(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号

特許第4768706号
(P4768706)

(45)発行日　平成23年9月7日(2011.9.7)　(24)登録日　平成23年6月24日(2011.6.24)

(51)Int.Cl.		F I		
G01N 33/574	***(2006.01)***	G01N	33/574	D
G01N 33/58	***(2006.01)***	G01N	33/58	Z
G01N 21/78	***(2006.01)***	G01N	21/78	C
C12Q 1/02	*(2006.01)*	C12Q	1/02	

請求項の数 35　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願2007-501297 (P2007-501297)
(86)(22)出願日　平成17年3月3日(2005.3.3)
(65)公表番号　特表2007-526469 (P2007-526469A)
(43)公表日　平成19年9月13日(2007.9.13)
(86)国際出願番号　PCT/ES2005/000108
(87)国際公開番号　WO2005/085845
(87)国際公開日　平成17年9月15日(2005.9.15)
審査請求日　平成19年11月21日(2007.11.21)
(31)優先権主張番号　10/791,994
(32)優先日　平成16年3月3日(2004.3.3)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　506299962
ユニバーシダド　デ　サラマンカ
スペイン国，イ－３７００８　サラマンカ，パチオ　デ　エスキューラス　１
(74)代理人　100074192
弁理士　江藤　剛
(72)発明者　オルファオ　デ　マトス　カーレイア　イー　バーレ　アルベルト
スペイン国，イ－３７００８　サラマンカ，パチオ　デ　エスキューラス　１，ユニバーシダド　デ　サラマンカ
(72)発明者　ペドレイラ　カルロス　エドアルド
スペイン国，イ－３７００８　サラマンカ，パチオ　デ　エスキューラス　１，ユニバーシダド　デ　サラマンカ

最終頁に続く

(54)【発明の名称】流体血球計算測定を使用する最小疾患レベルを監視するのに使用される腫瘍性細胞中の異常表現型の多次元検出方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

腫瘍性細胞によって表現される異常表現型の識別方法において、その方法が腫瘍性細胞を含む１つの試験サンプルと１つまたはそれ以上の正常／反応サンプルとの直接的比較を含み、

ａ）１つまたはそれ以上の正常／反応サンプルと１つの腫瘍性のサンプルとを、重複する多数の組み合わせで構成した複数の単クローン性の抗体で別々に染色し、各組み合わせ中の各単クローン性の抗体は異なる蛍光色素に接合され、かつ各組み合わせは該腫瘍性サンプルに含まれる目的の腫瘍性細胞に対して特異性を有する少なくとも３つの蛍光色素接合の抗体を共通に有し、

ｂ）流体血球計算測定を用いて、前記正常／反応サンプルおよび腫瘍性サンプルからの染色された各々の細胞の少なくとも２つの光散乱放射と少なくとも４つの蛍光放射を連続して測定し、

ｃ）一方が工程b)における前記正常／反応サンプルからの分析された各細胞の特別な光散乱および蛍光特性についての測定情報を含み、かつ他方が工程ｂ）における前記腫瘍性サンプルからの分析された各細胞の特別な光散乱および蛍光特性についての測定情報を含んでいる２つの独立したリストモードデータファイルを記憶装置に入力し、

ｄ）工程ｂ）からの前記腫瘍性サンプルに存在する細胞についての測定情報を含んでいる前記データファイルからの細胞事象を、工程ｂ）からの前記正常／反応サンプルに存在する細胞についての測定情報を含んでいる前記データファイルに、既知の比率で混ぜ合わ

せることによって工程ｃ）に基づく新たなデータファイルを作成し、
ｅ）予め設定した基準に基づく光散乱および蛍光放射の流体血球計算測定によってつくり出された多次元空間において、正常な細胞に対応する事象が占める区域と、正常／反応サンプルにおける空の空間に対応し且つ腫瘍性サンプルにおける腫瘍細胞が占めうる区域とを画定し、
ｆ）腫瘍性サンプルに存在し工程ｄ）に記載されたように混ぜ合わされた複数の細胞についての測定情報を含むデータファイルにおいて、腫瘍性細胞に対応する事象を、工程e)における予め設定した基準に基づく光散乱および蛍光放射の流体血球計算測定によってつくり出された多次元空間における腫瘍性サンプルに含まれる事象の集団であって且つ前記の空の空間に該当するものとして連続して識別し、
ｇ）正常な細胞と対照される腫瘍性細胞によって表示される表現型の異常を、工程ｄ）からの混ぜ合わされたデータファイルに含まれた腫瘍性細胞に対応する事象からの光散乱及び蛍光放射についての流体血球計算測定値の組み合わせとして突き止めて識別し、そのことによって工程ｄ）からの前記の混ぜ合わされた同じデータファイルに含まれる正常／反応サンプルからの細胞に対応する事象から腫瘍性細胞に対応する事象を識別し区別することを特徴とする異常表現型の識別方法。

【請求項２】
前記サンプルは末梢血からなることを特徴とする請求項１に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項３】
前記サンプルは骨髄からなることを特徴とする請求項１に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項４】
前記サンプルは脊髄からなることを特徴とする請求項１に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項５】
前記サンプルはリンパ節からなることを特徴とする請求項１に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項６】
１つ以上の任意に選択された正常なサンプルが染色されることを特徴とする、請求項１乃至5のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項７】
１つ以上の正常なサンプルが染色され、すべて正常なサンプルは人間の良好に定義されたグループからまたはそれらの性別に応じて定義されかつ非腫瘍性条件下にある人間のあらゆる他のグループから選択されることを特徴とする、請求項１乃至６のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項８】
前記腫瘍性サンプルは１つまたはそれ以上の種々の型の造血腫瘍細胞を含んでいることを特徴とする請求項１乃至５のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項９】
前記腫瘍性サンプルは１つまたはそれ以上の種々の型の非造血腫瘍細胞を含んでいることを特徴とする請求項１乃至５及び８のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１０】
前記腫瘍性サンプルは造血および非造血の両方の腫瘍細胞を含んでいることを特徴とする請求項１乃至５及び８乃至９のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１１】
前記腫瘍性サンプルは最初の診断、再発および診断後のあらゆる時間的周期で得られることを特徴とする請求項１乃至５及び８乃至１０のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１２】

