

(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2018-508760

(P2018-508760A)

(43) 公表日 平成30年3月29日(2018.3.29)

| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
|--------------------------------|---------------|-------------|
| GO 1 N 33/543 (2006.01) | GO 1 N 33/543 | 5 1 5 A |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/543 | 5 1 5 F |
| GO 1 N 37/00 (2006.01) | GO 1 N 33/53 | K |
| | GO 1 N 37/00 | 1 0 2 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁)

(21) 出願番号 特願2017-537313 (P2017-537313)
 (86) (22) 出願日 平成28年1月14日 (2016.1.14)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年9月7日 (2017.9.7)
 (86) 国際出願番号 PCT/IB2016/050157
 (87) 国際公開番号 W02016/113691
 (87) 国際公開日 平成28年7月21日 (2016.7.21)
 (31) 優先権主張番号 15151176.3
 (32) 優先日 平成27年1月14日 (2015.1.14)
 (33) 優先権主張国 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 62/107,114
 (32) 優先日 平成27年1月23日 (2015.1.23)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 591099809
 バイオーラッド ラボラトリーズ, インコーポレイティド
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルズ, アルフレッド ノーベル ドライブ 1000
 (71) 出願人 506215582
 バイオーラッド・イノベーションズ
 BIO-RAD INNOVATIONS
 フランス国, エフ-92430 マルヌーラーコケット, ブールヴァール・レイモン・ポアンカレ 3
 (74) 代理人 100092783
 弁理士 小林 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液分析の系および方法

(57) 【要約】

血液型判定の系および方法が提供される。一実施形態において、本方法は、試料内の1つまたは複数の物質に結合し得る1つまたは複数の結合剤が固定された基板表面に試料を供するステップ、結合剤が固定された基板の少なくとも一部分から未結合材料を実質的に除去するステップ、および基板上に固定された1つまたは複数の結合剤に結合した物質を検出するステップによって行うことができ、ここで、基板表面に試料を供するステップは、基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップと同時である。系および他の方法はまた、記載および説明される。

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

試料内の物質の有無を判定する方法であって、前記方法が、
前記試料内の物質に結合し得る結合剤が固定された基板表面に前記試料を供するステップ、

結合剤が固定された前記基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップ、
ならびに

前記基板上に固定された前記結合剤に結合した物質を検出したことに応答して、前記試料内に存在する前記物質を同定するステップ、および

前記基板上に固定された前記結合剤に結合した物質を検出しなかったことに応答して、
前記物質が前記試料内に存在しないと判定するステップ
を含み、

前記基板表面に前記試料を供するステップが、前記基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップと同時である、方法。

【請求項 2】

前記基板表面に前記試料を供するステップおよび前記基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップが、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーで行われる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記ディスペンサーがマイクロ流体プローブである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記ディスペンサーが、複数のマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

前記ディスペンサーが、マイクロ流体プローブのアレイである、請求項 3 または 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記ディスペンサーが、赤血球をサイズに基づいて排除するマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである、請求項 3 から 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記マイクロチャネルが、6 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記マイクロチャネルが、4 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】

前記マイクロチャネルが、2 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 10】

前記マイクロチャネルの直径が、1 ~ 2 マイクロメートルの直径を有する断面を含む、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 11】

前記基板表面が湿っている、請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記基板表面に試料を供するステップが、1 つまたは複数の試料を少なくとも 1 つの別々のパスにそれぞれ分配するステップを含む、請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記パスが直線である、請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】

| | |
|----------|----|
| 【請求項 1】 | 10 |
| 【請求項 2】 | |
| 【請求項 3】 | 20 |
| 【請求項 4】 | |
| 【請求項 5】 | |
| 【請求項 6】 | 30 |
| 【請求項 7】 | 30 |
| 【請求項 8】 | |
| 【請求項 9】 | |
| 【請求項 10】 | 40 |
| 【請求項 11】 | |
| 【請求項 12】 | |
| 【請求項 13】 | |
| 【請求項 14】 | 50 |

前記パスが25ナノメートルから500マイクロメートルの幅である、請求項12または13に記載の方法。

【請求項15】

前記基板表面に試料を供するステップが、1つまたは複数の試料を少なくとも1つの別々のスポットにそれぞれ分配するステップを含む、請求項1から14のいずれか1項に記載の方法。

【請求項16】

前記試料が血液試料を含む、請求項1から15のいずれか1項に記載の方法。

【請求項17】

前記試料が、全血、赤血球、血漿、血清、および唾液からなる群から選択される成分を含む、請求項1から15のいずれか1項に記載の方法。

10

【請求項18】

前記結合剤が、赤血球の表面に結合した抗原に対する1つまたは複数の抗体を含む、請求項1から17のいずれか1項に記載の方法。

【請求項19】

前記結合剤が、1つまたは複数の非変性または溶血表現型の赤血球を含む、請求項1から18のいずれか1項に記載の方法。

【請求項20】

前記結合剤が、1つまたは複数の組換え抗原を含む、請求項1から19のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項21】

前記結合剤が、赤血球抗原に対する1つまたは複数の抗体、および1つまたは複数の非変性または溶血表現型の赤血球を含む、請求項1から20のいずれか1項に記載の方法。

【請求項22】

前記結合剤が別々の線上に固定されている、請求項1から21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項23】

前記結合剤が別々のスポットに固定されている、請求項1から21のいずれか1項に記載の方法。

【請求項24】

前記結合剤が1～50の結合剤である、請求項1から23のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項25】

前記物質が、赤血球抗原に対する1つまたは複数の抗体を含む、請求項1から24のいずれか1項に記載の方法。

【請求項26】

前記物質が、1つまたは複数の赤血球抗原を含む、請求項1から25のいずれか1項に記載の方法。

【請求項27】

前記基板が、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリスチレン、デキストランポリマー、 dendリマー、オリゴヌクレオチド、ポリカーボネート、プラスチック、ガラス、シリコン、酸化シリコン、金属および金属酸化物、ならびにポリマー官能化された金属および金属酸化物、PVDフ、ニトロセルロース、ナイロン、ならびにポリスルホンからなる群から選択される少なくとも1つの材料で形成される、請求項1から26のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項28】

試料内の物質に結合し得る結合剤が別々の場所に固定された基板、前記試料を前記基板上に同時に分配し、前記基板から未結合材料を除去するように構成されたディスペンサー、前記基板を照らすように構成された光源、および

50

前記結合剤に結合した前記物質の有無を検出するように構成された検出器を含む系。

【請求項 29】

前記ディスペンサーがマイクロ流体プローブである、請求項 28 に記載の系。

【請求項 30】

前記ディスペンサーが、マイクロ流体プローブのアレイである、請求項 28 に記載の系。

【請求項 31】

前記ディスペンサーが、複数のマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである、請求項 28 に記載の系。

10

【請求項 32】

前記ディスペンサーが、赤血球をサイズに基づいて排除するマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである、請求項 28 から 31 のいずれか 1 項に記載の系。

【請求項 33】

前記マイクロチャネルが、6 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、請求項 32 に記載の系。

【請求項 34】

前記マイクロチャネルが、4 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、請求項 32 に記載の系。

【請求項 35】

前記マイクロチャネルが、2 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、請求項 32 に記載の系。

20

【請求項 36】

前記マイクロチャネルの直径が、1 ~ 2 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、請求項 32 に記載の系。

【請求項 37】

前記基板が、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリスチレン、デキストランポリマー、デンドリマー、オリゴヌクレオチド、ポリカーボネート、プラスチック、ガラス、シリコン、酸化シリコン、金属および金属酸化物、ならびにポリマー官能化された金属および金属酸化物、P V D F、ニトロセルロース、ナイロン、ならびにポリスルホンからなる群から選択される少なくとも 1 つの材料で形成される、請求項 28 から 36 のいずれか 1 項に記載の系。

30

【請求項 38】

ドナーの赤血球に結合し得る結合剤が固定された基板表面にドナーの赤血球を供するステップ、

結合剤が固定された前記基板の少なくとも一部分から未結合のドナー赤血球を除去するステップであって、前記基板表面に前記ドナー赤血球を供するステップが、前記基板の少なくとも一部分から未結合のドナー赤血球を除去するステップと同時である、ステップ、患者の血漿を前記ドナー赤血球の上に載せるステップ、および

患者の前記血漿の未結合部分を除去するステップであって、患者の血漿を載せるステップが、患者の前記血漿の未結合部分を除去するステップと同時である、ステップ、前記ドナー赤血球に結合した抗体を検出したことに応答して、前記抗体が患者の前記血漿内に存在すると判定するステップ、および

40

前記ドナーの赤血球に結合した抗体を検出しなかったことに応答して、前記抗体が患者の前記血漿内に存在しないと判定するステップ、を含む、クロスマッチングの方法。

【請求項 39】

ドナーの赤血球を供するステップ、未結合のドナー赤血球を除去するステップ、患者の血漿を載せるステップ、および患者の血漿の未結合部分を除去するステップが、マイクロ流体プローブで行われる、請求項 38 に記載の方法。

50

【請求項 40】

前記ドナー赤血球が非変性または溶血表現型の赤血球である、請求項 38 または 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記結合剤が、結合型レクチンまたはユニバーサル抗赤血球抗体を含む、請求項 38 から 40 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 42】

ドナー赤血球が別々の場所に固定された基板、
ドナー赤血球または患者の血漿を前記基板に同時に分配し、未結合のドナー RBC または患者の前記血漿の未結合部分を前記基板から除去するように構成されたディスペンサー、
前記基板を照らすように構成された光源、および
前記ドナー赤血球に結合した抗体の有無を検出するように構成された検出器
を含む、クロスマッチングのための系。

10

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本開示は、全体として、血液試料などの患者の試料の分析に関する。

【背景技術】**【0002】**

数百万人が毎年献血を行っている。ドナーの血液がレシピエントに輸血され得る前に、血液は型判定されなければならない。典型的には、血液は、A B O および R H 1 (R h e s u s D 抗原) 血液型について試験され、臨床上重要な同種免疫抗体についてスクリーニングされる。血液型を判定するために、赤血球 (red blood cells) (R B C または赤血球 (erythrocytes)) を抗 A、抗 B、抗 A B、および抗 D 抗体と別々に反応させる。このタイプの試験は、抗原型判定 (例えば、グループ判定および表現型判定) として知られている。同一の血液試料から得た血清 / 血漿はまた、A 型および B 型試薬 R B C、ならびに臨床上重要な抗原のほとんどを持つ、少なくとも 2 つの異なる O 型試薬細胞により個別に試験される。A 型および B 型試薬 R B C による試験のタイプはリバーズ型判定として知られており、O 型試薬細胞による試験のタイプは抗体スクリーニングとして知られている。

20

30

【発明の概要】**【発明が解決しようとする課題】****【0003】**

1 億 5 千万を超える試験が毎年、血液センターにおいて行われ、血液型および血清 / 血漿における臨床上重要な抗体が判定されている。通常、輸血は緊急の状況において必要とされ、この場合、可能な限り短い時間でドナーとレシピエントとの間の適合性を判定することが望ましい。複数の試料を一度に試験でき、迅速な試験結果を提供し得る、血液型判定の自動ハイスループット系および方法が、したがって望まれている。さらに、患者の血液試料をあまり要しないことも望ましい。

【課題を解決するための手段】

40

【0004】

一実施形態において、試料内の物質の有無を判定する方法が開示される。この方法は、試料内の物質に結合し得る結合剤が固定された基板表面に試料を供するステップ、結合剤が固定された基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップ、ならびに、基板上に固定された結合剤に結合した物質を検出したことに応答して、試料内に存在する物質を同定するステップ、および基板上に固定された結合剤に結合した物質を検出しなかったことに応答して、物質が試料内に存在しないと判定するステップを含み、ここで、基板表面に試料を供するステップは、基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップと同時である。基板表面に試料を供するステップおよび基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップは、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーで行うことが

50

できる。一実施形態において、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーは、マイクロ流体プローブである。一実施形態において、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーは、複数のマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである。別の実施形態において、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーは、マイクロ流体プローブのアレイである。

【0005】

一実施形態において、試料内の物質の有無を判定するための系(system)は、試料内の物質に結合し得る結合剤が別々の場所に固定された基板；試料を基板上に同時に分配し、未結合材料を基板から除去するように構成されたディスペンサー；基板を照らすように構成された光源；および結合剤に結合した物質の有無を検出するように構成された検出器を含む。

10

【0006】

さらに、本明細書において、血液分析系、およびこれらの系を用いて血液試料を分析する方法が開示される。より具体的には、本開示は、赤血球型および表現型を検出する(抗原型判定)ための、典型的な抗赤血球抗体のリバー型判定および典型的ではない抗赤血球抗体(抗体スクリーニング)をスクリーニングおよび同定するための、ドナーとレシピエントとの間の適合性を判定する(クロスマッチング)ための、ならびに抗体および/または活性血清補体画分で被覆された赤血球を実証する(例えば直接抗グロブリン試験)ための、系および方法に関する。

【0007】

一実施形態において、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーは、全血試料内の赤血球から血漿を分離するための構造を含む。血漿から赤血球を分離するための一実施形態において、マイクロチャネルは6マイクロメートル未満の直径を有する。一実施形態において、直径は4マイクロメートル未満、または2マイクロメートル未満、または1~2マイクロメートルである。マイクロチャネルの断面は、長方形、四角形、円形、長円形、および楕円形を含むあらゆる適切な形状、またはそれらの組み合わせであってよい。

20

【0008】

一実施形態において、基板表面は湿っている。一実施形態において、基板表面に試料を供する(applying)ステップは、1つまたは複数の試料を少なくとも1つの別々のパスにそれぞれ分配するステップを含む。ある特定の実施形態において、パスは直線である。一実施形態において、パスは、約25ナノメートルから約500マイクロメートルの幅である。一実施形態において、基板表面に試料を供するステップは、1つまたは複数の試料を少なくとも1つの別々のスポットにそれぞれ分配するステップを含む。一実施形態において、少なくとも1つの別々のスポットは、約25ナノメートルから約500マイクロメートルの直径である。一実施形態において、試料は、全血、赤血球、血漿、血清、および唾液からなる群から選択される。

30

【0009】

一実施形態において、1つまたは複数の結合剤は、1つまたは複数の抗体もしくはその断片、または赤血球抗原に特異的な一部のレクチンを含み、検出される試料内の物質は赤血球抗原である。

【0010】

別の実施形態において、1つまたは複数の結合剤は、1つもしくは複数の非変性または溶血表現型の赤血球、化学合成されたポリペプチドおよび多糖血液型抗原、組換え赤血球抗原、または赤血球膜抽出物を含み、物質は、赤血球抗原、組換え赤血球抗原、または赤血球膜抽出物に対する1つまたは複数の抗体またはその断片である。

40

【0011】

さらに別の実施形態において、結合剤は、複数部分からなる結合剤である。基板上に載せた第1の部分は、レクチン、または赤血球抗原に対する1つもしくは複数の抗体もしくはその断片を含む。抗体は、赤血球に対するユニバーサル抗体である。基板上に載せた結合剤の第2の部分は、潜在的血液ドナーの表現型判定されたまたは表現型判定されていない赤血球であり、結合剤に結合している。物質は、輸血を必要とする患者の血漿であり、

