

(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2006-524509

(P2006-524509A)

(43) 公表日 平成18年11月2日(2006.11.2)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12Q 1/32 (2006.01)	C12Q 1/32	2G054
GO1N 21/78 (2006.01)	GO1N 21/78	Z 4B029
C12M 1/34 (2006.01)	C12M 1/34	E 4B063

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 15 頁)

(21) 出願番号	特願2006-510097 (P2006-510097)	(71) 出願人	505384933
(86) (22) 出願日	平成16年4月15日 (2004. 4. 15)		メットジェン インコーポレイテッド
(85) 翻訳文提出日	平成17年12月14日 (2005.12.14)		アメリカ合衆国 ジョージア州 3035
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/011706		8-1411 アトランタ ピーオーボッ
(87) 国際公開番号	W02004/091376		クス 76411
(87) 国際公開日	平成16年10月28日 (2004.10.28)	(71) 出願人	504466834
(31) 優先権主張番号	60/462, 887		ジョージア テック リサーチ コーポレ
(32) 優先日	平成15年4月15日 (2003. 4. 15)		イション
(33) 優先権主張国	米国 (US)		アメリカ合衆国 ジョージア州 3033
			2 アトランタ ノースウェスト テンス
			ストリート 505
		(74) 代理人	100082005
			弁理士 熊倉 禎男
		(74) 代理人	100084009
			弁理士 小川 信夫

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血中フェニルアラニン濃度をモニタリングするための医療装置

## (57) 【要約】

比色分析を利用する、フェニルアラニンの血中濃度のモニタリングに適合された医療装置であって、検査エレメントを含むユニット、または検査用生物学的サンプルをその上に有する基質を受け入れるための挿入手段、および前記装置上に前記生物学的サンプルのフェニルアラニン濃度の検査結果を表示するための手段を含む、医療装置を提供する。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生体液中のフェニルアラニンの濃度を測定するための検査エレメントであって、生体液のサンプルが加えられる層、および、フェニルアラニンまたはフェニルアラニンの反応生成物の前駆体と相互作用する物質を含む試薬層を含む、検査エレメント。

## 【請求項 2】

試薬層が、フェニルアラニンをフェニルピルバートに変換する酵素を含む、請求項 1 に記載の検査エレメント。

## 【請求項 3】

試薬層がフェニルアラニンデヒドロゲナーゼを含む、請求項 2 に記載の検査エレメント 10

## 【請求項 4】

試薬層が緩衝酵素的比色分析試薬を含む請求項 1 に記載の検査エレメントであって、反応によりフェニルアラニンの存在/非存在が示される、前記検査エレメント。

## 【請求項 5】

試薬層が、バッファー、色素/メディエーター、および酵素/コファクターを含む、請求項 1 に記載の検査エレメント。

## 【請求項 6】

試薬層が親水性ポリマーを含む、請求項 1 に記載の検査エレメント。

## 【請求項 7】

親水性ポリマーがゼラチンまたはアガロースである、請求項 5 に記載の検査エレメント 20

## 【請求項 8】

比色分析試薬が、チオニン、ローズベンガル、メチレンブルー、アズールCまたはテトラゾリウム塩である、請求項 4 に記載の検査エレメント。

## 【請求項 9】

メディエーターが1-メトキシフェナジンメトサルフェートである、請求項 5 に記載の検査エレメント。

## 【請求項 10】

支持体層をさらに含む、請求項 1 に記載の検査エレメント。 30

## 【請求項 11】

比色分析を利用する、フェニルアラニンの血中濃度のモニタリングに適合された医療装置であって、請求項 1 に記載の検査エレメントを含むユニット、または検査用生物学的サンプルをその上に有する請求項 1 に記載の検査エレメントを受け入れるための挿入手段、および前記装置上に前記生物学的サンプルのフェニルアラニン濃度の検査結果を表示するための手段を含む、医療装置。

## 【請求項 12】

以前の生物学的サンプルの結果を保存するためのメモリ手段、および保存した生物学的サンプルの結果を表示するための手段をさらに含む、請求項 11 に記載の装置。

## 【請求項 13】

フェニルアラニン測定結果を医師の診療所にダウンロードすることを可能とする手段を含むことができる、請求項 12 に記載の装置。 40

## 【請求項 14】

フェニルアラニン濃度のモニタリングに使用する装置であって、例えば間質液を利用する、非観血式の装置。

## 【請求項 15】

生物学的サンプル内におけるフェニルアラニンの存在または非存在を調べるための方法であって、生物学的サンプルを請求項 1 に記載の検査ストリップに加える工程、該生物学的サンプルを試薬層と反応させる工程、および該生物学的サンプル内のフェニルアラニンの濃度を比色分析により測定する工程、を含む方法。 50

## 【請求項 16】

卓上型差し込み式である、請求項 11 に記載の装置。

## 【請求項 17】

電池式である、請求項 11 に記載の装置。

## 【請求項 18】

燃料電池式である、請求項 11 に記載の装置。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

発明の技術分野

10

本発明は、PKUの管理および治療との関連において、血中フェニルアラニン濃度をモニタリングするための医療装置に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

発明の背景

フェニルケトン尿症（“PKU”）は、体が必須アミノ酸フェニルアラニンを利用できないことを特徴とする代謝系の遺伝的疾患である。PKUを患う個人は、タンパク質含有食物に見られるアミノ酸の1つであるフェニルアラニンを過剰に蓄積する。理由は定かではないが、幼児の体内にフェニルアラニンが過剰となると脳の発達に有害であり、幼児期の早い段階で治療をしないと精神遅滞につながる。低フェニルアラニンの、極めて制限された食事療法を早期に開始し、十分に継続した場合は、PKUであると診断された個人は通常の発育および通常の寿命を期待することができる。治療は、人生にわたる食事管理およびカウンセリング、さらには継続的な血中フェニルアラニン濃度のモニタリングを伴う。