前記腫瘍性サンプルは高いまたは最小数の腫瘍細胞を含むことができることを特徴とする請求項１乃至５及び８乃至１１のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１３】

前記サンプルは得られた後に直接染色されることを特徴とする、請求項１乃至１２のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１４】

前記サンプルは生体外で培養された後に染色されることを特徴とする請求項１乃至１２のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１５】

腫瘍性サンプルおよび正常／反応サンプルを染色するのに使用される多数の組み合わせの単クローン抗体のパネルは同一であることを特徴とする、請求項１乃至１４のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１６】

腫瘍性サンプルを染色するのに使用される多数の組み合わせの単クローン抗体のパネルは正常／反応サンプルを染色するのに使用される多数の組み合わせの単クローン抗体のパネルよりも小規模であって、前者のパネルは後者のパネルに完全に含まれることを特徴とする、請求項１乃至１５のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１７】

単クローン抗体の組み合わせのパネルの各対に関して、単クローン抗体の各個の組み合わせに使用される各単クローン抗体の正確なクローン、および接合される蛍光色素は単クローン抗体の組み合わせの２つのパネルにおいて同一であることを特徴とする、請求項１乃至１６のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１８】

各組み合わせに含まれる単クローン抗体の数は４つまたはそれ以上の異なる単クローン抗体試薬からなることを特徴とする、請求項１乃至１７のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項１９】

前記すべての組み合わせに共通で、単クローン抗体試薬の数は３つまたはそれ以上の異なる単クローン抗体からなることを特徴とする、請求項１乃至１７のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２０】

正常／反応サンプルおよび腫瘍性サンプルの対を染色するのに使用される正確な単クローン抗体は前記腫瘍性サンプルに含まれる腫瘍細胞の型、系および成熟段階に依存して変化できることを特徴とする、請求項１乃至１９のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２１】

少なくとも４つの異なる蛍光色素が使用され、各々異なる単クローン抗体に接合されており、各蛍光色素の蛍光放出は他の蛍光色素接合単クローン抗体の蛍光放出から区別されることを特徴とする、請求項１乃至２０のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２２】

互換性のある蛍光色素の組み合わせは、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、フィコエリトリン（ＰＥ）、ペリジンクロロフィルプロテイン（ＰｅｒＣＰ）、アロフィコシアニン、アレクサフルオール４８８、アレクサ６４７、パシフィクブルー、アレクサフルオール４０５、シアニン５（Ｃｙ５、シアニン５．５（ＣＹ５．５）およびＰＥに、ＡＰＣに、またはＰｅｒＰＣ（ＰＥ／Ｃｙ５，ＰＥ／Ｃｙ５．５，ＰＥ／Ｃｙ７，ＡＰＣ／Ｃｙ７およびＰｅｒＰＣ／Ｃｙ５．５）に結合されたその共役または追加の互換性のある蛍光色素または蛍光色素共役から選択されることを特徴とする、請求項１乃至２１のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２３】

同一サンプルの種々繰り返しアリコートを染色するのに使用されるパネル中に含まれる

蛍光色素に接合された単クローン抗体の各組み合わせにより染色されるそれらの事象の光散乱および蛍光測定についての情報は別個のデータファイルに最初に記憶されることを特徴とする、請求項１乃至２２のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２４】

同一サンプルの種々繰り返しアリコートを染色するのに使用されるパネル中に含まれる蛍光色素に接合された単クローン抗体のすべての異なる組み合わせにより染色されるそれらの事象の光散乱および蛍光測定についての情報は単一のデータファイルに記憶されることを特徴とする、請求項１乃至２３のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２５】

２つの異なるデータファイルからの情報はあらゆる補正なしに直接混ぜ合わされることを特徴とする請求項１乃至２３のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２６】

２つの異なるデータファイルからの情報は前記の予め設定した基準に従って測定された細胞事象の集団の相対的な位置を調整した後に混ぜ合わされることを特徴とする請求項１乃至２３及び２５のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２７】

前記の予め設定した基準を構成しているのは基準微小粒子であることを特徴とする請求項１乃至１９のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２８】

基準微小粒子の集団は均一であることを特徴とする請求項２７に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項２９】

基準微小粒子の集団は異なるサイズ、密度、容量、形状、蛍光量、付着特性または他の物理－化学特性の微小粒子の多数の集団からなることを特徴とする請求項２７に記載の異常表現型の識別方法。

【請求項３０】

微小粒子の集団は蛍光粒子からなることを特徴とする請求項２７乃至２９のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項３１】

微小粒子の集団はその表面が抗免疫グロブリン抗体で被覆される微小粒子からなることを特徴とする請求項２７乃至３０のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項３２】

微小粒子の集団はその表面が抗免疫グロブリン抗体で被覆される蛍光微小粒子の混合物からなることを特徴とする請求項２７乃至３１のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項３３】

前記微小粒子は既知の数において追加されることを特徴とする請求項２７乃至３２のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項３４】

単クローン抗体の同一のパネルで染色された１つまたはそれ以上の正常／反応サンプルに含まれる細胞の光散乱および蛍光測定についての情報を含んでいるデータファイルへの多数の単クローン抗体のパネルで染色された腫瘍性のサンプルに対応するデータファイルからの事象の系列希釈は少量の腫瘍細胞が予め定義された既知の比率で正常／反応細胞に希釈されると検出することができる感度を評価するようにしたことを特徴とする請求項１乃至３３のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【請求項３５】

