

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2011-514516**(P2011-514516A)**(43) 公表日 **平成23年5月6日(2011.5.6)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 31/00 (2006.01)	GO 1 N 31/00 V	2 G O 4 2
GO 1 N 33/52 (2006.01)	GO 1 N 33/52 B	2 G O 4 5
GO 1 N 31/22 (2006.01)	GO 1 N 31/22 1 2 1 F	2 G O 5 4
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 31/22 1 2 2	
	GO 1 N 31/22 1 2 1 P	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 25 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-547204 (P2010-547204)	(71) 出願人	304037197
(86) (22) 出願日	平成21年2月20日 (2009. 2. 20)		オリオン ディアグノスティカ オサケ
(85) 翻訳文提出日	平成22年8月20日 (2010. 8. 20)		ユキチュア
(86) 国際出願番号	PCT/FI2009/000028		フィンランド共和国、フィン-02200
(87) 国際公開番号	W02009/103843		エスポー、コイプーマンツカーン チエ
(87) 国際公開日	平成21年8月27日 (2009. 8. 27)		6 ベー
(31) 優先権主張番号	61/030, 747	(74) 代理人	100098464
(32) 優先日	平成20年2月22日 (2008. 2. 22)		弁理士 河村 洸
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100149630
			弁理士 藤森 洋介
		(74) 代理人	100154449
			弁理士 谷 征史

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分析物を検出するための方法および装置

(57) 【要約】

本発明は、試料中の分析物、とりわけ炭水化物、より詳しくは糖の存在または量を測定するために、ファブリックを用いて試料を分析するための方法、装置およびキットに関する。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料中の分析物の存在または量を測定する方法であって、
該試料をファブリックに適用すること；
該試料中に分析物が存在する場合に該分析物を化学的に修飾すること；
該化学的に修飾された分析物の存在または量を検出すること
を含む方法。

【請求項 2】

分析物が炭水化物である請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

炭水化物が糖である請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

糖がフルクトース、デキストリン、ラクトース、マルトースまたはスクロースを含む請求項 3 記載の方法。

【請求項 5】

化学的修飾および検出が室温で行われる請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

化学的修飾および検出がファブリックの別々の領域で行われる請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

さらに、化学的に修飾された分析物の検出を干渉する薬剤を不活化することを含む請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の方法。

【請求項 8】

化学的修飾および干渉薬剤の不活化が化学的に修飾された分析物を検出する前に行われる請求項 6 記載の方法。

【請求項 9】

化学的修飾が、糖の環におけるエーテル結合の開環および/またはアルデヒド基の生成のための酸化剤との反応である請求項 3 または 4 記載の方法。

【請求項 10】

化学的修飾化剤が過ヨウ素酸または過ヨウ素酸塩である請求項 9 記載の方法。

【請求項 11】

化学的修飾反応の後かつ化学的に修飾された炭水化物の検出の前に、化学的に修飾された炭水化物の検出を干渉する過剰量の酸化剤が不活化される請求項 9 または 10 記載の方法。

【請求項 12】

化学的に修飾された炭水化物の検出が、該化学的に修飾された炭水化物の存在下で可視的な色の変化を与える銅含有化合物でなされる請求項 9、10 または 11 記載の方法。

【請求項 13】

ファブリックが合成ファブリック材料である請求項 1 ~ 12 のいずれかに記載の方法。

【請求項 14】

ファブリックがポリエステルファブリックである請求項 12 記載の方法。

【請求項 15】

試料が、毛細管作用を経てファブリックを通過して移動し、かつ化学的な修飾の手段、干渉薬剤を不活化する手段および検出手段が、該試料が通過して移動する該ファブリックの逐次的領域にある請求項 7 または 11 記載の方法。

【請求項 16】

ファブリックを表面に接触させること、および該表面を拭き取るかまたは該表面から試料を吸収することを含む方法により、試料がファブリックに適用される請求項 1 ~ 15 のいずれかに記載の方法。

【請求項 17】

10

20

30

40

50

ファブリックまたは表面が、ファブリックと表面とが互いに接触される前に緩衝溶液と接触される請求項 16 記載の方法。

【請求項 18】

ファブリックに試料を適用することにより室温で行われる非酵素法を含む試料中の糖の測定方法。

【請求項 19】

前記ファブリックが、糖に対する酸化剤として、過ヨウ素酸ナトリウムまたは過ヨウ素酸を含み、前記方法がチオ硫酸ナトリウムまたは硫酸第一鉄ナトリウムにより該過ヨウ素酸ナトリウムまたは過ヨウ素酸を中和することを含む請求項 18 記載の方法。

【請求項 20】

分析物を化学的に修飾するための手段を運ぶファブリック、化学的に修飾された分析物を検出するための手段および任意に干渉物質を不活化する手段を含む請求項 1 ~ 19 記載の方法を実行するのに適する検査装置。

【請求項 21】

前記ファブリックが、試料または試薬を一方通行させる不浸透性の層および/または層物質によって層状にされる請求項 20 記載の装置。

【請求項 22】

層状にされる不浸透性の層が少なくとも 1 つの開口部を含む請求項 21 記載の方法。

【請求項 23】

試料または試薬を一方通行に流す前記層状にされた層が、試料または試薬が試料を適用された表面へ逆流することを制限する請求項 21 記載の方法。

【請求項 24】

試料中の炭水化物の存在または量を検出するための装置であって、該装置がファブリック層を通して試料が連続的に移動するように調整されたファブリック層を含み、該ファブリック層が

炭水化物を化学的に修飾する手段を含む化学修飾エリア；

化学的に修飾された炭水化物の検出を干渉する薬剤を不活化する手段を含む不活化工エリア；および

化学的に修飾された炭水化物を検出する手段を含む指示エリア

を含む請求項 20 ~ 23 のいずれかに記載の装置。

【請求項 25】

炭水化物を化学的に修飾するための試薬として過ヨウ素酸または過ヨウ素酸ナトリウムを含み、さらにピシンコニン酸を用いる銅錯化剤を用いて該化学的に修飾された炭水化物を検出する前に、該化学的に修飾する試薬を中和するためのチオ硫酸ナトリウムまたは硫酸第一鉄ナトリウムを含むファブリック材料の層を含む請求項 2 記載の方法を実行するための装置。

【請求項 26】

請求項 20 ~ 25 のいずれかに記載の検査装置を製造する方法であって、

ロール - ツー - ロール印刷が前記ファブリック材料との接触面に導入される一方で該接触面のロールは回転させられ、該接触面のロールと該ファブリック材料が相対的に動かされる中で、分析物を化学的に修飾するための試薬および該化学的に修飾された分析物を検出するための試薬を、印刷によって該ファブリック材料に塗布する工程；および

該ファブリック材料を二枚の不浸透性の層の間に積層し、該不浸透性の層の一枚が、該ファブリック材料と並べられる少なくとも一つの開口部を有し、該開口部を通して試料が表面からファブリック材料へと吸収される工程

を含む方法。

【請求項 27】

前記ロール - ツー - ロール印刷が、グラビア印刷である請求項 26 記載の方法。

【請求項 28】

ファブリック材料；および

10

20

30

40

50

化学的に修飾する薬剤によって前記分析物を修飾するための手段；および
 干渉試薬を不活化するための手段；および
 化学的に修飾された分析物を検出する手段
 を含む検査装置を含み、試料中の分析物の存在または量を測定するためのキット。

【請求項 29】

前記ファブリック材料、または試料となるべき表面もしくは前記試料を生み出す表面を、
 湿らすための緩衝溶液をさらに含む請求項 28 記載のキット。

【請求項 30】

表面の汚染、とりわけ微生物の増殖を促進する物質による汚染を示すために、表面上の炭
 水化物の存在を検出するための請求項 1 ~ 19 のいずれかに記載の方法の使用。

10

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中の分析物 (analyte)、とりわけ炭水化物、より詳しくは糖の存在ま
 たは量を測定するために、ファブリック (fabric) を用いて試料を分析するための方法、
 装置およびキットに関する。

【背景技術】

【0002】

実験室、病院の受付、家庭、公共施設および工業用生産プラントにおいて周囲の衛生状
 態への注目は高まっている。この動向は、場所の使用者または清掃者がその場所の衛生状
 態を素早く確認できるような方法の開発へと向かっている。これらの方法は大変単純で扱
 いやすく、かつ迅速で安価なものであるべきである。

20

【0003】

衛生状態は、表面上の細菌濃度などの微生物の存在、または細菌の増殖を促す物質の存
 在を測定することで確認することができる。現行の方法を用いて表面から微生物を分析す
 ることは時間がかかり、専門的な知識を要する。細菌や真菌などの微生物の増殖を促す物
 質、たとえば糖類やタンパク質などを分析することは、ほぼ同等の信頼度で表面の清潔さ
 を示す。

