

(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2011-502264

(P2011-502264A)

(43) 公表日 平成23年1月20日(2011.1.20)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	2 G O 5 4
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
GO 1 N 33/542 (2006.01)	GO 1 N 33/542 A	
GO 1 N 15/14 (2006.01)	GO 1 N 15/14 C	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 34 頁)

(21) 出願番号 特願2010-532207 (P2010-532207)
 (86) (22) 出願日 平成20年10月29日 (2008.10.29)
 (85) 翻訳文提出日 平成22年4月28日 (2010.4.28)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/081598
 (87) 国際公開番号 W02009/058876
 (87) 国際公開日 平成21年5月7日 (2009.5.7)
 (31) 優先権主張番号 60/983,309
 (32) 優先日 平成19年10月29日 (2007.10.29)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 510005889
 ベックマン コールター, インコーポレ
 イテッド
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 928
 21, プレア, エス. クレーマー ブー
 ルバード 250
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100062409
 弁理士 安村 高明
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血小板集団の迅速な抗体ベースの分析のための方法

(57) 【要約】

生物学的試料において血小板集団、好ましくは未成熟な網状血小板の集団を同定するための方法であって、生物学的試料を、血小板上のエピトープまたは抗原に結合する少なくとも1つの標識リガンドまたは標識モノクローナル抗体と、核酸色素と共にインキュベートするステップを含む方法。この試料は分析され、インキュベートされた試料がフローサイトメーターを通過することによって1つまたは複数の血小板集団が同定または定量される。インキュベートされた試料はレーザー光源を用いて照射され、標識リガンドおよび核酸色素の蛍光は、少なくとも1つのさらなるパラメーター、たとえば光散乱、直流、軸方向光損失、不透明度、および高周波と共に測定される。これらのパラメーターは、試料における血小板集団を定性的または定量的に同定するために使用される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

生物学的試料において血小板集団を同定するための方法であって、

(a) 該生物学的試料を、核酸色素と、血小板上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの標識抗血小板リガンドと共に 5 分未満の間インキュベートするステップ、

(b) 該インキュベートされた試料がフローサイトメーターの感知領域を通過するようにし、該インキュベートされた試料はレーザー光源を用いて照射され、該リガンドおよび該核酸色素からの蛍光と、光散乱、直流、軸方向光損失、不透明度、および高周波からなる群より独立して選択される少なくとも 1 つのさらなるパラメーターとを測定するステップ、ならびに

10

(c) 該試料における血小板集団を識別または同定するステップを含む、方法。

【請求項 2】

同定される前記血小板集団は、未成熟な網状血小板の集団である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

(d) 前記試料における 1 つまたは複数の血小板集団を定量または計数するステップをさらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

同定される前記血小板集団は、成熟血小板、未成熟な網状血小板、巨大血小板、血小板凝集塊、血小板サテライト、活性化血小板、非活性化血小板、その組み合わせ、および総血小板集団からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 5】

前記リガンドは、血小板集団上で専ら発現されるが、赤血球、白血球、上皮細胞、または内皮細胞上で発現されないエピトープまたは抗原に特異的に結合する血小板特異的リガンドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記リガンドは、血小板集団上で示差的に発現されるエピトープに結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 7】

前記リガンドは、血小板集団上で、ならびに赤血球、白血球、上皮細胞、および内皮細胞からなる群より選択される少なくとも 1 つのさらなる集団上で発現されるエピトープまたは抗原に特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

30

【請求項 8】

前記リガンドは、血小板集団上で、ならびに赤血球、白血球、上皮細胞、および内皮細胞からなる群より選択される少なくとも 1 つのさらなる集団上で示差的に発現されるエピトープまたは抗原に特異的に結合する、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記インキュベーション時間は、5 秒間、10 秒間、15 秒間、20 秒間、30 秒間、40 秒間、50 秒間、1 分間、1.5 分間、2 分間、2.5 分間、3 分間、3.5 分間、4 分間、4.5 分間および 5 分間、ならびにその間の任意の小数部分からなる群より選択される、請求項 1 に記載の方法。

40

【請求項 10】

前記標識リガンドは抗血小板蛍光性リガンドである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記標識は、蛍光性標識、蛍光性または非蛍光性ビーズ、蛍光性または非蛍光性コロイド粒子、量子ドット、および蛍光共鳴エネルギー転移 (FRET) 標識である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記識別ステップは、1 つまたは複数の血小板集団を、白血球、網状赤血球、未成熟な

50

網赤血球、細胞破片、および非細胞凝集物からなる群より選択される1つまたは複数の集団を有する混合物から区別することを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項13】

抗血小板蛍光を検出することによって、血小板集団を、他の血球、細胞破片、および非細胞凝集物と識別するステップをさらに含む、請求項10に記載の方法。

【請求項14】

前記核酸色素の散乱光および蛍光のパラメーターを使用して前記血小板集団を分析することによって、未成熟な網状血小板を成熟血小板と区別するステップをさらに含む、請求項13に記載の方法。

【請求項15】

リガンドの濃度を増加させると、前記試料とのインキュベーション時間が短縮される、請求項1に記載の方法。

【請求項16】

前記試料中の核酸色素の濃度は、約0.3~約2.0 $\mu\text{g/ml}$ である、請求項1に記載の方法。

【請求項17】

前記試料は、成熟赤血球および白血球をさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項18】

前記試料は、全血、末梢血、血漿、および血小板が豊富な血漿からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項19】

前記試料は、(a)前記核酸色素に対して浸透性のある細胞、または(b)該核酸色素と接触させる前もしくはその間に、球状化剤との接触によって該色素に対して浸透性となる、該試料中の細胞を含有する、請求項1に記載の方法。

【請求項20】

前記試料は、溶解された細胞を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項21】

前記試料を、前記核酸色素と接触させる前またはその間に、該試料中に存在する無核赤血球を示差的に溶解し、前記血小板および有核細胞集団を維持する少なくとも1つの細胞溶解試薬と接触させる、請求項1に記載の方法。

【請求項22】

前記核酸色素が、メタクロマジー性色素、非メタクロマジー性色素、青色励起性色素、緑色励起性色素、赤色励起性色素、細胞浸透性色素、および細胞非浸透性色素からなる群より選択される、請求項1に記載の方法。

【請求項23】

前記核酸色素が、メタクロマジー性色素を含む、請求項22に記載の方法。

【請求項24】

前記血小板特異的リガンドは、(a)前記核酸色素と区別可能な発光スペクトルを有するか、または(b)該核酸色素と区別可能であるが、重複する発光スペクトルを有する蛍光性標識で標識される、請求項1に記載の方法。

【請求項25】

前記核酸色素はアクリジンオレンジであり、前記リガンド上の前記蛍光性色素はフィコエリトリン-シアニン-7 (PECy-7)またはPE-Alexa750である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

前記試料において総血小板集団を定量するステップをさらに含み、該総血小板集団は、成熟血小板、未成熟な網状血小板、巨大血小板、血小板凝集塊、および血小板サテライトを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項27】

前記リガンドは、モノクローナル抗体またはその断片である、請求項1に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 28】

物理的な洗浄または細胞分離の他の方法を含まない、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 29】

請求項 1 の方法を実行するのに有用なキット。

【請求項 30】

生物学的試料において血小板の集団を同定するための方法であって、

(a) 該生物学的試料を、核酸色素と、血小板上のエピトープに結合する少なくとも 1 つの標識抗血小板リガンドと共に 5 分未満の間インキュベートするステップであって、該リガンド上の標識および核酸色素は蛍光を放つ、ステップ、

(b) 該インキュベートされた試料がフローサイトメーターの感知領域を通過するようにし、該インキュベートされた試料はレーザー光源を用いて照射され、該標識リガンドの蛍光と該核酸色素の蛍光と、光散乱、直流、軸方向光損失、不透明度、および高周波からなる群より独立して選択される少なくとも 1 つの他のパラメーターとを測定するステップ、ならびに

(c) 該標識リガンドの蛍光およびさらなるパラメーターを使用して血小板の集団を同定し、該核酸色素の蛍光およびさらなるパラメーターを使用して同定された該血小板集団をゲーティングすることにより、該試料において未成熟な網状血小板集団を識別または同定するステップ

を含む、方法。

【発明の詳細な説明】**【背景技術】****【0001】**

血小板は、止血に一定の役割を果たすが、3つの一般的なタイプ：巨核球、巨核球の断片化に続いて末梢血に放出される網状（つまり未成熟）血小板、および成熟血小板がある。しかしながら、血小板の他の部分集団が、血液中に存在し、これらは、共通して、典型的な臨床的分析において数えられないか、または数え間違われる。そのような「部分集団」は、巨大血小板（つまり異常に大きな血小板）、血小板凝集塊（つまり多数の血小板が組み合わさったもの）、および血小板サテライト（platelet satellite）（つまり白血球または他の細胞への血小板の付着）を含む。

【0002】

患者の末梢血におけるこれらの様々なタイプの血球および血小板の識別および計数、その比率、ならびにそのある種のパラメーターまたは特徴の決定は、多種多様の血液障害または血液疾患の診断を可能にするのに必要である。異なるタイプの血小板の絶対数、濃度、および相対的パーセンテージは、ある種の疾患状態の存在もしくは不在および/または段階を大いに示す。たとえば、血小板タイプの測定および計数は、成熟化の様々な段階での血小板の異常な存在および/または数によって特徴づけられる多種多様の障害の診断およびモニタリングにとって重要である。たとえば、血小板集団の個々の同定および測定、その比率、ならびにすべての部分集団を含む総血小板数の精密な測定は、血小板新生および血小板代謝回転をモニターするための重要な臨床的有用性を有する。

【0003】

典型的には、成熟細胞のみが、末梢血において検出可能な量で存在する。血小板数が、低く、疑わしげであり、そして/または自動化血球計数器が、警告を示す場合、手作業の血液塗抹標本は、典型的には、十分な血小板が存在するかどうかを決定するためのならびに巨大血小板および/または血小板凝集塊の存在を検証するための唯一の方法である。手作業の計数は、細胞を核酸特異的非メタクロマジー性色素（非特許文献 1、非特許文献 2、非特許文献 3）または核酸特異的メタクロマジー性色素（非特許文献 4 ならびに特許文献 1）と接触させることを含む。メタクロマジー性色素は、広範囲の波長にわたって蛍光を放ち、未成熟な網状血小板を染色するのに特に有用であり、これらは、網状質として圧縮された RNA を含有する。たとえば、新規なメチレンブルーを用いる組織化学的染色において、未成熟な血小板の網状質は、斑状の紫がかった青色のエリアとして現われる。染

10

20

30

40

50

色されたら、血小板はすべて、顕微鏡視野において計数され、網状質を含有する血小板を総血小板のパーセンテージとして表し、網状血小板のパーセンテージとしてそれらを表す (Ingram, M. および Coopersmith, A. 1969年 Brit J Haematol 17巻: 225~228頁)。この手作業の計数手順は手間がかかり、面倒で、ヒトの計数誤差を起こしやすい。

【0004】

血小板分析の他の方法は、フローサイトメトリ技術を用いるものであり、これは、より速く、より信頼できる。そのような技術は、一般に、オキサジンと共に、非メタクロマジー性色素、チアゾールオレンジ (TO)、オーラミンO、およびポリメチンを用いる (Lee, L. G. ら、1986年 Cytometry 7巻: 508~517頁、Watanabe, K. ら、1995年 Eur J Haematol 54巻: 163~171頁、Briggs, C. ら、2004年 Brit L Haematol 126巻: 93~99頁)。メタクロマジー性色素であるアクリジンオレンジ (AO) もまた使用される (Seligman, P. A. ら、1983年 Am. J. Hematol 14巻: 57~66頁、特許文献1)。これらの方法は、成熟血小板および網状血小板を測定するのに有用であるが、ある種の弱点を欠点として持つ。これらの方法は、残りの血液成分から血小板を同定し、分離するためにサイズ (ログ前方散乱) および粒度 (ログ側方散乱) を使用する。メタクロマジー性色素の蛍光発光の幅広い性質は、血小板を同定するための蛍光色素結合体化抗体の使用を妨げた。

【0005】

健常なボランティアからの血液試料において、サイズおよび粒度の使用は、測定において血小板のみを含むのに十分である。しかしながら、ある種の疾患を有する患者からの試料は、血小板集団内にある、混入した赤血球断片を有し、血小板エリアにおいて血小板の数が見かけ上、増加し、そのため、網状血小板のパーセンテージがより低くなる。さらに、巨大血小板、血小板凝集塊、または血小板サテライトが、血小板関連性の欠乏または異常により存在する場合、結果として生じる同定または集団または定量は、フローサイトメーターによって誤って決定され得る。

【0006】

核酸色素を使用する従来のフローサイトメトリ測定法における他の悪化させる問題は、何人かの患者から得られる血液試料における少ない血小板数である。1つの例は、特発性血小板減少性紫斑病と呼ばれる障害であり、患者自身の血小板は、自己抗体で覆われ、単核食細胞系によって除去される。この疾患における統計的に根拠のある網状血小板パーセンテージに十分な血小板を数えるために、大部分の数が依然として赤血球の数となる莫大なデータファイルを取得しなければならない。

【0007】

そのような自動化フローサイトメトリ法はまた、網状血小板を測定する目的のために、非メタクロマジー性核酸色素と同時に血小板特異的抗体をも用いた。たとえば、Bonan ら1993年 Cytometry、14巻: 690~694頁、Matic ら1998年 Cytometry、34巻: 229~234頁、Rinder ら1998年、Blood、91巻: 1288~1294頁、非特許文献3、Balduini, C. L. ら、1999年 Brit J Haematol 106巻: 202~207頁、Stohlawetz, P. ら、1999年 Thromb Haemost 81巻: 613~617頁、Saxonhouse, M. A. ら、2004年 J Pediatr Hematol Oncol: 26巻、797~802頁、Chaoui, D. ら、2005年 Transfusion: 45巻、766~772頁を参照されたい)。例として、560nm を超えるピーク発光を有する蛍光色素結合体化抗体は、488nm レーザーを用いる励起に基づいてRNAに結合し、適切な光学フィルターを使用し、蛍光補正 (fluorescence compensation) を適用することによって500~560nm の検出可能な発光を有する色素チアゾールオレンジ (TO) と共に使用される (Saxonhouse ら2004年、上記に引用)。しかしながら、他の色素は、この方法において

作用しない。たとえば、メタクロマジー性色素 AO は、RNA に結合する場合、約 630 ~ 670 nm のピークを有する、500 nm ~ 700 nm の、幅広い重複する発光を有する。そのため、たとえ蛍光補正も使用したとしても、その範囲に及ぶ発光スペクトルを有する蛍光色素結合体化抗体と共に AO を使用するのには困難である (Practical Flow Cytometry、第 4 版、HM Shapiro (編)、John Wiley & Sons、Hoboken、New Jersey、306 ~ 326 頁の Shapiro, H. M. 2003 年 Nucleic Acid Dyes and their Uses.)。

【0008】

一般に、そのようなフローサイトメトリー法は、長いインキュベーション時間を含み、したがって、そのような方法は、ハイスループット血液学的システムに基づいた使用に適用できない。これは、TO および血小板特異的抗体を用いる、全血中の網状血小板の測定において例示される。抗 CD41 血小板特異的抗体は、15 分間のインキュベーション時間を使用するある刊行物において報告された (Chaouiri ら 2005 年、上記に引用)。同じ試薬は、他の方法において使用されたが、それぞれ 30 および 45 分間の異なるインキュベーション時間が用いられた (Stohlwetz ら 1999 年および Saxo nhouse ら、2004 年、共に上記に引用)。TO および蛍光色素結合体化抗血小板抗体を使用するさらなる刊行物は、抗体が血小板に結合するための 10 ~ 45 分間の範囲のインキュベーション時間を使用する (Bonan ら 1993 年、Matic ら 1998 年、Rinder ら 1998 年、非特許文献 3、Balduini ら 1999 年、すべて上記に引用)。これらの長いインキュベーション時間は、これらのアッセイを、ハイスループット血液学的システムにとって役に立たないものとする。

