

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4007624号  
(P4007624)

(45) 発行日 平成19年11月14日(2007.11.14)

(24) 登録日 平成19年9月7日(2007.9.7)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 2 1

請求項の数 2 (全 18 頁)

|              |                            |           |                      |
|--------------|----------------------------|-----------|----------------------|
| (21) 出願番号    | 特願平8-22758                 | (73) 特許権者 | 591003013            |
| (22) 出願日     | 平成8年2月8日(1996.2.8)         |           | エフ. ホフマン-ラ ロシュ アーゲー  |
| (65) 公開番号    | 特開平8-248030                |           | F. HOFFMANN-LA ROCH  |
| (43) 公開日     | 平成8年9月27日(1996.9.27)       |           | E AKTIENGESELLSCHAFT |
| 審査請求日        | 平成14年7月1日(2002.7.1)        |           | スイス・シーエイチ-4070バーゼル・  |
| 審査番号         | 不服2005-1857(P2005-1857/J1) |           | グレンツアーヘルストラツセ124     |
| 審査請求日        | 平成17年2月3日(2005.2.3)        |           |                      |
| (31) 優先権主張番号 | 385300                     | (74) 代理人  | 100066692            |
| (32) 優先日     | 平成7年2月10日(1995.2.10)       |           | 弁理士 浅村 皓             |
| (33) 優先権主張国  | 米国(US)                     | (74) 代理人  | 100072040            |
|              |                            |           | 弁理士 浅村 肇             |
|              |                            | (74) 代理人  | 100088926            |
|              |                            |           | 弁理士 長沼 暉夫            |
|              |                            | (74) 代理人  | 100102897            |
|              |                            |           | 弁理士 池田 幸弘            |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 吸着担体材料による結合アッセイのための装置及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

結合アッセイを行うための装置であって、

(a) 第一の所定の位置に第一の試薬を固定化した第一の吸収性材料(101); および  
(b) 第一の吸収性材料(101)とその上面で接触し、第二の所定の位置に第二の試薬を放出可能に固定化した第二の吸収性材料(106)を有してなり、

同第一の吸収性材料(101)および第二の吸収性材料(106)は、第一の吸収性材料(101)を通過する液体の流れが第二の吸収性材料(106)から同第二の試薬を放出させ、第一の吸収性材料(101)を通過して流れるように、互いに並列する位置にあって、第二の吸収性材料(106)は、横幅全体にわたって長手方向に伸びる粘着性の裏打ちをもったポリエステルフィルム(107)によって第一の吸収性材料(101)に強固に結合し、同ポリエステルフィルム(107)は第二の吸収性材料(106)の上面を覆い、同ポリエステルフィルム(107)の長手方向の両端は第一の吸収性材料(101)の上面に接着する、

10

結合アッセイを行うための装置。

【請求項2】

結合アッセイを行う方法であって、

請求項1記載の装置の第一の吸収性材料(101)に液体試料を導入し、同第一の吸収性材料(101)内に第一の液体の流れを発生させ、この第一の液体の流れは、第二の吸収性材料(106)に到達すると、二つの流れに分かれ、これにより、第一の吸収性材料

20

( 1 0 1 ) から液体を第二の吸収性材料 ( 1 0 6 ) に導入し、第一の吸収性材料 ( 1 0 1 ) 内に第一の液体の流れを維持しながら、第二の吸収性材料 ( 1 0 6 ) 内に第二の液体の流れを発生させ、そして、第二の試薬を第二の吸収性材料 ( 1 0 6 ) 内で第二の液体の流れのなかに流動させ、第二の試薬の流動後、第二の液体の流れは、第一の吸収性材料 ( 1 0 1 ) 内の第一の液体の流れと大体平行する方向にあり、そして、第二の液体の流れおよび第二の試薬を第二の吸収性材料 ( 1 0 6 ) から第一の吸収性材料 ( 1 0 1 ) に導入し、第一の吸収性材料 ( 1 0 1 ) 内で第一の液体の流れと合流させることからなる、結合アッセイを行う方法。

【発明の詳細な説明】

【 0 0 0 1 】

10

【発明の属する技術分野】

本発明は、結合アッセイ実施のための装置及び方法に関するものである。

また、本発明は、試薬輸送のための多孔性担体材料を使用するアッセイにも関するものである。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

特異的結合アッセイは、多くの応用において有用な価値ある道具である。このようなアッセイは、一つが分析対象物である二つ以上の結合成分を含む。特異的結合成分の例は、抗体及び抗原、DNA および / または RNA ハイブリッド形成、ならびにレセプタ - リガンド相互作用を含む。多くの特異的結合アッセイフォーマットがこの技術において知られており、競合、サンドウィッチおよび凝集アッセイ法がそれらに含まれる。あいにくなことに、特異的結合は常に観測可能なものではない。従って、結合を間接的あるいは直接的に観測可能とするために、標識技術が開発された、典型的には標識付けは、一方または両方の結合成分に検出可能な標識を結合することを含む。

20

【 0 0 0 3 】

放射性同位体、蛍光剤、および酵素は、検出のために装置および / または特殊な処理を必要とするため、“間接的”標識の例である。対照的に、“直接的”標識は、肉眼で見ることができ、検出のために特殊な処置または装置を必要としない。金属性ゾル、色素ゾルおよび着色ラテックスは、“直接”標識の例である。

【 0 0 0 4 】

30

最近では、結合アッセイ法および多孔性担体材料を組み合わせた技術が開発されている。結合対の一方の成分 (例えば、抗体または抗原) が、例えば吸着または共有結合によるこの技術で周知の多くの方法の一つにより多孔性の担体材料 (例えば繊維状または多孔性膜) 上に固定化される。

【 0 0 0 5 】

例えば、競合アッセイにおいて、分析対象物を含む試料は、典型的には、固定化成分と特異的に結合可能な標識分析対象物または標識分析対象物類似体 (試薬) と混合される。次いで、混合物は多孔性担体材料に負荷される。該多孔性担体材料内の毛細管芯により生じる該混合物の移動は、試薬を、固定化された特異的結合成分の結合部位の限られた数について競合する位置に運搬する。標識試薬の一部は、固定化試薬に特異的に結合し、次いで固定化される。結合される標識試薬の量は、試料中の分析対象物の量に反比例する。

40

【 0 0 0 6 】

過剰の未反応材料は、例えば多孔性担体材料に適当量の溶離液をかけることにより、洗浄にて除去される。洗浄後、標識は現像および / または測定 (“間接”標識) されるか、または目視評価 (“直接”標識) されうる。標識試薬は、湿らせた場合に移動性となるように、多孔性担体材料に染み込ませることもできる。そのような場合には、試料の添加それ自体がアッセイを開始し、操作を行うために充分であろう。

【 0 0 0 7 】

Deutsche から (それらの内容をここに参考として取り入れる米国特許第 4, 094, 647 号、4, 235, 601 号および 4, 361, 537 号) は、試料の特徴の測定 (

