

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5749010号
(P5749010)

(45) 発行日 平成27年7月15日(2015. 7. 15)

(24) 登録日 平成27年5月22日(2015. 5. 22)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 25/48 (2006. 01)

GO 1 N 25/48

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 M

GO 1 N 33/547 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 U

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/547

GO 1 N 33/553 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 4 1 Z

請求項の数 15 (全 12 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-522454 (P2010-522454)
 (86) (22) 出願日 平成20年8月13日(2008. 8. 13)
 (65) 公表番号 特表2010-538253 (P2010-538253A)
 (43) 公表日 平成22年12月9日(2010. 12. 9)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2008/050699
 (87) 国際公開番号 W02009/027726
 (87) 国際公開日 平成21年3月5日(2009. 3. 5)
 審査請求日 平成23年7月5日(2011. 7. 5)
 (31) 優先権主張番号 0716968.3
 (32) 優先日 平成19年8月31日(2007. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 60/969, 309
 (32) 優先日 平成19年8月31日(2007. 8. 31)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507251192
 ビバクタ、リミテッド
 VIVACTA LIMITED
 イギリス国ケント、シディングボーン、ケ
 ント、サイエンス、パーク、ギラット、ア
 ベニュー、100
 (74) 代理人 100117787
 弁理士 勝沼 宏仁
 (74) 代理人 100082991
 弁理士 佐藤 泰和
 (74) 代理人 100103263
 弁理士 川崎 康
 (74) 代理人 100107582
 弁理士 関根 毅

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 センサ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

サンプル中の検体を検出する方法であって、

エネルギーの変化を電気的信号に変換することが可能な変換器に、前記サンプルをさらすステップであって、前記変換器は、前記変換器上に又は前記変換器に近接して少なくとも1つの連結試薬を有し、前記少なくとも1つの連結試薬は、前記検体と結合することが可能な結合部位を有する、ステップと、

標識化試薬を前記サンプル中に導入するステップであって、前記標識化試薬は、前記検体用又は前記連結試薬用の結合部位と、エネルギーを生成するよう、放射源により生成された電磁放射を吸収することが可能な標識とを含む、ステップと、

前記標識化試薬を、第1の期間において、前記検体又は前記連結試薬と結合させるステップであって、前記変換器は、前記標識化試薬が、少なくとも部分的に前記変換器上に定着されるよう方向付けられている、ステップと、

続いて、第2の期間において、前記変換器を、前記サンプルに対し反転させる又は部分的に反転させることで、前記連結試薬に直接的にも前記検体を介しても未結合の前記標識化試薬を前記変換器から分離させるステップと、

前記第1及び第2の期間の間において、前記サンプルに電磁放射を照射するステップと、

前記生成されたエネルギーを電気的信号に変換するステップと、

前記電気的信号を検出するステップと、

10

20

を含む方法。

【請求項 2】

前記標識化試薬は、前記サンプルよりも密度が高く、重力は、前記標識化試薬を少なくとも部分的に前記変換器上に定着させるよう、前記標識化試薬に作用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記標識化試薬は、前記サンプルよりも密度が低く、浮力は、前記標識化試薬を少なくとも部分的に前記変換器上に定着させるよう、前記標識化試薬に作用する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記変換器は、焦電又は圧電素子及び複数の電極を有する焦電又は圧電変換器である、請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

前記サンプルには、電磁放射の一連のパルスが照射され、前記方法は更に、前記放射源からの電磁放射の各パルスと前記電気的信号の生成との間の時間遅延を検出するステップを含み、電磁放射の各々のパルスと前記電気的信号の生成との間の前記時間遅延は、前記変換器の表面からの距離の異なる 1 つ以上の任意の位置での、前記標識の位置に相当する、請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの連結試薬は、抗体であり、前記検体は、抗原であり、前記標識化試薬は、前記少なくとも 1 つの連結試薬と結合することも可能な標識化抗原、又は前記検体と結合することも可能な標識化抗体である、請求項 1 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つの連結試薬は、前記変換器上に吸着されている、請求項 1 から 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 8】

前記標識は、1 . 5 から 2 3 g / mL の密度を有する粒子である、請求項 1 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

ベースライン測定が、前記標識化試薬を前記サンプル中に導入した後であるが、前記標識化試薬を前記変換器上に定着させる前に行われる、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

サンプル中の検体を検出する装置であって、
電磁放射を生成するよう適合された放射源と、
エネルギーの変化を電気的信号に変換することが可能な変換器と、
前記変換器上の又は前記変換器に近接した少なくとも 1 つの連結試薬であって、前記検体と結合することが可能な結合部位を有する少なくとも 1 つの連結試薬と、
前記サンプルを、流体中に変換器と接して保持するためのチャンバであって、ふたで又は毛細力により封止されたチャンバと、
前記変換器により生成された前記電気的信号を検出することが可能な検出器とを備え、
前記装置は、固定リーダー内の回転力セットを備え、前記力セットは、前記チャンバと前記変換器とを含む、装置。

