

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第6339562号
(P6339562)

(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)

(24) 登録日 平成30年5月18日(2018.5.18)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 5 W
	GO 1 N 33/543 5 2 5 C
	GO 1 N 33/543 5 2 5 U
	GO 1 N 33/543 5 2 5 G

請求項の数 22 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2015-515577 (P2015-515577)	(73) 特許権者	508135943
(86) (22) 出願日	平成25年6月11日(2013.6.11)		ディアガスト
(65) 公表番号	特表2015-518969 (P2015-518969A)		D I A G A S T
(43) 公表日	平成27年7月6日(2015.7.6)		フランス・59120・ロース・アブニユ
(86) 国際出願番号	PCT/FR2013/051358		ー・ウジェーヌ・アピネ・ウロザンテ・2
(87) 国際公開番号	W02013/186482		5 1
(87) 国際公開日	平成25年12月19日(2013.12.19)	(74) 代理人	100108453
審査請求日	平成28年6月1日(2016.6.1)		弁理士 村山 靖彦
(31) 優先権主張番号	1255452	(74) 代理人	100110364
(32) 優先日	平成24年6月11日(2012.6.11)		弁理士 実広 信哉
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100133400
			弁理士 阿部 達彦
		(72) 発明者	ナジム・シャイビ
			フランス・33140・ヴィルナーヴ・ド
			ルノン・アヴニユ・デ・シアンス・6
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 インビトロ診断装置及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血液またはその成分の一つの試料から、赤血球の表現型の抗原と、特にこの抗原に対する抗体との少なくとも一つの反応を検出するためのインビトロ診断装置(10)であって、

- 支持(12)、及び

- 前記支持内に配され、0.05mmから1.5mmの厚さを有し、孔の直径が2µmから30µmの疎水性の多孔質膜(14)であって、前記膜が前記試料を受けるように意図された少なくとも一つの親水性の反応領域(16)を備え、前記親水性の反応領域(16)の表面が前記疎水性の多孔質膜(14)の表面よりも小さい、疎水性の多孔質膜(14)、を備え、

前記多孔質膜(14)の前記親水性の反応領域(16)が、前記多孔質膜の先行する化学的または物理的な処理によって多孔質基板の化学的機能を変更することなく、洗剤で親水性にされることを特徴とするインビトロ診断装置(10)。

【請求項 2】

前記洗剤が非イオン性の表面活性剤であることを特徴とする、請求項1に記載の診断装置(10)。

【請求項 3】

前記洗剤が0.01から2%(重量/体積)の量で使用されることを特徴とする、請求項1または2に記載の診断装置(10)。

【請求項 4】

前記多孔質膜(14)が前記支持(12)に配され、前記支持(12)が少なくとも一つの開口部(20)を備え、各開口部(20)が前記多孔質膜の各親水性の反応領域(16)に垂直であることを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項に記載の診断装置(10)。

【請求項 5】

前記支持(12)が硬質プラスチック支持であることを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項に記載の診断装置(10)。

【請求項 6】

前記多孔質膜(14)の下方に配された吸収性膜(18)も備えることを特徴とする、請求項1から5のいずれか一項に記載の診断装置(10)。

10

【請求項 7】

前記多孔質膜(14)の前記親水性の反応領域(16)が捕捉剤も備えることを特徴とする、請求項1から6のいずれか一項に記載の診断装置(10)。

【請求項 8】

前記捕捉剤が赤血球の型/表現型の抗原を備えることを特徴とする、請求項7に記載の診断装置(10)。

【請求項 9】

前記捕捉剤がヘモグロビンを欠いた赤血球であることを特徴とする、請求項8に記載の診断装置(10)。

20

【請求項 10】

前記捕捉剤が抗体であることを特徴とする、請求項7に記載の診断装置(10)。

【請求項 11】

前記捕捉剤がポリカチオン性のポリマーであることを特徴とする請求項7に記載の診断装置(10)。

【請求項 12】

前記反応領域(16)が前記多孔質膜の厚さに全体にわたって親水性であることを特徴とする、請求項1から11のいずれか一項に記載の診断装置(10)。

【請求項 13】

前記反応領域(16)が前記反応領域の表面で親水性であることを特徴とする、請求項1から12のいずれか一項に記載の診断装置(10)。

30

【請求項 14】

前記反応領域(16)が二つの親水性の領域(16-1、16-2)を備え、前記反応領域の中央(16-1)で、周辺(16-2)よりも親水化度が高いことを特徴とする、請求項1から13のいずれか一項に記載の診断装置(10)。

【請求項 15】

前記反応領域(16)が、異なる親水化度を有する二つの親水性の領域を有し、一方は表面、他方は厚さ中であることを特徴とする、請求項1から13の何れか一項に記載の診断装置(10)。

【請求項 16】

前記反応領域(16)が、前記多孔質膜の先行する化学的または物理的な処理によって多孔質基板の化学的機能を変更することなしに、二つの異なる洗剤で親水性にされることを特徴とする、請求項14または15に記載の診断装置(10)。

40

【請求項 17】

請求項1から16のいずれか一項に記載の装置(10)の製造方法であって、以下のステップを備えることを特徴とする製造方法：

- 0.05mmから1.5mmの厚さで、孔の直径が2μmから30μmの疎水性の多孔質膜(14)を、少なくとも一つの洗剤によって、前記膜の少なくとも一つの領域(16)上で親水化するステップ、

- 選択的に捕捉剤溶液を堆積するステップ、

50

- 乾燥するステップ、
- 前記多孔質膜（１４）、及び選択的に、前記多孔質膜（１４）の下方に配された吸収性膜（１８）を、支持（１２）と組み合わせるステップ。

【請求項１８】

血液またはその成分の一つの試料から、ＡＢＯ血液型の同定及び決定、拡張Ｒhesus表現型検査、異常な凝集素の探索、自己抗体の探索、寒冷凝集素の探索、及び／またはクロス検証をするための、請求項１から１６のいずれか一項に記載の装置の使用。

【請求項１９】

赤血球の試料から、抗原の二つの異なる分布の存在を検出するために、赤血球の血液型を表現型検査するプロセスであって、以下のステップを含むことを特徴とする表現型検査プロセス：

- 請求項１から６のいずれか一項に記載の装置（１０）の前記反応領域の中央で前記多孔質膜（１４）を水和するために溶液を堆積するステップであって、前記反応領域（１６）が二つの親水性の領域（１６－１、１６－２）を備え、前記反応領域の中央（１６－１）で周辺（１６－２）よりも親水化度が高く、前記中央で抗体を含む捕捉剤を備えるステップ、

- 表現型検査される前記赤血球をバッファ液中で希釈するステップ、
- 表現型検査される前記赤血球を含むこの溶液を、前記反応領域の前記中央で加えるステップ、

- 保温するステップ、

- 前記反応領域上にリンス液を堆積するステップ。

【請求項２０】

赤血球の試料からの、赤血球の血液型の表現型検査プロセスであって、以下のステップを備えることを特徴とする表現型検査プロセス：

- 前記多孔質膜（１４）を請求項１から６のいずれか一項に記載の装置（１０）の前記反応領域（１６）の位置で水和するために溶液を堆積するステップであって、前記反応領域（１６）が単一の親水性の領域を備え、かつ、抗体を含む捕捉剤を備えるステップ、

- 選択的に、表現型検査される前記赤血球をバッファ液中で希釈するステップ、

- 表現型検査される前記赤血球を含むこの溶液を、前記反応領域の前記中央に加えるステップ、

- 保温するステップ、

- 前記反応領域上にリンス液を堆積するステップ。

【請求項２１】

血漿、血清、または完全の血液の試料から、血液中に存在する多価抗体を検出するためのプロセスであって、以下のステップを備えることを特徴とするプロセス：

- 試験される試料を、請求項１から６のいずれか一項に記載の装置（１０）の前記反応領域（１６）上に堆積するステップであって、前記反応領域（１６）が抗原を含む捕捉剤を備えるステップ、

- 前記捕捉剤と同一の抗原を含む、既知の表現型の赤血球試験を加えるステップ、

- 混合物を前記親水性の領域に通すステップ、

- リンス液を前記反応領域上に堆積するステップ。

【請求項２２】

血漿、血清、または完全の血液の試料から、血中に存在する抗赤血球抗体の検出、クロス検証、または自己抗体若しくは寒冷凝集素の探索のためのプロセスであって、以下のステップを備えることを特徴とするプロセス：