【0009】

同様に、広範囲の核酸色素結合および血小板以外の血液成分の抗体を用いる表面染色において、インキュベーション時間は、同様に長く、たとえば 30 分間 (特許文献 2) および 15 分間 (特許文献 3) であり、したがって、自動化細胞分析に適していない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0010】

【特許文献 1】米国特許第 6,060,322 号明細書

【特許文献 2】米国特許第 5,047,321 号明細書

【特許文献 3】米国特許第 6,287,791 号明細書

【非特許文献】

【0011】

【非特許文献 1】Kienast, J. および Schmitz, G., Blood (1990 年) 75 巻: 116 ~ 121 頁

【非特許文献 2】Ault, K. A. ら、Am J Clin Pathol (1992 年) 98 巻: 637 ~ 646 頁

【非特許文献 3】Robinson, M. S. C. ら、Brit J Haematol (1998 年) 100 巻: 351 ~ 357 頁

【非特許文献 4】Schmitz, F. J. および Werner, E., Cytometry (1986 年) 7 巻: 439 ~ 444 頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

低い血小板数または干渉条件が、測定の不正確さをもたらし得る臨床的状況における血小板および網状血小板の特異的な同定を増強する迅速な分析方法のための当技術分野における必要性が残っている。機器のスループットを損なわずに、自動化血液学的分析器における実行に適しているような方法の必要性もまた残っている。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 1 3 】

本明細書において記載される方法は、血小板の実質的に同時の染色および抗体結合のための5分間未満の短いインキュベーション時間を含む迅速な分析を可能にする、血小板に結合する標識抗体および/または核酸色素の特有の組み合わせを使用する血小板血液学的分析のための方法の様々な実施形態を提供することによって、当技術分野における必要性に対応する。一実施形態において、迅速な方法は、1分間未満で実行されてもよいインキュベーションおよび染色手順を含む。他の実施形態において、そのプロセスは、30秒間未満で実行される。

【 0 0 1 4 】

一態様として、生物学的試料において血小板集団を同定するための方法は、生物学的試料を、血小板集団上のエピトープおよび抗原に結合する少なくとも1つの標識リガンドと、核酸色素と共に、試料中の細胞が色素に対して浸透性である条件下で5分未満の間インキュベートするステップを含む。インキュベートされた試料がフローサイトメーターの感知領域を通過するようにし、このインキュベートされた試料はレーザー光源を用いて照射される。一実施形態において、少なくとも2つのパラメーター、たとえば光散乱、直流、軸方向光損失、不透明度、高周波、および蛍光を測定する。これらの測定によって生成されるデータを2つのパラメーターの使用によって一般に分析し、試料中の1つまたは複数の血小板集団を他の細胞と区別する。

10

【 0 0 1 5 】

なおさらなる態様または実施形態において、生物学的試料において未成熟な網状血小板の集団を同定するための方法は、生物学的試料を、核酸色素と、血小板上のエピトープに結合する少なくとも1つの標識抗血小板リガンドと共に5分未満の間インキュベートするステップを含み、リガンド上の標識および核酸色素は、蛍光を放つ。インキュベートされた試料がフローサイトメーターの感知領域を通過するようにし、上述のインキュベートされた試料はレーザー光源を用いて照射され、標識リガンドの蛍光および核酸色素の蛍光と、任意選択で、光散乱、直流、軸方向光損失、不透明度、高周波、および蛍光からなる群より独立して選択される少なくとも1つの他のパラメーターとを測定する。上述の試料における血小板集団は、標識リガンドの蛍光およびさらなるパラメーターの測定によって生成されるデータを使用して血小板の集団を同定することによって識別または同定される。その同定された集団をゲーティングし、その後、核酸色素の蛍光およびさらなるパラメーターを使用して生成される測定値を分析することにより、未成熟な網状血小板集団の同定または定量が可能となる。

20

30

【 0 0 1 6 】

他の態様または実施形態において、上記アッセイを使用する方法は、哺乳動物被験体からの生物学的試料においてある種の血小板集団を同定または測定することにより、血小板関連性の疾患の進行の診断およびモニタリングが可能となる。

【 0 0 1 7 】

他の態様および特許請求の範囲の様々な実施形態の利点は、その以下の詳細な説明において開示される。

【 図面の簡単な説明 】

40

【 0 0 1 8 】

【 図 1 - 1 】 図 1 A ~ 1 F は、本明細書に記載のように、血液標本が核酸色素のアクリジンオレンジを用い、抗体を用いないで染色することによる分析のために調製された (1 A、1 C および 1 E)、または血液標本が、抗血小板抗体および A O (1 B、1 D および 1 F) と混合し、インキュベートすることによって調製された、健康な患者由来の試料の 2 パラメーターのヒストグラムの図である。図 1 A は、血小板を同定し、計数するための従来技術のゲーティング戦略である、サイズ / 前方散乱 (F S) 対粒度 / 側方散乱 (S S) を使用したヒストグラムである。この試料中の細胞を、メタクロマジー性色素のアクリジンオレンジ (A O) を用い、抗血小板抗体は用いずに染色した。このヒストグラムは、サイズ (F S) および粒度 (S S) に基づく血小板 (P)、赤血球 (R B C) および白血球

50

(WBC)の分離を示す。血小板は、横長の形の最も下にある集団である(P)。図1Bは、PECy7蛍光標識抗CD41抗血小板抗体およびAOを用いた、本明細書に記載の迅速抗体染色法を使用して調製された試料に用いた、同じFS対SS光散乱のゲーティング戦略を表す図である。サイズ(FS)および粒度(SS)に基づく血小板(P)、赤血球(RBC)および白血球(WBC)の分離は、図1Aの試料と同様に示された。

【図1-2】図1A~1Fは、本明細書に記載のように、血液標本が核酸色素のアクリジンオレンジを用い、抗体を用いないで染色することによる分析のために調製された(1A、1Cおよび1E)、または血液標本が、抗血小板抗体およびAO(1B、1Dおよび1F)と混合し、インキュベートすることによって調製された、健康な患者由来の試料の2パラメーターのヒストグラムの図である。図1Cは、蛍光性抗血小板抗体を使用しない図1Aの試料由来の血小板集団の、サイズ(FS)および抗血小板蛍光(PC7)を表す図である。この場合、血小板は抗血小板抗体で染色されず、したがって輪郭領域(S)は何ら血小板も存在しない、すなわち、蛍光は検出されない。図1Dは、図1Cに示されたものと同様のFS對抗血小板蛍光分析を表す図であるが、この試料は図1Bのために調製された同じ標本であった。この標本において、760~820nmの範囲において放射するPECy7蛍光標識抗CD41抗血小板抗体およびAOを使用して、迅速抗体染色法を用いた。このヒストグラムは、血小板がCD41-PECy7抗血小板抗体と結合した血小板集団の、サイズおよび蛍光を表す。このヒストグラムの血小板は、異なる蛍光性集団(S)と思われる。血小板ではない粒子は、非蛍光性であり、Y-軸に沿った事象として蛍光性血小板の左の、すなわち破片(D)と思われる。

【図1-3】図1A~1Fは、本明細書に記載のように、血液標本が核酸色素のアクリジンオレンジを用い、抗体を用いないで染色することによる分析のために調製された(1A、1Cおよび1E)、または血液標本が、抗血小板抗体およびAO(1B、1Dおよび1F)と混合し、インキュベートすることによって調製された、健康な患者由来の試料の2パラメーターのヒストグラムの図である。図1Eは、図1Aおよび1Cに記載の同じ血液標本の、FS対核酸色素の蛍光を表す図である。このヒストグラムは、赤血球、白血球および網状血小板を含む血小板のサイズおよび蛍光を示す。血小板は円弧のように見え、残りの細胞から十分分離されている。赤血球は、血小板より蛍光が低い。DNAを有する白血球は、測定限界外であり、ヒストグラムの右上角に縦線(WBC)のように見える。示されているように網状血小板は、血小板集団の中でより明るい蛍光性集団である。図1Fは、図1Dのヒストグラムにおいて同定された血小板集団の、FS対核酸色素の蛍光を表す図である。このヒストグラムは、破片および抗血小板抗体染色により同定され、分割された他の細胞(図1D)がない血小板の純粋集団をゲーティングするので、血小板および網状血小板の正確な計数を可能にする。未成熟な血小板である網状血小板は、前方散乱により実証されるようにサイズがより大きく、血小板の網状組織または顆粒の存在のためにAO蛍光がより明るい。

【図2】図2A~2Dは、血液標本が、本明細書に記載の迅速染色法を使用して、抗血小板抗体(抗CD41-PECy7)およびAOと混合し、共にインキュベートすることによって分析するために調製された、健康な患者由来の試料の、2パラメーターのヒストグラムである。図2Aは、光散乱のみ、すなわち前方散乱(FS)対側方散乱(SS)を使用して試料を分析したヒストグラムである。血小板を、Pと名付けた領域に同定した。図2Bは、FS對抗血小板抗体蛍光を使用して、同じ試料を分析したヒストグラムである。このヒストグラムは、染色された血小板(S)と、破片(D)および抗CD41-PECy7蛍光を有する他の細胞との分離を実証する。図2Cは、血小板集団を、FS対AO蛍光を使用して、図2Aにおいて同定された血小板集団についてのゲーティングにより分析した図である。この得られたヒストグラムは破片(D)領域を示す。図2Aのような、サイズ(FS)および粒度(SS)の使用により破片が含まれ、計算において網状血小板のパーセントがより低く、すなわち16.6%になり、これは、血小板集団の分析のための光散乱のみの使用の限界である。図2Dは、FS対AO蛍光を使用した、図2Bのヒストグラムにおいて「S」としてすでに同定された破片を除いた、純粋な血小板集団を分析し

10

20

30

40

50

た図である。図 2 B の F S および抗血小板の蛍光領域は、破片 (D) を排除する。したがって、図 2 D のヒストグラムは、血小板の改善された分割および網状血小板のより高いパーセント、すなわち 22.6% を提供する。

【図 3】図 3 A ~ 3 D は、血液標本が、本明細書に記載の迅速染色法 (抗血小板抗体および核酸色素との混合およびインキュベーション) に従って分析するために調製された、別の健康な患者由来の試料の、図 2 A ~ 2 D に示すヒストグラムと同様の 2 パラメーターのヒストグラムである。図 3 A は、前方散乱 (F S) 対側方散乱 (S S) を表し、光散乱パラメーターのみの使用による血小板および R B C の分離を示すヒストグラムである。図 3 B は、図 3 A において使用した同じ患者の試料に関する血小板集団の、F S 対抗血小板抗体の蛍光を表す図である。図 3 B における血小板は、抗 C D 4 1 P E C y 7 と結合した。このヒストグラムは、血小板と、破片および抗 C D 4 1 P E C y 7 蛍光を有する他の細胞との分離を実証する。図 3 C は、光散乱のみにより図 3 A において同定された血小板集団の、F S 対 A O 蛍光分析を表し、23.0% の網状血小板集団の評価をもたらす図である。図 3 D は、図 3 C とは対照的に、抗体染色により図 3 B において同定された、染色された血小板の純粋集団の、F S 対 A O 蛍光を表す図である。F S 対 A O 蛍光により評価された図 3 B の集団は、同じ患者の試料に関して、より正確でより高いパーセントの網状血小板、すなわち 25.4% を提供する

【図 4】図 4 A ~ 4 F は、血液標本が、他の従来技術の方法に従って、または抗血小板抗体および核酸色素を使用した本明細書に記載の迅速染色法を使用して分析するために調製された、同じ健康な患者由来の試料の 2 パラメーターのヒストグラムである。これらのヒストグラムは、健康なボランティアの試料中の血小板集団 (P) に存在するいずれの破片からも血小板を同定し、分割し、計数するための、抗血小板抗体を用いた迅速抗体染色法を例示し、従来技術の方法による結果と比較する。図 4 A は、血小板の分割および計数のために、いずれの抗体も用いずに調製した試料に関する前方散乱 (F S) 対側方散乱 (S S) を表す図である。健康なボランティアの試料における血小板 (P)、赤血球 (R B C) および白血球 (W B C) の分離を、サイズ (F S) および粒度 (S S) に基づき示す。血小板は、横長の形の最も下にある集団 (P) である。図 4 B は、血小板に対して特異性を有さない蛍光性抗体を試料と混合した試料に関する F S 対 P C 7 蛍光を表す図である。血小板は染色されなかったため、輪郭領域 (S) にはいずれの血小板も存在しない。2 パラメーターの使用では、血小板集団は同定されなかった。図 4 C は、760 ~ 820 nm の範囲で放射する P E C y 7 蛍光標識抗 C D 4 1 抗血小板抗体および A O を用いた迅速染色法を使用して調製された試料についての F S 対抗血小板 (P C 7) 蛍光を表す図である。このヒストグラム中の血小板は、異なる蛍光性集団のように思われる。血小板ではない粒子は非蛍光性であり、Y 軸に沿った事象として蛍光性血小板の左に見える (D)。この領域は、抗体を用いて染色された患者試料を測定した場合の事象において増加する。図 4 D は、試料が A O で染色され、抗体で染色されなかった被験体の血小板集団の F S 対 A O 蛍光を例示する図である。この血小板集団を、図 4 A において光散乱のみにより同定した。血小板は円弧のように見え、残りの細胞から十分分離されている。プロットは図 4 A からの血小板集団に基づいて (ゲーティングされて) いるので、赤血球および白血球は見ることができなかった。示されているように、網状血小板は、血小板集団の中でより明るい蛍光である。図 4 E は、試料が非特異的抗体により染色されない、図 4 B の試料の血小板集団の、F S 対 A O 蛍光分析を表す図である。したがって、図 4 B のヒストグラムが、血小板集団を同定しなかったため、図 4 E のヒストグラムは A O 蛍光を示さない。図 4 F は、P E C y 7 蛍光標識抗 C D 4 1 抗血小板抗体および A O を用いて染色され、図 4 C に記載のように単離された試料の F S 対 A O 蛍光を表す図である。血小板集団は、図 4 C において抗血小板抗体染色によって同定され、分割されたため、純粋血小板集団と関連付けることによって網状血小板の正確な計数が可能である。抗血小板特異的抗体の不在下で測定した網状血小板 (16.4%、図 4 D) および抗血小板特異的抗体の存在下で測定した網状血小板 (22.1%、図 4 F) は、健康なボランティアの試料において同様である。しかし、この集団は図 4 D の集団より正確に同定され、より高い。

10

20

30

40

50

【図5】図5A～5Fは、軽度の血小板減少症を有する患者から得た試料に由来する、2パラメーターのヒストグラムである。すべての試料は、迅速染色法に従って、少なくとも1種の抗血小板抗体（抗CD41および/または抗CD61）および核酸色素AOを用いて調製した。図5Aは、PECy7蛍光標識抗CD41抗血小板抗体およびAOを用いて染色された試料の、前方散乱（FS）対抗血小板蛍光のパラメーターを表す図である。図5Bは、PECy7蛍光標識抗CD61抗血小板抗体およびAOを用いて染色された試料である以外は同様の分析の図である。図5Cは、PECy7蛍光標識抗CD41抗血小板抗体およびPECy7蛍光標識抗CD61抗血小板抗体およびAOを用いて染色された試料である以外は同様の分析の図である。図5Dは、図5Aにおいて同定された血小板集団についてゲーティングし、21.5%の網状血小板を示す、FS対AO蛍光のパラメーターを表すヒストグラムである。図5Eは、図5Bにおいて同定され、21.9%の網状血小板を示す血小板集団の、FS対AO蛍光分析を表す図である。図5Fは、図5Cの2種の抗血小板抗体を使用して同定され、23.5%の網状血小板を示す血小板集団の、FS対AO蛍光分析を表す図である。

