

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4328203号
(P4328203)

(45) 発行日 平成21年9月9日(2009.9.9)

(24) 登録日 平成21年6月19日(2009.6.19)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 33/543 (2006.01)

C 1 2 M 1/34 (2006.01)

C 1 2 N 15/09 (2006.01)

C 1 2 Q 1/68 (2006.01)

G O 1 N 33/53 (2006.01)

G O 1 N 33/543 5 2 1

C 1 2 M 1/34 Z

C 1 2 N 15/00 A

C 1 2 Q 1/68 A

G O 1 N 33/53 Q

請求項の数 12 (全 7 頁)

(21) 出願番号 特願2003-529151 (P2003-529151)
 (86) (22) 出願日 平成14年9月17日(2002.9.17)
 (65) 公表番号 特表2005-503556 (P2005-503556A)
 (43) 公表日 平成17年2月3日(2005.2.3)
 (86) 国際出願番号 PCT/SE2002/001671
 (87) 国際公開番号 W02003/025573
 (87) 国際公開日 平成15年3月27日(2003.3.27)
 審査請求日 平成17年7月26日(2005.7.26)
 (31) 優先権主張番号 0103072-5
 (32) 優先日 平成13年9月17日(2001.9.17)
 (33) 優先権主張国 スウェーデン(SE)
 (31) 優先権主張番号 60/322,616
 (32) 優先日 平成13年9月17日(2001.9.17)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 500139981
 ファディア・アクチボラゲット
 P h a d i a A B
 スウェーデン751 37ウプサラ、ボッ
 クス6460
 (74) 代理人 100081422
 弁理士 田中 光雄
 (74) 代理人 100106231
 弁理士 矢野 正樹
 (72) 発明者 イブ・メンデルーハートヴィッグ
 スウェーデン、エスー756 55ウプサ
 ラ、ラベニウスヴェーゲン28番
 (72) 発明者 ルネ・ビエルクマン
 スウェーデン、エスー752 36ウプサ
 ラ、コボヴェーゲン34番

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多数ースポット検出ゾーンでの多数ー分析物アッセイデバイス

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

それを通して流体の横方向輸送を行う細長い流動マトリックス(6)、ここに、上記マトリックスは試料適用ゾーン(3)およびその下流を含み、分析物に直接的または間接的に結合することができる固定化された捕獲剤を有する検出ゾーン(8)、ここに、上記分析物は、標識された第2の結合剤を上記分析物に直接的または間接的に結合させることによって検出され；を含む水性試料中の分析物を測定するためのデバイスであって、A)固定化された捕獲剤は複数の小さなスポットとして検出ゾーン(8)に分布され、それにより、多数ー分析物および/または多数ー特異性検出を行い、B)捕獲剤は固定化された粒子を介してマトリックスに係留され、C)流動マトリックス当たりのスポットの数は10未満であって、D)スポットのいくつかは陽性対照(類)および/または内部キャリブレーター(類)として機能し、および分析物と交差反応する能力を有する捕獲剤、対照剤またはキャリブレーター剤を含むスポットは異なる液体の流動線に整列されることを特徴とする上記デバイス。

【請求項 2】

スポットが、直径が1mmより小さく、好ましくは、直径が0.5mmより小さい請求項1記載のデバイス。

【請求項 3】

流動マトリックスが多孔性膜である前記請求項いずれか1記載のデバイス。

【請求項 4】

マトリックスが固体材料のストリップである請求項 1 または 2 記載のデバイス。

【請求項 5】

捕獲剤が抗体またはその免疫反応性断片である請求項 1 ないし 4 いずれか 1 記載のデバイス。

【請求項 6】

捕獲剤がアレルゲンまたはその免疫反応性断片である請求項 1 ないし 4 いずれか 1 記載のデバイス。

【請求項 7】

捕獲剤が自己抗原またはその免疫反応性断片である請求項 1 ないし 4 いずれか 1 記載のデバイス。

【請求項 8】

捕獲剤が DNA / RNA、好ましくは、一本鎖核酸またはアプタマー、または DNA / RNA 様構造体である請求項 1 ないし 4 いずれか 1 記載のデバイス。

