

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3909345号

(P3909345)

(45) 発行日 平成19年4月25日(2007.4.25)

(24) 登録日 平成19年2月2日(2007.2.2)

(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 17 (全 18 頁)

(21) 出願番号	特願平10-533947	(73) 特許権者	ダイアマトリックス リミテッド
(86) (22) 出願日	平成10年1月15日(1998.1.15)		イギリス国, アールジー25 2ジェイ
(65) 公表番号	特表2001-508180(P2001-508180A)		エフ, ハンプシャー, チデストーン,
(43) 公表日	平成13年6月19日(2001.6.19)		ウッズ レーン(番地なし), ザ レイ
(86) 国際出願番号	PCT/GB1998/000136		テ ハウス
(87) 国際公開番号	W01998/032018	(74) 代理人	弁理士 平木 祐輔
(87) 国際公開日	平成10年7月23日(1998.7.23)		
審査請求日	平成17年1月11日(2005.1.11)	(74) 代理人	弁理士 石井 貞次
(31) 優先権主張番号	9700759.5		
(32) 優先日	平成9年1月15日(1997.1.15)	(74) 代理人	弁理士 藤田 節
(33) 優先権主張国	英国(GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 生化学的および免疫化学的アッセイデバイス

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(a)(i)液体をクロマトグラフ的に移送することができる多孔質材料と、(ii)多孔質材料上に供給されたアッセイ用検査試薬1種以上とを含む基体、および

(b)連続した吸水性コンパートメントを画定するように多孔質材料への透明で水不透過性のコーティングポリマーの部分的浸透により基体に付着させた前記コーティングポリマーを含んでなるアッセイデバイス。

## 【請求項2】

多孔質材料が紙である、請求項1に記載のデバイス。

## 【請求項3】

多孔質材料が移送可能な液体に対して不透過性のドーピングポリマーが多孔質材料の一部に加えられて、多孔質材料内にチャネルを画定しており、そこに画定されたチャネルにおいて多孔質材料上に各検査試薬が供給されている、請求項1または2に記載のデバイス。

## 【請求項4】

ドーピングポリマーがアクリル系ポリマー、ビニルアクリル系ポリマーまたはヘテロ多糖である、請求項3に記載のデバイス。

## 【請求項5】

コーティングポリマー(b)がヘテロ多糖、アクリル系ポリマーまたはアクリル系ポリマーである、請求項1～4のいずれか1項に記載のデバイス。

## 【請求項6】

10

20

(b)上に透明な光沢層(c)をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 7】

光沢層(c)がアクリル系ポリマー、アクリル系コポリマー、ポリウロン酸、ヘテロ多糖類、および分子量9000~146000の高分子のアルコールから選択される化合物を1種以上含む、請求項 6 に記載のデバイス。

【請求項 8】

検査試薬が、所定のアナライトと反応して検出可能な結果を生ずることができる検出試薬を少なくとも1種含有する、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 9】

イムノアッセイを行うのに適しており、検出試薬が診断上重要な抗原またはそれに対する抗体である、請求項 8 に記載のデバイス。 10

【請求項 10】

前記検査試薬が、

(a)アナライトが存在すると思われる液体サンプルを多孔質材料に添加した場合に自由に移動可能な、標識したアナライトもしくはアナライト類似体またはアナライトに対する標識した特異的結合試薬、および

(b)検出ゾーン内の多孔質材料上に固定された前記アナライトに対する未標識の特異的結合試薬、

を含有し、液体サンプルを吸水性コンパートメントに添加すると標識試薬(a)が検出ゾーンへと浸透するように、標識試薬(a)と検出ゾーンとの相対的位置が決定されている、請求項 9 に記載のデバイス。 20

【請求項 11】

液体サンプルをアッセイデバイスに添加すると吸水性コンパートメントへとクロマトグラフ的に移送されるような方法で、試薬(a)が、ポリマー(b)で被覆されていない多孔質材料の一部に供給されている、請求項 10 に記載のデバイス。

【請求項 12】

定量的もしくは半定量的アッセイでの使用または複数の所定のアナライトについての液体サンプルのアッセイでの使用に適しており、吸水性コンパートメントが中心部分とそれに接続された複数のチャンネルを含む、請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載のデバイス。

【請求項 13】

所定のアナライトの有無について液体サンプルをアッセイする方法であって、 30

(a)液体サンプルを請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のデバイスの吸水性コンパートメントと接触させ、

(b)多孔質材料に液体サンプルをクロマトグラフ的に移送させ、そして

(c)液体サンプル中の所定のアナライトの存在を判定する、

ことを含んでなる方法。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載のデバイスを含む検査キット。

【請求項 15】

請求項 1 に記載のデバイスを作製する方法であって、 40

(a)液体をクロマトグラフ的に移送することができる多孔質材料を用意し、

(b)多孔質材料上にアッセイ用検査試薬を1種以上供給し、そして

(c)このように得られた多孔質材料をコーティングポリマーの溶液または懸濁液と接触させることにより、前記材料に透明で水不透過性のコーティングポリマーを付着させる、ことを含んでなる方法。

【請求項 16】

工程(a)および(b)の間に、多孔質材料により移送され得る液体に対して不透過性のドーピングポリマーを多孔質材料の一部に適用して、多孔質材料内にチャンネルを画定する追加の工程をさらに含み、工程(b)で各検査試薬が画定されたチャンネルにおいて多孔質支持体上に供給される、請求項 15 に記載の方法。 50

## 【請求項17】

(d)このように得られたデバイスを、アクリル系ポリマー、ゲル化性多糖類およびポリビニルアルコールから選択される1種以上の化合物と接触させて、前記デバイス上に透明な光沢層を形成させる、ことをさらに含む、請求項15または16に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

本発明は、アッセイを実施するための新規なデバイスに関する。

実験室外で生化学的アッセイを実施するための簡易で自蔵型のデバイスがずっと必要とされている。特に、家庭、診療所または医院で使用可能であり、迅速な分析結果を得るのに使用でき、かつ利用者には最低限の技能しか要求せず、しかも利用者の手を最低限にしか煩わさないデバイスが必要とされている。

本発明は、煩雑な手作業による手順を行う必要がなく、そのため有資格者でなくても操作可能な、生化学的アッセイを実施するためのデバイスを提供しようとするものである。

したがって、本発明は、

(a)(i)液体をクロマトグラフ的に移送することができる多孔質材料と、

(ii)多孔質材料上に供給された、アッセイ検査試薬1種以上と

を含む基体、および

(b)連続した吸水性コンパートメントを画定するように多孔質材料に付着させた、透明で水不透過性のコーティングポリマー

を含んでなるアッセイデバイスを提供する。

典型的には、多孔質材料は、セルロース系材料、多孔質プラスチック材料、またはガラス繊維材料である。好ましくは、多孔質材料はセルロース系材料であり、例えば紙またはニトロセルロースである。多孔質材料は化学的または物理的に改質して特定の物理化学的特性を付与してもよい。例えば、多孔質材料は、イオン電荷を持っていてもよく、これは特に紙の場合である。好適な電荷多孔質材料の例としては、ワットマン(Whatman)<sup>R</sup> イオン交換紙が挙げられる。

好ましくは、多孔質材料が移送可能な液体に対して不透過性のドーピングポリマーが多孔質材料の一部に加えられて、多孔質材料内にチャンネルを画定しており、そこに画定されたチャンネルにおいて多孔質材料上に各検査試薬が供給されている。典型的には、ドーピングポリマーは、アクリル系ポリマー、アクリル系コポリマー(例えば、Primal B-60Aのようなエチルアクリレートとメチルメタクリレートとのコポリマー)、ビニルアクリル系コポリマー(例えば、Polyvin Glossのようなスクリーン印刷用インク)、またはヘテロ多糖である。好適なヘテロ多糖類としては、II型カラゲナン等のカラゲナン・ポリマーが含まれる。ドーピングポリマーと共にシランを用いて、多孔質材料内のチャンネルを区切ることも可能である。