50

患者の血漿内の抗体またはその断片は、ドナーの赤血球に結合する。

【0012】

さらに別の実施形態において、1つまたは複数の結合剤は、ヒト免疫グロブリンおよび/または活性血清補体画分に対する1つまたは複数の抗体またはその断片を含み、物質は、抗体および/または活性血清補体画分で被覆された赤血球である。

【0013】

一部の実施形態において、1つまたは複数の結合剤は、別々の線上に固定されている。一部の実施形態において、1つまたは複数の結合剤は、別々のスポットに固定されている。一部の実施形態において、1～100の結合剤が基板表面に結合している。

【0014】

抗体スクリーニング、抗原型判定（直接抗グロブリン試験を含む）、およびクロスマッチングのための系であって、この系は、試料内の物質に結合し得る結合剤が別々の場所に固定された基板；試料を基板上に同時に分配し、未結合材料を基板から除去するように構成されたディスペンサー；基板を照らすように構成された光源；および結合剤に結合した物質の有無を検出するように構成された検出器を含む。

10

【0015】

一部の実施形態において、クロスマッチングのための系は、ドナーの赤血球が別々の場所に固定された基板；ドナーの赤血球および/または患者の血漿を基板上に分配し、未結合のドナー赤血球または患者血漿の未結合部分を基板から同時に除去するように構成されたディスペンサー；基板を照らすように構成された光源；ならびにドナーの赤血球に結合した抗体の有無を検出するように構成された検出器を含む。

20

【0016】

項目1．試料内の物質の有無を判定する方法であって、前記方法が、試料内の物質に結合し得る結合剤が固定された基板表面に試料を供するステップ、結合剤が固定された基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップ、ならびに基板上に固定された結合剤に結合した物質を検出したことに応答して、試料内に存在する物質を同定するステップ、および基板上に固定された結合剤に結合した物質を検出しなかったことに応答して、物質が試料内に存在しないと判定するステップを含む、基板表面に試料を供するステップが、基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップと同時である、方法。

30

【0017】

項目2．基板表面に試料を供するステップおよび基板の少なくとも一部分から未結合材料を除去するステップが、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーで行われる、項目1に記載の方法。

【0018】

項目3．ディスペンサーがマイクロ流体プローブである、項目2に記載の方法。

【0019】

項目4．ディスペンサーが、複数のマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである、項目3に記載の方法。

40

【0020】

項目5．ディスペンサーが、マイクロ流体プローブのアレイである、項目3または4に記載の方法。

【0021】

項目6．ディスペンサーが、赤血球をサイズに基づいて排除するマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである、項目3から5のいずれか1項に記載の方法。

【0022】

項目7．マイクロチャネルが、6マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、項目6に記載の方法。

50

- 【 0 0 2 3 】
項目 8 . マイクロチャネルが、 4 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、項目 6 に記載の方法。
- 【 0 0 2 4 】
項目 9 . マイクロチャネルが、 2 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、項目 6 に記載の方法。
- 【 0 0 2 5 】
項目 1 0 . マイクロチャネルの直径が、 1 ~ 2 マイクロメートルの直径を有する断面を含む、項目 6 に記載の方法。
- 【 0 0 2 6 】 10
項目 1 1 . 基板表面が湿っている、項目 1 から 1 0 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 2 7 】
項目 1 2 . 基板表面に試料を供するステップが、 1 つまたは複数の試料を少なくとも 1 つの別々のパスにそれぞれ分配するステップを含む、項目 1 から 1 1 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 2 8 】
項目 1 3 . パスが直線である、項目 1 2 に記載の方法。
- 【 0 0 2 9 】
項目 1 4 . パスが 2 5 ナノメートルから 5 0 0 マイクロメートルの幅である、項目 1 2 または 1 3 に記載の方法。 20
- 【 0 0 3 0 】
項目 1 5 . 基板表面に試料を供するステップが、 1 つまたは複数の試料を少なくとも 1 つの別々のスポットにそれぞれ分配するステップを含む、項目 1 から 1 4 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 3 1 】
項目 1 6 . 試料が血液試料を含む、項目 1 から 1 5 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 3 2 】
項目 1 7 . 試料が、全血、赤血球、血漿、および血清からなる群から選択される成分を含む、項目 1 から 1 6 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 3 3 】 30
項目 1 8 . 結合剤が、赤血球抗原に対する 1 つまたは複数の抗体を含む、項目 1 から 1 7 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 3 4 】
項目 1 9 . 結合剤が、 1 つまたは複数の非変性または溶血表現型の赤血球を含む、項目 1 から 1 8 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 3 5 】
項目 2 0 . 結合剤が、 1 つまたは複数の組換え抗原を含む、項目 1 から 1 9 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 3 6 】
項目 2 1 . 結合剤が、赤血球抗原に対する 1 つまたは複数の抗体、および 1 つまたは複数の非変性または溶血表現型の赤血球を含む、項目 1 から 2 0 のいずれか 1 項に記載の方法。 40
- 【 0 0 3 7 】
項目 2 2 . 結合剤が別々の線上に固定されている、項目 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 3 8 】
項目 2 3 . 結合剤が別々のスポットに固定されている、項目 1 から 2 1 のいずれか 1 項に記載の方法。
- 【 0 0 3 9 】
項目 2 4 . 結合剤が 1 ~ 5 0 の結合剤である、項目 1 から 2 3 のいずれか 1 項に記載の 50

方法。

【 0 0 4 0 】

項目 2 5 . 物質が、赤血球抗原に対する 1 つまたは複数の抗体を含む、項目 1 から 2 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 0 4 1 】

項目 2 6 . 物質が、1 つまたは複数の赤血球抗原を含む、項目 1 から 2 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 0 4 2 】

項目 2 7 . 基板が、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリスチレン、デキストランポリマー、 dendrimer、オリゴヌクレオチド、ポリカーボネート、プラスチック、ガラス、シリコン、酸化シリコン、金属および金属酸化物、ならびにポリマー官能化された金属および金属酸化物、P V D F、ニトロセルロース、ナイロン、ならびにポリスルホンからなる群から選択される少なくとも 1 つの材料で形成される、項目 1 から 2 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

10

【 0 0 4 3 】

項目 2 8 . 試料内の物質に結合し得る結合剤が別々の場所に固定された基板、試料を基板上に同時に分配し、基板から未結合材料を除去するように構成されたディスペンサー、および結合剤に結合した物質の有無を検出するように構成された検出器を含む系。

20

【 0 0 4 4 】

項目 2 9 . ディスペンサーがマイクロ流体プローブである、項目 2 8 に記載の系。

【 0 0 4 5 】

項目 3 0 . ディスペンサーが、マイクロ流体プローブのアレイである、項目 2 8 に記載の系。

【 0 0 4 6 】

項目 3 1 . ディスペンサーが、複数のマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである、項目 2 8 に記載の系。

【 0 0 4 7 】

項目 3 2 . ディスペンサーが、赤血球をサイズに基づいて排除するマイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブである、項目 2 8 から 3 1 のいずれか 1 項に記載の系。

30

【 0 0 4 8 】

項目 3 3 . マイクロチャネルが、6 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、項目 3 2 に記載の系。

【 0 0 4 9 】

項目 3 4 . マイクロチャネルが、4 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、項目 3 2 に記載の系。

【 0 0 5 0 】

項目 3 5 . マイクロチャネルが、2 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、項目 3 2 に記載の系。

40

【 0 0 5 1 】

項目 3 6 . マイクロチャネルの直径が、1 ~ 2 マイクロメートル未満の直径を有する断面を含む、項目 3 2 に記載の系。

【 0 0 5 2 】

項目 3 7 . 基板が、ポリエチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリスチレン、デキストランポリマー、 dendrimer、オリゴヌクレオチド、ポリカーボネート、プラスチック、ガラス、シリコン、酸化シリコン、金属および金属酸化物、ならびにポリマー官能化された金属および金属酸化物、P V D F、ニトロセルロース、ナイロン、ならびにポリスルホンからなる群から選択される少なくとも 1 つの材料で形成される、項目 2 8 から 3 6 のいずれか 1 項に記載の系。

50

【 0 0 5 3 】

項目 3 8 . ドナーの赤血球に結合し得る結合剤が固定された基板表面にドナーの赤血球を供するステップ、
 結合剤が固定された基板の少なくとも一部分から未結合のドナー赤血球を除去するステップであって、基板表面にドナー赤血球を供するステップが、基板の少なくとも一部分から未結合のドナー赤血球を除去するステップと同時である、ステップ、
 患者の血漿をドナー赤血球の上に載せるステップ、および
 患者の血漿の未結合部分を除去するステップであって、患者の血漿を載せるステップが、患者の血漿の未結合部分を除去するステップと同時である、ステップ、
 ドナー赤血球に結合した抗体を検出したことに応答して、抗体が患者の血漿内に存在すると判定するステップ、および
 ドナーの赤血球に結合した抗体を検出しなかったことに応答して、抗体が患者の血漿内に存在しないと判定するステップ、
 を含む、クロスマッチングの方法。

10

【 0 0 5 4 】

項目 3 9 . ドナーの赤血球を供するステップ、未結合のドナー赤血球を除去するステップ、患者の血漿を載せるステップ、および患者の血漿の未結合部分を除去するステップが、マイクロ流体プローブで行われる、項目 3 8 に記載の方法。

【 0 0 5 5 】

項目 4 0 . ドナー赤血球が非変性または溶血表現型の赤血球である、項目 3 8 または 3 9 に記載の方法。

20

【 0 0 5 6 】

項目 4 1 . 結合剤が、結合型レクチンまたはユニバーサル抗赤血球抗体を含む、項目 3 8 から 4 0 のいずれか 1 項に記載の方法。

【 0 0 5 7 】

項目 4 2 . ドナー赤血球が別々の場所に固定された基板、
 ドナー赤血球または患者の血漿を基板に同時に分配し、未結合のドナー R B C または患者の血漿の未結合部分を基板から除去するように構成されたディスプレイ、および
 ドナー赤血球に結合した抗体の有無を検出するように構成された検出器
 を含む、クロスマッチングのための系。

30

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 8 】

【 図 1 】本発明の実施形態に従った血液分析系の概略図である。

【 図 2 】試料（例えば R B C ）が本発明の実施形態に従ったマイクロ流体プローブで供されている、結合剤のアレイが適用された基板の平面図である。この実施形態は抗原型判定に使用することができ、結合剤は R B C に対する抗体である。

【 図 3 】試料（例えば、抗体を有する血漿）が本発明の別の実施形態に従ったマイクロ流体プローブで供されている、結合剤のアレイが適用された基板の平面図である。この実施形態は、抗体のスクリーニングおよび / または同定に使用することができ、結合剤は、非変性もしくは溶血表現型の R B C または組換え血液型抗原である。

40

【 図 4 】試料（例えば、R B C および / または抗体を有する血漿）が本発明の別の実施形態に従ったマイクロ流体プローブによって供されている、結合剤のアレイが適用された基板の平面図である。この実施形態は、抗原型判定と抗体のスクリーニングおよび / または同定との両方に使用することができる。

【 図 5 】先行技術のマイクロ流体プローブを示す図である。

【 図 6 】本発明の実施形態に従ったマイクロ流体プローブの平面図である。

【 図 7 】本発明の別の実施形態に従ったマイクロ流体プローブの平面図である。

【 図 8 】本発明の実施形態に従った図 1 の系を用いる、非変性もしくは溶血表現型の R B C および / または R B C に対する抗体が事前に固定された基板表面へ試料を供する方法を示すフローチャートである。

50

【図 9】本発明の実施形態に従った、単一の試料または異なる試料に並列で接続された複数のマイクロ流体プローブを示す図である。

【図 10】本発明の実施形態に従った、単一の試料または異なる試料に並列で接続された複数のマイクロ流体プローブを示す図である。

【図 11】本発明の実施形態に従った、単一の試料または複数の試料に接続され得る、複数の処理液マイクロチャネルを有するマイクロ流体プローブを示す図である。

【図 12】本発明の実施形態に従った、患者の血漿と潜在的ドナーの赤血球とのクロスマッチングの方法を示すフローチャートである。

【図 13】実施例 5 A において記載される、マイクロ流体プローブを用いるシングルプレックス抗原型判定の結果を示す図である。図 13 B は、図 13 A で示されるスポットの 1 つの拡大図である。

【図 14】実施例 5 B において記載される、マイクロ流体プローブを用いるマルチプレックス抗原型判定の結果を示す図である。

【図 15】実施例 6 において記載される、マイクロ流体プローブを用いる直接抗グロブリン試験の結果を示す図である。

【図 16】実施例 7 A において記載される、マイクロ流体プローブを用いる抗体スクリーニングの結果を示す図である。

【図 17】実施例 7 B において記載される、マイクロ流体プローブを用いるリバー S A B O グループ判定の結果を示す図である。

【図 18】実施例 8 において記載される、マイクロ流体プローブを用いるクロスマッチングの結果を示す図である。図 18 A は、クロスマッチングスライド上の蛍光スポットの画像であり、図 18 B は、測定された、各スポットの蛍光強度である。

【発明を実施するための形態】

【0059】

概説

血液型を構成する赤血球膜抗原の全ての抗原変異体のうち、抗原 A、B、および H を有する A B O 系、特に抗原 D (D 抗原が存在しない場合は d と示される)、C、E、c、および e を有する R h e s u s (R H) 系、特に 2 つの抗原 K および k を有する K e l l (K E L) 系、特に抗原 F y ^a および F y ^b を有する D u f f y (F Y) 系、特に抗原 J k ^a および J k ^b を有する K i d d (J K) 系、または、M N S 系、L e w i s (L E) 系などの、あまり一般的に実施調査されていない他の系などの、30 を超える赤血球抗原系がこれまでにヒトにおいて同定されている。

【0060】

標準的な輸血は、通常、A B O 系および R h e s u s D 系 (D + o r d) における型を考慮する。しかし、典型的ではない凝集素が現れるリスクがある状況では、R h e s u s 系のある特定の数の他の抗原、特に C、c、E、および e 抗原、ならびに K e l l、またはさらに他の系が考慮される。

【0061】

赤血球抗原に対する抗体。自己免疫疾患のケースなどの病理学的状況以外では、個体の血清は、赤血球抗原に対する以下の 2 つのタイプの抗体を含有し得る。

(i) 典型的 (または通常) と言われ、A B O 系の抗原に対する抗体 (例えば、B 型の個体における抗 A 抗体)。

(ii) 血清または血漿におけるその存在が偶然のものであり、より具体的には非 A B O 系抗原に対するものである、典型的ではない (または免疫) と言われる抗体。

「典型的な」または「通常の」抗体は、赤血球をインビトロで凝集させ得る M および / または A アイソタイプの免疫グロブリンであることが、より多い。「典型的ではない」または「不規則な」または「免疫」抗体は、最も一般的には、例えば、輸血の間の、または母親の血液型に属さない胎児赤血球抗原に対する母親の免疫反応に起因する妊娠中の、特に出産時の、1 つまたは複数の抗原に対する免疫化の後、外来赤血球による抗原刺激がある場合に現れる G アイソタイプのものである。