細胞活性および細胞機能に関連付けられる抗原の異常パターンが検出されることを特徴とする請求項１及び８乃至３４のいずれかに記載の異常表現型の識別方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】
本発明は、骨髄、末梢血、脊髄およびリンパ節中に存在する腫瘍性細胞によって表現される異常な表現型の検出の感度、特異性および再現可能性を改善するための新規な方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
本発明は、流体血球計算の分野に関するものであり、特に腫瘍性細胞のプロテイン表現の異常なパターンの連続的検出、及び血液、骨髄、脊髄およびリンパ節サンプルの主要集団中に存在する最小限の数の腫瘍性細胞の識別を行なうことに関する。この発明は、１）腫瘍性細胞が有する異常な表現型を明確に識別すること、すなわち高感度に特異性についての識別を行うこと、２）同時に若しくはその次に得られる同一の人間からの他のサンプル中に異常な表現型を全く同じに表示している最小限の数の腫瘍性細胞を識別する場合におけるそれらの有用性についての評価、及び３）定量化された微小ビーズ（微小粒子）懸濁液に混合された多数の組み合わせで構成された複数の単クローン抗体を用いて染色されたサンプル中に存在する細胞の多重パラメータ流体血球計算分析によって、サンプルのマイクロリッターあたりの細胞のパーセンテージおよび細胞の数の両方に関して血液、骨髄、脊髄およびリンパ節サンプル中の腫瘍性細胞の分布の計算を可能にする。
【０００３】
米国特許第５，０４７，３２１号明細書において、ロッケンおよびタースタッパンは体液中の細胞成分の多重パラメータ分析を記載した。記載された体液は血液および骨髄を包含していた。２つの核酸色素、蛍光的に分類された単クローン抗体および２つの光散乱パラメータの組み合わせを使用して、ロッケンおよびタースタッパンは血液および骨髄の種々の細胞成分を識別し、各成分中の細胞の数をカウントしかつそれらの各々の微分解析を提供することを可能にした。全体の血液および骨髄吸引物についての前方および側方光散乱の測定とともに、ＬＤＳ－７５１（エクスシトン）ＤＮＡ－色素、チアゾルオレンジ（ＴＯ、モレキュラー・プローブズ社）および蛍光的に分類されたアンチ－ＣＤ４５単クローン抗体による組み合わされた染色により、これらの著者は、核にされた赤血球、エリトロサイト（赤血球）、網状赤血球、血小板、リンパ細胞、単核細胞、好中性の顆粒球、好塩基性の顆粒球、好酸性の顆粒球および核にされたすべての細胞の前駆体間の識別および区別を可能にした。しかしながら、彼らは、同一サンプル内に同時に存在する正常細胞と腫瘍性の細胞を特に区別するようなアプローチの可能性を示すことができなかった。
【０００４】
米国特許第６，２８７，７９１号明細書において、タースタッパンおよびチェンは、米国特許第５，０４７，３２１号のさらに他の改善を記載しているが、彼らは種々の白血球集団をより良く特色付けて示すようなことは何もしていない。
【０００５】
米国特許第５，１３７，８０９号明細書において、ロッケンおよびシャは骨髄中の細胞成分の多重パラメータ分析を記載している。著者等は、第１段階で、すべての白血球を染色するために、異なる蛍光色素により各々分類された単クローン抗体の組み合わせをし、第２段階で、白血球の選択された集団を染色するためにさらに他の組み合わせの使用を記載している。
【０００６】
上述したすべての方法は血液および骨髄中に存在する正常な白血球の幾つかの集団を識別することができかつ使用される単クローン抗体および核酸色素の特別な組み合わせによって識別されるような選択された副次集団を単に識別しており；それにも拘らず、それらはサンプル中の正常な細胞と自然にまたは人工的に混合された腫瘍性細胞の特定のかつ再生可能な識別に関するアプローチを提供することができなかった。また、これらのアプローチは全体の白血球のパーセンテージに関して識別される正常な白血球の副次集団の計数を可能にする。そのうえ、これらの方法を使用することによっては、とくに、サンプルが同一の人間の異なる組織から得るか若しくは異なる人間から得るか又はそれらが異なる条

件下で測定される場合には、第１のサンプル中に含まれる細胞に関して測定された光散乱および蛍光の量についての情報を第２の異なるサンプルに含まれている細胞の情報に容易に関連付けることも出来ないし、直接比較することも出来ない。

【０００７】

米国特許第５，６２７，０３７号明細書において、ワード等は、付与された量の血液サンプルに含まれる１つまたはそれ以上の細胞集団の数の計算についての１段階技術を提案している。このアプローチは１つまたはそれ以上の細胞マーカー、蛍光の定量化された微小粒子および定着剤からなる混合物を含んでいる試薬の混合物を使用している。ワード等によって記載された技術はＣＤ４＋Ｔ－細胞のような、白血球の絶対カウントの計算を許容するが、血液白血球の個々の副次集団の計数に応用されるような正確な手順のあらゆる特別な指示を提供していない。

【０００８】

この１０年の間に、血液学的悪性を患っている大多数の患者からの腫瘍性細胞が流動血球計算により分析される単クローン抗体の幾つかの三重または四重の組み合わせによって検出されるような抗原発現の異常なパターンを表示することを示す多くの種々の報告が公開されている（ビドリアルズ等によって概説された、Ｂｅｓｔ　Ｃｌｉｎ　Ｒｅｓ　Ｐｒａｃｔ，２００３；１６：５９９－６１２）。これらの抗原発現の異常なパターンは正常な細胞には決して検出されずそしてそれらは、以下の副次型、すなわち、１）クロス－リネアージ（交差血統）抗原発現、２）非同期抗原発現、３）抗原過剰および過小発現、４）異常に高いまたは低い光散乱特性、および５）転移表現型の１つまたはそれ以上を含んでいる。これらの異常性に基づいて、単クローン抗体試薬の３および４色の組み合わせの幾つかの疾病型の特別なパネルが、他の疾病中で、実際に、前駆体Ｂ－急性リンパ性白血病（ＢＣＰ－ＡＬＬ；ルシコ等、白血病、２００１年、第１５巻、第１１８５頁乃至第１１９２頁），Ｔ－ＡＬＬ（ポーウィット－マクドナルド、白血病、２０００年、第１４巻、第８１６頁乃至第８２５頁）、急性骨髄芽球性白血病（ＡＭＬ；サン・ミゲル等、血液、２００１年、第９８巻、第１７４６頁乃至第１７５１頁），Ｂ－細胞慢性リンパ細胞白血病（ローストローム等、血液、２００１年、第９８巻、第２９頁乃至第３５頁）および他のＢ－細胞慢性リンパ増殖疾患（サンチェス等、白血病、２００２年、第１６巻、第１４６０頁乃至第１４６９頁）を有する患者ごとに、異常表現型を発現している白血病細胞の組織的識別に関して提案されている。