吸水性コンパートメントの形状は、多孔質材料の形状によって規定され得るが、好ましくは、ドーピングポリマーによって多孔質材料内に画定されるチャンネルによって規定される。

ポリマー(b)は基体を被覆する。それは、典型的には基体(a)に付着しており、機械的に取り外すことはできない。好ましくは、コーティングポリマー(b)は、基体への該コーティングポリマーの部分的浸透によって該基体に付着させる。つまり、コーティングポリマー(b)は、好ましくは、アッセイデバイスと連続しているか、または一体化している。コーティングポリマーは、ある一定の程度までしか基体に浸透せず、多孔質材料が液体をクロマトグラフ的に移送するのを妨げるような程度までは浸透しない。通常、コーティングポリマーは、基体の厚みの30~70%、好ましくは約50%だけ浸透する。

コーティングポリマー(b)は、典型的にはヘテロ多糖であり、好ましくはI型カラゲナンやアガロースのようなカラゲナン・ポリマーである。あるいは、アクリル系ポリマーやアクリル系コポリマー(例えば、Primal B-60)のような合成ポリマーであってもよい。

コーティングポリマー(b)は、必ずしも基体(a)全体を被覆する必要はない。つまり、多孔質材料の一部は被覆されていなくてもよい。しかしながら、好ましくは、たった1箇所の吸水性コンパートメントへの入り口がある。液体サンプルをアッセイデバイスに添加した

10

20

30

40

50

時に吸水性コンパートメントへクロマトグラフ的に移送されるようなやり方で、多孔質材料の被覆されていない部分に1種以上(しかし全部ではない)の検査試薬を供給してもよい。つまり、コーティングポリマー(b)は、典型的には、少なくとも1種の検査試薬を含む連続した吸水性コンパートメントを画定するように、多孔質材料の少なくとも一部を被覆する。

好ましくは、本発明のアッセイデバイスは、アッセイデバイスの視覚的および/または感触的特性を向上させるために、さらにコーティングポリマー(b)の上に設けられた層(c)を含む。層(c)は、必要に応じて、透明であってもよいし、光沢があってもよいし、硬質であってもよいし、または水不透過性であってもよい。好ましくは、透明で光沢のある層である。層(c)は、有利には、印刷可能なもの、すなわち、情報を直接印刷できるものとし得る。層(c)に印刷できる情報の例としては、ロゴ、ブランド名、該アッセイデバイス使用のための説明、陽性および/または陰性の結果を示すためのインジケータ、検量基準、およびバーコードが挙げられる。

10

典型的には、層(c)は、アクリル系ポリマー(例えば、ポリメタクリル酸)、アクリル系コポリマー(例えば、Acrysol WS-24、Primal B-85、およびPrimal B-60Aのようなエチルアクリレートとメチルメタクリレートとのコポリマー)、ポリウロン酸(例えば、アルギン酸)、および高分子アルコールから選ばれる1以上の化合物を含む。好ましい高分子アルコールは、分子量が6000~146000、好ましくは約9000のものである。好適な高分子アルコールとして、ポリニビルアルコールが挙げられる。

ポリマー(b)が基体(a)全体を被覆しない場合、層(c)は、典型的には、多孔質材料の該ポリマー(b)で被覆されていない部分を被覆しない。

20

本発明のアッセイデバイスは、多種多様な液体サンプルを多種多様なアナライトについてアッセイするのに使用できる。したがって、このアッセイデバイスは、ヒトまたは動物の健康管理に使用できる。例えば、ヒトまたは動物の血清、血漿、尿、唾液または脳脊髄液のようなサンプルを、血中グルコース、乱用薬物、治療用薬物、ならびに診断上重要な抗原およびその抗体のようなアナライトについてアッセイするのに用いることができる。このアッセイデバイスはまた、食物衛生においても使用でき、例えば、食品を病原体(例えば、大腸菌、サルモネラ)についてアッセイするのに、あるいは飲用水を病原体(例えば、コレラ、腸チフス、アメーバによる疾患を引き起こすもの)についてアッセイするのに使用できる。さらに、本発明のアッセイデバイスは環境の検査に使用でき、例えば、河川の水を汚染物質(例えば、リン酸塩、硝酸塩、亜硝酸塩、またはポリ芳香族炭化水素、全石油炭化水素およびポリ塩素化ビフェニルのような或る範囲の生体異物化合物)についてアッセイするのに用いることができる。このデバイスは、簡易で自蔵型でなので、いろいろな状況下で使用できる。例えば、汚染現場での実地試験に、そして家庭環境において使用でき、例えば、アクアリウムからの水を亜硝酸塩または硝酸塩についてアッセイするのに使用できる。

30

一般に、アッセイの対象となるサンプルは水系サンプルであり、したがって多孔質材料が移送することができる液体は通常は水系の液体である。

アッセイデバイスの多孔質材料上に供給された検査試薬は通常、アッセイされるサンプル中でそれが存在すると思われる所定のアナライトと反応して検出可能な結果を生じることができる(例えば、該所定のアナライトとの錯体を形成することによる)、少なくとも1種以上の検出試薬を含む。この検出可能な結果とは、肉眼で見ることができるものであってもよい(例えば、色の変化)。あるいはまた、分光計または他の技術的手段(例えば、紫外線吸収の変化)によってしか検出できないものであってもよい。

40

典型的には検出試薬は、アッセイされるサンプルの他の成分よりも所定のアナライトの方に対して大きな親和性を有する。

検出試薬は化学物質であってもよく、例えば、鉄(III)イオン(これは、サリチル酸と接触させると色が変化する)、ピクリン酸(これは、アルカリ条件下でクレアチニンと有色の錯体を形成する)、モリブデン酸アンモニウム(これは、酸性条件下でリン酸塩イオンと錯体を形成する)などが挙げられる。

50

検出試薬は、酵素であってもよく、例えばアルコールデヒドロゲナーゼが挙げられるが、これはニコチンアミドアデニンジヌクレオチドと協働してエタノールをアセトアルデヒドに変換することができ、この変換は紫外光を用いて検出可能である。

必要に応じて2種以上の検出試薬を用いてもよい。つまり、酵素および補酵素を検出試薬として用いることができる。2種以上の検出試薬が使用可能な場合の例としては、スルファニルアミドおよびナフチルエチレンジアミンの使用(これは、酸条件下で亜硝酸塩イオンとピンク色の錯体を形成する)、ならびにグルコースを検出するためのグルコースオキシダーゼ、フェノール、4-アミノアンチピリンおよびペルオキシダーゼの使用が挙げられる。2種以上の検出試薬が存在する場合、各検出試薬は多孔質材料の隣接部位に供給されてもよいし、検出試薬の1種以上が多孔質材料の同一部位に供給されてもよい。2種以上の検出試薬が用いられる場合、検出可能な結果は、通常、各検出試薬がアナライトが存在すると思われる液体サンプルと接触した後でのみ生じる。

10

一般に、少なくとも1種以上の試薬が多孔質材料上に固定される。該試薬は、受動的吸着(passive adsorption)によって多孔質材料上に固定できる。あるいはまた、検査試薬は、検出試薬を多孔質材料上に固定することができる検出アンカー化合物を含んでいてもよい。この検出アンカー化合物は、多孔質材料と検出試薬との間の適切な共有結合を可能にする化合物であり得る。

検出試薬はまた、イオンの手段によって多孔質材料上に固定してもよい。例えば、負に帯電したイオン交換紙を多孔質材料として用いて、荷電した検出試薬を固定すること(または、その逆)が可能である。荷電した検出試薬の例としては、スルファニルアミドとN-1-ナフチルエチレンジアミンジヒドロクロライドとの混合物が挙げられ、この混合物は上記のようにして亜硝酸塩を検出するのに用いることができる。