- バッファ、既知の表現型の赤血球試験とともに、試験される試料を保温するステップ、

- この混合物に赤血球を凝集させることが可能な作用物質を加えるステップ、

- 請求項１から６のいずれか一項に記載の装置（１０）の前記反応領域（１６）上に、前記混合物を堆積するステップ、

10

20

30

40

50

- 前記赤血球を凝集させることが可能な作用物質を含む溶液を、前記反応領域上に堆積するステップ、

- クームス、人間の抗グロブリン、または抗補体試薬を、前記反応領域上に堆積するステップ、及び

- 前記反応領域上にリンス液を堆積するステップ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、赤血球抗原と、特にこれらの抗原に対する抗体との反応を検出するための、血液の試料または血液の成分の試料からの、インビトロ (*i n - v i t r o*) 診断装置に 10
関連する。

【0002】

本発明は、血液型の同定及び決定のための、この装置の使用にも適用する。

【背景技術】

【0003】

免疫血液学的診断の目的は、抗体による赤血球の攻撃を提供又は診断することである。このために、その存在または不存在が血液型を決定する、赤血球の表面に存在する抗原を決定するためのツールを持つことだけでなく、血液が赤血球の既知の抗原に対する一つ以上の抗体を含むかどうかを同定することが必要であり、抗体の存在は不適合の可能性を意味する。 20

【0004】

従って慣習上の技術は、赤血球の表面の血液型抗原の存在または不存在を探索し同定すること及び/または血漿中で血液型の抗抗原 (*a n t i - a n t i g e n*) 抗体の存在または不存在を探索し同定することからなる。

【0005】

例えばA B Oシステムについては、B e t h - V i n c e n t 試験が、赤血球によって運ばれる抗原を決定し、補完的なS i m o n i n - M i c h o n 試験または血清クロスチェックが血清中を循環する抗体を決定する。

【0006】

B e t h - V i n c e n t 試験では、個々の赤血球は既知の特異性の抗体の試薬と一緒に 30
にされる。一般に、この試験は、抗体が対応する赤血球の抗原を認識した時に、赤血球の癒着を観察することによって可視的にされる。

【0007】

S i m o n i n 試験では、個々の血漿は、それぞれがA B Oシステムの精確な抗原性グループに属する赤血球と一緒にされる。これは、赤血球試験 (*r e d b l o o d c e l l t e s t*) と個々の血漿との癒着試験である。

【0008】

所謂、不規則性抗体の探索には、個々の血液における様々な赤血球抗原に対する免疫グロブリンの存在または不存在の検出が必要である。自己抗体研究の場合、すでにインビボ (*i n v i v o*) で固定された抗体が直接試験で個々内を直接探索される。アロ抗体 40
探索の場合、間接クームス法を用いて、抗原が既知である赤血球試験上へのこれらの免疫グロブリンの固定を明らかにすることが目的である。

【0009】

免疫血液学の分野で表現型検査に使用されるプロセス及び装置は非常にたくさんあるが、血液型の既存の表現型検査技術は多くの不利点を有する。

【0010】

例えばマイクロプレート技術は、遠心分離フェーズに続く攪拌段階を必要とする。支持上に同時に存在する複数の反応は同一の再懸濁キネティックを有さないので、攪拌段階は重要である。従って、強力な癒着を再懸濁することに成功することなく弱い癒着が進行する危険性が存在する。それらは目視チェックの下で行わなければならない、一部の試薬の付 50

着現象には特に注意が払われなければならない。

【 0 0 1 1 】

同様に、ゲル試験による濾過技術が実行される際、特に A B O 型の血漿試験中に一部の癒着が検出されない危険性がやはり存在する。ゲルへと通っていく際の、小さな癒着の切断による分離のためである。

【 0 0 1 2 】

また、これら全ての技術は、赤血球をデカントするため、またはゲルを通すために、遠心分離段階を必要とするので、大きな不利がある。それは膨大な時間と分析コストを追加し、扱うのが困難なかさばる遠心分離器の使用を必要とする制限的な段階である。

【 0 0 1 3 】

例えば特許文献 1 に記述されるように免疫濾過法もまた周知であり、試料中に存在する分析物を、捕捉要素を運びながら多孔質膜を通過する際に捕捉するステップと、表出要素 (r e v e l a t i o n e l e m e n t) によってその存在を明らかにするステップとからなる。このタイプの装置は試料の堆積領域、親水性の多孔質膜を備え、膜上に捕捉試薬が堆積され、膜下に吸収性膜が配置される。このタイプの試験の実行は、試料堆積領域に純粋または希釈された試料を堆積するステップからなり、それは多孔質膜を通過して吸収性膜で終了する。毛管現象による多孔質膜へのこの移動中に、試料中に捕捉要素に対応する分析物が存在する場合、分析物は捕捉剤によって固定化される。さらに、捕捉領域上の分析物の存在を検出可能であり、要素を視覚的に検出させる (着色した生成物)、または物理的若しくは化学的方法で明らかにされるようにするのを耐える表出剤 (r e v e l a t i o n a g e n t) によって好ましい分析物の捕捉スポット上の存在を明らかにする必要がある。

【 0 0 1 4 】

しかしこの方法は著しい感度及び特異性の問題を有する。試料が堆積すると、多孔質膜を広がり浸透し、多くの分析物が多孔質膜のデッドボリューム中で失われるか、捕捉領域の外側を通過するからである。表出液についても同様である。従って、より大きな体積の試験される試料及び表出液を堆積することが可能であるために吸収システムを過大寸法にする必要があり、縮小可能な試験の実行を妨げ、その反応速度は制御され、表出剤を受けることは免除され、ロボットピペッタを利用可能である。

【 0 0 1 5 】

この問題を解決し、信号を濃縮する試みで、親水性の多孔質膜の上及び下に、流れが捕捉スポットを通過するように強制する貫通した疎水性の構造を挿入することが特許文献 2 または特許文献 3 に提案されている。しかし、これらの装置にはスポットからの遠心拡散の問題が依然として存在し、捕捉スポットを通過し、それに固定されていない表出要素は、親水性の多孔質膜中を遠心的に拡散可能であり、スポットの外周に蓄積され得る。表出要素はその後、やはりスポット上に集中される洗浄を逃れるだろう。求心拡散によるスポットへのリターンの形態で、この表出要素のリターン現象が存在し、好ましい分析物が存在しない場合でもスポットの再着色を引き起こす。この現象は、誤った陽性結果が表れてしまうので、試験の読み取り (一般に 5 分から 15 分) を非常に急に妨げる。疑い、人的エラー、または情報の喪失の場合に、これらの装置は後に装置を再解釈しないので、これは大きな問題である。

【 0 0 1 6 】

今日既存の免疫濾過装置の別の主要な問題は、動作速度及びいくつかの場合にはプレインキュベーション時間の制御である。捕捉要素と分析物との、及び分析物と表出要素との相互作用が特定の反応速度を有するので、これらの時間は重要である。これらの反応速度は時間の関数として実行される相互作用の数を表す。従って捕捉剤 / 分析物結合及び表出 / 分析剤の関数として、十分な信号を得るためには、各結合に対して十分な数の相互作用が保証されなければならない。従って、相互作用剤 / 分析物捕捉がより遅いイベントでは、膜を横切る試料の通過速度は制限されねばならない。制限的な、表出要素と分析物との相互作用であるイベントでは、表出要素及び分析物が捕捉スポット上を混合するプレイン

10

20

30

40

50

キュベーション時間を伴って進む必要がある。特定のシステムなしには、親水性の膜の通過は急である(500 μl/min)。

【0017】

流れを制御するために、ピストンの活用が、特に特許文献4で提案された。

【0018】

プレインキュベーション時間を制御するために、特許文献5では二つの部分で装置を使用することが提案された：試料収集領域及び多孔質膜を備える上部と、多孔質膜及び吸収性膜を備える下部である。初期位置では、毛管現象で流体が移動できないので、これら二つのブロックは通信しない。機械的な取扱いの後、二つの領域は接触し、流体は毛管現象で流れることができる。疎水性の膜上に捕捉要素を堆積し、界面活性剤の添加によって通過を活性化することも提案された。

10

【0019】

機械的なアプローチは、専用のシステムの開発及び使用を必要とするので、ロボットの使用を排除するのが難しい。またそれらは取り扱い中、全ての投影に専門家をさらす。

【0020】

システムを下塗り(prime)するために試験が実行される際に表面活性剤を添加するのは、捕捉剤/分析物相互作用に著しく干渉するので、非常に有害である。また、免疫血液学の特定の場合には、表出剤として使用される赤血球は、液体状の表面活性剤と相性がよくない。赤血球の膜が溶解し、それらのヘモグロビンを全て放出するからである。

