

(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2007-524831

(P2007-524831A)

(43) 公表日 平成19年8月30日(2007.8.30)

(51) Int. Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 35/02	(2006.01)	GO 1 N 35/02	A	2 G O 5 8
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53	T	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 22 頁)

(21) 出願番号 特願2006-517648 (P2006-517648)
 (86) (22) 出願日 平成16年6月24日 (2004.6.24)
 (85) 翻訳文提出日 平成18年2月27日 (2006.2.27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2004/020380
 (87) 国際公開番号 W02005/003729
 (87) 国際公開日 平成17年1月13日 (2005.1.13)
 (31) 優先権主張番号 10/602,981
 (32) 優先日 平成15年6月24日 (2003.6.24)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

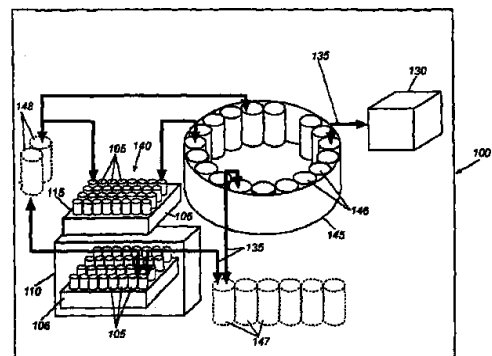
(71) 出願人 504357495
 エモリー ユニバーシティー
 アメリカ合衆国 30322 ジョージア
 州 アトランタ ノース ディケイター
 ビルディング スイート 130 ファースト
 フロアー ノース ディケイター
 ロード 1784 オフィス オブ テク
 ノロジー トランスファー
 (74) 代理人 100079049
 弁理士 中島 淳
 (74) 代理人 100084995
 弁理士 加藤 和詳
 (74) 代理人 100085279
 弁理士 西元 勝一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 免疫学的アッセイシステムおよび方法

(57) 【要約】

アッセイ試料を収容可能な容器、インキュベータ、試料分離システム、画像収集システムおよびピペッタを含む免疫学的または免疫血液学的アッセイシステムを開示する。本免疫学的アッセイシステムは、洗浄器も含み得る。フィルターを含み得る容器に免疫学的アッセイ試料を入れる工程；該容器に検査用試薬を添加する工程；該容器内の試料と試薬との混合物をインキュベートする工程；該容器内の試料と試薬との混合物を、反応した成分と反応していない成分に分ける工程；および該容器を分析して、該試料と試薬との間の相互作用の存在を判定する工程を含む、免疫学的アッセイ方法も開示する。好ましくは、該容器の底は、相互作用をより容易に分析可能とするように、試料の反応済成分をその容器の底一面に均等に広げることを助長する材料のものである。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

アッセイ試料および試薬を収容可能な容器を含むこと、ここで該容器が凹凸のある表面を有する底を含むことを特徴とする、免疫学的アッセイシステム。

【請求項 2】

前記容器を設置可能なインキュベータをさらに含むこと、ここで該インキュベータが、前記アッセイ試料と前記試薬が反応している間、前記容器を収容することを特徴とする、請求項 1 に記載の免疫学的アッセイシステム。

【請求項 3】

前記インキュベータの極めて近くに試料分離システムをさらに含むこと、ここで該試料分離システムが、前記アッセイ試料および前記試薬を様々な成分に分離するように設計されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の免疫学的アッセイシステム。

10

【請求項 4】

前記試料分離システムの極めて近くに画像収集システムをさらに含むこと、ここで該画像収集システムが、前記アッセイ試料および前記試薬中の成分間の相互作用の存在を検出するように設計されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の免疫学的アッセイシステム。

【請求項 5】

前記容器と、前記インキュベータと、前記試料分離システムと前記画像収集システムとの到達距離内にロボットアームを含むロボット式ピペッタをさらに含むこと、ここで該ロボット式ピペッタが、前記容器と、前記インキュベータと、前記試料分離システムと前記画像収集システムとの間で前記アッセイ試料または前記試薬を移送するように設計されていることを特徴とする、請求項 1 に記載の免疫学的アッセイシステム。

20

【請求項 6】

前記容器の底が、ポリプロピレン、ナイロン、硝酸セルロースおよびポリフッ化ビニリデンから選択されるフィルター材料を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 7】

前記容器の底が、0.45 ミクロン (μm) サイズの細孔を有するポリプロピレン；0.45 μm サイズの細孔を有する硝酸セルロース；0.45 μm サイズの細孔を有するナイロン 6, 6；1.2 μm サイズの細孔を有するナイロン 6, 6；0.2 μm サイズの細孔を有する HPVM 膜；1.0 μm サイズの細孔を有するポリフッ化ビニリデン (PVDF)；1.2 μm サイズの細孔を有する PVDF；0.2 μm サイズの細孔を有する PVDF；および 0.25 μm サイズの細孔を有する PVDF から選択されるフィルター材料を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のシステム。

30

【請求項 8】

前記試料分離システムが、遠心分離機であることを特徴とする、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 9】

前記画像収集システムが、フローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータであることを特徴とする、請求項 1 に記載のシステム。

40

【請求項 10】

前記アッセイ試料が、赤血球および抗体を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 11】

反応済試料および試薬成分を前記容器の底面上に均等に広げるための手段を含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 12】

前記反応済試料および試薬成分を容器の底面に均等に広げるための手段が、遠心分離機であることを特徴とする、請求項 11 に記載のシステム。

50

【請求項 13】

前記容器の底面上の反応成分を分析するための手段をさらに含むことを特徴とする、請求項 1 に記載のシステム。

【請求項 14】

前記反応成分を分析するための手段が、フローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータであることを特徴とする、請求項 13 に記載のシステム。

【請求項 15】

反応容器；
希釈された濃度の免疫血液学的試料；
希釈された濃度の試薬；および
フローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータ
を含むことを特徴とする、免疫学的アッセイシステム。

10

【請求項 16】

真空濾過システムをさらに含むことを特徴とする、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 17】

遠心分離システムをさらに含むことを特徴とする、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 18】

前記免疫血液学的試料が、赤血球、抗原および同種異系抗体のうちの少なくとも 1 つを含むことを特徴とする、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 19】

前記試薬が、抗体および患者の血漿のうちの少なくとも 1 つを含むことを特徴とする、請求項 15 に記載のシステム。

20

【請求項 20】

A - 抗原、B - 抗原、Rh (D) - 抗原、ケル抗原、ダUFFI 抗原、抗体および同種異系抗体のうちの少なくとも 1 つを検出することを特徴とする、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 21】

A - 抗原、B - 抗原、Rh (D) - 抗原、ケル抗原、ダUFFI 抗原、抗体および同種異系抗体のうちの少なくとも 2 つを検出することを特徴とする、請求項 15 に記載のシステム。

30

【請求項 22】

A - 抗原、B - 抗原、Rh (D) - 抗原、ケル抗原、ダUFFI 抗原、抗体および同種異系抗体のうちの少なくとも 3 つを検出することを特徴とする、請求項 15 に記載のシステム。

【請求項 23】

凹凸のある表面を有する底を有する容器を用意する工程；
免疫学的試料と試薬の混合物を該容器内で反応させる工程；
該試料と試薬との混合物を遠心分離する工程；ならびに
該容器内の成分を分析して、該試料成分と試薬成分の間の相互作用の存在を判定する工程
を含むことを特徴とする、免疫学的アッセイ方法。

40

【請求項 24】

前記遠心分離が、低速での遠心分離であることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

前記低速での遠心分離が、約 1,000 g の最高速度での遠心分離を含むことを特徴とする、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 26】

前記低速での遠心分離が、約 250 g から約 400 g の速度での遠心分離を含むことを特徴とする、請求項 24 に記載の方法。

50

【請求項 27】

前記試料と試薬との混合物の未反応部分の全てを容器から分離する工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 28】

前記試料と試薬との混合物をインキュベートする工程をさらに含むことを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 29】

前記試料と試薬との混合物が、赤血球および抗体を含むことを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 30】