20

検査試薬はまた、検出試薬に加えて、所定のアナライトと該検出試薬との反応により生じる検出可能な結果を増強するための試薬を含むことができる。例えば、多孔質材料が紙である場合には、カルボキシメチルセルロースを存在させて、該紙上の有色反応生成物の分布を確実にすることが可能である。

各検出試薬は、例えば、検出可能な結果として色のバンドが得られるように配置してもよいし、あるいは、検出可能な結果として色の塊(ブロック)が得られるように配置してもよい。後者の配置は、生じた色の強度を基準のものと比較することを含む定量的または半定量的アッセイに有用であろう。

30

本発明のアッセイデバイスは、多重試薬化学アッセイまたは逐次アッセイを実施するのに使用できる。つまり、第1の検出試薬および少なくとも1種の別の検出試薬を多孔質材料上に供給するものであり、試薬同士の相対的位置は、吸水性コンパートメントに添加された液体サンプルがクロマトグラフィ的に移送されて、最初に第1の試薬と接触し、次に別の試薬と接触するように決定されている。

典型的には、多重試薬化学アッセイに好適なアッセイデバイスでは、液体サンプルと最後に接触させる検出試薬を除く各検出試薬は、液体が多孔質材料に添加されると自由に移動でき、最後に接触させる検出試薬は、上記で説明したような様式で多孔質材料上に固定される。典型的には、逐次アッセイに好適なアッセイデバイスでは、各検出試薬は、上記で説明したような様式で固相支持体上に固定される。

40

例えば、2種類の検出試薬を有する多重試薬アッセイデバイスを用いる場合、アナライトが存在すると思われる液体サンプルは、クロマトグラフィ的に第1の試薬へと移送され、そこで、もしもアナライトが存在すれば、第1の反応を受ける。この第1の反応の生成物は、クロマトグラフィ的に第2の(および最後の)検出試薬へと移送されるが、この第2の検出試薬は典型的には多孔質材料上に固定される。ここで第2の反応を受けて、検出可能な結果を生じる。第1の試薬がスルファニルアミドであり、第2の試薬がナフチルエチレンジアミンである場合、アッセイデバイスは液体サンプルを亜硝酸塩の存在についてアッセイするのに適する。

さらに別の例として、逐次アッセイデバイスが用いられる場合、各検出試薬は、典型的には多孔質材料上に固定され、液体サンプルは各検出試薬を横切ってクロマトグラフィ的に移

50

送される。各検出試薬は、異なるアナライトと反応して検出可能な結果を生じ得るものであってもよい(この場合、1つの液体サンプルを複数種のアナライトについてアッセイするためには、逐次アッセイデバイスが適する)。あるいはまた、各検出試薬は所定濃度のアナライトだけに対して感受性であってもよい(この場合、定量的または半適量的アッセイのためには、逐次アッセイデバイスが適する)。

本発明のアッセイデバイスにおいて、吸水性コンパートメントは、複数のチャンネルが連結されている中心部分を含む。そのような配置を図2および3に示す。検出試薬が各チャンネルに供給できる。逐次アッセイデバイスについては、そのような検出試薬は各々、異なるアナライトと反応して検出可能な結果を生じることができるものであってもよい(この場合、該デバイス、1つの液体サンプルを複数種のアナライトについてアッセイするのに適する)。あるいはまた、各検出試薬は、異なる濃度の同一サンプルに対して感受性であってもよい(この場合、該デバイスは、定量的または半定量的アッセイに適する)。典型的には、そのようなアッセイデバイスでは、2~6個またはそれ以上、好ましくは4個、のチャンネルが中心部分に連結されている。

検査試薬はさらに、ウシ血清アルブミン、ポリビニルピロリドン、グロブリンおよびペプトン(例えば、酸または酵素で加水分解されたカゼインまたはカルボキシメチルセルロース)のようなブロッキング剤を含み得る。また、該検査試薬は、10mMトリス-塩酸緩衝液またはトリス-炭酸緩衝液のようなキャリア緩衝液も含み得る。特に好ましいのは、酵素的または免疫学的反応において検出試薬が所定のアナライトと反応する際に、検査試薬がそうしてブロッキング剤またはキャリア緩衝液を含むことである。

本発明のアッセイデバイスは、イムノアッセイを実施するのに特に好適である。イムノアッセイの実施に適するアッセイデバイスでは、検出試薬は、典型的には、抗原または抗体のような特異的結合試薬である。典型的には、この特異的結合試薬とは、診断上重要な抗原、診断上重要な抗原に対する抗体、または診断上重要な抗原に対する抗体を認識する抗体である。

診断上重要な抗原とは病原体であり得る。また、診断上重要な抗原とは、サンプル中での量が発病の見込みと関連すると考えられる抗原であってもよい。さらに、診断上重要な抗原とは、サンプル中での存在が臨床的症状(例えば、妊娠)の指標となる抗原であってもよい。

診断上重要な抗原の例としては、ヒト絨毛性ゴナドトロピン、黄体形成ホルモン、A型、B型およびC型肝炎ウイルス由来の抗原、クラミジア病またはライム病に關与する微生物、HIVウイルスもしくは他の性感染症に關与する病原体、心臓疾患に關連する抗原(例えば、コレステロール)、心臓発作またはこの種の他の生理学的障害の指標である抗原、ダウン症候群に關連する抗原、ネコ白血病に關連する抗原、ならびにアレルギー反応に關連する抗原が挙げられる。典型的には、特異的結合試薬が抗体である場合、それは病原体(例えば、ウイルス、細菌もしくは他の微生物)に対する抗体、または該病原体に対する抗体を認識する抗体である。

さらに、好ましくは、イムノアッセイの実施に好適なアッセイデバイスでは、検査試薬は、

(a)標識したアナライトもしくはアナライト類似体またはアナライトに対する標識した特異的結合試薬(但し、この標識した特異的結合試薬、標識したアナライトまたはアナライト類似体は、該アナライトが存在すると思われる液体サンプルを多孔質材料に添加すると自由に移動できる); および

(b)該アナライトに対する未標識の特異的結合試薬(但し、これは、検出ゾーン内の多孔性材料上に固定されている)

を含有し、該液体サンプルを吸水性コンパートメントに添加すると該標識した試薬(a)が検出ゾーンへと浸透するように、該標識した試薬(a)と検出ゾーンとの相対的位置が決定されている。

未標識のラベル(b)は、通常、受動的吸着により、または検出アンカー化合物によって多孔質材料上に固定されている。このようにして検査試薬が多孔質材料上に供給されるアッ

10

20

30

40

50

セイデバイスを図1に示す。

典型的には、液体サンプルをアッセイデバイスに添加した時に吸水性コンパートメントにクロマトグラフ的に移送されるようなやり方で、試薬(b)は吸水性コンパートメント内に供給され、そして試薬(a)は、ポリマー(b)で被覆されていない多孔質材料の一部に供給される。

検査試薬が上記のように画定されている本発明のアッセイデバイスは、サンドイッチアッセイ(標識した試薬(a)がアナライトに対する特異的結合試薬である場合)および競合アッセイ(標識した試薬(a)がアナライトまたはアナライト類似体である場合)の両方を実施するのに使用することができる。液体サンプルのアッセイ対象であるアナライトは抗原または抗体であり得る。

10

このデバイスがサンドイッチアッセイでの使用を目的としており、液体サンプルのアッセイ対象であるアナライトが抗原である場合、標識した試薬(a)および未標識の特異的結合試薬(b)は両方とも、通常は、該抗原を認識する抗体である。明らかに、未標識の試薬(b)は、標識した試薬(a)が結合するエピトープには結合しないが、別のエピトープには特異的である。この種のアッセイデバイスの例を図4に示す。