【請求項 11】

前記変換器は、焦電又は圧電素子及び複数の電極を有する焦電又は圧電変換器である、請求項 10 に記載の装置。

【請求項 12】

前記少なくとも 1 つの連結試薬は、前記変換器上に吸着されている、請求項 10 又は 11 に記載の装置。

10

20

30

40

50

【請求項 1 3】

前記検体用又は前記連結試薬用の結合部位を有する標識化試薬と、エネルギーを生成するよう、放射源により生成された電磁放射を吸収することが可能な標識は、前記チャンバの複数の表面のうちの 1 つに解放可能に付着している、請求項 1 0 から 1 2 のいずれか 1 項に記載の装置。

【請求項 1 4】

前記少なくとも 1 つの連結試薬は、抗体であり、前記検体は、抗原であり、前記標識化試薬は、前記少なくとも 1 つの連結試薬と結合することも可能な標識化抗原、又は前記検体と結合することも可能な標識化抗体である、請求項 1 3 に記載の装置。

【請求項 1 5】

前記標識は、1 . 5 から 2 3 g / m L の密度を有する粒子である、請求項 1 3 又は 1 4 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、センサに関し、特に、センサ、及びセンサを用いて結合アッセイ (binding assay) を行う方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

免疫アッセイ (immunoassay) のような結合アッセイでは、検体 (しばしば蛋白質又はハプテン) と、抗原 (検体) の全体又は部分 (エピトープ) に具体的に向けられた (抗体のような) 結合部 (binding moiety) との間の特定の「鍵穴と鍵 (lock-and-key)」相互作用が用いられる。検体と抗体との間の結合は、固有であって、関連はあるが非同定的な種 (species) との相互作用を最小化し、強固であって、良好な感度を与える。未知の検体を定量化するため、特徴的なマーカー (例えば、蛍光性又は化学ルミネセンス分子) で標識化された (labelled) 検体と、同様に標識化された第 2 の抗体 (「レポーター」) のいずれかの一定量が、サンプルと混合される。次に、過剰に存在する標識化種 (labelled species) は、最終的に平衡状態に達して検体と結合し、当該平衡状態では、検体の大部分が、少なくとも 1 つの標識 (label) と関連づけ (associate) られている。標識の濃度は一定であるため、検体を定量化するためには、検体 (「結合」部分 ("bound" fraction)) と関連づけられた部分は、関連づけられていないもの (「自由」部分 ("free" fraction)) と物理的に分離される必要がある。次に、いずれかの部分が定量化可能であり、「結合」部分は、検体の濃度に正比例し、「自由」部分は、検体の濃度に反比例する。一般に、「結合」部分と「自由」部分との分離は、第 2 の抗体 (「捕捉」抗体) を用いて成され、検体上の異なるエピトープに向けられ、ビード (bead) 又は固体表面のような固相に結合される。このビード又は固相は、次に、バルク溶液から物理的に分離することができ、標識が蛍光性分子である場合には、例えば蛍光光度計を用いて測定が行われる。抗体 / 抗原相互作用に加え、いくつかの異なる形態の結合相互作用が、結合アッセイに利用可能であり、当該結合相互作用には、DNA / DNA 相互作用、RNA / RNA 相互作用、及びアプタマー相互作用が含まれるが、これらには限定されない。「競合」アッセイのように、このようなアッセイの代替形態が知られており、当該代替形態では、検体が、公知の量の標識化検体と混合され、次に、これら 2 つが結合部位と競合する。そして、結合標識化検体の程度は、原サンプルの未標識化 (unlabelled) 検体の量に反比例する。

【0 0 0 3】

「結合」標識化部分と「自由」標識化部分とを、分離ステップ及び洗浄ステップを行う必要なく区別する固有の方法が、WO 2 0 0 4 / 0 9 0 5 1 2 に記載されている。この方法において、捕捉抗体を組み入れる固相は、圧電又は焦電フィルム、典型的には P V D F である。これは、固相分離特性を測定技法と組み合わせる固有の能力を有している。WO 2 0 0 4 / 0 9 0 5 1 2 に記載のように、(炭素又はコロイド金のような適切な着色物質

10

20

30

40

50

で標識化された) 標識化「レポーター」検体は、測定対象の検体の濃度に比例する速度 (rate) で捕捉表面と結合し、この結合は、補色 (complementary colour) の光で表面を照射することで同時にモニターされる。光エネルギーは、表面の標識により吸収され、非放射減衰 (non-radiative decay) により熱として放出され、P V D F フィルムにより検出される。同時にこのシステムの利点は、バルク溶液中の非結合標識により同様に吸収されたエネルギーが、P V D F フィルムにより検出されずに液体媒体中で失われることであり、こうして「結合」部分と「自由」部分との「分離」に自動的に影響する。十分なサイズのコロイド粒子を用いることには、有意な個数の陽子が粒子により吸収されて、強い信号をもたらす、その結果、良好な感度をもたらすという利点がある。