20

## 【0003】

PKUは、酵素フェニルアラニンヒドロキシラーゼ(PAH)の機能を改変する遺伝子突然変異によって引き起こされる。この酵素は通常、フェニルアラニンをアミノ酸チロシンに変換する。PKUを患う個人においては、この変換がうまくいかないためにフェニルアラニンが蓄積する。よく理解されていない機構を通して、過剰量のフェニルアラニンは中枢神経系に有毒であり、PKUに関連した重大な問題を引き起こす。脳へのダメージによって、生後1年が経過するまでに著しい精神遅滞が引き起こされる。症状としては、皮膚発疹、活動過多、精神遅滞、発作、小頭症、言語障害、震顫、行動異常、知能および運動能力の遅れ、汗および尿の不快臭、薄色化（皮膚、髪、目）が起こり得る。

30

PKUであると診断された個人の酵素の欠乏の度合いはそれぞれ異なる。患者の一部は幅広い食事を摂り得るに十分な酵素活性を有する一方で、他の患者は食事を厳しく制限され得る。PKU治療プログラムの健康管理従事者は、PKUであると診断された個人のための食事の性質を決定しなければならない。

## 【0004】

2000年に、米国健康統計センターは米国内で4,058,814の出生を報告した。2000年には、米国内で、1:10,000の発生率で約405人の新生児がPKUであると診断された。幼児、若年者、大人を含めて米国在住の14,000人の個人がPKUと診断されると推定される。

40

PKUは、新生児を対象とする適切な血液検査によって生後1日目に検出することが可能な遺伝的先天性代謝異常である。PKUの原因およびこの代謝性遺伝的疾患を検出するよう計画された血液検査の発見を受けて、米国では約40年前に全国的な新生児の検査が開始された。バッファロー大学のRobert Guthrie博士は、1961年にPKU用の新生児スクリーニング検査法を開発した。マサチューセッツ州は、1963年に遺伝的疾患のスクリーニング検査を義務付けた最初の州となった。現在では、PKU診断のためのガスリー試験は50州すべておよびコロンビア特別区において義務付けられている。早期診断、特殊な食事および継続的な血液モニタリングによって、これらの子供が通常に成育し、完全かつ生産的な人生を送ることを可能とした。

## 【0005】

50

治療をしない場合、すべてではないにしてもPKUを患って生まれた幼児の多くは精神遅滞となる。PKU患者の治療は、特にその子供が成長している期間中は、低フェニルアラニンまたはフェニルアラニン非含有の厳しい食事療法を伴う。精神遅滞を予防するためには、通常精神発達を確保するために幼児期の早い段階で治療を開始する必要がある。食事制限の中断に関連する諸問題のため、食事制限および治療計画は一生にわたって続けなければならないと考えられている。

PKUの治療は煩雑であり、血液サンプルの日常的な回収、非常に厳しい食事制限、食料摂取の記録、およびPKU治療プログラムへの訪問を必要とする。米国においては、各州はすべての新生児の血中フェニルアラニン濃度を生後1日以内に検査する。

#### 【0006】

10

PKU治療の目的は、血中フェニルアラニン濃度を2から10mg/dL (120-600  $\mu$ mol/L) の間に維持することである。血中フェニルアラニン濃度を頻りにモニタリングすることは、特に人生の初期段階において決定的に重要である；年齢が上がるに従ってモニタリングの頻度は下がる。

血中フェニルアラニンのモニタリング頻度は、個人毎の必要度によって異なる。“信頼性の高い家庭内検査法の開発、および順守性を向上させるための方策が求められる。” (NIH Consensus Statement on Phenylketonuria: Screening and Management, October 2000)。

#### 【0007】

20

PKU患者のフェニルアラニン濃度をモニタリングするために必要な採血には、克服しなければならない数多くの障害が存在する。特に子供については、採血は、患者および採血に関わる人の双方にとって緊張およびストレスを伴う経験となり得る。子供を採血できる状態にすること、必要な材料（例えばランセット、麻酔クリーム、アルコールパッド、パンソウコウ、濾紙、郵送用宛先ラベル/封筒など）の収集は、どう考えても困難なことである。加えて、検査結果の待ち時間は、必要な治療計画の変更を遅延させることにもなり得る。血液サンプルを得、そのサンプルを研究室に送ること、または絶え間ない移送およびその移送に伴う困難は、血中フェニルアラニンモニタリング用装置のための高度に特殊化した市場における固有のニーズを提供する。

#### 【0008】

30

過去数十年の間に、分析化学および臨床化学は、比較的簡便かつ安価な機器を使用して、そして多くの場合未熟な作業員によって多くの有用な分析測定が行なわれることが可能となるまでに発達した。現在では、これらの技術のいくつかは処方箋の必要ない、容易に入手可能な家庭用のキットおよび機器となった。これらのうち最も一般的であるのは定量的グルコース測定であり、世界中で何百万人も糖尿病患者が定期的に使用している。患者はマイクロランセットを使用して小さな(50-100マイクロリットル)血滴を作り、血液サンプルを浸漬棒(dip stick)デバイスに移す。前記浸漬棒デバイスは、サンプルを回収し、必要な分離工程を行い、そして特定の化学反応が行われる1以上の分析領域にサンプルを供給する役割を果たし、その結果、小型の安価な分析機器で読み取られるシグナルが得られる。糖尿病患者においては、グルコース特異的浸漬棒が使用され、そして一般にグルコメーターと呼ばれる小型の手持ち式の反射比色計が30-100ドルまたはそれより高い入手価格で購入される。

40

個別の浸漬棒の値段は、製造業者および数量対価に従って50セントから2.00ドルの範囲内にある。グルコースについて使用される酵素ベースの比色アッセイに加えてイムノアッセイを採用することも可能であり、その最も一般的であるのは家庭用妊娠検査である。現在の市販コレステロール試験は酵素ベースの比色分析システムである。

