲートを捕捉できない。その結果、対照機構は機能しない。
【００２２】
この場合、使用者は検出区画の試験結果が無効であると誤解せざるを得ない。
【００２３】
これは、検査のカットオフ値（すなわち測定範囲の下限）と上限濃度との間が広い濃度範囲に渡る場合、特によく見られる欠点である。これは、例えば妊娠検査の場合に当てはまり、そこでは、尿中のホルモンｈＣＧが約１０～２０ｍＩＵ／ｍｌのカットオフで検出される一方、妊娠の最初の３ヶ月の終わりには最大５００，０００ｍＩＵ／ｍｌまでのｈＣＧ値も観察される。このような高いアナライト濃度は対照区画において陰性の結果をもたらし、検出区画において誤って無効な試験結果のように見せる。
【００２４】
３．抗ＩｇＧ対照区画（間接的な対照区画として）
対照区画は抗体－標識コンジュゲートに対する抗体を保持する。この対照区画の原理は妊娠テストストリップにおいて非常に広く普及している。
【００２５】
例：アナライト特異的な標識マウス抗体が使用される場合、対照区画は例えばマウス抗体に対するポリクローナル抗体（例えばＰＡＢ＜マウスＦｃγ＞Ｓ－ＩｇＧ）を保持する。
【００２６】
利点：対照ラインの形成はサンプル中の高いアナライト濃度による影響を受けない。
【００２７】
欠点：コンジュゲートの正しい免疫学的活性は、この機構によっては検出されない。これは最近、試験素子の新たな認可に関して、例えば合衆国のＦＤＡ（食品医薬品局）などの認可機関により議論されている。別の欠点は、血液を用いるアッセイにおいて干渉除去抗体が使用される場合、対照区画におけるシグナルの強度が著しく減少することである。干渉除去抗体は通常、試験において、アナライト特異的コンジュゲート抗体と比較して１０～５００倍過剰に使用される。同一種の非コンジュゲート抗体が通常干渉除去抗体として使用されるため、それもまた対照ラインに捕捉される。
【００２８】
アナライトがサンプル中に存在しない場合、コンジュゲートの大部分は既に検出区画に結合し、残り少ない量のコンジュゲートは干渉除去抗体の存在下で対照区画の完全な機能不全をしばしば引き起こすという事実によって、これはさらに問題となる。
【００２９】
４．干渉除去抗体によって影響されない間接的対照ライン
対照ラインは、コンジュゲートの「独立した標識」に対する結合パートナーを保持する。
【００３０】
例：コンジュゲートのアナライト特異的結合パートナーはさらにジゴキシゲニン化され、対照ラインで抗ジゴキシゲニン抗体によって捕捉される（例えばＵＳ－Ａ ２００２－０

０５５１２６参照）。
【００３１】
利点：対照ラインの結合能力は高いアナライト濃度によって減少しない。さらに対照ラインの結合能力は干渉除去抗体の存在によって減少しない。
【００３２】
欠点：コンジュゲートの抗体をさらに特別に修飾しなければならず、さらなる労力、コストおよび時間がかかる。さらに、選択された標識が多量に内在性に存在する場合、対照ラインはまた機能することができない。
【特許文献１】ＵＳ－Ａ ２００２－００５５１２６
【発明の開示】
【発明が解決しようとする課題】
【００３３】
記載された先行技術から、改良された対照ライン機構の必要性があることは明白である。
【００３４】
本発明の目的は先行技術の欠点を解消することである。特に、試験製剤の成分に関係なく（特にいわゆる干渉除去抗体の使用に関して）、サンプルの内在性成分によって影響を受けることなく、アナライトの広い濃度範囲にわたって確実に機能する免疫学的試験素子の対照機構を提供することが、本発明の目的である。
【００３５】
この目的は本発明の対象によって達成される。
【課題を解決するための手段】
【００３６】
本発明は、請求項１に記載の試験素子および請求項１０に記載の方法に関する。本発明の好ましい実施形態は、従属請求項の対象である。
【００３７】
本発明は、第一に、新規な対照区画を除いて多くの変形形態で先行技術から公知の原理に基づくような、液体サンプルに由来するアナライト測定用の免疫学的サンドイッチ試験の実施のための試験素子に関する。例えば、試験素子は基本的に、フリース、メンブレン、紙等の吸収材から構成することができ（例えばＵＳ ４，８６１，７１１、ＵＳ－Ａ ２００２－００５５１２６、ＷＯ ２００５／１１１６０７参照）、または、液体輸送は微小流体構造（部分的には、吸引、加圧、遠心分離などの外力の作用によっても駆動される）もしくはキャピラリーチャネル（例えばＵＳ ６，１５６，２７０参照）によって行うことができる。
【００３８】
試験素子は、アナライト結合パートナー（アナライトが抗原もしくはハプテンである場合、通常、アナライトに結合できる抗体または免疫学的に活性な抗体フラグメント、あるいは、アナライトが抗体である場合、抗原またはハプテン）と、視覚的、光学的もしくは電気化学的手段により直接的または間接的に検出可能な標識とのコンジュゲートを保持する試薬区画を有し、そこでコンジュゲートは液体サンプルによって溶解可能である。適切な標識は、例えば、酵素、蛍光標識、電気化学的活性基、あるいは、金属もしくは炭素標識または着色ラテックスなどのいわゆる直接標識である。この区画はまたコンジュゲート区画とも呼ばれる。
【００３９】
コンジュゲート区画はサンプル付加区画として機能することができ、または別個のサンプル付加区画をコンジュゲート区画の前もしくは後に設けることができる。コンジュゲート区画は、上述のアナライト結合パートナーと標識とのコンジュゲートに加えて、第二のアナライト結合パートナー（同様に通常、アナライトに結合できる抗体または抗体の免疫学的に活性なフラグメントである）とそれ自体結合ペアのパートナーであるタグ物質とのさらなるコンジュゲートをも保持し得る。タグ物質は例えばビオチンまたはジゴキシゲニ