【0004】

タンパク質の存在を測定するために利用できる迅速かつ高感度な検査が存在し、それら
 はプロモクレゾールグリーンとタンパク質との反応に基づく。そのような検査は、例えば
 特許出願、国際公開第 2006/122733 号パンフレットに記載され、様々な膜の使用
 に基づいた既存の検査形式が網羅的に論じられている。当該出願は、ロールツーロール
 (roll-to-roll) または他の印刷技術で膜に試薬を塗る様々な方法についても広く論じて
 いる。

30

【0005】

糖類などの炭水化物を分析する既知の方法のほとんどは、色の変化により糖類が示され
 る方法に基づく。色の変化に基づく方法のほとんどは糖類の分光光度アッセイのために開
 発された。現在まで、表面上の糖類の存在を測定するために利用できるような安価で迅速
 、かつ簡単な検査は存在していない。糖類に関する問題はそれらの安定した構造であり、
 これは糖類の分析には、特異的かつ有望な不安定酵素、かなり高温での培養、長い反応時
 間および/または健康に有害または使用が危険な化学物質が必要であることを意味する。

40

【0006】

色の変化に基づいて糖類を分析する利用可能な方法はいくつがある。銅の還元に基づく
 方法としては、フェーリング試薬、アルセノモリブデン酸塩および B C A (ピシンコニ
 酸) アッセイがある。糖の測定に適用可能な他の方法としては、シアン化鉄および D N S
 (ジニトロサリチル酸) 法、アセタール形成に基づく方法、アントロン法、フェナジン基
 、シッフ試薬およびテトラゾリウムブルーなどの指示法、ならびに円偏光二色性、光吸収
 および蛍光に基づくボロン酸センサーがある。糖類の測定に適用可能な他の方法としては
 、グルコースオキシダーゼ/ペルオキシダーゼおよびヘキソキナーゼなどの酵素法、およ

50

び生物発光および化学発光などの発光方法がある。

【0007】

その使用可能な方法は、それ自体では、糖類をファブリック法により検出する検査形式での使用には適用できない。銅還元に基づく方法は全て、十分な速度で反応させるために加熱を要する。

【0008】

米国特許第6,586,195号において、糖類を示すためにヤーンスグリーンBが用いられている。この特許は還元糖類が、塩基性条件下で充分高い濃度、約10g/lの濃度でヤーンスグリーンBを還元でき、この場合ヤーンスグリーンBは青色から灰色へと変化するということを記載している。青色から灰色への変化というこの反応では、検出限界に近い濃度での検査結果を判断することは大変困難であるので、この色の変化は最適ではない。

10

【0009】

アセタール形成に基づく方法およびアントロン法は、高濃度の強酸を使用するため、ファブリックに基づく迅速な検査の開発においては不適切である。

【0010】

指示薬法は単純な試薬組成を含み、ファブリックに印刷するために必要な試薬の量を減らす。糖の濃度が十分に高い場合、指示薬の色の変化は室温でも観測することができる。欠点は、例えばフルクトースなどの高い還元力を有する糖類しか検出できないことである。また、市販されている指示薬は乏しい。

20

【0011】

酵素および発光に基づく方法は鋭敏かつ迅速である。いくつかの酵素に関連する欠点としては、それらのコストおよび不安定な特性があげられる。さらに、特定の糖類にのみ作用するという酵素の特異的作用により、全てまたはほとんどの炭水化物の総濃度を示すべきである迅速検査ではそのような酵素は使用できない。発光に基づく方法は糖修飾酵素と共にのみ実行可能であり、ゆえに酵素法と同一の問題を共有する。

【0012】

本分野において専門家に周知の方法および専門家が使用する試薬は、それ自体は迅速診断方法に適用されない。例えば、シアン化合物は酸性環境において毒性の高い物質であるシアン化水素として放出されるので、シアン化鉄法は糖類の迅速な分析に適さない。いくつかの方法は室温で機能しないおそれがあり（例えばDNS法またはヤーンスグリーンB）、安定性に乏しいおそれもある（例えば酵素を要する方法、シッフ試薬およびアセタール形成試薬）。いくつかの方法はまた高い酸性またはアルカリ性条件を要する。

30

【0013】

よって、表面上の炭水化物を測定するための迅速かつ鋭敏な検査への要望がある。とりわけ、温度を上昇させることなく行なうことができる検査が必要とされている。

【発明の概要】

【0014】

本発明は、試料中の分析物の存在または量を測定する方法であって、
該試料をファブリックに適用すること；
該試料中に分析物が存在する場合に該分析物を化学的に修飾すること；
該化学的に修飾された分析物の存在または量を検出すること
を含む方法に関する。

40

【0015】

1つの実施態様では、例えば試薬などの分析物を化学的に修飾する手段は、試料がファブリックに適用される前にファブリック上に存在する。好ましくは、試薬はファブリック上に印刷されるか、別な方法でファブリック上に配置される、またはファブリックに吸収されるか結合される。

【0016】

本発明の1つの実施態様では、方法はさらに化学的に修飾された分析物の検出を妨げる

50

薬剤を不活化することを含む。好ましくは、化学修飾および干渉薬剤の不活化は、化学的に修飾された分析物を検出する前に実施される。この実施態様によれば、例えば薬剤、試薬、試料中に存在する組成物または物質、ファブリックに塗布されるかアッセイの処置中に形成されるアッセイ試薬などの試料または干渉物はすべて、たとえば中和により、または沈殿によりその活動を妨げることによる不活化に対する対象物となる可能性がある。1つの実施態様では、干渉薬剤を不活化する手段は、試料がファブリックに適用される前にファブリック上に存在する。これらの手段は、ファブリック上に印刷されるか、別な方法でファブリック上に配置されるか、またはファブリックに吸収されるか結合される。1つの実施態様では、分析物を化学的に修飾する手段および干渉薬剤を不活性化する手段の両方が、試料がファブリックに適用される前にファブリック上に存在する。

10

【0017】

本発明はまた、上記の方法を実行するのに適した検査装置を提供し、この装置は分析物を化学的に修飾する手段、化学的に修飾された分析物の薬剤を検出する手段および任意には干渉薬剤を不活化する手段を担持するファブリックを含む。1つの実施態様によれば、前述の手段は、好ましくは装置が使用される際に、試料が連続した順番でこれらの部分を通して移動できるように、例えば領域 (region)、帯域 (zone) または区画 (section) として連続的に塗布または印刷される。

【0018】

本発明は、試料における分析物の存在または量を測定するためのキットであって、ファブリック材料；化学的に修飾する薬剤によって分析物を修飾するための手段；干渉試薬を不活化するための手段；および化学的に修飾された分析物を検出する手段を含む検査装置を含むキットをさらに提供する。

20

【0019】

さらに、本発明はロール - ツー - ロール印刷方式に関し、この方法では試薬および前述の手段はファブリック上の特定の場所に、連続的に印刷される。

【0020】

1つの実施態様では分析物は炭水化物である。またある実施形態では炭水化物は糖である。好ましくは、糖はフルクトース、デキストリン、ラクトース、マルトースおよび/またはスクロースを含む。

【0021】

本発明は試料をファブリックに適用することにより室温で行われる非酵素法を含む、試料中の糖を測定する方法を提供する。

30

【図面の簡単な説明】**【0022】**

【図1】 水分吸収 (moisture-absorbing) ファブリック法の構造的原理。

【図2】 異なるファブリックの領域に存在する試薬を示している、糖検査に適したファブリックの具体的な例。

【発明を実施するための形態】**【0023】**

本発明は、試料中の分析物を化学的に再構築または修飾することができ、そして任意には干渉試薬または薬剤および/またはアッセイ中に形成された生成物をアッセイ中に不活化できるような方法で試料を分析するための方法、装置およびキットに関する。

40

【0024】

この方法は、安定な分析物または試料中に見られる形では測定が困難な分析物の測定に広く適用できる。本発明の方法は、試料中の炭水化物、とりわけ糖類の存在を測定するのに特に適している。

【0025】

本発明は、水分吸収ファブリック法を用いる試料中の糖類の検出に関する。この方法は反応温度を上昇させることなく実施することができる。また本発明は、この方法において使用するためのファブリック含有装置に関する。装置の製造において、アッセイで使用さ

50

れる化学物質は従来の印刷技術を用いてファブリック上に移され得る。製造に適する方法は、国際公開第2006/122733号パンフレットに詳細に開示されており、これは参照によって本明細書に組み込まれる。プラスチック膜の間にファブリックを層状にすることにより、液体がファブリックに沿って迅速に移動することが可能となる。しかしながら、この製造手順は、再構築する薬剤、不活化する薬剤および一般的なアッセイ試薬が適用される場所が明らかに異なるため、より複雑で困難なことから、国際公開第2006/122733号パンフレットに開示される手順とは異なる。本発明の方法および装置は迅速検査として実用的である。迅速検査に関する基本的な要件は、単純さ、感度、特異性、安全性、使いやすさ、廃棄可能性および印刷技術を用いた工業生産に対する適合性である。