液体サンプルのアッセイ対象であるアナライトが抗体である場合、標識した試薬(a)は、このアナライト抗体で認識される抗原であり得る。この場合、未標識の試薬(b)は通常は、アナライト抗体を認識する抗体である。この種のアッセイデバイスの例を図5に示す。あるいはまた、標識した試薬(a)は、アナライト抗体を認識する抗体であってもよく、この場合、未標識の試薬(b)は、通常は、アナライト抗体で認識される抗原である。この種

20

のアッセイデバイスの例を図6に示す。

試薬(a)および(b)は、HIVまたはネコ白血病病原体を認識する抗体に対する特異的結合試薬であるアッセイデバイスは特に好ましい。

アナライトがヒト抗体である場合、このアナライト抗体を認識する抗体の例としては抗ヒトIgGおよび抗ヒトIgMが挙げられる。

このデバイスが競合アッセイでの使用を目的としている場合、液体サンプルのアッセイ対象であるアナライトが抗原であるならば、通常、未標識の試薬(b)は抗体である。液体サンプルのアッセイ対象であるアナライトが抗体である場合には、試薬(b)は、通常、そのアナライト抗体によって認識される抗原、またはそのアナライト抗体を認識する抗体である。

30

標識試薬(a)を検出ゾーンに確実に浸透させるため、対照ゾーンにさらなる検査試薬を含ませてもよい。これらのさらなる検査試薬は、典型的には、標識試薬(a)に対する特異的結合試薬を含むものである。アッセイがサンドイッチアッセイである場合には、アナライトまたはアナライト類似体が典型的には対照ゾーンに固定化される。アッセイが競合アッセイである場合には、標識試薬(a)に保持された標識に結合可能な試薬を対照ゾーンに固定化してもよい。対照ゾーンは、通常、液体サンプルを吸水性コンパートメントに添加した際に標識試薬(a)が検出ゾーンから対照ゾーンへ浸透するように配置する。

本明細書では、アナライトの類似体は、アナライトに対する特異的結合試薬と複合体を形成することのできる化合物である。

好ましくは、標識試薬(a)と未標識試薬(b)は両方とも抗体であり、好ましくは、ウイルス、細菌または他の微生物等の病原体を認識する抗体である。さらに好適な実施形態では、未標識試薬(b)は前記病原体であり、標識試薬(a)は前記病原体に対する抗体を認識する抗体である。

40

イムノアッセイを行うのに適した本発明のアッセイデバイスは、定量的もしくは半定量的アッセイでも使用することができ、また、複数の所定のアナライトについての液体サンプルのアッセイでも使用することができる。このようなアッセイでの使用に適したデバイスでは、吸水性コンパートメントは、典型的には、中心部分とそれに接続された複数のチャネルを含んでなる(図2および3)。

複数の所定のアナライトについての液体サンプルのイムノアッセイに適したデバイスでは：

50

- 所定の各アナライトに対する標識された前記特異的結合試薬、または所定の各アナライトに相当する標識されたアナライトもしくはアナライト類似体は、典型的には中心部分に存在し、この標識された特異的結合試薬または標識されたアナライトもしくはアナライト類似体は、アナライトが存在すると思われる液体サンプルを多孔質材料に添加した場合に自由に移動可能であり、

- 中心部分に接続された各チャンネルは、典型的には、所定のアナライトの一つに対する未標識の前記特異的結合試薬が固定化された検出ゾーンを含み、標識試薬と検出ゾーンとの相対的位置は、液体サンプルを吸水性コンパートメントに添加した際に標識試薬が各検出ゾーンへ浸透するような配置になっている。

定量的もしくは半定量的アッセイに適したアッセイデバイスでは：

- 標識されたアナライトもしくはアナライト類似体またはアナライトに対する標識された前記特異的結合試薬は、典型的には中心部分に存在し、この標識された特異的結合試薬または標識されたアナライトもしくはアナライト類似体は、アナライトが存在すると思われる液体サンプルを多孔質材料に添加した場合に自由に移動可能であり、

- 中心部分に接続された各チャンネルは、典型的には、アナライトに対する未標識の前記特異的結合試薬が固定化された検出ゾーンを含み、標識試薬と検出ゾーンとの相対的位置は、液体サンプルを吸水性コンパートメントに添加した際に標識試薬が各検出ゾーンへ浸透するような配置になっており、

(a)各検出ゾーンに異なる濃度の未標識の特異的結合試薬が含まれるか、または

(b)中心部分に接続されたチャンネルのうち、1つ以上であるが全てではない(好ましくは1つを除いた全ての)チャンネルが検量チャンネルであって、ゾーン(i)(このゾーンでは、アナライトに対する特異的結合試薬が、このゾーンを通過する実質的に全てのアナライトに結合するのに十分な量で固定化されている)、およびゾーン(ii)(このゾーンは、液体サンプルを多孔質材料に添加した際に自由に移動できる任意に標識されたアナライトもしくはアナライト類似体を既定量含有する)を含み、この検量チャンネルにおけるゾーン(i)、ゾーン(ii)および検出ゾーンの相対的位置は、液体サンプルを吸水性コンパートメントに添加した際に液体サンプルが中心部分からまずゾーン(i)へ浸透し、次いでゾーン(ii)へ浸透し、次いで検出ゾーンへ浸透するような配置になっている。

典型的には、アッセイすべき液体サンプルに高濃度のアナライトが含まれる場合には、各ゾーン(ii)に存在するアナライトもしくはアナライト類似体を標識する。このような状況下では、中心部分に存在する多量の標識試薬が(アナライトを介して)各ゾーン(i)で結合し、十分な量の標識試薬が中心部分から検量チャンネルの検出ゾーンへ浸透しない可能性がある。

典型的には、2~6個、好ましくは4個のチャンネルを中心部分に接続させる。

複数の所定のアナライトについての液体サンプルのアッセイに適したデバイスまたは定量的もしくは半定量的アッセイに適したデバイスを使用して、上述したように、抗体または抗原に対してサンドイッチアッセイおよび競合アッセイの双方を行うことができる。上述したように、1つ以上の対照ゾーンにさらなる検査試薬を含ませてもよい。図2および図3は、複数の所定のアナライトについての液体サンプルのアッセイまたは定量的もしくは半定量的アッセイに使用できる本発明のアッセイデバイスを示す。

抗体に対する半定量的アッセイを行うのに適した時に好適なアッセイデバイスを図7に示す。このデバイスでは、アナライト抗体を認識する標識抗体が中心部分に存在する。中心部分に接続されたチャンネルのうち1つを除く全てのチャンネルには、アナライト抗体により認識される抗原を固定化させた前記ゾーン(i)および前記ゾーン(ii)が含まれ、各ゾーン(ii)は異なる所定量のアナライト抗体を含有している。中心部分に接続された各チャンネルには、アナライト抗体により認識される抗原を固定化させた検出ゾーンも含まれる。

アッセイ完了後に検出ゾーンで発生したシグナルを比較することにより、液体サンプル中のアナライト抗体の濃度が分かる。

標識された検査試薬は、従来慣用の任意の標識によって標識することができる。好ましくは、標識は酵素標識、放射性標識、蛍光標識、着色ラテックスマイクロスフェア、金標識

10

20

30

40

50



または官能基化多糖標識である。より好ましくは、標識は可視シグナルを発生することができる。標識は常法によって結合させることができる。

ある特定のアッセイの場合には、標識より発生したシグナルを増強するために、検出ゾーンを通過する液体サンプルの流速を特異的に管理または制御するのが有利な場合があり、これによって液体中のアナライトと検出ゾーンに固定化された試薬との接触がさらに促進される。吸水性コンパートメントの形状は、これを達成するように調整することができる。例えば、吸水性コンパートメントは、液体サンプルを添加する多孔質材料の領域よりも検出ゾーンにおいて狭くすることができる。このような配置を図1に示す。