【0004】

WO2004/090512 に記載のセンサは、標識が捕捉表面に結合するキネティクスをリアルタイムにモニターするのに用いられ、これは、検体の濃度に比例する。この方法は、標識化種の表面への拡散速度と、表面での結合速度とに依存する。これらの速度のいずれかが準最適 (sub-optimal) である場合、アッセイの全感度又は反応時間は、制限しても構わない。表面での結合速度は、(例えば大きな炭素又は金粒子が標識として使用される場合、) 標識化検体間の立体障害 (steric hindrance) のような、多くの要素により制限可能である。加えて、大きな (20 ~ 500 nm) 粒子の固体表面への接近を妨げる静電斥力が存在することもあるし、又は、粒子が固相に接近するが、粒子上の結合表面が結合が生じるのに不当な方向に向けられる配向効果が存在することもある。これは、多くの抗体で覆われた大きな粒子と共に、これらの抗体の小さな部分のみが検体に結合されて、より起こりやすくなり、この結果、粒子の表面領域の小さな部分だけが、表面へと結合するのに使用される。結合速度のこれら制限要素に加えて、免疫アッセイ試験に用いられる粒子のサイズを制限可能なその他の要素も存在する。例えば、従来の「側方流動 (lateral flow)」免疫クロマトグラフィ・ストリップ試験では、コロイド金粒子の最適なサイズは、約 40 nm である。理由は、より大きな粒子が、そのサイズ及び密度 (density) に起因して流動膜 (flow membrane) 中にトラップされる傾向があるからである。最後に、大きな粒子ほど、拡散速度が低く、そのため、捕捉表面に拡散するのに長時間かかり、その結果、利用可能な信号を制限する可能性がある。

【0005】

従って、この技術分野には、このようなアッセイの感度の更なる向上へのニーズが依然としてある。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0006】

従って、本発明は、サンプル中の検体を検出する方法であって、

エネルギーの変化を電気的信号に変換することが可能な変換器 (transducer) に、前記サンプルをさらすステップであって、前記変換器は、前記変換器上に又は前記変換器に近接して少なくとも 1 つの連結試薬 (tethered reagent) を有し、前記少なくとも 1 つの連結試薬は、前記検体と結合することが可能な結合部位 (binding site) を有する、ステップと、

標識化試薬 (labelled reagent) を前記サンプル中に導入するステップであって、前記標識化試薬は、前記検体用又は前記連結試薬用の結合部位と、エネルギーを生成するように、放射源により生成された電磁放射を吸収することが可能な標識とを含む、ステップと、

前記標識化試薬を、第 1 の期間において、前記検体又は前記連結試薬と結合させるステップであって、前記変換器は、前記標識化試薬が、少なくとも部分的に前記変換器上に定着 (settle) されるよう方向付けられている、ステップと、

続いて、第 2 の期間において、前記標識化試薬を不安定化 (unsettle) させるステップと、

前記第 1 及び第 2 の期間の間において、前記サンプルに電磁放射を照射するステップと

、

10

20

30

40

50

前記生成されたエネルギーを電氣的信号に変換するステップと、
前記電氣的信号を検出するステップと、
を含む方法を提供する。

【図面の簡単な説明】

【0007】

【図1】WO2004/090512による装置を示す図である。

【図2】本発明の方法の模式的な描写を示す図である。

【図3】本発明による装置を示す図である。

【図4】本発明の方法を用いたカウント対時間のグラフを示す図である。

【発明を実施するための最良の形態】

10

【0008】

以下、本発明を、図面を参照して説明する。

【0009】

変換器が反転 (invert) 又は同様に摂動 (perturb) された場合、特定の相互作用により表面に結合されていない標識化「レポーター」が、いずれも剥がれ落ちることが判明した。そのため、適切に照射されたとき、変換器の近くに近接する標識は、強い信号を生成し、一方、表面から遠い標識は、弱い又は無視できる程度の信号を生成する。このようなシステムには、いくつかの利点がある。即ち、全ての標識が、結合表面の近くに濃縮されることが可能であり、その結果、表面に結合する粒子の速度が増大する。加えて、粒子と表面が同種の電荷である場合、重力又は浮力の下で表面に粒子を駆動することで、表面での静電斥力に打ち勝つ助けとなり得る。

20

【0010】

本発明の方法は、WO90/13017又はWO2004/090512に開示された種類のセンサを使用する。ここに表す図1は、WO2004/090512の図1に相当する。