10

【図6】正常なボランティアおよび患者における網状血小板値の分布を例示するグラフである。各記号は1個人を表す。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本明細書において記載される方法は、生物学的試料における1つまたは複数の血小板集団の自動で迅速な分析および同定を可能にする。この方法は、低い血小板数または干渉条件のいずれかが、測定の不正確さをもたらし得る臨床的状况において総血小板集団および血小板のサブセットの特異的な同定および/または定量を増強する。さらに、このアッセイ方法は、機器のスループットを損なわずに、自動化血液学的分析器へのこの方法の組み込みを可能にする迅速な染色を用いる。この方法は、試料中の血小板および他の細胞の迅速な染色を可能にする標識抗血小板リガンドおよび核酸色素の組み合わせを通して、当技術分野における現在の血小板同定アッセイに対するその利点を達成する。この方法は、最小数のアッセイ成分を使用しながら、血小板集団の最大数を同定し、および/または他の細胞からの血小板集団のより正確な分離を可能にする血液学的分析のために設計される。一実施形態において、この方法は、試料中の未成熟な網状血小板の集団の迅速で精密な同定を可能にする。

20

30

【0020】

本明細書において使用されるように、「血小板集団」は、成熟血小板集団、未成熟な網状血小板集団、巨大血小板集団、血小板凝集塊の集団、および血小板サテライトの集団などのような個々の血小板部分集団を含む。活性化血小板および休止（非活性化）血小板を含む総成熟血小板は同定される。一実施形態において、上記の血小板部分集団のすべてから成る総血小板集団は、同定されるおよび/または測定される。方法はまた、上記に示される血小板部分集団の2つ以上の集団を同定するために用いられてもよい。

【0021】

このアッセイ方法は、試料中の細胞が色素に対して浸透性である条件下での、少なくとも1つの標識抗血小板リガンドまたは血小板特異的リガンドおよび核酸色素との生物学的試料の迅速なインキュベーションを含む。結果として生じるインキュベートされた試料は、レーザー光に曝露され、パラメーターデータは収集される。その後は、血小板集団の識別は、たとえば抗血小板蛍光および核酸の蛍光を含むパラメーター測定値の組み合わせおよび評価に基づく。

40

【0022】

A. 迅速なインキュベーション

1. 生物学的試料

「生物学的試料」は、血小板を含有する任意の哺乳動物細胞含有懸濁液を含む。そのような標本または試料は、血液細胞および非血液細胞を含むことができる。例示的な試料は、全血、末梢血、血漿、および血小板が豊富な血漿を含む。そのような試料は、限定を伴

50

うことなく、全血、末梢血、血漿、血小板が豊富な血漿、骨髓吸引液、リンパ節組織、脾臓組織、脳脊髄液、皮膚組織、粘膜組織、胸腔穿刺液、胸膜液、および脊髄液を含む。しかしながら、分析のための血小板集団を含有する任意の懸濁液、組織、または体液は、このアッセイにおいて用いられてもよい。血液学的な（つまり血液）細胞集団は、成熟したおよび未成熟な変異体および異型の白血球および赤血球、網状赤血球、有核赤血球、様々な血小板集団、網状血小板、ならびに巨核球を含む。血液において、異型細胞は、骨髓球、未成熟な顆粒球、杆状球、芽細胞、異型リンパ球、変異リンパ球、有核赤血球、巨大血小板、血小板凝集塊、および血小板サテライトなどの様々な形態を含む。一実施形態において、有核細胞集団は、有核赤血球および有核白血球を含む。非血液細胞は、とりわけ、上皮細胞および内皮細胞を含む。試料はまた、任意選択で、細胞破片および非細胞凝集物を含有していてもよい。

10

【0023】

好ましくは、生物学的試料は、正常であるまたは疾患、有害な環境刺激、たとえば発癌物質に対する反応により、もしくは治療処置の結果として異型細胞集団を含有するヒト全血もしくは末梢血または血漿もしくは血漿が豊富な試料である。本明細書において記載される方法はまた、限定を伴うことなく、イヌおよびネコなどのような家畜（domestic animal）ならびに農場動物（farm animal）またはとりわけウマなどのような、より大きな哺乳動物を含む他の哺乳動物からの試料の分析において用いられてもよい。

【0024】

一実施形態において、試料は、方法において使用される核酸色素に対して自然に浸透性のある細胞を含有する。あるいは、方法の実行のために、試料中の細胞は、下記に記載されるように、アッセイの実行に先行して、試料調製の間色素に対して浸透性となる。他の実施形態において、試料は、溶解された細胞を含有する。

20

【0025】

一実施形態において、試料はまた、緩衝液などのような他の成分を含有してもよい。適した緩衝液は、約6～約9の範囲に、インキュベーションおよびパラメーター測定の間試料のpHを維持するものを含む。望ましくは、約7～約7.5の範囲のpHは、試料において維持される。さらに、そのような緩衝液はまた、方法の1つまたは複数のリガンドまたは色素成分の濃度を調節するために使用されてもよい。本明細書において記載される方法において利用することができる緩衝液の例は、限定を伴うことなく、ISOTON II、Coulter Corporation、Miami、FLまたはその他同種のものなどのようなリン酸緩衝生理食塩水または等張生理食塩水を含む。米国特許第3,962,125号を参照されたい。これは、参考として本明細書によって援用される。適切な緩衝液の選択は、迅速な染色法を限定しない。

30

【0026】

この迅速な染色法における使用のために、生物学的試料容量は、システムの必要量に適合させるために変更することができるが、好ましくは、約10 μ L～約150 μ Lの範囲とする。特に、試料容量は、少なくとも約20、30、40、50、60、70、80、90、100、110、120、130、または140 μ Lとすることができる。

40

【0027】

2. リガンド

本明細書において使用されるような用語「リガンド」は、血小板集団上に存在する、指定される標的、たとえばエピトープ、抗原、または受容体に結合するタンパク質、ペプチド、または核酸配列を一般に指す。ある実施形態において、リガンドは、クラスIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEの高度に特異的なポリクローナル、モノクローナル、合成、または組換え抗体、抗体の2つのタイプまたは種の組み合わせによって形成されるキメラ抗体、ならびにヒト抗体バックボーン内に他の種の抗体可変領域を含有するヒト化抗体である。すべてのそのような抗体は、血小板上に発現されるエピトープまたは抗原または細胞表面受容体に向けられる。他の実施形態において、このアッセイにおいて有

50

用なりリガンドはまた、上記のタイプの抗体のうちの1つのFab断片、Fab'断片、F(ab')²断片、fd断片、またはFc抗体断片などのような抗体断片とすることもできる。他の実施形態において、リガンドは、単鎖可変抗体断片である。他の適したリガンドは、相補性決定領域(CDR)を含む組換え構築物または血小板集団上に発現される標的エピトープもしくは標的抗原に結合する抗体の機能的に等価な結合特徴を保持するのに十分なCDRを共有する構築物である。

【0028】

一実施形態におけるこのアッセイにおいて使用される用語「血小板特異的リガンド」は、血小板集団上で専ら発現され、または異なる血小板集団上で示差的に発現されるエピトープ、抗原、または受容体に特異的に結合するリガンドである。血小板上で専ら発現されるエピトープ、抗原、または受容体は、赤血球、白血球、上皮細胞、または内皮細胞上で発現されない。たとえば、専ら血小板で発現されるエピトープまたは抗原または受容体の中には、CD41(GPIIb)、CD61(GPIIIa)、CD42b(GPIb)、CD42a(GPIX)、CD42d(GPV)、CD42bCD42a(GP1bIX)、CD42bCD42aCD42d(GPIb-IX-V)、CD41CD61(GPIIb-IIIIa)、およびCD62p(P-セレクチン/GMP-140)と命名されるタンパク質があり、これらは、血小板集団のみを特徴づけることが公知である。したがって、このタイプの血小板特異的リガンドの例は、抗GPIbモノクローナル抗体、抗GPIXモノクローナル抗体、抗GP1bIXモノクローナル抗体、抗GPIIb-IIIIaモノクローナル抗体、抗GPIVモノクローナル抗体、もしくは抗GMP-140モノクローナル抗体またはその部分である。血小板特異的エピトープまたは抗原はまた、上記に同定された抗原の断片をも含む。上記に定義されるような血小板特異的エピトープまたは抗原はまた、血小板のある種のサブセット上でのみ発現され、または血小板のある種のサブセット上で示差的に発現されるそれらの抗原をも含む。たとえば、CD62pは、休止血小板上でよりも活性化血小板上で高い密度で発現される受容体であり、したがって、抗CD62pは、本明細書において記載される方法において血小板のこれらの2つのサブセットを区別するために用いられてもよい。

【0029】

用語「抗血小板リガンド」は、血小板上でおよび少なくとも1つのさらなる細胞集団上で発現され、または示差的に発現されるエピトープ、抗原、または受容体に結合するリガンドを指す。ある種のエピトープは、血小板上で示差的に発現されてもよく、また、2つ以上のさらなる細胞集団上で示差的に発現されてもよく、そのようなエピトープに結合するリガンドは、下記に記載されるように同定のための様々なパラメーターを使用して多数の細胞タイプを同定するために使用されてもよい。たとえば、さらなる細胞集団は、赤血球、白血球、上皮細胞、または内皮細胞から選択することができる。一実施形態において、血小板および赤血球上で発現され、または示差的に発現されるエピトープまたは抗原は、限定を伴うことなく、以下のエピトープ、抗原、またはその断片を含む：CD36、CD47、CD55、CD58、CD99、CD111、およびCD147。したがって、方法における使用のためのこのタイプの適した抗血小板リガンドは、とりわけ抗CD36抗体、抗CD47抗体、抗CD55抗体、抗CD58抗体、抗CD99抗体、抗CD111抗体、および抗CD147抗体またはその部分を含む。

【0030】

他の実施形態において、血小板および白血球上で発現されるエピトープまたは抗原は、限定を伴うことなく、以下のエピトープ、抗原、またはその断片を含む：CD9、CD17、CD31、CDw32、CD36、CD49、CD51、CDw60、CD84、CD114、およびCD151。したがって、このタイプの示差的に発現される抗血小板リガンドは、たとえば抗CD84抗体、抗CDw32抗体、もしくは抗CD49抗体またはその部分である。

【0031】

他の実施形態において、血小板および上皮細胞上で発現されるエピトープまたは抗原は

10

20

30

40

50

、限定を伴うことなく、以下のエピトープ、抗原、またはその断片を含む：CD 9、CD w 17、CD 29、CD 46、CD 47、CD 49 b、CD 55、CD 60 b、CD 82、CD 98、CD 99、CD 110、CD 111、CD 112、CD 151、およびCD 165。したがって、このタイプの示差的に発現される抗血小板リガンドは、たとえば抗CD w 17抗体、抗CD 112抗体、もしくは抗CD 49 b抗体またはその部分である。

【0032】

他の実施形態において、血小板および内皮細胞上で発現されるエピトープまたは抗原は、限定を伴うことなく、以下のエピトープ、抗原、またはその断片を含む：CD 31、CD 114、CD 151、およびPECAM - 1。したがって、このタイプの示差的に発現される抗血小板リガンドは、抗PECAM - 1抗体、抗CD 31抗体、抗CD 114抗体、もしくは抗CD 151抗体またはその部分である。

10

【0033】

一実施形態において、方法は、1つの血小板特異的リガンドまたは1つの抗血小板リガンドを用いる。他の実施形態において、方法は、2つ以上の異なる血小板特異的リガンドを用いる。他の実施形態において、方法は、2つ以上の異なる抗血小板リガンドを用いる。他の実施形態において、方法は、血小板上の異なる決定基に結合する血小板特異的リガンドおよび抗血小板リガンドを用いる。他の実施形態において、そのようなリガンド（またはリガンドの組み合わせ）は、血小板上の抗原決定基の異なる発現に基づいて成熟した血小板および未成熟な血小板を、それらが成熟し、老化すると共に識別することができる。互いに関連する個々のリガンド/抗体特異性およびさらなる測定されるパラメーターは、単一の分析において最大の情報を提供することができる。血小板上のみのまたは血小板および他の血球上の抗原決定基に結合するこれらのリガンド/抗体の様々な組み合わせの使用は、正常および異型細胞タイプの中のさらなる同定および区別を可能にする。

20

【0034】

この方法の様々な実施形態における使用のために選択されるリガンドは、下記に定義されるように、検出可能な標識を用いて典型的には標識される。方法において使用されるリガンド/抗体の最適濃度は、選択される標識、所望の染色強度、反応速度論、および1つのみまたは2つの蛍光色素標識を有する多数の抗体を使用する場合の、蛍光チャンネルの間の蛍光キャリーオーバーに基づいて定義される。そのような濃度は、本発明の教示を考慮して、当業者によって決定することもできる。

30

【0035】

望ましくは、リガンド/抗体は、生物学的試料を有する単一反応混合物への混合のために設計される。

【0036】

3. 標識

この迅速な染色法において使用されるそれぞれのリガンドまたは抗体は、選択される検出可能な標識と結合または連結される。一実施形態において、標識は、蛍光性標識である。他の実施形態において、標識は、非蛍光性標識である。多数の標識リガンドが使用される実施形態において、蛍光性および非蛍光性標識の両方の組み合わせが用いられる。そのような標識は、限定を伴うことなく、蛍光色素、蛍光性および非蛍光性ビーズ、蛍光性または非蛍光性コロイド粒子、量子ドット、ならびに蛍光共鳴エネルギー転移(FRET)標識を含む。

40

【0037】

一実施形態において、検出可能な標識は、蛍光性標識、つまり診断アッセイにおいて共通して使用される蛍光色素である。リガンド/抗体を標識するのに有用な共通して使用される蛍光色素は、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、Alexa 488、フィコエリトリン(PE)、PE-シアニン-5(PC5)、PE-シアニン-7(PC7)、PE-テキサスレッド(ECD)、およびペリジニン-クロロフィル-タンパク質(PerCP)などのような青色励起性蛍光色素ならびにアロフィコシアニン(APC)、Alexa 647、およびAPC-Cy7などのような赤色励起性蛍光色素を含む。他

50

の有用な蛍光色素は、タンデム色素、たとえばPE - シアニン - 5 . 5、PE - Cy 7、PE - Alexa 750、およびローダミンを含む。Alexa色素もまた、タンデム色素ではないが、有用である。とりわけテキサスレッドおよびローダミン、FITC + PE、FITC + PECy 5、ならびにPE + PECy 7などのような、そのような標識の組み合わせは、フローサイトメトリー装置において用いられるレーザーのタイプに依存して使用されてもよい。他の蛍光色素は、方法において用いられてもよく、赤字、青色、紫色、もしくは緑色の波長またはその組み合わせの照射によって励起性となるものを含んでいてもよい。多数の蛍光色素は、入手可能な蛍光色素から独立して選択されてもよい。

【0038】

あるいは、ビオチン - アビジンまたは一次および二次標識抗体などのような間接的な標識方法は、同様の効果を達成するのに有用である。

10

【0039】

これらの蛍光性標識はすべて、市販で入手可能であり、それらの使用は、当技術分野で公知である。他の蛍光性標識は、他の供給源から入手可能であってもよく、今後開発されてもよい。そのような蛍光性色素または蛍光色素は、下記の実施例の例示的な蛍光性標識と同じ様式の方法において有用であることが予想される。