【 0 0 6 2 】

血液の分析において用いられる様々な試験には、以下のものが含まれる。

【 0 0 6 3 】

A B O グループ判定：この分析は、血漿または血清を用いる血清分析および血球ペレットを用いる細胞分析（それぞれ、リバーズおよびフォワードグループ判定）という2つのタイプの分析の組み合わせおよび解釈の結果である。

- フォワードグループ判定では、個体の赤血球を、A B O 系の抗原に対する正確な抗体特異性をそれぞれが有する試験抗体（抗 A、抗 B、および抗 A B 抗体）と接触させる。
- リバーズグループ判定では、典型的な循環抗体を含有する個体の血清または血漿を、A B O 系の正確な抗原型にそれぞれが属する表現型判定された赤血球と接触させる。

10

【 0 0 6 4 】

表現型判定アッセイ：表現型判定に通常用いられる技術は、通常、調査対象の赤血球の表面にある抗原の有無を、特異的抗体を用いてスクリーニングすることにある。

【 0 0 6 5 】

典型的ではない抗赤血球抗体のスクリーニングおよび/または同定：この試験は、個体の血液における、様々な赤血球抗原に対する抗体の有無を検出するために用いられる。このために、その抗原が既知である表現型判定された赤血球または/および組換え血液型抗原への、これらの抗体（I g G および/または I g M）の結合を実証することが目標とされる。表現型判定された赤血球または組換え抗原に結合すると、これらの典型的ではない抗赤血球抗体は、抗免疫グロブリン抗体によって明らかにされる。第1のステップにおいて、「スクリーニング」赤血球のパネル（典型的ではない抗体の有無を検出する（しかし同定はしない）ために輸血において重要な抗原の全てを含むように選択された2つまたは3つの赤血球）が使用される。スクリーニングが陽性である場合、存在する典型的ではない1つまたは複数の抗体の特異性は、次いで、既知の血液型系の大部分を占める10から15、またはさらに20の異なる表現型判定された赤血球を通常含む「同定」赤血球の少なくとも1つのパネルによって同定される。

20

【 0 0 6 6 】

クロスマッチングアッセイ：この分析の目的は、レシピエントにドナー血液を注入する前にドナー - レシピエント適合性を予測することである。これは、ドナー血液に行われる基本的な型判定を超えて、適合性を確認するために用いられる。潜在的ドナーの赤血球を、潜在的な輸血されるレシピエントの血清/血漿と接触させる。潜在的レシピエントの試料が潜在的ドナーの赤血球に対する抗体を含有していれば、これらの抗体は、抗免疫グロブリン抗体で明らかにされる。このような分析は、抗体の有無の判定のみを行い、その特異性の判定は可能にしない。「マイナー」クロスマッチングと呼ばれる別のタイプのクロスマッチングにおいて、潜在的ドナーの血漿を、潜在的な輸血されるレシピエントの赤血球と接触させる。潜在的ドナーの試料が潜在的レシピエントの赤血球に対する抗体を含有していれば、抗体は抗免疫グロブリン抗体で明らかにされる。

30

【 0 0 6 7 】

直接抗グロブリン試験：特に、新生児、または例えば溶血性貧血もしくは自己免疫疾患に罹患している患者において、赤血球は、抗体によってまたは/および血清補体画分によってインビボで感作される。インビボで感作された赤血球の表面に存在するこれらの抗体または活性血清補体画分は、それ自体、赤血球によって運ばれる抗原を構成し得、抗免疫グロブリン抗体および/または抗補体抗体によって直接的に検出される。

40

【 0 0 6 8 】

本明細書において、上記の試験を含む血液分析のための系および方法が記載される。この系および方法は、血液分析の自動化を容易にする。この系および方法は、グループ判定および表現型判定の検出、抗体のスクリーニングおよび/または同定、クロスマッチング、ならびに直接抗グロブリン試験に用いることができる。

【 0 0 6 9 】

本明細書において記載される系および方法の利点には、限定はしないが、(1) ナノリ

50

ットルからマイクロリットル容積の試薬および患者試料を送達するコンパクトなサイズの系を提供すること、(2) 反応化学を限局化し、反応時間を短くする系を提供すること、(3) マルチプレックスアッセイを行い得る(例えば、複数の患者の試料を試験し得る、および/もしくは複数の分析物についての単一の試料を試験し得る)系を提供すること、(4) 同時の表現型判定(例えば血液型フォワード型判定)および抗体のスクリーニング/同定(例えば血液型リバー型判定)を可能にする系を提供すること、(5) 非変性または溶血赤血球の抗原性を維持しながら非変性または溶血赤血球を基板に載せ得る系を提供すること、(6) 患者に輸血され得る赤血球をクロスマッチングし得る系を提供すること、ならびに/または(7) 試料を供するステップおよび未結合材料を洗浄するステップを同時に行ってアッセイ時間を短くする系を提供することが含まれる。

10

【0070】

本明細書および添付の特許請求の範囲において用いる場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」には、明らかにそうではないことが内容上明らかに示されない限り、複数形の言及が含まれる。したがって、例えば、「1つの(a)結合剤」を含む系に対する言及には、1つまたは複数の結合剤を含む系が含まれる。同様に、「1つの(a)物質」に対する言及には、1つまたは複数の物質が含まれる。本明細書において用いる場合、用語「約」は、列挙された数値および列挙された数値の10%以内のあらゆる値に言及する。したがって、「約25」は、22.5および27.5を含む、22.5と27.5との間のあらゆる値に言及する。

20

【0071】

系

図1を参照すると、血液を分析するための系100が示されている。一実施形態において、系100は、表現型判定(抗原型判定としても知られている)、抗体のスクリーニングおよび同定、または患者血漿とドナー赤血球とのクロスマッチングに用いられる。系100は、基板102、ディスペンサー104(例えばマイクロ流体プローブ)、光源106、および検出器108を含む。

【0072】

基板102は、結合剤110が固定または結合された表面を提供する(図2に示す)。基板102は、通常、平面の形状であり、限定はしないが、ポリエチレンテレフタレート(例えばマイラー)、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、プラスチック、ガラス、シリコン、酸化シリコン、ならびに/あるいは、裸の、またはポリマーもしくは活性基、例えばカルボキシル基、アミン基、トシル基、および他の基で官能化された金属および金属酸化物を含む、1つまたは複数の材料で形成され得る。一部の実施形態において、基板は、限定はしないが、ポリエチレンテレフタレート(例えばマイラー)、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリカーボネート、プラスチック、ガラス、シリコン、酸化シリコン、ならびに/または、裸の、もしくはポリマーで官能化された金属および金属酸化物を含む、1つまたは複数の材料で形成されたスライドである。基板102は、マイクロウェルまたはナノウェルを含有し得る。金属または金属酸化物で形成された基板の表面を官能化するためのポリマーの例には、グリシドキシプロピルトリエトキシシラン、ポリ-L-リジン、ポリブレン、ポリエチレングリコールポリマー、デキストランポリマー、アミノプロピルシラン、カロキシシラン(caroxysilane)、ヒドロゲルおよびポリマーブラシ、ならびに/または、例えば、官能化したアルキルチオール、デンドリマー、もしくはオリゴヌクレオチドの自己組織化した単層が含まれる。一実施形態において、基板102は金で被覆される。一実施形態において、基板102は、結合剤がその中に固定され得る複数のウェルを有するマイクロタイタープレートである。一部の実施形態において、基板102は、例えば、ニトロセルロース、ポリフッ化ビニリデン、ナイロン、またはポリスルホンを含む材料で形成される膜である。

30

40

【0073】

基板102の表面は湿っていてよい。湿った表面は、結合剤が活性を維持するために水和を要する一部の実施形態において望ましい。基板102の表面を湿らせるために用いら

50

れる典型的な流体には、限定はしないが、緩衝液、水、生理食塩水、および/または油（例えば鉱油）が含まれる。

【0074】

一部の実施形態において、基板102は、X方向、Y方向、および/またはZ方向に可動なプラットフォーム上に載せられる。

【0075】

図2～図4で示される実施形態において、1つまたは複数の結合剤110は、線のアレイの状態では基板102の表面に結合している。一実施形態において、線は、約25ナノメートルから約500マイクロメートルの幅である。ある特定の実施形態において、線は、約50ナノメートルから約200マイクロメートルの幅である。一部の実施形態において、1～100の結合剤が基板102の表面に結合している。一実施形態において、線のアレイは、基板102の幅いっぱいに広がっている。別の実施形態において、線のアレイは、基板102の長さいっぱいに広がっている。一部の実施形態において、1つまたは複数の結合剤110は、スポットおよび/またはドットのパターンで基板102に結合している。一実施形態において、スポット/ドットは、約25ナノメートルから約500マイクロメートルの幅である。ある特定の実施形態において、スポット/ドットは、約50ナノメートルから約200マイクロメートルの幅である。一実施形態において、スポットおよび/またはドットのアレイは、基板表面を覆っている。

10

【0076】

一部の実施形態において、結合剤110は、基板102の表面全体に結合している。例えば、基板102がスライドである実施形態において、スライドの表面全体が結合剤110で被覆され得る（例えば赤血球または抗体）。

20

【0077】

結合剤110は、血液試料内の1つもしくは複数の物質（例えば、全血、血漿、血清、またはRBC試料）または唾液試料に結合し得る。一部の実施形態において、結合剤110は、赤血球の表面に結合している抗原、またはヒト免疫グロブリン、または/および補体画分（被覆された、例えば赤血球上に吸着された）に対する抗体であり、物質は抗原である。一部の実施形態において、結合剤は、非変性もしくは溶血表現型の赤血球、または組換え抗原であり、物質は、赤血球の表面に結合した抗原に対する抗体である。一部の実施形態において、結合剤は、レクチンまたはユニバーサル抗赤血球抗体（例えば、抗グリコホリンA抗体）であり、物質は赤血球である。

30

【0078】

一部の実施形態において、結合剤110または物質として使用される抗体は、特定の血液型に特徴的な様々な抗原決定基と特異的に反応する免疫グロブリンである。抗体は、IgA抗体、IgM抗体、IgG抗体、またはその混合物であり得る。一部の実施形態において、抗体は、様々な主要なおよびマイナーな血液型系を特徴付ける赤血球抗原と特異的に反応し得る。このような血液型系には、限定はしないが、ABO系、特に抗原D（D抗原が存在しない場合はdと示される）、C、E、c、e、およびCwを有するRhesus（RH）系、特に4つの抗原K、k、Kp^a、およびKp^bを有するKell（KEL）系、特に抗原Fy^aおよびFy^bを有するDuffy（FY）系、特に抗原Jk^aおよびJk^bを有するKidd（JK）系、特に抗原M、N、S、およびs、およびP系の抗原P1を有するMNS系、特に抗原Lu^aおよびLu^bを有するLutheran系、ならびに、特に抗原Le^aおよびLe^bを有するLewis（LE）系が含まれる。

40

【0079】

抗体は、ポリクローナルおよび/またはモノクローナル、またはモノクローナルの混合物、または、F(ab')₂断片、Fab断片、scFv、およびVHHナノボディのドメインを含むその機能的断片であり得る。機能的抗体断片は、(i) 由来（例えばトランスジェニックマウス）に由来し得るか、または(ii) 可変ドメインが例えば非ヒト由来であり定常ドメインが例えばヒト由来であるキメラであり得るか、または(iii) 相補性決定領域（CDR）グラフトングされていてよく、ここで、可変ドメインのCDR

50

は例えば非ヒト由来であるが可変ドメインの1つもしくは複数のフレームワークは例えばヒト由来であり、定常ドメイン(あれば)は例えばヒト由来である。抗体は、天然の由来源、すなわち生きた生物もしくは細胞培養物から単離することができるか、または完全もしくは部分的に合成の抗体であり得る。合成の抗体は、既知の抗体配列の分析に基づいて全体または一部がインシリコで合成配列に由来する配列を有する抗体である。抗体配列またはその断片のインシリコ設計は、例えば、抗体または抗体断片の配列のデータベースを分析し、それから得られたデータを利用してポリペプチド配列をデバイス化することによって行うことができる。

【0080】

一部の実施形態において、結合剤110として用いられる赤血球は、既知の血液型表面抗原を有する非変性表現型の赤血球である。他の実施形態において、溶血表現型の赤血球または「ゴースト」を結合剤110または物質として用いることができる。ゴーストは、穏やかに溶血し、抗原性を保ちながらそれらのヘモグロビンが除去された赤血球である。一部の実施形態において、酵素処理された赤血球を結合剤110として用いることができる。一部の実施形態において、膜から単離された血液型表面抗原を結合剤110として用いることができる。さらに他の実施形態において、化学合成されたポリペプチドおよび多糖血液型抗原ならびに組換え血液型抗原を結合剤110として用いることができる。

10

【0081】

結合剤110は、限定はしないが、流体力学的流動閉じ込め、インクジェットプリント、スプレーにより載せること、マイクロスポッティング、および/またはマイクロ接触プリントなどの技術によって基板102の表面上に載せることができる。載せた間または後に、結合剤110は、例えば、静電引力、親和性相互作用、疎水性/親水性相互作用、または共有結合によって基板102の表面上に固定することができる。

20

【0082】

一部の実施形態において、結合剤110に固定されておらず非特異的な結合部位を提供し得る基板102の領域は、例えば、緩衝液内の脱脂乳タンパク質、カゼイン、および/またはウシ血清アルブミンなどの遮断剤で処理することができる。

【0083】

抗原型判定または表現型判定に使用され得る、図2で示される実施形態において、基板102の表面上に固定された結合剤110は、それぞれが異なる抗原に対する1つまたは複数の抗体のアレイである。一部の実施形態において、単一抗原に対する複数の抗体が、基板102の表面上に固定されている。各縦線は、異なる抗体、例えば、抗A、抗B、抗AB、抗D、抗C、抗c、抗Cw、抗K、抗k、抗Kp^a、抗Kp^b、抗Fy^a、抗Fy^b、抗Jk^a、抗Jk^b、抗Le^a、抗Le^b、抗P1、抗M、抗N、抗S、抗s、抗Lu^a、または抗Lu^bに相当し得る。

30

【0084】

抗体のスクリーニングおよび/または同定に使用され得る、図3で示される実施形態において、基板102の表面上に固定された結合剤110は、1つまたは複数の非変性または溶血表現型の赤血球、膜抽出物、または/および組換え血液型抗原のアレイである。各縦線は、異なる赤血球、例えば、赤血球RBCI、RBCII、RBCIII、・・・RBCXXに相当する。

40

【0085】

抗原型判定ならびに抗体のスクリーニングおよび/または同定(例えば「コンボ」試験)に使用され得る、図4で示される実施形態において、結合剤110の2つ以上のアレイ(すなわち、赤血球抗原に対する抗体のアレイ、および赤血球のアレイ)もまた、基板102上に固定され得る。例えば、それぞれ抗A、抗B、抗AB、抗D、抗C、抗c、抗Cw、抗K、抗k、抗Kp^a、抗Kp^b、抗Fy^a、抗Fy^b、抗Jk^a、抗Jk^b、抗Le^a、抗Le^b、抗P1、抗M、抗N、抗S、抗s、抗Lu^a、または抗Lu^b抗体の縦線は、基板102の表面に結合し得、それぞれ赤血球RBCI、RBCII、RBCIII、・・・RBCXXの縦線は、基板102の表面に結合し得る。