50

特異的結合アッセイ)のための試験装置を開示しており、これにおいては試薬類が混合され、移送用切片要素中を移送される(1987年5月7日発行のBakerら、WO87/02774も参照)。一実施態様において、第一の放射標識試薬を切片中に染み込ませ、第二の試薬をマイクロビーズへの結合を介して第一の試薬より下流側の切片上に固定化する。試料は第一の試薬より上流に負荷され、該切片の開始側末端が溶離液に浸される。溶離液は切片中を移動し、試料を拾い上げる。試料を含んだ溶離液は、第一の試薬を再度水和させ、それを試料と混合し、該試料および第一の試薬を第二の試薬まで移送し、ここにおいて特異的結合反応が放射標識試薬の一部を固定化する。過剰量の放射標識試薬は、切片の終末端に向けて洗い流される。別法として、標識試薬は切片体に直接に負荷されてもよい。

10

**【0008】**

Kelton等に対して発行された米国特許第4,938,927号(その内容をここに参考として取り入れる)は、流体閉止手段により多数の流体経路に分割された円形のクロマトグラフィー用膜を含む回転式流体マニピュレータを開示している。各流体経路は、標識特異的結合試薬および固定化特異的結合試薬を含む。試験標本は、標識試薬上またはその近傍に負荷される。次いで、溶離液が膜中央に近接する特殊な位置に適用される。溶離液は特定の経路を芯および遠心力によって円形の外方に向けて移動する。特異結合アッセイそれ自体の原理はDeutsch等に記述されるものと同等である。

**【0009】**

Sun等と与えられた米国特許第5,238,652号(その内容をここに参考として取り入れる)は、乱用される薬剤を示す抗原等の特定の非-蛋白質抗原の競合アッセイのための分析試験装置に関する。非-蛋白質抗原のための検出用抗体により感作された着色ラテックス粒子が、クロマトグラフィー用膜に、ラテックス球体が乾燥時には固定化され、液体との接触時には移動可能となるように直接に塗布される。該ラテックスの下流において、膜には永久的に固定化される薬剤接合プローブが染み込まれる。例えば、体液等の試料が膜に塗布されると、ラテックス粒子は該試料により再懸濁され、接合体に向けて移動する。薬剤またはその代謝産物が試料中に存在すると、ラテックス上の抗体への結合がこの移動中に起こるのであろう。薬剤または薬剤代謝物の量が全ての抗体結合部位を使い果たすに充分である場合には、着色ラテックス粒子の薬剤接合プローブへの結合は阻害されるであろう。試料中に薬剤または薬剤代謝物がない場合には、着色ラテックス粒子は薬剤接合体に結合して明確な着色バンドを形成するのであろう。

20

30

**【0010】**

May等に付与された英国特許第0291194号は、クロマトグラフィー用多孔性膜を入れた窪み状枠を有してなる分析試験装置が開示されている。該装置は、また分析対象物に対する標識(例えば、着色ラテックス等)された特異的結合試薬、および膜上に永久的に固定化された同じ分析対象物に対する非標識特異的試薬を含む。液体試料は毛細管現象により膜に染み込み、標識試薬を拾って非標識特異的試薬を持つ区域に移動する。試料中の分析対象物の存在は、サンドウィッチまたは競合様式のいずれかを使用して、標識試薬の結合の程度で測定される。

**【0011】**

標識試薬の膜への非可逆的固着を引き起こし得る標識試薬と膜との間の望まぬ相互作用を最小化するために、標識試薬を表面層として塗布することが示唆されている。これを達成するためには、蔗糖またはセルロース水溶液等の上塗り材料が上塗り層を形成するために標識試薬の塗布に先立って塗布される。次いで、標識試薬が該上塗りの表面に塗布される。しかしながら実際的には、上塗り材料は標識試薬と同様に膜の厚み方向にある程度は侵入する。

40

**【0012】**

May等に付与された米国特許第5,275,785号(“May ’785”、その内容をここに参考として取り入れる)には、異なった毛細管芯能力を有する複数の液体誘導膜および液体の流れを調節するための液体-膨張可能な“スイッチ”材料を結合させたクロ

50

マトグラフィー的試験装置が開示されている。個々の膜における異なった液体移動速度は、液体 - 膨張可能な“スイッチ”材料（膜間の接触を確立し、あるいは中断する）との組合せにより、試薬を検出領域にある順番および／または割合で搬送することを可能とする。

#### 【 0 0 1 3 】

##### 【発明が解決しようとする課題】

あいにく、上記に引用した技術は、多くの不都合を抱えていた。特に懸念される問題点は、乾燥した結合試薬を移動させることにあり：第一には移動される試薬の量に関し、第二には移動の様式にある。目標は試薬を定量的に移動させることにあるのであるが、このことは試薬が多孔性材料に非可逆的に固着する傾向にあるために実際的にはしばしば不可能となる。

10

#### 【 0 0 1 4 】

試薬を均一に移動させて濃度勾配が無いが、または最小となる連続体を形成することが望ましい。このような連続体は、結合の均一な程度（競合アッセイにおいては特に重要である）のために有利に働き、また再現性のある均質な生成バンドを好ましいものとする。試薬の溶液の全体に亘った移動および均質濃度を達成するための一つの既知の方法は、試料と、例えば標識結合試薬等の液体結合試薬とを予め混合し、次いで該混合物を試験装置に直接に、または媒介する試料パッドを介して適用することである。しかしながら残念なことに、この多工程の方法は、実験誤差の原因となり、また危険を含んだ試料の取り扱いが増大する。

20

#### 【 0 0 1 5 】

一工程装置は、試験を行うために試料添加の単一工程のみを必要とする。通常、結合試薬は、多孔性担体材料と連続的に接触する吸着材料中に埋め込まれるか、または多孔性担体材料に直接に塗布される。しかしながら、これらの場合に試料の液体の先頭部は、乾燥した含浸結合試薬を該試薬濃度が先頭部で最も高くなるように不均一に移動させ、従って、多孔性担体材料中のいかなる変動にも極めて敏感である不均一な濃度パターンを生じる。わずかなロット毎の差異でさえも、悪影響の原因となり得、標識試薬の厳密な検定を必要とする。検定は分析対象物のカットオフ濃度における性能に関して選択されるため、分析対象物がない場合とカットオフでの分析対象物の信号との実質的な区別を達成することがしばしば困難である。

30

#### 【 0 0 1 6 】

既知の一工程システムの他の不都合は、標識結合試薬の不均一な移動およびラテックスの乏しい再水和である。先行技術は、結合試薬を上塗り材料表面の表層に塗布することにより乏しい水およびラテックスの非可逆的な固着の問題を克服しようと試みている（例えば、上記に議論した M a y 等を参照）。しかしながら、上塗り材料を形成する粘性の化合物は、移動を困難とし、渦の原因となる。このことは、乏しい再現性および破綻した結果としてのバンドをもたらす。競合的フォーマットでは、この不都合はサンドウィッチアッセイのフォーマットより更に深刻である。

#### 【 0 0 1 7 】

従って、本発明の目的は、上述の問題点を克服することを可能ならしめるアッセイ装置を提供することである。

40

#### 【 0 0 1 8 】

##### 【課題を解決するための手段】

本発明によるアッセイ装置は、

（ a ）第 1 の所定位置においてその上に固定される第 1 の試薬を有する第 1 の吸着材料；および

（ b ）第 1 の吸着材料と接触し、第 2 の所定位置においてその上に放出可能に固定される第 2 の吸着材料を有してなり、該第 1 の吸着材料および第 2 の吸着材料は、第 1 の吸着材料を通る液体の流れが第 2 の吸着材料からの該第 2 の試薬の放出を生じ、該第 1 の吸着材料を通して流れるべく、互いに並列する位置にあることを特徴とするものである。