【0040】

それぞれの蛍光色素は、特徴的な「発光スペクトル」を有し、この部分は、特徴的な「ピーク発光スペクトル」となる。本明細書において使用されるように、用語「発光スペクトル」は、励起された場合に蛍光色素が放つ、それぞれの周波数の電磁放射の量を一般に意味する。一般に、発光スペクトルは、ナノメートルで普通測定される、ある種の周波数のバンドによって形成される範囲またはプロファイルである（つまり波長）。本明細書において使用されるように、用語「ピーク発光スペクトル」は、ナノメートルで最大波長として普通測定される、発光スペクトルの最も強い部分を意味する。任意の所与の蛍光色素の（および狭い発光スペクトルを有するほとんどの核酸色素の）ピーク発光スペクトルは、公知であり、Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、第6版、R. P. Haugland編、Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 1996年; Pierce Catalog and Handbook, Life Science and Analytical Research Products, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1994年/1995年) Molecular Probesおよび他の同様のテキストまたは対応するウェブサイトなどのような、当業者らに公知であり、参考として本明細書に援用されるそのような蛍光色素を記載する刊行物から容易に得られる。任意の所与の蛍光色素のピーク発光スペクトルはまた、分光光度計を使用してスペクトル走査を実行することによって得られてもよい。したがって、ある実施形態において、この方法において使用されるリガンド上の標識は、方法において使用される他の蛍光色素標識および/または核酸色素と重複ピーク発光スペクトルを有していてもよい。

20

30

【0041】

リガンド、たとえば抗体と標識を連結または結合するための方法は、同様に、従来のものであり、当業者らに公知である。標識結合の公知の方法は、記載されている（たとえば、とりわけHandbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、第6版、R. P. Haugland、Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 1996年、Pierce Catalog and Handbook, Life Science and Analytical Research Products, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1994年/1995年）、米国特許第6,692,968号、および第5,164,311号を参照されたい。したがって、連結方法の選択は、本発明を限定しない。

40

【0042】

50

方法の様々な実施形態によれば、1つの蛍光色素は、用いられる単一のリガンドを標識するために使用される。あるいは、同じまたは異なる蛍光色素は、方法において使用される多数のリガンド（たとえば1つまたは複数の抗体）を標識するために用いられる。標識として選択される蛍光色素の正体は、組成物における2つ以上の抗体を標識するために同じ蛍光色素または異なる蛍光色素が使用されるかどうかによって依存する。同じ蛍光色素が、1つを超える抗体を標識するために使用される場合、それぞれの抗体は、「重複ピーク発光スペクトル」を有するであろう。同一の蛍光色素の間のそのような重複は、補正不可能であるまたは分離不可能である。2つ以上の蛍光色素が使用される場合、それぞれ異なるピーク発光スペクトルを有する、異なる蛍光色素が選択されてもよく、これらは、任意選択で、重複ピーク発光スペクトルであってもよい。一実施形態において、方法における1つの抗体上の蛍光色素標識のピーク発光スペクトルは、他の抗体を標識するために使用される蛍光色素のピーク発光スペクトルと重複して、補正不可能なスペクトル発光を形成してもよい。

10

20

30

40

50

【0043】

重複発光スペクトルによって形成されるスペクトルパターンに適用されるような語句「補正不可能な」、「分解不可能な」、または「分離不可能な」は、2つの抗体を標識する蛍光色素のピーク発光スペクトルの重複によって形成されるスペクトルパターンが、成分のピーク発光スペクトルに分離することができない、または分解することができないことを意味する。一実施形態において、重複スペクトルパターンは、現在の光学または色補正法（光学もしくは電子）によって分離可能ではない。したがって、結果として生じる補正不可能なスペクトルパターンは、その成分の蛍光色素ピーク発光スペクトルのいずれかと異なり、異なる血小板または他の血球サブセットもしくは集団を同定するヒストグラムを作成するために、組成物において使用される抗体および/または色素の異なる細胞特異性を用いる分析法において用いることができる。補正不可能な重複スペクトル発光パターンを形成する適したペアの蛍光色素は、限定を伴うことなく、青色励起性ペア：FITCおよびAlexa488、PEおよびCy3、PC5およびPeCy5、PC5およびPerCP、PeCy5およびPerCP、PC7およびPeCy7ならびに赤色励起性ペア：APCおよびAlexa647を含む。異なる色の2つのレーザーが蛍光性分析において使用される場合、適した蛍光色素ペアは、限定を伴うことなく、PC7およびAPC-Cy7ならびにPeCy7およびAPC-Cy7を含む。

【0044】

あるいは、重複ピーク発光スペクトルを有していない異なる蛍光色素ペアを使用してもよい（以後、「非重複」蛍光色素と呼ぶ）。たとえば、使用のための選択される、連結される蛍光色素（1つまたは2つのレーザーを使用）は、PE（ピーク発光スペクトル約575nm）+PECy5（ピーク発光スペクトル約670nm）、PE+APC（ピーク発光スペクトル約660nm）、FITC（ピーク発光スペクトル約520nm）+PE、APC+PECy7（ピーク発光スペクトル約770nm）、およびPE+PECy7を含む。これらのペアの蛍光色素はすべて、非重複ピーク発光スペクトルを有する。補正不可能な重複発光スペクトルもしくは補正可能な重複発光スペクトルまたは重複しない発光スペクトルを有する蛍光色素ペアのこれらのリストは、代表的なもののみであり、網羅的なリストを含むことを企図しない。当業者は、本明細書のさらなる教示を考慮して、本明細書において記載される方法における使用のための適切な蛍光色素の組み合わせを容易に選択することができるはずである。

【0045】

迅速な染色法の一実施形態において、上記に示される（1つまたは複数の）リガンドと結合体化する標識は、方法において用いられる核酸色素と区別可能である発光スペクトルを有する蛍光性標識である。他の実施形態において、血小板特異的または抗血小板リガンドは、核酸色素と重複発光スペクトルを有する蛍光性標識で標識される。後者の実施形態において、そのような重複発光スペクトルは、方法において使用される蛍光性標識または核酸色素の少なくとも1つのピーク発光スペクトルで補正可能であってもよいもしくは分

解可能であってもよいまたは補正可能でなくともよいもしくは分解可能でなくともよい。

【0046】

他の非蛍光性標識は、この迅速な染色法において用いられてもよい。たとえば、抗体は、たとえば放射性化合物、化学発光標識、ビオチンなどのようなタンパク質、酵素、FLAGなどのような分子標識などを用いて標識されてもよい。たとえば、Chubert RG、Brizzard BL、1996年Biotechniques 20巻(1号): 136~141頁およびKnappik A、Pluckthun A、1994年Biotechniques 1994年; 17巻(4号): 754~761頁を参照されたい。検出可能な標識の他の要素は、他の成分との相互作用に際してシグナルを生成するのに有用な基質、たとえばストレプトアビジンおよびホースラディッシュペルオキシダーゼ系を含む。適した標識は、幅広い、慣習的に用いられる検出可能な診断標識の中から選択される。

10

【0047】

望ましい一実施形態において、本明細書において記載される方法において使用される蛍光色素は、PE-Cy7である。

【0048】

4. 核酸色素

本明細書において記載される迅速な染色法は、下記に定義されるように、試料中の細胞に浸透することができ、核酸を迅速に染色することができる核酸色素を利用する。核酸特異的色素は、それらのRNAまたはDNA結合能力に基づいてある種の波長の蛍光を放つ(Flow Cytometry and Sorting、第2版、MR Melamed、T Lindmo、およびML Mendelsohn(編)、Wiley-Liss Inc、New York、291~314頁のDarzynkiewicz、ZおよびKapusinski J 1990年「Acridine orange: A versatile probe of nucleic acids and other cell constituents.」)。

20

【0049】

本発明において有用な蛍光性色素に関して、用語「発光スペクトル」は、上記の蛍光色素について定義されるのと同じように定義される。いくつかの色素は、200nmを超えてわたる幅広い「ピーク」と共に幅広い発光スペクトルを有する。他の色素は、狭いピーク発光スペクトルを有する。そのような色素の発光スペクトルはまた、当技術分野においても公知であり、多種多様の周知のテキストにおいて公開されている。たとえばFlow Cytometry and Sorting、第2版、MR Melamedら(編)、Wiley-Liss Inc、New York、291~314頁のDarzynkiewicz、ZおよびKapusinski J(1990年)Acridine orange: A versatile probe of nucleic acids and other cell constituents、Shapiro、Howard M.(2003年)Practical Flow Cytometry 第4版、Wiley-Liss、Hoboken、NJ 296~297頁、Invitrogenウェブサイト: www.invitrogen.com を参照されたい。

30

40

【0050】

蛍光性色素は、一実施形態において、核酸色素である。他の実施形態において、蛍光性色素は、細胞親和性色素である。一実施形態において、核酸または色素は、細胞浸透性色素である。色素は、メタクロマジー性もしくは非メタクロマジー性、または細胞浸透性もしくは非細胞浸透性であってもよい。用語「細胞浸透性」は、組成物または反応混合物中の透過剤のさらなる存在を必要とすることなく、細胞膜に容易に浸透し、細胞の成分を染色する色素を表すものとする。典型的には、細胞浸透性色素は、生きている細胞または溶解されていない細胞の成分を染色するために利用される。

【0051】

50

他の実施形態において、蛍光性色素は、赤色、緑色、紫色または青色励起波長領域内の細胞非浸透性色素などの細胞非浸透性色素である。方法の実施形態におけるこの色素の使用は、下記に提供されるように、細胞を溶解するための、試料の前処理が一般に伴う。

【0052】

さらなる実施形態において、蛍光性色素は、挿入色素および/またはメタクロマジー性色素である。たとえば、Urbanら、2000年 Acta. Histochem. 102巻: 259~272頁において示されるメタクロマジー性色素を参照されたい。

【0053】

さらなる実施形態において、蛍光性色素は、非メタクロマジー性色素である。用語「非メタクロマジー性色素」は、所定の波長で照射された場合に励起および/または発光の単一の波長を提供する蛍光性色素を表すものとする。

【0054】

様々な態様において有用な蛍光性色素は、上記の特徴の組み合わせを共有していてもよい。たとえば、この方法の一実施形態において、核酸色素は、メタクロマジー性、細胞浸透性である青色励起性核酸色素のアクリジンオレンジである。他の有用な色素は、非メタクロマジー性、非細胞浸透性である青色励起性核酸色素のヨウ化プロピジウムである。他の有用な色素は、青色の約488nm波長において励起する、非メタクロマジー性細胞浸透性核酸色素のチアゾールオレンジである。フルオレセインジアセテートは、核酸色素ではないが、非メタクロマジー性細胞浸透性の酵素基質色素である、他の青色励起性色素である。ローダミン123は、方法のある種の実施形態において有用な青色励起性の非メタクロマジー性細胞浸透性ミトコンドリア色素である。赤色励起性SYTO61色素は、約633nmで励起する非メタクロマジー性細胞浸透性核酸色素である。同様に、赤色励起性色素TO-PRO-3は、迅速な染色法のある種の実施形態において有用な非メタクロマジー性非細胞浸透性核酸色素である。

【0055】

本明細書において記載される方法の様々な実施形態において利用されてもよい他の蛍光性色素の例は、限定を伴うことなく、ピロニンY色素、アクリジン色素、ノニルアクリジンオレンジ色素(3,6-ビス-(ジメチルアミノ)-10-ノニルアクリジニウムブロミド、Molecular Probes、Eugene、OR)、およびアクリジン赤色色素(ピロニンB、Sigma-Aldrich Corp.、St. Louis、MOとしても市販で入手可能);チアゾールオレンジ色素(Becton Dickinson、Franklin Lakes、NJ);ヨウ化プロピジウム(3,8-ジアミノ-5-(3-ジエチルアミノプロピル)-6-フェニル-ニョウ化フェナントリジニウム、Sigma-Aldrich Corp.、St. Louis、MO);エチジウムブロミド(Sigma-Aldrich Corp.、St. Louis、MO);ヨウ化ヘキシジウム(Molecular Probes、Eugene、OR);ジヒドロエチジウム(Molecular Probes、Eugene、OR);エチジウムモノアジド(Molecular Probes、Eugene、OR)、トルイジンブルー色素(2-アミノ-7-ジメチルアミノ-3-塩化メチルフェノチアジニウム、Sigma-Aldrich Corp.、St. Louis、MO);TOPRO-3色素;YOPO-1色素;SYTO(商標)17色素およびSYTO(商標)59色素~SYTO(商標)64色素などのようなSYTO(商標)色素;TOTO-1色素およびTOTO-3色素などのようなTOTO(商標)色素;PO-PRO-3色素;YOYO-1色素などのようなYOYO(商標)色素;BOBO(商標)色素;POPO-3色素などのようなPOPO(商標)色素;キサンテン色素;カルボシアニン色素;Astra Violet FRを含むポリメチン色素;チオフラビンT;プソイドイソシアニン(pseudoisocyanine);オキサカルボシアニン色素;アジン色素;ジフェニルメタン色素;メチン色素;オキサジン色素;シアニン色素;スチリル色素;およびヒドロシスチルバミジン(Molecular Probes、Eugene、OR)を含む。これらの色素の多くおよび本明細書において記載される方法において利用することができる他

10

20

30

40

50

のものは、Molecular Probes Inc. (Eugene, Oregon) から市販で入手可能である。米国特許第 5, 563, 070 号を参照されたい。これは、参考として本明細書によって援用される。

【0056】

非メタクロマジー性色素の例は、限定を伴うことなく、とりわけ、ニュートラルレッド色素 (3-アミノ-7-ジメチルアミノ-2-メチルフェナジン塩酸塩、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)、Basic Orange (商標) 21 色素 (Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)、DiOC 色素 (1, 1'-ジメチルオキサカルボシアニン、Molecular Probes, Eugene, OR)、Pyronin (商標) Y 色素 (Polysciences, Inc., Warrington, PA)、Methylene Blue (商標) 色素 (3-ビス-(ジメチルアミノ)-フェノチアジン-5-イウムクロリド、Molecular Probes, Eugene, OR)、Auramine (商標) O 色素 (4, 4'-(イミドカルボニル)-ビス-(N,N-ジメチルアニリン)-塩酸塩、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO)、LDS (商標) 751 色素 (キノリンイウム, 6-(ジメチルアミノ)-2-[4-[4-(ジメチルアミノ)フェニル]-1,3-ブタジエニル]-2-エチル過塩素酸塩、Molecular Probes, Eugene, OR)、赤色系列色素、およびその組み合わせを含む。たとえば、様々な Beckman Coulter カタログ; The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products、第 6 版、R.P. Haugland、Molecular Probes、Eugene, OR を参照されたい。ある種の色素は、いくつかの状況においてメタクロマジー性色素とすることができ、他の状況において非メタクロマジー性色素とすることができることに注目されたい。

10

20

【0057】

本明細書において記載された方法および組成物において利用することができるメタクロマジー性色素の例は、限定を伴うことなく、とりわけキサンテン色素、カルボシアニン色素、Astra Violet FR を含むポリメチン色素、チオフラビン T、プソイドイソシアニン、オキサカルボシアニン色素、アクリジン色素、アジン色素、ジフェニルメタン色素、メタン色素、オキサジン色素、シアニン色素、およびスチリル色素を含む。たとえば、Urbanら、2000年 Acta. Histochem. 102 巻: 259 ~ 272 頁において示されるメタクロマジー性色素を参照されたい。