前記凹凸のある表面が、遠心分離中、試料中の相互作用した成分を、前記容器内の一箇所だけに移動させることなく、前記容器の底面上に均等に広がらせることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

10

【請求項 31】

前記容器が、
不活性材料、および
多数の細孔
を含むフィルターを備えていることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 32】

前記フィルターが、ポリプロピレン、ナイロン、硝酸セルロースおよびポリフッ化ビニリデンから選択される材料を含むことを特徴とする、請求項 31 に記載の方法。

20

【請求項 33】

フィルターが、0.45 ミクロン (μm) サイズの細孔を有するポリプロピレン；0.45 μm サイズの細孔を有する硝酸セルロース；0.45 μm サイズの細孔を有するナイロン 6, 6；1.2 μm サイズの細孔を有するナイロン 6, 6；0.2 μm サイズの細孔を有する HPVM 膜；1.0 μm サイズの細孔を有するポリフッ化ビニリデン (PVDF)；1.2 μm サイズの細孔を有する PVDF；0.2 μm サイズの細孔を有する PVDF；および 0.25 μm サイズの細孔を有する PVDF から成る群より選択される材料を含むことを特徴とする、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 34】

前記成分が、フローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータにより分析される、請求項 23 に記載の方法。

30

【請求項 35】

前記遠心分離が、短期間の遠心分離であることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 36】

前記遠心分離が、最大時間約 1 分の遠心分離であることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 37】

前記試料と試薬との混合物を反応させる工程が、その試料と試薬との混合物のインキュベーションを含むことを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

40

【請求項 38】

前記遠心分離が、低速かつ短期間の遠心分離であることを特徴とする、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 39】

希釈された免疫血液学的試料と希釈された試薬を混合して試料混合物を作る工程；
該試料混合物をフローサイトメトリにより分析する工程；および
所定の成分が該免疫血液学的試料中に存在するか否かを判定する工程
を含むことを特徴とする、免疫学的アッセイ方法。

【請求項 40】

50

前記免疫血液学的試料が、赤血球、抗原および同種異系抗体のうちの少なくとも1つを含むことを特徴とする、請求項39に記載の方法。

【請求項41】

前記試薬が、抗体および患者の血漿のうちの少なくとも1つを含むことを特徴とする、請求項39に記載の方法。

【請求項42】

前記所定の成分が、A - 抗原、B - 抗原、Rh(D) - 抗原、ケル抗原、デュフィ抗原、抗体および同種異系抗体のうちの少なくとも1つであることを特徴とする、請求項39に記載の方法。

【請求項43】

前記所定の成分が、A - 抗原、B - 抗原、Rh(D) - 抗原、ケル抗原、デュフィ抗原、抗体および同種異系抗体のうちの少なくとも2つであることを特徴とする、請求項39に記載の方法。

【請求項44】

前記所定の成分が、A - 抗原、B - 抗原、Rh(D) - 抗原、ケル抗原、デュフィ抗原、抗体および同種異系抗体のうちの少なくとも3つであることを特徴とする、請求項39に記載の方法。

【請求項45】

真空濾過により反応容器の底面上に前記試料混合物を広げる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項39に記載の方法。

【請求項46】

低速遠心分離により反応容器の底面上に前記試料混合物を広げる工程をさらに含むことを特徴とする、請求項39に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般には免疫学的アッセイシステムに関し、より詳細には免疫学的試料及び免疫血液学的試料の成分を分離および分析するためのシステムおよび方法に関する。

【背景技術】

【0002】

免疫学的アッセイは、抗体と抗原との反応を検出するように設計される。これらのアッセイは、一般に、赤血球(RBC)などの細胞またはビーズを「抗原担体」として利用する。適切なアッセイ構成においては、抗体は抗原担体を架橋させることができ、それによって最初は個々の抗原担体と抗体であったものから大きな三次元抗原-抗体凝集体が生じる。他の構成においては、抗体は抗原担体を架橋させることなく結合する。

【0003】

血液バンク設定における免疫血液学的検査は、輸血前に輸血の供血者と受血者の間の適合性を判定するために、RBCおよび抗体を使用する。例えば、受血者からの抗体が供血者からのRBCを架橋(凝集)させ、結果として大きなRBC凝集体が形成する場合、その供血者と受血者は、不適合である。現行の市販検査用試薬は、これらの凝集体と個々の凝集していないRBCを区別するように設計されている。例えば、標準的な「試験管検査」では、RBCを抗体と混合し、約1000×重力加速度(g)で、短期間、およそ30秒、遠心分離して、抗原-抗体複合物の形成を促進し、その後、凝集したRBCと凝集していないRBCを区別することができるように手で穏やかに再懸濁させる。試験管検査は、大きな労力を要し、自動化に適さず、結果は、個々のオペレータの技能に依存するので検査室間での標準化が難しい。

【0004】

凝集したRBCを同定するために使用される別の手法として、標準的なクロマトグラフ原理に基づくスピンカラム法がある。この方法論においては、均質なマトリックス材料、例えばビーズ、ゲルまたはポリアクリルアミドなどを満たした試験管を使用して、凝集し

10

20

30

40

50

た R B C を単独の R B C から分離する。このマトリックス材料は、注意深く制御された遠心力のもとで大きな（「4+」）凝集体がかるうじてそのマトリックスに入るような特定のサイズの穴または細孔を有するように設計される。しかし、それに続く小ささの凝集体（「3+」から「+1」まで）は、漸進的な度合いでそのマトリックスに入らず、凝集していない R B C は、そのマトリックスに入らないばかりでなく、試験管の底に完全に沈降する。単一の均質クロマトグラフマトリックスにおいて、様々なサイズの R B C 凝集体から単独の R B C を有効に分離するには、比較的長く、約 10 分の、遠心分離の実施を、80 x g の注意深く制御された低速遠心分離条件下で行わなければならない。最適な遠心分離条件からの逸脱、例えば、アッセイの実施を短くするために遠心分離速度をより高速にすることは、R B C の不良分離を導き、その結果、供血者と受血者の間の適合性を判定するアッセイ能力を損なうことになる。この方法論は、ある程度は自動化に適しており、オペレータの技能にさほど依存しない。

10

【0005】

スピンカラム法は、カラムの製造コストのため、試験管検査より有意に費用が高む。このマトリックス材料は、溶液状態であり、一般に、包装、輸送および保管条件を注意深く制御することを必要とする。加えて、試験管検査での約 30 秒に対して遠心分離工程が長時間、約 10 分であるため、検査が、試験管検査での検査より遅い。アッセイ結果の解釈は、読み取りが「アナログ」尺度に基づくため、すなわち、一般にはマトリックスによる R B C 移行距離を判断しなければならないため、オペレータの訓練も必要である。

【0006】

免疫血液学的検査のためのこの技法の方法には、主としておもて検査法（forward-blood typing）、うら検査法（reverse-blood typing）、および抗体スクリーニングの 3 つがある。これらの各々を別々に論じる。

20

【0007】

A O B / D おもて検査法

おもて検査法は、R B C 表面の特異的で臨床的に重要な抗原の存在を判定するために使用される。A - 抗原、B - 抗原、R h (D) - 抗原、ならびにケル (K e l l) およびデュフィ (D u f f y) などを含む他の R B C 抗原が挙げられるがこれらに限定されない。通常、これらの抗原の各々は、個別の検査 / 反応で検査される。そのため、これら 3 つの R B C 抗原を同定するために 3 つの別個の反応が必要とされる。このプロトコルは、R B C 上の A、B および R h (D) 抗原の存在を検出するために 3 つの別の試験管 / 反応を設定することを従来必要としている。

30

【0008】

A 抗原および B 抗原の型判定には、ヒト抗血清を使用することもできるが、我々は現在、適切な抗原に対する一次マウス抗体を使用している。理論上、これらの抗体は、フルオレセインなどの蛍光染料または多数の他の市販染料のうちのいずれかで直接標識することができるが、分析装置、すなわち、フローサイトメータまたは他の適切な計器が、それらを検出できることを条件とする。しかしながら、A 抗原および B 抗原は、一部が糖残基から成るため、これらの抗原に対して作成された殆どの抗体は、免疫グロブリン M (I g M) 類の抗体であり、直接標識することが難しい。