50

【0086】

再び図1を参照すると、ディスペンサー104は、1つまたは複数の試料のマイクロ流体またはサブマイクロ流体容積を基板102の表面上の別々のパスに分配するように構成されている。一部の実施形態において、パスは、基板102の長さいっぱいに広がっている。他の実施形態において、パスは、基板102の幅いっぱいに広がっている。ある特定の実施形態において、パスの幅は、約25ナノメートルから約500マイクロメートルの幅である。一実施形態において、ディスペンサー104はまた、1つまたは複数の結合剤110を基板102の表面上に分配するように構成されている。

【0087】

一部の実施形態において、ディスペンサー104は、X方向、Y方向、および/またはZ方向に可動である。ディスペンサー104の動きおよび機能は、コンピュータで制御することができる。

10

【0088】

一部の実施形態において、ディスペンサー104は、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーである。一実施形態において、流体力学的流動閉じ込めディスペンサーは、本明細書に組み込まれる米国特許出願第13/881989号明細書において記載されているようなマイクロ流体プローブ200（または縦方向MFP）である。図5Aおよび図5Bで示される実施形態において、マイクロ流体プローブ200は、処理液マイクロチャンネル223、224と浸水液マイクロチャンネル323、324とが共に提供されている基底層220を含み得る。各チャンネルは、開口部221、222、321、322と流体連通し、各開口部は基底層の面に位置し（同一面である必要はない）、好ましくは近接している。チャンネル223、224、323、324はまた、モーター付きポンプと開口部221、222、321、322との間を接続する。マイクロ流体プローブ200を表面の近くで動かすと、開口部221を介して提供される処理液は浸水液と結び付き、好ましくは、図5Bの曲がった（太い）矢印で表されるように、開口部321および322を介して提供される浸水液内に入る。矢印は理解のために提供されており、それらの寸法は意図的に誇張されている。この点について、装置は、好ましくは、層流をもたらすように構成されている。一部の実施形態において、開口部の寸法は数十マイクロメートルであり得る。開口部は、50マイクロメートル、または数百マイクロメートル程度離れていてよい。処理チャンネル/開口部の対が本明細書において用いられるため、処理液は、開口部222で浸水液の一部と再吸引され得る。流体パスが開口部221と222との間で逆になること、すなわち、処理液は開口部222から注入され得るが開口部221は液体を吸引し得ることに留意されたい。処理液は、原則的に開口部221および222の近くに位置し、原則的にヘッド200の近くに存在する浸水液に囲まれる。示されているように、被覆層210は、基底層の上面で開いているチャンネルを閉じる。

20

30

【0089】

さらに、処理液マイクロチャンネルの部分は、好ましくは、基底層の上面で開いている基底層220の層厚内の溝223'、224'として提供される。このように、マイクロチャンネルの形成は、その横方向の寸法にもかかわらず（おそらく小さい、例えば数十マイクロメートル）、簡単に行われる。組み立ての後、溝は被覆層210の部分によって閉じられる。溝は、道具によって、基底層220の上面に直接彫り込むことができる。溝はあらゆる適切な断面形状、例えば円形、四角形、UまたはV型の断面を有し得る。所要の道具は、典型的には基底層220の材料に従って選択される。変型において、レーザーアブレーションが検討され得る。しかし、最も有利には、深掘り反応性イオンエッチング（DRIE）がマイクロチャンネルの製造に用いられる。

40

【0090】

図5Bに示すように、溝223'、224'は、それぞれの開口部221、222まで延びている。同様に、浸水チャンネル223、224は、それぞれの開口部321、324に達する。この実施例において、チャンネルおよび開口部は、ヘッドの上面の主軸の周りに対称的に配置されている。開口部は、これも同様に容易に機械で作ることができる、基底

50

層 2 2 0 の正面 3 2 0 のエッジ 3 1 0 の辺りで、溝の端部で直接形成される。前記フロントエンド 3 2 0 は典型的には鋭角で作られ、これは、目的の表面にコンパクトに液体を載せることを可能にし、容易に光学的モニタリングを行う余地を残す。

【 0 0 9 1 】

図 5 A を参照すると、バイアス 2 1 1、2 1 2 が被覆層 2 1 0 上に提供されている。浸水チャンネル 3 2 3、3 2 4 への流体連通の中継を可能にするさらなる通路 3 1 1 が示されている（両浸水チャンネルに注水する唯一の通路がここでは示されている）。バイアスに接続された対応するチューブポートが提供され得る（示されていない）。チャンネルは、バイアスに面するように配置された端部を有する。

【 0 0 9 2 】

図 5 A および図 5 B に示すように、マイクロ流体プローブ 2 0 0 は、2 つの処理液マイクロチャンネルを含む。一部の実施形態において、マイクロ流体プローブ 2 0 0 は、3 つ以上の処理液マイクロチャンネルを含む。一部の実施形態において、マイクロ流体プローブ 2 0 0 は、2 ~ 5 0 の処理液マイクロチャンネルを含み得る（図 1 1 を参照されたい）。一部の実施形態において、マイクロ流体プローブ 2 0 0 は、処理液マイクロチャンネルの少なくとも 1 つに加熱エレメントを含み得る。試料の加熱は抗原および抗体が反応する速度を増大させ得、これは試験時間を短くし得る。

【 0 0 9 3 】

典型的な処理液には、緩衝液、全血、R B C、血漿、血清、または油（例えば鉱油）が含まれる。典型的な浸水液には、鉱油、緩衝液、水、および/または生理食塩水が含まれる。

【 0 0 9 4 】

一部の実施形態において、マイクロ流体プローブは、全血試料において赤血球から血漿を分離するための構造を含む。一部の実施形態において、分離は、サイズによっておよび/または毛管力によって行うことができる。図 6 は、異なる寸法の少なくとも 2 つの処理液マイクロチャンネルを有するマイクロ流体プローブ 6 0 0 の実施形態を示す。プローブは、目詰まりを起こすことなく全血試料または R B C 含有試料（すなわち血漿中の R B C）と使用され得るように構成されている。第 1 のマイクロチャンネル 6 0 2 は、全血試料内の赤血球を排除するサイズになっている。第 2 のマイクロチャンネル 6 0 4 は、試料の赤血球が通過できるサイズになっている。処理液マイクロチャンネルが円形断面を有する一実施形態において、第 1 のマイクロチャンネル 6 0 2 は、6 マイクロメートル未満の直径を有する。一部の実施形態において、第 1 のマイクロチャンネルの直径は、4 マイクロメートル未満、または 2 マイクロメートル未満、または 1 ~ 2 マイクロメートル未満である。一部の実施形態において、第 2 のマイクロチャンネル 6 0 4 は、約 7 マイクロメートルを超える直径を有する。赤血球の直径は約 6 ~ 8 マイクロメートルである。より大きな直径を有することで、第 2 のマイクロチャンネル 6 0 4 は赤血球を通過させる。マイクロチャンネルの断面は、円形、長円形、および楕円形を含む、あらゆる適切な形状であり得る。一部の実施形態において、処理液マイクロチャンネル 6 0 2 および 6 0 4 の内面を、例えば、血液成分が内面に結合するのを防ぐヘパリンなどの材料で被覆することができる。全血試料はまた、血液の凝固を防ぐために、例えば、ヘパリン、クエン酸塩、または E D T A で抗凝固処理され得る。

【 0 0 9 5 】

図 7 は、第 1 の開口部 7 0 4 と流体連通する蛇行マイクロチャンネル 7 0 2 を有するマイクロ流体プローブ 7 0 0 の実施形態を示す。蛇行マイクロチャンネル 7 0 2 の直径は、全血試料の R B C を保持するサイズになっている。より小さな直径の毛細管 7 0 6 は、蛇行マイクロチャンネル 7 0 2 から分岐し、第 2 の開口部 7 0 8 と流体連通する。毛細管 7 0 6 は、赤血球を有さない血漿を通過させる。

【 0 0 9 6 】

マイクロ流体プローブは、チャンネルを通過する流体に適合する材料で形成され得る。典型的な適合材料には、限定はしないが、シリコン、シリカ、ポリジメチルシロキサン（P

10

20

30

40

50

DMS)、ヒ化ガリウム、ガラス、セラミック、石英、ポリマー、例えば、ネオプレン、Teflon(商標)、ポリエチレンエラストマー、ポリブタジエン/SBR、亜硝酸塩、ナイロン、および/または金属が含まれる。チャンネルの内面はまた、流体成分とチャンネル自体との間の親和性を低減させるために適切な材料で被覆することができる。

【0097】

再び図1を参照すると、光源106は、基板102の表面を照射するように構成されている。検出される信号に応じて、光源106は、可視領域から近赤外領域までの範囲の光を提供し得る。典型的な光源には、レーザーおよび発光ダイオードが含まれる。

【0098】

検出器108は、基板102の表面からの発光を検出するように構成されている。一部の実施形態において、検出は、発色、蛍光、または発光の検出によって行われる。一部の実施形態において、検出は、写真または電子検出器などによる画像化によって行われる。典型的な電子検出器には、フォトダイオード、電荷結合素子(CCD)検出器、または補的な金属酸化物半導体(CMOS)検出器が含まれる。

10

【0099】

検出器108からのアナログ信号は、アナログ-デジタルコンバータ110によってデジタル化される。デジタル化された信号は、検出された光の少なくとも1つの値または強度を得るために、マイクロプロセッサ112によって処理され、前記値または強度は、メモリ114に記憶され、かつ/または任意選択のディスプレイ116に表示される。

【0100】

適切なエレクトロニクスおよびソフトウェアを使用することによって、系100を、基板102の表面上の結合剤110に結合した特異的物質の同一性および位置が分かるようにプログラムすることができる。物質の同一性および位置は、生じた信号で補正され得、それによって、特定の血液グループ判定をテスターに判定および同定することができる。さらに、統計ソフトウェアを含めて、基板102上に提供された結合剤110の様々な反復および/または希釈物から生じた結果を結び付け、かつ系統立てることができる。この様式で、多数の物質から得られた信号を共に関連付け、統計的に有意な結果をテスターに提示することができる。

20

【0101】

方法

系100は、抗原型判定、抗体のスクリーニング/同定、抗原型判定とクロスマッチングとの組み合わせを行うために使用することができる。さらに、系100は、グループ判定および表現型判定の検出、抗体のスクリーニングおよび/または同定、クロスマッチング、ならびに直接抗グロブリン試験に使用することができる。

30

【0102】

図8を参照すると、抗原型判定ならびに/または抗体のスクリーニングおよび/もしくは同定のための方法800が示されている。方法800は、例えば、図1で記載した前述の系で行うことができる。

【0103】

典型的なステップ810において、試料は、試料内の1つまたは複数の物質に結合し得る1つまたは複数の結合剤110が固定された、湿ったまたは乾燥した基板102に供される。図2に示す抗原型判定の実施形態において、試料および物質は、酵素処理されたまたはされていない、患者またはドナーのRBCであり、基板102の表面上に固定された結合剤110は、赤血球(RBC)抗原に対する抗体である。RBC試料は、例えば遠心分離によって全血をRBCおよび血漿に分離することによって得ることができる。得られたRBCは、「そのまま」用いることができるか、または希釈することができる。一部の実施形態において、RBCは約0.1から50%に希釈される。一部の実施形態において、RBCは約0.5~20%の間に希釈される。ある特定の実施形態において、RBCは約0.6から5%の間に希釈される。一部の実施形態において、RBCは50%超に希釈される。

40

50

【0104】

図3に示す抗体のスクリーニングおよび/または同定の実施形態において、試料は患者またはドナーの血漿であり、基板102の表面上に固定された結合剤110は、非変性もしくは溶血表現型のRBC、化学合成されたポリペプチド、天然のもしくは合成された多糖血液型抗原、または組換え血液型抗原であり、1つまたは複数の物質は、RBC抗原、組換え赤血球抗原、または赤血球膜抽出物に対する抗体である。

【0105】

図4に示す実施形態において、図2に示す抗原型判定の実施形態は、図3に示す抗体のスクリーニングおよび/または同定の実施形態と組み合わせられている。この実施形態において(例えば「コンボ」アッセイ)、基板の第1の部分は、非変性であるかまたは溶血してよい表現型判定されたRBCが固定されており、第2の部分は、RBC抗原に対する抗体が固定されている。

10

【0106】

一実施形態において、1つまたは複数の試料が1つまたは複数のマイクロ流体プローブで供される。別の実施形態において、1つのマイクロ流体プローブが各試料に用いられる(図2~3)。各試料は、結合剤110で被覆された基板102に、結合剤110の線路上に垂直の方向に供され、その結果、試料は、基板102に被覆された結合剤110のそれぞれに供される。さらに別の実施形態において、並列したプローブのアレイであるプローブアレイ900は、同一のまたは異なる試料に接続される(図9~10)。プローブアレイ900は、同一のまたは異なる試料を全ての結合剤110に一度に供する。新たな試料のために、プローブアレイ900内のチャンネルは例えば第1の試料を除去するためにすすがれ、プローブアレイ900は別の結合剤110セットに向かって共に動き、新たな試料が新たな結合剤110セットに供される。各新たな試料のために、プローブアレイ900をすすいで動かすプロセスが繰り返される。一部の実施形態において、複数のプローブアレイ900が、複数の結合剤110にそれぞれに対する複数の試料を一度に試験するために使用される。

20

【0107】

図11に示す実施形態において、マイクロ流体プローブ1100は、複数の処理液マイクロチャンネルを含む。複数の処理液マイクロチャンネルは、1つまたは複数の試料(すなわち、同一のまたは異なる試料)および/または結合剤110を基板102の表面上に載せるために使用することができる。一部の実施形態において、マイクロ流体プローブは、2~100の処理液マイクロチャンネルを含む。他の実施形態において、プローブアレイ900におけるプローブのそれぞれ(図9~10に示す)は、複数のマイクロチャンネルを含む。「コンボ」アッセイの実施形態において、図6で示すマイクロ流体プローブ600は、1つまたは複数の試料を、基板の第1の部分に非変性であるかまたは溶血してよい表現型判定されたRBCが固定されており、第2の部分にRBC抗原に対する抗体が固定されている、図4で示す実施形態に載せるために使用される。

30

【0108】

典型的なステップ820において、未結合材料、例えば、赤血球および/または抗体は、結合剤が固定されている基板102の少なくとも一部分から除去される。未結合材料は、基板102の表面を、例えば、緩衝液、水、または生理食塩水で洗浄することによって除去され得る。一実施形態において、マイクロ流体プローブは、1つまたは複数の処理液マイクロチャンネルを介して洗浄溶液(例えば浸水液)をポンプ吸い上げることによって、未結合材料をステップ810と同時に除去するために使用することができる。

40

【0109】

典型的なステップ830において、基板102に固定された1つまたは複数の結合剤110に結合した物質が検出され、試料内に存在する物質が同定される。結合剤に結合した物質が存在しないことも判定され得る。抗原型判定の実施形態において、RBC抗体に結合したRBCの赤色が、視覚的にまたは分光光度的に検出され得る。RBC抗体に結合したRBCはまた、例えば、発色、蛍光、または化学発光コンジュゲート抗体を含む二次標