30

【0058】

750 nm を超えるピーク発光波長を有する (1 つまたは複数の) 蛍光色素の新しいタンデム色素の最近の生産により、蛍光色素結合体化リガンドとのメタクロマジー性色素の使用が可能になる。たとえば、下記の実施例において実証されるように、抗血小板リガンドまたは血小板特異的リガンドと結合体化するそのタンデム蛍光色素 PE-Cy7 との核酸色素 AO の使用は、この方法におけるインキュベーションの間の迅速な染色を可能にする。この組み合わせの使用は、750 nm を超える、著しく過剰な AO 結合 DNA 発光を引き起こす血小板 DNA がいない血小板活動領域において適合する。

40

【0059】

したがって、迅速な染色法の一実施形態において、蛍光性色素は、アクリジンオレンジまたはノニルアクリジンオレンジである。他の実施形態において、色素は、チアゾールオレンジである。他の実施形態において、色素は、ヨウ化プロピジウムである。他の実施形態において、色素は、アクリジンレッドまたはトルイジンブルー色素である。

【0060】

一実施形態において、蛍光性色素の発光スペクトルは、方法において使用される 1 つまたは複数の蛍光色素標識の 1 つまたは複数のピーク発光スペクトルと重複する。他の実施形態において、核酸色素およびリガンド上の標識の発光スペクトルは、非重複である。

【0061】

50

本明細書において記載される方法の一実施形態において、使用される核酸色素は、アクリジンオレンジであり、蛍光色素は、P E C y 7である。色素および蛍光色素の様々な組み合わせは、以下の実施例において使用されるアクリジンオレンジおよびP E C y 7について記載されるのと同じ様式において、迅速な染色法において使用されてもよい。

【0062】

5. インキュベーション条件

試料、リガンド、および色素の間の接触のためのインキュベーション時間が、一実施形態において、約5分間未満であることはこの方法の利点である。一実施形態において、試料およびリガンドおよび色素の間のアッセイインキュベーション時間は、約1分間である。他の実施形態において、インキュベーション時間は、30秒間未満である。この方法はまた、少なくとも5秒間、10秒間、15秒間、20秒間、30秒間、40秒間、50秒間、1分間、1.5分間、2分間、2.5分間、3分間、3.5分間、4分間、4.5分間、または4.9分間以内のインキュベーション時間を使用して実行されてもよい。同様に、インキュベーション時間は、分および5秒間以内の秒で表される時間の任意の小数部分とすることができる。

10

【0063】

個々の抗体および試薬の濃度を調節して、処方物に球状化剤 (s p h e r i n g a g e n t) の使用を組み込み、混合を最適化する場合、約1分間の反応混合物の反応時間が達成される。この種の迅速な反応時間は、研究所において実証されており、自動化ハイスループットシステムに必要とされる。

20

【0064】

反応混合物の成分は、室温でインキュベートすることによって反応させる。温度は問題とならないが、一般に周囲の温度が用いられる。他の実施形態において、温度は、約37まで変動してもよいが、但し、試料における細胞の生存能に十分なものとする。

【0065】

本明細書において記載されるアッセイのインキュベーションステップの他の条件は、方法において使用されるリガンドおよび核酸色素の試薬の濃度を含む。一実施形態において、リガンド/抗体の濃度を増加させると、試料とのインキュベーション時間が短縮される(または反応速度が増大する)。したがって、リガンドの濃度が高くなるほど、インキュベーション時間は短くなる、つまり、より迅速なアッセイとなる。一実施形態において、約10~約200 μ Lの試料に対して、約0.1~約2 μ gのそれぞれのリガンド/抗体が添加される。他の実施形態において、リガンドは、約0.1~約2 μ g / 100 μ L試料の間の濃度で存在する。

30

【0066】

核酸色素の濃度および性質は、インキュベーション時間の迅速性に影響を与え得る。たとえば、色素が細胞浸透性である場合、アッセイ時間は縮小される。典型的には、このアッセイにおいて試料中の核酸色素の濃度は、約0.3~約2.0 μ g / m lである。他の実施形態において、試料中の核酸色素の濃度は、約0.6 μ g / m lである。核酸色素は、反応混合物中に導入される。抗体濃度、血液容量、インキュベーション時間および/または混合時間を適切に調節すると、それよりも低い濃度または高い濃度が可能である。この方法において用いられるリガンドの種類および数もこの方法の迅速性に影響を与え得る。

40

【0067】

迅速な染色法の一実施形態において、試料中の細胞を、アッセイ試薬、特に核酸色素に透過性になるように、試料を球状化剤と接触させる。この接触は、核酸色素および抗血小板リガンドまたは血小板特異的リガンドとインキュベートする前またはその間に行われる。球状化剤は、当業者によって容易に選択することができる。望ましくは、球状化試薬は、赤血球および網赤血球を等容性で (i s o v o l u m e t r i c a l l y) 球状化し、透過性を増加させる両性イオン性界面活性剤である。そのような試薬はまた、界面活性剤としても作用することができる。球状化剤の例は、リン酸緩衝生理食塩水などのような緩

50

衝液を有する溶液中に適当に存在する非イオン性界面活性剤ドデシル - D - マルトシド、アルキルアミドベタインもしくはラウロアミドプロピルベタイン、ココアミドプロピルベタイン、およびココアミドスルホベタインなどのようなアルキルベタインなどのような両性イオン性作用物質、N - テトラデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、またはN - ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネートを含む。米国特許第 5 , 6 3 3 , 1 6 7 号および第 5 , 4 3 8 , 0 0 3 号を参照されたい。これらは、参考として本明細書によって援用される。血液試料内の細胞を等容性で球状化するために、試料における球状化試薬の濃度は、最も好ましくは、約 3 $\mu\text{g} / \text{ml}$ ~ 約 5 0 $\mu\text{g} / \text{ml}$ であり、mOsmは、約 2 0 0 ~ 約 4 0 0 mOsm、好ましくは約 2 5 0 mOsm ~ 約 3 5 0 mOsmの範囲である。しかしながら、当業者は、選択される界面活性剤を考慮に入れて、細胞を等容性で球状化するために必要とされ、または所望されるように、この濃度および容量オスモル濃度を容易に調節してもよい。

10

【 0 0 6 8 】

細胞をも透過性にするいくつかの界面活性剤および洗浄剤もまた、インキュベーションに先立ってまたはその間に、試料との混合のために用いられてもよい。界面活性剤の例は、限定を伴うことなく、陰イオン性界面活性剤アンモニウムペルフルオロアルキルカルボキシレート (Fluorad (登録商標) FC - 1 4 3 (3 M Company, Minneapolis, Minnesota)) として市販で入手可能)、ナトリウムラウロイルミリストイルラクチレート (Pationic (登録商標) 1 3 8 C (R . I . T . A . Corp, Woodstock, Illinois)) として市販で入手可能) または非イオン性界面活性剤ドデシル - D - マルトシド、N , N - ビス [3 - D - グルコン - アミドプロピル) コールアミド、ポリオキシプロピレン - ポリオキシエチレン - ブロック共重合体、N - テトラデシル - D - マルトシド、ダコニール - N - メチル - グルカミド、n - ドデシル - D - グルコピラノシド、n - デシル - D - グルコピラノシド、ステアリン酸のポリエチレングリコールエステル、エトキシ化ココモノグリセリド、オクチフェノキシポリ (エチレンオキシ) エタノール、エトキシ化オクチフェノール、および直鎖アルコールまたは陽イオン性界面活性剤ココヒドロキシエチルイミダゾリン、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、デシルトリメチルアンモニウムプロミド、オクチルトリメチルアンモニウムプロミドまたは両性イオン性界面活性剤ラウルアミドプロピルベタイン、N - テトラデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、N - ドデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、ココアミドプロピルベタイン、ココアミドスルホベタイン、N - ドデシル N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネート、N - テトラデシル - N , N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホネートを含む。洗浄剤の例は、限定を伴うことなく、非イオン性洗浄剤を含む。

20

30

【 0 0 6 9 】

他の細胞透過剤もまた、細胞非浸透性色素が細胞膜に浸透することを可能にするために、方法の様々な実施形態において含むことができる。望ましくは、これらの成分は、全組成の約 0 ~ 約 1 % の間の濃度で使用される。

【 0 0 7 0 】

迅速な染色法の代替の実施形態において、(1 つまたは複数の) リガンドおよび色素に対して透過性ではない細胞を含有する試料について、試料は、試料中に存在する無核細胞を示差的に溶解し、血小板および有核細胞集団を維持する少なくとも 1 つの細胞溶解試薬と、リガンドおよび色素とのインキュベーションに先立ってまたはその間に接触させられる。有核細胞集団は、有核赤血球および白血球を含む。有核細胞、特に血小板の内因性または外因性の特性を変化させることを伴わない試料 / 反応混合物中の無核細胞の異なる溶解および溶解反応の随意のクエンチングは、色素および (1 つまたは複数の) リガンドとの試料のインキュベーションの前にまたはその一部として行われてもよい。

40

【 0 0 7 1 】

細胞溶解系は、典型的には、核酸色素が非浸透性色素である場合に用いられる。いくつ

50

かの実施形態において、細胞溶解系は、単一の細胞溶解試薬を含むことができる。他の実施形態において、細胞溶解系は、細胞溶解剤およびクエンチ試薬などのような2つの試薬を含む。いくつかの実施形態において、細胞溶解系は、3つの試薬、細胞溶解剤、クエンチ試薬、および固定試薬を含むことができる。

【0072】

(1つまたは複数の)細胞溶解試薬は、ERYTHROLYSE II試薬(Beckman Coulter, Inc.)、試薬を同定する目的のために参考として援用される米国特許第5,882,933号において開示される溶解試薬を含むが、これらに限定されない。本明細書において記載される方法において有用な細胞溶解系は、第2の試薬、たとえば、方法の残りのステップの間に、たとえば、試料が、トランスデューサーモジュールの開口部を流れている間に、細胞溶解試薬の影響をクエンチまたは阻止するものを含むことができる。有用な細胞溶解阻止剤は、溶解剤に依存して選択されてもよく、速度が問題である場合のみ、おそらく用いられてもよい。そのような細胞溶解阻止剤の例は、Stablyse(商標)試薬(Beckman Coulter, Inc.)である。細胞溶解阻止試薬は、変えることができるが、但し、細胞溶解反応のクエンチングの主要な条件ならびに興味のある細胞の抗原決定基ならびに所望される電気的および光学的特性の維持が達成されるものとする。他の細胞溶解系は、市販されており、Immunoprep(商標)系(米国特許第5,030,554号; Beckman Coulter, Inc.)、Versalyse(商標)系、Facslyse(商標)系(Becton Dickinson)、または塩化アンモニウム系を含む。これらの系は、本明細書

10

20

【0073】

一実施形態において、インキュベーションは、溶解/クエンチ反応を含み、これは、約4~10秒間の間、上記に定義されるように、細胞溶解系または細胞溶解試薬と試料/抗体混合物の一部を接触させることを含む。数秒間の後、細胞溶解系の効果は、その後、記載されるようなクエンチング試薬を用いて阻止されるかまたはクエンチされ、RBCは溶解する。試料が、サイトメトリ/血液学的分析器の開口部を流れている間、クエンチング試薬は、一般に、試料に接している。この第2の試薬は、したがって、少なくとも数秒間、混合物に接している。従来固定試薬はまた、細胞溶解試薬の選択または方法の好ましい実行に依存して用いられてもよい。細胞溶解試薬、クエンチ試薬、および固定試薬の容量は、所望の場合、使用される細胞溶解系の正体に依存して当業者によって容易に選択することができる。

30

【0074】

迅速な染色およびインキュベーションのための他の条件の中には、試料への試薬の追加の順序がある。一実施形態において、(1つまたは複数の)リガンド/抗体は、最初に試料に追加され、その後、核酸色素、その後、他の成分が追加される。その後、単一反応混合物は、試料中に存在する無核赤血球を示差的に溶解し、試料中の血小板集団を維持する随意的細胞溶解試薬とおよび/または球状化試薬と接触させられる。最後に、随意的クエンチングまたは固定性試薬は、追加されてもよい。あるいは、他の実施形態において、細胞溶解試薬または球状化試薬は、(1つまたは複数の)リガンドおよび色素の追加に先立って試料に最初に追加される。他の実施形態において、すべての試薬は、同時に追加される。迅速な染色の迅速性により、すべての試薬を実質的に同時に追加する後者のプロセスは好ましい。

40

【0075】

反応混合物のインキュベーションならびに細胞溶解サイクルおよびクエンチサイクル(リガンド/色素試薬とのインキュベーションの前にまたはその間に行われてもよい)は、好ましくは、完全に自動化される。

【0076】

B. パラメータ測定および分析

生物学的試料における正常および異型の両方の血小板集団、特に未成熟な網状血小板の

50

迅速な同定および分析のための方法は、上記に定義される迅速に染色される試料/色素/(1つまたは複数の)リガンド反応混合物および以下のステップを使用して実行される。必要であれば、いくつかのステップは手動で実行されてもよいが、好ましくは、方法は、完全に自動化される。

【0077】

迅速な染色およびインキュベーションに続いて、結果として生じる試料/リガンド/色素反応混合物は、細胞分析器、多パラメータースイスループットフロー血液学的分析器またはフローサイトメーターのたとえばトランスデューサーの単一フロー開口部中の感知領域を通過する。トランスデューサーは、単一の分析ステップにおいて、細胞について、それらが、トランスデューサーモジュールの単一の開口部を通過する時に、多数の関連する測定(電気的、蛍光性、および光学的)を行うことができる。サイトメーターは、多数のパラメータを測定する。試料は、これらの測定によって生成されるデータを使用して分析される。一般に、少なくとも2つのパラメータの測定によって生成されるデータは、抗血小板リガンド上の標識、たとえば、選択されるリガンドと結合体化または結合する標識の蛍光の検出または定量的検出および核酸色素によって放たれるシグナル、たとえば蛍光の検出を可能にする。さらなるパラメータは、上記に言及される2つのパラメータと組み合わせて測定され、分析されてもよい。一実施形態において、通過ステップは、多数の(少なくとも2つの)異なるパラメータについて混合物を測定する単一のステップである。フローサイトメーターの感知領域は、レーザー光源を用いて、インキュベートされた試料を照射する。パラメータは、同じでも異なってもよく、リガンド上の標識の正体および色素によって放たれるシグナルに依存して、蛍光の1つもしくは複数のチャンネル、1つもしくは複数の光学的パラメータ、1つもしくは複数の電気的パラメータ、またはその組み合わせを含む。その後は、それぞれの細胞集団は、同定され、光散乱、直流、軸方向光損失、不透明度、高周波、または蛍光であるこれらのパラメータのうちの少なくとも2つを使用して計数され、試料について測定される。

【0078】

たとえば、一実施形態において、細胞の蛍光は、好ましくは、個別の多数の波長の範囲内で測定され、これらは、試料中の血小板および他の細胞に結合する抗体を標識するために使用される色素または蛍光色素のそれぞれの蛍光発光スペクトルによって決定される。したがって、蛍光分析は、細胞が、細胞集団を同定するためにトランスデューサーを通過する時に個々の細胞についてなされる、少なくとも1つの同時に測定される電気的または光学的測定と組み合わせられる。このように、血小板集団は、試料中に存在する場合、溶解および非溶解画分のさらなる分離ならびに異なるトランスデューサーの試料中の異なる細胞についてなされる異なる測定の相互関係の必要性を伴わないで得られる。

【0079】

一実施形態において、蛍光分析は、試料において、蛍光標識血小板特異的抗体が結合した血小板の非血小板からの同定を可能にし、少なくとも1つの血小板集団の同定を可能にする。他の実施形態において、核酸色素の蛍光の測定は、未成熟な血小板の同定を可能にする。血小板集団の、より精密な測定の利点は、抗血小板抗体蛍光が、他の破片から血小板の純粋な集団を単離し、同定するために実行され、その後、純粋な血小板集団中の未成熟な血小板集団を同定するための核酸色素の蛍光が使用される場合に、見出される。これは、本明細書において記載される図において理解することができる。