40

【0009】

I g M 抗 A 抗体および I g M 抗 B 抗体は、R B C を凝集させる傾向があり、これが、血液型判定を行うための大部分の市販技術の根本原理である。しかし、R B C の凝集は、フローサイトメトリーによる細胞の分析の妨げとなる。大きな凝集物とそのフローセルを通過することができずにむしろフローセルを詰まらせ、その結果、その後の装置の整備が必要となるからである。それ故、従来、R B C 凝集とフローサイトメトリーとは相容れないものであった。実際、この分野の先行出版物は、抗体による R B C の凝集により、フローサイトメトリーの免疫血液学への応用が現実には制限されることを示唆している。さらに、通常、フローサイトメトリーの従事者は、フローサイトメトリーの前に試料から凝集体 / 凝集物を除去して、装置を詰まらせないように努める（例えば、B e r n e m a n , Z

50

. N . , D . R . v a n B o c k s t a e l e , W . M . U y t t e n b r o e c k , C . V a n Z a e l e n , J . C o l e - D e r g e n t , L . M u y l l e , および M . E . P e e t e r m a n s , 「赤血球血液型 A 抗原密度プロフィールのフローサイトメトリー分析 (Flow - C y t o m e t r i c A n a l y s i s o f E r y t h r o c y t i c B l o o d G r o u p A A n t i g e n D e n s i t y P r o f i l e)」, V o x S a n g 6 1 : 2 6 5 (1 9 9 1) ; G a r r a t t y , G . , および P . A . A r n d t , 「フローサイトフルオロメトリーの赤血球免疫学への応用 (A p p l i c a t i o n s o f F l o w C y t o f l u o r o m e t r y t o R e d B l o o d C e l l I m m u n o l o g y)」, C y t o m e t r y 3 8 : 2 5 9 (1 9 9 9) ; S h a r o n , R . , および E . F i b a c h , 「A B O 赤血球抗原の定量的フローサイトメトリー分析 (Q u a n t i t a t i v e F l o w C y t o m e t r i c A n a l y s i s o f A B O R e d C e l l A n t i g e n s)」, C y t o m e t r y 1 2 : 5 4 5 (1 9 9 1)) .

10

20

30

40

50

【0010】

うら検査法

うら検査法は、血漿および血清中の天然抗 A 抗体および天然抗 B 抗体の存在を判定するために使用される。この検査が、上で説明したおもて検査法の確認としての役割を果たして、正しい血液型が個人に割り当てられることを確実にする。通常、これら 2 つの抗体の各々を、個別の検査 / 反応で試験する。典型的には、A、B または O 型試薬細胞を収容している 3 本の別の試験管を使用する。各試験管について、一個人の血漿を添加し、インキュベートして、洗浄し、その後、ヒト I g M に対する市販蛍光標識二次抗体を添加する。

【0011】

おもて検査法と同様に、I g M 抗 A 抗体および I g M 抗 B 抗体 (この場合はヒト由来のもの) の存在は、R B C を凝集させる傾向があり、これが、血液型判定を行う大部分の市販技術の根本原理である。さらに、上述のとおり、大きな凝集物が、そのフローセルを通過することができずにむしろフローセルを詰まらせ、その結果、その後の装置の整備が必要となるため、R B C の凝集は、フローサイトメトリーによる細胞の分析の妨げとなる。

【0012】

予想外の R B C 同種異系抗体のスクリーニング

以前に輸血を受けたことがある患者または供血者が、妊娠している個人においては、異種 R B C に対する抗体 (R B C 同種異系抗体) が生じていることがある。強い同種異系抗体が存在する場合、R B C 凝集を含むおもて検査法およびうら検査法についての問題と同じ問題が、あてはまる。

【0013】

以上のように、上述の欠点および不備に対処する、これまでに対処されていない要求が、当業界には存在する。

【非特許文献 1】B e r n e m a n , Z . N . , D . R . v a n B o c k s t a e l e , W . M . U y t t e n b r o e c k , C . V a n Z a e l e n , J . C o l e - D e r g e n t , L . M u y l l e , および M . E . P e e t e r m a n s , 「赤血球血液型 A 抗原密度プロフィールのフローサイトメトリー分析 (Flow - C y t o m e t r i c A n a l y s i s o f E r y t h r o c y t i c B l o o d G r o u p A A n t i g e n D e n s i t y P r o f i l e)」, V o x S a n g 6 1 : 2 6 5 (1 9 9 1)

【非特許文献 2】G a r r a t t y , G . , および P . A . A r n d t , 「フローサイトフルオロメトリーの赤血球免疫学への応用 (A p p l i c a t i o n s o f F l o w C y t o f l u o r o m e t r y t o R e d B l o o d C e l l I m m u n o l o g y)」, C y t o m e t r y 3 8 : 2 5 9 (1 9 9 9)

【非特許文献 3】S h a r o n , R . , および E . F i b a c h , 「A B O 赤血球抗原の定量的フローサイトメトリー分析 (Q u a n t i t a t i v e F l o w C y t o m e t r i c A n a l y s i s o f A B O R e d C e l l A n t i g e n s)」

, Cytometry 12:545 (1991))

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

解決しようとする課題は、現行の試験管検査およびスピカラム法の欠点であり、また免疫学的アッセイの技法をより自動化に適するようにすることを課題とする。

【課題を解決するための手段】

【0015】

免疫学的および免疫血液学的アッセイのためのシステムおよび方法をここに開示する。簡単に説明すると、代表的なアッセイシステムは、アッセイ試料および試薬を収容可能な容器、ここで該容器が凹凸のある表面を有する底を含む；インキュベータの極めて近くに設けられる試料分離システム；前記試料分離システムの極めて近くに設けられる画像収集システム；及び、前記フィルター容器、前記インキュベータ、前記試料分離システムおよび前記画像収集システムの到達距離内に設けられる、ロボットアームを含むロボット式ピペッタを含む。不規則な又は凹凸のある表面を有する前記容器は、ポリプロピレン、ナイロン、硝酸セルロース、およびポリフッ化ビニリデンのうちの少なくとも1つから選択されるフィルター材料を有するフィルター容器であり得る。さらに、前記フィルター容器は、多数の細孔も含むものであり得る。

10

【0016】

さらに、免疫学的および免疫血液学的アッセイのための方法を開示する。本免疫学的方法は、試料と検査用試薬（このうち一方は抗原担体（RBCまたはビーズ）を含有し、他方は抗体を含有する）の間の相互作用を特定するものである。これに関して、代表的方法を、容器を用意する工程；免疫学的試料と試薬との混合物とを該容器内で反応させる工程；該試料と試薬との混合物とを低速で、または短期間、遠心分離する工程；場合により、該RBCまたは他の抗原担体を洗浄する工程；及び、該容器内の成分を分析して、該試料成分と試薬成分の間の相互作用の存在を判定する工程、に、おおまかに要約することができる。

20

【0017】

希釈された免疫血液学的試料と希釈された試薬を混合して試料混合物を作成する工程；該試料混合物をフローサイトメトリーにより分析する工程；および、所定の成分が該免疫血液学的試料中に存在するか否かを判定する工程を含むことを特徴とする、免疫学的アッセイ方法も開示される。反応容器、希釈された濃度の免疫血液学的試料、希釈された濃度の試薬、およびフローまたはキャピラリーサイトメータを含む免疫学的アッセイシステムも開示する。また、反応容器、希釈された濃度の免疫血液学的試料、希釈された濃度の試薬、およびフローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータを含むことを特徴とする、免疫学的アッセイシステムも開示する。

30

【0018】

開示するアッセイシステムおよび方法の他の方法、特徴および利点は、以下の図面および詳細な説明を検討することにより、当業者には明らかであるか、または明らかとなるであろう。すべてのそうした追加的方法、特徴および利点は、本開示の範囲内に包含され、添付の特許請求の範囲によって保護される。

40

【発明の効果】

【0019】

本発明の免疫学的アッセイシステムにより、現行の試験管検査およびスピカラム法の欠点を克服し得ると同時に、免疫学的アッセイの技法をより自動化に適合させ得る。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