【0011】

WO2004/090512で説明されているように、図1は、本発明と共に用いられる種類の化学センシング装置1を示す。当該装置1は、物質 (substance) 2を電磁放射で照射した際における物質2中での熱生成に依存する (本発明で使用する物質2は、実際には、変換器3上の又は変換器3に近接した標識化試薬であり、変換器3については、以下、より詳細に論じる)。上記装置1は、複数の電極4, 5を有する焦電又は圧電変換器3のような変換器を備える。物質2は、任意の適した技法を用いて、変換器3上に又は変換器3に近接して保持される。当該物質は、適切な形態であってもよく、複数の物質が堆積されてもよい。好適には、物質2は、変換器上、特に、上部電極上に吸着され、例えば、イオン結合、水素結合、又はファンデルワールス力のような分子間の力により、共有的 (covalently) に連結 (couple) 又は結合 (bind) される。物質2は、光源 (好適には可視光源) のような電磁放射源6により照射されたときに熱を発生する。光源は、例えば、LEDでもよい。光源6は、適切な波長 (例えば補色) の光で物質2を照射する。理論では結合は望ましくないが、図1にて曲線で示すように、物質2は光を吸収して励起状態を生じ、それはその後非放射減衰を受け、これによりエネルギーを生成すると信じられている。このエネルギーは、主に熱の形態 (即ち、周囲環境の熱運動) であるが、しかしながらその他の形態 (例えば衝撃波) も生成され得る。しかしながら、エネルギーは、変換器により検出され、電氣的信号へと変換される。WO2004/090512に記載のように、変換器3からの当該信号は、変換器3から物質2への距離に依存し、光パルスと当該信号との間の時間遅延は、その距離に関し有益な情報を与え得る。本発明の装置は、特に測定される物質用に調節され、よって、生成されるエネルギーの正確な形態は、決定される必要はない。あるいは、特定しない限り、用語「熱」はここでは、非放射減衰により生成されるエネルギーを意味するよう使用される。光源6は、物質2を照射するよう配置される。好適には、光源6は、変換器3及び電極4, 5の下方に配置され、物質2は、変換器3及び電極4, 5を介して照射される。光源は、光源が導波システム (guided wave

30

40

50

system) である変換器内の内部光源でもよい。導波体 (wave guide) は、変換器そのものでもよいし、導波体は、変換器に付着された追加の層でもよい。

【 0 0 1 2 】

本発明の方法では、分析対象のサンプルが、変換器 3 にさらされる。上述のように、変換器 3 は、エネルギーの変化を電気的信号に変換することが可能である。

【 0 0 1 3 】

物質 2 により生成されたエネルギーは、変換器 3 により検出され、電気的信号に変換される。電気的信号は、検出器 7 により検出される。光源 6 及び検出器 7 は、共にコントローラ 8 の制御下にある。光源 6 は、好適には、光の一連のパルス生成する (用語「光」は、ここでは、特定の波長を言及せず、電磁放射の任意の形態を意味する)。この光は、
「刻まれた光 (chopped light)」と呼ばれる。原則として、光の単一フラッシュ、即ち、電磁放射の 1 つのパルスは、変換器 3 から信号を生成するのに十分である。しかしながら、再生可能な信号を得るには、光の複数のフラッシュが用いられ、実用的には刻まれた光が必要とされる。電磁放射のパルスが印加される周波数 (frequency) は、変化させてもよい。下限では、パルス間の時間遅延は、各パルスと判断対象の電気的信号の生成との間の時間遅延に対し十分である必要がある。上限では、各パルス間の遅延時間は、データを記録するのにかかる期間が法外に延びるほど大きくならない必要がある。好適には、パルスの周波数は、少なくとも 2 Hz、より好適には 2 ~ 50 Hz、より好適には 5 ~ 15 Hz、最適には 10 Hz である。これはそれぞれ、最適で 500 ms、20 ~ 500 ms、66 ~ 200 ms、及び 100 ms のパルス間の時間遅延に相当する。しかしながら、
時間遅延は、1 ms ほどの低さでも構わない。加えて、いわゆる「マーク・スペース (mark-space)」比、即ち、オフ信号に対するオン信号の比は、好適には 1 であるが、しかしながら、その他の比も、悪影響なしに使用可能である。刻んだ又は異なるマーク・スペース比の異なる周波数の刻まれた光を生成する電磁放射源は、当技術分野では公知である。検出器 7 は、光源 6 からの光の各パルスと、検出器 7 により検出された変換器 3 からの対応する電気的信号との間の時間遅延 (「相関遅延」) を決定する。この時間遅延は、距離 d の関数である。

【 0 0 1 4 】

光の各パルスと、再現可能な結果を与える対応する電気的信号と、の間の時間遅延を決定する任意の方法を使用してもよい。好適には、時間遅延は、光の各パルスの開始から、熱吸収に対応する電気的信号の最大値が検出器 7 により検出される時点まで測定される。