10

【0026】

本発明の検査は任意の適切な分析物に適用され得るが、便宜上、以下の記述では分析物が炭水化物である実施態様を詳細に論じる。本発明の検査は炭水化物、とりわけフルクトース（果糖）、デキストリン、ラクトース（乳糖）、マルトース（麦芽糖）およびスクロース（グラニュー糖）などの糖類を、好ましくは視覚的な色の変化を用いて測定するために使用され得る。従来の方法を活用すると、フルクトースが最も測定しやすい一方で、スクロースおよびデンプンは測定が最も困難である。スクロースおよびデンプンは、他の前述した糖類よりも還元力がかなり低いので、測定するのが最も困難である。本発明は、スクロースなどの中性糖類の存在を含む、 $150\mu\text{g}$ の糖類の存在を検出することができる。

20

【0027】

衛生状態を評価するために、指示検査は実際には主に定性的なものであり、所定の感度範囲内で試料中の糖の存在を示す。本発明は検出限界が $1\text{g}/\text{l}$ の感度まで炭水化物、とりわけ糖類の存在を示すことができる。これは、 $10\times 10\text{cm}^2$ の表面から採取された $500\mu\text{l}$ の試料中で $500\mu\text{g}$ の糖類を検出する能力に相当する。糖類に対する検出限界は（同様の単位を使用する場合）、好ましくは $0.5\text{g}/\text{l}$ （ $250\mu\text{g}$ ）、より好ましくは $0.2\text{g}/\text{l}$ （ $100\mu\text{g}$ ）、 $0.1\text{g}/\text{l}$ （ $50\mu\text{g}$ ）、 $0.05\text{g}/\text{l}$ （ $25\mu\text{g}$ ）、 $0.02\text{g}/\text{l}$ （ $10\mu\text{g}$ ）または $0.01\text{g}/\text{l}$ （ $5\mu\text{g}$ ）である。

【0028】

本発明は、例えば病院、診療所、実験室、食品産業、乳製品工場、製パン所、醸造所および飲料産業において、衛生状態を測定する単純かつ安価な装置を可能にする。

30

【0029】

「炭水化物」とは、炭素、酸素および水素を含む化合物であり、好ましくは糖である。

【0030】

「糖」とは、水溶性の単糖類、オリゴ糖類または多糖類である。

【0031】

ファブリック上での連続的な反応が本発明の方法を実行するために使用され得る。簡潔には、試料はあらかじめ定められた特定の順番で、所望の化学物質と反応するためにファブリックへ導入される。

【0032】

試料は、通常は検査されるべき表面上をファブリックでふき取ることによりそのファブリックに導入される。他の実施態様もまた考えられる。例えば、ファブリックは検査される表面に置かれる場合もあれば、検査場所から採取された液体試料が例えばピペットまたは同様の移動手段を用いてファブリックに導入される場合もある。表面および/またはファブリックはそれらが接触する前に処理され得る。例えば、それらのうちの1つ（好ましくは表面）は、液体試料の提供を補助するために水溶液で濡らされ得る。水溶液は例えば噴霧または洗浄液として利用され得る。これは、検査される表面が乾燥しているか、またはそれ自体が適当な液体試料を生むのに十分な水分を有していない場合に特に望ましい。水溶液は、一般的には水または例えば緩衝剤のようなアッセイを実施する上で有益な物質を含む溶液である。

40

50

【 0 0 3 3 】

緩衝剤は、分析物を修飾するためまたは修飾された分析物を検出するために用いられる化学的作用を妨害する化合物を含むべきではない。例えば、分析物が炭水化物の場合、化学修飾は一般的に酸化であり、検出工程は一般的に、正の結果を可視的に示す色を有する金属錯体の使用を伴う。この実施態様において、水溶液から好適に取り除かれるべき干渉試薬は、銅と錯体を形成するヨウ素酸塩およびリン酸塩、ならびに酸化を干渉する炭水化物と錯体を形成するホウ酸およびホウ酸塩を含むがこれらに制限されるものではない。緩衝液は第一級、第二級および第三級アルコールを含み得るが、ジアルコール、トリアルコールなどの多価アルコールは好ましくない。また水溶液は、デンプンまたは検査装置中での移動がクロマトグラフィの分離によりさらに制限されるその他の多糖類を検出するためにヨウ素やKIなどの安定化剤を含み得る。

10

【 0 0 3 4 】

適当な水溶液は、ACSまたはプロアナリシスのグレードに従って調製された緩衝剤である。当該水溶液はまた金属カチオン不純物を低い含量で有するべきである。好適には0.002%以下または0.001%以下の鉄を有する。好ましくは、鉛のような重金属を10ppm以下または5ppm以下で含む。より好適には、水溶液中の金属カチオン不純物の含有量は低ければ低いほどよい。

【 0 0 3 5 】

一度液体試料がファブリックへ誘導されると、最初の工程は一般的には炭水化物を化学的に修飾することである。該炭水化物が糖である場合、好適には室温での測定を可能にするような方法で再構築または修飾される。ある実施形態では、糖類は糖の環構造におけるおよびモノマー間のエーテル結合を開くことでより反応性にされ、それに続く酸化過程ではアルデヒド基の数が増加される。炭水化物を化学的に修飾する手段は、試薬、例えば過ヨウ素酸もしくは過ヨウ素酸ナトリウムなどの過ヨウ素酸塩、またはセリウム(IV)塩など他の種類の化学化合物であってよい。このような化学的修飾手段は、好ましくは2つのヒドロキシル基間の炭水化物鎖を開裂させるのに十分な酸化電位を有する酸化剤であり、好ましくは無色である。

20

【 0 0 3 6 】

炭水化物をより簡単に検出できる形状へ修飾することに関して予期され、また本発明の方法および試験装置の基礎として使用され得るその他の反応には、以下のものが挙げられるがそれらに限定されるものではない。

30

- ・ -OH基が弱酸により α -型から β -型へと変えられる、変旋光。
- ・ 糖-OHおよびアルコール間の酸素架橋(エーテル)の酸触媒による生成。
- ・ 例えば Cu^{2+} などの弱い酸化剤の存在における、グルコン酸などのカルボン酸の生成。
- ・ 高温で強酸を用いる、グルクロン酸などのジカルボン酸の生成。
- ・ NaBH_4 による糖アルコールへの還元(エーテル環の切断およびヒドロキシル末端基の形成)。
- ・ 酢酸ナトリウムおよび無水酢酸が存在する場合の酢酸エステルの生成。
- ・ 例えば酸化銀およびヨウ化メチルなどの存在によるアルデヒドの生成。

40

【 0 0 3 7 】

分析物を、化学的に修飾された分析物を検出する前に化学的に修飾する方法は、以前はファブリック上で用いられなかった手順であると考えられる。本発明の方法では、試料と修飾または再構成手段とが出会い、好ましくは干渉薬剤が不活化され、所望の組成物または物質のみがファブリック材料中でさらに移動するべきである。

【 0 0 3 8 】

「干渉薬剤」は、もし化学的に修飾された分析物が検出される時に存在すれば、化学的に修飾された分析物の検出を妨害する物質である。干渉薬剤は試料中にもともと存在してもよく、分析物の化学的修飾由来の余分な試薬であり得、または例えば反応の生成物または副産物など、分析物を化学的に修飾する反応の結果として存在し得る。

50

【0039】

分析物が炭水化物の場合、干渉薬剤の例としては、銅と錯体を形成するヨウ素酸塩およびリン酸塩、ならびに炭水化物の酸化を干渉する炭水化物と錯体を形成する傾向にあるホウ酸およびホウ塩酸などが挙げられる。また、金属カチオンのような還元薬剤は銅を還元することができるので、糖なしでも着色反応を導く。

【0040】

干渉薬剤は化学的修飾が起こる際にファブリックの同じ領域で不活化されてもよく、化学的に修飾された分析物を含む試料が通過するファブリックの後ろの領域で不活化されてもよい。好ましくは、不活化は後ろの領域で起こる。また不活化は化学的に修飾された分析物が検出される前に起こる。

10

【0041】

化学的に修飾された分析物は、その後検出される。分析物が炭水化物の場合、検出は好ましくはBCAアッセイを用いて実行される。BCA法では、 Cu^{2+} がアルカリ煮沸で糖を酸化させる。酒石酸は、水酸化銅の沈殿の形成を防止する Cu^{2+} に対する錯化剤として用いられる。この過程で Cu^{2+} はピシンコニン酸と反応する Cu^{+} へと還元され、糖の存在によるものと考えられる有色錯体を形成する。

【0042】

BCA法はインキュベーションを用いる一方で微小な量の還元銅でもBCA錯体として検出でき、用いられる試薬はファブリック上の安定した化合物中で凝固するように導かれ得る。