【0080】

さらなるパラメータは、光学的パラメータ、たとえば一般に1つの散乱光、たとえば側方散乱または前方散乱を含む。しかしながら、散乱光がある種の血小板集団の測定においてそれほど精密ではないので、散乱光のみを使用する測定は、好ましくない(図を参照されたい)。単一の蛍光色素のみが用いられる場合、散乱光の1つを超える角度が、使用されてもよい。散乱光の角度は、約10~70度の間の散乱光、つまり中程度の角度の散乱光(MALS);約10~20度の間の散乱光、つまりより低い中程度の角度の散乱光(LMALS);約20および約70度の間、つまりより高い中程度の角度の散乱光(

10

20

30

40

50

UMALS)、または約80~100度の間の散乱光、名目上直角の、つまり側方散乱(SS)、約2~18度の間の低角度の前方散乱および軸方向光損失または吸光度から選択されてもよい。

【0081】

電気的パラメーターは、一般に、直流電気的インピーダンス測定容量である(DC)。あるいは、電気的パラメーターは、不透明度とすることができ、これは、DC容量にわたる細胞の高周波として計算される。これらのパラメーターは、同一出願人による米国特許第5,125,737号において詳細に議論され、定義されており、これは、参考として本明細書に援用される。

【0082】

上記のフローサイトメトリーのステップは、手動で、部分的に手動で実行されてもよく、部分的に自動化されてもよいまたは完全に自動化されてもよい。あるそのような自動化フローサイトメトリー機器は、参考として本明細書に援用される米国特許第6,228,652号において記載され、これは、前述の細胞特徴、つまりDC容量、RF伝導性(不透明度)、散乱光、および蛍光特徴をすべて同時に決定することができ、それによって、個別のトランスデューサーから集められるデータを関連させるためのあらゆる必要性を回避する自動化機器を開示する。電気的測定は、DC(直流容量/インピーダンス)およびRF(高周波)から成る。光学的測定は、光散乱および蛍光を含む。散乱光測定は、低い、中程度の、および高い前方の角度の測定ならびに直角(90度/側方散乱)の測定を含むように、それぞれの細胞について収集される散乱の多数の角度から成ってもよい。蛍光測定は、2つまたは3つの光電子増倍管または検出器(PMT)での蛍光発光の収集によってなされる。

【0083】

望ましくは、様々な実施形態の分析を実行するのに有用であるのは、電気的、光学的、および蛍光パラメーターを測定する血液学的機器である。たとえば、参考として本明細書に援用される米国特許第6,228,532号において記載される機器を参照されたい。例示的な実施形態において、532nm緑色ダイオードレーザーは、有用なフロー血液学的システムにおいて照明源として使用される。しかしながら、当業者にとって、代替の輝線を有するレーザー、たとえば633nmもしくは647nmレーザーなどのような赤色レーザー、488nmレーザーなどのような青色レーザー、または405nmレーザーなどのような紫色レーザーを、代用することができ、蛍光色素は、適切に調節される。色素は、レーザーシステムに適合させてもよい。

【0084】

結果として生じるデータは、上記に同定される血小板集団または部分集団の1つまたは複数を同定し、任意選択で定量するために必要とされる情報を提供する。他の非血小板細胞もまた同定されてもよい。この方法によれば、それぞれの細胞集団は、単一反応混合物における蛍光の蛍光分析において検出可能な発現の異なるパターンを利用して、少なくとも2つのパラメーターによって同定される。たとえば、2つのパラメーターは、抗血小板リガンド蛍光を同定する蛍光のチャンネルおよび側方散乱などのような光学的パラメーターであってもよい。細胞集団を同定するために使用されてもよい他の2つのパラメーターは、蛍光の2つのチャンネルであってもよい。細胞集団を同定するために使用されてもよい他の2つのパラメーターは、蛍光のチャンネルおよび電気的パラメーター、たとえばDCであってもよい。細胞集団を同定するために使用されてもよい他の2つのパラメーターは、光学的パラメーター、たとえばSSおよび電気的パラメーター、たとえばDCであってもよい。単一反応混合物についてなされる測定のさらなる組み合わせは、この方法において使用される特定の蛍光色素、色素、抗体、光学的、および電気的パラメーターに依存して、当業者にとって明白である。これらの分析ステップは、望ましくは、自動化プロセスにおけるアルゴリズムの中に組み込まれる。

【0085】

C. 集団識別

10

20

30

40

50

このアッセイ方法によれば、未成熟な網状血小板などのような血小板集団は、白血球、網状赤血球、未成熟な網赤血球、細胞破片、および非細胞凝集物を含む、試料中に存在していてもよい1つまたは複数の集団を有する混合物から区別される。同様に、アッセイ方法は、1つを超える血小板集団が同定されることを可能にする。試料中のこれらの血小板集団は、他のパラメーターに対してあるパラメーターをプロットする、測定されたデータから生成されるヒストグラムの検討に際して同定される。

【0086】

一実施形態において、血小板集団は、抗血小板蛍光によって、他の血球、細胞破片、および非細胞凝集物と識別される。他の実施形態において、成熟血小板は、散乱光および抗血小板蛍光のパラメーターによって測定されるように、サイズおよび粒度によって未成熟な血小板と区別される。他の実施形態において、網状血小板は、核酸色素の蛍光を測定することによって成熟血小板と区別される。他の実施形態において、抗血小板蛍光は、血小板集団を同定するために用いられ、その後、その集団は、未成熟な血小板集団を精密に測定し、同定するために、それ自体、核酸色素の蛍光を使用してさらに分析される。

10

【0087】

一実施形態において、この評価に使用されるパラメーターは、前方および側方散乱ならびに最低限の少なくとも2つの蛍光のチャンネルを含む。収集されたチャンネルのそれぞれの蛍光発光パターンは、反応混合物における、色素のみ、蛍光色素結合体化モノクローナル抗体のみ、または色素および少なくとも1つの蛍光色素結合体化モノクローナル抗体のスペクトルの追加の代表的なものである。しかしながら、方法はまた、散乱光および蛍光の測定と共に、インピーダンス(DC)および伝導性(RF)のVCSパラメーターを用いてもよい。上記に示されるように、多くの適したレーザーは、蛍光を励起するために用いられてもよく、488nm青色アルゴンレーザー、緑色532nmレーザー、または色素が赤色励起性蛍光色素と結合体化した抗体と組み合わせて使用される赤色励起性色素である場合、赤色レーザー(633nm、635nm、640nm、もしくは644nm)を含む。

20

【0088】

混合物における少なくとも1つの抗体/リガンド上の少なくとも1つの蛍光色素標識のピーク発光スペクトルが、色素発光スペクトルと重複して、補正不可能な新しいスペクトルパターンを形成する場合、検出系の任意のチャンネルにおいて検出された、結果として生じる蛍光シグナルは、色素のみ、(1つもしくは複数の)蛍光色素結合体化抗体のみ、または色素および少なくとも1つの蛍光色素結合体化抗体の付加的な蛍光の補正不可能な産物の蛍光発光の特徴となる。

30

【0089】

以下の表Iは、方法を使用して、互いに、以下の血小板集団および部分集団を同定し、区別するためにゲーティング手順において使用されてもよいパラメーターを示す。選択されるパラメーターは、リガンドおよびその標識の正体ならびに特定の核酸色素ならびに分析器において用いられるレーザーに関係する。標識リガンドおよび核酸色素ならびにレーザーの選択とのパラメーターの関係は、当業者に公知であり、本明細書において提供される教示を考慮して容易に選択される。表Iにおいて示されるように、2つのパラメーターのセットは、核酸色素、たとえばAOおよび選択されるリガンドを標識する所望の蛍光色素、たとえばPE-Cy7を用いる本発明の方法においてある種の細胞または血小板サブセットを同定するために使用されてもよい。一実施形態において、表Iは、本明細書において記載される方法において示される細胞タイプのうちの任意の2つを区別またはゲーティングするために用いることができるパラメーターのそれらのペアを同定するのに有用である。2つの細胞タイプの間で共通したパラメーターのセットが使用されるであろう。たとえば、本明細書において記載される方法の一実施形態において、同定のために、成熟血小板および血小板サテライトの細胞タイプを選択した場合、表において明示されるように、2つの細胞タイプの間で共通したパラメーターのセット、たとえば前方散乱および蛍光のセットを使用することができる。

40

50

【 0 0 9 0 】

【 表 1 】

表 1

試料中の細胞タイプ	同定するパラメーター
成熟血小板	前方散乱および抗血小板蛍光、側方散乱および蛍光、直流および不透明度、不透明度および蛍光、直流および高周波、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光; 前方散乱および側方散乱
未成熟な網状血小板	前方散乱および核酸色素蛍光、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、高周波および蛍光、不透明度および蛍光、軸方向光損失および蛍光
巨大血小板	前方散乱および側方散乱、前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および不透明度、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
血小板凝集塊	前方散乱および側方散乱、前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および蛍光、直流および不透明度、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
血小板サテライト	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
活性化血小板	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
総血小板集団	前方散乱および側方散乱、前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および不透明度、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
白血球または赤血球	前方散乱および側方散乱、前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および不透明度、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
網状赤血球	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
未成熟な網赤血球	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
細胞破片	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、不透明度および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
非細胞凝集物	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、不透明度および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光

10

20

30

40

【 0 0 9 1 】

この方法は、試料中の血小板集団を定量ならびに同定することをさらに含む。一実施形

50

態において、成熟血小板、未成熟な網状血小板、巨大血小板、血小板凝集塊、および血小板サテライトを含む、試料中の総血小板集団は、他の公知の血小板測定アッセイを使用して達成することができるよりも正確に定量される。

【0092】

一実施形態において、方法は、約1~100 μ Lのヒト血漿試料に、シアニン7に連結されたフィコエリトリン(PE-Cy7)を用いて標識された抗血小板抗体および核酸色素アクリジンオレンジを追加することを含む。PE-Cy7は、メタクロマジー性アクリジンオレンジを超える発光バンド幅を有する。これらの発光スペクトルは、この方法における同時の使用のための色素および標識の選択を可能にする。さらに、血小板中のDNAの不在は、色素の幅広い発光の強度を低下させ、抗体染色の蛍光シグナル対ノイズ比を結果的に増加させる。標識リガンドは、使用される抗体に依存し、従来滴定によって当業者によって決定される濃度で1~50 μ Lの容量で追加される。核酸色素は、約0.5~2.0mLの容量で0.1~1.0 μ g/mLの濃度で球状化または他の緩衝液中で一般に追加される。インキュベーションは、試料への試薬の追加に続いて、随意の球状化剤の存在下において、60秒間以下の時間、室温で実行される。血小板の表面への抗体の結合時間は、細胞の抗体染色に通常付随する通常の10分から10秒間以内に縮小される。球状化剤の存在下におけるメタクロマジー性色素の30秒間未満の速い結合と組み合わせ(たとえば米国特許第6,060,322号を参照されたい)、この迅速な抗体染色法は、メタクロマジー性色素を用いる血小板集団の測定に対する特有のアプローチである。このインキュベーションに続いて、混合物は、電気的、光学的、および蛍光測定値が得られる、フロー/血液学的分析器の感知領域を通過する。結果として生じるデータは、とりわけ成熟血小板数、網状血小板数、および未成熟な血小板画分を決定するために使用される。方法のこの実施形態は、物理的な洗浄または物理的な細胞分離の他のステップを欠く。方法が、そのようなさらなるステップを用いないので、それは、他の方法よりも、自動化システムの迅速な実行に、より適している。

10

20

30

40

50

【0093】

血小板特異的抗体がリガンドとして用いられる方法の実施形態において、リガンドは、血小板に特異的であり(またはそれが、血小板集団に示差的に結合する場合、抗体の集団に)、他の血液成分を染色しない。この特徴は、単に、染色された血小板から蛍光シグナルを取得し、その後、この集団の色素蛍光を測定することによって、血球または破片の残りから血小板を同定し、分離するために使用することができる。この方法は、測定時間を短縮し、スループットを増加させ、獲得したファイルのサイズを最小限にする。

【0094】

なお別の実施形態において、方法は、全血における網状血小板測定に有用である。全血中の血小板成分が、血小板の活性化または損失のあらゆる可能性を最小限にするその自然環境において存在しているので、全血は、使用のための最適な試料である。網状血小板測定は、状態が、血小板の骨髄機能不全または血管破壊のうちの一つであるかどうかを決定するために、低い血小板数を有する患者においてより必要となるので、低い血小板数を有する試料は、統計的に意味のある結果に十分な計数を得るためにより長い測定時間を必要とするであろう。全血が使用される場合、測定は、血小板と共に存在する赤血球の莫大な数に影響される。これは、網状血小板値を低下させるであろう、血小板との赤血球の同時の計数を予防するために血液試料の高度な希釈を必要とする。さらに、獲得したデータファイルは、多くの赤血球の包含により巨大となる。そのため、先行技術の方法における、低い血小板数を有する全血試料は、より長い測定時間によりスループットを損なうであろう。

【0095】

本発明の方法によれば、赤血球の影響を減らすために、全血試料は、赤血球を除去するために溶解されるかまたは血球成分の残りから血小板を取り出すために物理的に分離され、それによって、試料における血小板の割合を増加させる。両方の調製用の方法は、網状血小板の測定のための方法のこの実施形態に随意の追加のステップを導入する。溶解方法

について、抗血小板抗体および核酸色素は、全血試料に追加され、その後、網状血小板への色素結合を促進するために、溶解ステップおよび球状化緩衝液における再懸濁が続く。方法は、その後、成熟血小板と共に網赤血球（未成熟な赤血球）を同時に同定するために、前方散乱、側方散乱、直流、および蛍光の選択されるパラメーターを使用して、上記に記載されるように実行される。表 I を参照されたい。

【0096】

核酸色素と組み合わせた、蛍光色素結合体化抗血小板特異的抗体との血小板の結合を用いることによる、本明細書において記載され、下記の実施例において示される方法は、非血小板集団からの血小板の分離および同定の改善をもたらす。この方法は、一般に間違った結果をもたらす、血小板集団内にある混入した赤血球断片によって特徴づけられる特発性血小板減少性紫斑病または他の疾患などのような疾患について、より一貫した、より信頼できる網状血小板値を可能にする。したがって、このアッセイは、総血小板集団の精密な定量に基づいて障害を診断するのに有用である。

10

【0097】

他の実施形態において、上記に記載される方法の様々な成分は、自動化機器での、この方法の即座の実行のためにキットにおいて組み合わせられてもよい。したがって、使用のために組み合わせられたことがない色素、リガンド、および標識の組み合わせは、これらの方法の実行において有用な組成物を形成してもよい。

【実施例】

【0098】

以下の実施例は、生物学的試料中の血小板集団の同定および定量化のための、迅速染色法の様々な態様を例示する。これらの実施例は、添付の特許請求の範囲により定義される範囲を限定するものではない。

20

【0099】

（実施例 1）

網状血小板を同定および染色する方法。

【0100】

A . 試料の調製

i . 迅速染色調製物

本明細書において述べられ、図において例示される研究それぞれに関して、蛍光色素結合体化抗血小板抗体、たとえば抗 CD 4 1 (0 . 5 μ g / m L) または抗 CD 6 1 (0 . 5 μ g / m L) を、ヒト全血液のアリコート (約 2 5 μ L) に加えた。各抗体リガンドに結合体化された標識は、蛍光色素のフィコエリトリン - シアニン 7 (P e C y - 7) であった。結合体化は従来の方法によった。各抗体 / 試料の混合物を、周囲温度において 1 0 秒を超えない間インキュベートした。