（詳細な説明）

免疫学的および免疫血液学的試料の成分を分離および分析するためのシステムおよび方法を一般的に開示する。これに関して、本免疫学的アッセイシステムの実施形態は、現行

50

の試験管検査およびスピンカラム法の欠点を克服すると同時に、免疫学的アッセイの技法をより自動化に適合させる。

【0021】

ある実施形態において、本免疫学的アッセイシステムは、容器システムを含む手段であり、ここで該フィルターは、特定のサイズの多数の穴または細孔の存在により個別の分子量およびサイズのカットオフを示す1つまたは複数のフィルターを備えたフィルターであることを特徴とする。免疫学的試料を試薬と混合し、前記フィルター上に置く。真空、遠心分離、または前記試料をフィルターに通す何らかの別の方法を適用すると、前記試料の成分は、様々なフィルターによりそれらのサイズに従って互いから分別される。

【0022】

別の実施形態において、本免疫学的アッセイシステムは、反応容器、希釈された濃度の免疫血液学的試料、希釈された濃度の試薬、およびフローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータを含む。ここで開示される代替システムは、任意の真空濾過システムおよび/または任意の遠心分離システムを含んでもよい。

【0023】

さらに別の実施形態において、本免疫学的アッセイシステムは、1つまたはそれ以上の容器を含み、それらの各々が、凹凸のある地形の底面を有する容器システムを含む計器である。本件明細書において「地形 (topography)」は、その容器の底面が起伏の特徴を有すること、または表面が、底面の複数の部分が他の部分より高いか、突出部を含むような輪郭となっていることを意味する。「凹凸のある (uneven)」は、その底面が、完全に平滑ではないことを意味するが、その容器の底の隆起した起伏が、規則正しい構造 (例えば均等間隔の突出部の列) であってはならないという意味ではない。多数の製造業者から市販されている安価な例は、底がフィルター材料で覆われている96ウエルプレートである。通常、こうしたフィルタープレートを使用して、フィルターの細孔径より大きな材料とその細孔径より小さな材料を、例えば小さいほうの材料をフィルターに通させるように真空または遠心分離を適用することにより、分離する。しかし、ある実施形態では、材料をフィルターに通して移動させる必要がない。この実施形態では、免疫学的試料を試薬と混合し、容器の中に入れて反応させる。このフィルターは、不規則な表面を提供し、それが、遠心分離の影響下で抗原担体 (例えばビーズまたは赤血球 (RBC)) が容器の端に移動するのを遅らせ、それにより遠心終了時には底のフィルター材料一面に抗原担体が本質的に均等に分散された結果を生ずる。これらのフィルタープレートの使用は、均等に分散された抗原担体薄膜が、凝集性抗体の存在下で大きな凝集物または凝集体を形成せず、それにより後続の試薬相互作用の分析を向上させる利点を有する。

【0024】

本明細書における抗原担体は、例えば、合成ビーズまたは試薬細胞 (例えばRBC、WBCもしくは血小板) でありうる。本件明細書においては例として、該抗原担体を通常、RBCと呼ぶであろうが、当業者には、本アッセイシステムおよび方法において使用することができる他の抗原担体を想像することができる。

【0025】

上述のように、底にフィルター材料を備えた96ウエルアッセイプレートを容器として使用することができ、その多数の例が市販されている。抗体とRBCをこのウエル内で反応させ、その後、遠心分離すると、そのウエルの底の不規則な地形がRBCの転動および移動を妨げるので、RBCが底一面に均等に広がる。対照的に、底にフィルター材料を備えていない標準的な96ウエルプラスチックアッセイプレートのように、その容器が平滑な底を有する場合、遠心力により、RBCのすべてがその平滑な底に沿って転動し、前記容器の隅に局在することになりうる。RBCに結合する抗体の存在下では、平坦な底のプレート内で緊密に密集したRBCは、大きな凝集物または凝集体を形成しうるが、不規則な底の地形を有するプレート内では、分散したRBCは、個別の細胞として残存するか、非常に小さな凝集物を形成するのみである。画像収集システムとしてフローサイトメータを使用して試料を分析する場合、個々の細胞および不規則な底の地形を有するプレート内

10

20

30

40

50

で形成される小さな凝集物は、容易かつ正確に分析することができる。対照的に、平滑な底のプレートからの大きな凝集体は、該サイトメータを詰まらせ、損傷させることがあり、これは、試料の分析を防止または妨害する。

【0026】

本開示免疫学的システムを使用して、抗体と細胞の間、または場合によっては、抗体と（抗原担体として作用するように改良および/または形成することができる）合成ビーズの間の相互作用を測定することができる。本免疫学的システムは、少なくとも2つの異なる方法で使用することができる。1つの方法では、患者試料の「細胞成分」、例えばRBC、白血球(WBC)または血小板を、「試薬抗体」と混合する。その混合物の成分を分離するか *in situ* で放置し、その後、分析して、細胞成分と試薬抗体の間の相互作用の存在を判定することができる。

10

【0027】

もう1つの方法では、本免疫学的システムは、患者の抗体を含有する試料、例えば血漿または血清試料と、合成ビーズまたは試薬細胞（例えばRBC、WBCもしくは血小板）でありうる抗原担体とを混合する。その混合物は、分離してもよいし、その場に放置してもよく、その後、その成分を分析して、抗体試料と試薬細胞または合成ビーズの間の相互作用の存在を判定する。

【0028】

本開示図面を参照すると、本開示アッセイシステムおよび方法をより良く理解することができる。図面中の構成要素は、必ずしも縮尺で製図したのではなく、本明細書において開示する原理を明確に図示する上での代替物として提示するものであることを強調しておく。また、図面中、同じ参照番号は、幾つかの図を通して一致する部分を示す。

20

【0029】

図1は、免疫学的システム100の実施形態を描写している。図1に示す免疫学的システム100は、アッセイ試料を収容可能な容器105；該容器を設置可能な任意のインキュベータ110；該インキュベータ110の極めて近く、またはその中に配置された試料分離システム115；該試料分離システム115の極めて近くに、任意で設けられる画像収集システム130；ならびに該フィルター容器105、インキュベータ110、試料分離システム115および/または画像収集システム130への到達距離内に、任意で設けられる、ロボットアームを含む任意のロボット式ピペッタ135を含む計器である。この免疫学的システム100は、その中に配置された任意の洗浄器140、およびアッセイ試料を保持するための試料ホルダー146が中に配置されている任意のターンテーブルシステム145を含んでもよい。さらに、場合によってはこの免疫学的システム100に、アッセイ試料147を収容した試験管および/または試薬148を収容した試験管を含んでもよい。

30

【0030】

ある実施形態においては、容器105はフィルター容器である。「フィルター容器」105は、アッセイ試料を収容可能であり、中に配置される1つまたはそれ以上のフィルター150を含むことができる容器を意味する。好ましくは、該フィルター容器105は、不活性材料および多数の細孔を含むフィルター150を含む。好ましい実施形態では、多数のフィルター容器105が、単一ユニット、例えばプレート106に配列される。ここでは、以後、容器105をフィルター容器105と呼ぶことがあるが、他の実施形態では、容器105が別のタイプの容器（例えば上述のような凹凸のある地形を有する底面の容器）であってもよい。

40

【0031】

免疫学的システム100内に任意で配置され得るインキュベータ110は、その中にフィルター容器105を配置可能な形状およびサイズのものである。多くのサイズおよび形状のインキュベータを使用することができるが、好ましい実施形態では、インキュベータ110は、その中に多数のフィルター容器105またはフィルター容器のプレート106を配置可能な形状およびサイズのものである。インキュベータ110は、フィルター容器