20

【0043】

例えば天然のセルロースおよびビスコースに基づくファブリックは、炭水化物を検出するために用いられる場合に偽陽性を生じさせやすいので、好適なファブリックは合成ファブリックである。用いられ得る合成ファブリックは、セルロース - およびビスコース - 不含ファブリック、ポリエステルファブリック、ポリエタン、ポリアミドファブリック、ポリプロピレンファブリック、塩化ポリビニルファブリックおよびそれらの組み合わせを含む。1つの実施態様では、ファブリックはポリエステルファブリックである。

【0044】

本明細書で使用される「ファブリック」という用語は、液体試料を吸収できかつ毛細管現象により該試料を移動または担持できるあらゆる材料を含むものとして定義される。一般的に用いられる用語は、「マトリックス」であり、相当する性質を有する材料である。「修飾する」という用語は、再構成も意味するものとして使用され定義される。「領域」という用語は、例えば多段階検査の「帯域 (zone)」、「相 (phase)」、「エリア (area)」、「区画 (section)」も意味するものとして使用され定義される。「拭き取り (wiping)」という用語は「掃きよせ (sweeping)」も意味するものとして使用され定義される。拭き取りの間、ファブリックは表面から液体を吸収する。「物 (product)」という用語は、あらゆる薬剤、試薬、組成物または物質を意味するものとして使用され定義される。

30

【0045】

本発明のある実施態様では、BCA法がファブリック上で機能するように適用される。適切な装置の製造において、液状の化学物質はファブリック状に印刷されそこで乾燥する。固体状では、化学物質はファブリックに沿って移動することもなければ、蒸発によって希釈されることもなく、液状における安定性に比べて安定性が改善する。本発明の迅速な診断検査は、色の変化を引き起こす反応に基づいて表面上の糖類の検出を可能にし、上記の検査に関連する問題として説明されている欠点を排除する。本発明の検査装置は使い捨てで、ロール - ツー - ロール印刷法を用いて製造でき、コストを低く抑える。検査の実行は簡単であり、特別な訓練を要しない。さらに、含まれる化学物質は日々使用するのに安全なものである。

40

【0046】

糖類を測定して表示するための利用可能な方法はいくつが存在し、これらの検査は上記序章において論じた。文献に見られる方法はBCAおよび様々な指示薬を含む。これらの

50

方法は検査の成功に関する好ましい要件の1つを満たす。つまり、これらは室温で色の変化を生じさせる。欠点は、それらは高い糖濃度を必要とするが、熱触媒作用によって表示される量はごく僅かであるということである。しかしながら、文献で論じられている性質は、ファブリックを用いて直接使用できる方法には充分でない。本発明はこれらの問題および加熱の必要性を排除する一方で、その検査は低い糖濃度でも測定するのに充分敏感である。本発明は試験管方法の条件をファブリック上に創設することを可能にし、湿った表面からファブリックへと移動させられた試料が糖を含んでいる場合、色の変化を受けるようにする。

【0047】

本発明によると、その試験方法に使用される試薬は、印刷することによりファブリックへ移動させられた。印刷は検査装置の製造コストに効果的である上、印刷エリア全体に渡る均質な試薬濃度を確実にする。最も一般的なロール-ツー-ロール印刷法は凸版印刷、グラビア印刷、オフセット印刷およびシルクスクリーン印刷を含み、またいくつかの応用方法ではインクジェット法も含む。

10

【0048】

グラビア印刷が本発明の印刷方法として好適である。しかしながら当業者にとっては、わずかな修正を伴うことで他の印刷方法も使用でき得るということは明白であろう。グラビア印刷は、有意に異なる流体力学的性質を有するインクの使用を可能とする、インク移動の手順の単純さ、ならびにその方法の良好な化学移動および化学物質耐性ゆえに好ましい。実施例においては、印刷はテーブルトップの試験印刷機を用いて行われた。

20

【0049】

吸湿性のファブリックを検査することは、液体試料を含有する糖を十分な量で清浄な表面へと適用することを伴った。ファブリックの端は、液体試料が指示エリアに到達するまで試料と接触した状態のままにされた。

【0050】

全ての方法は、フルクトース、デキストリン、ラクトース、マルトースおよびスクロースと共に検査され、スクロースは還元糖というよりも中性である。

【実施例】

【0051】

実施例 1

生物学的ファブリックおよび合成ファブリックの両方を試験した。初期段階では、セルロースおよびビスコース、つまり糖のような群を含む生物学的なファブリックは、その糖様の機能がゼロ試料にも検査中の色の変化を引き起こすので、使用に適していないと考えられていた。それゆえ、合成のセルロースおよびビスコース不含ファブリックも検査され、ゼロ試料での色の変化は観測されなかった。検査された合成ファブリックから、疎水性の性質が少ないという理由でポリエステルファブリックがポリプロパンよりも好都合であるということが見出された。

30

【0052】

実験の間、糖類検出のために用いられたヴァーフェンシュミット (Waffenschmidt) またはスミス (Smith) プロトコルは以下の通りである (Smithら、Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid, 1985, 150, 76-85; Waffenschmidtら、Anal. Biochem. 1987, 165, 337-340)。

40

【0053】

B C A 法を用いる還元糖検出のための、ヴァーフェンシュミットらのプロトコル：
溶液組成

溶液 A

- ・ B C A 9 7 1 m g
- ・ $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$ 3 1 . 7 5 g
- ・ NaHCO_3 1 2 . 1 g
- ・ a d . H_2O 5 0 0 m l

50

溶液 B

- ・ $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ 624 mg
 - ・ L - セリン 631 mg
 - ・ ad. H_2O 500 ml
- 【0054】

溶液は通常 1 : 1 で混合される。

【0055】

糖試料は溶液 A および B の混合物 1 ml と混合される。この糖含有混合物は 100 の加熱ブロックで 15 分間保持される。約 20 分で室温まで冷ました後、吸光度は 560 nm で記録される。

【0056】

還元単糖類の検出限界は約 5 nmol である。グルコース 5 nmol とは約 0.9 μg である。

【0057】

BCA 法を用いるタンパク質の検出のための、スミスらのプロトコル中で用いられる溶液組成は表 3.1 に示される。

【0058】

【表 1】

表 3.1. BCA 混合物中の溶液組成

溶液 A		溶液 B	
化学物質	量	化学物質	量
BCA 中のナトリウム塩	1g	$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	4g
$\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$	2g	H_2O	ad. 100ml
酒石酸二ナトリウム	0.16g	—	—
NaOH	0.4g	—	—
NaHCO_3	0.95g		
H_2O	ad. 100ml	—	—
pH11.25へ調整(10M NaOH)		—	—

【0059】

溶液 A および B は通常 50 : 1 の割合で混合される。

【0060】

試料溶液および溶液 A および B の混合物はそれぞれ 1 : 20 の割合で混合される。検出の時間制限が狭い場合およびタンパク質が微小な量しか残らない場合、混合物はインキュベートされる。

【0061】

吸光度は分光光度計を用いて測定された。異なる時間およびインキュベーション温度が用いられる場合、同様の吸光度の読み取りが達成される。これは表 3.2 で表される。

【0062】

【表 2】

表3. 2. 異なるタンパク質量およびインキュベーションパラメータによる、0.2吸光度の達成

吸光度	タンパク質量	インキュベーション温度	インキュベーション時間(分)
~0.2	20 μ g	室温	~5
~0.2	20 μ g	37°C	~2.5
~0.2	5 μ g	60°C	~3

10

【0063】

スミスプロトコルはタンパク質の分析を意図するものだが、還元糖の検出にも用いることができる。これは、還元糖（グルコース）の干渉効果が存在する表3.3で示される。

【0064】

【表 3】

表3. 3. スミスプロトコルにおける還元糖の効果

50 μ gのBSA*および以下のグルコースを含む100 μ lの試料	ウォーターブランク補正 (water blank correction) が用いられたBCAアッセイ** (見出されたBSA*)	干渉ブランク補正 (interference blank correction) が用いられたBCAアッセイ** (見出されたBSA*)
900 μ gのグルコース	245 μ g	57.1 μ g
450 μ gのグルコース	144 μ g	47.7 μ g
90 μ gのグルコース	70 μ g	49.1 μ g

20

*ウシ血清アルブミン(タンパク質)

**37°Cで30分間インキュベーションによる前記プロトコル

30

【0065】

「ウォーターブランク補正 (water blank correction)」では、すべての試薬がブランク中に存在し、かつ試料とブランクの量を同一に維持するために試料の量と同じ量の純水を足される。ブランクの吸光度が記録され、吸光量が試料の吸光度から差し引かれ、汚染物質、試薬、実験器具などにより生じる吸光度を是正する。

【0066】

「干渉ブランク補正 (interference blank correction)」は、「ウォーターブランク補正」と同様であるが、ブランクは試料中と同量の干渉薬剤も含む。したがって、干渉薬剤、汚染物質、試薬、実験器具などにより生じる吸光度を、試料から差し引くことができる。