50

## 【 0 0 1 9 】

本発明の結果としての主な優位点は以下の通りである：

## 【 0 0 2 0 】

本発明は、上述した問題を克服し、特異的結合試薬を含む付加的表面膜（多孔性担体材料）の使用により改良された特異的結合アッセイ法を提供する。特異的結合試薬を染み込ませた付加的な独立膜を通して、特異的試薬の再水和および試料によるその希釈の程度が調節され、これによってアッセイの性能が至適化される。この固有の設計は、標識試薬のより均一な移動パターンを達成し、過剰体積の試料が負荷された場合に膜体の望ましからぬ溢れを除く。

## 【 0 0 2 1 】

10

## 【 発明の実施の形態 】

本発明は、限定されるものではないが、特異的アッセイ、特に薬剤の乱用アッセイを実施するためのアッセイ装置を用いて使用され得る。そのようなアッセイ装置は、多孔性担体材料の試験片を組み込むために構成され、またそのような寸法に形成される。この型の装置は、その内容をここに参考として取り入れる公開番号 E P - A - 0 6 6 8 7 4 5 を持つ欧州特許出願に開示されている。

## 【 0 0 2 2 】

本発明によるアッセイ装置においては、好ましくは第 1 の吸着材料および第 2 の吸着材料が同じ材料からなる。

## 【 0 0 2 3 】

20

本発明によるアッセイ装置においては、好ましくは第 1 の吸着材料が吸収性膜および多孔性膜からなる群から選択される。第 1 の吸着材料は、好ましくはニトロセルロースである。

## 【 0 0 2 4 】

本発明によるアッセイ装置においては、好ましくは第 2 の吸着材料が吸収性膜および多孔性膜からなる群から選択される。第 2 の吸着材料は、好ましくはニトロセルロースである。

## 【 0 0 2 5 】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第 1 の吸着材料および第 2 の吸着材料は、支持体によって互いに接触するように支持され、該支持体は、好ましくは帯状の材料であり、前記帯状材料は好ましくはポリエステルフィルムである。

30

## 【 0 0 2 6 】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第 2 の試薬は標識され、標識は好ましくは着色ラテックスである。

## 【 0 0 2 7 】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第 1 の吸着材料は、それに固定化される複数の試薬を有する。

## 【 0 0 2 8 】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第 2 の吸着材料は、それに固定化される複数の試薬を有する。

40

## 【 0 0 2 9 】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第 1 の試薬及び第 2 の試薬は、互いに結合するための親和性を有している。

## 【 0 0 3 0 】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第 1 の試薬及び第 2 の試薬は、それぞれ同様な物質と結合するための親和性を有している。

## 【 0 0 3 1 】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第 1 の吸着材料の芯速度は、第 2 の吸着材料の芯速度と同じかまたはそれ以上である。

## 【 0 0 3 2 】

50

本発明によるアッセイ装置の更に好ましい実施態様において、第１の吸着材料の芯速度は、第２の吸着材料の芯速度より低い。

【００３３】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第１の試薬は、第１の吸着材料上に非可逆的に固定化される。

【００３４】

本発明によるアッセイ装置の好ましい実施態様において、第１の吸着材料及び第２の吸着材料は、それぞれ平面上の表面を有する。特に好ましい実施態様において、第１の吸着材料の平面上の表面は、第２の吸着材料の平面上の表面に並置される。

【００３５】

10

本発明による結合アッセイを実施する方法は：

（ａ）第１の吸着材料に液体試料を導入して該第１の吸着材料中に第１の液体流を生成させ；

（ｂ）第１の吸着材料からの液体を第２の吸着材料に導入して第１の吸着材料中の第１の液体流を維持しつつ、第２の吸着材料中に第２の液体流を生成させ；

（ｃ）第２の試薬を、第２の吸着材料中の第２の液体流に導入し、第２の試薬導入後に、該第２の流れが第１の吸着材料中の第１の液体流と全体に平行する方向にあり；および

（ｄ）第２の液体流および第２の吸着材料からの第２の試薬を、第１の吸着材料に導入して第１の吸着材料中の第１の液体流と合流させること

を含んでなることを特徴とする。

20

【００３６】

本発明による方法の好ましい実施態様において、第１の吸着材料中の第１の液体流は、第２の吸着材料中の第２の液体流と同じか、またはそれ以上の速度で流れる。

【００３７】

本発明による方法の好ましい実施態様において、第１の吸着材料中の第１の液体流は、第２の吸着材料中の第２の液体流より小さい速度で流れる。

【００３８】

本発明の実施態様は、ここに添付する図面を参照して記述され、ここにおいて、

【００３９】

図１は、カバーパネルを外したアッセイ装置の試験片室の正面図を表す。

30

【００４０】

図２は、図１の側断面図を表す。

【００４１】

図３は、アッセイ装置のカバーパネルを表す。

【００４２】

図４は、本発明による試験片の斜視図を表す。

【００４３】

図５は、本発明の装置を用いて行われたアッセイに関する色測定密度対モルヒネ濃度のグラフを表す。

【００４４】

40

図６は、IVEK Digisense 2000<sup>TM</sup>システムを使用し、試薬が調合されたニトロセルロースを使用して行われたアッセイに関する色測定密度対モルヒネ濃度のグラフを表す。

【００４５】

図７は、本発明の装置を用いて行われたアッセイに関する色測定密度対テトラヒドロカンナビノイド（THC）濃度のグラフを表す。

【００４６】

図８は、IVEK Digisense 2000<sup>TM</sup>システムを使用し、試薬が調合されたニトロセルロースを使用して行われたアッセイに関する色測定密度対THC濃度のグラフを表す。

50

## 【 0 0 4 7 】

図 9 は、P a a s c h e エアブラシを使用して試薬が噴霧されたニトロセルロースを使用して行われたアッセイに関する色測定密度対 T H C 濃度のグラフを表す。

## 【 0 0 4 8 】

図 1 0 は、蔗糖が上塗りされたニトロセルロース上で行われたアッセイに関する色測定密度対 T H C 濃度のグラフを表す。

## 【 0 0 4 9 】

図 1 1 は、蔗糖の上塗りの上にメチルセルロース溶液中のラテックスが塗布された上塗りニトロセルロースを使用して行われたアッセイに関する色測定密度対 T H C 濃度のグラフを表す。

10

## 【 0 0 5 0 】

本発明は、下記に好ましい実施態様をもって記述される。これらの実施態様は、発明の理解を助けるために示されるものであって、限定として解釈されるべきものではない。

## 【 0 0 5 1 】

本発明の装置および方法は、臨床化学、妊娠および類似の試験に加えて、コカイン、アンフェタミン類、カンナビノイド類、バルピタール酸類、ベンゾジアゼピン類、アヘン製剤類、フェンシクリジン類、プロボキシフィン類、三環式抗鬱剤類およびメタドン等の乱用される薬剤の試験に使用するために特に好適である。