ンとすることができ、標識化コンジュゲート、アナライトおよびタグ付きコンジュゲートから成るサンドイッチ複合体を検出区画および/または対照区画に固定化するために使用することができる。

【００４０】

試験素子はさらに、アナライトまたはアナライトを含有する複合体に対する解離不可能に固定化された結合パートナー（すなわち液体サンプルによって解離され得ないもの）を保持する検出区画を有する。固定化された結合パートナーは同様に通常、アナライトに結合できる抗体もしくは抗体の免疫学的に活性なフラグメントまたは、抗原もしくは（ポリ）ハプテンである。例えばアナライト結合パートナーとともにビオチンまたはジゴキシゲニンを有する上述のタグ付きコンジュゲートの１つが使用される場合、固定化された結合パートナーはまたストレプトアビジンまたはポリストレプトアビジンおよび抗ジゴキシゲニン抗体であり得る。

【００４１】

最後に、対照区画は試験素子中または試験素子上にあり、それは、例えば、アナライト類似体として機能し、標識化コンジュゲートに由来するアナライト結合パートナーと結合することができる固定化されたポリハプテンの形態で、アナライト結合パートナーと標識とのコンジュゲートに対する解離不可能に固定化された結合パートナーを保持する。対照区画がアナライトまたはアナライトを含有する複合体に対する１以上の解離不可能に固定化された結合パートナーをさらに保持することが、本発明にとって重要である。後者の結合パートナーは、検出区画の固定化された結合パートナーに関して上述された、同一の化合物から選択され得る。検出区画および対照区画におけるこれらの固定化された結合パートナーは、通常同一である。しかし、それらはまた、例えば、検出区画ではビオチンタグ付きコンジュゲートに対する結合パートナー（従って、例えばポリストレプトアビジン）が固定化され、対照区画ではポリハプテンに加えて抗アナライト抗体が固定化されるというように、異なっていてもよい。後者の場合、対照区画に追加的に固定化される抗アナライト抗体は、（別の）独立のエピトープに対するものであるべきであり、従ってコンジュゲート抗体（ビオチンタグ付きコンジュゲートおよび標識化コンジュゲート）によって認識されないものである。

【００４２】

本発明の別の対象は、本発明の試験素子を用いて液体サンプルに由来するアナライトを検出するための方法である。サンプル（それ自体が液体であり得、または、もしそれ自体が液体でない場合は、例えばバッファーのような液体に溶解もしくは懸濁され、使用され得る）は試験素子に付加され、それが試薬区画（コンジュゲート区画）に到達する際、それはそこに存在する試薬を溶解し、移動可能な形態にする。アナライトは（サンプル中に存在するならば）コンジュゲート区画の標識化コンジュゲートと接触して反応し、アナライト－コンジュゲート複合体を形成する。サンプルと試薬との混合物はその後検出区画に到達し、そこでアナライト－コンジュゲート複合体の少なくとも一部は、アナライトまたはアナライトを含有する複合体に対する解離不可能に固定化された結合パートナーに結合する。アナライトと反応しなかった標識化コンジュゲートは、対照区画においてコンジュゲートに対する解離不可能に固定化された結合パートナーに結合する。加えて、検出区画において捕捉されなかったアナライト－コンジュゲート複合体の一部は、対照区画においてアナライトまたはアナライトを含有する複合体に対する解離不可能に固定化された結合パートナーに結合する。