40

【0067】

スミスプロトコルによる実験において用いられるBCA試薬の組成物は表3.1に列挙される。試験管法では、試薬は50A:1Bの割合で混合され、その後試料がインキュベートされた。

【0068】

BCA方法で用いられる化学物質は、プレーン (plain) 上に移動させられ、異なる緩衝剤がテーブルトップの試験印刷機を用いてファブリックに塗られた。種々のファブリックエリア、pH値およびBCA化学物質の組み合わせのエリアが試験され、さらなる開発研究のための基礎を築いた。検査観測およびそれらに関する説明は表3.4に記載される。

50

【 0 0 6 9 】

【 表 4 】

表3. 4. 検査観測およびそれらの説明

観測	説明
ゼロ反応 (zero reaction) の強度はより高いpH値に伴って高まる。	生物学的ファブリックが検査に用いられた。それゆえBCA法の最適な条件に接近する場合に、より強い反応が得られた。BCA法を用いる場合の糖類に対する最適なpH値は10. 2である。
生物学的ファブリックはゼロ反応を起こし、合成ファブリックではゼロ反応は観測されなかった。	生物学的ファブリックで観測されたゼロ反応は、銅が、ビスコースおよびセルロースの形態で生物学的ファブリックに存在する還元物質と反応することで生じた。合成ファブリックではゼロ反応がないことは仮説を確認した。
高いpH値のリン酸緩衝液を使用した場合、ゼロ反応は色を有したが、色は次第にあせた。	リン酸緩衝液を使用した場合、着色反応が生じたが、色は次第にあせた。これは銅がリン酸と反応するからであった。
最も低い検出限界はpH値4. 7の酢酸ナトリウム緩衝剤で達成された。	pH値4. 7の酢酸塩緩衝剤が最も鋭敏であった。なぜなら検査は、BCA法を干渉しない緩衝剤および物質を用いて行われたからである。

10

20

【 0 0 7 0 】

BCA法は、ファブリック上に試験管法の最適な条件を作り出す目的でさらに開発された。生物学的ファブリックは陰性対照反応における陽性の結果により適していないことが判明したので、ポリエステルファブリックを基体として選択した。これは、ポリエステルファブリックが正しくない対照反応を起こす還元基を含まないためである。

【 0 0 7 1 】

緩衝剤およびpHの影響を調べるために、ファブリックをpH10. 2で、0. 1Mの炭酸塩緩衝剤で洗浄し、その結果をpH4. 7の酢酸塩緩衝剤と比較した。BCA試薬溶液は、炭酸ナトリウム緩衝剤で洗浄されたファブリック上に、A + 1 / 2 Bの割合、つまり溶液Bが印刷の前に水により半分の濃さまで薄められた状態で印刷された。溶液Aが初めに印刷され、印刷部が乾燥すると1 / 2の溶液Bが添加された。表3. 1は希釈前の溶液組成を記載する。

30

【 0 0 7 2 】

初期の検査では、pH4. 7の酢酸ナトリウム緩衝液で洗浄したファブリック上でのフルクトースに対する検出限界は5 g / lであった。他の検査された糖類は色の変化を起こさなかった。pH10. 2の炭酸塩緩衝液はフルクトースの検出限界を1 g / lまで低くしたが、他の糖類はそれでも色の変化を起こさなかった。

40

【 0 0 7 3 】

試験管法の分析は試料のインキュベーションを含むので、ファブリック法に対する熱の影響を、湿ったファブリックを糖類と共に80 °Cのオープンに30分間置くことで検査した。熱の効果はファブリックにおいても明白であり、フルクトースの検出限界は0. 05 g / lであったが、変色反応は他の糖類には観測されなかった。

【 0 0 7 4 】

銅錯化剤は方法の1要素であるので、検査の能力改善を試みるために、様々な錯化剤が検査された。以前の検査においては酒石酸ナトリウムがCu²⁺の錯化剤として用いられたが、現在はヴァーフエンシュミットが、L-セリンが酒石酸ナトリウムよりも効果的な

50

銅の錯化剤になるということを発見したので、L-セリンに置き換えられた。

【0075】

以下の検査は、ヴァーフェンシュミットの試薬組成に基づくものであった（Waffenschmidtら、前記）。ファブリックは同じ炭酸塩緩衝剤により処理され、化学物質は以前の検査と同様の方法でファブリック上に印刷された。2種類の異なる試薬割合、A + BおよびA + 1 / 2 Bが印刷に用いられた。表3.5は溶液AおよびBの組成を示す。

【0076】

【表5】

表3.5. ヴァーフェンシュミットによるBCA溶液の組成

溶液A		溶液B	
化学物質	量	化学物質	量
BCA	0.194g	CuSO ₄ ×5H ₂ O	0.194g
NaCO ₃ ×H ₂ O	6.35g	L-セリン	0.126g
NaHCO ₃	2.42g	H ₂ O	ad. 100ml
H ₂ O	ad. 100ml	—	—

10

【0077】

糖類がファブリック上で検査された場合、水とのゼロ反応は強く、ファブリックは2週間以内で自発的に紫へと変わった。L-セリンはCu²⁺をキレート化し、徐々にCuへと還元させると考えられており、その後強く着色されたBCAの銅錯体を形成した。それゆえ、さらなる研究開発においてはヴァーフェンシュミットプロトコルよりもスミスプロトコルの方が好まれると思われる。

20

【0078】

上記の検査に基づいて、正しいpH値、緩衝液および錯化剤はその方法に十分な感度を与えるものではないということが認識された。BCA法を用いた糖類検出を改善するのに適切な触媒は、この文献からは特定できなかった。

【0079】

銅の酸化力はBCA法においてある役割を果たす。このことおよび上記の結果および結論に基づいて、銅よりも強力な酸化剤を見つける試みがなされた。本発明によれば、適切な変色指示薬を用いて酸化剤の還元を検出することが可能である。

30

【0080】

しかしながら、より強力な酸化剤を採用することは、いくつかの問題を引き起こした。物質の酸化力が増加するにつれて、その物質の毒性およびほかの物質への反応性も増加する。反応性はいくつかの物質に対して自発的な分解または還元を引き起こし、検査の安定性および機能を弱める。

【0081】

そこで、本発明者らは、色の変化に基づく方法を用いて糖類をより検出しやすくするような方法で、糖類そのものを修飾または再構成し得ることがわかった。したがって、本発明者らは、糖類に含まれるアルデヒド基の数を増加させる目的で糖類を酸化させることを試みた。なぜなら銅還元に基づく方法において、銅ととりわけ反応するのがアルデヒド基だからである。

40

【0082】

糖類の酸化に適した3つの化学物質が文献から特定された。それらは過ヨウ素酸、過ヨウ素酸ナトリウムおよびデス・マーティン（Dess-Martin）過ヨウ素酸塩であり、アルデヒド基を増加させるような方法で糖類を酸化する。後述のように、本発明者らは、アルデヒド基の数の増加がこの方法の検出限界を低くすることを見出しており、低い還元力を有する糖類および中性の糖類も検出することを可能にした。

【0083】

50

実施例 2

試験管法において表 3 . 1 に列挙された糖、過ヨウ素酸ナトリウムおよび B C A 試薬は、所定の手順で試験管に加えられた。糖を含む試験管は室温で 5 分以内に色が変化した。ゼロ反応（陰性対照）は 5 分より後に生じた。B C A 法が今や室温でも機能的であり、中性の糖類でさえも色の変化を起こすことから、この検査は重大な進歩を証明した。ゼロ反応は B C A 試薬に含まれる酒石酸ナトリウムによるものであった。

【 0 0 8 4 】

酒石酸ナトリウムの影響が、表 3 . 1 に示される B C A 混合液の溶液 A を酒石酸ナトリウムなしで調製することにより調べられた。試験管法において、全ての糖類が色の変化を起こすことができなかつた。これは酒石酸ナトリウムの酸化作用によるものである可能性があり、この場合、銅は糖類により還元されるが、酒石酸ナトリウムにより再度酸化される ($Cu^+ \rightarrow Cu^{2+}$)。

10

【 0 0 8 5 】

ファブリックを用いる B C A 法の一部として、酒石酸ナトリウムが検査された。B C A 試薬は前の検査と同様の方法でファブリック上に印刷され、酒石酸ナトリウムは最後に加えられた。これは陰性対照試料と糖含有試料の間の明白な時間制限を確立するためであった。

【 0 0 8 6 】

結果に基づいて、酒石酸ナトリウムは検査の感度を増強するために用いられるだけでなく、糖に誘導される色の変化が 30 ~ 40 分後にファブリック上で観察されるように方法を干渉することが結論付けられた。それゆえ、糖を再構成または修飾した後に、酒石酸ナトリウムを中和および / または不活化する方法が必要とされた。