## 【 0 0 5 2 】

該明細書に亘って使用されるように、“膜”、“多孔性担体材料”および“吸着材料”なる用語は、相互に可換に使用され、ここに記述されるアッセイのために好適な材料を意味する。

20

## 【 0 0 5 3 】

発明の理解のためにいくつかの位置的な用語が使用されている。“表面”および“主”膜は、“前部”および“後部”なる用語にて記述されている。“前部”は、長手方向の中間点（膜中の液体流の方向に位置する）を越えて伸びる膜の部分である。膜の最前部は、“末端部”として引用される。“後部”は、前部の反対部分で、最初に液体試料と接触する末端向きの長手方向中間点の先にある膜の部分に関連する。膜の最後部は、“始端部”として引用される。“下流”は、膜中を液体が流れる向きである。反対に“上流”は、膜中の液体流の反対の向きである。

30

## 【 0 0 5 4 】

試料は、主膜の始端部に吸収され、主膜の長さ方向に沿って毛細管作用により移送される。一般的には、膜の長さは 1 - 1 0 c m の範囲、幅は 0 . 4 - 2 c m、厚さは 0 . 1 - 1 m m である。典型的には膜は、細長く薄い長方形の角柱の形状を持つ。

## 【 0 0 5 5 】

試料の流れが試薬含有表面膜（一般的に標識試薬を含む）に到達した場合に、それは二つの流れに分割され：第 1 のものは主膜中を進行し、第 2 のものは、典型的には後部の表面膜に染み込み、該表面膜中に位置する試薬を移動させる。該表面膜中の試薬は、湿った状態において移動性である。明快さのために単一の試薬が該表面膜にあるものとして記述されるが、複数の試薬も使用され得ることが認識されなければならない。同様にして、1 種

40

## 【 0 0 5 6 】

好ましい標識は、着色コロイド状粒子であり、着色ラテックスが最も好ましい。着色ラテックスは、検出区域に結合した際に裸眼にて容易に見ることができ、従って、更に現像処理を必要としない。特異的結合試薬を用いたラテックスの感作方法は、この技術で周知である（例えば、I l l u m , L . および P . D . E . J o n e s の、微小球体へのモノクローナル抗体の固定化、Methods in Enzymology, Vol . 1 1 2 , 6 7 - 8 4 頁（1 9 8 5）ならびに G a l l o w a y , R . J . の、微粒子試験および免疫アッセイの開発、Seradyne, Inc. 6 - 3 1 頁（1 9 8 8）参照）。上記に暗に言及されるように、複数の試薬が 1 以上の表面膜にて使用されてもよい。斯くして

50

複数の結合試薬、例えば抗原および/または抗体により感作された複数のラテックス含有膜、または一つのラテックス含有膜が使用され得る。

【0057】

2つの平行する流れは再統合され、表面膜の前部端またはその近傍の主膜中で混合される。移動が主膜中の検出部位に向けて続く間に、試薬と分析対象物との間の結合反応が起こる。アッセイが競合またはサンドウィッチ様式であるかに依存して、結合の程度または単に分析対象物の存在が、固定化試薬との特異的結合が起こる検出部位にて測定される。非結合物質は、主膜の末端に向けて下流に移動し続け、対照部位にて部分的に捕捉される。非結合標識試薬は、検出または対照部位には残らない。

【0058】

主膜上には、特異的結合試薬（一般に非標識）が固定化される（即ち、固定化される特異的結合試薬が展開される液体によって洗い流されない）検出部位がある。該検出部位の下流には、他の結合試薬が固定化される対照部位がある。組み合わせられた場合に、表面膜は検出部位の上流において主膜の上側表面と接触している（図4参照）。

【0059】

選択肢として、液体試料を吸収させ、該液体を主膜の始端部に放出するために試料パッドを使用することができる。試料パッドは、典型的には吸い取り材料から形成され、主膜に接触される。該試料パッドは、場合により付加的な試薬を含んでもよい。

【0060】

場合により、過剰量の試薬溶液を吸収し、主膜中の毛細管流をより長時間、助長するために、主膜の末端に吸い取り材料から形成される“染み込み”パッドを使用することができる。

【0061】

膜およびパッドは、好ましくは支持体中に配置される。試料パッドおよび染み込みパッドの使用は、ここに参考として取り入れる米国特許第4,956,302号および5,238,652号に記述されている。本願明細書を読んだ当業者は、本発明との組合せにおいて、このようなパッド類を使用することができるであろう。

【0062】

好適な表面および主膜は、薄層クロマトグラフィー材料、紙またはセルロースクロマトグラフィー物質、多孔性の合成プラスチック等の毛細管作用が可能な吸収性または繊維状材料を含む。好ましい吸収材料は、良好な芯としての能力、“主”および“表面”膜の間の良好な接触を保証するなめらかな表面、定量的な移動を向上する膜に対する標識化合物の可逆的結合、毛細管作用により標識試薬を輸送する能力、適当な範囲の芯特性の能力、再現性を有しかつ好都合な試薬塗布ならびに操作性を有する。

【0063】

好ましい膜は、ニトロセルロースおよびナイロンを含む。更に、プラスチック上の既製の膜は、取り扱い上好都合であるため好ましい。ニトロセルロースは、(i)複雑な共有結合無しに吸着により蛋白質に結合することができ、(ii)優れた芯特性を有し、ならびに(iii)細孔の径の都合よい範囲が利用可能であることから望ましい。裏打ちセルロース（例えば、プラスチック材料上へのプレキャスト）は最も好ましい。検出および対照部位を形成するためのニトロセルロース上への特異的蛋白質の吸着方法、およびニトロセルロース上の非占有結合部位の中性封止剤による封止は、この技術で周知である（例えば、Harvey, M. A.、ニトロセルロース膜に基づく免疫アッセイの至適化、Schlicher & Schuell, No. 557, 18-23頁, 1991参照）。

【0064】

移動速度は、膜の性質、例えば細孔の大きさにより変化する。流速、適切な膜のタイプ、および細孔の大きさの選択は、当業者の知識の範囲内にあり、最小の実験にて決定される。

【0065】

表面膜内の流体力学のために、試薬（典型的には標識される）は、表面膜の前部末端にて

10

20

30

40

50

濃縮され、第1の流れと混合される主膜中にゆっくりと滲み出る傾向がある。希釈の程度は、本発明においては、既知の構成と同様に試薬の移動化速度によるよりも、むしろ流体力学により調節されるものと仮定されてきた。従って、本発明は主膜中の下流で起こる再統合された流れにおいて、表面膜試薬の相対的に一定の濃度となる優位点を与える。この試薬の一定濃度は、表面膜における試薬の供給が続く限り維持される。

