

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5670423号
(P5670423)

(45) 発行日 平成27年2月18日 (2015. 2. 18)

(24) 登録日 平成26年12月26日 (2014. 12. 26)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006. 01)

GO 1 N 33/53 K

GO 1 N 33/543 (2006. 01)

GO 1 N 33/543 5 7 5

GO 1 N 33/543 5 4 1 Z

請求項の数 4 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2012-503710 (P2012-503710)
 (86) (22) 出願日 平成22年4月1日 (2010. 4. 1)
 (65) 公表番号 特表2012-522992 (P2012-522992A)
 (43) 公表日 平成24年9月27日 (2012. 9. 27)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2010/029662
 (87) 国際公開番号 W02010/115024
 (87) 国際公開日 平成22年10月7日 (2010. 10. 7)
 審査請求日 平成23年11月14日 (2011. 11. 14)
 (31) 優先権主張番号 12/417, 296
 (32) 優先日 平成21年4月2日 (2009. 4. 2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 501354521
 アボット ポイント オブ ケア インコ
 ーポレイテッド
 アメリカ合衆国 08540 ニュージャ
 ーシー州, プリンストン, カレッジ
 ロード イースト 400
 (74) 代理人 100068021
 弁理士 絹谷 信雄
 (72) 発明者 レヴァイン, ロバート・エー
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ギルフ
 オード ビルグリム・レーン 31
 (72) 発明者 ワードロー, スティーヴン・シー
 アメリカ合衆国 コネチカット州 ライム
 ハイロック 1

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗凝固処理血液薄膜試料における特定の貪食作用の測定によるヒト又は動物の感染症の検出

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

抗凝固処理全生血の単層薄膜試料を分析して、所定の病原体に由来する単数又は複数の抗原がコーティングされた粒子に対する、血液試料に含まれる白血球による特定の貪食作用及び／又は結合作用の有無を調べることにより、血液ドナーの前記病原体による最近の曝露又は現在の感染の有無を調べる方法において、

前記血液試料を、前記抗原がコーティングされた第1の検出可能粒子、及び前記抗原がコーティングされていない第2の検出可能粒子と混合し、培養して、前記血液試料と前記第1及び第2の検出可能粒子の培養された混合物を生成する工程と；

膜厚方向の厚さが3～25 μmであるサンプルチャンバを用意する工程と；

前記サンプルチャンバに前記混合物を充填する工程と；

前記サンプルチャンバを光学的にスキャン又は撮像して、個々の前記白血球により貪食された前記第1及び第2の検出可能粒子の量を検出し記録する工程と；

前記スキャン又は撮像工程が、個々の前記白血球により貪食された前記第1及び第2の検出可能粒子の量を比較することにより、前記血液試料のドナーが前記所定の病原体に感染しているとの兆候があることを示すか否かを決定する工程と；

を含む方法。

【請求項 2】

感染の有無を調べる分析による結果が有効であるか否かを決定する工程であって、前記第1の検出可能粒子及び前記第2の検出可能粒子の貪食が皆無であるか、又は予め定義さ

10

20

れた正常範囲より少ない場合には前記結果が無効であると判断する工程をさらに含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記所定の病原体が、ライム病の存在を示すボレリア (*B o r r e l i a*) 菌である請求項 1 又は 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記サンプルチャンバの膜厚方向の厚さが 4 ~ 6 μ m である請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0001】

本願は 2009 年 4 月 2 日に出願の米国特許出願第 12 / 417, 296 号明細書に開示された本質的主題の利益を受ける権利を有するものであり、参照によりそれを組み込むものとする。

【0002】

本発明は抗凝固処理血液薄膜試料の標的検体の分析方法であって、標的検体が、特定の単数又は複数の抗原がコーティングされた粒子に対する白血球の特定の貪食作用及び / 又は結合作用の有無であり、血液試料が、抗凝固処理血液試料中に存在する白血球と、表面に存在する特定の単数又は複数の抗原がコーティングされた第 1 のタイプの検出可能な粒子とを含有し、抗原が、所定の病原体により発現する抗原に類似しているか、又は同一のものである方法に関する。より詳しくは、本発明は、全血などのヒト及び動物の体液中、又は白血球を含む他の流体中に存在する検出可能物質に対する貪食及び / 又は結合作用の電子的検出、量子化及び特性評価に関する。この特性評価は、少なくとも 2 枚の平行な平面壁を有し、そのうちの少なくとも 1 枚は透明である薄いチャンバ内で、白血球を含有する静止状態の薄膜流体試料に対して行われる。ライム病が、この方法で検出できる 1 つの感染症の例としてのみ使用されている。本発明は、貪食という生物学的プロセスが有効である全ての感染因子に適用される。例としては、淋病又は肺炎球菌感染症、その他が挙げられる。