【請求項 9】

試料が全血、血清、血漿、唾液または尿である前記請求項いずれか 1 記載のデバイス。

【請求項 10】

標識が発蛍光体または色原体である前記請求項いずれか 1 記載のデバイス。

【請求項 11】

未知の特異性のスクリーニングのための前記請求項 1 ないし 10 の 1 以上のデバイスの使用。

【請求項 12】

特異的免疫グロブリンのスクリーニングのための前記請求項 1 ないし 10 の 1 以上のデバイスの使用。

【発明の詳細な説明】

【発明の詳細な説明】

【0001】

発明の分野

本発明は、多数 - スポット検出ゾーンを含む固相アッセイデバイス、および免疫クロマトグラフィーアッセイにおけるその使用に関する。

【0002】

発明の背景

あるタイプの固相アッセイデバイスは、吸収性材料のプレート - 形状の流動マトリックス、通常は、硝酸セルロースまたはガラス繊維のごとき膜ストリップを含み、ここに、液体は膜中の毛管力によって横方向に（すなわち、ストリップの平面内を）輸送され得る。該膜は、通常、試料適用ゾーンおよび試料適用ゾーンの下流の検出ゾーンを含む。検出ゾーンにおいては、通常、分析物用の捕獲試薬を固定化する。アッセイを行うためには、適用ゾーンを液体試料と接触させて、注目する分析物につきアッセイする。デバイスは、もし試料中に存在すれば、膜ストリップを通じて、そこで分析物が捕獲される検出ゾーンへ液体の毛管作用が注目する分析物を輸送するのに十分な条件下に維持される。ストリップの下流端部における吸収パッド等は、通常、毛細管液体流動を保証する。次いで、通常は標識された検出試薬を検出ゾーンの上流に加え、検出ゾーン中の捕獲された分析物と相互作用させ、捕獲された分析物の量を測定する。しばしば、検出試薬は、試料適用ゾーンの上流、または試料適用ゾーンまたは検出ゾーンの間はいずれかに、例えば、発蛍光または色原体基を含有する拡散して移動可能な粒子の形態で、膜ストリップ中にまたはその上に予め配置される。

【0003】

これらの既知のデバイスに伴う主な欠点は、少数の分析物がアッセイ当たりに測定できるに過ぎないことである。

EP191640 (Syntex Inc) において、1 を超える分析物を検出することができるデバイスが開示されている。しかしながら、検出することができる分析物の数は制限されており、

10

20

30

40

50

交差 - 反応性分析物を検出する問題は取り扱われていない。

【 0 0 0 4 】

発明の概要

本発明に横たわる問題は、いくつかの分析物、および同一の I g E と反応する異なるアレルギーのごとき、相互に交差反応する分析物さへの検出を可能とすることであった。

この問題は、本発明により多数 - スポットデバイスによって解決された。

【 0 0 0 5 】

かくして、本発明の第一の態様において、それを通して流体の横方向輸送を行う細長い流動マトリックス、ここに、上記マトリックスは試料適用ゾーンおよびその下流を含み、分析物に直接的または間接的に結合することができる固定化された捕獲剤を有する検出ゾーン、ここに、上記分析物は、標識された第 2 の結合剤を上記分析物に直接的または間接的に結合させることによって検出され；を含む水性試料中の分析物を測定するためのデバイスであって、A) 固定化された捕獲剤は複数の小さなスポットとして検出ゾーンに分布され、それにより、多数 - 分析物および / または多数 - 特異性検出を行い、B) 捕獲剤は固定化された粒子を介してマトリックスに係留され、C) 流動マトリックス当たりのスポットの数は 10 未満であって、D) スポットのいくつかは陽性対照 (類) および / または内部キャリブレーター (類) として機能することを特徴とする上記デバイスが提供される。

10

【 0 0 0 6 】

流動マトリックス当たりのスポットの数は好ましくは 5 ないし 1000、より好ましくは 10 ないし 100 である。スポットは好ましくは、直径が 1 mm より小さく、好ましくは直径が約 0.5 mm より小さい。

20

スポットは、好ましくは、交差反応性分析物または特異性の検出を可能とするパターンで配置される。これは交差 - 反応性 I g E を有するアレルギーによって例示され、すなわち、そのようなアレルギーは同一流動線に配置すべきではない。