#### 【0009】

主要な糖尿病コントロールおよび合併症臨床試験(DCCT)は、最近、糖尿病に対する厳重な血糖値コントロールのより一層の健康上の効果について報告した。グルコースの日常的なモニタリングおよびインスリン摂取の制限は、この疾患の管理をはるかに効果的にし、かつ、患者および健康管理機関の双方にとって煩わしい慢性的な複雑な状況を軽減するこ

50

とにつながる。

糖尿病患者団体は、特に血液サンプリングの外傷および不快感を伴わないサンプリング方法に重きをおきながら、グルコースおよび糖尿病に重要な他の代謝産物の測定およびモニタリングをさらに向上させるための主要な研究および開発活動を主導、促進している。分析用サンプルとしての間質液の使用、さらには真に非観血的な分析方法の開発に向けての検討がなされている。現在、多くの研究および開発は、グルコース分析用の間質液のサンプルを得るための最小限に観血的なアプローチに向けられている。そのような液は血管または神経のない皮膚表皮層から収集し得る。従って、その方法は無痛および無血である。

#### 【0010】

本発明は、QO PKUの管理（即ち血中フェニルアラニン濃度モニタリング）用に適合された、グルコース検査についての既知の技術を利用する。次世代は無痛および無血の技術を使用することになると予想される。

本発明の目的は、代謝系遺伝疾患に使用するための特殊化した血液モニタリング製品を提供することである。より具体的には、本発明の目的は、厳しい医療管理下にあるPKU患者の血中フェニルアラニン濃度を測定するためのモニタリング製品を提供することである。さらなる目的は、PKU患者が家庭内で使用するための血中フェニルアラニンモニタリング製品を提供することである。

#### 【発明の開示】

#### 【課題を解決するための手段】

#### 【0011】

#### 発明の要約

本発明は、PKU患者が家庭内でその個人の必要とする基準で定期的に血中フェニルアラニン濃度をモニタリングすることを可能とする医療装置および該装置で読み取る検査ストリップに関し、それらは、糖尿病患者の使用するグルコースモニターおよびストリップに類似する。本発明のストリップおよび装置は、PKU治療計画で必要とされる基準に従って血中フェニルアラニン濃度を定期的に(routinely)モニタリングする。好ましい実施態様においては、本発明の装置はさらに、長期の治療期間にわたる血中フェニルアラニンの結果の記憶保存手段を含む。本発明の装置のある実施態様は、血液サンプルの滴を検査ストリップ上にのせ得るものであり、処方指示する遺伝学医師により適切とされる必要な基準に応じて購入が続けられる類のものである。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0012】

#### 発明の詳細な説明

本発明は、生体液を、該生体液に含まれるフェニルアラニン濃度について分析するための新規の検査ストリップを提供する。本発明の検査ストリップは、望ましくは不連続(discrete)の、密接に接触した(in intimate contact)少なくとも2つの重なった層を含む。好ましくは、この検査ストリップは、分析のために生体液を加える前に形成される。

#### 【0013】

より具体的に述べると、本発明は、複数の重なった層からなる一体型(integral)分析用ストリップを提供し、前記ストリップは、ストリップに加えた液中のフェニルアラニンの存在に応答して、高度に定量的な検出可能な変化をストリップ内に素早くもたすことが可能である。本発明のストリップは、診断およびモニタリングの目的のために使用し得、試薬層と流体性接触(fluid contact)しているサンプル展開層を含む。サンプル展開層（本明細書において同意語として展開層または配置層(metering layer)とも表す）は、ストリップに加えられる液サンプルの少なくとも1の成分またはその成分の反応生成物を含む層物質内に分布または配置させることによって、与えられたいかなる時間で、展開層の、試薬層を向いた（即ち試薬層に近い）面上にあるその物質の様な濃度を提供する。加えられたサンプルは密閉(confine)する必要はない。様々な好ましい実施態様においては、展開層は等方的に多孔性(isotropically porous)；即ち、層内のあらゆる方向において多

10

20

30

40

50

孔性であり得る。本明細書における等方的な多孔性への言及は、展開層内のすべての方向における実質的な多孔性の事実を示す。そのような多孔性の程度は、例えば孔径、空隙容量のパーセンテージその他に関して、必要または望ましい場合には、変動し得ることが理解される。本明細書に使用される等方的多孔性(isotropic porosity)(または等方的に多孔性)という用語は、フィルター膜に関連して膜表面間が連続である孔を有する膜を表すためにしばしば使用される等多孔性(isoporous)またはイオン透過性(ionotropic)の用語と混同されるべきではないと理解される。同様に、等方的多孔性は、異方的(anisotropic)という用語との対比で使用される等方的(isotropic)という用語(少なくとも1つの表面に沿って薄い“表皮膜(skin)”を有するフィルタ膜を表す)と混同されるべきではない。例えばMembrane Science and Technology, James Flinn ed, Plenum Press, New York (1970)を参照されたい。 10

#### 【0014】

試薬層とは、フェニルアラニンまたはフェニルアラニンの反応生成物の前駆体と相互作用する少なくとも1の物質を含み、かつ、その相互作用性物質の効果によって層内に変化をもたらすことができる層のことである。試薬層は、好ましくは、展開層内で展開可能な少なくとも1の物質またはその物質の反応生成物に対する浸透性(permeability)が実質的に一様なものである。層の一様な浸透性とは、均質な液がその層の表面にむらなく供給された場合に、層の表面の異なる領域を通して行われた、層内のその液の濃度の同様の測定が、実質的に等しい結果をもたらすような浸透性を意味する。一様な浸透性の効果によって、例えば本明細書に説明する試薬層の内部における望ましくない濃度勾配が排除される。 20

#### 【0015】

本明細書における、一体型分析用エレメントにおける展開層と試薬層の間の流体性接触(fluid contact)への言及は、展開層と試薬層の重なった領域の間を通して、その検査ストリップを通り抜けるという流体の能力を明らかにする。換言すれば、流体性接触とは、流体性接触している層の間で流体の成分を移送する能力を意味する。