20

【 0 0 8 7 】

実施例 3

本発明者らの先行試験の結果および本発明者らの発明の問題解決により、連続して反応するような化学物質を含む多段階検査、つまり多領域または多帯域検査を採用するに至った。毛細管作用により試料溶液がファブリックに流れ、ファブリック上の特定エリアに印刷されている化学物質と反応する。

【 0 0 8 8 】

検査概念においては、調査された表面にある糖の不純物は、必要な化学物質を含有する吸湿性のファブリックを通して運ばれる。ファブリックにおいて、液体試料中の糖類は所定の順番で化学物質と反応する。ゆえに実施例 2 に記載されているように、通常反応を阻害したりまたはゼロ反応を起こしたりする反応性の化学物質でも、試薬として用いられ得る。なぜなら、その反応性の化学物質は B C A 分析物の指示エリアの前に不活化することができるからである。したがって、本発明の構成および不活化が活用される場合、上記の試験管法で用いられる試薬は、迅速な多段階検査におけるファブリック材料上に用いられ得る。

30

【 0 0 8 9 】

初期の試験管方法では、酒石酸ナトリウムは室温での B C A 方法を促進することが見出された。問題は、数分後に陰性試料で陽性の検査結果が生じること、および方法をファブリックにより機能させる困難性であった。本発明者らは、付加的な工程を含むことで方法が改善され得ることを認識した。

40

【 0 0 9 0 】

糖類の環構造およびモノマー間の結合はエーテル結合を含むということが知られている。このエーテル結合を開くことは糖の酒石酸ナトリウムとの反応、さらには銅との反応を促進する。ハロゲン酸、ヨウ化水素および臭化水素、または低い pH 値がエーテル結合の破壊に用いられ得る (Clayden ら、Organic Chemistry, OUP 201, p.434)。ハロゲン化水素は固体状でファブリック上に固定できないので、直接的には使用できない。

【 0 0 9 1 】

糖類のエーテル結合は酸性条件において破壊され、この状態は硫酸を用いる試験管法の

50

検査で達成された。次に、糖類は酒石酸ナトリウムで酸化され、過剰量の酒石酸ナトリウムはチオ硫酸ナトリウムで中和された。溶液はBCA試薬を加える前に水酸化ナトリウムで中和された。化学量論比が、化学物質の濃度を最適化するための開始時点として使用され、結果表4.1に示される濃度に帰着した。

【0092】

【表6】

表4.1. 酒石酸ナトリウム/チオ硫酸ナトリウム方法における試薬の比率

試薬	量
糖溶液 1g/l	200 μ l
硫酸 0.1M	100 μ l
酒石酸ナトリウム 11.3g/l	100 μ l
チオ硫酸ナトリウム $\times 5H_2O$ 11.6g/l	120 μ l
NaOH 0.1M	200 μ l
BCA溶液B、5%に希釈	100 μ l
酒石酸を含有するBCA溶液A	500 μ l

10

【0093】

上述の方法はスクロースで色の変化を生じ、ゼロ試料（陰性対照）は試験管法の検査において24分後に色が変化した。

【0094】

本発明者らの発明の洞察によると、糖類の反応性は多段階工程において増加する可能性があり、それらの測定を妨害する試薬は、試料中の分析物の指示前に不活化され得る。

【0095】

ファブリック検査が展開する間に、化学物質はファブリック上に印刷され、その後ファブリックはストリップへと切断された。ストリップは連続したファブリックと同様の構造を形成するよう並行して置かれ、プラスチックの膜の間に層状にされた。当初の選択は酢酸セルロースプラスチックであったが、親水性の性質により、液体がプラスチックとファブリックの界面で移動した。この問題は、試料液をファブリック中に保持する疎水性のプラスチックを用いることで解決された。図1は、吸湿性のファブリックによる方法の構造の一例を描く。種々の試薬を含有するファブリックの種々の領域が存在する場合もある。図1の種々の色は、潜在的な試薬エリアを描く。

20

30

【0096】

したがって、ファブリック材料を含む検査装置が提供され、ファブリックは、一続きのファブリックを形成するために連続して結び付けられた一連の別個のストリップか、一枚のファブリックのいずれかを含む。別個のストリップはそれぞれ少なくとも1つの試薬を含み、好適には1つ試薬のみであり、一方で、一枚のファブリックは所定および連続した順番でファブリック上に提供された1つより多くの試薬を含む。このファブリック材料は2枚の不浸透性の層によって層状にされ、不浸透性の層のうち1枚は少なくとも1つの開口部、好適には複数の開口部を有する。開口部の形状は円形、三角形、四角形、正方形または同様のいかなる形状でもよい。開口部の大きさは0.01mmの穿孔から2cmより大きいものまで変化し得るが、開口部が単一の場合、開口部の大きさは2cm以上である。ファブリック材料中の液体の毛細管移動を容易にするために、不浸透性の部材は通常疎水性の材料で作られる。適切な材料は不織ポリプロピレン材料を含む。

40

【0097】

また、装置は少なくとも1つのサンプリング開口部を含む形式を提供し得る。この開口部は透明または不透明な不浸透性の層によって層状にされた一連の試薬帯域を含む通路へ続き、不浸透性の層は、少なくとも1つの層状にされていない開口部または検査指示領域

50

を含む透明な積層で終結する。

【0098】

明らかに、拭き取りまたは吸収検査装置は、例えば試料が検査され、干渉試薬を不活化するように修正するなど、本発明の原理を活かすことが可能なあらゆる形状を有し得る。例えば装置の片側、例えば試料を拭き取ったり吸収したりするエリアと同一または反対側の面に、検査指示領域を有することも可能である。

【0099】

前述のように本発明は好適には一層のファブリックの、例えば連続的に異なる帯域へ塗布された試薬を含む側方流動の検査形式に関する。このような側方流動検査が様々な設計ならびに技術的および方法論的なアプローチを含むことは、当業者にとっては明白である。

【0100】

装置は任意的に、試料を通過させる一方で試薬または試料の逆流を制限するファブリック材料の層を含み得る。この層はしばしば半浸透性の層とも呼ばれる。例えば、半浸透性の層は疎水性の材料で作られ得る。適切な疎水性材料は不織ポリプロピレン材料である。

【0101】

試験管法で用いられる酒石酸ナトリウム・チオ硫酸ナトリウム法は、テーブルトップの試験印刷機で、別々のファブリック上にそれぞれの試薬を印刷することでファブリックに移される。多段階検査の目的は酸性条件で糖の環を破壊し、酒石酸ナトリウムで糖鎖を、還元アルデヒド基を含有する短い炭素鎖へと酸化することである。BCA方法を干渉する過剰量の酒石酸ナトリウムは、指示の前にチオ硫酸ナトリウムで中和され、結果として生じるアルデヒド基を含有する炭素鎖により銅が還元され、強力な吸収性錯体が形成される。

【0102】

用いられたファブリックは、0.1Mの炭酸塩緩衝剤によりpH10.2で前処理されたポリエステルファブリックであった。BCA試薬はA+1/2Bの割合で、前処理されたファブリックに印刷された。他の試薬は、前処理されていないファブリックに塗布された。

【0103】

検査の間、少量の過剰なチオ硫酸ナトリウムがゼロ反応を引き起こすので、酒石酸ナトリウムを中和するチオ硫酸ナトリウムをファブリック上に含む方法を用いることは好ましくない。さらに、この方法に伴う検出限界は高いので、1g/l未満の濃度を有する糖溶液は、可視的な色の変化を起こさなかった。チオ硫酸ナトリウムの代わりに硫酸第一鉄を用いることが好ましい。硫酸第一鉄は過ヨウ素酸塩をヨウ素酸塩へ還元し、同時に三価第二鉄イオンへと酸化する。

【0104】

72g/lの濃度の硫酸鉄(II) ($\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$)、11.3g/lの濃度の過ヨウ素酸ナトリウム、0.1Mの濃度の硫酸およびA+1/2BのBCA試薬が、別々のファブリック上に印刷された。それらは、最初に硫酸、次に過ヨウ素酸ナトリウム、最後に硫酸第一鉄となるような単一の構造へと積層された。これに反応エリアとして清浄なファブリックストリップが続き、その後BCA試薬が続く。試料がファブリックに沿って移動すると、以下に示す反応系列の発生が予測される(Waffenschmidtら、前記; Claydenら、Organic Chemistry, OLIP 2001, 146, 344, 1369; Caldwellら、J. Biol. Chem. 1938, 123, 595-606)。