#### 【0066】

表面膜からの試薬希釈速度は、主膜および表面膜の間の芯速度の適切な差異を選択することによって調節される。“芯速度”は、膜内の液体移動速度（距離／時間）を指す。表面膜は、同じ材料、または他の好適な多孔性担体材料から作られ得る。しかしながら、便宜のために表面および主膜は一般的に同じ材料から製造される。このような適切な膜材料の選択は、本願明細書を読んだ当業者によれば容易に行われる。例えば、より高速の希釈が要求される場合には、試薬はより遅い芯特性をもった膜を介して、例えばより小さい細孔の大きさを有する膜を使用して塗布される。主膜の芯速度は、好ましくは表面膜の芯速度より大きい、または同等である。結果として表面膜からの試薬は、主膜の液体先端部の後方にて主膜に染み込み、而して第1の流れが主膜を予め湿潤化することを許容する。予めの湿潤化は、(i) 表面膜からの試薬の均質な移動を容易にし、(ii) 検出部位における非標識試薬のための疎水性による逆効果を除去するか、少なくとも有意に低減し、ならびに(iii) 検出部位における結合を容易にする。

#### 【0067】

標識結合試薬は、通常は膜表面に対する標識試薬の非特異的結合を避けるために封止化合物により予め封止された膜に塗布される。

#### 【0068】

膜は切断することができ、試験片は任意の好適な様式に組み立てられる。別法として、膜はある寸法の仕様に予め形成されてもよい。例えば、最初に主膜の表面に表面膜を固定して大きい部分を組み立て、次いでこれを片に切断することも好都合であり得る。表面膜は、好ましくは主膜と同じ幅であるか、またはより狭い。各膜の長さは、経験的に決定されるが、結合試薬の必要量を収容するためにちょうど十分な寸法をもった比較的短い膜が好ましい。膜と検出部位との間の正確な寸法は、試薬の適切な混合に必要な時間と結合反応の完結に必要な時間との均衡により決定され、距離が長すぎると均一な移動が困難となる。このような特定のパラメータは、最小の実験により決定される。現在では0.5 cm ~ 5 cmの範囲の距離が好ましい。主膜上の表面膜の位置は、検出部位の上流側であるが、試料塗布部位の下流側となる。

#### 【0069】

主および表面膜の積層は、過剰量の試料が膜外部に出ることによる時に起こる膜の溢れを阻止する。試料の溢れの波が試薬が埋設される位置に達すると、試験結果を完全に歪めてしまうであろう。この問題は、試料が下方に移動する様な適用において特に深刻である。

#### 【0070】

表面および主膜の間の接触は、多くの方法によって達成され得る。例えば、主および表面膜は、収容要素によって互いに押圧されるか、あるいは一方を他方に対して、または両者が積層されてもよい。積層は、信頼性のある“堅固な”接触が達成されるため好ましい。更に、積層は、溢れを阻止する堰として作用する。膜間の接触を最大にする好ましい方法は、下記の例に記述されるマイラーテープ等のポリエスチルフィルムを使用して主膜上に表面膜を並置して積層することを含む。

#### 【0071】

一般に、表面膜の試薬が、感知可能な程度に膜間の界面を横切らないことが望ましく、むしろ完全に表面膜内を前部末端に向けて移送されるべきである。

#### 【0072】

図1～4は、特異的結合アッセイを実施するためのクロマトグラフィー原理を使用した特定の装置を表す。3種の異なる分析対象物を試験する3個の多孔性担体膜がプラスチック支持体102内に示されている。この様な支持体は、その内容をここに参考として取り入

10

20

30

40

50

れる欧州特許出願公開 E P - A - 0 6 6 8 7 4 5 に開示されている型のアッセイ装置の一部を形成している。典型的には、プラスチック支持体 1 0 2 は、3 ~ 5 個の多孔性担体膜を支持する。図 1 は 3 個の多孔性担体膜を示し、その一方で図 3 は、5 個の多孔性担体膜用の窓を示す。

#### 【 0 0 7 3 】

主膜 1 0 1 は、検出部位 1 0 3 および対照部位 1 0 4 を有する。標識化特異的結合試薬 1 0 5 は、主膜 1 0 1 の上面に接触する表面膜 1 0 6 内に埋設される。表面膜 1 0 6 は、例えば粘着性マイラーテープ 1 0 7 等の粘着性の裏打ちをもったポリエステルフィルムを用いて主膜 1 0 1 に強固に結合する。接触し、好ましくはわずかに重複する各主膜 1 0 1 の始端部 1 0 8 は、試料パッド 1 0 9 である。試料は、パッド裏面のいくつかの小孔（示していない）を通して試料パッド 1 0 9 に接触する。試料パッド 1 0 9 の頂部に軟質のゴムシール 1 1 0 が付けられている。必要とされる柔軟性は、当業者により容易に決定される。シール 1 1 0 は、試料パッド 1 0 9 よりも若干寸法的に大きく、試料パッドを覆い、かつ押し込まれた際にその境界に沿って封止する。

#### 【 0 0 7 4 】

クロマトグラフィー膜が垂直に設置される場合に、試料の漏れを防止するために封止が必要とされる（試料は下向きに移動する）。当然であるが、シールは 1 1 0 は、装置が垂直位置以外で使用される場合にも用いられ得る。クロマトグラフィー膜の末端 1 1 2 の吸収パッド 1 1 1 は、3 個の膜全てについて共通になっている。それぞれの検出部位は、カバーパネル 1 1 5 の十字形の結果窓 1 1 3 を通して、また対応する対照部位は円形の対照窓 1 1 4 を通して観測されうる。カバーパネルのプラスチックは、典型的には透明ではない。C O C のラベルを付した十字形の結果窓は、尿中のベンゾイルエクゴニン検出のためのアッセイ用である。テトラヒドロカンナビノイドを意味する T H C のラベルを付した十字形の結果窓は、尿中のカンナビノイド類検出のためのアッセイ用である。M O R のラベルを付した十字形の結果窓は、尿中のアヘン類検出のためのアッセイ用である。T E S T C O M P L E T E のラベルを付したそれぞれの円形窓 1 1 4 内の青色バーの出現は、対応する試験が完了まで操作され、結果が解釈されてもよいことを示すものである。これらの窓 1 1 4 は、抗 - ウシ血清アルブミン抗体により被覆された膜片の領域を露呈する。ラテックス微小粒子は、ウシ血清アルブミンにて被覆され、それらが膜のこの領域を移動する際に抗体がウシ血清アルブミンに結合して微小粒子を捕捉する。

#### 【 0 0 7 5 】

本発明は、競合アッセイ様式において特に有用である。この様式の一つの型において、表面膜中の標識試薬は分析対象物それ自体であるか、特異的結合の同様な型が可能な類似体である。標識試薬は試料により移動可能とされると共に希釈され、分析対象物またはその構造的類似体に対して結合可能な非標識試薬が固定化される検出部位に向けて、試料と共に移動する。試料中に分析対象物が存在する場合には、それは検出領域の限られた数の結合部位について標識試薬と競合し、分析対象物の相対濃度が標識試薬の結合の低減の程度から測定され得る。