50

識検出によっても検出され得る。抗体のスクリーニングおよび/または同定の実施形態において、RBC抗原に結合した抗体は、特異的な二次標識検出によって検出され得る。

【0110】

図12を参照すると、ドナーの赤血球および患者の血漿を載せるためにマイクロ流体プロブを用いるクロスマッチング方法1200が示されている。この方法は、ドナーのRBCと患者の血漿との適合性を試験する。方法1200は、例えば、図1に記載した前述の系で行うことができる。

【0111】

典型的なステップ1210において、ドナーの赤血球が、マイクロ流体プロブを用いて、事前に湿潤処理された基板表面に供される。ドナーの赤血球は、非変性であるかまたは溶血してよい。一部の実施形態において、ドナーの赤血球はまた、表現型判定されている。一部の実施形態において、これらのRBCは、赤血球の抗原性を維持するために、浸水液内で基板表面に供される。一部の実施形態において、基板表面は、例えば、レクチン、化学的作用物質、または例えば抗グリコホリンA抗体などのユニバーサル抗RBC抗体などの結合剤で事前に処理される。

10

【0112】

典型的なステップ1220において、未結合のドナー赤血球は、基板102の表面を、例えば、緩衝液、水、または生理食塩水で洗浄することによって除去される。一実施形態において、マイクロ流体プロブは、1つまたは複数の処理液マイクロチャネルを介して洗浄（浸水）溶液をポンプ吸い上げることによって、未結合のドナー赤血球をステップ1210と同時に除去するために使用することができる。

20

【0113】

典型的なステップ1230において、患者の血漿試料は、ステップ1210において事前に処理された基板表面に供されたドナーRBCの上に載せられる。一実施形態において、ステップ1210において使用されるものと同じのプロブが、患者の血漿を載せるために使用される。ステップ1210におけるものと同じのマイクロチャネルまたは異なるマイクロチャネルが、患者の血漿を載せるために使用され得る。ステップ1210におけるものと同じのマイクロチャネルが使用される場合、マイクロチャネルは、使用の間に例えば緩衝液で流すことができるか、または、緩衝液、油、もしくは空気の「小塊」を用いて、ドナーRBCを患者試料から分離することができる。別の実施形態において、異なるマイクロ流体プロブが、相互汚染を防ぐために、このステップとステップ1210との間に使用される。

30

【0114】

典型的なステップ1240において、患者の血漿試料の未結合の抗体は、基板102の表面を例えば緩衝液、水、または生理食塩水で洗浄することによって除去される。一実施形態において、マイクロ流体プロブは、1つまたは複数の処理液マイクロチャネルを介して洗浄溶液をポンプ吸い上げることによって、ステップ1230で未結合の抗体を除去するために使用され得る。

【0115】

典型的なステップ1250において、ドナーの赤血球に結合した抗体を検出したことに応答して、患者の血漿内に存在する抗体が検出され（例えば、二次標識された抗体によって）、ドナーの赤血球に結合した抗体を検出しなかったことに応答して、患者の血漿内に存在しない抗体が判定される。

40

【0116】

別のクロスマッチング方法において（例えば、マイナーなクロスマッチング方法）、マイクロ流体プロブは、患者のRBCおよびドナーの血漿を載せるために用いられる。この方法は、患者の血漿とドナーのRBCとの適合性を試験するものであり、RBCのみではなく全血が患者に輸血される状況、または、医学的に関連する量のドナー血漿が、患者に輸血される分離されたRBC内に残っている状況で、重要である。マイナーなクロスマッチング方法は、例えば、図1に示す前述の系を用いて行うことができる。

50

【0117】

マイクロ流体プローブの1つの利点は、赤血球の抗原性の維持を可能にする、生理学的浸水液内に載せる能力である。これによって、プローブのさらなる使用可能性がもたらされる。一部の実施形態において、血液型判定のための系は、非変性のまたは溶血した赤血球に結合し得る1つまたは複数の結合剤が別々の場所に固定された基板；これらの非変性または溶血表現型の赤血球を基板上に分配し、未結合の赤血球を基板から除去するように構成されたディスペンサー；患者の血漿試料を表面に供された赤血球の上に載せ、未結合の抗体を除去するように構成されたディスペンサー；および抗体を検出するように構成された検出器を含む。先に記載したクロスマッチングは一実施例である。

【0118】

抗体のスクリーニングは別の実施例である。表現型判定されたRBCは、クロスマッチングアッセイにおけるように、事前に処理された表面上にプローブによって載せられる。洗浄が適用され、次いで、抗体を含有する血漿が載せられ同定される。

[実施例]

[実施例1]

【0119】

抗原型判定

この分析の目的は、特異的モノクローナルまたはポリクローナル抗体によって、ドナーまたは患者の赤血球の表面に存在する血液型抗原（血液型ABO、RH、Kell、Duffy、Kidd、Lewisなど）を同定することである。

【0120】

本発明の技術を使用する、赤血球の血液グループ判定/表現型判定の可能性を実証するために、基板102の表面を、抗赤血球抗体を固定するために用い、マイクロ流体プローブ200を、患者の赤血球または全血試料を分配し、未結合の赤血球を除去するために用いる。抗赤血球抗体に結合したRBCの赤色を次いで、視覚的に検出する。

【0121】

1.1 - 材料

この実施例において、結合剤110は抗赤血球抗体である。基板102の表面は、ポリスチレン96ウェル平底プレートである。抗体を、インクジェットプリンターまたはコンタクトプリンターを用いて、ウェルの底上のスポットとして載せる。各ウェルは、各抗体特異性の少なくとも1つのスポットを含有する。この実施例において、抗体を、PBS緩衝液（pH7.4）内に10から500μg/mLの範囲の濃度で希釈し、受動吸収によって基板102の表面に結合させる。抗体を表面上に載せた後、基板を、試料成分の非特異的な結合を防ぐために、1%BSAを補ったPBSと接触させることによって飽和させ、その後、空気乾燥する。

【0122】

この実施例において、以下の抗体を用いる。

- 抗A IgMクローン15750F7 (Bio-Rad)
- 抗D IgGクローンBRAD3 (IBGRL)
- 抗K1 IgGクローンMID11G4 (Bio-Rad)

【0123】

1.2 - 試験の説明

本技術に従ったグループ判定の実現可能性を実証し、特異性を検証するために、各スポットを個別に試験する。適切な緩衝液（処理液）を、ウェル表面全体を覆うようにウェル内に分配する。マイクロ流体プローブを次いで抗体スポットの上に位置させる。第1のステップにおいて、RBCまたは全血の懸濁液をスポットの上に流して、RBCおよび抗体を接触させる。第2のステップにおいて、流れを洗浄緩衝液に切り替えて、未結合のRBCを除去する。最後に、スポットした抗体に付着した赤血球の有無を視覚的にまたは分光光度的に検出する。

[実施例2]

10

20

30

40

50

【0124】

抗体のスクリーニング/同定

本発明の技術を使用する抗体のスクリーニングおよび同定の可能性を実証するために、基板102の表面を、ポリ-L-リジン(PLL)を介して非変性または溶血表現型の赤血球を固定するために用いる。この適用では、マイクロ流体プローブ200は、加熱および連続的化学を行うように設計されている。プローブを、患者の血漿、血清、または全血試料を載せるため、非特異的抗体を除去するため、および標識された抗Fc抗体コンジュゲートを分配して結合抗体を検出するために使用する。

【0125】

2.1 - 材料および試薬

2.1.1. PLLでの基板102の表面の感作

この実施例において、基板102の表面は、ポリスチレン96ウェル平底プレートである。PBS(pH7.4)内の25μg/mlの分子量7万~13万のPLLを各ウェルに分配し、18時間、周囲温度でインキュベートする。このステップの最後に、ウェルを、0.05%Tween-20を補ったPBS(pH7.4)内で洗浄し、次いで、細胞を固定するために使用する。

【0126】

2.1.2. 表面上への細胞の固定

この実施例において、結合剤110は、非変性または溶血表現型の赤血球である。細胞を、インクジェットプリンターまたはコンタクトプリンターを用いて、PLLで被覆したウェル底上のスポットとして載せる。各ウェルは、各表現型の少なくとも1つのスポットを含有する。この実施例において、防腐成分を補った、緩衝液内で20から50%の細胞懸濁液。載せた後、基板を洗浄して未結合の細胞を除去し、次いで、試料成分および細胞防腐剤の非特異的な結合を防ぐために、1%BSAおよび1Mデキストロースを補ったPBSと接触させることによって飽和させる。一晚インキュベーションした後、飽和緩衝液を除去し、表面を空気乾燥する。

【0127】

この実施例において、使用した結合剤は、抗体のスクリーニングに典型的に使用される、3つの非変性または溶血表現型の赤血球である。

【0128】

2.2. 試験の説明

各細胞スポットを個別に試験する。適切な緩衝液(処理液)を、ウェル表面全体を覆うようにウェル内に分配する。マイクロ流体プローブを次いでスポットの上に位置させる。第1のステップにおいて、患者の血漿、血清、または全血をスポットの上に流して、試料およびRBCを接触させる。プローブは、反応区域を37に加熱するようにセットアップする。第2のステップにおいて、連続的なプロセスを適用する:非特異的抗体を除去するための洗浄、標識された抗Fc抗体コンジュゲートの分配、および未結合の標識された抗グロブリン抗体を除去するための最終洗浄。最後に、非変性または溶血表現型の赤血球に付着した抗体の有無を、発色、蛍光、または発光によって検出する。

[実施例3]

【0129】

クロスマッチング

本発明の技術を使用するクロスマッチングを行う可能性を実証するために、マイクロ流体プローブ200を、ポリ-L-リジン(PLL)を介するドナー赤血球の固定から最終的な反応検出までの全てのステップを行うために用いる。このマイクロ流体プローブ200は、加熱および連続的化学を行うように設計されている。プローブはまた、患者の血漿、血清、または全血試料を載せるため、および非特異的抗体を除去するために使用する。標識された抗Fc抗体コンジュゲートを用いて、結合した抗体を検出する。

【0130】

3.1 - 材料および試薬

10

20

30

40

50

3.1.1. PLLでの基板102の表面の感作

この実施例において、基板102の表面は、ポリスチレン96ウェル平底プレートである。PBS (pH7.4)内の25 μ g/mlの分子量7万~13万のPLLを各ウェルに分配し、18時間、周囲温度でインキュベートする。このステップの最後に、ウェルを、0.05% Tween-20を補ったPBS (pH7.4)内で洗浄し、次いで、細胞を固定するために使用する。

【0131】

3.1.2. 試験の説明

適切な緩衝液(処理液)を、ウェル表面全体を覆うように、PLLで被覆したウェル内に分配する。マイクロ流体プローブ200を次いで表面の上に位置させ、以下の連続的なプロセスを適用する：事前に洗浄したドナー赤血球を載せること、未結合の細胞を除去するための洗浄ステップ、患者の血漿、血清、または全血を37で流すこと、非特異的抗体を除去するための洗浄、標識された抗Fc抗体コンジュゲートの分配、および未結合の標識された抗グロブリン抗体を除去するための最終的な洗浄。最後に、ドナー赤血球に付着した抗体の有無を、発色、蛍光、または発光によって検出する。

10

[実施例4]

【0132】

直接抗グロブリン試験

この分析の目的は、特異的モノクローナルまたはポリクローナル抗体によって、インビボで感作されたRBCに被覆されたIgGおよび/またはC3d補体画分を同定すること

20

【0133】

本発明の技術を使用する、感作されたRBCを検出する可能性を実証するために、基板102の表面を、抗IgGおよび抗C3d抗体を固定するために用いる。マイクロ流体プローブ200を、事前に洗浄した患者の赤血球を分配し、未結合の赤血球を除去するために用いる。特異的抗体に結合したRBCの赤色を次いで、視覚的に検出する。

【0134】

4.1 - 材料

この実施例において、結合剤110は、抗IgGおよび抗C3d抗体である。基板102の表面は、ポリスチレン96ウェル平底プレートである。抗体を、インクジェットプリンターまたはコンタクトプリンターを用いて、ウェル底上のスポットとして載せる。各ウェルは、各抗体特異性の少なくとも1つのスポットを含有する。この実施例において、抗体を、PBS緩衝液(pH7.4)内に10から500 μ g/mlの範囲の濃度で希釈し、受動吸収によって基板102の表面に結合させる。抗体を表面上に載せた後、基板を、試料成分の非特異的な結合を防ぐために、1%BSAを補ったPBSと接触させることによって飽和させて、その後、空気乾燥する。

30

【0135】

この実施例において、以下の抗体を用いる。

- ポリクローナルウサギ抗ヒトIgG (Bio-Rad)
- 抗C3d IgGクローン053A714 (Bio-Rad)

40

【0136】

4.2 - 試験の説明

試験の実現可能性を実証し、特異性を検証するために、反応を一体的な様式で行う。このケースにおいて、各スポットを個別に試験する。適切な緩衝液(処理液)を、ウェル表面全体を覆うようにウェル内に分配する。マイクロ流体プローブを次いで抗体スポットの上に位置させる。第1のステップにおいて、RBCの懸濁液をスポットの上に流して、RBCおよび抗体を接触させる。第2のステップにおいて、流れを洗浄緩衝液に切り替えて、未結合のRBCを除去する。最後に、スポットした抗体に付着した赤血球の有無を視覚的にまたは分光光度的に検出する。

[実施例5]

50

【0137】

抗原型判定 - シングルプレックスおよびマルチプレックスのグループ判定 / 表現型判定
この分析の目的は、特異的モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いることによって、ドナーまたは患者の赤血球の表面に存在する血液型抗原（血液型 A B O、R H、K e l l、D u f f y、K i d d、L e w i s など）を同定することである。

【0138】

本発明の技術を使用する、赤血球の表現型判定 / グループ判定の可能性を実証するために、抗赤血球抗体を基板表面上に固定し、マイクロ流体プローブを、未結合の赤血球を除去すると同時に患者の赤血球を分配するために用いた。抗赤血球抗体に結合した赤血球の赤色を次いで、視覚的に検出し、抗原特異性を判定するために使用した。

10

【0139】

A . A 陽性赤血球のシングルプレックスグループ判定

材料

この実施例において、結合剤は抗赤血球抗体であり、特に、マウス I g M 抗 A m A b (B i o - R a d クローン 1 5 7 5 0 F 7) であった。この実験および全てのその後の実験では、基板はポリスチレンスライド (T E D P E L L A , I N C . 、製品番号 2 6 0 2 2 5) であった。抗体を、インクジェットプリンターを用いて、スライド上のスポットの列として載せた。各スポットを、X、Y 座標によって明らかに同定した。スポットのサイズは約 2 5 0 μ m の直径であった。スポットを互いにアラインし、約 5 0 ~ 6 0 μ m 離れた。精製した抗 A I g M 抗体を P B S 緩衝液 (p H 7 . 4) 内に 1 0 から 5 0 0 μ g / m L の範囲の濃度で希釈し、受動吸収によって基板 1 0 2 の表面に結合させた。抗体を表面上に載せた後、基板を、試料成分の非特異的な結合を防ぐために、P B S 内の 1 % B S A で処理した。こうして調製されたスライドを空気乾燥し、使用するまで 4 で保存した。この実施例およびその後の実施例で使用したマイクロ流体プローブは、1 0 0 μ m \times 1 0 0 μ m の寸法をそれぞれ有する 4 つのチャンネルを有するプローブであった。適切な流体力学的流動閉じ込めを得るために、チャンネル 2 を用いて試料を分配し、チャンネル 1 および 3 を用いて試料を吸引した。異なる表現型 (A 陽性および O 陽性赤血球) を有する赤血球懸濁液を試料として用いた。