【０００９】

腫瘍性細胞によって発現される異常表現型の識別に関してこれまでされたすべてのアプローチにおいて、データ解釈は、正常な細胞についてのタンパク質（プロテイン）発現に関する広範囲な知識を有する経験を積んだ人間によって実施される。このアプローチによって、とくに３つまたは４つの単クローン抗体の組み合わせの比較的大きなパネルがそれらの識別に使用される場合に、最初の診断でかつ再発で研究された患者からの腫瘍性細胞が１つまたはそれ以上の異常な表現型を頻繁に示すことが明らかにされた。診断において検出されたすべての異常な表現型に基づいて、これらの腫瘍性細胞－特別な表現型の特別な検討のための単クローン抗体の新たな３または４色の組み合わせが同時に（例えば、段階付け目的のために）および引き続いて（例えば、疾病および療法を監視するために）得られた他のサンプル中の腫瘍性細胞による最小浸入の検討のためのそれらのさらに他の使用に設計されかつ試験される。しかしながら、正常細胞と腫瘍性細胞との間で異なって観察されるタンパク質発現のパターンについての高度の知識および経験を有する専門家によるデータ解釈の要求は異常な表現型の識別を主観的にかつ再生を困難にする。そのうえ、多くの異常な表現型は付与された細胞中に存在するすべての白血球細胞の部分集合中にのみ存在しかつそれらは、時間の経過により、同一の患者において、かつ同一の組織からの他のサンプルにおいても同様に変化する。これは、さらに、異常表現型の識別を、潜在的に発生している擬似の負のかつ正の結果により、主観的とは別に、不確かにする。加えて、１０．ｓｕｐ．－４以下の周波数で発生している血液、骨髄、脊髄およびリンパ節からの正常な細胞の表現型についての現行の知識は非常に制限されており；これは、大多数の

正常な血液および骨髄細胞中の最小数の腫瘍性細胞を検出するためのこれらのアプローチの感度に負に影響を与え、それは、最良の技術および生物学的条件下で、腫瘍性細胞の正確な血統、型および成熟の段階、腫瘍性細胞の識別に使用される異常な表現型、および研究される試料の型に依存して、一般に、１０．ｓｕｐ．－３（１０００個の通常細胞中の１つの腫瘍性細胞の検出）および１０．ｓｕｐ．－６（１００万個の通常細胞中の１つの腫瘍性細胞）の間にある。

【発明の概要】

【００１０】

本発明は、以下の工程、すなわち、１）１つまたはそれ以上の正常／反応サンプルと１つの腫瘍性のサンプルとを、同一または部分的に重複する多数の組み合わせで構成した複数の単クローン性の抗体で別々に染色し、各組み合わせ中の各単クローン性の抗体は異なる蛍光色素に接合され、且つ各組み合わせは少なくとも３つの蛍光色素接合の単クローン性の抗体を共通に有しており、２）流体血球計算測定を用いて、正常／反応サンプルおよび腫瘍サンプルからの単クローン性の抗体の前記の各々の組み合わせで染色された多数の細胞に関係する蛍光放射を連続して測定し、３）一方が正常／反応サンプルからの分析された各個体の細胞に特有の光散乱及び蛍光特性についての情報を含み、他方が腫瘍サンプルからの分析された各個体の細胞に特有の光散乱及び蛍光特性についての情報を含んでいる２つの独立したリストモードデータファイルを記憶装置に入力し、４）腫瘍サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいる前記データファイルからの細胞事象（イベント）を、正常／反応サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいる前記データファイルに、既知の比率で混ぜ合わせることによって新たなデータファイルを作成し、５）光散乱および蛍光放射の流体血球計算測定によってつくり出された多次元空間に、正常な細胞に対応する事象によって占有される区域と、正常／反応サンプル中の空の空間に対応しかつ腫瘍性サンプル中の腫瘍細胞によって占有されうる区域を形成し、６）続いて、前記の新たに混ぜ合わされたデータファイルにおいて、光散乱および蛍光放射の流体血球計算測定によってつくり出された多次元空間における腫瘍性細胞に対応する事象および正常細胞に対応する事象を識別し、そして７）正常な細胞と比較されるような腫瘍性細胞によって表示される最も関連性のある表現型の異常を突き止め、そのことによって、混ぜ合わされたデータファイル中に含まれる腫瘍性細胞に対応する事象の明確且つ高感度の特異性についての識別を可能にする工程を含んでいる。この手順は計算手順の使用によって正常なサンプル中の腫瘍性細胞の希釈実験をシミュレートしかつ２つまたはそれ以上の異なるデータファイルから直接または予め確立された標準にしたがって測定された細胞の事象の集団の関連の位置を調整した後に情報を混合することによって使用することができる。

【００１１】

上記で簡略して述べたように、本発明の方法の第１の段階は、少なくとも４つの単クローン抗体の多数の組み合わせにより、１つまたはそれ以上の正常／反応なサンプルおよび１つの腫瘍性細胞の染色を含み、各組み合わせ中の各単クローン抗体は異なる蛍光色素に／接合されかつ一般に各組み合わせは少なくとも３つの蛍光色素接合の単クローン抗体の副次グループを有している。