吸水性コンパートメントの形状は、標識試薬が集まるトラッピングゾーンを設けるようなものであってもよい。このようなトラッピングゾーンを使用して、クロマトグラフィーの成否を確認することができる。従って、トラッピングゾーンは、「読取(ready to read)」指標をもたらすことにより独立した対照として機能することができる。トラッピングゾーンは、例えば、吸水性コンパートメントを横切る部分バリアーからなることができる。このようなバリアーは、図1に示すように、ドーピングポリマーによって形成することができる。

本発明のアッセイデバイスは、アッセイすべき液体サンプルから望ましくない粒子状物体を除去するためのフィルターをさらに含んでもよい。通常、フィルターは、フィルターを通して液体サンプルをアッセイデバイスに添加することができるように、吸水性コンパートメントの入口に設けられる。

例えば、フィルターは、吸水性コンパートメントの入口に設けられた既定の孔径を有するポリマーを含んでもよい。このような一体化フィルターは、デトリタス等の望ましくない粒子状物体を水性サンプルから除去する半透過性バリアーとして機能することができる。あるいは、フィルターは、吸水性コンパートメントの入口に設けられた前記多孔質材料を含んでもよく、その一部は任意にコーティングポリマー(b)で被覆されていてもよい。このようなフィルターは、アッセイすべき液体サンプルから赤血球細胞などの物体を除去することができる。前記ドーピングポリマーは、このようなフィルターの一部に取り込まれてフィルター内にチャネルを画定してもよい。このようなチャネルは、吸水性コンパートメントの入口へ向けて液体サンプルを方向付けるのに有用である。

好ましくは、本発明のアッセイデバイスはディップスティック等の実質的に平面のストリップであり、ストリップに沿って液体サンプルをクロマトグラフ的に移送するものである(「ラテラルフロー・デバイス(lateral flow device)」。しかしながら、アッセイデバイスは、液体サンプルを多孔質材料の厚み方向へクロマトグラフ的に移送することもできる(「タンジェンシャルフロー・デバイス(tangential flow device)」。)

タンジェンシャルフロー・デバイスでは、上述したように、前記ドーピングポリマーが多孔質材料の一部へ取り込まれており、ドーピングポリマーで画定されたチャネルは多孔質材料の本体を貫通する。このように、チャネルの全ての外側面は多孔質物質により囲まれている。コーティングポリマー(b)はタンジェンシャルフロー・デバイスでは必須ではない。

従って本発明は、

(a)(i)液体をクロマトグラフ的に移送することができる多孔質材料と、  
(ii)多孔質材料上に供給されたアッセイ用の検査試薬1種以上と、  
を含む基体、および

(b)多孔質材料により移送され得る液体に対して不透過性のドーピングポリマーであって、多孔質材料の一部に取り込まれて多孔質材料の本体を貫通するチャネルを画定している前記ドーピングポリマー、  
を含んでなり、画定されたチャネルにおいて多孔質材料上に各検査試薬が供給されている、アッセイデバイスも提供する。

好適なドーピングポリマーは上述の通りである。

このようなタンジェンシャルフロー・デバイスは、多孔質材料においてチャネルの入口を覆う、既定の孔径を有するポリマーを含んでもよい。このようなポリマーは、先に説

10

20

30

40

50

明したように、半透膜として機能することができる。さらに、このようなタンジェンシャルフロー・デバイスは、多孔質材料においてチャンネルの出口を横切る、多孔質材料により移送され得る液体に対して不透過性の層またはコーティングを含んでいてもよい。不透過性の層またはコーティングは、例えば、前記コーティングポリマー(b)または多孔質材料に付着させたシラン層を含んでいてもよい。

このようなタンジェンシャルフロー・デバイスの多くは、紙の1枚シートといった多孔質材料の1枚シートに設けることができる。このように設けられたタンジェンシャルフロー・デバイスを使用して、従来のマイクロタイタープレートと同様にアッセイを行うことができる。

また、所定のアナライトの有無について液体サンプルをアッセイする方法であって、

(a) 液体サンプルを本発明のデバイスの吸水性コンパートメントと接触させ、

(b) 多孔質材料に液体サンプルをクロマトグラフ的に移送させ、そして

(c) 液体サンプル中の所定のアナライトの存在を判定する、

ことを含んでなる方法も提供する。

また本発明は、液体サンプルを所定のアナライトについてアッセイするための、本発明のアッセイデバイスの使用を提供する。また、本発明のアッセイデバイスを含む検査キットも提供する。

さらに本発明は、本発明のアッセイデバイスを作製する方法であって、

(a) 液体をクロマトグラフ的に移送することができる多孔質材料を用意し、

(b) 多孔質材料上にアッセイ用検査試薬を1種以上供給し、そして

(c) このように得られた多孔質材料をコーティングポリマーの溶液または懸濁液と接触させることにより、該材料に透明で水不透過性のコーティングポリマーを付着させる、

ことを含んでなる方法を提供する。

上記工程(c)においては、多孔質材料を透明で水不透過性のコーティングポリマーで被覆する。このコーティングポリマーがヘテロ多糖等の生体ポリマーである場合には、典型的に、多孔質材料をまずゲル促進剤と接触させ、次いでコーティングポリマーの溶液または懸濁液と接触させる。

場合によっては、工程(c)においてコーティングポリマーは、多孔質材料を液状の該コーティングポリマーと接触させることにより適用することもできる。

特にコーティングポリマーが合成ポリマーである場合には、当業者に公知のロール塗布によって適用されてもよい。

好ましくは、本発明の方法は、工程(a)と(b)との間に、多孔質材料により移送され得る液体に対して不透過性のドーピングポリマーを多孔質材料の一部に適用して、多孔質材料内にチャンネルを画定する追加の工程をさらに含み、工程(b)で各検査試薬が多孔質支持体に画定されたチャンネル内に供給される。

ドーピングポリマーは、コンピュータで制御されたエアブラシを使用して、または好ましくは多孔質材料の両面にテンプレートを取り付けた後でドーピングポリマーを適用することによって多孔質材料に適用することができる。これは例えば標準的なスクリーン印刷技術により行うことができる。

ゲル促進剤は、コーティングポリマーの架橋を促進することが可能な化合物である。架橋剤と記載される場合もある。ポリマーがアクリル系ポリマー等の合成ポリマーである場合にはゲル促進剤は必要ではない。適切なゲル促進剤としては、塩化カルシウム等の無機塩、ポリエチレンイミン等の窒素含有ポリマー、ヘキサデシルアンモニウムブロミド等の有機アンモニウム塩、セルラーゼ等のタンパク質、中性硬化ポリ(アミノアミド)化学製品等のカチオン樹脂(例えば、Kymene<sup>®</sup> SLX)が挙げられる。

本発明の方法は好ましくは、

(d) このように得られたデバイスを、アクリル系ポリマー、ゲル化性多糖類、およびポリビニルアルコールから選択される1種以上の化合物と接触させて、前記デバイス上にさらなる層、好ましくは透明な光沢層を形成すること

をさらに含む。

10

20

30

40

50

上記さらなる層は、好ましくは、0.5%~1.5%w/vのアルギン酸を含浸する溶液、7.5%~12.5%w/vのポリビニルアルコールを含有する溶液、100%w/vのPrimal B-60Aを含有する溶液、25%~100%w/vのAcrysol WS-24を含有する溶液、および40~60%w/v、好ましくは約47%w/vのPrimal B-60Aを含有する溶液(この溶液は、Primal B-60A:ポリメタクリル酸比が90:10~70:30またはPrimal B-60A:Primal B85比が95:5~90:10である)から選択される溶液中にアッセイデバイスを浸して得る。典型的に、上記溶液は全て水系溶液である。