50

105が該インキュベータ110内に配置されているときにそれらを加熱することができる、任意で配置され得る加熱要素をさらに含んでもよい。

【0032】

試料分離システム115も、その中にフィルター容器105を配置することが可能な形状およびサイズのものである。多数のサイズおよび形の試料分離システムを使用することができるが、好ましい実施形態では、多数のフィルター容器105および/またはフィルター容器のプレート106をその中に配置することができる。試料分離システム115は、例えば、遠心分離機125、濾過システム、および/または印加電場でありうるが、これに限定されない。試料分離システム115は、フィルター容器105がその試料分離システム115内に設置されているとき、該フィルター容器105内に配置されたアッセイ試料147をフィルター150に通し、それによって該アッセイ試料を、サイズを基に様々な成分に分離するタイプのものである。試料分離システム115が遠心125分離機でありうる別の実施形態では、遠心分離のプロセスが、アッセイ試料147中の一切の反応済成分(例えばRBC)を任意の洗浄器140で洗浄し、RBCの凝集を生じずに画像収集システム130で分析することができるように、容器の底面上に均等に広げらるう。

10

【0033】

任意で用い得る画像収集システム130は、例えば、限定ではないが、カメラ、フローサイトメータ、キャピラリーサイトメータ、顕微鏡などの特別なレンズ、または人間の目でさえありうる。通常、アッセイ試料は、試料分離システム115から取り出した後、画像収集システム130によって分析される。画像収集システム130は、フィルター容器105を分析して、前記容器内に配置されたフィルター150の上の材料の有無を判定することもできる。

20

【0034】

画像収集システム130は、特に、それがフローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータの形態をとる場合、フィルター150上の材料のサイズおよび反応した状態を判定するために使用することもできる。例えば、画像収集システム130は、その材料が、個々の抗原担体の形態のものなのか、抗原担体の凝集体の形態のものなのかを判定することが可能であり、また蛍光標識抗体が、フィルター150上に、またはフィルター150が存在しない場合には容器内に、存在する抗原担体に結合しているのか否かを判定することができる。

30

【0035】

本システム内で任意で使用されるロボット式ピペッタ135は、一般に知られており、当業者に使用されているタイプのものである。ある実施形態によると、例えば、限定ではないが、Tomtec, Inc. (米国、コネチカット州のハムデン)またはCRS Robotics Corporation (カナダ、オンタリオ州のバーリントン)が製造および市販しているロボット式ピペッタシステムを使用することができる。

【0036】

洗浄器140は、画像収集システム130からロボット式ピペッタ135のロボットアームの到達距離範囲内に任意で配置される。洗浄器140は、その中にフィルター容器105、多数のフィルター容器105、および/またはフィルター容器のプレート106を配置することが可能なサイズおよび形状のものである。洗浄器140は、アッセイ混合物中に存在する抗原担体からすべての試薬を洗い落として、フィルター容器105のフィルター150に通すように設計される。あるいは、RBCなどの抗原担体が、遠心分離後、フィルター容器105の底一面に均等に分散されている場合、洗浄器140を使用して、RBC層の上にある液体を吸引するか、ピペットで取り除き、その後、RBCの上により多くの液体をピペットまたは別途方法で分配してもよい。洗浄を含むこれらの工程を、複数の回数、反復してもよい。洗浄器140の構造は多数あるだろうが、洗浄器140は、真空吸引またはピペティングシステムでありうる。

40

【0037】

50

図2は、図1の免疫学的システム100のフィルター容器105構成要素の一例を描写している。図2は、試料分離のために遠心分離機125内に配置する前の、分析される試料147を収容しているプレート構造106内の多数のフィルター容器105(a)、および遠心分離機125から取り出した後の該容器(b)を表している。図2でわかるように、フィルター150は、フィルター容器105内に配置されている。遠心分離後、抗原担体155が、フィルター容器105内のフィルター150の底一面に均等に分散されていることに注目されたい。

【0038】

多様な実施形態に従って、フィルター150の細孔径を変化させることができる。例えば、フィルター150の細孔は、約0.01ミクロン(μm)から約50 μm の範囲のサイズのものである。フィルター150の細孔のサイズは、フィルター容器105の用途に依存する。この用途のある実施形態において、フィルター150を使用して、例えばRBC凝集体を保持し、一方個々の赤血球はフィルター150の細孔を通過させることが望まれる場合、細孔径の範囲は、約3 μm から約40 μm の間である。しかし、抗原担体を保持するが、抗体を含有する液体は通過させるためにフィルター容器150が使用される、抗原担体(例えば、RBC、WBC、血小板または合成ビーズ)から液体のみを濾過して除去するためにフィルター容器105を使用する場合、好ましい実施形態における細孔径の範囲は、約0.1 μm から約3 μm である。さらに好ましくは、この細孔径は、約0.2 μm から約1.2 μm の範囲である。この方法論に最適な細孔径は、0.45 μm である。

10

20

【0039】

フィルター150が、非常に小さな(例えば約0.2から約1.2 μm の)細孔径を含むとき、該フィルターは、抗原担体から液体をさほど有効に濾過させて除去することができないこともある。この場合、フィルター150は、不規則な地形の凹凸のある表面として機能し得、これが、フィルター容器105が試料分離システム115(例えば遠心分離機125)の中に置かれているときに、アッセイ試料中の反応済成分をフィルター容器の底面上に均等に広げさせる。遠心分離後にフィルター容器の底一面にRBCまたは他の抗原担体が均等に広がっていることにより、抗原担体の集合または凝集が低減され、ならびに特にその画像収集システム130がフローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータである場合、画像収集システム130によるアッセイ試料における相互作用の存在の分析がより容易かつ正確になる。

30

【0040】

別の実施形態では、フィルター容器105の厚さは、フィルター150の用途に依存して変化しうる。例えば、フィルター150の厚さは、約3 μm から約5mmの範囲でありうる。好ましい実施形態において、フィルター150の厚さは、約3 μm から約100 μm の間である。場合により、フィルター150の厚さは、約10 μm から約75 μm の間である。

【0041】

上述のように、フィルター容器105の様々な実施形態において、フィルター150は、多くの異なるタイプの材料から製造することができる。好ましい実施形態において、フィルター150は、不活性材料および多数の細孔を含む。フィルター150の不活性材料は、フィルター150の用途に依存して変更しうる。

40

【0042】

例えば、フィルター150の機能が、遠心分離後、フィルター150の表面上に反応済成分を均一に広げさせる機能である場合、フィルター150の不活性材料は、例えば、ポリプロピレン、ナイロン、硝酸セルロースおよびポリフッ化ビニリデン材料でありうるが、これらに限定されない。好ましくは、フィルター150は、下記のうちの1つから製造される: 0.45ミクロン(μm)サイズの細孔を有するポリプロピレン(英国、ケント州のWhatman plcによって製造され、同社からUniFilter(登録商標)として市販されているもの); 0.45 μm サイズの細孔を有する硝酸セルロース(W

50

hatman plcによって製造され、同社からUniFilter（登録商標）として市販されているもの）、0.45 μmサイズの細孔を有するナイロン6,6（米国、ニューヨーク州、ロチェスターのNalge Nunc Internationalによって製造され、同社からSilent Screen（商標）として市販されているもの）；1.2 μmサイズの細孔を有するナイロン6,6（Nalge Nunc Internationalによって製造され、同社からSilent Screen（商標）として市販されているもの）；0.2 μmサイズの細孔を有するHPVM膜（米国、ニューヨーク州、ロチェスターのNalge Nunc Internationalによって製造され、同社から市販されているもの）；1.0 μmサイズの細孔を有するポリフッ化ビニリデン（PVDF）（米国、マサチューセッツ州、ベッドフォードのMillipore Inc.により製造され、同社からMultiScreen（登録商標）として市販されているもの）；1.2 μmサイズの細孔を有するPVDF；0.2 μmサイズの細孔を有するPVDF（Millipore Inc.により製造され、同社から市販されているもの）；0.2 μmサイズの細孔を有するPVDF（米国、マサチューセッツ州、アクロンのCorning Life Sciencesによって製造され、同社から市販されているもの）；および0.25 μmサイズの細孔を有するPVDF（Corning Life Sciencesによって製造され、同社から市販されているもの）。ある実施形態においては、0.45 μmサイズの細孔を有するポリプロピレンが、最適なフィルター材料150として機能することが判明した。