【００１２】

正常および腫瘍性サンプルは、以下の型の１つ、すなわち、血液、骨髄、脊髄およびリンパ節からなる。

【００１３】

腫瘍性サンプルは、造血腫瘍細胞または乳ガン、直腸ガン、前立腺腫瘍、肺ガン、膀胱ガンおよび胃の腫瘍等のごときあらゆる非造血起源からの腫瘍性細胞を包含することができる。

【００１４】

腫瘍性サンプルは、最初の診断、再発および診断後のあらゆる時間周期で得られ、それらは高い数の腫瘍性細胞および最小の疾患を包含することができる。それらは得られた後に直接および生体外で培養後に染色される。

【００１５】
腫瘍性サンプルを染色するのに使用される単クローン抗体の組み合わせのパネルは、正常／反応サンプルの染色に使用される単クローン抗体の組み合わせのパネルと同一であり、変形例において前者のパネルは後者のパネルよりも小規模なものとすることができるが、前者のパネルの一部は単クローン抗体の組み合わせの後者のパネルに完全に含まれる。
【００１６】
正常／反応および腫瘍性サンプルを染色するのに使用される各対のパネルに関して、単クローン抗体の各個の組み合わせに使用される各単クローン抗体のクローン、およびそれが接合される蛍光色素は単クローン抗体の組み合わせの２つのパネルにおいて同一である。
【００１７】
単クローン抗体の多数の組み合わせの各々における蛍光成分の数は、少なくとも４つの異なる蛍光色素を含み、各々異なる単クローン抗体に接合されており、各蛍光色素の蛍光放出は他の蛍光色素接合単クローン抗体の蛍光放出から区別できる。本発明の実施に使用することができる蛍光分類（ラベル）は、フルオレセインイソチオシアネート（ＦＩＴＣ）、フィコエリトリン（ＰＥ）、ペリジンクロロフィルプロテイン（ＰｅｒＣＰ）、アロフィコシアニン、アレクサフルオール４８８、アレクサ６４７、パシフィックブルー、アレクサフルオール４０５、シアニン５（Ｃｙ５）、シアニン５．５（ＣＹ５．５）およびＰＥに、ＡＰＣに、またはＰｅｒＰＣ（例えば、ＰＥ／Ｃｙ５，ＰＥ／Ｃｙ５．５，ＰＥ／Ｃｙ７，ＡＰＣ／Ｃｙ７およびＰｅｒＰＣ／Ｃｙ５．５）に結合されたその共役を含んでいる。各単クローン抗体は白血球の種々の集団についてかつサンプル中の腫瘍性細胞の集団について異なる量で発現される異なる抗原を認めることができる。１対の正常／反応および腫瘍性サンプルを染色するのに使用される単クローン抗体のすべての組み合わせに共通である正確な単クローン抗体は腫瘍性サンプル中に含まれる問題の腫瘍細胞の型、血統および成熟段階に依存して変化され得る。
【００１８】
染色に使用される単クローン抗体の多色の組み合わせのパネルがいったん選択されると、既知の量のサンプル中の細胞は、溶解溶液、既知の量での蛍光微小粒子および単クローン抗体試薬の混合物とともに混合される。サンプルを染色するのに使用される単クローン抗体の多数の組み合わせの各々に関して、溶解溶液、蛍光微小粒子および単クローン抗体の特別な組み合わせと混合されるサンプルの繰り返しを含んでいる異なるアリコートが使用される。核にされた細胞が染色されかつ核にされない赤血球が溶解された後、サンプルは洗浄されかつ流体血球計算器において測定することができ、そのさい細胞は１つまたはそれ以上の感知領域を通って１つずつ通されるかまたはあらゆる洗浄過程を実現することなく流体血球計算器において直接分析させることができる。変形例において、サンプルは単クローン抗体および蛍光微小粒子の集団のみとともに混合されかついったん染色されると、流体血球計算器において直接測定される。
【００１９】
基準微小粒子の集団は均一にすることもでき、または異なるサイズ、密度、容量、形状、蛍光量、付着特性または他の物理－化学特性の微小ビーズの多数の集団からなることもできる。微小粒子の集団はその表面が抗免疫グロブリン抗体で被覆される微小粒子または両者の混合物の蛍光粒子からなることができる。サンプルのマイクロリッター中に存在する細胞の集団の絶対数を計算するためにおいて、既知の数／サンプルの量において微小粒子の量子化された集団が追加される。
【００２０】
流体血球計算器の感知領域の各々において、細胞および微小粒子は１つまたはそれ以上の波長で光源に個々に露光され、血液、骨髄、脊髄およびリンパ節から取られた細胞のサンプル中の各染色された細胞に関して、光散乱の少なくとも２つの測定が行なわれかつ蛍光の少なくとも４つの測定が行なわれる。分析された各個の細胞および各個の微小粒子の光散乱および蛍光測定に関して記録された情報はコンピュータのごとき、データ記憶およ

び分析装置に記憶される。単クローン抗体の組み合わせにより染色された微小ビーズおよび細胞を含んでいる分析された各サンプルアリコートに関する情報は別個のデータファイルに記憶することができるが、しかしながら、本発明の好適な実施形態において、サンプルを染色するのに使用される単クローン抗体のすべての組み合わせにより染色された微小ビーズおよび細胞についての情報は異なる組み合わせの単クローン抗体により染色されたサンプル／微小粒子混合物の各々別個のアリコートについての情報の連続獲得によって単一のファイルに記憶され、連続して測定された単クローン抗体の異なる組み合わせにより染色された各アリコートに対応するそれらの事象の特別な識別「獲得の時間」のごときパラメータの使用によって達成することができる。あらゆる場合において、正常／反応サンプルおよび腫瘍性サンプルについてのデータは種々のデータファイルに個別に記憶される。米国特許第４，２８４，４１２号明細書および同第４，７２７，０２０号明細書において、データ記憶コンピュータシステムおよび単一のおよび二重の光源を備えた代表的な流体血球計算機器の構成および使用がそれぞれ記載されている。これらのシステムにおいて、データはリストモードＦＣＳ（流体血球計算標準）フォーマットに通常記憶されている。このフォーマットにおいて、各個の事象に関する情報は、各細胞および微小粒子が流体血球計算機器において測定されたシーケンスにしたがって連続方法において測定されたすべてのパラメータに関して列挙される。