典型的に、水不透過性コーティングポリマーが前記生体ポリマーである場合、本発明の方法は工程(a)の前に洗浄工程をさらに含み、この工程では多孔質材料をカリウムイオン、カルシウムイオン、またはアルミニウムイオン等の一価金属イオン、二価金属イオン、または三価金属イオンの水溶液と接触させる。洗浄工程は、通常、金属イオンの溶液の入った浸漬タンクに多孔質材料を通して、エアボックス中で該多孔質材料を乾燥させて行う。タンジェンシャルフロー・アッセイデバイスは、上記したように、1種以上の検査試薬を多孔質材料に供給し、ドーピングポリマーをその上に適用することにより作製することができる。

最も広範な態様において、本発明は、液体をクロマトグラフィ的に移送することができる多孔質材料の中を通る液体の流れを制御するために、その液体に対して不透過性であるポリマーの使用を提供する。

以下の実施例により本発明を説明する。

#### 実施例 1 ~ 5

平均マトリクス孔径が4~6 $\mu$ mの純セルロース繊維からなる80mmの長さの改質していないクロマトグラフィー紙(Whatman 31ETまたは3MM)を、200mM塩化カルシウムの水溶液の入った浸漬タンクに通した。次いで、それらをエアタンク中で乾燥させ、最終寸法である8 $\times$ 80mmに切断した。

得られたストリップの一部の孔を、室温(RT)にてアクリルポリマーPrimal B-60Aを適用してふさいだ。ポリカーボネートテンプレートをクロマトグラフィー紙の両面に固定しポリマーを適用してストリップにチャンネルを形成した。ポリマーは室温にて約2時間放置乾燥させた。

蒸留水中のI型カラギーナン(1.5% wv<sup>-2</sup>)を、完全に懸濁するまで80 $^{\circ}$ Cまで加熱した。懸濁したらポリマーを45 $^{\circ}$ Cまで冷却して保った。

このポリマーを、セルロースマトリクスの最小のゲル浸透で表面重合が達成されるように、クロマトグラフィー紙に適用した。これを実現するために、表1に記載の種々のゲル促進剤を使用した。

検査ストリップを、まずゲル促進剤の水溶液に浸漬し、続いて温かいカラギーナン懸濁液に直ちに浸漬した。この工程を3回繰り返して連続した表面被覆物を形成し、最後にゲル促進剤に浸漬した。被覆されたストリップを室温または37 $^{\circ}$ Cにて一晩放置乾燥させた。その後、表1に記載のように種々のポリマーおよびコポリマー混合物を使用して、得られた被覆紙にさらなるコーティング層を適用する。

被覆紙を、さらなるコーティングポリマーに2回浸漬させ、室温にて2時間放置乾燥させた。

10

20

30

表 1

実施例	ゲル促進剤	さらなるコーティングポリマー
1	200 mM 塩化カルシウム	Primal B-60A (100% w/v) および Orotan 165* (21% w/v)の混合物
2	ポリエチレンイミン (2% w/v)	同上
3	Celluclast (5.0% w/v)	同上
4	Kymene SLX (1.0% w/v)	同上
5	ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド	同上

\*Orotan 165は、ポリメタクリル酸のアンモニウム塩である。

#### 実施例 6 ~ 10

ドーピングポリマーとしてPrimal B-60Aの代わりにII型カラギーナンを用いたこと以外は実施例 1 ~ 5 の方法を繰り返した。

蒸留水中のII型カラギーナン(1% w/v)を、懸濁するまで一定に攪拌しながら90℃まで加熱した。懸濁したら、ポリマーを70℃に保ち、ポリカーボネートテンプレートを取り付けたクロマトグラフィー紙の両面に適用した。次いでこの紙を室温にて約2時間放置乾燥した。

このストリップを、実施例 1 ~ 5 に記載のようにI型カラギーナン、およびさらなる被覆層で被覆した。使用したゲル促進溶液およびさらなるコーティングポリマーを表 2 に示す。

表 2

実施例	ゲル促進剤	さらなるコーティングポリマー
6	200 mM 塩化カルシウム	Primal B-60A (100% w/v) および/または Orotan 165* (21% w/v)の混合物
7	ポリエチレンイミン (2% w/v)	同上
8	Celluclast (5.0% w/v)	同上
9	Kymene SLX (1.0% w/v)	同上
10	ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド	同上

\*Orotan 165は、ポリメタクリル酸のアンモニウム塩である。

#### 実施例 11

##### 免疫診断ラテラルフロー・デバイスの作製

##### ドーピングポリマーの適用

通常のスクリーン印刷技術を用いて、未処理のクロマトグラフィー紙(200x280mm)(Whatman 31ET, 3MMまたはSchleicher & Schuell 22/2, 3324, 2668)にポリビングロス(Polyvin Gloss)を適用した。この紙の両面に、スクリーン印刷テンプレートとして該ポリマーを適用した。この印刷により、各々非ドーピング紙のチャンネルを有する個々のラテラルフロー・フォーマットを画定した。ラテラルフロー・フォーマットの寸法は、15x85mmであった。ドーピングポリマーを適用したあと、該シートを個々のラテラルフロー・フォーマットに切断した。

##### 検査試薬の添加

ギルソンピペット(Gilson pipette)を用いて、ストリップの底端部から15mmのところからチャンネルを幅方向に横切る連続的な筋を描くように、ブロッキング緩衝液5µlをラテラルフ

10

20

30

40

50

ロー・フォーマットに添加した。この縞を“原点(origin)”として定義した。

つぎにこのストリップをオープン(60 )で5分間乾燥したあと、室温で30分間放置した。ヒト絨毛性性腺刺激ホルモンに特異的な金標識抗体を、原点のところにチャンネルを幅方向に横切る連続的な筋として添加した。

つぎに、金標識抗体に特異的な未標識抗体を、ストリップの底端部から28mmのところまでチャンネルを幅方向に横切る連続的な筋として添加した。これは、“検出ゾーン”として定義した。つぎにこのストリップを室温で少なくとも1時間空気乾燥した。

#### 一次および二次コーティングポリマーの適用

検査試薬を添加した個々のラテラルフロー・ストリップを、コーティングポリマー(b)(1.5% wv<sup>-1</sup> アガロース)の温かい(38±1 )溶液に、ストリップの頂部から65mmの深さまで二 10  
度浸漬し、原点は未コーティングのまま残した。つぎにこれらを室温で一晩空気乾燥させた。

一次コーティングしたストリップを、該ストリップの頂部から65mmの深さまで、Primal B-60A; Orotan 165(90:10)(ポリマーC)の混合物中に2回浸漬し、原点をコーティングしないまま残した。つぎにこれらのストリップを室温で一晩空気乾燥させた。

#### 検査ストリップの操作

合成尿素緩衝液のサンプル中にこれらのストリップを入れ、これにヒト絨毛性性腺刺激ホルモンを様々な濃度で添加して、検査物を発色させた。検出ゾーンにおける明瞭なピンク色の筋は、該ストリップが首尾良く発色されたこと、およびアナライト(ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン)が検出されたことを示す。 20

#### 実施例12

検査試薬を添加したあとにKハンドコーター(RK Print-Coat Instruments Ltd.)を用いてPrimal B60のコーティングポリマーを適用したことを除き、実施例11のプロセスを繰り返した。次にストリップを室温で30分間空気乾燥させた。