【発明を実施するための最良の形態】

【００４３】

本発明は下記の実施例および図面に基づいてさらに説明される。

【００４４】

図１に示されたテストストリップは、本発明の対照ラインを除く構造および機能に関して、Ｒｏｃｈｅ Ｃａｒｄｉａｃ Ｔ Ｑｕａｎｔｉｔａｔｉｖｅ Ｔｒｏｐｏｎｉｎ Ｔ ｔｅｓｔ ｓｔｒｉｐ（Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany）に相当する。他のア

ナライト測定用の類似のテストストリップもまた取得可能である（例えば、対応するＮＴ－ｐｒｏＢＮＰテストストリップを記載するＵＳ－２００５－０１１８６６２－Ａ１参照）。

【００４５】

以下のものがプラスチック支持材１上に連続的に位置する。すなわち、ｉ）そこから遊離できる含浸された抗アナライト抗体－金コンジュゲートを保持するフリース材５および、そこから遊離できる含浸された抗アナライト抗体－ビオチンコンジュゲートを保持するフリース材６を有する、サンプル付加区画Ａ、ｉｉ）赤血球分離マトリックス４としてガラス繊維フリースを有し、全血から赤血球を分離して実質的に無色の血漿を生じることができる、赤血球分離区画Ｂ、ｉｉｉ）ニトロセルロース製のクロマトグラフィーメンブレン３を有し、ポリストレプトアビジン検出ライン７および対照ライン８がそこに固定化される、検出区画Ｃ、ならびにｉｖ）クロマトグラフィーメンブレン３を通るサンプルの移動を促進し、同時に移動したサンプルを廃液として受け入れるために使用される吸引フリースを有する、吸引区画Ｄである。

【００４６】

フリース５の抗アナライト抗体－金コンジュゲート（また標識化コンジュゲートとも呼ばれる）およびフリース６の抗アナライト抗体－ビオチンコンジュゲート（またタグ付きコンジュゲートとも呼ばれる）は、アナライトを含むサンドイッチを形成するために機能し、メンブレン３に固定化されたポリストレプトアビジンは検出ライン７を形成するために使用される。

【００４７】

この場合の本発明の対照ライン８は、抗アナライト抗体－金コンジュゲートに対する解離不可能に固定化された結合パートナー（すなわち抗体特異的ポリハプテン（またはアナライト））に加えて、アナライトを含有する複合体に対する解離不可能に固定化された結合パートナー（すなわち、この場合ではポリストレプトアビジン）をさらに保持する。

【００４８】

結果として、対照ライン８は、低～中程度のアナライト濃度では、主としてポリハプテン/アナライトとコンジュゲートの結合によって、直接的かつ免疫特異的に標識化コンジュゲートを捕捉する。この場合、少量の形成されたサンドイッチは既に「上流の」検出ライン７によってほぼ定量的に捕捉されるので、対照ライン８のストレプトアビジン－ビオチンサンドイッチ部分はまだ機能しない。

【００４９】

高いアナライト濃度では、コンジュゲートがサンプルに由来するアナライトによって既に飽和されているため、対照ライン８のポリハプテンコンジュゲート結合機構は機能しなくなる。しかしこの場合、（標識化コンジュゲート、アナライトおよびタグ付きコンジュゲートの）サンドイッチ複合体の形態で存在するコンジュゲートは、対照ライン８のストレプトアビジン－ビオチン機構によって捕捉される。このことが起こるのは、速度論的理由から検出ライン７はすべてのサンドイッチ複合体を捕捉するわけではなく、その一部はクロマトグラフ「下流」で対照ライン８に結合するためである。