【 0 0 0 7 】

流動マトリックスは、ニトロ - セルロースのごとき多孔性膜、または固体材料のストリップであり得る。

捕獲剤は抗体またはその免疫反応性断片であり得る。あるいは、捕獲剤はアレルギーまたはその免疫反応性断片である。

30

【 0 0 0 8 】

もう 1 つの代替法においては、捕獲剤は DNA / RNA、好ましくは一本鎖またはアプタマーである。

デバイスの好ましい具体例においては、スポットのいくつかは陽性対照 (類) および / または内部キャリブレーター (類) として機能する。

試料は全血、血清、血漿、唾液または尿である。

標識された第 2 の結合試薬の標識は、例えば、発蛍光体または色原体である。

【 0 0 0 9 】

該デバイスは、未知の特異性のスクリーニングで、ならびに特異的免疫グロブリンの検出で用いることができる。多くのスポットに既知の物質、例えば、蛋白質または DNA 等を沈積させることによって、特定のスポット (類) 中の物質に特異的に結合する、試料中に存在するバインダー (類) につき迅速にスクリーニングすることができる。その例は特異的 I g E の試料測定であり、ここに、スポットは異なるアレルギーを含む。もう 1 つの例は、異なる反応性についてのライブラリー (DNA、抗体等) のスクリーニングについてである。

40

【 0 0 1 0 】

発明の詳細な記載

図 1 に示すごとく、デバイスは、上方ハウジング部分 1、試料に関して、デバイスで実行すべきアッセイで用いるいずれの試薬に対しても不活性な材料、例えば、ポリスチレンまたはポリプロピレンの下方ハウジング部分 2 を含む。上方ハウジング部分 1 は、試料ウ

50

エル開口 3（ここでは、円錐状）および検出ウインドウ 4 を有する。

【 0 0 1 1 】

下方ハウジング部分 2 は、そこに、吸収性材料（すなわち、毛細管作用による水性媒体の移動に対して感受性の多孔性材料）の膜ストリップ 6、例えば、ポリエステル裏打ち上のニトロ - セルロースが設けられている。（図面中の左側の）ストリップ 6 の上流端部近くには、拡散により移動可能な検出試薬（標識された第 2 の結合試薬）を含むフィルターピース 7 がストリップ上に置かれている。そのような検出試薬は、例えば、標識粒子および分析物に結合することができる反応体の間のコンジュゲートであり得る。さらに下流には、検出ウインドウ 4 の下方およびその中に、ストリップ上に特異的なパターンで固定化されたいくつかの捕獲剤または反応体を含むストリップ上の複数 - スポット反応ゾーン 8 が設けられている。捕獲剤は、テストされるべき分析物に結合することができる。反応ゾーン 8（図 2 ないし 3）は、図面で示されるよりも小さくても大きくてもよく、5 ないし 1000 の捕獲剤、好ましくは 10 ないし 100 の捕獲剤を含むことができる。重要なことには、交差 - 反応性分析物を有する捕獲剤は、所望により、同一レーンには配置されず、すなわち、液体の同一流動線には配置されない。

10

【 0 0 1 2 】

上方ハウジング部分 1 は、膜ストリップ 6 の上流端部に、流動液体または緩衝液のための容器として働かせることを意図した液体吸収性材料のパッド 11 を含む。ハウジング部分 1 における開口 3 は、試料を膜 6 に導入することを意図している。示された場合には、（所望により、2 以上のフィルターよりなることもできる）フィルターエレメント 12 が、アッセイ用の開口 3 の下方に設けられ、ここに、試料が全血であって、血液細胞を分離すべき場合には、試料液体は濾過される必要がある。かくして、緩衝液パッド 11 が緩衝液液体容器（以下、緩衝液パッドという）を形成し、試料開口 3 およびフィルターエレメント 12 によって規定される室は、試料ウエルまたは試料容器を形成する。

20

【 0 0 1 3 】

所望により、引き出しフィルム 5 を、さらに後記する目的で存在させる。膜ストリップ 6 の下流端部には、吸上エレメント 13 が設置され（ここでは、セルロースのごとき吸収剤材料のパッドの形態である）、その目的は、膜ストリップ 6 を通ってのアッセイ液体の毛細管流動を維持するのを助けることにある。

【 0 0 1 4 】

試料における分析物のためのアッセイは、以下に記載するデバイスで実行することができる。

30

デバイスには、通常、緩衝溶液（流動液体）を浸漬した緩衝液パッド 11 を設け、検出試薬はフィルター 7 に予め沈積させ、各適当な捕獲試薬およびキャリブレーション剤は反応（または検出）ゾーン 8 中にスポットの特異的なパターンで固定化する。これは、他のスポットよりはキャリブレーションスポットを最適に位置させる可能性を提供する。