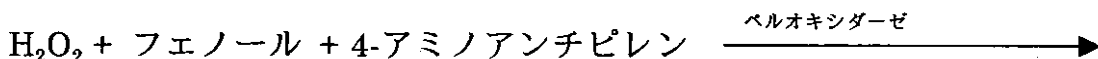
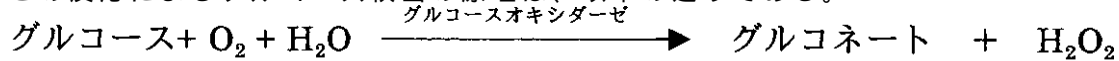
コーティングしたストリップ上に、該ストリップの頂部から65mmの深さまで、改質スチレンアクリレートポリマーエマルジョンであるバリアコートDC1708(Barriercoat DC1708, Dussek Campbell)を同様にローラーでコーティングし、原点をコーティングしないまま残した。つぎにこれらのストリップを室温で30分間空気乾燥した。

#### 実施例13

##### グルコースの酵素検出用タンジェンシャルフロー・アッセイデバイス 30

以下の手順は、グルコースを検出するためのタンジェンシャルフロー・アッセイデバイスの製造方法を説明する。

この反応によるグルコース検出の原理は、以下の通りである。



ピンク/赤 発色基

グルコースアッセイ試薬を以下のように調製した。

#### 1. フェノール試薬の調製 40

容量100mlのスクリューキャップボトルに1.2±0.1gのフェノールを量り入れ、pH7.0の0.1Mリン酸緩衝液(100±1ml)を加えた。完全に溶解するまでこの混合物をよくかき混ぜた。

このボトルをアルミホイルでラップして該溶液に光が入らないようにした。

#### 2. 4-アミノアンチピレン試薬の調製

容量100mlのスクリューキャップボトルに4-アミノアンチピレン(0.4±0.1g)を量り入れ、pH7.0の0.1Mリン酸緩衝液(100±1ml)を加えた。完全に溶解するまでこの混合物をよくかき混ぜた。このボトルをアルミホイルでラップして該溶液に光が入らないようにした。

#### 3. ペルオキシダーゼ試薬の調製

活性X IU/mg、重量800/X±0.1mgのペルオキシダーゼサンプルを、容量1.5mlのエッペンドルフ(Eppendorf)のチューブに取り入れ、pH7.0の0.1Mリン酸緩衝液(1.0±0.1ml)を加えて 50

、800 IU/mlを含むペルオキシダーゼ溶液のサンプルを調製した。この試薬は、各回毎に新たに調整しなければならない。

#### 4. グルコースオキシダーゼ試薬の調製

活性X IU/mgおよびY mg/mlのグルコースオキシダーゼサンプルをピペティングにより250/XY $\pm$ 0.01mlとって容量1.5mlのエッペンドルフチューブに入れ、pH7.0の0.1Mリン酸緩衝液(1 $\pm$ 0.1ml)を加えて、250IU/mlを含むグルコースオキシダーゼ溶液を調製した。この試薬は、各回毎に新たに調整しなければならない。

#### 5. グルコースアッセイ試薬の調製

容量1.5mlのエッペンドルフチューブにカルボキシメチルセルロース(CMC)20 $\pm$ 1mgを量り入れ、以下の試薬を加えた。

200 $\pm$ 1 $\mu$ l フェノール試薬

200 $\pm$ 1 $\mu$ l 4-アミノアンチピレン

200 $\pm$ 1 $\mu$ l ペルオキシダーゼ試薬

200 $\pm$ 1 $\mu$ l グルコースオキシダーゼ試薬

200 $\pm$ 1 $\mu$ l 0.1Mリン酸緩衝液、pH7.0

試薬を良く混ぜ、必要になるまで氷上に保った。

#### ドーピングポリマーの適用

通常のスクリン印刷技術を用いて、紙の両面にタンジェンシャルフロー・フォーマットを画定するスクリン印刷テンプレートとして適用したポリビングロス(Polyvin Gloss)で未処理のクロマトグラフィー紙のシート(200 x 280mm;Whatmans 31ET, 3MMまたはSS紙)にスクリン印刷を行った。この印刷により、個々のタンジェンシャルフロー検査ウェルを画定する。

印刷したシートは、マイクロタイタープレートに似たフォーマットのものである。

ドーピングポリマーを適用したあと、該シートを1つのストリップ(10 x 85mm)につきウェルを5個有する個々のタンジェンシャルフロー・フォーマットに切断した。各ウェルは、約5 $\mu$ lの液体サンプルを収容することができるものであった。

#### 検査試薬の添加

上記のように定義したグルコースアッセイ試薬(10 $\pm$ 1 $\mu$ l)を、検査ストリップに印刷したウェルの各々に加え、室温で30分間空気乾燥させた。

アルミホイルの中に該ストリップを保存し、室温で光を遮断した。

#### 検量標準ストリップの調製

サンプルストリップを発色させたときに実時間比較が行えるように、サンプルストリップと同時に検量標準ストリップを調製した。

D-グルコース(1.802 $\pm$ 0.002g)を容積100mlのメスフラスコに量り入れ、グルコースが完全に溶解するまで攪拌しながら蒸留水(80ml)を加えて、グルコース検量標準(10 $\pm$ 1 $\mu$ l)を調製した。つぎにこの溶液に蒸留水を加えて体積を100mlにした。これにより100mM D-グルコースのストック溶液を用意し、これを用いて連続希釈により2~10mMの標準を作製した。これらの標準を使用するまで-20 $^{\circ}$ Cで保存した。

つぎに、試薬を入れたウェルに検量標準(10 $\mu$ l $\pm$ 1 $\mu$ l)を入れた。室温にて1分後、ウェルの中で発色した(ピンクから赤)。色の強度は、該標準中のグルコース濃度に関連する。検量ストリップを用いて作製した色等級を使用して、サンプルにより生成された色と比較し、サンプル中のグルコース濃度の表示度数を得る。

#### 検査ストリップへのサンプルの添加

試薬を入れたウェルの各々にサンプル(10 $\pm$ 1 $\mu$ l)を入れた。室温にて1分後、ウェルの中で発色した(ピンクから赤)。

このストリップの発色を上記検量標準ストリップと比較し、各サンプル中のグルコース濃度の表示度数を得た。

#### 実施例14

#### 亜硝酸検出用タンジェンシャルフロー・アッセイデバイス

グルコースアッセイ試薬の代わりに亜硝酸アッセイ試薬を使用した以外は、実施例12の

10

20

30

40

50

ロセスを繰り返した。亜硝酸アッセイ試薬は以下のように調製した。

1. スルファニルアミド試薬

容量1.5mlのエッペンドルフチューブに、スルファニルアミド(40±0.5mg)およびN-1-ナフチルエチレンジアミンジヒドロクロリド(2.0±0.1mg)を量り入れた。1±0.1mlのo-リン酸(10% vv<sup>-1</sup>)を加え、溶解するまで該混合物を攪拌した。

2. 亜硝酸検量標準の調製

容量500mlのビーカーに亜硝酸(48.2±0.1mg)を量り入れ、400mlの脱イオン水を加えた。溶解するまでこの混合物を攪拌した。つぎにこのビーカーの内容物を、脱イオン水で洗浄して容量1Lのメスフラスコに移した。この溶液に脱イオン水を加えて体積を1Lとし、良くかき混ぜた。こうして10mg l<sup>-1</sup> (10ppm)の亜硝酸(NO<sup>2-</sup>)ストック溶液を得、これを使用して