【００５０】

非常に高いアナライト濃度では、検出ライン７のサンドイッチ型では、いわゆる高濃度でのフック効果が起こり得る。この理由は以下のように説明することができる。すなわち、限られた量のアナライト（試験素子に存在する抗体の量に対する抗原不足）では、抗原分子は独立のエピトープを介して両結合パートナー（標識化抗体およびタグ付き抗体）と同時に結合する。従って、所望のサンドイッチ複合体が形成され、アナライトは検出区画７への固定化を保証する結合パートナー（この場合、ストレプトアビジンと結合できるビオチン化抗体）ならびに、アナライトの検出能を保証する標識化結合パートナー（この場合、金標識化抗体）と結合する。（標識化コンジュゲートおよびタグ付きコンジュゲートの量に対して）高いアナライト過剰では、両サンドイッチパートナー（すなわち、一方の標識化コンジュゲートおよび他方のタグ付きコンジュゲート）は、それぞれ２つの独立に

存在するアナライト分子に結合するため、アナライトはタグ付きコンジュゲートによって検出区画７に結合するが、それは標識化コンジュゲートの欠如のため検出できない。

【００５１】

高濃度でのフック効果が検出ライン７で起こる場合、その結果、これは高いアナライト濃度にも関わらずアナライト陰性の試験結果に見える。アナライト非依存性の（例えば固定化されたＰＡＢ＜マウスＦｃγ＞Ｓ－ＩｇＧ抗体に基づく）対照ライン８は、この場合、試験が正しく機能していることを示唆し、最終的に偽陰性の試験解釈を導く。この場合、対照ライン８は検出ライン７と同様の高濃度でのフック効果を受け、同時に機能しなくなることによって、試験結果は（少なくとも偽陰性ではなく）無効として示されることが望ましい。

【００５２】

まさにこれは新規な対照ライン８に当てはまり、別の利点は、サンプル中の高いアナライト濃度のため、自由な標識化コンジュゲートがほとんどないことである。すなわち、対照区画に到達した時アナライトに結合する標識化コンジュゲートがなく、標識化コンジュゲートに対する解離不可能に固定化された結合パートナー（この場合ポリハプテン）に基づく対照ライン８の部分がもはや、サンプル－試薬混合物中に結合パートナーを見いだせない。このため、対照ライン８の、アナライトまたはアナライトを含有する複合体に対する解離不可能に固定化された結合パートナーに基づく部分（この場合ストレプトアビジン－ビオチン機構）だけが、いまだ有効である。サンドイッチ形成が前記の高濃度でのフック効果によって妨げられる場合、検出ライン７に加えて対照ライン８もまた機能しない。その結果、試験結果は使用者に無効と認識されることができ、「陰性」と誤解されない。

【００５３】

本発明は、上記に詳述されたストレプトアビジン－ビオチン結合を用いた「間接的サンドイッチ法」に適用できるだけではない。「直接的サンドイッチ法」への一般化が可能である。この場合には、サンドイッチパートナーは検出ライン区画に不可逆的に固定化される。従って、対照ラインは、（コンジュゲート抗体に対する）ポリハプテンに加えて、検出ラインに固定化されるサンドイッチ抗体を含む。この場合、対照区画に固定化される結合パートナーとしてポリハプテンの代わりに抗原を使用することは、抗原とともに対照ライン区画に適用されるサンドイッチ抗体が既に抗原－抗体複合体を形成し、従って少なくとも部分的に新規な対照ラインの両機構の一部を「中和する」ので、好ましくないことに注意すべきである。従って、この「合成エピトープ」が移動可能なコンジュゲート抗体だけを標的とし、第二のサンドイッチ抗体を標的としないため、ポリハプテンを使用するのが好ましい。このようにして、それは機能することができる。

【実施例１】

【００５４】

本発明は、全血に由来する心筋トロポニンＩ（ｃＴｎＩまたはＴｎＩと略される）検出用のテストストリップに基づき、実施例として下記に記載される。

【００５５】

ａ）分析用素子

図１に従ったテストストリップが製造される。

【００５６】

５mm幅で７８mmの長さのポリエステル製支持フォイル１（Imperial Chemistry Industries, GB のＭｅｌｉｎｅｘ，３５０μm厚）上に、ホットメルト接着剤（Huls AG, Germany のＤｙｎａｐｏｌ Ｓ １３５８）を用いて、以下のものをそれぞれ互いに隣とわずかに重複させて接着した。

【００５７】

・液体回収区画（廃液部）２（吸引区画Ｄ）として、ガラス繊維（直径０．４９～０．５８μm、長さ１０００μm）が１００およびポリビニルアルコール繊維（KurarayのＫｕｒａｌｏｎ ＶＰＢ １０５－２）が５の割合から成る、約１８０ｇ／ｍ^{2}の単位面積重量を有する、１．５mm厚で７mmの長さのフリース。