20

【背景技術】

【0003】

30

K r i d e r らの米国特許第 5, 985, 595 号明細書は、ヒト又は動物の血液中に存在する病原体を迅速に検出する診断試験に関するものである。検査される血液試料は、スライド上に展開され、空気乾燥され、固定され、染色された後、顕微鏡により調べられる。この特許は、参照によりその全体が本明細書中に組み込まれる。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

K r i d e r らの特許に記載されている病原体の存在を診断する試験を、技師による試料のスライド上への展開、空気乾燥、固定、染色、及び顕微鏡検査を必要とせず、治療の場で行い得る、より迅速かつ簡単な方法で実施できることが望ましい。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

本発明は、添加した検出可能な粒子に対する白血球の特定の貪食作用の有無を調べる、抗凝固処理全生血試料の分析方法であって、第 1 のタイプの粒子が、ボレリア・ブルグドルフェリ (*B o r r e l i a b u r g d o r f e r i*) 菌に見出されるような特定の抗原で覆われており、第 2 のタイプの粒子が、第 1 の粒子と組成及びサイズは類似しているが、特定の抗原は有しておらず、かつ色又は蛍光により第 1 の粒子と区別することができるものである方法に関する。一般的に、そのような分析には抗凝固剤としてクエン酸ナトリウム又はヘパリンが使用されるが、貪食作用を低下させないものであれば任意の抗凝固剤を使用し得る。ライム病検出用の抗原は、引用した K r i d e r らの特許第 5, 985

50

、595号に記載されている。これらの粒子に対する特定の貪食作用の有無によって、試料提供者の血液のライム病などへの最近又は現在の感染の有無が明らかになる。

【0006】

本発明の方法は、電子画像法や電子走査法など、血液試料の電子的光学的顕微鏡による分析法を利用する。この方法は、後述するように、培養した血液試料を予め決められた一定の厚さの試験チャンバに入れて、チャンバ内で薄膜血液試料を作成することを含む。チャンバ内の試料を観察できるように、チャンバの少なくとも1つの壁は透明である。場合によっては、チャンバの上下の壁が共に透明である。チャンバの厚さは $3\mu\text{m} \sim 25\mu\text{m}$ の範囲とすることができる。抗凝固処理全血を分析するときは、血液試料の単層薄膜を得るために、チャンバの厚さは $4\mu\text{m} \sim 6\mu\text{m}$ とすることが好ましい。この単層には白血球及び赤血球が共に含まれる。チャンバ内の単層血液試料は、標的であるライム病検体、即ちボレリア(Borrelia)菌に特異的な抗原がコーティングされた第1の検出可能粒子に結合するか、又はそれらを摂取した白血球が存在するか否かを調べるために、画像化される。血液試料には、また、類似した数の、識別可能な色又は蛍光を有する以外は第1の粒子とサイズ及び組成が同一で、ライム病検体に特異的な抗体がコーティングされていない第2の検出可能粒子が含まれる。ライム病はこの方法を使用して検出し得る病気の単に1例として使用されているに過ぎず、「ライム」という用語が使用されているとき、貪食作用の変化により特徴付けられる任意の感染症プロセスで置き換えることができる。第1及び第2の粒子は、色及び/又は蛍光などの検出可能な信号が異なるという特徴を有しており、これにより互いに識別することができる。それ以外の点では、サイズと組成は貪食作用に影響を及ぼすおそれがあることから、粒子は、サイズと組成は同一とし、標的の単数又は複数の抗原の有無のみ異ならせるべきである。タイプ1及びタイプ2の粒子として使用する粒子は共に、検出が容易で、かつ白血球の貪食作用に最適なサイズである、直径約1~3ミクロンの範囲で同一のサイズであることが理想的である。

【0007】

血液と粒子の混合物は、最適抗凝固剤としてヘパリン又はクエン酸ナトリウムを使用し、所定時間、即ち数分~1時間、最適には体温で培養され、その後、血液試料は、分析チャンバに入れられる。貪食作用は既に完了しているため、白血球を僅かに押圧するようなより薄いチャンバを使用すると、貪食された粒子をより明確に識別することができる。ヒトでは、4~6ミクロンの高さのチャンバが良好に機能する。あるいは、抗凝固剤及び粒子が既に入れられているチャンバに血液を直接加えてもよい。その場でインキュベーション工程が行われ、その後、試料が読み取られる。この場合、チャンバは、白血球が重大な機械的妨害を受けずに貪食を行うことができるように、十分なサイズのものにしなければならない。選択するチャンバの高さは、試験する種とそれらの活性な食細胞のサイズによって変わる。その後、チャンバが画像化され、試料中で第1の検出可能粒子が白血球に摂取されたか否か、あるいは白血球の表面に付着しているか否かが調べられる。画像化により、試料中で第2の検出可能粒子のいずれかが白血球に貪食、又は結合されたか否かもまた調べられるであろう。結合及び/又は摂取された各タイプの粒子の量を比較することにより、最近又は現在の標的病原体の感染の有無、あるいは標的病原体を有する血液源が示される。