【 0 0 1 5 】

キャリブレーションスポットの機能は陽性対照および/または内部キャリブレーターとしてのものである。

もしテストすべき分析物が抗原であれば、フィルター 7 中の検出試薬は、例えば、フルオロゲン - 標識粒子にカップリングした抗原に対する抗体であり得、多数 - スポット反応ゾーン 8 中の固定化された捕獲試薬は抗体であり得、キャリブレーター剤は分析物または分析物のアナログであり得る。

40

【 0 0 1 6 】

所定量の試料をハウジング部分 1 中の開口 3 を通して添加する。全ての必要なアッセイ液体、すなわち、この場合には試料液体および緩衝液液体を次いでデバイス中に存在させるが、引き出しフィルム 5 は、各液体膜ストリップ 6 の間の接触を効果的に妨げる。次いで、引き出しフィルム 5 をオペレーターが除去し、それにより同時液体受領における膜ストリップ 6 を緩衝液パッドおよび試料ウエル 3 中の試料液体と接触させる。もし引き出しフィルムが存在しなければ、アッセイは試料の添加に続いて直接開始するであろう。

50

【 0 0 1 7 】

今や、パッド 1 1 からの緩衝液液体が、直接パッド 1 1 と接触する（図 3 参照）そのはるか上流の端部部分を介して膜ストリップ 6 に進入し、毛管力によって膜ストリップ 6 の下流まで輸送される。同時に、試料液体が直接輸送され、続いて、（第一の）緩衝液液体の流動パルスが輸送される。しかしながら、検出試薬フィルター 7 および緩衝液パッド 1 1 の主な部分は、流動バリア - フィルム 1 0 によって膜ストリップ 6 から離される。膜ストリップ 6 に輸送された緩衝液液体は、フィルター 7 に進入し、それを通して輸送され、それと共にその中に検出試薬を沈積させ、それにより、検出試薬の流動パルスを形成する。この検出試薬流動パルスは、試料流動および緩衝液流動パルスの後に順次に従う。検出試薬がフィルター 7 から除去された後に膜ストリップ 6 に輸送された緩衝液は、検出試薬流動パルスの後に第 2 の緩衝液流動パルスを形成する。

10

【 0 0 1 8 】

前記した異なる液体流は示した順番にすなわち、試料流動、第一の緩衝液流動、検出試薬流動、および第 2 の緩衝液流動の順で膜ストリップ 6 に沿って輸送され、結局は、多数 - スポット反応ゾーン 8 に到達する。反応ゾーン 8 においては、試料に存在する分析物は、膜中に特異的スポットパターンで固定化された試薬によって捕獲される。形成された分析物 / 捕獲試薬複合体は、以下の第 1 の緩衝液流動によって洗浄され、検出試薬の流れは反応ゾーン中に検出可能な試薬 / 分析物複合体を形成する。後者は最後には、第 2 の緩衝液の流れによって洗浄される。キャリブレーションスポットにおいてはその中の所定量の分析物が、検出試薬流中の検出試薬と反応して検出可能な検出試薬 / 分析物複合体を形成する。反応ゾーンに検出された試薬からのシグナル強度を分析することによって、それはキャリブレーションスポット（類）で得られたものと相関させて、試料中の分析物の量を決定することができる。

20

【 0 0 1 9 】

前記した反応（または検出）ゾーン 8 においては、分析物に特異的に結合することができるいくつかの反応体を（共有結合によって、物理的吸着を介して生物特異的親和性を介して、反応体が共有結合した固定化粒子を介して）特異的スポットパターンで固定化する。しかしながら、その代わりに、反応体と反応することができる剤を膜中に固定化させ、次いで、試料と共に反応体を添加し、あるいは反応ゾーンの上流の領域またはゾーンにある膜中に予め沈積させることができる。そのような固定化された剤は特異的結合対（s p d）の 1 つのメンバーであり得、次いで、反応体を s p d の他のメンバーにカップリングまたはコンジュゲートさせる。例示的な特異的結合対は抗原 - 抗体およびハプテン - 抗体、ビオチン - アビジンまたは - ストレプトアビジン、レクチン - 糖、ホルモン - ホルモン受容体、核酸デュプレックスのごとき免疫学的結合対を含む。例えば、反応ゾーンはその中に固定化されたストレプトアビジンを有することができ、分析物用の捕獲反応体はビオチニル化することができる。