【0021】

20

特許文献6に開示された別の方法は流れを制御するために第一の下に追加の膜を使用することからなるが、提案された装置は親水性の多孔質膜中の試料及び表出要素の拡散に関連する問題を解決していない。

【0022】

従って、既存の免疫血液学的診断試験は多くの不利点を有する。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0023】

【特許文献1】欧州特許出願第2167967号明細書

【特許文献2】加国登録特許1312265号明細書

30

【特許文献3】国際公開第02/052263号

【特許文献4】米国特許出願公開第2008/0318342号明細書

【特許文献5】国際公開第03/016902号

【特許文献6】欧州特許出願第0334015号明細書

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0024】

また本願発明は毛管現象によるインビトロの免疫血液学的診断用に適合され、信頼でき、速く、可動性で、安価で、製造及び使用が単純で、小型化及び自動化可能で、相当な感度を有する装置を提案することで、従来技術の不利点を修正することを目的とする。

40

【課題を解決するための手段】

【0025】

この目的に応えるために本発明は、血液またはその成分の試料から、表現型の抗原赤血球と、特にこの抗原に対する抗体との少なくとも一つの反応を検出するためのインビトロ診断装置を提案し、該装置は、

- 支持、及び

- 0.05 mmから1.5 mmの厚さで、孔の直径が2 μmから30 μmの疎水性の多孔質膜であって、上記膜が上記試料を受けるように意図された少なくとも一つの親水性の反応領域を備え、上記反応領域が疎水性の多孔質膜の表面よりも小さな表面を有する疎水性の多孔質膜を備えることを特徴とする。

50

【 0 0 2 6 】

本発明はこの装置の使用、特に赤血球的血液型の表現型検査及び抗体の検出、この装置の実行のためのプロセスにも関連する。

【 0 0 2 7 】

- 有利に、本発明は今日既存の免疫濾過試験から生じる全ての不利点を、特に、
- 偽陽性の原因となる表出剤のリターンを防止する
 - より小さな体積の使用からの高められた感度
 - システムの小型化及び自動化
 - 装置の機械的な取扱いの必要なく、反応の反応速度の制御、によって改善する。

【 0 0 2 8 】

他の特徴及び利点は、添付図面についてのみの例示として与えられる、本発明の以下の説明から明らかになるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 9 】

【 図 1 】 本発明に係る装置の特定の実施形態の図解を示す透視図である。

【 図 2 A 】 親水性の反応領域の第一の変形を伴う、本発明に係る装置の疎水性の多孔質膜及び吸収性膜を示す図である。

【 図 2 B 】 親水性の反応領域の第二の変形を伴う、本発明に係る装置の疎水性多孔質膜を示す図である。

【 図 3 A 】 図 2 A に示された変形に対応する、疎水性の多孔質膜を伴う、本発明に係る装置の断面図である。

【 図 3 B 】 図 2 B に示された変形に対応する、疎水性の多孔質膜を伴う、本発明に係る装置の断面図である。

【 図 4 A 】 図 2 A に示された疎水性の多孔質膜の反応領域及び下方の吸収性膜の一部上の、本発明に係る装置を使用した後に得られる結果を示す図である。

【 図 4 B 】 図 2 B に示された疎水性の多孔質膜の反応領域上の、本発明に係る装置の使用後に得られた結果を示す図である。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 0 】

本発明に係る装置 10 は、血液またはその成分の 1 つの試料から、赤血球の表現型の抗原と、特にこの抗原に対する抗体との少なくとも一つの反応を検出するためのインビトロ診断装置である。

【 0 0 3 1 】

これは、特にインビトロの免疫血液学的な診断に適応された、毛管現象を介したインビトロ診断用の装置である。

【 0 0 3 2 】

赤血球の表現型の抗原、または赤血球の型 (g r o u p) の抗原、または血液型の抗原は、それに対する抗体の生成を引き起こすことができ、及び / または認識し、その後免疫システムによる赤血球の破壊を可能にすることが必要な、赤血球の表面に存在する全ての免疫原性の分子を意味する。

【 0 0 3 3 】

赤血球の表現型の抗原と、特にこの抗原に対する抗体との反応は、抗原 - 抗体反応であり、本明細書を通して呼ばれる。

【 0 0 3 4 】

血液またはその成分の 1 つの試料とは、完全な血液または、特に赤血球片、白血球片、血漿、若しくは血清から選択される成分の一つを意味する。

【 0 0 3 5 】

図 1 に示される通り、本発明に係る装置 10 は：

- 支持 12、及び
- 試験される試料を受けるように意図される親水性の反応領域 16 を少なくとも 1 つ備

10

20

30

40

50

える疎水性の多孔質膜 14、を備える。

【0036】

多孔質膜 14 は 0.05 mm から 1.5 mm の厚さを有し、好ましくは 0.1 mm から 1 mm であり、更により好ましくは 0.4 mm から 0.8 mm である。

【0037】

孔の直径は 2 から 30 μm であり、好ましくは 7 から 12 μm である。

【0038】

疎水性の多孔質膜 14 は、水性溶媒によって変化しない任意の材料を含み得る。この材料は、例えばニトロセルロースポリマー、セルロース等の、化学的に変更されているか、変更されていない天然高分子、または例えばポリエチレン、高密度ポリエチレン (HDP E)、若しくは P V D F 等のフッ素化ポリマー等の合成高分子から特に選択され得る。この材料は最初に疎水性でなければならず、適切な処理によって疎水性にされる。これらのポリマーは後に使用される捕捉剤とリンクを形成可能な試薬グループ (r e a g e n t g r o u p) で官能化されてもされなくてもよい。

10

【0039】

疎水性の多孔質膜 14 は少なくとも一つの親水性の反応領域 16 を備える。反応領域 16 は、疎水性の多孔質膜 14 の表面よりも小さな表面を有する、つまり膜 14 は完全には親水化されない。

【0040】

多孔質膜 14 の親水性の反応領域 16 は、好ましくは、先行する疎水性の多孔質膜 14 の化学的または物理的な処理によって多孔質基板の化学的機能を変更することなく、局所的な洗剤の添加によって親水性にされる。

20

【0041】

洗剤とは任意の親水化剤を意味し、つまり、疎水性の膜 14 を親水性にすることが可能な任意の物質を意味する。

【0042】

使用される洗剤は、天然洗剤、化学的に変更された、若しくは化学合成によって得られた天然洗剤から選択され得る。好ましくは、これは非イオン性の界面活性剤であり、例えば Triton X - 100、Tween 20 または saponin である。

【0043】

洗剤は水溶液またはエタノールなどの有機溶剤で 0.01 から 5% まで希釈され得る。好ましくは、膜 14 を局所的に親水性にするために使用される洗剤は 0.01 から 2% (重量 / 体積) のドーズ (d o s e) で使用される。

30

【0044】

膜の他の特性 (特に空隙率と厚さ) に関連する、使用される洗剤の量は、膜を通過する流体の動作速度を制御する。捕捉要素を受けよう意図される膜を親水性にするために、Triton X - 100 に関しては 0.1%、Tween については 0.05% の最大ドーズを超える必要はないことが一般的に認められる。しかし、本発明に係る膜 14 の特定の特性のために、この膜を局所的に親水性にすることが可能な洗剤は、領域の反応性を妨害することなく、特に Triton X - 100 または Tween - 20 については、2% まで使用することができ、これによって膜 14 の親水化が容易になる。

40

【0045】

同じ疎水性の膜 14 は、親水性の反応領域が交わらないという条件で、いくつかの親水性の反応領域 16 を備えることができる。

【0046】

反応領域 16 はいかなる幾何学的な形態でもよいが、直径 0.3 mm から 20 mm 円形の円形またはスポットの形態が好ましい。

【0047】

反応領域 16 は多孔質膜 14 の厚さ全体及び / または表面で親水性であり得る。

【0048】

50

図2 A、3 A、及び4 Aに示されるように、反応領域16は単一の親水化度を有し得る。この構成は分析される試料中の抗体の特定の存在の検出に特に適合される。

【0049】

変形によれば、反応領域16は異なる親水化度を有するいくつかの領域を備え得る。

【0050】

図2 B、3 B及び4 Bに示される通り、反応領域16は二つの親水性の領域16-1、16-2を有し得り、周辺の16-2よりも反応領域の中央16-1で親水化度が大きい。これらの親水性の領域は膜14の表面のみであることが好ましい。