【0008】

分析を確実に機能させるために、健康なライム病に罹患していない被験種集団における、白血球1個当たりの各タイプの粒子の摂取数の正常範囲を決める実験を行うことは必須である。貪食された粒子が、タイプ1粒子及びタイプ2粒子の両方で皆無であるか、又はあまりにも少ない(ユーザーが定義する正常範囲より少ない数と定義される)ならば、その試験は無効であり、そうした無効性は、白血球が死んでいるか機能不全にあるため、あるいは培養する条件が適当でなかったためであり得る。正常な量の第1及び第2の検出可能粒子が白血球に貪食されるならば、それはライム病又は他の標的病原体が存在しないことを示している。第2のタイプの粒子に対して、第1のタイプの粒子が正常量より多く白血球に結合又は摂取されている場合、それはライム病の現在又は最近の感染の有無に関す

10

20

30

40

50

る試験が陽性であることを示している。タイプ 2 粒子よりタイプ 1 粒子がより多く摂取されているが、その量が共に正常の範囲内であれば、この試験から結論は出せない。第 1 及び第 2 の検出可能粒子が白血球によって貪食されている量が共に正常な量より少ないならば、それは試験が無効であることを示している。第 1 及び第 2 の検出可能粒子が白血球によって貪食されている量が共に正常より多いならば、これは明確に決められない結果であり、原因不明の貪食作用の亢進を示している。そのような結果は重要な臨床的有用性を有している可能性があるが、試験の対象としている特定の疾患過程の有無を示すためには使用することはできない。

【図面の簡単な説明】

【0009】

10

【図 1】図 1 は、本発明により作製された試験用サンプリングチャンバの一部を示す平面図であり、チャンバは培養された抗凝固処理全血試料を含有しており、その試料は本発明の試験方法の実施に使用する第 1 及び第 2 の検出可能な粒子を含有している。

【発明を実施するための形態】

【0010】

ここで図 1 を参照すると、平面図に、検出粒子と共に培養された抗凝固処理全血の単層薄膜試料を含むサンプリングチャンバ 40 の一部が示されている。この例では、チャンバ 40 は、血液試料を電子的又は光学的に画像化できるように、透明な上面を有している。薄膜血液試料は、チャンバ 40 に所望の厚さ（この例では、約 $6\text{ }\mu\text{m}$ ）を与えるピーズ 42 を具備するサンプリングチャンバに収容されている。血液の薄膜は、赤血球 44、赤血球の塊又は連鎖 46、形質細胞のない空隙 48、及び白血球 13 を含む。血液試料はまた、2 種類の検出可能粒子 8 及び 9 を含む。粒子 8 には、標的ライム病検体に特異的な単数又は複数の抗原がコーティングされており、粒子 9 には、標的検体に特異的な抗原がコーティングされていない。粒子 8 及び 9 は、試料が画像化されると、試料中で異なるものとして検出することができる。

20

【0011】

図 1 に、試験用血液試料中のライム病の存在を調べる試験での陽性の結果を示す。血液試料中の多くの白血球 13 がライム病に特異的な粒子 8 を貪食しており、非特異的粒子 9 は白血球 13 に全く貪食されていないことがわかるであろう。試験が陰性であったならば、血液試料中にライム病細菌検体が存在しないので、粒子 8 を貪食した白血球は皆無か又は比較的少数であったであろうし、試験が結論を出せないものであったならば、粒子 8 及び 9 は共に白血球 13 によって同程度に貪食されたであろう。

30

【0012】

陽性及び陰性、並びに分析の有効性を定義するために、貪食された両タイプの粒子を含有する細胞のパーセンテージ又は絶対数の比が使用される。両タイプの粒子を含む細胞の比及び / 又はパーセンテージは、さらに、好中球又は単球など（共に貪食作用を有する）の細胞のタイプによって、下位の特性評価がされ得る。摂取された各タイプの粒子のパーセンテージ又は数の比はまた、陽性及び陰性、並びに分析の有効性を明らかにする結果を算出するために使用することができる。