【００２１】

単一サンプルからの情報が独立のデータファイル――データファイルの各々が単クローン抗体の特別な組み合わせにより染色された微小粒子および細胞の混合物に対応するそれらの事象の光散乱および蛍光特性についての情報を含んでいる――に収容される場合に、サンプルが染色された単クローン抗体の多数の組み合わせに対応するすべてのデータファイルからの情報が単一のデータファイルに混ぜ合わされる。２つまたはそれ以上の異なるデータファイルに収容されたデータを混ぜ合わせる結果として生じる各データファイルにおいて、混ぜ合わされた各個のデータファイルに対応する情報は、リストモードデータが混ぜ合わされた他のデータファイルの事象についての情報を収容する前または後に別個のリストに順序付けられる。

【００２２】

流体血球計算器において測定された正常／反応サンプルからの細胞についての情報を含んでいるデータファイルはそのすべてが単一の正常／反応サンプルまたは多数の正常／反応サンプルに対応する単クローン抗体の異なる組み合わせにより各々染色された同一数のサンプルアリコートに対応する多重データファイルを混ぜ合わせた後に得られた情報からなっている。単クローン抗体の多数の組み合わせの同一パネルにより個々に各々染色された２つまたはそれ以上の正常／反応サンプに関して集められた情報を混ぜ合わすことから生じるデータファイルは任意に選択された個人からの良好に定義された年令間隔からの個人または、他の特性中、彼らの年令、性別に応じてかつおよび非腫瘍条件下にある個人の他のグループからの正常／反応サンプルから構成される。

【００２３】

単クローン抗体の多数の組み合わせの特別なパネルにより染色された腫瘍性細胞により発現された異常な表現型の識別に関して、新たなデータファイルは正常／反応サンプルに存在する細胞についての情報を含んでいるデータファイルに腫瘍性サンプル中に存在する細胞についての情報を含んでいるデータファイルから細胞事象に対応するデータを良好に知られた比率で混合することによって発生される。腫瘍性サンプルおよび正常／反応サンプルの両方からの細胞事象についての情報を含んでいる混ぜ合わされたデータファイルにおいて、２つのデータファイルの各々に対応する事象はリストモードデータフォーマットに相次いで順序付けされかつそれらは、ソフトウエアツール（例えば、種々の色でペイントされたドット）を使用して、光散乱および蛍光放出の流体血球計算測定によって発生されたあらゆる多次元空間に異なって分類することができる。

【００２４】

多数の異なるサンプルからの細胞の光散乱および蛍光特性についての情報を含んでいる

データファイルが混ぜ合わされ、そしてそれらが異なる条件（例えば、異なる機器設定）下で、異なる流体血球計算機器においてまたは異なる時間（異なる日、月または年において）で得られたならば、測定されたすべてのパラメータ（光散乱および蛍光放出）によって形成された多次元空間内の各細胞事象の相対的な位置が、サンプルの各々に関して、細胞と同時に測定された内部の基準微小粒子の集団の位置に観察される相対的な変化に基づいてソフトウエアオペレーションによって自動的に調整される。調整された後、基準化過程は混ぜ合わされた多数のサンプルに収容された正常／反応サンプルの微小粒子および同一の集団に対応するそれらの事象の補正された位置が重なり合うため制御される。

【００２５】

１つまたはそれ以上の正常サンプルおよび１つの腫瘍性サンプルにおいて測定された細胞事象についての情報を含んでいる種々のデータファイルが発生され得る。そのために、腫瘍性サンプルにおいて測定された全体の細胞性に対応するすべての情報またはこのファイルに存在する腫瘍性細胞を代表する任意に選択された事象の変数において測定された全体の情報に対応するその種々の部分が正常／反応サンプルを測定した後得られたデータファイルの情報に追加される。この手順は計算手順の使用によって正常なサンプル中の腫瘍性細胞の希釈実験をシミュレートする。したがって、例えば、１／１，１／１０，１／１００，１／１０００，１／１００００，１／１０００００，１／１０００００、および１／１０００００００（事象／事象）の個々の事象についてのデータの連続希釈が腫瘍性サンプルに対応するファイルからのデータと正常／反応サンプルに対応するファイルからのデータを混ぜ合わせることによって作ることができる。

【００２６】

正常／反応サンプルからのおよび腫瘍性サンプルからのデータファイルが単一のデータファイルにいったん混ぜ合わされると、この新たに混ぜ合わされたデータファイルに存在する腫瘍性細胞は正常／反応サンプルの細胞についてのみの情報を含んでいる最初のファイルにおいて依然として空のままである空間に区分けされた少なくとも１５個の事象のそれらの集団として、ソフトウエアツールを使用して識別される。同一のパネルで染色された正常細胞のそれらの集団に比較して腫瘍性細胞の各個の集団に関して測定された光散乱および蛍光の量を定量化することによって、腫瘍性細胞によって表示される最も分析的な異常表現型についての統計的な情報が引き出すことができる。異常表現型は２つまたはそれ以上の光散乱および蛍光測定の組み合わせから構成され、かつそれは同一の混ぜ合わされたデータファイル中に収容される正常／反応細胞に対応する事象のすべての集団から異なるように混ぜ合わされたデータファイル中に存在する腫瘍性細胞に対応するそれらの事象の明白で高感度な特異性についての識別を可能にする。

【００２７】

本発明の方法は、また、細胞活性化および細胞の機能を監視するための抗原発現の異常パターンを検出するのに使用することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【００２８】