本発明の検査ストリップは、自己支持型(self-supporting)であってもよいし、または、展開層、該展開層と流体性接触している試薬層および他のいかなる層は、支持体(例えば、約200nmと約900nmの間の領域内の1以上の波長の電磁放射線を透過することが可能な支持体)に保持されていてもよい。 30

#### 【0016】

Przybylowicz, E. P. et. al. (米国特許第3,992,158号(1976))は、酵素的比色アッセイを通して血液/血清内の検体濃度を測定するための、薄フィルム方式の手法について説明した。この特許の内容を、特に本明細書に援用する。この手法をL-Phe濃度の測定に応用するための予備的な研究が行われた。フィルムはいくつかの層を含む: 試薬層、展開層およびフィルター層。試薬層は、緩衝酵素的比色試薬を含む親水性ポリマー(例えばゼラチンまたはアガロースなど)からなり、そこで反応(検体の非存在/存在を示す)が行われる。例えば二酸化チタンで着色された酢酸セルロースからなる展開層は、検体の一様な展開を助け、かつ、反射濃度測定法による有色の反応生成物の定量を可能とする反射表面として機能する。酢酸セルロースおよび珪藻土からなるフィルター層は、大きなタンパク質および血液細胞を検体から除去して、検出の容易性および正確性を向上させる。 40

#### 【0017】

図1に示す本発明の実施態様において、分析用エレメントは、展開層14(フィルター機能をも果たし得、かつ、支持体10を通した反射分光学的検出のための適当な反射性のバックグラウンドをも提供し得る)と流体性接触している試薬層12を含む支持体10から構成される。

あるいは、層14は、反射しない類のものであってもよく、検出は透過モードで実施し得る。層14は、例えば、層12上にコーティングまたは積層された等方的に多孔性の白化(blush)ポリマー層であり得る。

#### 【0018】

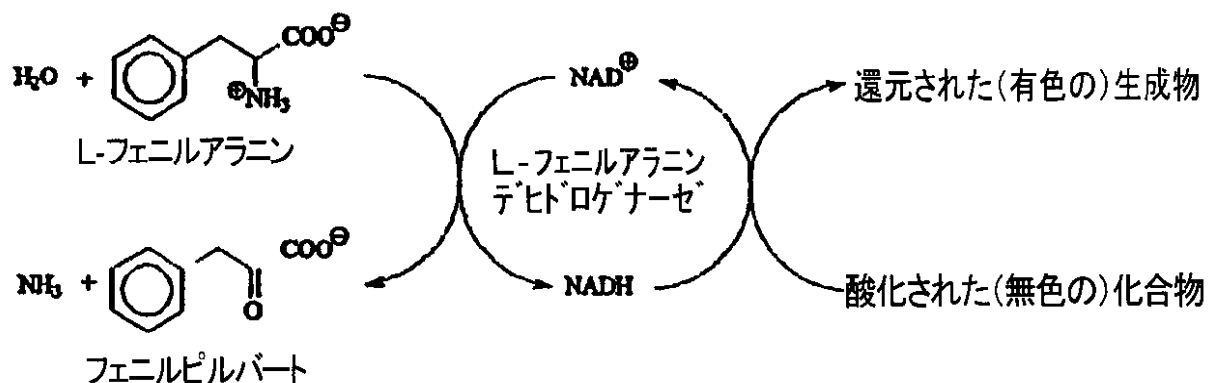
図2は、本発明のさらなる実施態様を示し、ここでは分析用エレメントは支持体30、試薬層32から構成され、フィルター層34は半浸透式(semi-permeable)膜から形成されてもよく、かつ、両方の層と流体性接触しており、層34は例えば白化(blush)酢酸セルロース内の二酸化チタンで構成され得る。

現在の血中フェニルアラニンの家庭用モニターは、酵素フェニルアラニンデヒドロゲナーゼを利用する。下に示すように、この酵素はフェニルアラニンをフェニルピルバートに変換し、その際に付随して等量のNADHを生成する。続いて、比色アッセイを使用してNADHが検出される。下に示すように、例えば、NADHは無色のテトラゾリウム化合物を還元して、目に見える、または比色分析により測定される有色の化合物とする。

【0019】

色形成と連動するL-フェニルアラニンの酸化

【化1】



10

20

生成したNADHは、電子アクセプター検出システムを使用して比色分析的に測定される。

【0020】

大多数意見として“許容される”血中フェニルアラニンの範囲は、120から360: moles/Lである。実務においては、食事コンプライアンスが問題となる場合には、上限値は5歳となった後は480: moles/Lに上げられ、そして10歳となった後はより高くすることが“許容”される。また、女性については、妊娠中にモニタリングを行う必要がある。

家庭におけるモニタリングの必要限界値は使用可能なサンプル容量に影響される。指に針を刺すことにより得られる血液量は約30  $\mu\text{L}$ である。30  $\mu\text{L}$ の血液の滴が使用されると想定すると、最適の下限値である120  $\mu\text{moles/L}$ におけるフェニルアラニンの総量は0.60  $\mu\text{g}$ であり、そして最適の上限値である360  $\mu\text{moles/L}$ においては1.8  $\mu\text{g}$ である。フェニルアラニン濃度が、繰り返し測定間の統計的ばらつきによって低く見えているだけではなく、実際にとっても低いときには、正確に検出するためには、検出の下限値はコントロール値0.60  $\mu\text{g}$ よりも十分に低くなくてはならない。

30

【0021】

いくつかの呈色試薬が有用であり、検出限界は形成された色の強度に影響される。チオニン、ローズベンガル、メチレンブルー、アズールCが、NADHと直接反応することが示されている。テトラゾリウム塩を使用することも可能であるが、その場合は1-メトキシフェナジンメトサルフェートなどの電子メディエーターを必要とするかもしれない。