【0051】

反応領域16は異なる親水化度を有し、一方は表面に、他方は厚さに、二つの親水性の領域を備えることもできる。

10

【0052】

反応領域16が二つの親水性の領域を備える場合、反応領域16は、先行する多孔質膜の化学的または物理的な処理によって多孔質基板の化学的な機能を変更することなく、二つの異なる洗剤で親水化される。

【0053】

有利に、図2 B、3 B及び4 Bで示されるように、特に表面で、異なる親水化を有する二つの領域を有する反応領域16の構成は、特に二重分布(double population)と呼ばれる現象である、一方は陽性であり、他方は陰性である二つの分布の任意の共存を区別するという、輸血の専門家の特定の関心事に応える。この構成は特に試験

20

【0054】

多孔質膜14の親水性の領域16は捕捉剤を含み得る。捕捉剤は膜14に吸収され、または共有結合的に結合される。

【0055】

捕捉剤は、単独または表出剤と複合された、試験される試料中に含まれる関連する分析物を保持可能な、領域16上に固定された任意の化学的または生物学的な要素を意味する。

【0056】

試験される試料中の特定の抗体の存在を同定することが目的の時は、これらの捕捉剤は特定の赤血球の表現型の抗原を備える。それらは断片の精製された、若しくは精製されない抗原、または抗原、ポイドセルを運ぶ、若しくは抗原を運ばないセルの膜、または合成によって得られる組換え蛋白質若しくは組替抗原でもよい。好ましくは、捕捉剤は抗原を運ぶ、ヘモグロビンを欠いた赤血球である。

30

【0057】

試験される試料中の特定の抗原の存在を同定することが目的の際は、捕捉剤は抗体である。

【0058】

捕捉剤は、反応領域16上に存在する時、反応領域16を区切るために、膜14を親水化する役割の洗剤と同時に堆積されてもよく、親水化の後で洗剤とは独立に堆積されてもよい。

40

【0059】

捕捉剤は、pH4からpH10、好ましくはpH6.5からpH7.8、より一層好ましくはpH7からpH7.5で安定化されたpH溶液を含む非変性バッファ中で、反応領域16上に堆積され得る。捕捉剤は吸収されても、共有結合的に結合されてもよい。

【0060】

捕捉剤は、アジ化ナトリウム、抗生物質等の微生物学的な安定性を維持することを意図された補助剤、砂糖(スクロース、ブドウ糖、トレハロース)等の立体配座安定性を意図された補助剤、同様にこれらの機能を実施するために当業者に知られた任意の他の作用剤に添加され得る。

【0061】

50

捕捉剤は領域 16 の全体に、または一部にだけ存在することができる。

【0062】

洗剤及び/または捕捉剤は、ロボットのまたは手動のピペッタで堆積可能な溶液の形態が好ましい。有利に、これらの溶液は、毛管現象によって好ましい体積を保持する針を用いて簡単に堆積することもできる。これらの針は任意の材料で作ることが可能だが、より好ましくは金属製であり、疎水コートの有するか、有さない。それらの末端は平坦であるか、所定の大きさの切り目を有することができる。

【0063】

洗剤及び/または捕捉剤溶液の堆積の後に、膜の乾燥が続かねばならず、乾燥の期間は適用される温度に依存する：室温では少なくとも4時間、37℃では少なくとも1時間である。

10

【0064】

本発明に係る装置は、吸収性膜18を多孔質膜14の下に備えることができる。この膜18は、特に反応領域16が膜14の厚さ全体にわたって親水性である時に、膜14によって保持されない、反応領域16の位置に堆積された液体を吸収する。

【0065】

膜18は、吸収紙、セルロース等、毛管現象によって受動的な吸収を可能にする材料を含むか、吸収性ポリマーからなり得る。例示として、以下の製品が挙げられる：

- ・ Millipore C048、C068、C083、C248
- ・ Whatman CF3、CF4、CF10、Grade 470、CF5、CF6、CF7、Grade 900、Grade 300
- ・ Ahlstrom Grades 601、642、631、238、237、222、243、320
- ・ Pall Grades 111、113、133、165、197、8975、8964、8301、Accuwik (登録商標) Ultra
- ・ Cleanis Gelmax 超吸収性パッド
- ・ 綿

20

【0066】

吸収性膜18の組成及び寸法は、試験中に使用される全溶液を吸収可能なように選択されねばならない(μl での V_{total})。各膜は吸収容量($\mu\text{l}/\text{cm}^2$ での C)によって特徴づけられ、膜及びその寸法(cm^2 での D)は以下の式を満たすように選択される：

30

$$D > V_{total} / C$$

【0067】

代替的に、液体は膜上の領域と膜下の領域との圧力差によって吸収され得る。例えば部分的な真空を伴う吸引システムの使用である。

【0068】

膜14及び選択的に膜18は支持12内に配される。

【0069】

本発明に係る装置10の支持12は好ましくは硬質の(rigid)支持である。それは例えばシェルであり得る。

40

【0070】

好ましくは、支持は液体を逃がさない硬質の材料を含む。これは特にポリプロピレン、ポリエチレン、ポリスチレン、アクリロニトリルブタジエンスチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリアミド、ポリ塩化ビニル、ポリメタクリル酸メチル等のプラスチック材料であり得る。

【0071】

好ましくは、支持12は少なくとも一つの開口部20を備え、各開口部20は、多孔質膜14の各親水性の反応領域16に直角である。この開口部20は親水性の反応領域16上に堆積された試料の収集領域に対応する。この親水性の領域16は、二つの親水性の領

50

域が常に膜 1 4 上の疎水性の領域によって分けられているならば、開口部の基底部と同一の、より小さな、またはより大きな寸法でよい。

【 0 0 7 2 】

開口部 2 0 は、必要であれば、下方の信号を見るために、透明なエッジを有してもよい。

【 0 0 7 3 】

収集領域は、反応膜 1 6 上に堆積される、試験される試料の最大体積を少なくとも含むことができるような寸法でなければならない。

【 0 0 7 4 】

各反応領域 1 6 の独立は反応領域間の疎水性の膜によって構成されるバリアによって得られる。この独立は単一の膜を備える同一の装置上でいくつかの異なる診断を実行する。変形によると、この独立は、支持 1 2 を、仕切りによって分けられた、それぞれが独自の膜を有する物理的に独立したユニットに分割することによって選択的に実施されてもよい。

10

【 0 0 7 5 】

さらに、開口部 2 0 の周り、開口部の底、前記開口部 2 0 の開口部の反対側のドームの過剰な厚さをつくることによって、膜 1 4 及び 1 8 間の接触を改善することができる。

【 0 0 7 6 】

支持 1 2 は標準的な S B S / A I N S I と外部寸法で適合する寸法を有する、いくつかの開口部 2 0 を有するシェルであり得る。

20

【 0 0 7 7 】

本発明に係る装置 1 0 は、毛管現象によって、特に血液またはその成分の一つである生物学的な流体中の分析物の存在または不存在を決定するのに使用され得る。この分析物は、赤血球の表現型の抗原またはこの抗原に対する抗体であり得る。

【 0 0 7 8 】

装置 1 0 は特に以下のために利用される：

- 赤血球を表現型検査する、つまり、それらの表面の抗原を決定すること。
- アンチ A またはアンチ B 抗体の存在を同定するシモン (S i m o n i n) 試験。
- 特にアロ抗体、自己抗体、またはさらに寒冷凝集素の探索の点から赤血球の、細胞性抗原に対する抗体の探索または同定。

30

【 0 0 7 9 】

具体的に、従って本発明の目的は、血液またはその成分の一つの試料から、A B O 血液型の同定及び決定、拡張 R h e s u s 表現型検査、異常な凝集素の探索、自己抗体の探索、寒冷凝集素の探索、及び / またはクロス検証のための装置 1 0 の使用である。

【 0 0 8 0 】

本発明に係る装置 1 0 の使用は表出剤の使用を必要とする。好ましくは、これは赤血球である。これらの赤血球は：

- 抗体を探索するための装置の使用、またはシモン試験のための、赤血球試験と呼ばれる既知の表現型の赤血球
- 表現型検査用の装置の使用のために試験される試料中に含まれる赤血球、である。

40

【 0 0 8 1 】

試験される試料中の存在を検出することが目的である分析物の関数として、捕捉剤の性質、表出剤の性質、親水化方法 (単一または複数、厚さ中または表面) 、及び追跡の実験計画の全ては変わる必要がある。

【 0 0 8 2 】

全ての場合において、反応領域上で試験される試料の堆積に先行して、バッファ液によって反応領域 1 6 の水和を進めることができる。このバッファは p H 6 から p H 8 . 5 、好ましくは p H 6 . 5 から p H 7 . 8 、特に p H 7 から p H 7 . 5 の安定化された p H の溶液を含み得り、2 5 0 m O s m から 8 0 0 m O s m 、好ましくは 3 0 0 m O s m から 6 0 0 m O s m のモル浸透圧濃度を有し得る。この溶液は、選択的に、低濃度の洗剤 (0 .