【００５８】
・検出区画および対照区画（検出区画Ｃ）を含むクロマトグラフィーメンブレン３として、１．５ｃｍの長さのニトロセルロースメンブレン（Sartorius, Germanyのｔｙｐｅ ＣＮ １１３０１）。
【００５９】
・血液分離用フリース４（赤血球分離区画Ｂ）として、ガラス繊維が１００およびポリビニルアルコール繊維が１０の割合（両繊維は液体回収区画と同様）から成る、約１８０ｇ／ｍ^{2}の単位面積重量を有する、１．５ｍｍ厚で１３ｍｍの長さのフリース。
【００６０】
・特異的結合ペアの標識化パートナーを保持する区画として金コンジュゲートを保持し（金コンジュゲートフリース５）、特異的結合ペアのタグ付きパートナーを保持するさらなる区画としてビオチンコンジュゲートを保持している（ビオチンコンジュゲートフリース６）、ポリエステル繊維が８０、レーヨンステープルが２０およびポリビニルアルコール繊維が２０の割合から成る、約０．３２ｍｍの厚さと約８０ｇ／ｍ^{2}の単位面積重量を有する、２枚の１８ｍｍまたは２０ｍｍの長さのフリース（欧州特許文献ＥＰ ０ ３２６ １３５の実施例１に記載される製品）。
【００６１】
計量描線（line metering）によって、前述された検出区画３のニトロセルロースメンブレン上にストレプトアビジン水溶液（４．５ｍｇ／ｍｌ）を塗布する。このための用量は、約０．４ｍｍ幅のラインを形成するよう選択される（計測される量は ０．１ｍｌ／分、ウェブ速度は３ｍ／分）。このライン７はアナライトを検出し測定するために機能し、テストストリップ当たり約０．８μｇのストレプトアビジンを含有する。
【００６２】
１ｍｇ／ｍｌのＴｎＩポリハプテン水溶液（ポリハプテンの調製については下記参照）、１ｍｇ／ｍｌのストレプトアビジン溶液、または（それぞれ１ｍｇ／ｍｌを含有する）ポリハプテン溶液およびストレプトアビジン溶液の１：１混合物を、同一の計測条件下でストレプトアビジンラインの４ｍｍ下流の間隔で塗布する。これらのライン８はテストストリップの機能を確認するために使用され、テストストリップ当たり約０．１５μｇのポリハプテンおよび／または０．１５μｇのストレプトアビジンを含有する。
【００６３】
その後、メンブレンを風乾する。
【００６４】
ポリハプテンは下記のように調製する。すなわち、心筋トロポニンＩ（FEBS, Vol. 270 ; No. 1, 2; page 57-61: Molecular cloning of human cardiac troponin I using polymerase chain reaction参照）のアミノ酸（ａａ）２７－４３を含むエピトープに相当するアミノ酸配列を有するペプチドは、当業者にとって公知の古典的なペプチド固相合成によって調製される。β－アラニン、ε－アミノカプロン酸、β－アラニンおよびシステインから成るペプチド残基がキャリアタンパク質への結合のためのＮ末端スペーサーとして使用されるため、該ペプチドは１７１６．１３の分子量を有する。
【００６５】
その後、ペプチドを、ＭＨ（ＢＰＬＡ）／ＳＨペプチド結合によって、１０：１（ペプチド：キャリアタンパク質）のモル比で、キャリアタンパク質としてのウシ血清アルブミンに結合させる。
【００６６】
その後、ポリハプテンを４０ｍｇ／ｍｌトレハロースの存在下で凍結乾燥し、計量描線（line metering）のために脱塩水に溶解させる。
【００６７】
ポリハプテンは下記においてＰＨ，ＴｎＩ（２７－４３）［ＵＺＵ－Ｃｙｓ－４３］アミドと呼ばれる。
【００６８】

金コンジュゲートフリース５は下記のように作製する。すなわち、約４０ｎｍの平均粒径を有する金ゾルを、Ｆｒｅｎｓ（Frens, G., Preparation of gold dispersions varying particle size: controlled nucleation for the regulation of the particle size in monodisperse gold suspensions in Nature: Physical Science 241 (1973), 20-22）の方法に従って、クエン酸三ナトリウムを含む０．０１重量％の四塩化金酸溶液を煮沸しながら還元することによって調製する。