【 0 0 1 5 】

そのため、物質 2 は、変換器表面から分離されていてもよく、信号が、更に検出されてもよい。更に、介在する媒体を通じて検出可能な信号が、変換器 3 へとエネルギーを変換できるだけでなく、異なる距離 d が区別されてもよく (これは「深さプロファイリング」と呼ばれる)、受信された信号の強度は、特に変換器 3 の表面からの距離 d における物質 2 の濃度に比例する。

【 0 0 1 6 】

従って、本発明の好適な実施形態では、サンプルは、電磁放射の一連のパルスで照射され、上記の方法は更に、放射源からの電磁放射の各パルスと、電気的信号の生成との間の時間遅延を検出するステップを含む。電磁放射の各々のパルスと、電気的信号の生成との間の時間遅延は、変換器の表面からの距離の異なる 1 つ以上の任意の位置での標識の位置に相当する。従って、本発明の方法は、サンプルを変換器から取り除かずに行われる。

【 0 0 1 7 】

図 2 (a) に示すように、本発明では、変換器 3 は、サンプルチャンバ 9 内に組み込まれている。変換器 3 は、変換器 3 上に又は変換器 3 に近接して少なくとも 1 つの連結試薬 10 を有し、それは、検体 11 を結合可能な結合部位を有している。例えば、上記少なくとも 1 つの連結試薬 10 は、抗体としてもよく、検体 11 は、抗原としてもよく、標識化試薬は、検体にも結合可能な連結試薬と標識化抗体との少なくとも 1 つと結合可能な標識化抗原でもよい。この例では、標識化試薬が、少なくとも 1 つの連結試薬 10 と結合するこ

とも可能な標識化抗原である場合、検出器により検出される電気的信号は、サンプル中の検体の存在に反比例する。別の例では、少なくとも1つの連結試薬は、第1の核酸 (nucleic acid) であり、検体は、第2の核酸であり、第1及び第2の核酸は、相補的 (complementary) である。更なる例では、少なくとも1つの連結試薬は、アビジン (avidin) 又はその誘導体 (derivatives) を含み、検体は、ビオチン (biotin) 又はその誘導体を含み、その逆でもよい。適切な免疫アッセイの例は、WO 2004/090512に記載されている。好適には、少なくとも1つの連結試薬は、変換器に吸着又は共有結合されているが、試薬を表面に付着させるその他の方法も知られており、それらを使用してもよい。

【0018】

次に、標識化試薬12が、サンプル中に導入される。標識化試薬12は、検体11用又は連結試薬10用の結合部位と、エネルギーを生成するよう、放射源により生成された電磁放射を吸収することが可能な標識とを含む。図2(b)では、標識化試薬12が、検体11と結合している。

【0019】

次に、サンプルは、標識化試薬12を検体11又は連結試薬10（ここでは検体11）と結合させるよう、十分な時間放置される。このアッセイの第1の期間では、変換器は、重力が標識化試薬12に作用して、標識化試薬12を少なくとも部分的に変換器3上に定着させるよう方向付け (orient) されている。

【0020】

従って、標識は、妥当なタイムスケール内で定着するのに十分な密度を有する必要がある。これは、粒子の性質、サンプルの性質、及びアッセイを行うのに必要な時間に依存する。標識は、好適には、金属（好適には金）粒子、着色ポリマー粒子（例えば着色ラテックス粒子）、磁性粒子、カーボン粒子、及び、非導電性コア材料と少なくとも1つの金属シェル層とを含むナノ粒子の中から選択される（米国特許6344272号参照）。しかしながら、適切な周波数を吸収し、重力下で定着する限り、熱を生成するよう電磁放射と相互作用することが可能な任意の標識が容認可能である。磁性粒子の場合には、電磁放射は無線周波数放射である。上述のその他の全標識が光を使用し、当該光には、IR又はUV放射が含まれ得る。金粒子の場合には、信号を更に増大させるため、標識は、銀イオン溶液及び還元剤を用いた金属銀 (metallic silver) の触媒堆積により強められてもよい。金は、銀イオンの銀金属への還元触媒作用を及ぼし/活性化し (catalyse/activate)、銀金属が光を吸収する。好適には、標識は、金粒子である。金粒子は、商業的に入手可能であり、或いは、公知の方法で用意してもよい（例えばG. Frens, Nature, 241, 20-22 (1973)参照）。