50

0.1 から 0.05 % m / v の Tween 20)、飽和剤 (BSA)、及び / または抗原 - 抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。

【0083】

同様に、結果を読むためには、バッファのすすぎを用いる必要がある。好ましくは、このバッファの洗浄は、pH が 2 から 10、好ましくは 5 から 9 の、PBS、TBS、または食塩水を含む。バッファのモル浸透圧濃度は、赤血球の溶血を避けるために制御されなければならない。バッファは、捕捉剤に直接的にまたは間接的に固定された表出剤または着色された分析物を引き離さないように選択されなければならない。驚くべきことに、本発明に係る装置の使用のために、NaCl 等の塩類溶液作用因子、または例えばグリシンまたはタウリン等の非イオン性のオスモライトの存在によって得られる少し高浸透圧の洗浄液 (つまり 300 mOsm から 800 mOsm) を使用することが好ましい。このバッファは表出剤の色と対照的な色で着色され得る。例えば、表出剤が赤血球の場合、洗浄バッファ液は青または緑に着色され得る。バックグラウンドノイズを消すために洗浄液に少量の界面活性剤を添加することもできる。これらの界面活性剤は、好ましくは非イオン性の表面活性剤であり、特に糖のエステル、とりわけソルビタンのポリオキシエチレンエステル (Tween) である。

10

【0084】

装置 10 の使用中、液体はとりわけピペッタシステムまたは毛管現象の複製システムによって堆積され得る。

【0085】

20

有利に、本発明に係る装置は遠心分離も、攪拌も、真空引きも、特別な装置も必要としない。またそれは手動で完全に自律的に使用され得、ロボット上で簡単に自動化され得る。膜 14 の異なる特性は動作速度を制御し、膜 14 の穴のサイズが如何に大きくても、抗原 - 抗体反応を可能とするのに十分な長さの動作時間を生成する。

【0086】

第一の変形によれば、本発明の目的は、赤血球の表現型検査のための装置 10 の使用である。

【0087】

目的は赤血球の表面の抗原を探索することである。この場合、抗体または抗体の混合物が捕捉剤として使用され、具体的に問題の抗原または抗原の変形を認識することができる。抗体は、精製または半精製された単一クローンの (monoclonal) 抗体、単一クローンの抗体を含む培養表面活性剤 (culture surfactant) (表 1 参照)、または多クローンの抗体、抗血清であり得る。凝集素またはレクチンも使用され得る。

30

【0088】

単一クローンの抗体の非網羅的なライブラリは以下である：

【0089】

【表1】

表1:小球の表現型検査に利用可能な捕捉の抗体の非網羅的なリスト

好ましい抗原	捕捉要素	参照クローンの例	表出要素
A	Ac Anti-A	BIRMA-1,	試料の赤血球
B	Ac Anti-B	LB-2及び/またはES-4	試料の赤血球
AB	Ac Anti-AB	ES-4及び/またはES-15及び/ またはBH517	試料の赤血球
D (RH1)	Ac Anti-D	RUM-1及び/またはMS-201及び/ またはMAD-2及び/または TH-28及び/またはMS-26	試料の赤血球
C (RH2)	Ac Anti-C	MS-273またはMS-24	試料の赤血球
c (RH4)	Ac Anti-c	MS-33	試料の赤血球
E (RH3)	Ac Anti-E	MS-258, MS-80	試料の赤血球
e (RH5)	Ac Anti-e	MS-16, MS-21, MS-63	試料の赤血球
K	Ac Anti-K	MS-56	試料の赤血球
Fya (FY1)	Ac Anti-Fya	P3TIM	試料の赤血球
Fyb (FY2)	Ac Anti-Fyb		試料の赤血球
Jka (JK1)	Ac Anti-Jka	MS-15	試料の赤血球
Jkb (JK2)	Ac Anti-Jkb	MS-8	試料の赤血球
S (MNS3)	Ac Anti-S	MS-94	試料の赤血球
s (MNS4)	Ac Anti-s	P3BER L	試料の赤血球
Lea (LE1)	Ac Anti-Lea	LM112/161	試料の赤血球
Leb (LE2)	Ac Anti-Leb	LM129/181	試料の赤血球
M (MNS1)	Ac Anti-M	M110/140	試料の赤血球
N (MNS2)	Ac Anti-N		試料の赤血球
P1	Ac Anti-P1	P3MON23	試料の赤血球
Kpa (KEL3)	Ac Anti-Kpa		試料の赤血球
Lua (LU1)	Ac Anti-Lua		試料の赤血球
Lub (LU2)	Ac Anti-Lub		試料の赤血球
k, cellano(KEL 2)	Ac Anti-k		試料の赤血球
Kpb (KEL4)	Ac Anti-Kpb		試料の赤血球
Cw	Ac Anti-Cw		試料の赤血球

10

20

30

【0090】

特定の実施形態によると、本発明の目的は、陽性の表現型の分布と陰性の表現型の分布（二重分布）とを同時に検出するために、赤血球（純粋な赤血球または完全な血液）の試料から赤血球の血液型を表現型検査するプロセスであり、以下のステップを備える：

【0091】

- 本発明に係る装置10の反応領域の中央で多孔質膜14を水和するために溶液を堆積するステップ。前記反応領域16は二つの親水性の領域16-1、16-2を備え、周辺の16-2よりも反応領域の中央16-1で親水化度が大きく、中央で抗体を含む捕捉剤を備え；膜の水和のための溶液は免疫血液学的反応に望ましいと知られる溶液であり、選択的に、例えばpH6からpH8.5、好ましくはpH6.5からpH7.8、特にpH7からpH7.5のpHで安定化され、250mOsmから800mOsm、好ましくは

40

50

300 mOsmから600 mOsmのモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファなどの添加物を含む。この溶液は、選択的に、低濃度の洗剤（特に0.01から0.05 % m/vのTween 20）、飽和剤（例えばBSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。このバッファは選択的にプロテアーゼ活性を有し得、例えばパパインまたはプロメラインなどの酵素を添加することによって得られ得る。このバッファは選択的に、反応の可能性を持たせ、小球と捕捉要素とのより長い接触を維持するために、ポリブレンまたはポリリジン等のポリカチオン性の作用物質を含み得る；

- バッファ液中で、特に、選択的に、例えばpH6からpH8.5、好ましくはpH6.5からpH7.8、特にpH7からpH7.5のpHで安定化され、250 mOsmから800 mOsm、好ましくは300 mOsmから600 mOsmのモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファなどの添加物を含む、免疫血液学的反応に望ましいと知られているバッファ液中で、表現型検査される赤血球を希釈するステップ。この溶液は、選択的に、低濃度の洗剤（特に0.01から0.05 % m/vのTween 20）、飽和剤（例えばBSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。このバッファは選択的にプロテアーゼ活性を有し得、例えばパパインまたはプロメラインなどの酵素を添加することによって得られ得る。このバッファは選択的に、反応の可能性を持たせ、赤血球の捕捉要素とのより長時間の接触を維持するために、ポリブレンまたはポリリジン等のポリカチオン性の作用物質を含み得る；

- 表現型検査される赤血球を含むこの溶液を反応領域の中央16-1に加えるステップ；

- 好ましくは15 から40、特に18 から25 の温度で、60秒から15分、特に2分から10分の間、保温（incubate）するステップ；

- 反応領域上にリンス液を堆積するステップ；リンス液は抗原-抗体反応に対して有害ではないと知られている溶液であり、赤血球の健全性を維持し、非特異的な相互作用を緩めることができ、例えばpH6からpH8.5、好ましくはpH6.5からpH7.8、特にpH7からpH7.5のpHで安定化され、250 mOsmから800 mOsm、好ましくは300 mOsmから600 mOsmのモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファ等である。この溶液は、選択的に、低濃度の洗剤（特に0.01から0.05 % m/vのTween 20）、飽和剤（例えばBSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。ポリカチオン性の作用物質の先行する使用の場合、このバッファは、例えばこのタイプの添加物によって生じる非特異的な相互作用を緩めることが可能なように100 mMより多いNaClを含むなど、強イオン性であろう。