30

【0101】

以下および図面に記載の試料に適切な場合、その後、抗体により染色された試料のアリコート (約 2 μ L) を、球状化緩衝液 (0 . 5 から 2 . 0 m L) 中のメタクロマジー核酸色素のアクリジンオレンジ (0 . 1 ~ 1 . 0 μ g / m L) に加え、混合し、速やかに測定した。抗体結合から核酸染色までの全反応を、6 0 秒未満で完了した。

40

【0102】

i i . 比較試料の調製

実験に使用する他の試料は、抗血小板抗体と混合しない、または同様の方法で非特異的抗体 (同じ蛍光色素と結合体化したアイソタイプ抗体) と混合する、あるいは上記の比率で A 0 のみと混合するかのいずれかであった。このような試料を、記載の迅速法により調製された試料との比較のために使用した。

【0103】

B . 分析

1 つの分析の実行のために、血液標本を、核酸色素のアクリジンオレンジを用い、抗体なしで染色することによって、健康な被験体由来の試料から調製した。「試験」標本は、

50

上記のパート A に記載の同じ被験体から調製した。

【 0 1 0 4 】

各試料のアリコート（約 1 ~ 2 m l ）を、F 5 0 0 フローサイトメーター（B e c k m a n C o u l t e r ）に導入し、複数の蛍光性、光学的および電氣的パラメーターを測定した。その結果得たデータを分析し、図において同定したヒストグラムを作成した。2 パラメーターの評価によって血小板集団を同定するヒストグラムにおいて、記載のように、その血小板集団を別の 2 パラメーターを使用してさらに評価し、血小板のサブセットを同定した。

【 0 1 0 5 】

図のヒストグラムは、健康なボランティアの試料および血小板減少症の臨床試料の双方において血小板集団（P）に存在するあらゆる破片からも、血小板を同定し、分割し、計数するための、抗血小板抗体を用いた迅速抗体染色法を例示する。本明細書において報告されたヒストグラム（すべて 2 パラメーター）は、光散乱のみの評価、または血小板を同定するための他の組み合わせを使用する従来技術の結果と比較する。

10

【 0 1 0 6 】

第 1 の実験において、健康な被験体の試料を、上記の試料の調製に従って、メタクロマジー性色素のアクリジンオレンジ（A O）を用い、抗血小板抗体は用いずに染色した。血小板を同定し、計数する従来のゲーティング戦略は、細胞集団を同定するために、光散乱パラメーター、たとえばサイズ / 前方散乱（F S）対粒度 / 側方散乱（S S）を用いた。得られたヒストグラム（図 1 A）は、サイズ（F S）および粒度（S S）に基づく、血小板（P）、赤血球（R B C）および白血球（W B C）の分離を示した。血小板は、楕円形の最も下にある集団（P）であった。同じ試料調製物を F S および P E C y 7 蛍光のパラメーターを使用して評価した場合、血小板は抗血小板抗体で染色されず、したがって、得られたヒストグラム（図 1 C）にどのような血小板もない、すなわち蛍光は検出されなかった。同じ試料調製物を、F S 対核酸色素の蛍光のパラメーターを使用して評価した場合、得られたヒストグラムは、赤血球、白血球および網状血小板を含む血小板のサイズおよび蛍光を示した。血小板は円弧のように見え、残りの細胞から十分分離されている。赤血球は、血小板より蛍光が低かった。D N A を有する白血球は、測定限界外であり、図 1 E のヒストグラムの右上角に縦線（W B C）のように見える。示されているように網状血小板は、血小板集団の中でより明るい蛍光性集団である。

20

30

【 0 1 0 7 】

同じ被験体の血液試料を、上記のパート A の方法に従って、迅速染色法において P E C y 7 蛍光性標識抗 C D 4 1 抗血小板抗体および A O を使用して調製した場合、サイズ（F S）および粒度（S S）に基づく血小板（P）、R B C および W B C の同様の分離を検出する（図 1 B）。F S 対抗血小板蛍光のパラメーターを、7 6 0 ~ 8 2 0 n m の範囲で放射する P E C y 7 蛍光性標識抗 C D 4 1 抗血小板抗体および A O を使用して迅速抗体染色法に供したこの試料に用いた場合、得られたヒストグラムは異なる結果を表した。図 1 D は、血小板集団のサイズおよび蛍光を表し、血小板は C D 4 1 - P E C y 7 抗血小板抗体と結合していた。このヒストグラム中の血小板は、異なる蛍光性集団（S）として現れた。血小板ではない粒子は非蛍光性であり、破片として血小板集団とは分離されているようだった。この後者の領域は、血小板が少ない特定の疾患状態の患者において増加し、血小板と非血小板事象とを特異的に識別するこの方法の重要性を例示する。

40

【 0 1 0 8 】

図 1 D のヒストグラムにおいて同定された、同定血小板集団の次の分析を、F S 対核酸色素の蛍光のパラメーターにより実施した。図 1 F のヒストグラムは、破片および抗血小板抗体染色によって同定され、分割された他の細胞がない、血小板の純粋な集団についてゲーティングしたので、血小板および網状血小板のより正確な計数が得られた。未成熟な血小板である網状血小板は、前方散乱により実証されるようにサイズがより大きく、血小板の網状組織または顆粒の存在のために A O 蛍光がより明るい。

【 0 1 0 9 】

50

第2の実験において、健康な患者由来の血液試料を、上記の迅速染色法を使用して、抗血小板抗体（抗CD41-PECy7）およびAOと混合し、共にインキュベートすることによって分析するために調製した。光散乱のみ、すなわち前方散乱（FS）対側方散乱（SS）を使用したサイトメトリ評価は、血小板集団を同定するヒストグラム（図2A）を提供した。FS対AO蛍光を使用して図2Aにおいて同定された血小板集団についてゲーティングする次の分析（図2C）により、総血小板集団の約16.6%に測定された網状血小板（未成熟）を示すヒストグラムが作成された。

【0110】

FS対抗血小板抗体の蛍光のパラメーターを使用した同じ試料の分析により、破片および他の細胞から、染色された血小板の分離を表すヒストグラム（図2B）を得た。したがって、図2Bのヒストグラムにおいて「S」としてすでに同定された、破片を除いた純粋な血小板集団についてゲーティングする次の分析は、FS対AO蛍光のパラメーターを使用した。この場合、破片の排除により、図2Dのヒストグラムのパラメーターが血小板の改善された分割を提供することが可能になった。図2Cにより得られた16.6%とは対照的に、より高いパーセントの網状血小板、すなわち22.6%が得られた。サイズ（FS）および粒度（SS）パラメーターの使用によりその計算に破片が含まれ、抗血小板蛍光と核酸蛍光とを使用する分析と一体となった迅速染色法の使用により提供された網状血小板のパーセントより、同定された網状血小板のパーセントが低くなった。したがって、これらのヒストグラムは、本明細書に記載の方法の利点である、精度の改善を実証する。

10

【0111】

第3の実験において、別の健康な被験体由来の血液試料を、上記のパートAに記載の迅速染色法（抗血小板抗体および核酸色素との混合およびインキュベーション）に従って調製した。試料を、前方散乱（FS）対側方散乱（SS）（図3A）を使用して分析し、その後、それによって同定された血小板集団を、FS対AO蛍光（図3C）を使用して分析した。この分析により、網状血小板集団が23.0%であると推定された。

20

【0112】

同じ試料を、FS対抗血小板抗体の蛍光を使用して分析した場合、染色された血小板の純粋な集団が、破片およびヒストグラムの他の細胞から分離された（図3B）。FSおよびAO蛍光を使用したこの血小板集団についての続くゲーティング（図3D）は、より正確で、より高いパーセントの網状血小板、すなわち25.4%を、同じ患者の試料に関して提供した。この実験は、血小板集団を、蛍光性結合体化抗血小板抗体および核酸色素を用いて迅速染色法で分割し、本発明に従って評価した場合、血小板および網状血小板の改善された同定および計数を例示する。

30

【0113】

第4の実験において、試料を別の健康な被験体から調製した。各試料を、上記のパートAに記載の迅速染色法を使用して、抗血小板抗体および核酸色素を使用して分析するために、または代替的に以下に記載のように、のいずれかで調製した。得られたヒストグラムは、抗血小板抗体およびその後の蛍光分析を用いた迅速抗体染色法が、試料中に存在する破片からの、血小板集団の同定、分割および数え上げ、したがってより正確な血小板集団の測定を可能することを例示した。いずれの抗体も用いず、AOを用いて調製した1種の試料を、前方散乱（FS）対側方散乱（SS）をプロットすることによって評価し、そのヒストグラムは、血小板、赤血球および白血球の分離を示した。血小板は、横長の形の最も下にある集団（P）であった（図4A）。FSおよびAO蛍光による血小板集団について得られたゲーティングは、約16.4%の網状血小板集団を提供した（図4D）。

40

【0114】

第2の試料を、血小板に対して特異性を持たない蛍光性抗体を用いて調製した。FSおよびPC7蛍光のパラメーターにより得られた評価は、血小板集団を同定しないヒストグラムを作成した（図4B）。ゲーティングするために、ヒストグラムには同定された集団がなかったので、FSおよびAO蛍光を用いた続くゲーティングを示すヒストグラムは、同様に空白であった（図4E）。

50

【0115】

対照的に、760～820nmの範囲で放射するPECy7蛍光性標識抗CD41抗血小板抗体およびAOを用いた、上記のパートAに記載の迅速染色法を使用して調製した試料を、その後、サイトメトリ分析器にかけた。FS対抗血小板(PC7)蛍光を表すヒストグラム(図4C)は、試料中の血小板ではない粒子と異なる血小板集団を明らかにした。したがって、非血小板または破片の領域は、抗体で染色された患者試料を測定した場合の事象において増加した。純粋血小板集団についての続くゲーティングは、FS対AO(図4F)を使用して達成され、分析された。血小板集団は、図4Cにおいて抗血小板抗体染色により同定され、分割されたので、純粋血小板集団と関連付けることにより、網状血小板の正確な計数が可能であった。抗血小板特異的抗体の不在下で測定した網状血小板(16.4%、図4D)および抗血小板特異的抗体の存在下で測定した網状血小板(22.1%、図4F)は、健康なボランティアの試料において同様である。しかし、この集団は図4Dの集団より正確に同定され、より高い。

10

【0116】

第5の実験は、軽度の血小板減少症を有する患者から得た血液試料を使用した。すべての試料は、上記のパートAに記載の迅速染色法に従って、以下のように、1種の抗血小板抗体(抗CD41または抗CD61)および核酸色素のAOあるいは双方の抗血小板抗体およびAOを用いて調製した。得られた図5Aおよび5Bは、PECy7蛍光性標識抗CD41または抗CD61抗血小板抗体およびAOを用いて染色された試料の、前方散乱(FS)対抗血小板の蛍光のパラメーターを使用した分析が、血小板の同様の集団を提供したことを明らかにした。FSおよびAO蛍光を使用したそれらの血小板集団についての続くゲーティングは、比較的同様のパーセントの網状血小板、すなわち、それぞれ21.5%および21.9%(図5Dおよび5E)を提供した。双方の抗血小板抗体を用いて調製した試料について実施された同じ評価(図5Cおよび5F)は、23.5%の網状血小板を明らかにした。図5Dおよび5E中の同じ被験体由来の試料中の血小板集団を同定するための、単一の異なる抗血小板抗体の使用は、試料中の血小板の同様のパーセントを実証するが、図5Dおよび5Fの比較により、迅速抗体染色法が2種の抗血小板抗体を使用する場合、単一の抗血小板抗体よりも網状血小板値が増加することを示す。

20

【0117】

(実施例2)

網状血小板の測定

正常なボランティアおよび患者における網状血小板の比較値：正常なボランティアおよび血小板数の低い患者により、予備研究を実施した。PE-Cy7標識抗CD41およびアクリジンオレンジと、全血液試料とを使用した実施例1の方法を使用すると、正常なボランティアおよび患者の網状血小板値のパーセントの分布は、図6に示すように明らかに異なる。患者集団には広範囲にわたる値があった。

30

【0118】

上に引用されたすべての出版文献、特許および特許出願ならびに優先権文献の開示は、参照により本明細書に組み込まれる。本明細書に記載の方法および組成物の、多くの従来からの改善および変形は、上に同定された明細書に含まれ、当業者には明らかであることが期待される。本発明の様々な実施形態に対するこのような改善および改変は、本明細書に添付の特許請求の範囲に包含されると考えられる。