【００６９】

抗体－金コンジュゲートは、Ｒｏｔｈ，Ｊ．（The colloidal gold marker system for light and electron microscopic cytochemistry in Bullock, G.R. and Petrusz, P.編、Techniques in Immunocytochemistry Vol, 2, New York, Academic Press 1983, 216-284）の方法に従って調製する。

【００７０】

このために、金ゾル溶液を室温に冷却した後、＜ｃＴｎＩ＞抗体の等電点より約０．５ｐＨ単位高くなるように、金ゾルのｐＨを０．２Ｍ K_2CO_3 を用いて調整する。クローン名Ｍ１５５のモノクローナル＜ｃＴｎＩ＞マウス抗体は、カタログ番号４Ｔ２１（Turku, Finland）でHyTest Companyから購入できる。このモノクローナル抗体はｃＴｎＩエピトープａａ２７－４３を認識する。

【００７１】

金ゾルの光学密度（ＯＤ）（５２５ｎｍおよび１ｃｍ光路長での吸光度）は通常１．０である。＜ｃＴｎＩ＞抗体を、その濃度が金ゾル溶液への添加後１．２μｇ／ｍｌになるように、水に溶解した形で添加する。室温で３０分間撹拌した後、金コンジュゲートを高濃度のウシ血清アルブミン溶液（コンジュゲート溶液中の最終濃度１ｍｇ／ｍｌ）の添加によって飽和させる。

【００７２】

室温でさらに３０分間撹拌した後、飽和後の金コンジュゲートを、３０ｋＤａメンブレンを通して２０ｍＭトリスバッファーｐＨ７．０に対する限外ろ過によって、一般的には２０の光学密度に濃縮する。その後、１００μＭ Ｂｒｉｊ ３５および０．０５重量％の NaN_3 をコンジュゲート溶液に添加し、使用時まで回転させながら４℃で保存する。

【００７３】

金コンジュゲートフリース５は下記の含浸溶液で含浸させる。すなわち、５０ｍＭ ＨＥＰＥＳ ｐＨ７．５；１．０重量％のウシ血清アルブミン；１．０重量％のショ糖、０．１％Ｔｗｅｅｎ ２０、ＭＡＢ＜ｃＴｎＩ＞Ｍ１５５－ＩｇＧ－４０ｎｍ金ゾルコンジュゲートＯＤ ４．５である。

【００７４】

このために、ポリエステルレーヨンステープルーポリビニルアルコール混合フリースを、まず含浸溶液を入れた容器にくぐらせ、次に２５０μｍの隙間で並んだ２つのステンレススチール製ローラーを通して圧搾し、最後に循環空気乾燥機によって６０℃で乾燥させる。フリースによって吸収される含浸溶液の量は通常、記載された条件下で２４０ｍｌ／m^2 である。

【００７５】

ビオチンコンジュゲートフリースは以下のように作製する（６）。すなわち、クローン名１６Ａ１１のモノクローナル＜ｃＴｎＩ＞マウス抗体（カタログ番号４Ｔ２１でHyTest Companyから市販されている）を、ビオチンコンジュゲートを調製するために使用する。このモノクローナル抗体はｃＴｎＩエピトープａａ８７－９１を認識する。

【００７６】

ビオチンのスクシンイミドエステル誘導体を、０．１Ｍリン酸カリウムｐＨ８．５中の１０ｍｇ／ｍｌ ＩｇＧ溶液に８倍モル過剰に添加する。その混合物を９０分間２５℃で撹拌しながらインキュベートする。溶液にリジンを添加して最終濃度１０ｍＭにすることによって反応を停止する。過剰なビオチン化試薬を透析によって除去し、使用時まで６重量％のショ糖の存在下で－７０℃で保存する。