【0092】

堆積される試料は、赤血球または完全な血液でよい。試料は、pH6からpH8.5、好ましくはpH6.5からpH7.8、特にpH7からpH7.5のpHで安定化され、250 mOsmから800 mOsm、好ましくは300 mOsmから600 mOsmのモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファ中で希釈され得る。この溶液は、選択的に、低濃度の洗剤（特に0.01から0.05 % m/vのTween 20）、飽和剤（例えばBSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。このバッファは選択的に、例えばパパインまたはプロメラインなどの酵素の添加によって得られるプロテアーゼ活性を有し得る。

【0093】

このプロセスを実行するために用いられる装置10の膜14の反応領域16の親水化は、好ましくは表面親水化である。

【0094】

親水化は例えば、0.1 % m/vから1 % m/v、好ましくは0.2 % m/vから1 % m/vの濃度の、2 μ lから40 μ l、好ましくは5 μ lから20 μ lの体積の、エタノール中のTween 20溶液を用いて実行され得り、親水化領域は、その中央に、0.1 % m/vから2 % m/v、好ましくは0.5 % m/vから1 % m/vの濃度、25 n1

10

20

30

40

50

から15 μ l、好ましくは100nlから10 μ lの体積のTriton X100の水溶液を用いて、厚さ中に作られる。

【0095】

試料中に存在する赤血球が捕捉要素によって認識された抗原を予期した場合、赤血球は洗浄にもかかわらず膜14の反応領域16の中央に固定化されたままであり、中央反応領域16-1は赤を維持する。試料中に存在する赤血球が捕捉要素によって認識される抗原を運ばない場合、赤血球は洗浄によって洗い流される：中央領域16-1は白のままであり、周辺領域16-2で赤いリングが形成する。試料が二つの異なる分布を有する場合、中央の赤22-1及び赤い周辺リング22-2の両方が観測される。

【0096】

結果を読むのは視覚的でも自動でも可能である。

【0097】

他の特定の実施形態によると本発明の目的は、二重分布の検出を許さず、赤血球（精製された赤血球または完全な血液）の試料から、赤血球の血液型を表現型検査するためのプロセスであり、以下のステップを含む：

- 本発明に係る装置10の反応領域の中央で多孔質膜14を水和するために溶液を堆積するステップ。上記反応領域16は単一の親水性の領域を備え、抗体を含む捕捉剤を含み、膜の親水化のための溶液は、選択的に、例えばpH6からpH8.5、好ましくはpH6.5からpH7.8、特にpH7からpH7.5のpHで安定化され、250mOsmから800mOsm、好ましくは300mOsmから600mOsmのモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファ等の添加物を含む、免疫血液学的反応に望ましいと知られている溶液である。この溶液は選択的に低濃度の洗剤（特に0.01から0.05% m/vのTween 20）、飽和剤（例えばBSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。このバッファは選択的にプロテアーゼ活性を有し得、例えばパインまたはプロメラインなどの酵素を添加することによって得られ得る。このバッファは選択的に、反応の可能性を持たせ、赤血球の捕捉要素とのより長時間の接触を維持するために、ポリブレンまたはポリリジン等のポリカチオン性の作用物質を含み得る。

- 選択的に、バッファ液中で、特に、選択的に、例えばpH6からpH8.5、好ましくはpH6.5からpH7.8、特にpH7からpH7.5のpHで安定化され、250mOsmから800mOsm、好ましくは300mOsmから600mOsmのモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファなどの添加物を含む、免疫血液学的反応に望ましいと知られているバッファ液中で、表現型検査される赤血球を希釈するステップ。この溶液は選択的に低濃度の洗剤（特に0.01から0.05% m/vのTween 20）、飽和剤（例えばBSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。このバッファは選択的にプロテアーゼ活性を有し得、例えばパインまたはプロメラインなどの酵素を添加することによって得られる。このバッファは選択的に、反応の可能性を持たせ、赤血球の捕捉要素とのより長時間の接触を維持するために、ポリブレンまたはポリリジン等のポリカチオン性の作用物質を含み得る。

- 表現型検査される赤血球を含むこの溶液を反応領域の中央に添加するステップ。

- 好ましくは15 から40、特に18 から25 の温度で、2秒から15分、特に1分から10分の間、保温するステップ。

- 抗原-抗体反応に有害ではないと知られている溶液であり、赤血球の保全性を維持し、非特異的な相互作用を緩めることができ、例えばpH6からpH8.5、好ましくはpH6.5からpH7.8、好ましくはpH7からpH7.5のpHで安定化され、250mOsmから800mOsm、好ましくは300mOsmから600mOsmのモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファ等のリンス液を反応領域上に堆積するステップ。この溶液は選択的に低濃度の洗剤（特に0.01から0.05% m/vのTween 20）、飽和剤（例えばBSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。ポリカチオン性の作用物質の先行する使用の場合、このバッファは、例

10

20

30

40

50

えばこのタイプの添加物によって生じる非特異的な相互作用を緩めることが可能なように 100 mM より多い NaCl を含むなど、強イオン性であろう。

【0098】

このプロセスを実行するために使用される装置 10 の膜 14 の反応領域 16 の親水化は、厚み親水化であり得る。装置 10 は、膜 14 の下方に、例えば吸収性膜 18 などの吸収システムを備えることも必要である。

【0099】

親水化は、0.1% m/v から 2% m/v、好ましくは 0.5% m/v から 1% m/v の濃度、25 nL から 15 μ L、好ましくは 100 nL から 10 μ L の体積の Triton X100 の水溶液を用いて実施され得る。

10

【0100】

試料中に存在する赤血球が捕捉要素によって認識される抗原を運ぶ場合、赤血球は、洗浄にもかかわらず膜 14 の反応領域 16 の中央 22 に固定化されたままであり、反応領域 16 は赤いままである。試料中に存在する赤血球が、捕捉要素によって認識される抗原を運ばない場合、赤血球は洗浄によって洗い流され、反応領域 16 は白を維持する。吸収性膜 18 は膜 14 に固定されない全てを吸収する（領域 24）。

【0101】

結果を読むのは視覚的でも自動でも可能である。

【0102】

第二の変形によると、本発明の目的は血液中の多価抗体を検出するための、またはシモン試験のための装置 10 の使用である。

20

【0103】

目的は特定の抗体の探索である。従って捕捉要素は好ましい抗体を対象とする抗原を含む。

【0104】

固定化された抗原は、ポリマーまたは蛋白質構造に結合する、または結合しない合成抗原であり得る。これらは抗原または好ましい変形の抗原の混合の一つ以上のシークエンスを含む組換え蛋白質でもあり得る。固定化された抗原は、セルまたはセルの断片、特に、膜状の断片または細胞内容を欠いたセルの上でもあり得る。これらのセルは特に、「ゴースト (ghost)」とも呼ばれる、細胞質を欠いた赤血球であり得る。

30

【0105】

試料が問題の抗原に対する抗体を有する場合、抗体は反応領域 16 の位置で膜 14 の表面に捕捉されたままであろう。

【0106】

これらの抗体の存在を明らかにするためには、それらの抗体の性質を認識することによって (anti-IgG、anti-IgM)、または、使用される抗体が多価 (いくつかの抗原を同時に検出可能) である場合には、問題の抗原も運んでいる表出要素も利用され得る、表出要素を使用する必要がある。

【0107】

【表 2】

40

表 2: 免疫血液学の分野における抗体の探索例

好ましい抗原	捕捉要素	表出要素
IgM Anti-A	ゴースト A	赤血球試験 A1
IgM Anti-B	ゴースト B	赤血球試験 B

【0108】

従って本発明の別の目的は、血漿、血清、または完全の血液の試料から、血液中に存在する多価抗体の検出用のプロセスであり、以下のステップを備える：

50

- 試験される試料を装置 10 の反応領域 16 上に堆積するステップであって、上記反応領域 16 が抗原を含む捕捉剤を含むステップ、

- 捕捉剤と同じ抗原を備える、既知の表現型の赤血球試験を添加するステップ、

- 混合物を親水性の領域を透過させるステップであって、上記親水性の領域が 1 分から 45 分、好ましくは 3 分から 15 分の通過時間を可能にする特性を有するステップ、

- 例えば pH 6 から pH 8.5、好ましくは pH 6.5 から pH 7.8、特に pH 7 から pH 7.5 の pH で安定化され、250 mOsm から 800 mOsm、好ましくは 300 mOsm から 600 mOsm のモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファ等のリン溶液を反応領域上に堆積するステップ。この溶液は選択的に低濃度の洗剤（特に 0.01 から 0.05 % m/v の Tween 20）、飽和剤（例えば BSA）を含み得る。