40

【実施例】

【0022】

実施例

酵素的比色アッセイに対するヒト血清の影響

様々な濃度のL-フェニルアラニン(L-Phe)の溶液を添加したヒト血清(A/B型、Sigma Aldrichより購入)溶液を使用して比色酵素的アッセイを行った。血清を含まないが同等のL-Phe濃度で行った対照実験は、血清の存在によって時間経過に従って吸光度の変化率および還元された色素の  $m_{\text{MAX}}$  の変化率が低下することを示した。

さらなる研究によって、血清の存在は、340nm (NADHの  $m_{\text{MAX}}$ ) における吸光を抑制する

50

ことによってアッセイの比色の部分に直接影響することが明らかになった。抑制の程度はNADH濃度およびアッセイ混合物に存在する血清の量によって異なった。10,000Daを超える分子量のタンパク質を血清から除去すると、吸光の抑制の程度が低減した。

【0023】

時間による吸光度の変化率とL-Phe濃度との間の直線的な関係が血清の存在下において得られるかどうかを調べるための実験が行われた。

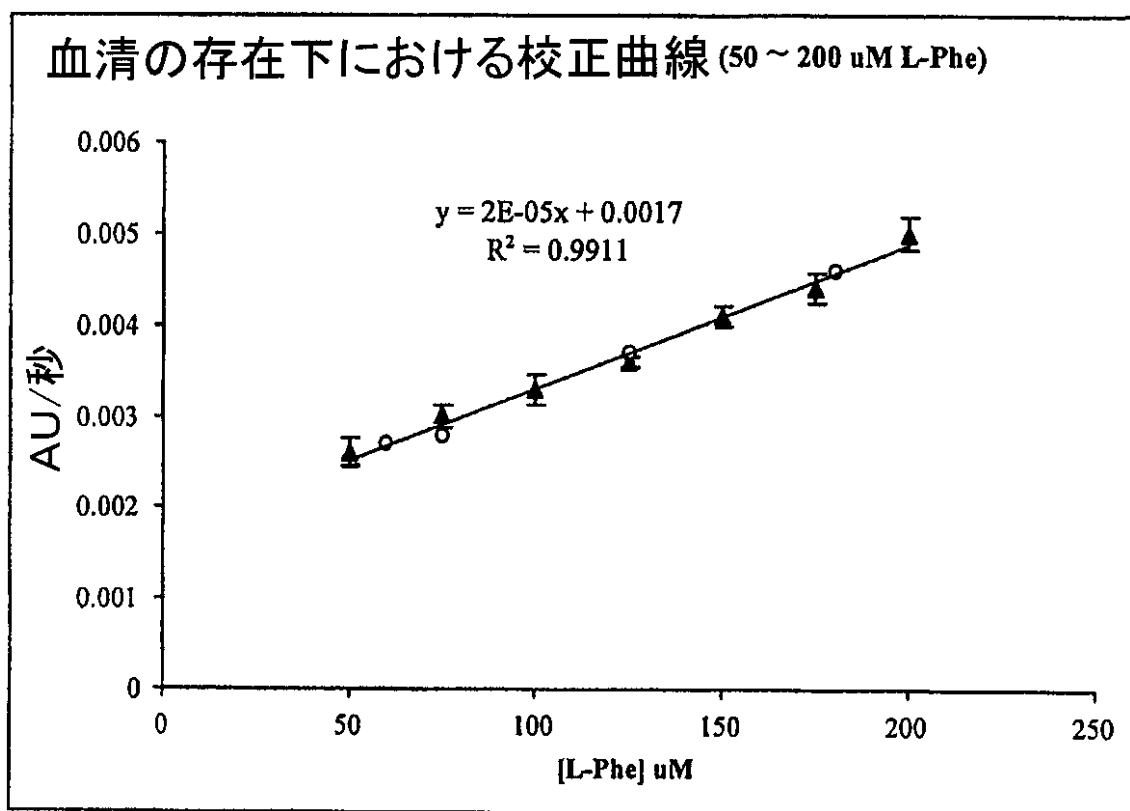
アッセイにおける酵素濃度を上げて、使用するL-Phe濃度の幅を狭めることによって、一次従属が得られた。加えて、酵素的比色アッセイに使用する前に血清を0.45 μmのフィルターで濾過することによって、回収データの一貫性が向上した。

血清および0から3000 μMの非希釈L-Phe濃度領域の15倍希釈に対応する、0から200 μMの範囲のL-Pheについての校正曲線を得た。

校正曲線：3mlアッセイ混合物は、5.4mMリン酸カリウム/43.5mMトリエタノールアミン・バッファー(pH8.6)中に、300 μM MTS、150 μM PMS、0.75mM  $\text{-NAD}^+$ 、0-200 μM L-Phe、200 μl ヒト血清および0.17u/ml L-Pheデヒドロゲナーゼを含む。

【0024】

【表1】



20

30

【0025】

上に示す校正曲線は少なくともトリPLICATEで行った酵素的比色アッセイに基づき、そこにおいては0.0026から0.005AU/秒で変動する吸光度の変化率に対して標準偏差は0.0001から0.0002の範囲にある。

フェニルアラニン濃度が未知のサンプルを使用して、校正曲線の正確さを試験した(校正曲線のポイントを白丸で示す)。この校正曲線を使用した予想フェニルアラニン濃度の誤差%は2から11%の範囲であった。未知のL-Phe濃度予想における正確性は、アッセイに使用される酵素濃度に強く依存した。

室温で遠心することにより、ヒト全血(抗凝血剤の存在下で保存したもの)から多血小板血漿(PRP)を調製した。PRPは1.5mlずつに分注して-20 で保存し、アッセイを開始する直前に37 の水槽で融解した。いくつかの濃度にL-Pheを添加した融解PRPを、酵素的比色

40

50

アッセイに使用した。同等の濃度にL-Pheを添加した血清を使用して対照実験を行った。時間経過に伴う520nmにおける吸光度の変化率は、下の表に示すように、血清とPRP-含有アッセイ混合物で同じであった。