30

【 0 0 2 0 】

同様に、キャリブレーションスポット（類）はキャリブレーター物質それ自体よりはむしろキャリブレーター物質のためのバインダーを含むことができる。バインダーは、通常、前記したもののうちの 1 つのごとき特異的結合対のメンバーである、他方、特異的結合対の他のメンバーは、試料と共に添加することができるか、あるいはキャリブレーターゾーンの上流に予め沈積させることができるキャリブレーター物質にカップリングまたはコンジュゲートさせる。例えば、ストレプトアビジンはキャリブレーターゾーンに固定化することができ、他方、キャリブレーター物質はビオチニル化される。

40

【 0 0 2 1 】

ここに考えられるタイプのアッセイデバイス、特に、流動マトリックス、順次アッセイ、キャリブレーターシステム、検出試薬に関するアッセイデバイスのさらなる詳細については、例えば、我々の公開された PCT 出願 WO 99/36776、WO 99/36777 および WO 99/36780 に言及することができる。

【 0 0 2 2 】

50

本発明のデバイスを用いて測定すべき分析物は、当業者に容易に明らかであろう。しかしながら、通常、分析物は生物特異的親和性試薬、例えば、抗体または他の蛋白質、ハプテン、DNA配列のごとき核酸またはポリヌクレオチドである。後者の場合、反応ゾーンはストレプトアビジンを含むことができ、分析物の配列がそれにハイブリダイズするDNA配列ビオチニル化することができる。

【0023】

本発明のデバイスは、アッセイを開始する前に試料の便利な予備処理を可能とする。

本発明のデバイスは我々の公開されたPCT出願WO 99/60402に記載されたタイプのアッセイを実行するのにも適しており、ここに、流動マトリックスは、分析物の測定を乱しまたはそれに影響するであろう試料成分を離すために反応（検出）ゾーンの上流にクロマトグラフィー分離ゾーンを含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0024】

【図1】図1は、本発明によるデバイスの具体例の斜視図である。

【図2】図2は図1におけるデバイスの側面断面図である。

【図3】図3は、図2における側面図に対応する分解図である。

【図1】

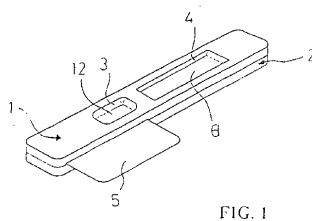


FIG. 1

【図2】

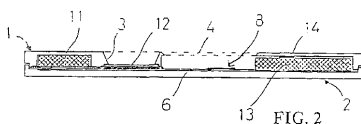


FIG. 2

【図3】

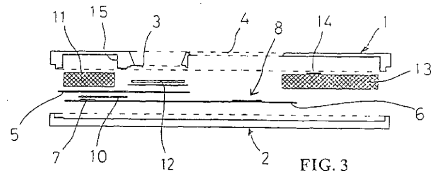


FIG. 3

フロントページの続き

(72)発明者 ガード・ルンドストロム
スウェーデン、エス - 7 5 2 4 1 ウプサラ、ブルックスヴェーゲン 1 6 番

審査官 三木 隆

(56)参考文献 特開平 1 0 - 2 5 3 6 3 2 (J P , A)
特表平 0 8 - 5 0 8 0 9 7 (J P , A)
特表平 0 9 - 5 1 2 3 3 3 (J P , A)
特表 2 0 0 2 - 5 0 9 2 5 2 (J P , A)
特開平 0 5 - 0 0 5 7 4 3 (J P , A)
特開平 1 0 - 2 7 4 6 5 3 (J P , A)
特表平 0 7 - 5 0 5 2 9 3 (J P , A)
特開昭 6 1 - 2 2 8 3 5 4 (J P , A)
特表平 1 1 - 5 0 5 1 2 6 (J P , A)
特表平 0 8 - 5 1 1 6 2 1 (J P , A)
特表 2 0 0 2 - 5 1 4 3 0 6 (J P , A)

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/543
C12M 1/34
C12N 15/09
C12Q 1/68
G01N 33/53