10

【0109】

堆積される試料は、pH 6 から pH 8.5、好ましくは pH 6.5 から pH 7.8、特に pH 7 から pH 7.5 の pH で安定化され、250 mOsm から 800 mOsm、好ましくは 300 mOsm から 600 mOsm のモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファ中で希釈された、又は希釈されていない、血漿、血清、または完全の血液であり得る。この溶液は選択的に低濃度の洗剤（例えば 0.01 から 0.05 % m/v の Tween 20）、飽和剤（例えば BSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。このバッファは、好ましくは NaCl の 100 mM 未満の塩分濃度である。

【0110】

このプロセスを実行するために使用される装置 10 の膜 14 の反応領域 16 の親水化は、好ましくは厚さで実行される。従って、装置 10 は、膜 14 の下方の吸収システム、例えば吸収性膜 18、も備える必要がある。

20

【0111】

親水化は 0.3 % m/v から 2 % m/v、好ましくは 0.5 % m/v から 1 % m/v の濃度、25 nL から 15 μ L、好ましくは 100 nL から 10 μ L の体積の Triton X 100 の水溶液を用いて実施され得る。捕捉剤は、洗剤と混合されて、または反応領域 16 の親水化後に、膜上に堆積され得る。

【0112】

試験される血漿が、捕捉剤中及び表出剤（赤血球試験）中に存在する抗原に対する抗体を含む場合、反応領域 16 に赤い中央 22 が現れる。白い中央は、試験される血漿中に、捕捉剤中及び表出剤（赤血球試験）中の両方に存在する抗原に対する抗体が存在しないことを知らせる。吸収性膜 18 は、膜 14 に固定されていない全てを吸収する（領域 24）。

30

【0113】

結果を読むのは視覚的でも自動でも可能である。

【0114】

第三の変形によると、本発明の目的は、血中の異常な凝集素を探索するための装置 10 の使用である。

【0115】

目的は、試料の血漿抗体によって、または後続の補足の活性化によって感作された赤血球の存在を同定することである。

40

【0116】

この形式では、捕捉剤が存在しないか、後者はポリカチオン性のポリマー等の凝集剤である。

【0117】

血漿とともに赤血球パネル試験を保温した後、混合物に赤血球を可逆的に凝集させることが可能な作用物質を添加する。この可逆的凝集剤は、例えばポリブレン、ポリリジンまたはポリエチレンイミン (polyethyleneimine) 等のポリカチオン性のポリマーから選択され得る。形成される凝集体の寸法は膜を介してそれらを通すには大

50

きすぎるので、赤血球は保持されたままであり、小球のボタンを形成する。小球は、ボタンの不安定化を避けるために、やはり凝集剤を含む溶液を用いて、非特異的なグロブリンの過剰量で洗浄される。これらの保持された小球の洗浄後、後者が感作されている場合、ボタンのセルの細網化を実行するために、多価クームス試薬が添加される。低ドーズの界面活性剤を含む食塩水バッファの添加は感作されていないセルの凝集をほどこき、網状の感作細胞の凝集を維持する。

【 0 1 1 8 】

【表 3】

表3:異常な凝集素の探索に利用可能な抗体の非網羅的なリスト

好ましい分析物	細網化剤	参照クローン	
赤血球試験上の IgG human	Anti-IgG, protein A, protein G.	MS-278, Protein A, G, A/G	赤血球試験
赤血球試験上の IgM human	Anti-IgM		赤血球試験
赤血球試験上の C3d human	Anti-C3d	BRIC-8	赤血球試験

10

【 0 1 1 9 】

これらのプロセスを実行するために、このプロセスを実行するために使用される装置 10 の膜 14 の反応領域 16 の親水化が好ましくは厚さで実行される。従って装置 10 は膜 14 の下方の吸収システム、例えば吸収性膜 18、も備える必要がある。

20

【 0 1 2 0 】

親水化は 0.3% m/v から 2% m/v、好ましくは 0.5% m/v から 1% m/v の濃度、25 n l から 15 μ l、好ましくは 100 n l から 10 μ l の体積の Triton X 100 の水溶液を用いて実施され得る。有利に可逆的な凝集剤が添加され得、好ましくは例えばポリブレン、ポリリジンまたはポリエチレンイミン (polyethyleneimine) 等のポリカチオン性のポリマーから選択され得る。

【 0 1 2 1 】

この第 3 の変形によると、従って、本発明の別の目的は、血漿、血清、または完全の血液の試料から、血中に存在する抗赤血球抗体の検出、クロス検証、または自己抗体若しくは寒冷凝集素の探索のためのプロセスであり、以下のステップを備えることを特徴とする：

30

- アロ抗体の探索のために、試験される試料を、バッファ、既知の表現型の赤血球試験、及び赤血球を凝集することが可能な作用物質とともに、15 から 40 °C、好ましくは約 37 °C の温度で、3分から60分、好ましくは5分から30分の間、予め保温するステップ。バッファは、L I S S バッファ (例えば 50 m M より少ない NaCl を含む) 等の低イオン力のバッファである。自己抗体の探索のためには、予め保温しない試料の赤血球を含む試料を単に用いる。

40

- この混合物に小球を凝集させることが可能な作用物質、例えばヘキサジメトリンプロマイドの溶液を添加するステップ。

- 好ましくは 15 秒から 5 分の期間の後、本発明に係る装置 10 の反応領域 16 上に混合物を堆積し、それを流すステップ；それはスポットの上にセルのボタンを形成する。

【 0 1 2 2 】

反応領域上に、赤血球を凝集させることが可能な作用物質を含む溶液を堆積するステップであって、赤血球を凝集させることができる作用物質は、例えばヘキサジメトリンプロマイドの溶液であってよく、好ましくは溶液中のヘキサジメトリンプロマイドの濃度が 0.01 から 2% (m/v) であり、更により好ましくは 0.05 から 0.5% の範囲であるステップ；この作用物質は非特異的な蛋白質の洗浄を実施し、セルのボタンの保全性を

50

維持する。

- クームス、人間の抗グロブリン、または抗補体試薬を反応領域上に堆積するステップ

。 - 例えば pH 6 から pH 8.5、好ましくは pH 6.5 から pH 7.8、好ましくは pH 7 から pH 7.5 の pH で安定化され、300 mOsm から 800 mOsm のモル浸透圧濃度の高調食塩水等のリンス液を反応領域上に堆積するステップ。この溶液は、選択的に低濃度の洗剤（例えば 0.01 から 0.05 % m/v の Tween 20）及び赤と対照的な色（青または緑）の色素を含み得る。

【0123】

堆積される試料は、pH 6 から pH 8.5、好ましくは pH 6.5 から pH 7.8、特に pH 7 から pH 7.5 の pH で安定化され、250 mOsm から 800 mOsm、好ましくは 300 mOsm から 600 mOsm のモル浸透圧濃度の溶液を含むバッファ中で希釈された、又は希釈されていない、血漿、血清、または完全の血液であり得る。この溶液は選択的に低濃度の洗剤（例えば 0.01 から 0.05 % m/v の Tween 20）、飽和剤（特に BSA）、及び/または抗原-抗体反応の可能性を持たせることが可能な作用物質を含み得る。このバッファは、好ましくは NaCl の 50 mM 未満の塩分濃度を有する。

10

【0124】

試験される血漿が表出剤（赤血球試験）中に存在する抗原に対する抗体を含む場合、または試料の赤血球がすでにインビボで感作されている場合、赤い中央 22 が反応領域 16 に現れる。白い中央は表出剤（赤血球試験）中に存在する抗原に対する抗体の不存在、または検出不能な量を知らせる。吸収性膜 18 は膜 14 に固定されていない全てを吸収する（領域 24）。

20

【0125】

結果を読むのは視覚的でも自動でも可能である。

【0126】

本発明に係る装置 10 は、最も頻繁に実施される適切な補完的な試験を組み合わせる範囲に従って、提供され得、同一のカード上で専門家によって同時に提供され得、全ての試験は同様に実施され、解釈される。

【0127】

各カード上で、インラインに配置された、いくつかの試料（ドナーまたは患者）用のカラム内に配置されたいくつかの分析物が検出され得る。これは、例えば、

30

- ABO - D 血液分類、
- Rhesus - Kell 分類、
- 異常な凝集素の探索（3つの赤血球表現型）、
- 異常な凝集素の同定（10の赤血球表現型）、
- 拡張表現型検査、
- 抗グロブリンを伴う直接制御、
- 直接互換性試験、のためのカードであり得る。