【0105】

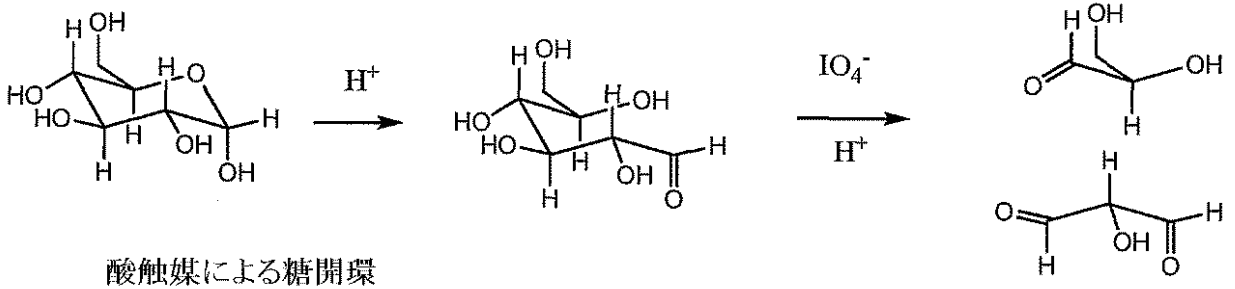
10

20

30

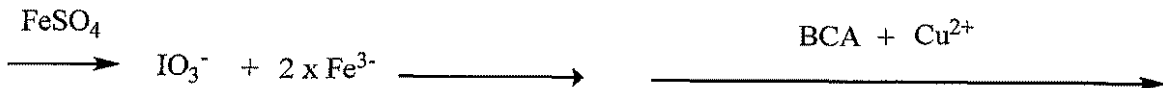
40

【化1】



過ヨウ素酸塩により開裂されたジオール (可能性の1つ)

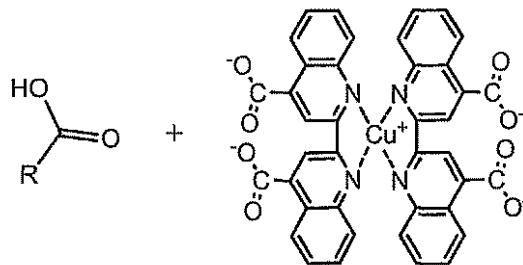
10



過剰の過ヨウ素酸塩が硫酸鉄により還元



20



アルデヒドが酸化され銅が還元
Cu⁺がピシンコニン酸と高度に着色した錯体を形成

30

ファブリック上の推定反応シリーズ

【0106】

第一段階において環構造は硫酸により開環される。次の段階で過ヨウ素酸塩がジオールを切断し、糖類をアルデヒドへと酸化する。過ヨウ素酸塩は硫酸第一鉄により中和され、最終段階において銅が形成されたアルデヒドにより還元され、BCAとの着色錯体が形成される。

【0107】

試料がファブリックに沿って移動すると、硫酸第一鉄は指示エリアまで運ばれ偽陽性反応を引き起こすことが分かった。これは、銅と反応する二価の鉄によるものであり、鉄の酸化および銅の還元、 $\text{Fe}^{2+} + \text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{Cu}^{+}$ となる。硫酸第一鉄は過ヨウ素酸ナトリウムによって完全に酸化され、かつゼロ反応を引き起こさないように、適切な量で存在するべきである。三価鉄はもはや銅と反応しないが、その赤褐色が、形成されたBCA銅錯体の紫色を覆う可能性があるため、指示エリアに運ばれたものは検出限界を弱める。

40

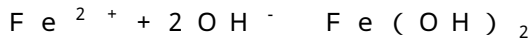
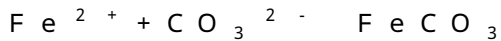
【0108】

炭酸塩緩衝剤の帯域は、鉄が指示エリアへ運ばれることを防ぐために挿入された。ファブリックは0.1Mの炭酸塩緩衝剤とpH10.2で塗られ、摂氏60度の炉の中で乾燥

50

された。炭酸塩層は硫酸第一鉄の後ろかつ指示エリアの前に置かれた。鉄は、アルカリ性の炭酸塩層において炭酸イオンおよび水酸化物イオンと反応して、以下に示す化合物を形成する (Smithら、前記)。

【0109】



可溶性である代わりに、現れた鉄化合物の析出物はファブリック上で蓄積する化合物の移動を止める。

【0110】

結果として生じる検査は機能的で、糖を含有する試料で反応が得られたが、一方で陰性対照試料は無色のままであった。この方法の検出限界は0.5 g/lであった。ファブリック上における糖検査の、機能的な検査の概念作用の一例は図2に示されており、1.拭き取りエリア、2.硫酸、3.過ヨウ素酸ナトリウム、4.硫酸第一鉄、5.炭酸塩緩衝剤、および6. A + 1 / 2 B の B C A を含む。過ヨウ素酸ナトリウムおよび硫酸の層は、過ヨウ素酸により置き換えられ得るということが留意されるべきである。

【0111】

一般的に本発明で記載される方法は、一枚のファブリック上に化学物質を並べて印刷すること、または種々のファブリック上にそれぞれ印刷することを含み、種々のファブリックは一続きのファブリック構造を形成するために並べて層状にされる。検査はファブリック中の別々のストリップから収集されたので、これらの層は検査が展開する間も存続できた。しかしながら、一続きの一片のファブリックがロール-ツー-ロールの大量生産で用いられ、ファブリックの部分を炭酸塩緩衝剤で洗浄することを実際問題として困難にするだろう。それゆえ、必要とされる量の炭酸塩緩衝剤が印刷によって移されなければならない。1モル濃度の炭酸塩緩衝剤が指示エリアに印刷された。鉄が析出する場所のファブリック上にある炭酸塩緩衝剤の量は、例えば溶液をpH 10.2に飽和させるなど、炭酸塩緩衝液のモル濃度を増加させることで増幅され得る。溶液は、24.9 ml/m²の容量を移動できる印刷シリンダーを用いてファブリック上に二度印刷された。印刷されたエリアにおいて、鉄は炭酸塩として析出し、試料液と共に移動することが阻止されるので、これにより、硫酸第一鉄の量を最適化する必要はなくなる。緩衝液のモル濃度を調節すること、および印刷シリンダーにおける網目の大きさおよびカップの深さを変更することにより、移される試薬の量を管理することができる。

【0112】

前述のように、化学物質の量は、過ヨウ素塩酸ナトリウムをオルト過ヨウ素酸 H₅IO₆ (HIO₄ × 2 H₂O) で置き換えることでさらに軽減され得る (Masudaら、J. Org. Chem. 1994, 59, 5550-5555)。オルト過ヨウ素酸は固体状で利用可能であり、ファブリック上で安定である。オルト過ヨウ素酸のpK_A値は1.64なので、オルト過ヨウ素酸もまた糖の環の開環において弱い硫酸に置き換わる。

【0113】

検査の感度を強化するために、ファブリック上の B C A 試薬の比率はさらに最適化された。試験管法において、溶液 A および溶液 B は 50 : 1 の比率で一緒に混合された。1 : 1 (A + B) および 2 : 1 (A + 1 / 2 B) という著しく高い比率は、試薬をファブリック上に印刷する場合に用いられた。この場合、銅の青色が紫色の B C A 錯体の観測を干渉した。銅溶液は水で 1 : 10 (1 / 10 B) まで希釈された。銅の量を減少させることは検出限界を低くし、以前用いられていた 0.5 g/l の糖溶液に代わって 0.1 g/l の糖溶液の色の変化が検出され得る。

【0114】

実施例 4

ある実施態様において、室温で糖を検出するための検査装置は、5つの異なる領域およびそれらのエリア上に印刷された5つの異なる化学物質および/または試薬液を含有した

10

20

30

40

50

。第1のエリアについては、化学物質を含有しない掃引または吸引領域である。その後液体試料は、印刷されたオルト過ヨウ素酸を含有するエリアへと移動し、そこで糖の環構造およびモノマー間のエーテル結合が切断される。さらにこのエリアで、糖類はオルト過ヨウ素酸によりアルデヒドへと酸化される。次のエリアは、過ヨウ素酸塩をヨウ素酸塩へと還元させ、同時に三価の第二鉄へと酸化する硫酸第一鉄を含む。第一鉄および第二鉄イオンは鉄炭酸塩および水酸化第二鉄として、炭酸塩緩衝剤を含有する次のエリアで析出する。最後の機能的な層は、 24.9 ml/m^2 のインクを移動できるシリンダーで印刷された、BCA検査の純粋なA溶液および1:10に希釈されたB溶液を含む。紫色は 0.5 g/l の糖を含有する $300 \mu\text{g}$ のサンプルで生じ、液体試料中の、例えばフルクトース、サッカロース、ラクトース、マルトースまたはデキストリンなどの糖類 $150 \mu\text{g}$ を検出する能力を示す。しかしながら、検査の感度は上記の糖の順序に沿って減少し、したがって、最初の糖ではより低い糖濃度でさえ検出可能である。

10

【0115】

オルト過ヨウ素酸は個別の酸、例えば弱硫酸および過ヨウ素酸ナトリウムなどの層によって置き換えることができる。硫酸第一鉄の代わりに、図2に示されるようにチオ硫酸ナトリウムもまた、過ヨウ素酸塩の不活化に用いられ得る。