【0026】

時間経過に伴う吸光度の変化率 (AU/秒)

[L-Phe] = 0  $\mu$ M [L-Phe] = 75  $\mu$ M [L-Phe] = 125  $\mu$ M [L-Phe] = 250  $\mu$ M

	0 $\mu$ M	75 $\mu$ M	125 $\mu$ M	250 $\mu$ M	
血清	0.0011	0.0023	0.003	0.0036	10
血漿	0.0013	0.0022	0.0029	0.0036	

アッセイ条件：3mlのアッセイ混合物は、5.4mMリン酸カリウム/43.5mMトリエタノールアミン・バッファー (pH8.6)中に、300  $\mu$ M MTS、150  $\mu$ M PMS、0.75mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>、0-250  $\mu$ M L-Phe、200  $\mu$ l ヒト血清および0.25u/ml L-Pheデヒドロゲナーゼを含む。

【0027】

凝固の問題のため、PRPを使用するより広範なL-Phe濃度におけるさらなる実験は行わなかった。より多くの血液を入手した後に、血漿を保存および処理するためのさらなるオプションについての探求を行う。例えば、PRPはフィブリンの構成を緩める滅菌デキストロースの存在下で保存することができるし、または、いくつかの凝固因子を欠く、極低温で沈殿させた血漿を調製することも可能である。家庭用モニタリングキットのレベルでは大規模な血液処理は行われなため、全体的に血漿への操作は最小限に留めるべきである。

本発明の検査ストリップ用の薄層フィルム形式を試すための実験が行われた。分光学的測定によって、酵素的比色アッセイ試薬は水性フォーマット内で(親水性ポリマーである)ゼラチンの存在下で機能することが示された。ゼラチン存在下におけるいくつかのL-Phe濃度についての典型的な酵素的比色アッセイにおいて、490nmにおける吸光度の変化率を測定した。以下のデータは、与えられた条件下(アッセイ混合物の最終pHは7.00であった(先の試験はpH8.0で行われた))でアッセイが機能することを示す：

【0028】

[L-Phe] (mM)	吸光度の変化率 (AU/秒)
0	0.0007
2.5	0.0014
5.0	0.0025

アッセイ条件：3mlのアッセイ混合物は、5.4mMリン酸カリウム/43.5mMトリエタノールアミン・バッファー(最終pH7.0)中に、300  $\mu$ M MTS、150  $\mu$ M PMS、1.125mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup>、0-5000  $\mu$ M L-Pheおよび0.17u/ml L-Pheデヒドロゲナーゼを含む。

【0029】

次に、酵素的比色アッセイ試薬が、ゼラチンフォーマット内で乾燥後に機能することを示すための実験を行った。典型的な試薬混合物(ゼラチン、バッファー、色素/メディエーターおよび酵素/コファクターを含む)を、96-ウェルマイクロプレート内で、室温で通常の気流を当てて乾燥させた。乾燥反応混合物にL-Phe溶液(pH8.6で緩衝)を加え、そしてMolecular Devices社のマイクロプレートリーダーを使用して20分にわたって490nmにおいて吸光度の変化をモニタリングした。L-Pheの存在下における吸光度の変化率は、対照混合物(すべての試薬を含むが、酵素を含まない)と比較して著しく高かったため、この実験は、ゼラチン内での乾燥工程後に試薬が活性を有することを明確に示した。

上述のマイクロプレートアッセイを使用して、1~15mMの範囲のL-Pheについての予備的校正曲線を得た(20分の反応後のマイクロプレートのスナップ写真が図3の写真に示され

10

20

30

40

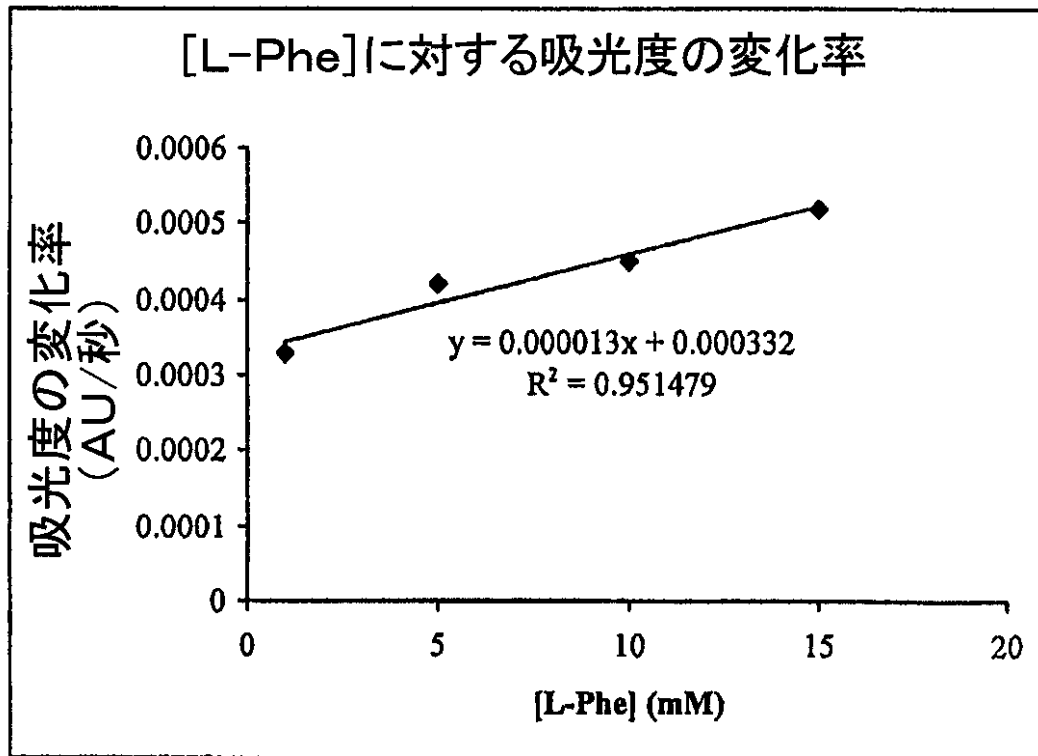
50

ている)。

アッセイ条件：約65 $\mu$ lのアッセイ混合物は、5.4mM リン酸カリウム/43.5mM トリエタノールアミン・バッファー(最終pH7.0)中に、75 $\mu$ M MTS、37.5 $\mu$ M PMS、0.375mM  $-NAD^+$ 、0-15mM L-Pheおよび0.08 u/ml L-Pheデヒドロゲナーゼを含む。