【0043】

図3は、図2で描写した容器105に対し別の実施形態である容器106を図示するもの。この容器106は、免疫学的システム100において容器105の代わりに使用することができる。容器106は、上述の凹凸のある地形を有する底、または上述のフィルター材料のいずれかを含み得る。この凹凸のある地形またはフィルター材料は、下で論じるような遠心分離後、抗体担体155を容器106の底面上に均等に広げることがを助長する。

【0044】

図4は、免疫学的システム100の一構成要素である遠心分離機125の1つのタイプである試料分離システム115を描写している。当業者に公知であり、使用されているあらゆるタイプの遠心分離システムを、遠心分離機125として使用することができることは、理解されよう。フィルター容器105および/またはフィルタープレート106を保持するように改良されているのであれば、例えば、Beckman Coulter, Inc（米国、カルフォルニア州、フラートン）によって製造され、同社から市販されている典型的な遠心分離機を、ある実施形態に応じて使用することができる。図4に示した遠心分離機125は、好ましい実施形態において使用される遠心分離の角度を示している。多様な角度を用いるが、好ましい実施形態において、フィルター容器105は、遠心分離機が静止しているとき回転軸175に対して0°の角度で始まり、遠心分離中に90°の角度に移動し、遠心分離終了時に0°の角度に戻る「スイングバケットローター」の中に置かれる。

【0045】

免疫学的システム100のある実施形態において、フィルター容器105、試料およびフィルター150の向きは、試料分離システム115が、試料をフィルター150と接触させ、フィルター150の呼び細孔径より小さい試料の成分を、フィルター150を通過させてフィルター150の下で収集リザーバーに行かせて、大きすぎてフィルター細孔を通ることに適さずにフィルター150の上のフィルター容器105に残る試料の成分と分離することができるような向きである。

【0046】

免疫学的システム100のある実施形態において、容器105は、上述の凹凸のある地形を有する底、または上述のフィルター材料のうちのいずれかを含み得る。該凹凸のある地形またはフィルター材料は、容器105の底面上へ抗原担体155が均等に広がることを助長する。凹凸のある地形またはフィルター材料は、遠心分離中に抗原担体155が容

器 105 の一部または片側のみに移動するのを防止する。抗原担体 155 が、遠心分離中に容器 105 の一部に移動すると、抗原担体 155 は凝集して大きな凝集塊になり、分散させることおよび画像収集システム 130 により正確に読み取ることが難しくなりうる。従って、この容器 105 は、特に画像収集システム 130 がフローサイトメータまたはキャピラリーサイトメータであるとき、画像収集システム 130 から得ることができる結果を向上させる。

【0047】

本発明の他の実施形態には、免疫学的アッセイ方法が含まれる。この方法は一般的に、希釈された免疫血液学的試料と希釈された試薬を混合して試料混合物を作成する工程、該試料混合物をフローサイトメトリーにより分析する工程、および、所定の成分が該免疫血液学的試料中に存在するか否かを判定する工程を含む。この方法は、例えば次のタイプのアッセイに応用することができる。

【0048】

A B O / D おもて検査法

本開示方法のある実施形態においては、標識されていない一次マウス抗体を使用し、市販の抗マウス免疫グロブリン M (I g M) 蛍光標識二次抗体を使用して、その存在を検出する。

【0049】

フローサイトメトリーを使用する血液型判定にこの技法を応用可能とするために、次の方法を利用しうる。R B C と抗体を混合し、その後、R B C を洗浄した後に R B C の凝集が発生しないまたは最小限にしか発生しないところまで、一次 I g M 抗体を希釈する。可能性のある多数の希釈度を用いることができるが、約 1 : 500 から 1 : 1000 の希釈度が、最適な結果を呈す。この方法は、おもて検査法に付随する試薬コストを低減させる。ここで本方法が開示されるまでは、一般に、本発明分野では、高感度の血液型判定には高い抗体力価が必要であると考えられていた。しかし、本方法では、フローサイトメトリーにより高感度検出が利用可能であるため、上記抗体希釈物を使用して血液型判定を行い得ることが、実際の実験データにより示されている。例えば、異なる希釈度の抗 A 抗体 (1 : 50 から 1 : 1000) を使用して、O 型 R B C (A 抗原を有さない) または A 型 R B C (A 抗原を有する) のいずれかを着色した代表データを表 1 に示す。R B C の蛍光シグナルをフローサイトメトリーによって収集し、平均蛍光を計算した。O 型 R B C は、A 抗原を有さないもので、極めて低い蛍光を有することに注目されたい。抗 A 抗体が 1 : 1000 に希釈されているときでさえ、A 型 R B C の平均蛍光 (19.5) が、O 型 R B C のもの (4.11) より未だ有意に高いことは、注目に値する。従って、免疫血液学的検査に一般に使用される抗体は、抗体 - R B C 相互作用がフローサイトメトリーによって検出されるときには、この分野で可能であると一般に考えられているものより、ずっと低い濃度まで希釈され得る。

【0050】

【表 1】

低い抗体濃度でも抗体-抗原相互作用を検出可能なフローサイトメトリーの感度を実証する代表的データ

抗体希釈物	R B C の平均蛍光強度	
	O 型 R B C	A 型 R B C
抗 A (1 : 50)	4.18	179.82
抗 A (1 : 100)	4.19	79.75
抗 A (1 : 500)	4.11	36.4
抗 A (1 : 1000)	4.11	19.5

【0051】

10

20

30

40

50

二次抗体も、適切な希釈度で使用されることが望ましい。高すぎる力価を有する抗体を使用すると、通常、凝集が生成するものと考えられる。可能性のある多くの希釈度を用いることができるが、約1:100の希釈度が、最適な結果を呈す。この方法もまた、おもて検査法に付随する試薬コストを低減させる。IgM分子は、蛍光タグと直接結合させることが通常難しいが、標識IgM抗体の作成により、二次抗体使用の必要が無くなり、故に、凝集を低減させることとなる。さらに、細胞に対する抗原を検出するためのフローサイトメトリーの標準的な使用では、殆どの抗体を4で細胞とともにインキュベートしなければならない。例えば、該二次抗体のインキュベーションが、約1:100希釈では、意外にも室温で有効に行うことができる。

【0052】

最後に、上記のように適切な抗体希釈物を使用しているにもかかわらず、典型的な試験管の中で細胞を遠心分離によって洗浄すると、すべての細胞が集まって緊密な1個のペレットになり、それを抗体が架橋させることがあるため、やはり、多少の凝集が生じることがある。このレベルの凝集は、フローサイトメトリー分析には大きすぎることがある。そのため、上述のような一次および二次抗体の適切な希釈物の使用に加えて、RBCを強固に凝集させない洗浄手順を利用してもよい。2つのそうした手順が知られている：(1)真空濾過を利用し、有効に架橋するほど互いに近接しないように細胞をフィルター上に広げる、迅速自動フローサイトメトリー検査(Rapid Automated Flow cytometric Testing (RAFT))法。この技法は、米国特許仮出願第60/179,248号、米国特許出願第09/773,826号、および特許協力条約特許出願第PCT/US01/03206号(これらはすべて、本明細書に参考として組み込まれている)に記載されている；(2)真空濾過を使用するのではなく、下で説明するようにマイクロタイタフィルタープレートを低速で遠心分離する工程。

【0053】

上述のように、伝統的に、従来のアッセイ法では、RBC上のA、BおよびRh(D)抗体の存在を検出するために3本の別の試験管/反応を設定する必要があった。しかし、本開示方法および装置においてフローサイトメトリーを使用することにより、3つすべての抗原を1本の試験管で同時に検出することができる。このタイプのマルチプレクシング(multiplexing)は、多数の方法で行うことができる。

【0054】

ある実施形態において、抗A、抗Bおよび抗Rh(D)抗体は各々、別々に、異なる蛍光レポーター分子で標識することができる。例えば、ヒトIgG抗Rh(D)抗体は、市販のキットを使用してイソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)で直接標識することにより、この用途に使用することができる。別の実施形態において、IgM抗体が異なる種(例えばヒトIgM抗AおよびマウスIgM抗B)由来のものである場合には、それらを識別する異なる二次抗体(異なる蛍光タグを含有するもの)を使用することができる(例えば、ヤギ抗ヒトIgMおよびヤギ抗マウスIgM)。