【0021】

本発明は、好適には20から1000 nm、より好適には100から500 nmの粒子サイズを有する粒子を使用する。粒子サイズとは、粒子のその最も広いポイントにおける直径を意味する。粒子は、好適には1.5から23 g/mL、より好適には15から20 g/mL、最適には19 g/mLの密度を有する。特に好適な実施形態では、粒子は、上述のサイズ及び密度を有する金粒子であるが、しかしながら、オスミウム又はイリジウムのようなその他の高密度の材料も使用できる。続いて、第2の期間では、標識化試薬を、不安定化 (unsettle) させる。標識化試薬の不安定化は、変換器で受信される信号を変化させ、連結試薬に結合された標識化試薬の量の指標 (indication) を与える。標識化試薬は、好適には、変換器をサンプルに対し反転 (invert) させる又は部分的に反転 (partially invert) させることで、不安定化される。部分的に反転とは、標識化試薬が変換器表面から離されるよう、変換器が傾けられることを意味する。代わりに、標準化試薬は、サンプルを攪拌 (agitate) することで、不安定化されてもよい。しかしながら、いずれかの場合において、システムの不安定化は、未結合 (unbound) 標識を変換器から分離させる。図2(c)は、反転後のサンプルチャンバ9を示す。結合検体11と、検体11に結合された標識化試薬12aが、変換器3の近くに（近接して (proximal)）残り、一方、未結合標識化試薬12bは、遠く（遠位 (distal)）にある。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 2 】

本発明の方法では、サンプルは、第 1 及び第 2 の期間の間において電磁放射が照射されて、上記の 2 つの比較を可能にする。WO 2 0 0 4 / 0 9 0 5 1 2 を参照して上述したように、標識によって生成されたエネルギーは、電気的信号へと変換され、当該電気的信号は、検出器により検出され、中央処理装置 (central processing unit) にて処理される。

【 0 0 2 3 】

サンプルは、典型的には、体液 (bodily fluid) のような流体サンプルであり、例えば、血清、血漿、又は尿である。

【 0 0 2 4 】

変換器は、典型的には、チャンバの一部である。好適な実施形態では、標識化試薬は、使用前にチャンバの複数の内部表面のうちの 1 つに解放可能 (releasably) に付着している。解放可能に付着とは、標識化試薬が、(例えば表面へのドライダウンにより) 表面に付着しているが、サンプルが導入された場合に解放されることを意味する。より好適には、変換器は、チャンバの上部 (top) を画定し、標識化試薬は、チャンバの内部底面 (interior bottom surface) に解放可能に付着している。この後者の配置は、ベースライン測定を行うのに特に適している。ベースライン測定は、サンプル及び標識化試薬が変換器へと与えられた後に、標識化試薬が変換器から遠くなるよう行われる。この時点で、サンドイッチアッセイでは、検体が連結試薬又は標識化試薬と結合することが可能であるが、表面でのサンドイッチの形成は排除されている。理由は、これら 2 つは、互いに遠位にあるからである。競合アッセイでは、溶液中の検体は、結合試薬と結合することが可能であり、標識化試薬が変換器へと移動させられる前に結合部位を満たす。変換器がチャンバの上部を形成し、標識化試薬がチャンバの底部に堆積している上記の例では、標識化試薬は、重力の下、チャンバの底部に留まる。ベースライン・リーディングが行われ、チャンバが反転されて標識化試薬を変換器上に定着させ、これにて、ここで説明された方法に続いて測定を行うことができる。こうして、サンプルが導入され、これにより標識化試薬を解放し、ベースライン測定が行われ、チャンバが、標識化試薬を少なくとも部分的に変換器上に定着させるよう、反転又は部分的に反転される。沈殿 (sedimentation) が起こるのに十分な時間の後、チャンバが、もう 1 度反転され、その元の位置に戻る。これはその後、未結合標識化試薬を表面から離れて沈殿させ、定量化 (quantitate) 対象の結合部分を残す。

【 0 0 2 5 】

本発明は、標識化試薬が、アッセイの第 1 のパートでは、サンプルチャンバの下面 (ベース) を形成する変換器へと定着し、第 2 のパートでは、変換器から離れるよう、サンプルの液体媒体よりも高密度の標識化試薬を参照して説明された。即ち、標識化試薬は、サンプルよりも密度が高く、重力が、標識化試薬を少なくとも部分的に変換器上に定着させるよう、標識化試薬に作用する。代わりに、標識化試薬が、アッセイの第 1 のパートでは、サンプルチャンバの上面 (リッド) を形成する変換器へと定着し、第 2 のパートでは、変換器から離れるよう、標識化試薬は、サンプルの液体媒体よりも低密度でもよい。即ち、標識化試薬は、浮力のもと、サンプルチャンバの上方部分に浮かぶ。このように、標識化試薬は、サンプルよりも密度が低く、浮力が、標識化試薬を少なくとも部分的に変換器上に定着させるよう、標識化試薬に作用する。標識化試薬が沈殿により定着する場合にも浮揚 (floatation) により定着する場合にも、標識化試薬は、サンプルと異なる密度を有する。