【0030】

【表2】



10

20

30

【0031】

マイクロプレートアッセイを使用する室温における乾燥ゼラチンフォーマット内の酵素的比色試薬の安定度は、3日の期間にわたって安定であることが分かった。

試薬層、展開層およびフィルター層を含む薄層フィルムを製造するための実験が行われた。Gardoの塗布棒およびBird型のフィルム塗布具を使用して、湿潤時の厚さが100 $\mu$ mから200 $\mu$ mの範囲にある均一の層を製造し、それは乾燥するに従ってより薄くなり得る(例えば、100 $\mu$ mゼラチンフィルムは乾燥によって約20 $\mu$ mの厚さに低減する)。試薬-含有ゼラチン混合物の層形成を成功裏に達成した。

【0032】

本発明の装置は主として家庭用のユニットであり、旅行に携帯できるほど持ち運びやすい。そのデザインは、壁にプラグした外部パワーサプライを使用する小型装置である。この製品についての容積が減るならば、大きさをグルコースモニターと同程度にさらに削減することが可能であるかもしれない。

40

以下は、このデザインの要件の下位集合、およびアプローチである。

【0033】

手持ち式であり、家庭内使用に便利である：

本発明の装置は、好ましくは手に持つこともできるが、卓上/カウンター上に設置した方がより機能する。最初のデザインには、市販の規格品のプラスチック囲いを使用することができる。これはまた、完全な生産にも使用し得る。選択された囲いは電池室用のオプションを有していないが、スライドが使用される間は卓上/カウンター上装置として使用

50

し得る。

【0034】

電池式-充電可能：

本発明の装置は、差し込み式であってもよいし、または電池式であってもよく、好ましくは充電可能である。このユニットは、電池充電器のように見える小さい外部パワーパックを有していてもよい。電力回路は最適化し得る、即ち電池の充電および電池のための空間が加えられる。テスターおよび外部パワーパックは、あわせても依然として持ち運びやすい。本発明の装置は燃料電池式であってもよい。

このデザインは、例えば、傾斜した表示部を有する一般的な平らな面を有するケースを使用し得る。標準的な囲いは、様々な色（ボーン色（オフホワイト）および黒色）のもの

10

【0035】

使用し易さ：

ユニット本体は3つのボタン、サンプルスライドのための場所、ディスプレイ、および2つのジャック（電源用に1つとデータ接続用に1つ）を有し得る。3つのボタンのいずれかを押すとユニットの電源が入り、その後ディスプレイが、ボタンの機能を、それらが使用されるに従って定義する。

このユニットのためのソフトウェアは、そのプログラミングのし易さおよびサポート回路への導入のし易さによって選択されたマイクロプロセッサ上で作動される。これは、例えば、Rabbit SemiconductorからのRCM3410 RabbitCoreからのマイクロプロセッサで

20

【0036】

市販の規格品のディスプレイを使用してもよい。選択されるディスプレイは、サイズ、機能性、消費電力、値段、および購入し易さを基準とする。

ディスプレイパネルは、血液の測定値をマイクロモル/リットルおよびミリグラム/デシリットルで表示することが理解される(1mg/dL = 60 μmole/L)。

この装置の重量は、好ましくは0.45kg（1ポンド）未満である。

最初のユニットは、作動プログラム、オプションセットアップデータ、および読み取りの履歴の保存を可能とするフラッシュメモリー保存ファイルシステムを有していてもよい。パワーパックが差し込まれていない時には、搭載型・腕時計様の電池がメモリーの内容を安全に保管した状態に保つ。

30

1時間内に行う検査数の唯一の制限となるのは、検査を実施するのに掛かる時間のみである。ファイルは日と時間によって保存されるため、検査が実施されると自動的に記録される。処理量は、好ましくは1時間あたり10回の検査を超えてはならない。

報告された結果のばらつきは、機器よりもストリップに依存する。校正の所定操作により、電子工学に基づく測定の変動性に対処する。

【0037】

予定するユニットは、幅9.1cm（3.6"）、深さ14.6cm（5.75"）、そして高さおよそ5cm（2"）である。最初のユニットの高さは、アルゴリズムのより速い動作、試験、および微調整を可能とするためにもう少し高いかもしれない。

40

このユニットの重量は340g（12オンス）の領域にあるべきである。壁に差し込まれる分離型パワーサプライは、携帯式電話を充電するために使用されるものと同様となる。

検査は立ち上げ時に表示されるメインメニューから実行されるため、（操作をする人にとって）検査に必要なステップの数は最小限である。データは自動的にファイルされ、操作をする人の手間を省く。

【0038】

このシステムは本発明のストリップを扱うようにデザインされているが、他の種類の検査ストリップに変更するとは容易であり、その際にユニットの機械的および機能的デザイ

50

ンへの影響は最低限であるか、全く無い。

現行のデザインは、ディスプレイを使用して、操作をする人に対して、ディスプレイ上に成功および読み取りの結果またはエラー点滅を知らせる。現在のところ、音響フィードバックをユニット内にデザインすることを予定していないが、それが必要となった場合には容易に加えることができる。