【００７７】
ビオチンコンジュゲートフリース６は下記の含浸溶液で含浸させる。すなわち、２０ｍＭ トリスｐＨ７．２、５０ｍＭ ＮａＣｌ、１．０重量％のウシ血清アルブミン；１．０重量％のショ糖、０．１重量％のＴｗｅｅｎ ２０、および７ｍｇ／ｌ ＭＡＢ＜ｃＴｎＩ＞Ｍ－１６Ａ１１－ＩｇＧビオチン（ＸＯＳｕ ８：１）である。これを金コンジュゲートフリースの調製に使用したのと同様の条件下で含浸、乾燥させる。
【００７８】
ｂ）テストストリップの評価
対照ライン８の組成だけが異なる以下の３つのテストストリップの変形形態を、ａ）に記載された方法に従って製造した。対照ライン８を作製するための溶液は、以下の３つの変形形態で構成された。すなわち、
変形形態１：１ｍｇ／ｍｌ ポリハプテン[ＰＨ，ＴｎＩ（２７－４３）]；古典的な対照ラインを有するテストストリップ、
変形形態２：１ｍｇ／ｍｌストレプトアビジン；対照ラインとして第二の検出ライン試薬を有するテストストリップ、
変形形態３：１ｍｇ／ｍｌポリハプテンおよび１ｍｇ／ｍｌストレプトアビジン；本発明の対照ラインを有するテストストリップ、である。
【００７９】
既に上述されたように、すべてのテストストリップの変形形態は、４．５ｍｇ／ｍｌストレプトアビジンを保持している同一の検出ライン７を有する。
【００８０】
漸増する量のｃＴｎＩ－Ｃ－Ｔ複合体（カタログ番号８Ｔ６２でHyTestから市販されている）を添加したｃＴｎＩ陰性のドナーの血液を使用して、テストストリップを評価した。このために１５０μｌの混入されたドナー血液をサンプルとして、サンプル付加区画としても機能するビオチンコンジュゲートフリース６にテストストリップごとにピペットで付加し、１５分後に試験結果を検出ラインおよび対照ラインの出現について視覚的に評価し、またライン強度を定量化するため測定機器（Ｒｏｃｈｅ Ｃａｒｄｉａｃ Ｒｅａｄｅｒ，Roche Diagnostics GmbH，注文番号１９０２２２９）を用いた反射光測定によっても評価した。この場合、１００％の反射率は検出ラインまたは対照ライン区画にラインが存在しないことを表し、２０％の反射率は濃い暗赤色のラインを表し、その強度では測定装置の検出系は発色飽和の状態である。
【００８１】
結果は下記の表に要約される。
【表１】

	シグナル（[%反射率]または視覚的に*陽性（＋）もしくは陰性（－）で）			
cTnI 濃度 [ng/ml]	検出ライン	対照ラインの変形形態		
		1	2	3
0	100 (-)	20 (+)	100 (-)	20 (+)
1	65 (+)	30 (+)	80 (+)	20 (+)
10	25 (+)	45 (+)	60 (+)	20 (+)
50	18 (+)	96 (+/-)	40 (+)	35 (+)
250	30 (+)	98 (-)	65 (+)	65 (+)
1000	98 (-)	100 (-)	98 (-)	98 (-)