#### 【 0 0 7 6 】

別の型において、競合は時間分割される。この場合に、標識試薬は分析対象物またはその構造類似体の結合相手である。標識試薬は試料により移動可能とされると共に希釈され、非標識の分析対象物またはその類似体が固定化される検出部位に向けて、試料と共に移動する。分析対象物が試料中に存在する場合には、移動過程の間に標識試薬と結合するであろう。残留する標識試薬の不飽和結合部位は、検出部位の固定化試薬と結合しうる。再度、分析対象物の濃度は、標識試薬の結合の低減の程度から測定され得る。競合様式の両者の型について、移動する液体中の結合成分の濃度比は、標識試薬の移動領域の寸法に亘って有意に変動してはならない。また、均一性は、検出部位への異動期間に亘って崩壊してはならない。流れの均一性の偏差は、競合のゆらぎを許容し、乏しい再現性の結果をもたらす。本発明は、不均一性を最小にし、標識試薬を更に希釈することにより感度を改善する（下記に記述される）。

10

20

30

40

50

## 【0077】

分析対象の不在とカットオフの分析対象濃度との間の識別は、標識試薬の全体量を増大し、かつその存在する体積を増大することによって改善されうる。結果として、ゼロ薬剤濃度における分析信号はより強くなり、その一方でカットオフ水準の信号は変わらずに維持されて、急峻な検量曲線がより良い識別を可能とする。

## 【0078】

本発明は、サンドウィッチ様式においても有用である。この様式において、標識試薬および非標識固定化試薬の両者は、分析対象物の結合相手である（但し、それらは典型的には分析対象物の異なるエピトープに結合しなければならない）。好ましくは、標識および固定化非標識試薬の両者は、分析対象物の過剰量をもって存在する。試料中に分析対象物が存在すると、移動過程においてそれは標識試薬と完全に結合する。検出部位において、標識試薬と既に結合した分析対象物は、固定化試薬に結合し、サンドウィッチを形成する。分析対象物濃度は、検出部位における結合に直接に比例する。

## 【0079】

## 【実施例】

## 例 1

以下のモルヒネアッセイの例は、発明を例示するために提供されるものである。しかしながら、本発明がいずれの特定の物質についても限定されるものではないことは指摘されなければならない。

## 【0080】

モルヒネ誘導体、N - [ 3 - [ ( 7 , 8 - ジデヒドロ - 4 , 5 - エポキシ - 6 - ヒドロ - 17 - メチルモルフィナン - 3 - イル ) オキシ ] プロポキシ ] - 4 - イソチオシアナトベンズアミドは、欧州特許出願公開 E P - A - 0 3 8 6 6 4 4 の記述に従って調製された。

## 【0081】

このモルヒネ誘導体とウシ血清アルブミン ( B S A ) との接合は、以下のようにして行われた：50 mM のリン酸カリウム、p H 8 ( 438 mL ) 中の B S A の溶液 ( 約 57 mg / mL ) ( 氷浴中にて冷却 ) に、ジメチルスルホキシド ( D M S O ) を滴々添加した ( 188 mL ) 。25 まで加温後、D M S O ( 190 mL ) 中の上記誘導体の 5 mg / mL の溶液を滴々添加した。該反応混合物を室温にて 16 時間攪拌し、次いで透析チューブに移し、最初に 15 容の 20 % D M S O - リン酸カリウム緩衝溶液 ( 50 mM、p H 8 ) 、第 2 に 10 % D M S O - リン酸カリウム緩衝溶液、第 3 には更に 4 回リン酸カリウム緩衝溶液に対して透析した。

## 【0082】

着色された均質なカルボキシレート - 修飾スチレン微粒子、例えば S e r a d y n のブルーラテックス ( 0 . 3 ミクロン粒子 ) を、最初に 1 % 固体にて 20 mM、p H 6 . 1 の M E S ( 2 - [ N - モルホリノ ] エタンスルホン酸 ) 中で 3 回遠心分離することにより洗浄した。次いで洗浄したラテックスを、M E S 中で 5 % 固体に調節し、( i ) 2 mg / mL の抗 - モルヒネモノクローナル抗体を用いて室温にて 16 時間感作し、( ii ) M E S 中の B S A 溶液を用い、室温にて 1 時間封止し、( iii ) M E S 中の 1 % 固体にて遠心分離により 3 回洗浄し、( iv ) 再度、5 % 固体に調節した。使用前に、等量のこのラテックスと M E S 中の 35 % w / v しよ糖とを混合した。

## 【0083】

ポリエステルフィルム上に直接に鋳られた大きい細孔のニトロセルロース、例えば M i l l i p o r e のマイラーにて裏打ちされた大きい細孔のセルロース ( 10 - 20 ミクロン ) を長さ 10 cm、幅 5 cm の小片に切断した。共に 50 mM リン酸カリウム緩衝溶液 p H 7 . 5 中の、モルヒネ - B S A 接合体 ( 約 5 mg / mL ) および抗 - B S A モノクローナル抗体 ( 約 2 mg / mL ) の溶液を、例えば、I V E K C o r p . D i g i s p e n s e 2000<sup>TM</sup> システム等の正の排出液体分配システムを使用して、10 cm の辺からそれぞれ 2 cm および 1 cm の距離でニトロセルロース上に 1 μ l / cm にて分配した。ニトロセルロース断片を 37 にて約 30 分間で乾燥させ、次いで 20 mM トリス、p H

10

20

30

40

50

8 中の 1 % ポリビニルアルコール ( P V A、分子量 13,000 - 23,000 ) の溶液を用いて室温にて 30 分間で封止した。次いで断片を水ですすぎ、乾燥させた。

【 0084 】

試料パッドは、セルロース濾紙、例えば B i o R a d ゲルブロッターを  $0.5\text{ cm}^2$  の小片に切断することにより調製した。同じセルロース濾紙を染み込みパッドに使用した。

【 0085 】

この例に上述されている同じニトロセルロースを、ラテックスのための分離膜 ( 表面膜 ) として使用した。この目的で、主膜と同様にして予め封止されたニトロセルロースを、5 mm 幅の小片に切断し、ラテックスを I V E K 分配システムを用いて塗布した。37 にて 30 分間乾燥後、この膜をニトロセルロース側をしたにして主膜上に置き、粘着性の裏打ちをもったポリエステルフィルム、例えば A d h e s i v e I n c . の粘着性マイラーを用いて主膜に積層した。その後、断片を 5 mm 幅の小片に切断し、試料パッドおよび染み込みパッドをそれぞれ小片の始端部および終端部に置き、予め決定された量の薬剤 ( 硫酸モルヒネ ) を含む溶液を使用して検量曲線を得た。

【 0086 】

至適検量曲線 (  $1.1\text{ }\mu\text{l/cm}$  のラテックス ) を図 5 に示した。この曲線および図 6 ~ 11 に示す曲線は、3 倍増感 ( tristimulus ) 反射式色分析装置、例えば M i n o l t a C R - 241 C h r o m a M e t e r を用いて、得られたバンドの色測定密度を測定することにより得た。

【 0087 】

図 5 ~ 11 に示されるグラフにおいて、縦軸は 1000 倍にした M i n o l t a C R - 241 C h r o m a M e t e r にて測定される値を示す。これは、 “ M i n o l t a 読み取り値  $\times 1000$  ” のラベルにより示されている。この M i n o l t a 読み取り値は、C I E ( C o m m i s s i o n I n t e r n a t i o n a l e d e l ' E c l a i r a g e ) により決定された X , Y , Z 3 倍増感値から導かれる色測定密度、 $D_x$  から得た。3 倍増感値は、1931 年に C I E により確立された Y x y 色システムから導かれ、ここにおいて Y は明るさの因子、x および y は色ダイアグラムの座標である。3 倍増感値 X は、式  $X = Y ( x / y )$  によって 3 倍増感値 Y と関連づけられる。X の色測定密度  $D_x$  は、式  $D_x = - \log_{10} ( X_m / X_0 )$  から導かれ、ここにおいて  $X_m$  は得られたバンドの測定された X 3 倍増感値であり、 $X_0$  は、光源の測定された X 3 倍増感値である。