【 0 0 2 6 】

また、本発明は、上述した方法を実行するための装置及びキットを提供する。当該装置は、変換器を含むハンドヘルド・ポータブル・リーダー及び使い捨て装置の形態をとってもよい。

【 0 0 2 7 】

サンプルは、本質的に閉じたシステム内に集められ、標識化試薬と混合され、リーダー

10

20

30

40

50

内に置かれる。当該リーダーは、捕捉に適切のように分析チャンバを方向付け、過剰な未結合標識化試薬を剥ぎ落とす／浮散させる。典型的には、これは、固定リーダー内の回転力セットを含むが、しかしながら、物理的にリーダーを回転させることも含まれ得る。このような装置では、チャンバが封止（seal）され、或いは、例えば毛細路（capillary channel）内部の表面張力により、再配向（reorientation）の間にサンプルがチャンバから出るのを防ぐよう、少なくともサンプルが十分に規制されている。

【 0 0 2 8 】

従って、本発明は更に、サンプル中の検体を検出する装置であって、電磁放射を生成するよう適合（adapt）された放射源と、エネルギーの変化を電氣的信号に変換することが可能な変換器と、
前記変換器上の又は前記変換器に近接した少なくとも1つの連結試薬であって、前記検体と結合することが可能な結合部位を有する少なくとも1つの連結試薬と、
前記サンプルを、流体中に変換器と接して保持するためのチャンバであって、前記装置を反転、部分的に反転、又は攪拌して前記サンプルを収容するよう適合されたチャンバと、
前記変換器により生成された前記電氣的信号を検出することが可能な検出器と、
を備える装置を提供する。

10

【 0 0 2 9 】

好適には、変換器は、サンプルに対し反転、部分的に反転、又は攪拌を受けるよう適合されている。特に、サンプルチャンバは、サンプルがこぼれるのを防ぐよう封止されている。チャンバは、ふた（lid）で、又は、サンプルチャンバ内の毛細力（capillary force）により、封止されていてもよい。好適には、サンプルチャンバは毛細管である。サンプルチャンバは、好適には50～500 μm、より好適には100～300 μmの深さと、好適には1～10 mm、より好適には5 mmで、好適には10～50 mm、より好適には30 mmの長さ／幅を有する。サンプル体積は、好適には1～100 μL、より好適には10～50 μL、最適には約30 μLである。

20

【 0 0 3 0 】

上述のように、変換器は、好適には、焦電又は圧電素子及び複数の電極を有する焦電又は圧電変換器であり、少なくとも1つの連結試薬は、好適には、変換器上に付着している。

30

【 0 0 3 1 】

また、本発明は、ここで説明した装置と、ここで同様に説明した標識化試薬とを備えるキットを提供する。

【 実施例 】

【 0 0 3 2 】

図3に示すように、センサ1は変換器3から作製される。変換器3は、イリジウムスズ酸化物で覆われた棒状（poled）の圧電ポリビニリデンフルオロライドの部品と、透明ポリカーボネート・リッディングフィルム13の部品からなる。変換器3は、本技術分野で知られた標準的な方法を用いて、甲状腺刺激ホルモン（TSH）に向けられた抗体で覆われている。変換器3（約100ミクロンの厚さを有する）とリッディング部材13は、感圧接着剤で覆われたポリエステルの部品からなるスペーサ14を用いて、約500ミクロンの間隔で離されている。これは、寸法約30×10×0.5 mmの大きい方のサンプルチャンバ15を生成する。第2の小さい方のチャンバ16は、制御反応に備えるため寸法10×10×0.5で作製される。生成された電荷を検出するため、変換器3の上面及び底面への電気接続に備えるための用意をしておく。

40

【 0 0 3 3 】

アッセイは、大きい方のチャンバ15を、（フィルホール17を介して、）TSHへの抗体で覆われた200 nmコロイド金粒子を含む緩衝剤混合物と、更に5 ng/mLの濃度のTSHで満たすことで行われる。制御チャンバ16は、TSHなしで、（同一濃度の）緩衝剤及び金粒子だけで同時に満たされる。入口ホール及び出口ホールが封止され、次

50

に、圧電フィルム 3 がチャンバの底面上で水平に配向されるよう、チャンバアセンブリが試験器具 (test instrument) に接続される。次に、圧電フィルム 3 は、(波長 525 nm の) 4 つの LED を用いて連続して、刻まれた LED 光で照射される。4 つの LED のうちの 3 つは、リードチャンバの表面の異なる領域を照射し、1 つは、制御チャンバ 16 の圧電フィルム表面を照射する。各 LED パルスについて、電圧が、ロックイン増幅器及びアナログ・デジタル (ADC) 変換器を用いて、圧電フィルム 3 をまたいで測定される。ADC 信号が、時間に対しプロットされ、図 4 に示されている。ADC 信号が、最初の 1200 秒にわたって上昇することが観察できる。これは、照射された金粒子がフィルムの表面に堆積するにつれて、圧電フィルム 3 中に誘起される熱応力が増加したことを示している。1200 秒後には、制御チャンバ (LED 1) 及び測定チャンバ (LED 2、3、及び 4) からの信号は、見分けがつかなくなる。