【0055】

A B O うちら 検査法

おもて検査法とは対照的に、一次抗体の強度は、患者ごとに異なるので、制御することができない。この理由で、洗浄において適切な方法を使用することにより、RBCの凝集が防止される。上と同様、この方法は、米国特許出願第09/773,826号および国際特許出願第PCT/US01/03206号に記載の技法、または本明細書において下記にて説明する技法のいずれかを使用する。おもて検査法と同様、二次抗体の力価は、凝集を制限するために適切に決定する。うちらA B O血液型検査における方法の一例の詳細を下の表2に示す

【0056】

10

20

30

40

【表 2】

フローサイトメトリー ABO/Rh (D) 検査プロトコル例

		アッセイ			
工程	A、B おもて	Rh (D) おもて	A、B うち	抗体スクリーニング	
1. RBC	2%患者RBC (25 μ L)	2%患者RBC (25 μ L)	3%患者A、B、O RBC (30 μ L)	3%スクリーニング細胞 (13 μ L)	
2. 一次抗体	マウス α -A、 α -B (50 μ L)	ヒト α -Rh (D) (50 μ L)	患者血漿 (50 μ L)	患者血漿 (25 μ L)	
3. 増強剤	PEG (20%) μ L 50	
4. インキュベーション	室温 × 2分	室温 × 2分	室温 × 2分	37°C × 5分	
5. 洗浄	200 μ L 食塩水 × 4	200 μ L 食塩水 × 4	200 μ L 食塩水 × 4	200 μ L 食塩水 × 4	
6. 二次抗体	PE- α -マウス IgM 100 μ L	PE- α -ヒト IgM 100 μ L	PE- α -ヒト IgM 00 μ L	PE- α -ヒト IgG 100 μ L	
7. インキュベーション	室温 × 5分	室温 × 5分	室温 × 5分	室温 × 5分	
8. 洗浄	200 μ L 食塩水 × 2	200 μ L 食塩水 × 2	200 μ L 食塩水 × 2	200 μ L 食塩水 × 2	
9.	フローサイトメトリー				

10

20

30

40

50

【0057】

予想外な RBC 同種異系抗体のスクリーニング

ここで開示される予想外 R B C 同種異系抗体をスクリーニングするためのアッセイ方法は、うら検査法について上で説明した方法と同様である。例えば、ここで開示されるアッセイは、上の表 2 にある例に従って行うことができる。

【 0 0 5 8 】

さらに別の実施形態として、図 5 のフローチャートに描いたような免疫学的アッセイ方法 1 8 0 が挙げられる。この免疫学的アッセイ方法 1 8 0 は、ブロック 1 8 5 に見られるような、免疫血液学的試料をフィルター容器 1 0 5 または容器 1 0 6 に入れる任意の工程を含む。ブロック 1 9 0 に示したように、次の工程は、フィルター容器 1 0 5 または 1 0 6 へのアッセイ試薬の添加を含む。ブロック 1 9 5 に示した次の任意の工程は、前記試料と試薬を混合して、試料混合物 2 0 0 を作る工程である。ブロック 2 0 5 に示したように、この方法は、その試料混合物 2 0 0 をインキュベートする工程を任意で含む。

10

【 0 0 5 9 】

ブロック 2 0 5 に示したインキュベーション工程において、試料混合物 2 0 0 を約 4 から約 3 7 の範囲の温度でインキュベートし得る。好ましい実施形態において、試料混合物 2 0 0 は、ほぼ室温 (2 0 ~ 2 5) と約 3 7 の間の温度範囲でインキュベートされる。試料混合物 2 0 0 のインキュベーション時間は、インキュベーション無しから約 3 0 分のインキュベーション時間の範囲でありうる。好ましい実施形態において、インキュベーション時間は、約 2 から約 5 分の範囲である。

【 0 0 6 0 】

この任意のインキュベーション後の、ブロック 2 1 0 に描写したような次の任意の工程は、試料混合物 2 0 0 を様々な成分に分離する工程である。この工程は、試料混合物 2 0 0 を収容しているフィルター容器 1 0 5 および / またはプレート 1 0 6 を試料分離システム 1 1 5 の中に置くことによって、通常、達成される。ブロック 2 1 0 の分離工程において使用する試料分離システム 1 1 5 が、遠心分離機 1 2 5 である場合、その遠心分離速度は、好ましくは約 1 0 0 から約 1 , 0 0 0 × 重量加速度 (g) の速度であるが、他の速度を使用してもよい。好ましい実施形態において、この遠心分離の最高速度は、約 2 5 0 g から 4 0 0 g の範囲である。遠心分離時間は、約 5 秒から約 5 分の範囲でありうる。好ましい実施形態では、最高遠心分離時間が約 1 分であるが、他の時間を用いてもよい。

20

【 0 0 6 1 】

試料を遠心分離すると、R B C または他の抗原担体は、容器の底に均等に分散され、その上にある液体は、残留抗体、または抗原担体と反応していない他の試薬を含有し得る。ブロック 2 1 2 に示したように、その上清液を容器 1 0 5 / 1 0 6 から除去してもよい。除去は、例えば、ロボットピペティングなどのピペティング、または未反応成分の単なる注ぎ出しによって達成することができるが、これに限定されない。

30

【 0 0 6 2 】

上清液を除去する場合、フィルター容器の底に残っている抗原担体を任意で洗浄してもよい。この洗浄工程は、ブロック 2 1 3 に示したように、該抗原担体への緩衝溶液の添加によって達成することができる。この緩衝溶液は、例えば、食塩水、例えば 0 . 9 % 塩化ナトリウム (N a C l) 溶液 ; リン酸緩衝食塩水 ; またはこのアッセイ方法中に細胞成分の生存を保つあらゆる生理食塩液でありうるが、これに限定されない。好ましい実施形態では、p H 7 . 4 の 0 . 9 % (重量 / 容量) N a C l の溶液を使用する。この緩衝液は、ピペッタまたは他の手段により添加することができる。

40

【 0 0 6 3 】

緩衝溶液を添加した後、前記緩衝液を、ブロック 2 0 5 に示したように抗原担体とともに任意でインキュベートしてもよく、その後、場合によっては、ブロック 2 1 0 にあるようにその上清液から抗原担体を除去してもよく、また、ブロック 2 1 2 にあるようにその上清を除去してもよい。試料混合物 2 0 0 がその用途に適するように十分に洗浄されるまで、1 回から約 1 0 回、このプロセスを繰り返し得る。

【 0 0 6 4 】

前記洗浄工程は、生理食塩液を用意する工程、および約 1 0 マイクロリットルから約 5

50

ミリリットルの生理食塩液を試料混合物 200 に添加する工程を含み得る。ブロック 205、210、212 および 213 に含まれている任意の洗浄工程の後、ブロック 190 に示した工程に進めることにより、試料を他の抗体などのさらなる試薬と反応させてもよい。これらの工程は、矢印により図示した順序で、選択されたあらゆる回数、繰り返すことができるが、好ましくは 1 回と 5 回の間である。

【0065】

ブロック 215 に示したように、任意の分離工程 210、任意の液体除去工程 212 および任意の洗浄工程 213 の後、フィルター容器 105 および / またはプレート 106 を分析して、試料 200 中の相互作用の有無を判定してもよい。試料 200 は、画像収集システム 130 内にフィルター容器 105 および / またはプレート 106 を置くことによ

10

【0066】

該相互作用は、それ自体、抗体による細胞成分の凝集が形成されていることまたは共に集塊をなしていることの証拠となる。該凝集は、画像収集システム 130 によって検出することができる。同様に、該アッセイ方法は、画像収集システム 130 により抗体成分による細胞試薬の凝集の存在または不在を検出することによって、アッセイ試料中の抗体成分と細胞性試薬との間の相互作用を検出するために使用することができる。あるいは、これらのアッセイで使用される抗体を、蛍光染料に結合させるか、または別途手法で標識してもよい。この場合、標識抗体と抗原担体の間の相互作用は、フローサイトメトリーまたはキャピラリーサイトメトリーを用いて該抗原担体の蛍光標識として検出することができる。この実施形態では、RBC または他の抗原担体の一切の凝集を最少にすることが望ましい。