【 0088 】

各小片について、スペクトルの赤色部分の色測定密度 (  $D_x$  ) が、接合体 ( または得られた ) バンド上の 5 個の点について各点が隣接するものから 1 mm 離されて測定された。背景色測定密度のレベルが、得られたバンドから離れて測定された。平均読み取り値、標準偏差および % C V ( 変位の百分率係数 ) を計算した。

【 0089 】

比較のために、ラテックスを直接に主膜に塗布した。至適計量曲線 (  $0.5\text{ }\mu\text{l/cm}$  のラテックス ) が図 6 に示されている。  $0.5\text{ }\mu\text{l/cm}$  を超える体積のラテックスが膜に付加された場合には、カットオフ濃度 (  $300\text{ ng/ml}$  ) における抑制は乏しかった。

【 0090 】

得られたバンドおよび対照バンドの均一性は、5 個の読み取り点についての色強度の変位により特徴づけられる。表 1 は、対照および得られたバンドの強度における % C V を表す。

【 0091 】

【 表 1 】

10

20

30

40

## 得られたバンドおよび対照バンドの強度における変位（％CV）

| 図番号 | モルヒネ標準濃度 |          |           | 対照抗－BSA |
|-----|----------|----------|-----------|---------|
|     | 0 ng/mL  | 75 ng/mL | 150 ng/mL |         |
| 2   | 8.0      | 9.3      | 15.6      | 5.3     |
| 3   | 24.1     | 17.1     | 151.9     | 22.7    |

10

## 【0092】

## 例2

このテトラヒドロカンナビノイドアッセイの例は、本発明を更に例示するものである。

## 【0093】

例1においてこの発明に関して記述されたニトロセルロース膜は：モルヒネ－BSA接合体と同様にして調製されたテトラヒドロカンナビノイド－BSA接合体、但しBSAにたいする薬剤誘導体の比は20：1；試料パッドに取り入れたβ－シクロデキストリン；ならびに抗－テトラヒドロカンナビノイドモノクローナル抗体にて感作させたブルーラテックスを用いて調製された。着色した結果のバンドの分析は、例1と同様にして行われた。3.0 μl/cmの至適計量曲線は図7に示される。

20

## 【0094】

図8および図9は、それぞれIVEKシステムにより、及びPaasche社のエアブラシ等の圧縮空気液体分配システムまたはエアブラシにより、主膜に直接にラテックスが塗布された場合（1 μl/cm）の至適THC曲線を示す。

## 【0095】

ラテックスがしょ糖の上塗り（水中に35％～66％w/v）の副膜上に付加された場合の該様式の性能も評価された。60％のしょ糖副膜及び2.0 μl/cmのラテックスを用いた至適曲線が図10に示されている。EP-A-0291194に示唆されるように、ラテックス溶液が1％メチルセルロース、例えば1％Methocel K4M<sup>TM</sup>メチルセルロース（Dow Chemical Company）及び0.6％w/vのPVAに調製され、しょ糖副膜の表面に直接に塗布された異なるラテックス剤型についても評価された（図11）。この場合には、半分以上のラテックスは、移動し始めることもなかった。しょ糖副膜は、ラテックスの移動をかなり遅らせ、かつ移動が均一でない。

30

## 【0096】

得られたバンド及び対照バンドの均一性は、5個の読み取り点についての色強度変位により特徴づけられ得る。表2は、対照および得られたバンドの強度における％CVを表す。

## 【0097】

## 【表2】

40

## 得られたバンドおよび対照バンドの強度における変位 (%CV)

| 図番号 | THC標準濃度 |            |          | 対照抗-BSA |
|-----|---------|------------|----------|---------|
|     | 0 ng/mL | 12.5 ng/mL | 25 ng/mL |         |
| 4   | 15.5    | 7.9        | 12.5     | 5.3     |
| 5   | 21.4    | 33.1       | 37.2     | 22.7    |
| 6   | 40.8    | 21.5       | 52.7     | 44.3    |
| 7   | 31.8    | 31.2       | 54.8     | 66.0    |
| 8   | 21.6    | 86.6       | 22.9     | 22.6    |

10

## 【0098】

上記二つの例の結果から明らかなように、本発明の装置は、先行技術のシステムに比べて優れた結果を与える。

## 【0099】

20

本願明細書を読めば、多くの別の実施態様が当業者には明らかとなるであろう。これらの変更は、添付の請求の範囲によってのみ限定される発明及びそれらの均等物の範囲及び精神のうちにあるものとみなされるべきである。

## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、カバーパネルを外したアッセイ装置の試験片室の正面図を表す。

【図2】図2は、図1の側断面図を表す。

【図3】図3は、アッセイ装置のカバーパネルを表す。

【図4】図4は、本発明による試験片の斜視図を表す。

【図5】図5は、本発明の装置を用いて行われたアッセイに関する色測定密度対モルヒネ濃度のグラフである。

30

【図6】図6は、IVEK Digisense 2000™システムを使用し、試薬が調合されたニトロセルロースを使用して行われたアッセイに関する色測定密度対モルヒネ濃度のグラフである。

【図7】図7は、本発明の装置を用いて行われたアッセイに関する色測定密度対テトラヒドロカンナビノイド(THC)濃度のグラフである。

【図8】図8は、IVEK Digisense 2000™システムを使用し、試薬が調合されたニトロセルロースを使用して行われたアッセイに関する色測定密度対THC濃度のグラフである。

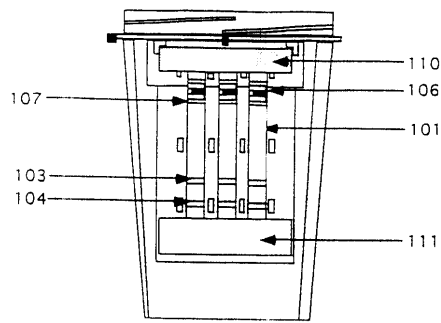
【図9】図9は、Paascheエアブラシを使用して試薬が噴霧されたニトロセルロースを使用して行われたアッセイに関する色測定密度対THC濃度のグラフである。

40

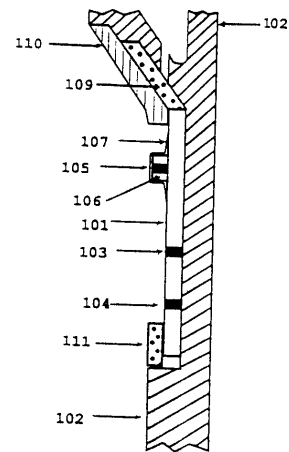
【図10】図10は、蔗糖が上塗りされたニトロセルロース上で行われたアッセイに関する色測定密度対THC濃度のグラフである。