結果は、10秒以内に得ることが可能であり得る：

結果をダウンロードするためのデータポートが提供される。

100回分の検査結果を記録し得るメモリーが提供される。

【図面の簡単な説明】

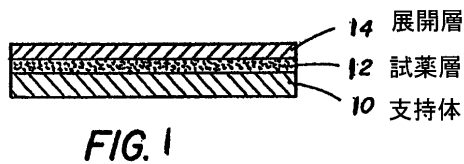
【0039】

【図1】展開層14と流体性接触している試薬層12を含む支持体10から構成される本発明の分析用エレメントを示す。

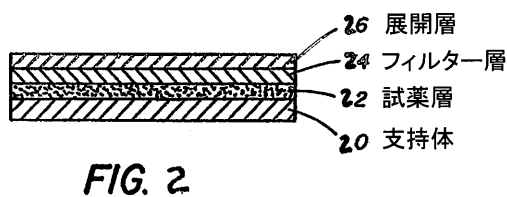
【図2】支持体30、試薬層32、フィルター層34から構成される本発明の分析用エレメントを示す。

【図3】酵素的比色アッセイ試薬混合物とL-Phe溶液を20分間反応させた後のマイクロプレートのスナップ写真を示す。

【図1】



【図2】



【図3】

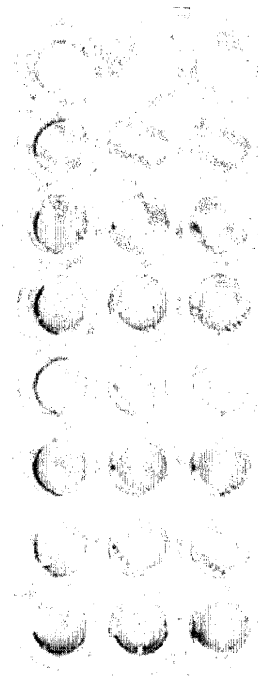


Fig. 3

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/11706		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC(7) : C12Q 1/32, 1/00; G01N 33/53 US CL : 435/26, 4, 970				
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/26, 4, 970				
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 practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X --- Y	US 6,468,416 B1 (NAKAMURA et al) 22 October 2002 (22.10.2002), see entire document.	1-3 ----- 4-13, 15-18		
X --- Y	US 6,503,198 B1 (ARONOWTIZ et al) 07 January 2003 (07.01.2003), see columns 37-40 and entire document.	1-2, 14 ----- 4-8		
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%;">               "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                "E" earlier application or patent 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             </td> <td style="width: 50%;">               "T" 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                "&amp;" document member of the same patent family             </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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	"T" 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
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent 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	"T" 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 06 March 2005 (06.03.2005)		Date of mailing of the international search report <b>07 APR 2005</b>		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner of Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Louise Leary <i>Louise Leary</i> Telephone No. 571-272-0700		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US04/11706

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

WEST/NPL/GOOGLE: phenylalanine test element, dehydrogenase, colorimetric, medical, non-invasive, test strip, power device

## フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, 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, HU, IE, IT, LU, MC, NL, 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, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(74) 代理人 100084663

弁理士 箱田 篤

(74) 代理人 100093300

弁理士 浅井 賢治

(74) 代理人 100114007

弁理士 平山 孝二

(72) 発明者 メイ シェルドン ダブリュー

アメリカ合衆国 ジョージア州 30329 アトランタ ノースイースト ロジェレッタ ドライヴ 1147

(72) 発明者 シュラナー リチャード ディー

アメリカ合衆国 ジョージア州 30328 アトランタ グレンリッジ クローズ ドライヴ 750

(72) 発明者 オールダム チャーリー ディー

アメリカ合衆国 ジョージア州 30332-0400 アトランタ ステイト ストリート 770 スクール オブ ケミストリー アンド バイオケミストリー ジョージア インスティテュート オブ テクノロジー

(72) 発明者 デ シルヴァ ヴェロニカ

アメリカ合衆国 ジョージア州 30332-0400 アトランタ ステイト ストリート 770 スクール オブ ケミストリー アンド バイオケミストリー ジョージア インスティテュート オブ テクノロジー

F ターム(参考) 2G054 AA07 AB05 AB07 CA21 EA06 GB04 JA08

4B029 AA07 BB16 FA12

4B063 QA01 QA18 QA19 QQ03 QR02 QR66 QS11 QS36 QX02

专利名称(译)	用于监测血液苯丙氨酸浓度的医疗装置		
公开(公告)号	<a href="#">JP2006524509A</a>	公开(公告)日	2006-11-02
申请号	JP2006510097	申请日	2004-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	会见仁公司 佐治亚科技研究公司		
申请(专利权)人(译)	Mettojen公司 佐治亚理工学院研究公司		
[标]发明人	メイシエルドンダブリュー シュラナーリチャードディー オールダムチャーリーディー デシルヴァヴェロニカ		
发明人	メイ シェルドン ダブリュー シュラナー リチャード ディー オールダム チャーリー ディー デシルヴァ ヴェロニカ		
IPC分类号	C12Q1/32 G01N21/78 C12M1/34 A61B C12Q1/00 G01N33/52 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6812 C12Q2326/92 G01N33/526 G01N2333/906		
FI分类号	C12Q1/32 G01N21/78.Z C12M1/34.E		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/AB05 2G054/AB07 2G054/CA21 2G054/EA06 2G054/GB04 2G054/JA08 4B029/AA07 4B029/BB16 4B029/FA12 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ03 4B063/QR02 4B063/QR66 4B063/QS11 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	小川伸男		
优先权	60/462887 2003-04-15 US		
其他公开文献	JP2006524509A5		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

一种适用于利用比色分析监测苯丙氨酸血液水平的医疗装置，包括用于接收包含测试元件或其上具有测试生物样品的基底的单元的插入装置，和用于在所述装置上显示所述生物样品的苯丙氨酸浓度的测试结果的装置。

形成と運動するL-フェニルアラニンの酸化

化1]