40

【 図 1 - 1 】

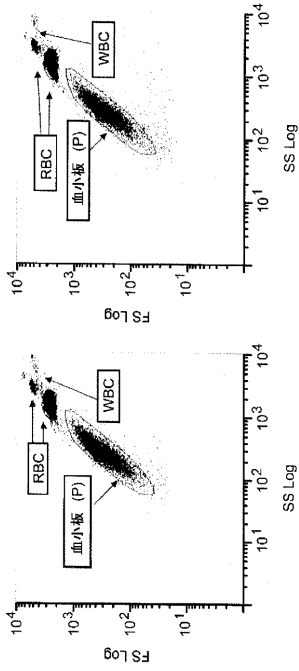


FIG. 1B

FIG. 1A

【 図 1 - 2 】

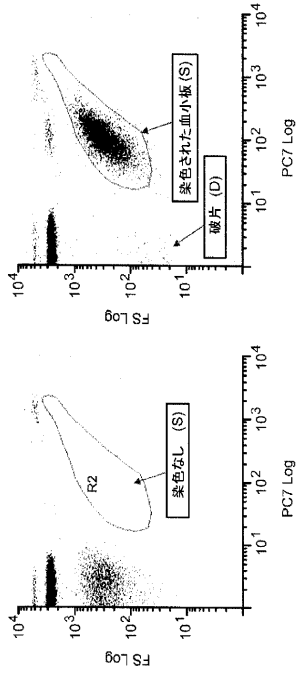


FIG. 1D

FIG. 1C

【 図 1 - 3 】

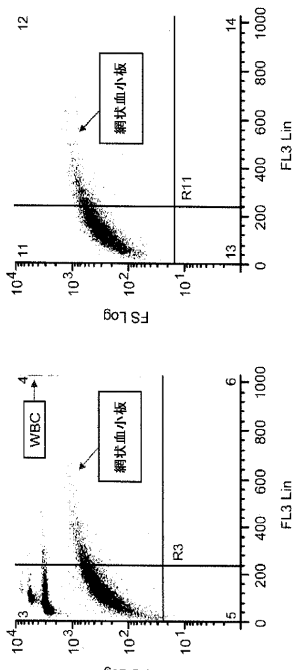


FIG. 1E

FIG. 1F

【 図 2 】

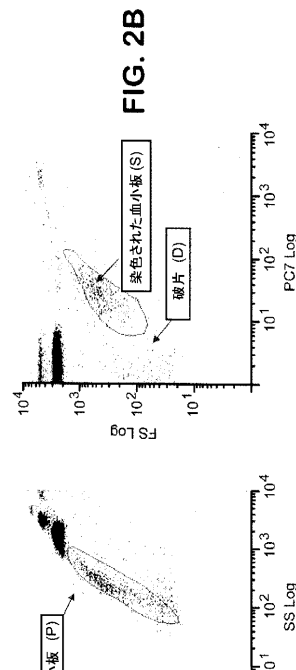


FIG. 2A

FIG. 2B

FIG. 2C

FIG. 2D

FIG. 2E

FIG. 2F

FIG. 2G

FIG. 2H

FIG. 2I

FIG. 2J

FIG. 2K

FIG. 2L

FIG. 2M

FIG. 2N

FIG. 2O

FIG. 2P

FIG. 2Q

FIG. 2R

FIG. 2S

FIG. 2T

FIG. 2U

FIG. 2V

FIG. 2W

FIG. 2X

FIG. 2Y

FIG. 2Z

FIG. 2AA

FIG. 2AB

FIG. 2AC

FIG. 2AD

FIG. 2AE

FIG. 2AF

FIG. 2AG

FIG. 2AH

FIG. 2AI

FIG. 2AJ

FIG. 2AK

FIG. 2AL

FIG. 2AM

FIG. 2AN

FIG. 2AO

FIG. 2AP

FIG. 2AQ

FIG. 2AR

FIG. 2AS

FIG. 2AT

FIG. 2AU

FIG. 2AV

FIG. 2AW

FIG. 2AX

FIG. 2AY

FIG. 2AZ

FIG. 2BA

FIG. 2BB

FIG. 2BC

FIG. 2BD

FIG. 2BE

FIG. 2BF

FIG. 2BG

FIG. 2BH

FIG. 2BI

FIG. 2BJ

FIG. 2BK

FIG. 2BL

FIG. 2BM

FIG. 2BN

FIG. 2BO

FIG. 2BP

FIG. 2BQ

FIG. 2BR

FIG. 2BS

FIG. 2BT

FIG. 2BU

FIG. 2BV

FIG. 2BW

FIG. 2BX

FIG. 2BY

FIG. 2BZ

FIG. 2CA

FIG. 2CB

FIG. 2CC

FIG. 2CD

FIG. 2CE

FIG. 2CF

FIG. 2CG

FIG. 2CH

FIG. 2CI

FIG. 2CJ

FIG. 2CK

FIG. 2CL

FIG. 2CM

FIG. 2CN

FIG. 2CO

FIG. 2CP

FIG. 2CQ

FIG. 2CR

FIG. 2CS

FIG. 2CT

FIG. 2CU

FIG. 2CV

FIG. 2CW

FIG. 2CX

FIG. 2CY

FIG. 2CZ

FIG. 2DA

FIG. 2DB

FIG. 2DC

FIG. 2DD

FIG. 2DE

FIG. 2DF

FIG. 2DG

FIG. 2DH

FIG. 2DI

FIG. 2DJ

FIG. 2DK

FIG. 2DL

FIG. 2DM

FIG. 2DN

FIG. 2DO

FIG. 2DP

FIG. 2DQ

FIG. 2DR

FIG. 2DS

FIG. 2DT

FIG. 2DU

FIG. 2DV

FIG. 2DW

FIG. 2DX

FIG. 2DY

FIG. 2DZ

FIG. 2EA

FIG. 2EB

FIG. 2EC

FIG. 2ED

FIG. 2EE

FIG. 2EF

FIG. 2EG

FIG. 2EH

FIG. 2EI

FIG. 2EJ

FIG. 2EK

FIG. 2EL

FIG. 2EM

FIG. 2EN

FIG. 2EO

FIG. 2EP

FIG. 2EQ

FIG. 2ER

FIG. 2ES

FIG. 2ET

FIG. 2EU

FIG. 2EV

FIG. 2EW

FIG. 2EX

FIG. 2EY

FIG. 2EZ

FIG. 2FA

FIG. 2FB

FIG. 2FC

FIG. 2FD

FIG. 2FE

FIG. 2FF

FIG. 2FG

FIG. 2FH

FIG. 2FI

FIG. 2FJ

FIG. 2FK

FIG. 2FL

FIG. 2FM

FIG. 2FN

FIG. 2FO

FIG. 2FP

FIG. 2FQ

FIG. 2FR

FIG. 2FS

FIG. 2FT

FIG. 2FU

FIG. 2FV

FIG. 2FW

FIG. 2FX

FIG. 2FY

FIG. 2FZ

FIG. 2GA

FIG. 2GB

FIG. 2GC

FIG. 2GD

FIG. 2GE

FIG. 2GF

FIG. 2GG

FIG. 2GH

FIG. 2GI

FIG. 2GJ

FIG. 2GK

FIG. 2GL

FIG. 2GM

FIG. 2GN

FIG. 2GO

FIG. 2GP

FIG. 2GQ

FIG. 2GR

FIG. 2GS

FIG. 2GT

FIG. 2GU

FIG. 2GV

FIG. 2GW

FIG. 2GX

FIG. 2GY

FIG. 2GZ

FIG. 2HA

FIG. 2HB

FIG. 2HC

FIG. 2HD

FIG. 2HE

FIG. 2HF

FIG. 2HG

FIG. 2HH

FIG. 2HI

FIG. 2HJ

FIG. 2HK

FIG. 2HL

FIG. 2HM

FIG. 2HN

FIG. 2HO

FIG. 2HP

FIG. 2HQ

FIG. 2HR

FIG. 2HS

FIG. 2HT

FIG. 2HU

FIG. 2HV

FIG. 2HW

FIG. 2HX

FIG. 2HY

FIG. 2HZ

FIG. 2IA

FIG. 2IB

FIG. 2IC

FIG. 2ID

FIG. 2IE

FIG. 2IF

FIG. 2IG

FIG. 2IH

FIG. 2II

FIG. 2IJ

FIG. 2IK

FIG. 2IL

FIG. 2IM

FIG. 2IN

FIG. 2IO

FIG. 2IP

FIG. 2IQ

FIG. 2IR

FIG. 2IS

FIG. 2IT

FIG. 2IU

FIG. 2IV

FIG. 2IW

FIG. 2IX

FIG. 2IY

FIG. 2IZ

FIG. 2JA

FIG. 2JB

FIG. 2JC

FIG. 2JD

FIG. 2JE

FIG. 2JF

FIG. 2JG

FIG. 2JH

FIG. 2JI

FIG. 2JJ

FIG. 2JK

FIG. 2JL

FIG. 2JM

FIG. 2JN

FIG. 2JO

FIG. 2JP

FIG. 2JQ

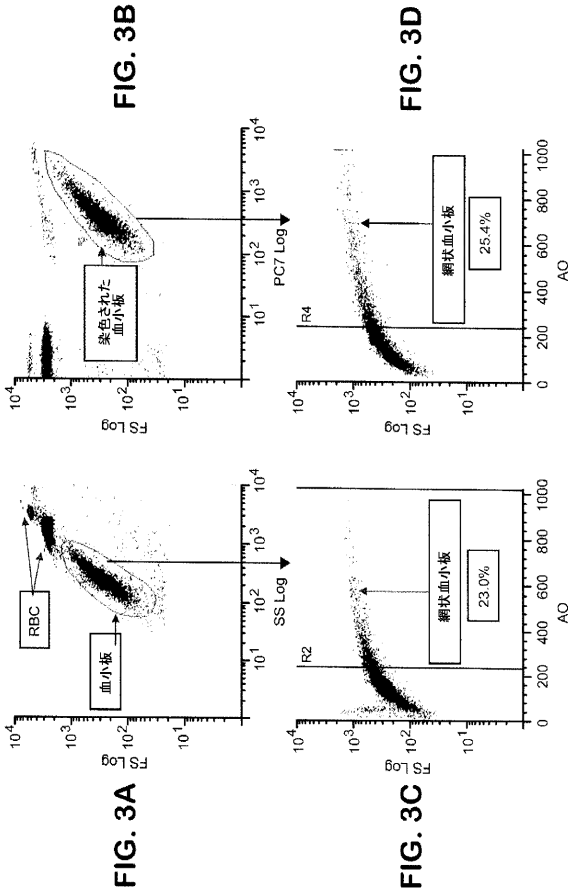
FIG. 2JR

FIG. 2JS

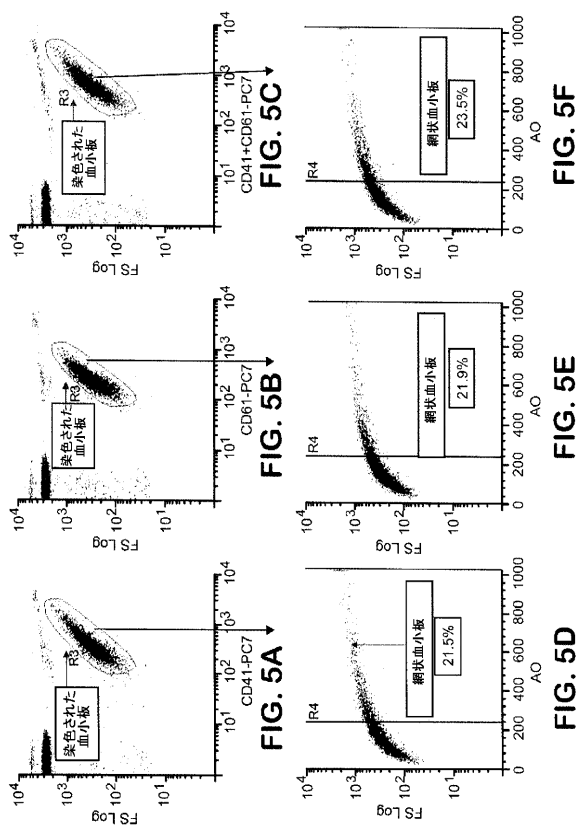
FIG. 2JT

FIG. 2JU

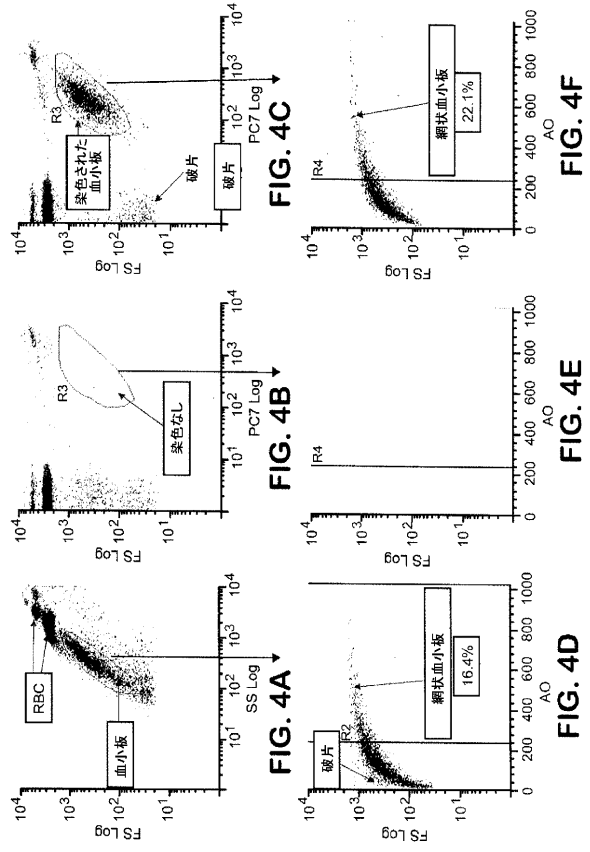
【 図 3 】



【 図 5 】



【 図 4 】



【 図 6 】

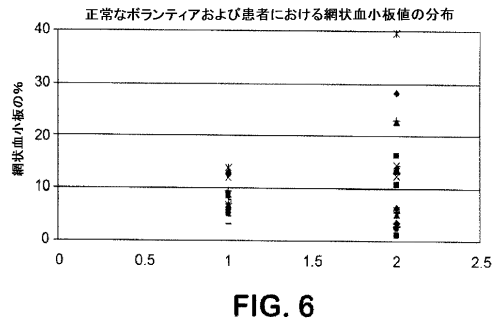


FIG. 6

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 08/81598
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - C12N 5/06; C12N 5/16 (2008.04) USPC - 435/343 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) IPC(8): C12N 5/06; C12N 5/16 (2008.04) USPC: 435/343 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 435/4, 435/325, 435/343 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST (PGPB, USPT, USOC, EPAB, JPAB); Google Platelet, incubate, epitope, ligand, dya, flow cytometer, reticulated, fluorescence, immature, differentiate, identify, and anti-platelet		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6,080,322 A (Horton, et al.) 09 May 2000 (09.05.2000), col 1, ln 29; col 2, ln 37-38, 41-42, 47-51, 66-67; col 3 ln 50-51, 54-60; col 5, ln 63-65; col 6, ln 6-7, 13-16, 27-28, 34-36; col 7, ln 14-15, 52-57; col 8, ln 4-5; col 9 ln 12-13	1-30
Y	US 2007/0202549 A1 (Ahearn, et al.) 30 August 2007 (30.08.2007), para [0009], [0028]-[0031], [0046], [0047]	1-30
Y	US 2003/0138851 A1 (DeMatos) 24 July 2003 (24.07.2003), para [0003]	7, 8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but 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 17 December 2008 (17.12.2008)		Date of mailing of the international search report 05 JAN 2009
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. 571-273-3201		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

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

(72)発明者 ミルバガナム, ラビンドラ
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 01106, ロングメドウ, コンバース ストリート
1031

(72)発明者 ポール, ロナルド ディー.
アメリカ合衆国 フロリダ 33312, フォート ローダーデール, エス.ダブリュー.
24 アベニュー 1738

Fターム(参考) 2G054 AA07 BB13 EA03 GA04 GA05

专利名称(译)	基于抗体的快速血小板分析方法		
公开(公告)号	JP2011502264A	公开(公告)日	2011-01-20
申请号	JP2010532207	申请日	2008-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	贝克曼考尔特公司		
申请(专利权)人(译)	贝克曼库尔特有限公司		
[标]发明人	ミルバガナムラビンドラ ポールロナルドディー		
发明人	ミルバガナム, ラビンドラ ポール, ロナルド ディー.		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/542 G01N15/14 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/86 G01N15/1459 G01N33/80 G01N2015/0084 G01N2015/1477 Y10S435/962 Y10S435/973 Y10T436/101666 Y10T436/13		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.597 G01N33/542.A G01N15/14.C G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/BB13 2G054/EA03 2G054/GA04 2G054/GA05		
代理人(译)	夏木森下		
优先权	60/983309 2007-10-29 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种鉴定血小板群的方法，优选生物样品中的未成熟网状血小板群，其中所述生物样品包含至少一种标记的配体或与血小板上的表位或抗原结合的标记的单克隆。将抗体与核酸染料一起孵育。分析样品并通过使孵育的样品通过流式细胞仪来鉴定或定量一个或多个血小板群。使用激光光源照射孵育的样品，并测量标记的配体和核酸染料的荧光以及至少一个附加参数，例如光散射，直流，轴向光损失，不透明度和射频。这些参数用于定性或定量鉴定样品中的血小板群。

試料中の細胞タイプ	測定するパラメータ
成熟血小板	前方散乱および抗血小板蛍光、側方散乱および蛍光、直流および不透明度、不透明度および蛍光、直流および高周波、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光；前方散乱および側方散乱
未成熟な網状血小板	前方散乱および核酸染色蛍光、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、高周波および蛍光、不透明度および蛍光、軸方向光損失および蛍光
巨大血小板	前方散乱および側方散乱、前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および不透明度、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
血小板凝集塊	前方散乱および側方散乱、前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および蛍光、直流および不透明度、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
血小板サテライト	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
活性化血小板	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
総血小板集団	前方散乱および側方散乱、前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および不透明度、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
白血球または赤血球	前方散乱および側方散乱、前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および高周波、直流および不透明度、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
網状赤血球	前方散乱および蛍光、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
未成熟な網状赤血球	前方散乱および側方散乱、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
細胞破片	前方散乱および側方散乱、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、不透明度および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光
非細胞凝集物	前方散乱および側方散乱、側方散乱および蛍光、直流および蛍光、不透明度および蛍光、高周波および蛍光、軸方向光損失および蛍光