【0013】

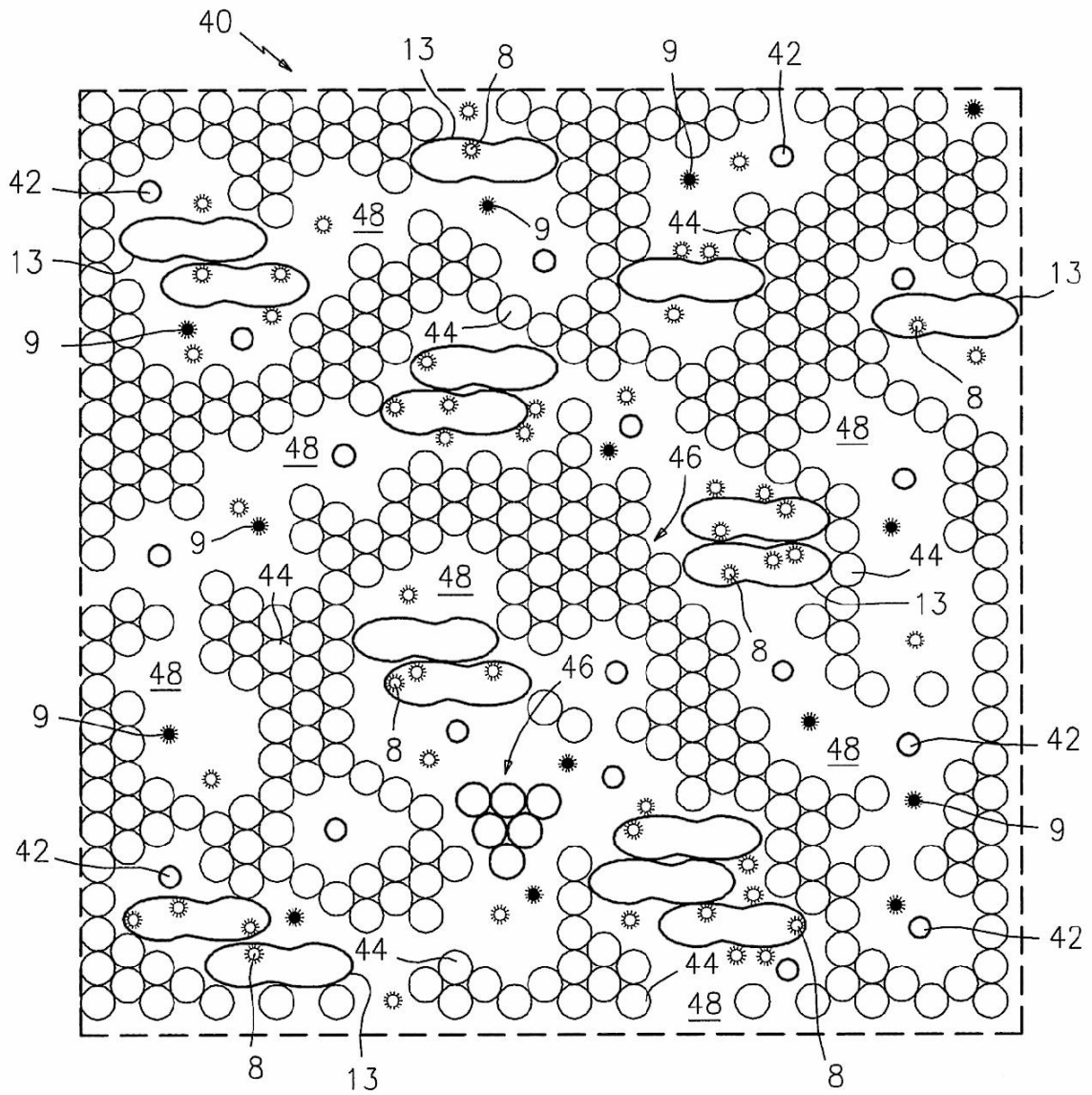
40

本発明の方法の特定の使用例は、ヒトの血液におけるライム病の検出に関するものであるが、それはまた、例えば肺炎を引き起こすエス・ニューモニエ (*S. pneumoniae*) や淋病を引き起こすナイセリア・ゴノレエ (*Neisseria gonorrhoea*) などの他の感染性病原体の存在の検出にも当然使用できることが認められる。これらの病原体及び他の病原菌もまた白血球による貪食作用を受けやすい。

【0014】

開示した本発明の実施形態には、本発明の概念から逸脱することなく、多くの変更と変形を加えることができるため、添付の請求項で要求される以外に本発明を限定することを意図するものではない。

【図 1】



フロントページの続き

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 特表2001-517921(JP,A)
国際公開第2008/151088(WO,A1)
特表2007-532881(JP,A)
特表2010-529043(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)
G01N 33/48-33/98
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

一种分析抗凝薄膜血液样品的目标分析物的方法，其中目标分析物的特征在于抗凝血样品中存在的白细胞和涂有抗原的特定颗粒的特异性吞噬作用/或合并工作并且颗粒涂有特定的抗原或抗原，并且这些抗原与由给定的目标病原体表达的抗原相似或相同。有一种方法。背景技术