20

【0140】

方法

本技術に従ったグループ判定の実現可能性を実証し、特異性および再現性を検証するために、各スポットを同一の赤血球溶液（例えば、2 つの A 陽性赤血球および 2 つの A 陰性赤血球 (O 赤血球)) を用いて次々に試験した。この実施例において、赤血球を 0 . 9 % 等張生理食塩水で洗浄し、生理食塩水内に 5 0 % で懸濁した。マイクロ流体プローブのチャンネル 2 を用いて、2 μ l の希釈した赤血球懸濁液を 1 . 6 μ l / 分で吸引した。スライドを湿らせるために、十分な緩衝液 (処理液) を、表面全体を覆うようにスライド上に分配した。マイクロ流体プローブを次いでスライドの上に位置させ、流体力学的流動閉じ込めを次いでセットアップした。流体力学的流動閉じ込めが安定したら、マイクロ流体プローブの動きを、0 . 0 2 m m / 秒の速度で動くように、かつアラインされたスポットを通る直線をなぞるようにプログラムした。プローブが動く間、分配された赤血球は、飽和した基板 1 0 2 の表面と接触するか、またはスポットされた抗体と接触していた。正確な抗原特異性を有する赤血球は、固定された抗体にすぐに結合した。細胞および緩衝処理流体の連続的に載せ吸引したため、未結合の赤血球を赤血球の結合と同時に除去した。赤血球を載せ / 吸引した後、スポットした抗体に付着した赤血球の有無を、カメラ画像キャプチャによって検出した。基板上の各スポットの位置を知ること、抗原が試験対象の赤血球の表面に存在しているかを確認すること、ひいては、試験対象の赤血球の血液型特異性を同定することが可能となった。

30

40

【0141】

抗原が A 陽性および A 陰性の R B C の表面に存在しているかを判定するために、2 つの A 陽性赤血球および 2 つの A 陰性赤血球を、R B C を 2 0 のスポットに載せることによ

50

て試験した。A陽性赤血球が結合した20のスポットのうち4つの試験結果を図13Aに示す。4つ目のスポットの拡大図を図13Bに示す。A陽性赤血球はスポット表面全体に強力に結合し、一方、A陰性赤血球は全く結合しなかった(示していない)。これらの結果は、観察された結合が特異的であること、すなわち、赤血球の結合が、抗原-抗体対が関与する場合にのみ生じることを実証する。この結果はまた、A陽性赤血球がA陰性赤血球と明らかに区別され得、その結果、赤血球の表面にあるA抗原が同定され得ることを実証する。さらに、これらの結果は、未結合のRBCを除去すると同時に固体基板上の抗赤血球抗体にRBCを供するためにマイクロ流体プローブが使用される、シングルプレックス抗原型判定方法において、マイクロ流体プローブが使用され得ることを示す。

【0142】

本出願人はまた、評価される赤血球の抗原密度が低いほど、赤血球に覆われているスポット表面の密度が低いことを見出した。

【0143】

B. AおよびD陽性赤血球のマルチプレックスグループ判定

この実施例において、同一の赤血球アリコート(したがって試料が少ない)を用いて、固定されたマウスIgM抗Aモノクローナル抗体(mAb)および固定されたヒトIgG抗D mAbと別々に反応させた。

【0144】

材料

結合剤は、抗赤血球抗体:マウスIgM抗A(クローン157 50 F7)およびヒトIgG抗D mAb(クローンBrad3)であった。抗体を、ポリスチレンスライド上のスポットとして手動で載せた。各スポットを、X、Y座標によって明らかに同定した。このケースにおいて、スポットのサイズは約1.5mmの直径であった。同一の抗体特異性を有するスポットを互いにアラインし、互いに約200μm離れた。用いた抗体は精製されており、PBS緩衝液(pH7.4)内に10から500μg/mLの範囲の濃度で希釈されていた。希釈した抗体を受動吸収によって基板表面に結合させた。抗体を表面上に載せた後、基板を、試料成分の非特異的な結合を防ぐために、1%BSAを補ったPBSで飽和させた。スライドを空気乾燥し、使用するまで4で保存した。適切な閉じ込めを得るために用いた条件は、以下の通りである:チャンネル1:吸引、チャンネル2:分配、およびチャンネル3:吸引。異なるAおよびD表現型(A+、A-、O+、およびO-)を有する赤血球懸濁液を試料として用いた。

【0145】

方法

マイクロ流体プローブ技術を用いるグループ判定/表現型判定の実現可能性を実証し、特異性を検証するために、各スポットを同一の赤血球溶液を用いて次々に試験した。この実施例において、赤血球をまず0.9%等張生理食塩水で洗浄し、生理食塩水内に50%で懸濁した。1.5μlの赤血球懸濁液を1.5μl/分で吸引した。スライドを湿らせるために、十分なPBS緩衝液(処理液)を、表面全体を覆うようにスライド上に分配した。マイクロ流体プローブをスライドの上に位置させ、流体力学的流動閉じ込めを次いでセットアップした。流体力学的流動閉じ込めが安定したら、X軸またはY軸に従うマイクロ流体プローブの動きを、アラインされたスポットを通る直線を描くように、0.02mm/秒でプログラムした。プローブが動く間、分配された赤血球は、飽和した基板表面と接触するか、またはスポットされた抗体の1つと接触していた。正確な抗原特異性を有する赤血球は、固定された抗体にすぐに結合した。細胞および緩衝処理流体の連続的に載せ吸引したため、未結合の赤血球を赤血球の結合と同時に除去した。赤血球を載せ/吸引した後、スポットした抗体に付着した赤血球の有無を、カメラ画像キャプチャによって検出した。基板上的各特異的抗体の位置を知ること、抗原が試験対象の赤血球の表面に存在しているかを同定すること、ひいては、試験対象の赤血球の血液型特異性を同定することが可能となった。

【0146】

10

20

30

40

50

A陽性赤血球(A⁺、A⁻)およびD陽性赤血球(A⁺、O⁺)、ならびにA陰性(O⁻およびO⁺)およびD陰性赤血球(O⁻およびA⁻)を試料として用い、それぞれ2スポットに線状に載せた。A陽性赤血球は、抗A mAbが固定されたスポット表面のスキャン領域に強力に結合し(図14A)、一方、A陰性赤血球は全く結合しなかった(図14B)。D陽性赤血球も、抗D mAbが固定されたスポット表面のスキャン領域に強力に結合し(図14C)、一方、D陰性赤血球は全く結合しなかった(図14D)。これらの結果は、観察された結合が特異的であること、すなわち、スポット/赤血球の結合が、抗原-抗体対が関与する場合にのみ生じることを実証する。これらの結果はまた、本発明のマイクロ流体プローブ技術を用いる赤血球の2パラメータマルチプレックスグループ判定/表現型判定の実現可能性を実証する。さらに、これらの結果は、未結合のRBCを除去すると同時に固体基板上の抗赤血球抗体にRBCを供するためにマイクロ流体プローブが使用される、マルチプレックス抗原型判定方法において、マイクロ流体プローブが使用され得ることを示す。これらの結果はまた、同一の試料がマルチプレックス化反応の実行に使用され得ること、すなわち、同一の試料が全スポットに供され得ることを示す。

10

[実施例6]

【0147】

直接クームス陽性赤血球の表現型判定：直接抗グロブリン試験

この分析の目的は、特異的モノクローナルまたはポリクローナル抗体を用いることによって、インビボで感作された赤血球に吸着されたヒトIgGおよび/またはC3d補体画分を同定することであった。

20

【0148】

ここでは、本発明の技術を使用する、感作された赤血球の検出の可能性を実証するために、抗ヒトグロブリンmAb(マウスIgG mAb)を基板表面上に固定した。マイクロ流体プローブを、ヒトIgGで感作された赤血球を分配し、未結合の赤血球を除去するために用いた。特異的抗体に結合した赤血球の赤色を次いで、カメラ画像キャプチャによって視覚的に検出した。

【0149】

材料

この実施例において、結合剤は抗ヒトグロブリン抗体(マウスIgG mAb)であった。ポリスチレンスライドの表面全体を、抗体を用いて手動で官能化した。精製した抗体をPBS緩衝液(pH7.4)内に10から500μg/mLの範囲の濃度で希釈し、受動吸収によってポリスチレンスライドの表面に結合させた。抗体をスライドの表面上に載せた後、スライドを、試料成分の非特異的な結合を防ぐために、1%BSAを補ったPBSと接触させることによって飽和させた。これらのスライドを乾燥させ、使用するまで4で保存した。適切な閉じ込めを得るために用いた条件は、以下の通りである：チャンネル1：吸引、チャンネル2：分配、およびチャンネル3：吸引。感作された赤血球懸濁液および非変性の赤血球懸濁液を試料として用いた。

30

【0150】

方法

インビボで感作された赤血球を模倣するために、ヒト抗D IgGを用いて赤血球を感作した。0.9%等張生理食塩水で洗浄したD陽性赤血球を、生理食塩水内に2%で懸濁した。並行して、20μg/mLのヒト抗D mAb溶液を調製した。洗浄したD陽性RBC溶液をヒト抗D mAb溶液と混合し、45分、37でインキュベートした。未結合の抗体を除去するために、抗D感作されたRBCを0.9%等張生理食塩水で洗浄し、10%で懸濁した。抗D感作されたRBCを直接クームスカード(IgG+C3d)で試験し、強力な陽性反応を得た。2μlの感作されたRBC懸濁液を次いで、マイクロ流体プローブのチャンネル2を用いて1.8μl/分で吸引した。スライドの表面全体をPBSで湿らせた。プローブを次いでスライドの上に位置させた。マイクロ流体プローブの流動閉じ込めが安定した後、マイクロ流体プローブを、X軸に沿った直線を速度0.02mm/秒でなぞるようにプログラムした。

40

50

【 0 1 5 1 】

抗 D 感作された赤血球およびいかなる感作もしていない同一の赤血球（すなわち非変性 R B C ）を、抗ヒトグロブリン抗体の結合剤を有するスライド上にマイクロ流体プローブを用いて載せた。結合剤へ試料を供するのと同時に、未結合材料をプローブによって除去した。抗体に付着した赤血球の有無を、カメラ画像キャプチャによって検出した。抗 D 感作された R B C は抗ヒトグロブリン抗体に結合し、一方、感作されなかった R B C は抗ヒトグロブリン抗体に結合しなかった。

【 0 1 5 2 】

この結果は、抗 D 感作された赤血球のみがスキャン領域全体にわたって抗ヒトグロブリン m A b に強力に結合し（図 1 5 ）、一方、非変性の赤血球は全く結合しなかった（示していない）ことを示す。これらの結果は、観察された結合が特異的であることを実証する。さらに、これらの結果は、未結合の R B C を同時に除去しながら固体基板上の抗ヒトグロブリンモノクローナル抗体にヒト I g G で感作された赤血球を供するためにマイクロ流体プローブが使用される、直接抗グロブリン試験において、マイクロ流体プローブが使用され得ることを示す。

10

[実施例 7 A]

【 0 1 5 3 】

抗体のスクリーニング / 同定

典型的ではない抗赤血球抗体のスクリーニングは、ドナーとレシピエントとの間の適合性の輸血を可能にするために必要である。目的は、レシピエントの血漿が、輸血されなくてはならないドナー赤血球に対する抗体を含有していないことを検証することである。スクリーニングは、表面上の血液型抗原の分布によって特徴付けされるいくつかの赤血球を用いる必要がある。このようなスクリーニングは以下の通りである：表現型が分かっている赤血球を試験対象の血清または血漿試料とインキュベートする。存在する場合、特異的抗体は赤血球の表面に結合し、抗ヒトグロブリン抗体を含有する試薬で検出される。様々な抗原を有するまたは有さない赤血球のパネルを用いることによって、試料内に存在する抗体の特異性を判定することが可能である。本発明の技術を使用する抗体のスクリーニングおよび同定の可能性を実証するために、基板表面を、ユニバーサル抗体を介して非変性または溶血表現型の赤血球を固定するために用いた。マイクロ流体プローブを次いで、抗 D モノクローナル抗体を分配するために用いて、患者の血漿を模倣した。抗 D モノクローナル抗体を分配している間、プローブは、非特異的に結合した材料を同時に除去した。プローブはまた、 $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ のフィコエリトリン標識された抗ヒトグロブリン抗体（二次抗体）を分配して、結合した抗 D モノクローナル抗体を検出するために用いた。

20

30

【 0 1 5 4 】

材料

この実施例において、ポリスチレンスライドの表面全体を、ユニバーサル抗赤血球抗体を用いて手動で官能化した。用いた抗赤血球抗体を精製し、P B S 緩衝液（p H 7 . 4 ）内に $100 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度で希釈し、受動吸収によってスライドの表面に結合させた。スライドを次いで、試料成分の非特異的な結合を防ぐために、1 % B S A を補った P B S と接触させることによって飽和させた。空気乾燥の後、スライドを使用するまで 4 で保存した。表現型判定された赤血球を 0 . 9 % 等張生理食塩水で洗浄し、次いで、0 . 5 % で懸濁した。この赤血球懸濁液を次いで、20 分間、37 で、湿潤室内で、スライドとインキュベートした。次いで、スライドを 0 . 9 % 等張生理食塩水で洗浄して、未結合の赤血球を除去した。マイクロ流体プローブを次いで、低イオン強度緩衝液内に希釈した $4 \mu\text{g} / \text{mL}$ のモノクローナル抗 D m A b （一次抗体）および $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ のフィコエリトリン標識された抗ヒトグロブリン m A b （二次抗体）の試料混合物を載せるために用いた。試料混合物は何らかの標識がないと検出不可能であったため、マイクロ流体プローブは二重の流動閉じ込めモードでランし、このことは、試料混合物が、それ自体が浸水液（P B S ）内に閉じ込められている別の形状の液体の内部に入れ子状になっていたことを意味する。このケースにおいて、第 2 の閉じ込めは可視的なフルオレセイン溶液で行い、

40

50

試料混合物の適切な閉じ込めを保証した。マイクロ流体プローブを用いて、試料混合物はチャンネル2で分配し、チャンネル3で吸引し、フルオレセイン溶液はチャンネル1で分配し、チャンネル4で吸引した。