10

実施例 15

亜硝酸検出用ラテラルフロー・アッセイデバイス

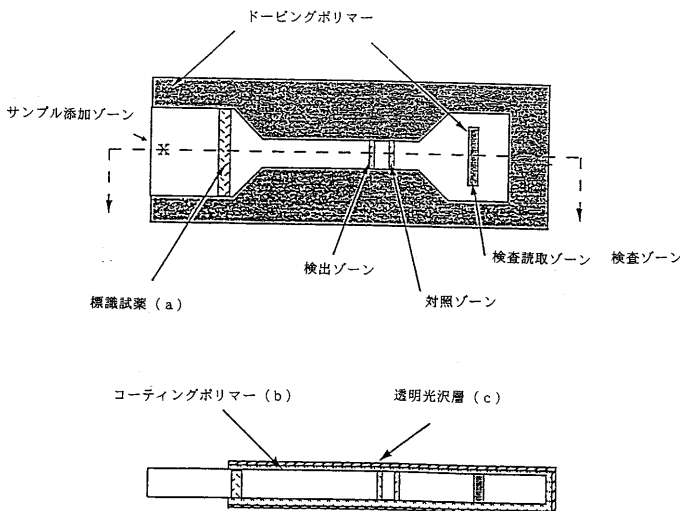
このようなラテラルフロー・アッセイデバイスにおいて多孔質材料としてWhatman 31ETを使用することにより、検査中に亜硝酸検査において使用される発色基のクロマトグラフ的な移送を行った。これは、デバイスの検査領域における最終的な色の变化をもたらすというより、紙上の色を分離する効果を有していた。そのため、帯電した多孔質材料を使用して色分子を定着させた。

こうして、31ETの代わりの多孔質支持体として、改変イオン交換セルロース(リン酸セルロース)を含むWhatmanイオン交換紙P81を使用して、実施例11と同じようにマスキングポリマーを適用した。実施例14のように調製した亜硝酸検査試薬を、デバイスの検出ゾーン領域に添加した。亜硝酸検査発色基(正帯電したものを)、リン酸セルロースの負帯電により所定の位置に定着させた。その後、検査を行うときに、他の試薬が亜硝酸を含むサンプルとともに移動し、定着した発色基と反応して、サンプル中の亜硝酸濃度に関連し得る鋭い色バンドが得られた。

20

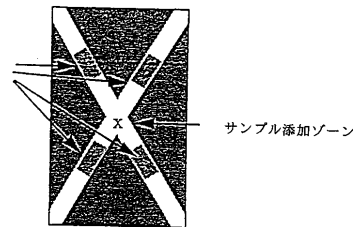
【 図 1 】

Figure 1



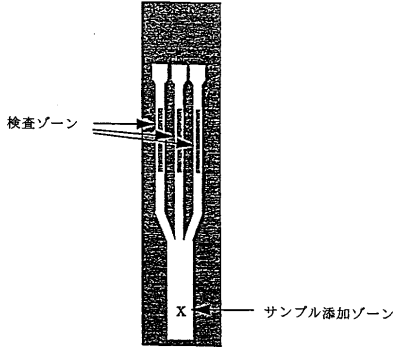
【 図 2 】

Figure 2



【 3 】

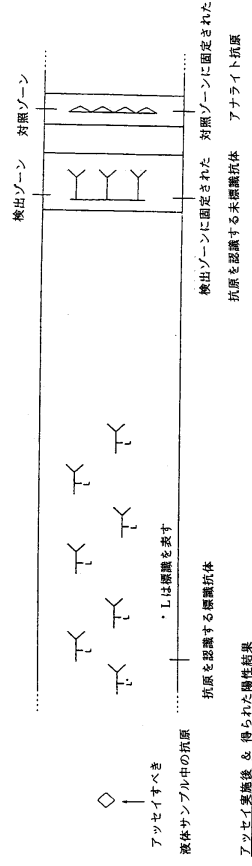
Figure 3



【 4 】

Figure 4

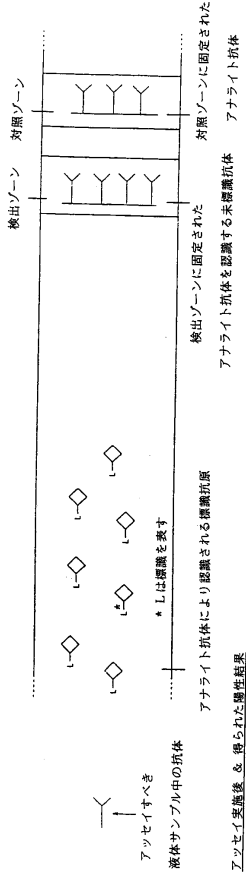
アッセイ実施前  
 抗体のサンドイッチアッセイの実施に適した  
 アッセイデバイスの吸水性コンパートメントの一部



【 5 】

Figure 5

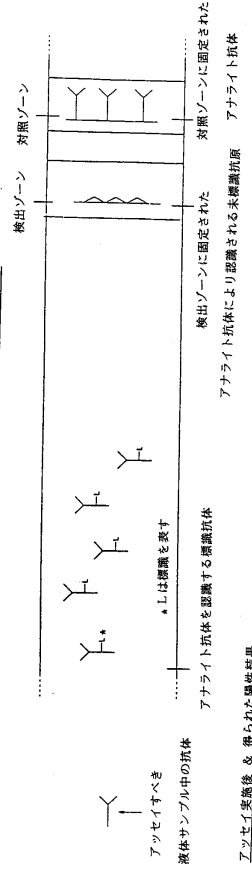
抗体のサンドイッチアッセイの実施に適した  
 アッセイデバイスの吸水性コンパートメントの一部



【 6 】

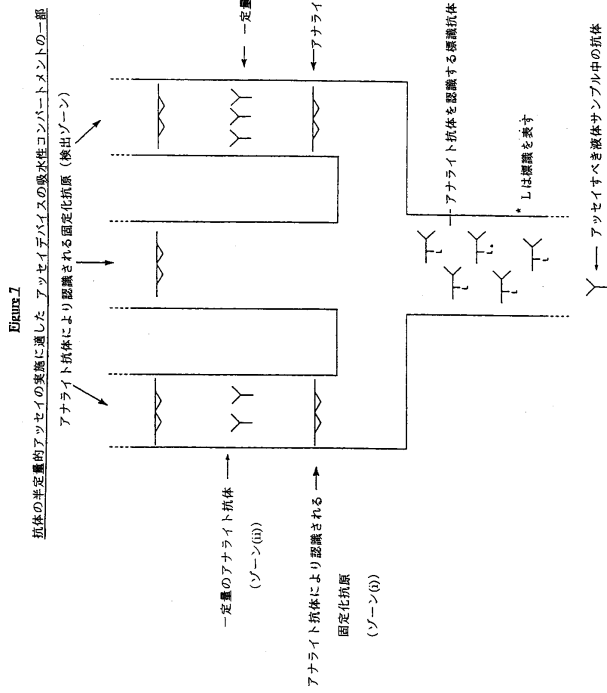
Figure 6

アッセイ実施前  
 抗体のサンドイッチアッセイの実施に適した  
 アッセイデバイスの吸水性コンパートメントの一部





【 図 7 】



## フロントページの続き

- (72)発明者 ハードマン, デビッド, ジョン  
イギリス国, シービー2 4エーティー, ケンブリッジ, バブラハム ホール(番地なし),  
バブラハム バイオサイエンス テクノロジーズ
- (72)発明者 スラター, ジェイムズ, ハワード  
イギリス国, ティーエー4 3エーエー, サマーセット トーントン, ピーオー ボックス  
18
- (72)発明者 レイド, アダム, ジー.  
イギリス国, シーティー5 1アールティー ケント, ウィットステーブル, ダグラス ア  
ベニュー 32
- (72)発明者 ラング, ウィリアム, ケネス  
イギリス国, エヌイー48 4エーイー, ノーサンバーランド, ヘクスハム, パラスフォ  
ード, チシル ウェイズ 26
- (72)発明者 ジャクソン, ジェイムズ, リチャード  
イギリス国, アールジー25 2ジェイエフ, ハンプシャー, チデストン, ウッズ レー  
ン(番地なし), ザ レイテ ハウス

審査官 山村 祥子

- (56)参考文献 特開平08-075748(JP,A)  
特表平08-509291(JP,A)  
特表平06-509424(JP,A)  
特表平08-507605(JP,A)  
特表平07-501148(JP,A)  
米国特許第05409664(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/543