＊ （－）または（＋）の指定は視覚的な結果分類を指す。すなわち、
（－）＝視認できるラインはない
（＋）＝視認できるライン

【００８２】
結果は以下のように解釈される。
【００８３】
検出ライン：
予想通り、検出ラインの強度は、最初はアナライト濃度の増加とともに増加し（１ｎｇ／ｍｌ～５０　ｎｇ／ｍｌ　ｃＴｎＩでの反射率の値の減少）、最大強度（１８％反射率、すなわち発色飽和）を過ぎた後、著しく高いアナライト濃度ではサンドイッチ方式により引き起こされる高濃度でのフック効果のため再度減少する。前記の高濃度でのフック効果は、１０００ｎｇ／ｍｌ　ｃＴｎＩでテストストリップの検出ラインにおいてほぼ１００％の反射率の値（視覚的に陰性）を示し、従って偽陰性の検出ラインを生じる。
【００８４】
変形形態１：「古典的な対照ライン」：
アナライトの非存在下では、金コンジュゲートは、ポリハプテン（ａａ２７－４３）へのＭ１５５抗体の結合によって、ほぼ定量的に対照ラインに蓄積する（２０％反射率）。一方、アナライト濃度が増加するに従って、対照ラインの発色強度は減少する。これは、金コンジュゲートの大部分がサンドイッチ複合体の形で検出ラインに捕捉されるため、および、検出ラインに捕捉されない金コンジュゲートの一部は存在するアナライト濃度の増加によってすでに飽和し、従って、もはや対照ラインのポリハプテンに十分結合できないためである。この場合、クロマトグラフ分離された金コンジュゲートは、検出ラインおよび対照ラインを超えて、その下流に位置する廃液用フリース２に移動する。
【００８５】
サンプル中５０ｎｇ／ｍｌ　ｃＴｎＩを越えると、検出ラインはこの濃度およびまた２５０ｎｇ／ｍｌでもまだ明らかに陽性であるが、対照ラインの機能不全（視覚的に陰性）が引き起こされる。
【００８６】
しかし、対照ラインの欠如のため、使用者はこの場合、試験結果を無効であると誤解せざるを得ない。
【００８７】
この所見は先行技術と一致し、従って、古典的なポリハプテン対照ラインの限界を示す。
【００８８】
変形形態２：「対照ラインとしての第二の検出ライン」：
対照ラインと見なされる第二のストレプトアビジン検出ラインは、アナライトの非存在下では、サンドイッチ複合体が形成されないため（対照ラインとしてのその機能に関して）当然ながら機能しない。従って、第一検出ラインがアナライトの存在しないことを正しく反映していても、試験結果は無効とみなされるであろう。
【００８９】
アナライトの存在下では、形成されるサンドイッチ複合体のほとんどが検出ラインによって既に上流で結合されるためにより弱い強度であるが、検出ラインと同様のストレプトアビジン対照ラインは形成されたサンドイッチ複合体を検出する。
【００９０】
非常に高いアナライト濃度（１０００ｎｇ／ｍｌ　ｃＴｎＩ）では、両方とも同一の機構に従っているため（高濃度でのフック効果については上記参照）、検出ラインに加えて対照ラインもまた機能しない。
【００９１】
変形形態３：「本発明の対照ライン」
表中に測定および視覚的分類によって示されるように、この対照ラインは（ポリハプテン金コンジュゲート機構によって）アナライトの非存在下で試験結果が正しいことを示唆する。
【００９２】

中間の濃度範囲では、対照ラインは相加的な両方の免疫学的機構によってシグナルを生じる。

【００９３】

より高い濃度範囲（５０～２５０ｎｇ／ｍｌ　ｃＴｎＩ）では、対照ラインは、主としてストレプトアビジン－ビオチン機構によって、測定されるシグナルを生じる（古典的なポリハプテン対照ラインはこの場合既にアナライト飽和にあり、従って機能しない）。高濃度でのフック効果が検出ラインに起っている場合（１０００ｎｇ／ｍｌ　ｃＴｎＩ）、対照ラインもまた期待通り機能しない。

【００９４】

これらの特性を総合すると、この新規な対照ライン機構が既知の技術の実施形態よりも優れていることが示される。

【図面の簡単な説明】

【００９５】

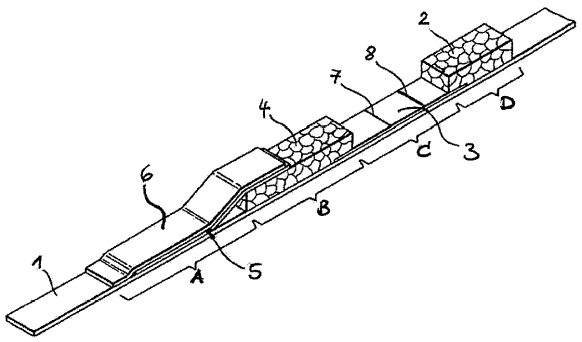
【図１】免疫クロマトグラフテストストリップの形態での本発明の試験素子の好ましい実施形態を図示する。

【符号の説明】

【００９６】

Ａ　サンプル付加区画およびコンジュゲート区画
Ｂ　赤血球分離区画
Ｃ　検出区画
Ｄ　吸引区画
１　支持材
２　吸引フリース（廃液部）
３　検出ラインおよび対照ラインを含むクロマトグラフィーメンブレン
４　赤血球分離用マトリックス（血液分離用フリース）
５　金コンジュゲートフリース（標識化コンジュゲート）
６　ビオチンコンジュゲートフリース（タグ付きコンジュゲート）
７　検出ライン（固定化されたポリストレプトアビジン）
８　対照ライン

【図１】



フロントページの続き

(72)発明者　ユールゲン　クレップ
ドイツ連邦共和国　デー－７６６７６　グラベン－ノイドルフ，オルフヴェーク　５

審査官　白形　由美子

(56)参考文献　国際公開第２００４／１０９２８５（WO，Ａ１）
特表２００７－５３７４２８（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５０６１１５（ＪＰ，Ａ）
特開２０００－０９７９４１（ＪＰ，Ａ）
特表２００７－５２６４４３（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｇ０１Ｎ　３３／５４３