20

【0067】

本開示アッセイシステムおよび方法の上記実施形態は、実施の単なる可能な例であり、本明細書において開示する原理の明確な理解のためだけに提示されていることを強調しておく。本発明の精神および原理から実質的に逸脱することなく、上記実施形態（複数を含む）に多くの変形および修正を施すことができる。そうした修正および変形は、本明細書における本開示の範囲内に包含され、特許請求の範囲により保護されるものとする。

30

【0068】

優先権主張

本出願は、2003年6月24日に提出され、米国実用特許出願番号 10 / 602 , 981 を与えられた、「免疫学的アッセイのシステムおよび方法」と題する同時係属米国出願への優先権を主張するものである。前記出願は、参考として本明細書に全面的に組み込まれている。

【図面の簡単な説明】

【0069】

40

【図 1】本発明で開示される免疫学的システムの代表例を説明する図である。

【図 2】図 1 の免疫学的システムのフィルター容器内での試料と試薬の混合物の間の相互作用を図示する。

【図 3】相互作用した試料と試薬を描く、図 1 の免疫学的システムのフィルター容器の代表例を図示する。

【図 4】運転中の遠心分離機の具体例として、図 1 の免疫学的システムの分離システム要素の代表例を図示する。

【図 5】図 1 の免疫学的システムを使用する、本発明で開示される免疫学的アッセイ方法の代表例のフローチャートである。

【 図 1 】

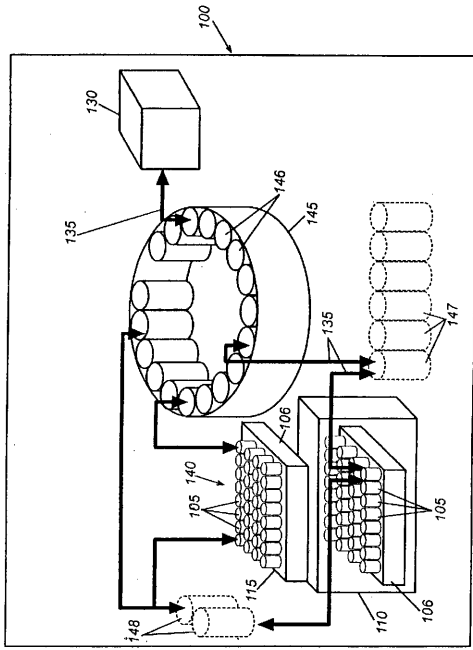


Fig. 1

【 図 2 】

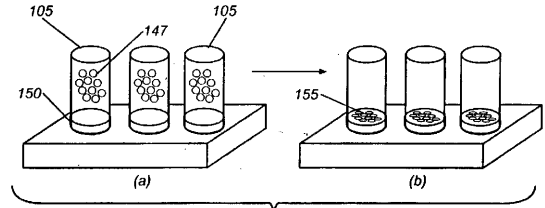


Fig. 2

【 図 3 】

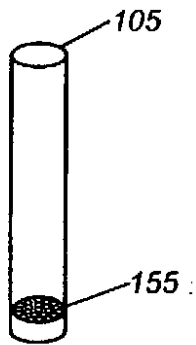


Fig. 3

【 図 4 】

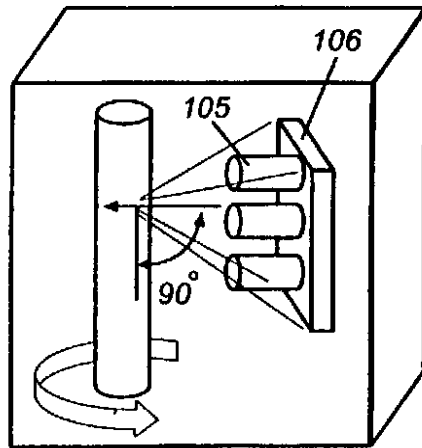
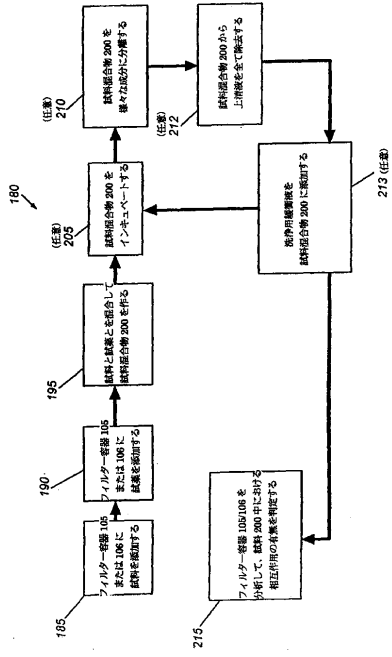


Fig. 4

【図 5】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US04/20380
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC(7) : G01N 033/53		
US CL : 422/62, 68.1, 100, 101, 255		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 422/62, 68.1, 100, 101, 255		
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)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5,620,898 A (YAREMKO et al) 15 April 1997, see col. 5, lines 39-42, col. 13, line 61- col. 15, line 3.col. 15, line 48-col. 16, line 21, col. 13, lines 1-12, col. 6, lines 21-32.	1-5, 8, 10-12, 23-31, 35-38
X	US 6, 692,702 B1 (BURSHTEYN et al) 17 February 2004, see col. 7, lines 43-59, col. 16, lines 44-52.	1, 6, 7, 9, 13-16, 18-22, 39-45
Y	US 6,008,040 A (DATAR) 28 December 1999, see col. 4, lines 24-41	32-33
Y	US 5, 968,731 A(LAYNE et al) 19 October 1999, see col. 14, lines 14-19, col. 17, lines 34-39.	15, 17-22, 34, 39-46
<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:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 17 February 2005 (17.02.2005)	Date of mailing of the international search report 03 MAR 2005	
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P. O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer Richard Crispino Telephone No. 571-272-1023 Jean Proctor Paralegal Specialist	

フロントページの続き

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, 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

(72) 発明者 ロバック、ジョン、ディー。

アメリカ合衆国 3 0 0 3 0 ジョージア州 ディケーター リドリー レーン 2 1 9

(72) 発明者 ヒリアー、クリストファー、ディー。

アメリカ合衆国 3 0 3 3 8 ジョージア州 ダンウッドィ マンハセット ファーム コート
1 6 3 4

Fターム(参考) 2G058 AA09 BA06 BB02 CA04

专利名称(译)	免疫测定系统和方法		
公开(公告)号	JP2007524831A	公开(公告)日	2007-08-30
申请号	JP2006517648	申请日	2004-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	埃默里大学		
申请(专利权)人(译)	埃默里大学		
[标]发明人	ロバックジョンディー ヒリアークリストファーディー		
发明人	ロバック、ジョン、ディー. ヒリアー、クリストファー、ディー.		
IPC分类号	G01N35/02 G01N33/53 B01L3/00 G01N35/00		
CPC分类号	G01N35/028 B01L3/5025 B01L3/50255 B01L2200/16 B01L2300/0829 B01L2300/0851 G01N2035/00356 G01N2035/00485 G01N2035/0097		
FI分类号	G01N35/02.A G01N33/53.T		
F-TERM分类号	2G058/AA09 2G058/BA06 2G058/BB02 2G058/CA04		
代理人(译)	中岛敦		
优先权	10/602981 2003-06-24 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

免疫学或免疫血液学测定系统，包括能够含有测定样品的容器，培养箱，样品分离系统，图像收集系统和移液器。免疫测定系统还可包括洗涤器。步骤把容器免疫学测定样品，其可以含有一个过滤器；容器的测试试剂添加步骤；所述样品和所述混合物的容器中温育过程与试剂；在所述容器内的样品，并与试剂将混合物分成反应和未反应的组分；并分析容器以确定样品和试剂之间存在相互作用。优选地，容器的底部是促进样品的反应组分均匀扩散到容器底部的材料，从而可以更容易地分析相互作用。