【0155】

方法

モノクローナル抗D mAbと10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のフィコエリトリン標識された抗ヒトグロブリンmAbとの混合物(3 μl)を、マイクロ流体プローブのチャンネル2を用いて3.5 $\mu\text{l}/\text{分}$ で吸引した。適切な量のPBS緩衝液(処理液)を分配して、スライドの表面全体を湿らせた。マイクロ流体プローブを次いでスライドの上に位置させ、二重の流動閉じ込めモードをセットアップした。二重の流動閉じ込めが安定した後、プローブを、30秒から180秒の間、同一の位置に留まるようにセットアップした。試料の供給および未結合材料の除去は同時であった。抗ヒトグロブリンmAbによって標識され、非変性の赤血球に付着した抗体の有無を、蛍光マイクロアレイ分析器Sensospot(Sensovation AG、Radolfzell、GE)で蛍光を読み取ることによって検出した。

10

【0156】

図16で示すように、抗D mAbは、プローブがいかに長く同一の位置に留まっても、D陽性RBCに結合した。類似の結果が、モノクローナル抗D mAbおよび標識された抗ヒトグロブリンmAbが別々にD陽性RBCに供された場合にも得られた。この実験は、マイクロ流体プローブが、未結合材料の除去と同時に試料が供される抗体のスクリーニング/同定方法において使用され得ることを実証する。

20

[実施例7B]

【0157】

リバーサABOグループ判定試験

この分析の目的は、血液試料におけるAおよび/またはB血液型抗原に対する天然の抗体の有無を示すことであった。この分析の結果は、直接試験で得られた結果と組み合わせると、試料のABO血液型の確立を可能にする。リバーサABOグループ判定試験において用いられる試料は、血清、血漿、または全血試料であり得る。本発明の技術を使用するリバーサABOグループ判定の可能性を実証するために、基板表面を、ユニバーサル抗体を介して非変性表現型の赤血球を固定するために用いた。この適用では、マイクロ流体プローブを、患者の血漿血清を載せ、未結合材料を除去するために用いた。

30

【0158】

材料

先の実施例にあるように、ポリスチレンスライド全体の表面をユニバーサル抗赤血球抗体で完全に官能化した。ユニバーサル抗赤血球抗体をスライド表面上に載せた後、スライドを、試料の非特異的な結合を防ぐために、1%BSAを補ったPBSと接触させることによって飽和させた。これらのスライドを空気乾燥し、使用するまで4で保存した。表現型判定されたA陽性赤血球を0.9%等張生理食塩水で洗浄し、懸濁して最終濃度0.5%とした。この赤血球懸濁液を次いで、20分、37で、湿潤室内で、スライドとインキュベートした。次に、スライドを0.9%等張生理食塩水で洗浄して、未結合の赤血球を除去した。マイクロ流体プローブを次いで、B血液型の人の血漿を載せるために用いた。血漿は何らかの標識がないと検出不可能であったため、先の実施例におけるように、マイクロ流体プローブをここでも二重の流動閉じ込めモードで用いた。

40

【0159】

方法

血漿試料をマイクロ流体プローブのチャンネル2を用いて3.2 $\mu\text{l}/\text{分}$ で吸引した。適切な緩衝液(処理液)を、表面全体を湿潤させるためにスライド上に分配した。マイクロ流体プローブをスライドの上に位置させ、二重の流動閉じ込めモードを次いでセットアップした。二重の流動閉じ込めが安定したら、プローブを、30秒から180秒の間、同一の位置に留まるようにセットアップした。ここでも、試料の供給および未結合材料の除去

50

は同時に生じた。スライドを次いで、15分、37℃で、10 µg/mlのフィコエリトリン標識された抗ヒトH+L IgAと浴内でインキュベートした。抗ヒトH+L IgAによって標識され、非変性の赤血球に結合した血漿抗体の有無を、蛍光マイクロアレイ分析器Sensospot (Sensovation AG, Radolfzell, GE)で蛍光を読み取ることによって検出した。

【0160】

図17に示すように、抗D IgMはA陽性RBCに結合し、プローブが同一の位置に留まっていた時間に依りて結合の強度は増大する。この実験は、マイクロ流体プローブが、未結合の血漿材料の除去と同時に患者の血漿が表現型判定された赤血球に供されるリバーグループ判定方法において使用され得ることを実証した。

10

[実施例8]

【0161】

クロスマッチ

この分析の一目的は、ドナーからレシピエントへの1つまたは複数の血球濃縮物の輸血の背景において、完全なドナー-レシピエント適合性があることを確実にすることであった。別の目的は、ドナーの赤血球によって運ばれる血液型構造に対するレシピエント血漿内の抗体の存在に関連する不適合性を実証することであった。マイクロ流体プローブを、ユニバーサル抗体を介してドナー赤血球を固定し、患者の血漿を載せ、かつ非特異的に結合した患者の血漿材料を除去するために用いた。赤血球に結合した血漿抗体の有無の検出を、標識された抗ヒトグロブリンIgAで行った。

20

【0162】

材料

ポリスチレンスライド全体の表面を、実施例7Aにおけるように、ユニバーサル抗赤血球抗体で完全に官能化した。ユニバーサル抗赤血球抗体をスライド表面上に載せた後、スライドを、試料成分の非特異的な結合を防ぐために、1%BSAを補ったPBSと接触させることによって飽和させた。スライドを空気乾燥し、使用するまで4℃で保存した。A+ドナー赤血球を0.9%等張生理食塩水で洗浄し、50%の濃度で懸濁した。A+ドナーRBCを分配するために、マイクロ流体プローブを流体力学的流動閉じ込めモードで以下のように操作した：チャンネル1：吸引、チャンネル2：分配、およびチャンネル3：吸引。次いで、二重の閉じ込めモードを用いて、A+またはO+患者血漿を以下のように分配した：血漿はチャンネル2で分配し、チャンネル3で吸引し、フルオレセイン溶液はチャンネル1で分配し、チャンネル4で吸引した。

30

【0163】

方法

この実施例において、2.5 µlのA+ドナー赤血球懸濁液(50%の希釈懸濁液)を、マイクロ流体プローブを用いて1.5 µl/分で吸引した。PBS緩衝液(処理液)を、表面全体を湿潤させるためにスライド上に分配した。マイクロ流体プローブを次いでスライドの上に位置させ、流動閉じ込めを次いでセットアップした。流動閉じ込めが安定したら、マイクロ流体プローブの動きを、X軸に沿った直線を描くように0.03 mm/秒でプログラムした。線の長さは約12 mmであった。プローブが動く間、A+ドナーの赤血球は、スライド表面に結合したユニバーサル抗赤血球抗体にすぐに結合した。連続的な流れのため、赤血球が分配されると、未結合の赤血球は同時に除去された。マイクロ流体プローブを次いで、A+またはO+患者の血漿を先に記載したように二重の流動閉じ込めモードで載せるために用いた。マイクロ流体プローブを用いて、2 µlの血漿を3 µl/分で吸引した。マイクロ流体プローブを、A+血漿では60秒、O+血漿では30または60秒、同一の位置に留まるようにセットアップした。事前に供されたRBCへの血漿の供給と同時に、未結合材料をプローブで除去した。スライドを次いで、15分、37℃で、10 µg/mlのフィコエリトリン標識された抗ヒトグロブリンIgAと浴内でインキュベートした。最後に、フィコエリトリン標識された抗ヒトグロブリンIgAによって標識され、非変性の赤血球に結合した抗体の有無を、蛍光マイクロアレイ分析器Sensosp

40

50

ot (Sensovation AG、Radolfzell、GE) で蛍光を読み取る
ことによって検出した。

【 0 1 6 4 】

図 1 8 A および図 1 8 B に示すように、A + 血漿は A + 赤血球に結合しなかった（例えば、偽スポットのみが検出された）。しかし、結合は、30 秒のインキュベーション時間であっても、O + 血漿で観察された。この実験は、マイクロ流体プローブが、未結合の血漿材料の除去と同時にドナー血漿が固定された赤血球に供されるクロスマッチング方法において使用され得ることを実証した。

【 0 1 6 5 】

本明細書および本明細書に添付の特許請求の範囲（および本明細書における用語）において用いる場合、用語「含む（comprise）」およびそれらの変型、例えば「含む（comprises）」および「含む（comprising）」は、ステップまたはエレメントの列挙に先行する場合、さらなるステップまたはエレメントの追加が任意選択であり排除されないことを意味するものである。本明細書において引用される全ての特許、特許出願、および他の刊行された参考文献は、ここで、参照することによってその全体が本明細書に組み込まれる。本明細書において引用されるあらゆる参考文献またはあらゆる通常の先行技術と、本明細書の明確な教示との間のあらゆる不一致は、本明細書の教示が優先されることで解決されるものとする。これには、ある語または表現の本技術分野で理解されている定義と、同一の語または表現の本明細書において明確に提示されている定義との間のいかなる不一致も含まれる。

10

20

【 0 1 6 6 】

米国特許出願第 1 3 / 8 8 1 9 8 9 号明細書の本文は、以下に組み込まれる。

【 符号の説明 】

【 0 1 6 7 】

- 1 0 0 系
- 1 0 2 基板
- 1 0 4 ディスペンサー
- 1 0 6 光源
- 1 0 8 検出器
- 1 1 0 A D C、結合剤
- 1 1 2 マイクロプロセッサ
- 1 1 4 ディスプレイ
- 1 1 6 メモリ
- 2 0 0 マイクロ流体プローブ
- 2 1 0 被覆層
- 2 1 1 バイアス
- 2 1 2 バイアス
- 2 2 0 基底層
- 2 2 1 開口部
- 2 2 2 開口部
- 2 2 3 処理液マイクロチャネル
- 2 2 3 ' 溝
- 2 2 4 処理液マイクロチャネル
- 2 2 4 ' 溝
- 3 1 0 エッジ
- 3 1 1 通路
- 3 2 0 正面
- 3 2 1 開口部
- 3 2 2 開口部
- 3 2 3 浸水液マイクロチャネル

30

40

50

- 3 2 4 浸水液マイクロチャネル
- 6 0 0 マイクロ流体プローブ
- 6 0 2 マイクロチャネル
- 6 0 4 マイクロチャネル
- 7 0 0 マイクロ流体プローブ
- 7 0 2 マイクロチャネル
- 7 0 4 開口部
- 7 0 6 毛细管
- 7 0 8 開口部
- 8 0 0 方法
- 9 0 0 プローブアレイ
- 1 1 0 0 マイクロ流体プローブ
- 1 2 0 0 クロスマッチング方法

【 図 1 】

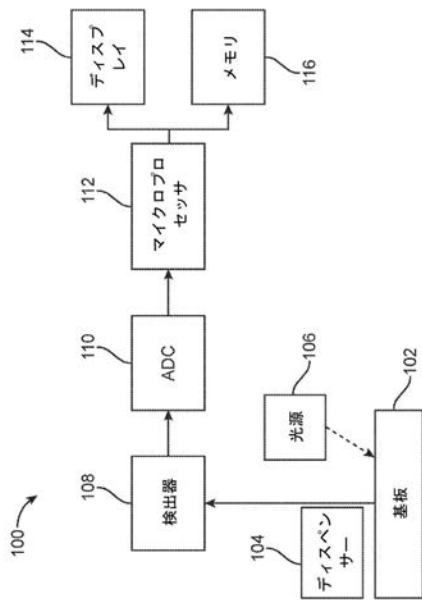


図 1

【 図 2 】

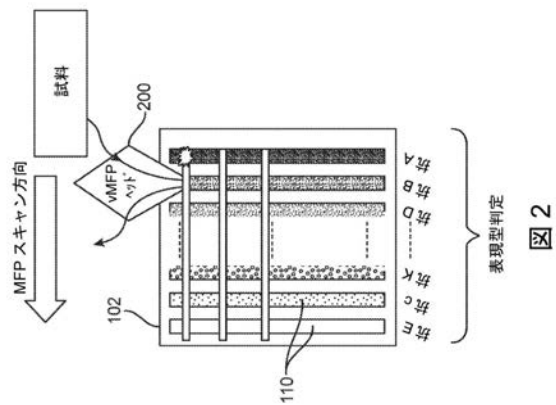


図 2

【 図 3 】

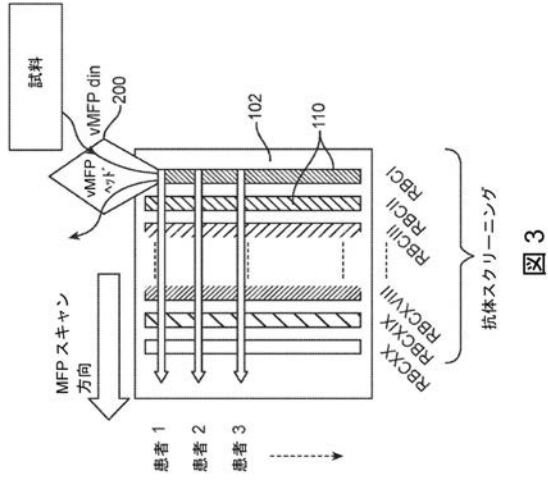


図 3

【 図 4 】

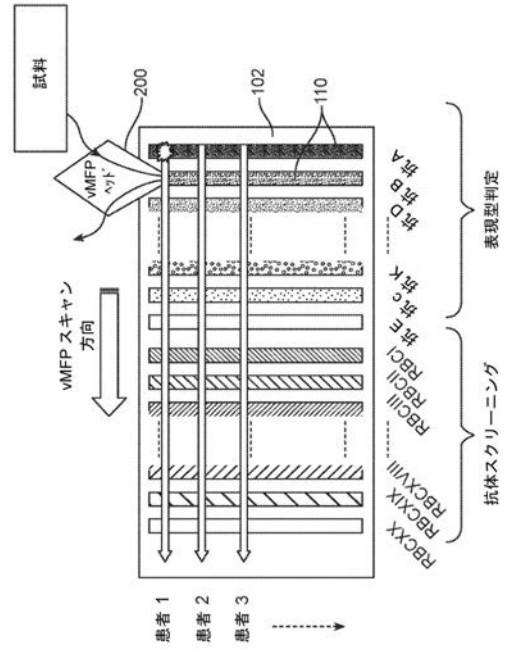


図 4

【 図 5 】

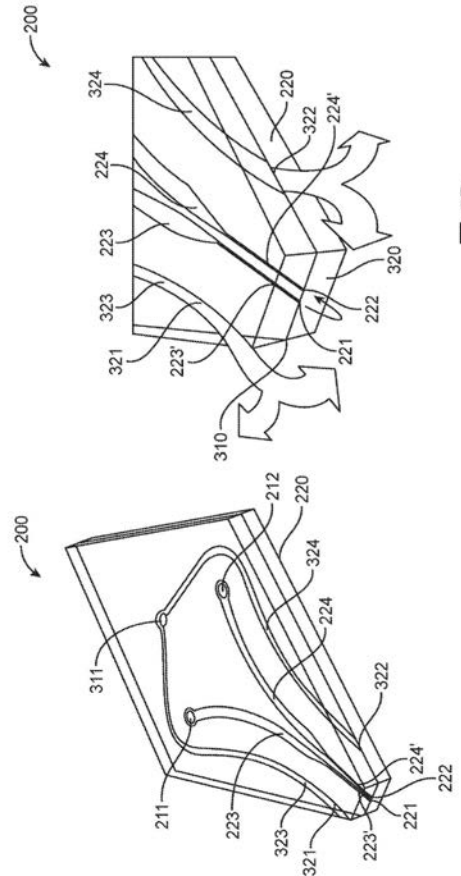


図 5A (先行技術)