本発明を以下のようにその適用区域を限定しない２つの実施例について説明する。

【００２９】

実施例１

１．サンプル

５ｍＬの抹消血（ＰＢ）が１０人の健康なボランティアから得られかつ抗凝固剤としてＥＤＴＡを含有しているバキュテナー（商標）（ベクトン・ディキンソン、ニュージャージー州ニュージャージー）管に置かれた。加えて、５時間、１０．ｓｕｐ．９／Ｌの絶対的リンパ球増加によりＢ細胞慢性リンパ球性の白血病（Ｂ－ＣＬＬ）と診断された患者からの５ｍＬのＰＢが同様に得られた。

【００３０】

２．サンプル調製

サンプルを軽く混合した後、１０．ｓｕｐ．６および２時間．１０．ｓｕｐ．６の間で核

にされた細胞を含んでいる各ＰＢサンプルの２００ｕＬが６本の異なる繰り返し管内に置かれそして２ｍＬ／管の燐酸緩衝された塩水により５４０ｇで５分間洗浄された。次いで、各ＰＢサンプルから各管に、単クローン抗体の以下の５色の組み合わせの１つが追加され、異なる蛍光色素（ＦＩＴＣ／ＰＥ／ＰＥ－テキサスレッド／ＰｅｒＣＰ－Ｃｙ５．５／ＡＰＣ）で接合された各単クローン抗体が５ｕＬの量、すなわち、１）ＣＤ２２／ＣＤ２３／ＣＤ１９／ＣＤ４５／ＣＤ５，２）ＣＤ４３／ＣＤ７９ｂ／ＣＤ１９／ＣＤ４５／ＣＤ５，３）アンチ－ラムダ／アンチ－カッパ／ＣＤ１９／ＣＤ４５／ＣＤ５，４）アンチ－ＩｇＭ／ＣＤ２７／ＣＤ１９／ＣＤ４５／ＣＤ５，５）ＣＤ１１ｃ／ＣＤ１０／ＣＤ１９／ＣＤ４５／ＣＤ５，６）ＣＤ１０３／ＣＤ２５／ＣＤ１９／ＣＤ４５／ＣＤ５および、７）ＣＤ２０／Ｚａｐ７０／ＣＤ１９／ＣＤ４５／ＣＤ５において追加されている。軽く混合した後、サンプルは暗闇において室温で１５分間培養された。この培養後、２時間．１０．ｓｕｐ．３微小ビーズを包含している２００ｕＬの微小ビーズ懸濁液（パーフェクトカウント、シトグノス、スペイン、サラマンカ）が各繰り返し管に追加された。

【００３１】

データ獲得

軽く混合した後、染色された細胞の光散乱および蛍光がファクスディバ（ＦＡＣＳＤＩＶＡ）（ＢＤＢ）ソフトウエアを使用して４８８および６３５ｎｍで同調された２つの放出レーザ光を備えたファクスアリア（ＦＡＣＳＡＲＩＡ）流体血球計算器（ベクトン／ディキンソン・バイオサイエンシズ　ＢＤＢ－、カリフォルニア州サンホス）において測定された。分析された各サンプルに関して、分析された各細胞および微小ビーズに関するＦＩＴＣ，ＰＥ，ＰＥ－テキサスレッド／ＰＥ－Ｃｙ５．５およびＡＰＣの前方（ＦＳＣ）および側方光散乱（ＳＳＣ）、および蛍光放出についての情報を包含した単一のデータファイルが集められた。加えて、時間（獲得パラメータの）に対応する情報が同様に記録された。各サンプルに関して、しきい値としてＣＤ４５－関連の赤蛍光を使用する「サンプル調製」についての上記部分で定義されたシーケンスにおいて種々の管に関して獲得が実施された。開口クリーニング組み合わせに関して、５００，０００ＣＤ４５＋細胞についての情報が獲得された。獲得は１０秒間２つの連続する管の間で停止された。

【００３２】

４．データ操作およびデータ分析

テータ分析の前に、１０個の正常なＰＢサンプルに対応する１０個のファイルすべてに包含されるリストモードデータが単一のデータファイルにサンプル１からサンプル１０へ順序付けされた方法において合体させられた。各微小ビーズおよび細胞事象に関するＦＳＣ，ＳＳＣ，ＦＩＴＣ，ＰＥ，ＰＥ－テキサスレッド／ＰＥ－Ｃｙ５．５およびＡＰＣ蛍光放出の測定に対応するデータがアルファＣＣＳアシスタント１．１ａソフトウエアを使用するチャンネル値（０ないし２０４８に目盛られる）に変換された後データベースに導入される。アルゴリズムは、その場合に、クラスタ分析によって、すべてのサンプルアリコート（ＦＳＣ，ＳＳＣ，ＣＤ１９，ＣＤ４５，ＣＤ５）に関して測定された共通のパラメータならびに各サンプルアリコートにおいて測定された微量粒子により識別された正常細胞のすべての異なる集団を識別するためにリンパ節造影写真Ｂソフトウエア（バージョン：ベーターテスト、サイトグノス、スペイン、サラマンカ）を使用する正常サンプルからのデータに基づいて作成された。各測定パラメータの各細胞集団の統計的データは、その場合に、例えば、パーゼン・ウインドーズ（デューダ・アール・オー等、パターン分類、ジョン・ワイリー・アンド・サン２００１）を使用することによって、多次元蓋然性分布機能を評価するのに使用された。１つまたはそれ以上のプロトタイプ（コードブック・ベクトルズ）が正常サンプルに関して集められたデータファイルに存在する細胞および微小ビーズの各集団の代表であるように設定される。

【００３３】

並行して、同様な分析がＢ－ＣＬＬデータファイルにより実施された。Ｂ－ＣＬＬデータファイルにおいて得られたパーフェクトカウント微小ビーズ粒子の評価された分布は、その場合に、ノーマルデータファイルにおいて得られた位置において比べられた。Ｂ－Ｃ