10

【0034】

この時点で、チャンバが反転され、その結果、圧電フィルム 3 が、チャンバの上部、即ち、「屋根」を形成する (これは、図 2(c) の位置に相当する)。重力のもとで金粒子が表面から離れるにつれて、制御チャンバ (LED 1) 内の信号が急激に低下したことが観測できる。しかしながら、測定チャンバ (LED 2、3、及び 4) では、信号の低下は、ずっと少ない。理由は、サンプル中に存在する TSH が、金粒子上の抗体と表面上の抗体との間を架橋 (bridge) し、金粒子を圧電フィルム 3 の表面に結合させるからである。

【0035】

これらのプロット間の差は、TSH が反応混合物内に存在することを確認するのに使用可能である。加えて、TSH の異なる濃度を用いた調節曲線 (calibration curve) を用意することで、このシステムを、人体流体 (human fluid) 中の TSH 濃度についての定量的試験として使用することが可能である。

20

【図 1】

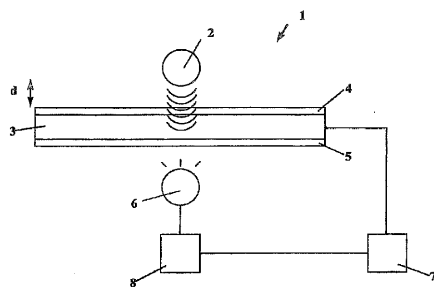
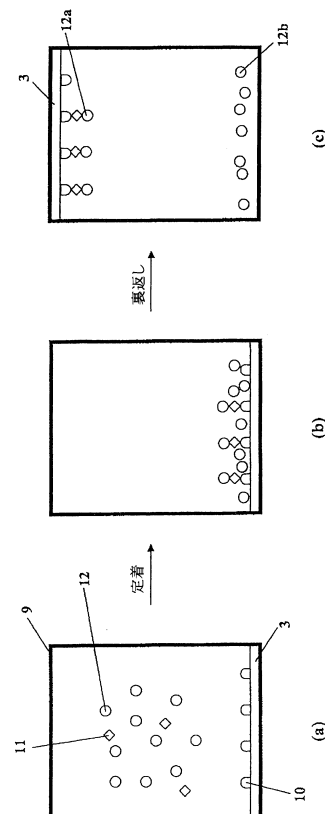


Fig. 1

【図 2】



【図 3】

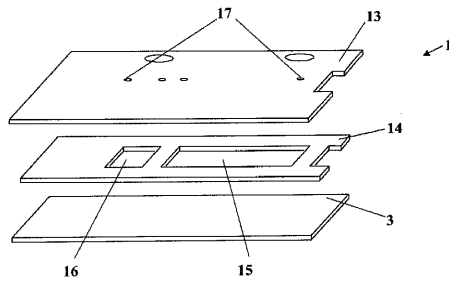
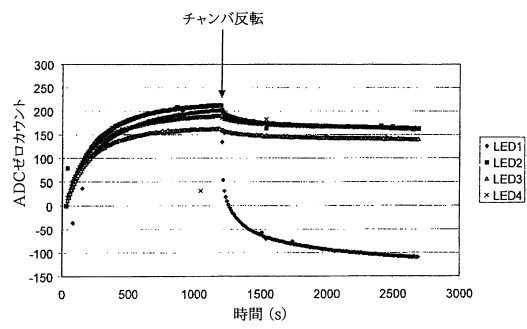


Fig. 3

【図 4】



フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I			
G 0 1 N	21/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/553	
G 0 1 J	5/00	(2006.01)	G 0 1 N	21/00	A
			G 0 1 J	5/00	Z

(74)代理人 100118843

弁理士 赤岡 明

(74)代理人 100124372

弁理士 山ノ井 傑

(72)発明者 ティモシー、ジョセフ、ニコラス、カーター

イギリス国ケント、シティングボーン、ケント、サイエンス、パーク、ギラット、アベニュー、100、ピバクタ、リミテッド

(72)発明者 スティーブン、アンドリュー、ロス

イギリス国ケント、シティングボーン、ケント、サイエンス、パーク、ギラット、アベニュー、100、ピバクタ、リミテッド

審査官 赤坂 祐樹

(56)参考文献 特開2002-122597(JP,A)

特表平07-507312(JP,A)

特表2006-522930(JP,A)

国際公開第2005/107939(WO,A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3 - 3 3 / 5 5 3

G 0 1 N 2 5 / 4 8

G 0 1 J 5 / 0 0

G 0 1 N 2 1 / 0 0