図 5B (先行技術)

【 図 6 】

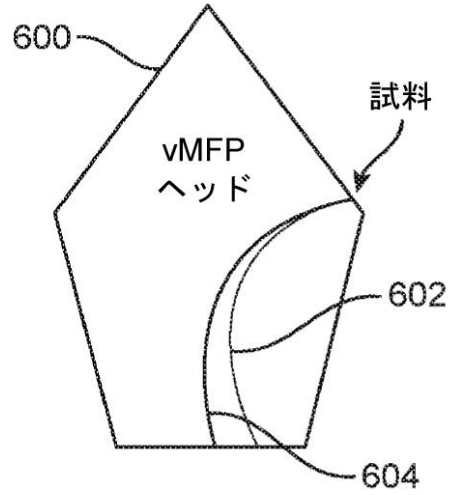


図 6

【 図 7 】

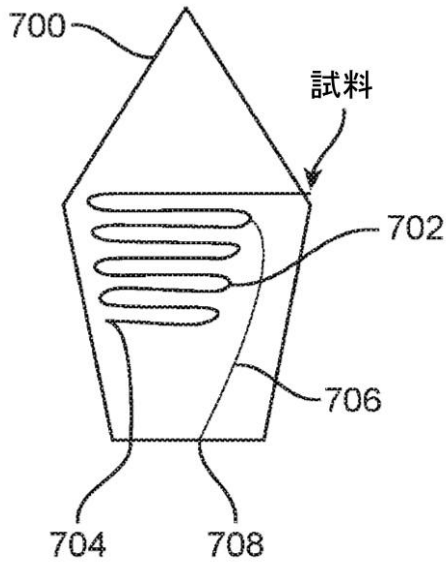


図 7

【 図 8 】

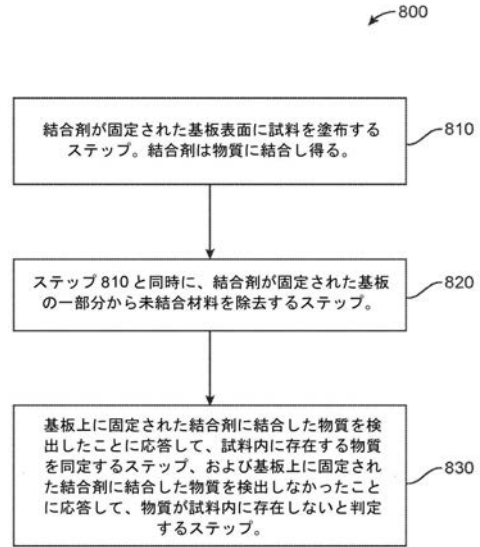


図 8

【 図 9 】

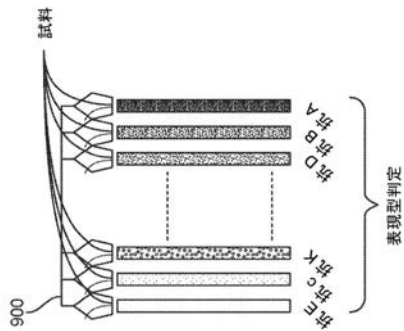


図 9

【 図 1 1 】

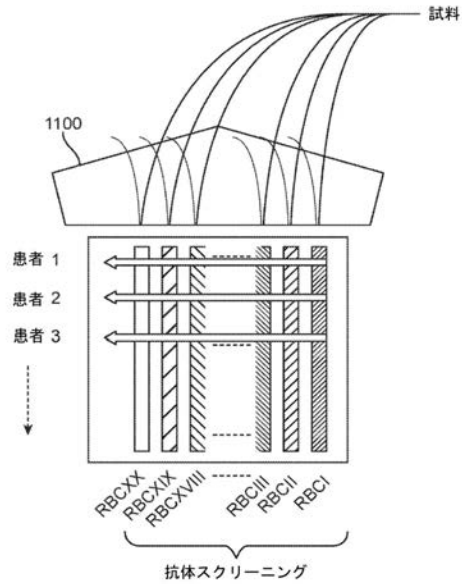


図 11

【 図 1 0 】

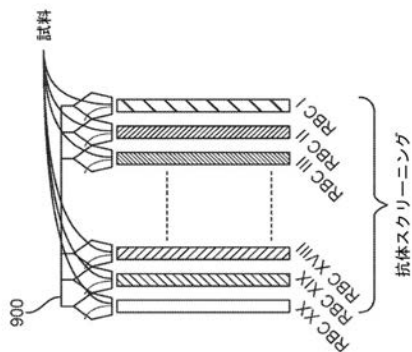


図 10

【 図 1 2 】

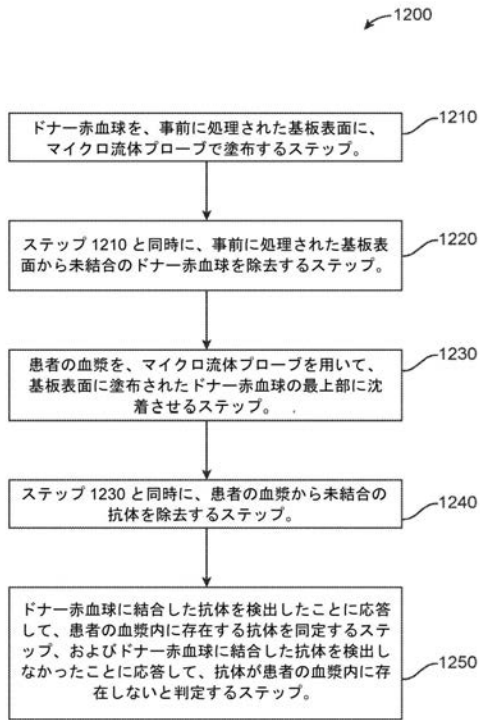
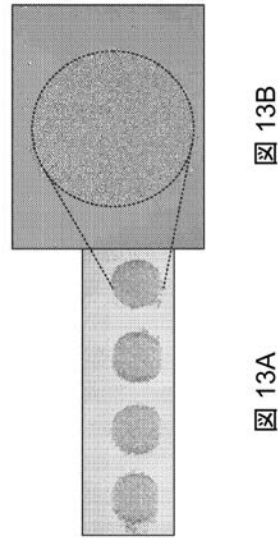
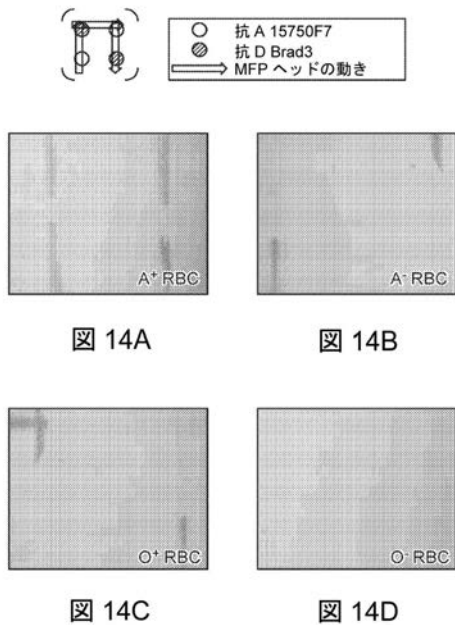


図 12

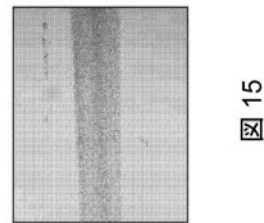
【 図 1 3 】



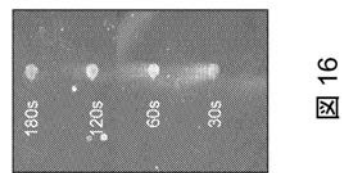
【 図 1 4 】



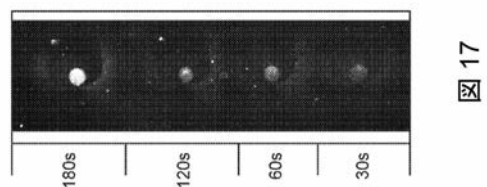
【 図 1 5 】



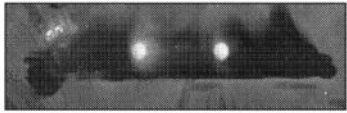
【 図 1 6 】



【 図 1 7 】



【 图 1 8 】



血浆 A+ 血浆 O+ 血浆 O+
60 秒 30 秒 60 秒

图 18A

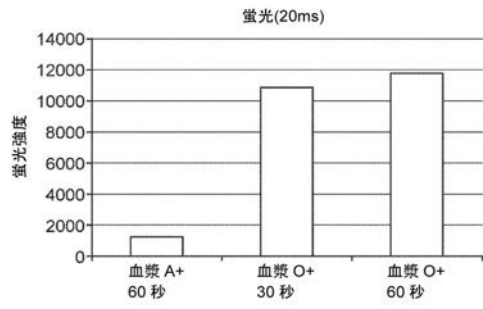


图 18B

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/IB2016/050157 |
|---|

| | | |
|--|--|---|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/543 G01N33/80 ADD. | | |
| 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) G01N | | |
| 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) EPO-Internal, BIOSIS, CHEM ABS Data, EMBASE, PAJ, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| A | US 8 546 084 B2 (ABO DIAG [FR]) 1 October 2013 (2013-10-01) Figures 1-3; claims 1 & 8 ----- | 1-42 |
| A | J. AUTEBERT ET AL: "Hierarchical Hydrodynamic Flow Confinement: Efficient Use and Retrieval of Chemicals for Microscale Chemistry on Surfaces", LANGMUIR (AMERICAN CHEMICAL SOCIETY ACS), vol. 30, no. 12, 1 April 2014 (2014-04-01) , pages 3640-3645, XP055253582, Washington DC USA ISSN: 0743-7463, DOI: 10.1021/la500875m Title; whole document ----- | 1-42 |
| <input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" 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 *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 | | ** 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 | Date of mailing of the international search report | |
| 26 February 2016 | 08/03/2016 | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Van Bohemen, Charles | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2016/050157

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| US 8546084 | B2 | 01-10-2013 | |
| | | EP 2167967 A2 | 31-03-2010 |
| | | EP 2942626 A1 | 11-11-2015 |
| | | ES 2545879 T3 | 16-09-2015 |
| | | FR 2918460 A1 | 09-01-2009 |
| | | JP 2010531989 A | 30-09-2010 |
| | | MA 31561 B1 | 02-08-2010 |
| | | TN 2009000527 A1 | 31-03-2011 |
| | | US 2010184102 A1 | 22-07-2010 |
| | | WO 2009007649 A2 | 15-01-2009 |
| ----- | | | |

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1 . T w e e n

(74)代理人 100120134

弁理士 大森 規雄

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ビュフィエール, フレデリック

フランス国 マーンズ ラ コケット 9 2 4 3 0 , ブールヴァール レイモン ポアンカレ , 3

(72)発明者 ヴィラード - ソシーネ, シルヴィエ

フランス国 マーンズ ラ コケット 9 2 4 3 0 , ブールヴァール レイモン ポアンカレ , 3

(72)発明者 リヴァリン, イリアーナ

フランス国 マーンズ ラ コケット 9 2 4 3 0 , ブールヴァール レイモン ポアンカレ , 3

(72)発明者 ギヨン, ローレント

フランス国 マーンズ ラ コケット 9 2 4 3 0 , ブールヴァール レイモン ポアンカレ , 3

(72)発明者 グエガン, ヨハン

フランス国 マーンズ ラ コケット 9 2 4 3 0 , ブールヴァール レイモン ポアンカレ , 3

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 用于血液分析的系统和方法 | | |
| 公开(公告)号 | JP2018508760A | 公开(公告)日 | 2018-03-29 |
| 申请号 | JP2017537313 | 申请日 | 2016-01-14 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 比奥-雷德实验室股份有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 生物 - Rad实验室, Incorporated的 雷开球德 生物-拉德-イノベーションズ | | |
| [标]发明人 | ビュフィエールフレデリック ヴィラードソシーネシルヴィエ リヴァリンイリアーナ ギヨンローレント グエガンヨハン | | |
| 发明人 | ビュフィエール,フレデリック ヴィラード-ソシーネ,シルヴィエ リヴァリン,イリアーナ ギヨン,ローレント グエガン,ヨハン | | |
| IPC分类号 | G01N33/543 G01N33/53 G01N37/00 | | |
| FI分类号 | G01N33/543.515.A G01N33/543.515.F G01N33/53.K G01N37/00.102 | | |
| 代理人(译) | 小林 浩 鈴木康仁 | | |
| 优先权 | 2015151176 2015-01-14 EP 62/107114 2015-01-23 US | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

提供了血液分型系统和方法。在一个实施方案中,该方法包括使样品经受具有固定的一种或多种能够与样品中的一种或多种物质结合的结合剂的基质表面,至少基质具有固定于其上的结合剂。可以通过从该部分中基本上除去未结合的材料并检测与固定在基质上的一种或多种结合剂结合的物质来进行,样品是在基质表面上提供的。这些步骤与从基板的至少一部分去除未结合的材料同时进行。还描述和解释了该系统和其他方法。

| | | |
|---------------------------------------|--|--|
| (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2018-508760A (P2018-508760A) |
| | | (43) 公表日 平成30年3月29日(2018.3.29) |
| (51) Int. Cl. | F I | テーマコード(参考) |
| GO1N 33/543 (2006.01) | GO1N 33/543 | 515A |
| GO1N 33/53 (2006.01) | GO1N 33/543 | 515F |
| GO1N 37/00 (2006.01) | GO1N 33/53 | K |
| | GO1N 37/00 | 102 |
| 審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 38 頁) | | |
| (21) 出願番号 特願2017-537313(P2017-537313) | (71) 出願人 591099809 | |
| (22) 出願日 平成28年1月14日(2016.1.14) | バイオラッド ラボラトリーズ, インコーポレイテッド | |
| (23) 優先権主張日 平成29年9月7日(2017.9.7) | アメリカ合衆国, カリフォルニア 94547, ハーキュルス, アルフレッド ノーベルドライブ 1000 | |
| (24) 国際出願番号 PCT/182016/050157 | (71) 出願人 506215582 | |
| (25) 国際公開番号 W02016/113691 | バイオラッド・イノベーションズ | |
| (26) 国際公開日 平成28年7月21日(2016.7.21) | BIO-RAD INNOVATIONS | |
| (27) 優先権主張番号 15151176.3 | フランス国, エフ-92430 マルヌーラコケット, ブールヴァール・レイモン・ボアンカレ 3 | |
| (28) 優先日 平成27年1月14日(2015.1.14) | (74) 代理人 100092783 | |
| (29) 優先権主張国 欧州特許庁(EP) | 弁理士 小林 浩 | |
| (30) 優先権主張番号 62/107,114 | | |
| (31) 優先日 平成27年1月23日(2015.1.23) | | |
| (32) 優先権主張国 米国(US) | | |
| (33) 優先権主張国 米国(US) | | |

(54) 【発明の名称】 血液分析の系および方法

最終頁に続く