【0128】

本発明に係る装置 10 は、やはり上記装置の使用のプロセスの少なくとも一つを実行するのに必要な試薬を備えるキット中に存在し得る。

40

【符号の説明】

【0129】

- 10 診断装置
- 12 支持
- 14 多孔質膜
- 16 反応領域
- 16 - 1 中央
- 16 - 2 周辺

50

- 1 8 吸収性膜
- 2 0 開口部

【 図 1 】

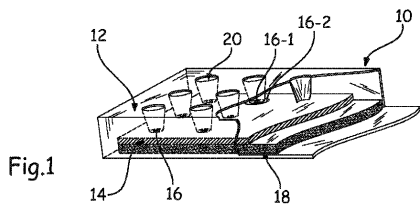


Fig.1

【 図 2 B 】

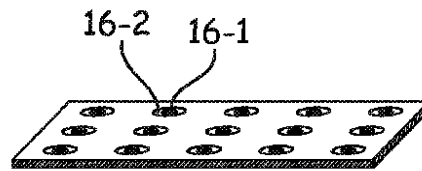


Fig.2B

【 図 2 A 】

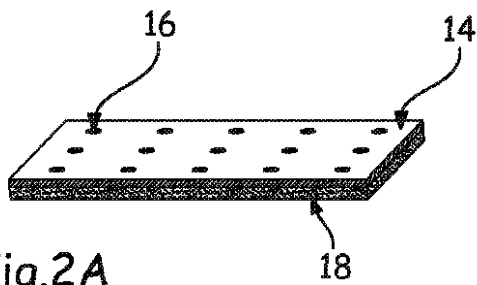


Fig.2A

【 図 3 A 】

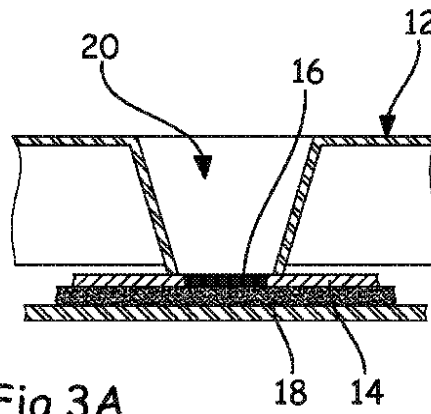


Fig.3A

【図3B】

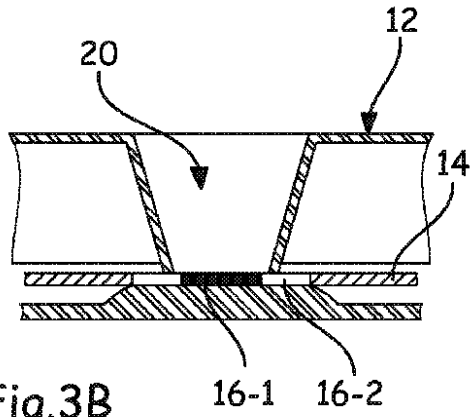


Fig.3B

【図4B】

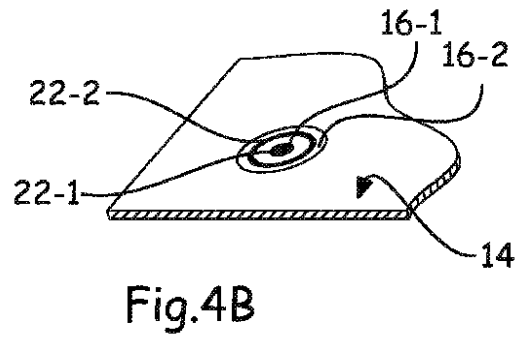


Fig.4B

【図4A】

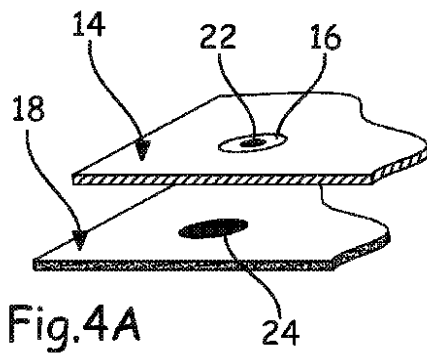


Fig.4A

フロントページの続き

(72)発明者 シルヴァイン・マルゴージェ
フランス・33170・グラディニャン・アレ・デュ・オー・ヴィニョー・26・レジデンス・レ
・クロ・ドゥ・ベルヴェ・アパルトマン・10

(72)発明者 メグミ・リュカ
フランス・33650・マルティヤック・ルート・ドゥ・ラ・ジオルゲール・52

審査官 西浦 昌哉

(56)参考文献 特表2008-520968(JP,A)
特表2004-538488(JP,A)
特開平03-118473(JP,A)
特開平03-137927(JP,A)
特開平09-054091(JP,A)
特開平10-160731(JP,A)
実開昭63-161361(JP,U)
特開平09-257794(JP,A)
特表2009-515179(JP,A)
特開平04-320962(JP,A)
国際公開第2007/064462(WO,A1)
国際公開第2010/056889(WO,A2)
国際公開第1998/020348(WO,A1)
特表2010-515877(JP,A)
特開昭61-152700(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98

C12Q 1/00 - 3/00

专利名称(译)	体外诊断仪器及其用途		
公开(公告)号	JP6339562B2	公开(公告)日	2018-06-06
申请号	JP2015515577	申请日	2013-06-11
[标]申请(专利权)人(译)	乐骋鹿杰弗里斯		
申请(专利权)人(译)	乐骋, Diaje		
当前申请(专利权)人(译)	鹿阵风		
[标]发明人	ナジムシャイビ シルヴァインマルゴリーエ メグミリユカ		
发明人	ナジム・シャイビ シルヴァイン・マルゴリーエ メグミ・リュカ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	B01L3/5023 B01L3/5085 B01L2300/0663 B01L2300/069 B01L2300/0829 B01L2300/161 G01N33/525 G01N33/54386 G01N33/54393 G01N33/6854 G01N33/80 Y10T29/49826 B01L3/00 G01N33/543 G01N2800/22		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.525.W G01N33/543.525.C G01N33/543.525.U G01N33/543.525.G		
代理人(译)	村山彦 安倍晋三龙彦		
优先权	2012055452 2012-06-11 FR		
其他公开文献	JP2015518969A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种体外诊断设备(10),用于检测红细胞表面抗原与特异性针对血液或其组分之一的样品中的所述抗原的至少一种反应。该装置的特征在于它包括:衬底(12);和疏水性多孔膜(14),所述疏水性多孔膜(14)的厚度在0.5mm和1.5mm之间并且孔直径在2和30μm之间,所述膜包含至少一个用于接收样品的亲水性反应区(16)。本发明还涉及所述装置在免疫血液学中的用途。

(19) 日本国特許庁(JP)	(12) 特許公報(B2)	(11) 特許番号 特許第6339562号 (P6339562)
(45) 発行日 平成30年6月6日(2018.6.6)	(24) 登録日 平成30年5月18日(2018.5.18)	
(51) Int. Cl. G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/543 (2006.01)	F I G01N 33/53 K G01N 33/543 525W G01N 33/543 525C G01N 33/543 525U G01N 33/543 525G	請求項の数 22 (全 22 頁)
(21) 出願番号 特願2015-515577(P2015-515577) (86) (22) 出願日 平成25年6月11日(2013.6.11) (65) 公表番号 特表2015-518969(P2015-518969A) (43) 公表日 平成27年7月6日(2015.7.6) (86) 国際出願番号 PCT/FR2013/051358 (87) 国際公開番号 W02013/186482 (87) 国際公開日 平成25年12月19日(2013.12.19) 審査請求日 平成28年6月1日(2016.6.1) (31) 優先権主張番号 1255452 (32) 優先日 平成24年6月11日(2012.6.11) (33) 優先権主張国 フランス(FR)	(73) 特許権者 508135943 ディアガスト D I A G A S T フランス・59120・ロース・アブニュ ー・ウージェヌ・アピネ・ウロザンテ・2 S I (74) 代理人 100108453 弁理士 村山 彦彦 100110364 弁理士 柴田 信哉 (74) 代理人 100133400 弁理士 阿部 進彦 (72) 発明者 ナジム・シャイビ フランス・33140・ヴィルナヴ・ド ルノン・アヴニユ・デ・シアンヌ・6 最終頁に続く	
(54) 【発明の名称】 インビトロ診断装置及びその使用		