ＬＬにおいて、微小ビーズは同一の位置を付与したが、空間Ｒ．ｓｕｐ．７の別な空間において、異なる大きさの移動が各次元において観察されている。観察された移動に基づいて、補正機能が適用されかつＢ－ＣＬＬデータファイルにおけるすべての事象の位置はこの機能にしたがって調整された。調整された後、正常な残存のＣＤ５＋／ＣＤ４５＋＋／ＣＤ１９Ｔ－細胞のおよび腫瘍性細胞Ｂ－ＣＬＬと共存している正常な残存するＣＤ４５＋＋／ＳＳＣの高い中性好性白血球の分布に対応する事象に関する新たな値がＢ－ＣＬＬデータファイルにおいて計算されかつノーマル（正常な）データファイル中に存在する同一の正常な集団に関して得られた値と比較された。事象の両集団の分布は両方のデータファイルにおいて同一であった（ｐ＞０．０５）。次いで、腫瘍性Ｂ－細胞集団を含んでいるすべての細胞および微小ビーズ集団の多次元統計データが１つまたはそれ以上のプロ調整タイプを作成するのにかつ同一のデータファイル中に存在する細胞事象の正常な残存する集団に対応するそれらに加えて、腫瘍性Ｂ－ＣＬＬ細胞の集団の確立分布機能を評価するのに使用された。

【００３４】

この段階後、１０個の正常なＰＢサンプル（ノーマルデータファイル）についての情報を含んでいるデータファイルのコピーが上述したようなこのデータファイルからの各事象の位置に関する値を調整した後Ｂ－ＣＬＬデータファイルからの事象に対応するデータと異なる集団で合流させた。調整されたＢ－ＣＬＬデータファイルに対応するデータファイルからＮＯＲＭＡＬデータファイルへの事象の以下の希釈因子、すなわち、９９／１，１／１，１／１０．１／１００，１／１０００，１／１００００，１／１０００００，１／１０００００００．１００００００００（ＮＯＲＭＡＬ／Ｂ－ＣＬＬデータファイル）が用意された。次いで、クラスタ分析が上述されたような合流させられたＮＯＲＭＡＬ／Ｂ－ＣＬＬデータファイルに関して実施された。すべてのＮＯＲＭＡＬ／Ｂ－ＣＬＬデータファイルにおいて、ＮＯＲＭＡＬデータファイル中に存在しないＣＤ５＋／ＣＤ１９＋／ＣＤ４５高い／ＣＤ２０低い／ＣＤ１１ｃ－／ＣＤ２２－ＣＤ２３＋＋／ＣＤ７９ｂ低い／ＩｇＭ低い／ＣＤ２７＋／ＣＤ１０３－／ＣＤ２５低い／カッパ低い／ラムダ－／ＺＡＰ７０－／ＣＤ１０－腫瘍性Ｂ－細胞の集団が識別された。他の集団から、最も緊密に関連する集団がＣＤ５＋／ＣＤ１９＋／ＣＤ４５高いＢ－細胞によって代表された。この後者の集団はＣＤ２０，ＣＤ２２，ＣＤ７９ｂ，ＣＤ４３，ＣＤ５およびＣＤ２５（腫瘍性Ｂ－ＣＬＬ細胞の異常表現型を定義するマーカ）の組み合わせに基づいて前者から明瞭に識別することができた。

フロントページの続き

(72)発明者　ソブラル　ダ　カスタ　エライネ
スペイン国, イー３７００８　サラマンカ, パチオ　デ　エスキューラス　１, ユニバーシダド
デ　サラマンカ

審査官　山村　祥子

(56)参考文献　特表２００４－５０１３５８（ＪＰ, Ａ）
国際公開第０３／０６５０４２（WO, Ａ１）
特開平０４－２５２９５７（ＪＰ, Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl., ＤＢ名)
G01N 33/48-33/98
G01N 21/78
C12Q 1/02

专利名称(译)	用于使用流体细胞计量测量监测最小疾病水平的肿瘤细胞中异常表型的多维检测方法		
公开(公告)号	JP4768706B2	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	JP2007501297	申请日	2005-03-03
[标]申请(专利权)人(译)	普遍性蕨去萨拉曼卡		
申请(专利权)人(译)	Yunibashidado萨拉曼卡		
当前申请(专利权)人(译)	Yunibashidado萨拉曼卡		
[标]发明人	オルファオデマトスカーレイアイーバーレアルベルト ペドレイラカルロスエドアルド ソブラルダカスタエライネ		
发明人	オルファオ デ マトス カーレイア イー バーレ アルベルト ペドレイラ カルロス エドアルド ソブラル ダ カスタ エライネ		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/58 G01N21/78 C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/574.D G01N33/58.Z G01N21/78.C C12Q1/02		
代理人(译)	江藤刚		
优先权	10/791994 2004-03-03 US		
其他公开文献	JP2007526469A5 JP2007526469A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

检测存在于骨髓，外周血，脊髓和淋巴结中的肿瘤细胞表达的异常表型的方法包括以下步骤：1）一个或多个正常/反应样品和一个肿瘤样品用相同或部分重叠的单克隆抗体的多种组合单独染色，和2）使用流式细胞术从正常/反应和肿瘤样品中分离单个样品。与用克隆抗体组合染色的大量细胞相关的荧光发射被顺序测量，并且3）每个包含关于分析的每个单独细胞的特殊光散射和荧光特性的信息。肿瘤文件存储两个独立的列表模式数据文件，并且4）以已知比率包含关于正常/反应样品中存在的细胞的信息：通过混合来自数据文件的列表模式数据来创建新数据文件，该数据文件包含有关样本中存在的细胞的信息，以及5）与正常细胞和正常细胞相对应的事件所占据的区域/对应于反应样品中的空白空间并形成肿瘤样品中肿瘤细胞占据的那些区域，6）随后对应于在多维空间中共存的肿瘤细胞识别那些做的事件和那些与正常细胞相对应的事件，和7）确定肿瘤细胞显示的与其正常等同物相比最相关的表型异常。它包含。