【0116】

吸湿性ファブリックの上記概念は試験管でも検査された。この検査形態の試薬を用いて、化学物質は試験管中で表5.1に示される手順で測定された。硫酸第一鉄が加えられた後、三価の鉄イオンが溶液中で形成されるため、溶液はいくらか濁った。炭酸塩とされた第一鉄および第二鉄ならびに水酸化物は5分以内に試験管の底へと沈降し、その後BCA混合液に含まれる溶液Aが加えられた。

20

【0117】

【表7】

表5.1. 室温で機能するBCA炭水化物検査

試薬	量
糖溶液 1g/l	1ml
過ヨウ素酸 11.3g/l	$100 \mu\text{l}$
硫酸第一鉄 72g/l	$30 \mu\text{l}$
BCA混合液、溶液B	$10 \mu\text{l}$
BCA混合液、溶液A	1ml

30

【0118】

1 g/l の糖濃度では、溶液はただちに紫色へと変化した。色は時が経つにつれて暗くなり続けたが、これは銅がゆっくりと還元していることによるものだと推測される。 0.01 g/l の糖濃度では、発色が可視的な検出可能レベルまで至るのに、単糖類および二糖類では7分かかった。発色は、デキストリンおよびスターチでは遅かった。

40

【0119】

本発明および関連する検査の利点の一つは、ロール-ツー-ロール印刷方法での加工可能性である。このため、検査で用いられる化学物質はすべて印刷方法によりファブリック上に移すことができる。好適な検査の製造は、ファブリック上に逐次印刷される5つの化学物質を含む。ファブリックは印刷の間伸縮するので、装置には高い精度で整列する能力が要求される。さらに、多くの試薬は無色であるので、印刷の質を監視することおよび種々のエリアの配置をさらに複雑にする。本発明によれば、印刷ユニットの数と用いられる試薬の数が一致するプレスによる印刷が一番簡単である。この場合、好適な検査のために推奨される印刷ユニットの数は5つである。この種類の装置は、1つの作業の間に全ての化学物質をファブリック上に印刷できる。これは、種々の化学物質の層を配置することお

50

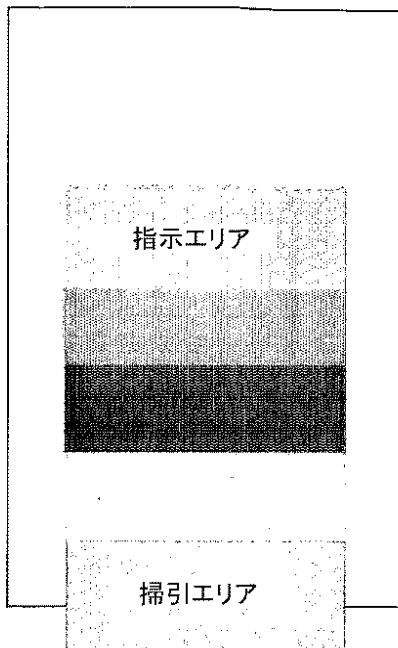
よび伸縮に関連する問題の衝撃を減少させる。なぜなら伸縮が全ての印刷ユニットに同一に影響するからである。

【0120】

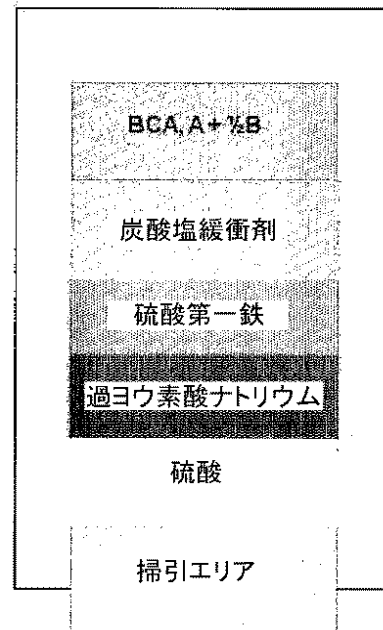
本発明の下で展開した検査は、室温で機能する糖検出のための初めての非酵素検査である。本発明の方法は、多くの検査で検出できなかった中性の糖類の測定も可能である。本発明により与えられる重要な洞察は分析物の化学的修飾であり、例えば糖類の過ヨウ素酸による化学的修飾、および指示段階およびファブリックの使用前の干渉剤の不活化である。本発明の1つの実施態様は、吸湿性ファブリックに基づく柔軟な検査であって、ファブリック上での干渉化学物質の析出を容易にし、したがってファブリック上でのそれらのさらなる移動を阻止する検査を提供する。

10

【図1】



【図2】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FI2009/000028

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/52 G01N33/543		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2006/122733 A (ORION DIAGNOSTICA OY [FI]; HAEIVAE VELI-MIES [FI]; KYLMAE ANNA KAISA []) 23 November 2006 (2006-11-23) cited in the application abstract claims 18-24,29-32,35-45,51,52,55,58,60 page 18, line 22 - page 20, line 4 figures 1,2 ----- -/-- Page-	1-3,5, 13, 16-18, 20-23, 26,27,30
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		*I* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 17 August 2009		Date of mailing of the international search report 26/08/2009
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Mulder, Lonneke

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/FI2009/000028

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 586 195 B1 (FRIEDMAN ARTHUR J [US]) 1 July 2003 (2003-07-01) cited in the application abstract column 2, line 37 - line 50 column 4, line 34 - line 65 examples 4,5 claims 5-7,10 claim 7	1-5, 16-18,30
X	column 4, lines 61-65	20
X	US 4 298 688 A (KALLIES KARL-HEINZ) 3 November 1981 (1981-11-03) abstract column 3 column 6, line 55 - line 65 claims 1,4,7-9	1-3,5-9, 11, 15-17, 20,24, 28,29
Y		12
X	US 5 620 863 A (TOMASCO MICHAEL F [US] ET AL) 15 April 1997 (1997-04-15) abstract figures 1-3 claims 1,5-7,9,11 column 3, line 62 - column 4, line 6 column 5, line 4 - line 45 column 6, line 37 - line 64 column 9, line 12 - line 26	1-3,5,7, 9,13,20, 28,29
Y	WAFFENSCHMIDT S ET AL: "Assay of reducing sugars in the nanomole range with 2,2'-bichinoninate" ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, ACADEMIC PRESS INC, NEW YORK, vol. 165, no. 2, 1 September 1987 (1987-09-01), pages 337-340, XP024830121 ISSN: 0003-2697 [retrieved on 1987-09-01] abstract materials and methods	12
A	WO 95/12619 A (INST VOOR AGROTECH ONDERZOEK [NL]; VEELAERT SARAH [BE]; WIT DIRK DE [N]) 11 May 1995 (1995-05-11) examples abstract	10,19,25

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/FI2009/000028

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2006122733	A	23-11-2006	AU 2006246649 A1	23-11-2006
			CA 2608920 A1	23-11-2006
			CN 101213449 A	02-07-2008
			EP 1882185 A2	30-01-2008
			GB 2426334 A	22-11-2006
			JP 2008541107 T	20-11-2008
			<hr/>	
US 6586195	B1	01-07-2003	NONE	
<hr/>				
US 4298688	A	03-11-1981	BG 37647 A1	16-07-1985
			CH 640638 A5	13-01-1984
			DD 143379 A3	20-08-1980
			DE 2922856 A1	14-02-1980
			FR 2433750 A1	14-03-1980
			GB 2026160 A	30-01-1980
			HU 182641 B	28-02-1984
			SE 7906339 A	27-01-1980
			US 4281062 A	28-07-1981
			<hr/>	
US 5620863	A	15-04-1997	NONE	
<hr/>				
WO 9512619	A	11-05-1995	AU 1123595 A	23-05-1995
			CA 2175794 A1	11-05-1995
			EP 0726916 A1	21-08-1996
			FI 961905 A	03-07-1996
			JP 9500414 T	14-01-1997
			NL 9301905 A	01-06-1995
			US 5747658 A	05-05-1998
			<hr/>	

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78 A

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 ルオトラ、ユハニ
フィンランド共和国、フィン - 0 2 2 7 0 エスポー、メンテュカッリオンチエ 1 2 デー

(72)発明者 スンナリ、アンチ
フィンランド共和国、フィン - 9 0 8 3 0 ハウキプダス、ヘボクヤ 1 7

(72)発明者 コロルオマ、テルホ
フィンランド共和国、フィン - 9 0 6 5 0 オウル、ピュレスチエ 4 ベー 1

(72)発明者 ケレネン、ミッコ
フィンランド共和国、フィン - 9 1 8 0 0 テュルネベ、ルイスポルク 4

Fターム(参考) 2G042 AA01 BD20 CA10 CB03 DA02 DA03 FB02 FB07 FC02 GA01
HA08
2G045 BB51 DA30 FA18 FB11 FB17 GC12 JA07
2G054 CA23 EA04 EA06 GA03 GB01 GE06