【図11】図11は、蔗糖の上塗りの上にメチルセルロース溶液中のラテックスが塗布された上塗りニトロセルロースを使用して行われたアッセイに関する色測定密度対THC濃度のグラフである。

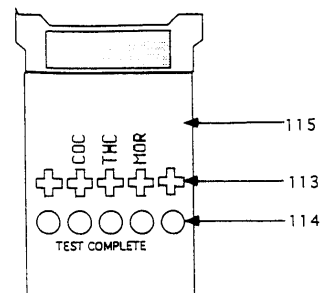
【図 1】



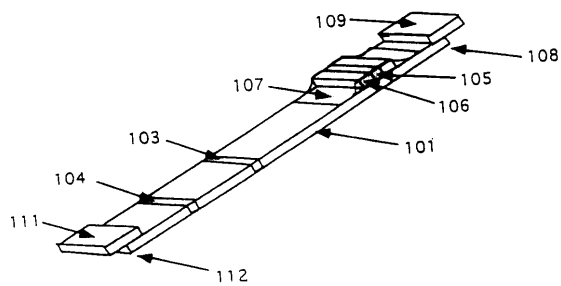
【図 2】



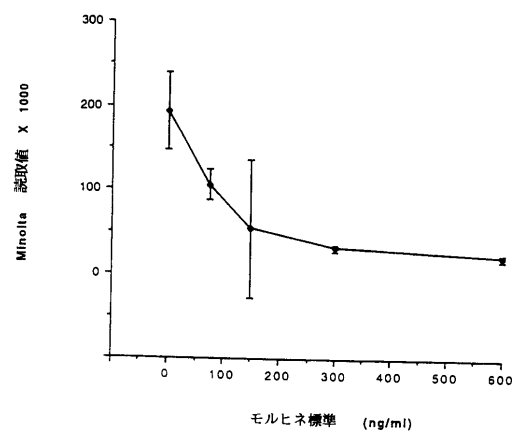
【図 3】



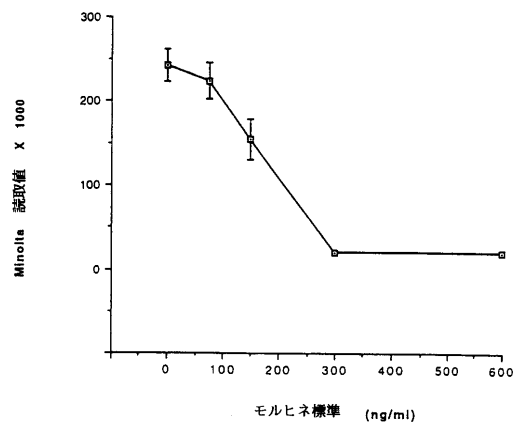
【図 4】



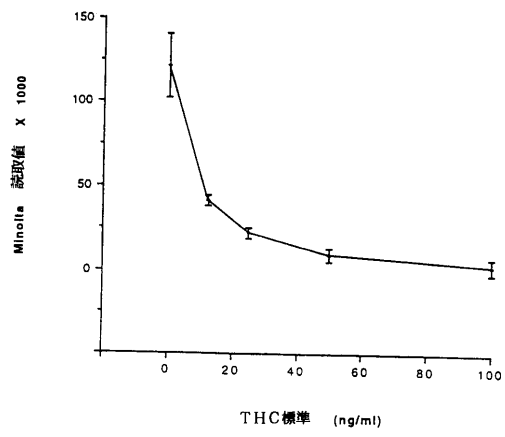
【図 6】



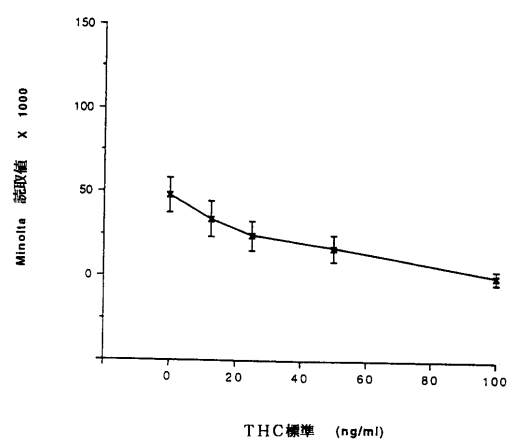
【図 5】



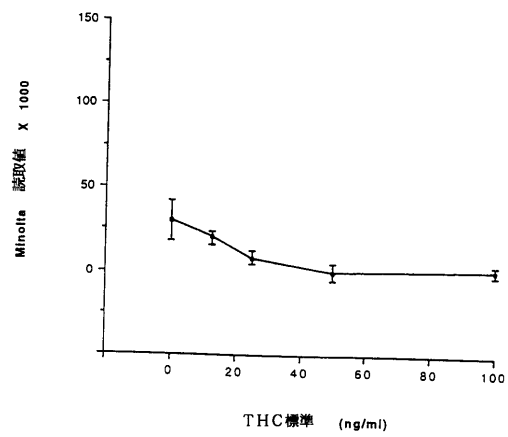
【 図 7 】



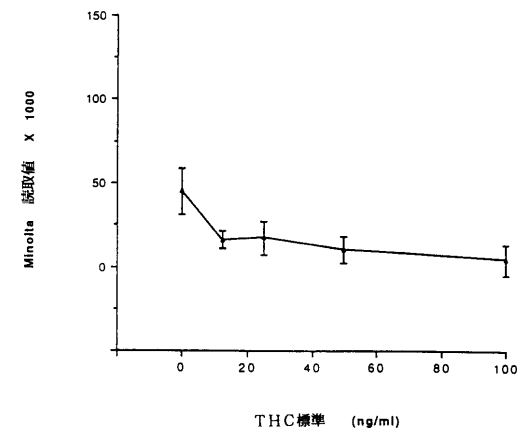
【 図 8 】

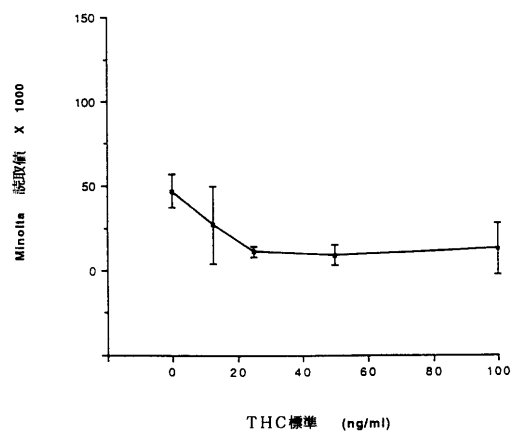


【 図 9 】



【 図 10 】



【 1 1】

---

フロントページの続き

(72)発明者 アレクセイ ドミトリ クリモブ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州プリンストン, ファカルティ ロード, ヒベン アパートメン  
ツ 1 - ワイ

(72)発明者 シオウ - チュアン ジェーン ツァイ  
アメリカ合衆国ニュージャージー州フレミントン, バーリィ シーフ ロード 11

合議体

審判長 高橋 泰史

審判官 山村 祥子

審判官 秋月 美紀子

(56)参考文献 特開平5 - 5743 (JP, A)  
国際公開第93 / 18398 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N33/543