

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5768371号
(P5768371)

(45) 発行日 平成27年8月26日 (2015. 8. 26)

(24) 登録日 平成27年7月3日 (2015. 7. 3)

(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 4 1 A
GO 1 N 21/78 (2006. 01)	GO 1 N 33/543	5 7 5
	GO 1 N 33/543	5 9 7
	GO 1 N 33/53	N
請求項の数 20 (全 44 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2010-510825 (P2010-510825)	(73) 特許権者	506215582
(86) (22) 出願日	平成20年6月6日 (2008. 6. 6)		バイオーラッド・イノベーションズ
(65) 公表番号	特表2010-529444 (P2010-529444A)		B I O - R A D I N N O V A T I O N S
(43) 公表日	平成22年8月26日 (2010. 8. 26)		フランス国、エフー92430 マルヌー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/057116		ラーコケット、ブルヴァール・レイモン
(87) 国際公開番号	W02008/148886		・ポアンカレ 3
(87) 国際公開日	平成20年12月11日 (2008. 12. 11)	(74) 代理人	100078662
審査請求日	平成23年5月6日 (2011. 5. 6)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	0755624	(74) 代理人	100113653
(32) 優先日	平成19年6月8日 (2007. 6. 8)		弁理士 東田 幸四郎
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100116919
(31) 優先権主張番号	60/929, 052		弁理士 齋藤 房幸
(32) 優先日	平成19年6月11日 (2007. 6. 11)	(72) 発明者	ビュフィエール、フレデリック
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フランス国、エフー33600 ペサック
			、リュ・デ・ラヴァンディエール 32
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液試料の複数分析

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 試料を、単一の試験容器中で、またはいくつかの分離した試験容器中で、凝集なしに、試料中に存在する抗体または活性化血清補体分画が赤血球に結合することを可能にする条件下で、ビーズの群ごとに互いに異なる既知の表現型の、赤血球を各々が保有する区別可能なビーズの群と接触させること、

(i i) 赤血球に結合していない抗体または活性化血清補体分画を除去すること、

(i i i) 結合している抗体および/または結合している活性化血清補体分画を標識すること、および

(i v) 標識された抗体または標識された活性化血清補体分画に結合しているビーズの群を同定し、それにより、存在する抗赤血球抗体の同定を可能にすること、
 によって生物学的試料中の複数の抗赤血球抗体を同定するためのインピトロ方法。

【請求項 2】

(i) 赤血球を含む試料を、単一の試験容器中でか、またはいくつかの分離した試験容器中で、凝集なしに、赤血球が抗体に結合することを可能にする条件下で、ビーズの群ごとに互いに異なる、赤血球によって保有される抗原性分子に特異的な、所定の抗体を各々が保有する区別可能なビーズの群と接触させることであって、該赤血球は、該ビーズの群と接触させられる前かまたは後に標識される、

(ii) 該抗体に結合していない赤血球を除去すること、および

(iii) 標識された赤血球に結合しているビーズの群を同定し、それによって検出され

10

20

た赤血球によって保有される抗原の同定を可能にすること
 によって生物学的試料中の赤血球によって保有される複数の抗原性分子を同定することを
 さらに含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

赤血球によって保有される抗原性分子が、血液型を構成する赤血球膜抗原、赤血球によ
 って保有される活性化血清補体分画、および感受性化された赤血球の表面に存在する抗体
 からなる群より選択される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 4】

抗原の同定および抗体の同定が同時にそして同じ容器中で行われる、請求項 2 記載の方
 法。

10

【請求項 5】

混合物の分析がフローサイトメトリーによって行われる、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項
 記載の方法。

【請求項 6】

ビーズに結合した赤血球が、溶血に付される、請求項 1 ~ 5 のいずれか 1 項記載の方法
 。

【請求項 7】

溶血が、 100mosmol/L 以下の培質中のインキュベーションによって行われる
 、請求項 6 記載の方法。

【請求項 8】

区別可能なビーズが超常磁性または磁性または磁化可能なビーズである、請求項 1 ~ 7
 のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項 9】

区別可能なビーズが発光または蛍光シグナルを発する、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項記
 載の方法。

【請求項 10】

検出可能に標識された赤血球が蛍光化合物で標識される、請求項 2 記載の方法。

【請求項 11】

抗体が、蛍光、発光または放射性標識を保有する抗ヒトグロブリン抗体と接触させるこ
 とによって標識される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 12】

活性化血清補体分画が、蛍光、発光または放射性標識を保有する抗血清補体分画抗体と
 接触させることによって標識される、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 13】

複数の抗赤血球抗体を同定することを含み、抗体が非定型抗体である、請求項 1 ~ 12
 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 14】

生物学的試料が、全血、血漿、血清、血液細胞ペレットおよび任意の他の血液調製物か
 らなる群より選択される、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 15】

生物学的試料が、抗体によってインビボで感受性化された、および/または血清補体分
 画でコートされた赤血球を有する個体起源である、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項記載の
 方法。

40

【請求項 16】

赤血球の表面に、および/または個体起源の生物学的液体中に存在する免疫グロブリン
 のアイソタイプを決定する、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

同定された抗体の定量化も含む、請求項 1 ~ 16 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

患者中に輸血されなければならない赤血球をクロスマッチングするための方法であって

50

、
 (i) 患者由来の血清または血漿の試料を、単一の試験容器中で、凝集なしに、存在する可能な抗体が赤血球に結合することを可能にする条件下で、輸血されなければならない赤血球を保有する区別可能なビーズの群と、同時に接触させること、
 (i i) 赤血球に結合していない抗体を除去すること、
 (i i i) 結合している抗体を標識すること、および
 (i v) 混合物を分析して、ビーズの群が抗体に結合しているかどうかを決定すること、
 ここで、ビーズの群の結合は輸血されなければならない赤血球が患者に対して完全な適合ではないことを示す、
 を含む、方法。

10

【請求項 19】

生物学的試料中の、赤血球によって保有される抗原性分子に対する複数の抗体を同定するための一組の試薬であって、検出されることのできる少なくとも1つの特定の物理的パラメーターを保有し、そして、赤血球を保有する、区別可能なビーズの群を含む、一組の試薬。

【請求項 20】

検出されることのできる少なくとも1つの特定の物理的パラメーターを保有し、そして、赤血球によって保有される抗原性分子に特異的な捕獲抗体を保有する、区別可能なビーズの群をさらに含む、請求項 19 に記載の一組の試薬。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、赤血球の型および表現型の分析に関し、そしてまた、非定型抗赤血球抗体についてのスクリーニング、ドナーとレシピエントとの間の適合性の決定、および抗体または活性化血清補体分画でコートされた赤血球の実証に関する。

【0002】

今日では、輸血は、血液ドナーから得られた赤血球濃縮物（血液細胞濃縮物）の調製物を静脈内投与することにある。輸血が存在する場合、主な危険性は、抗体およびその赤血球抗原がレシピエント（輸血される個体）の身体中で再結合されることの可能性に関連付けられる。事実、赤血球（erythrocyte）（赤血球（red blood cell）とも呼ばれる）の表面に、免疫系によって認識され、そして赤血球溶血を伴う免疫応答を引き起こすことができる膜抗原、特に血液型（または式）抗原が存在する。そのような免疫学的反応の結果は、臨床徴候を伴わない不十分な輸血から、軽微な臨床反応（不安、悪寒）、重篤な臨床反応（ショック、ヘモグロビン尿、腎不全）、または結果として死を生じる劇的な臨床反応（ショック、播種性血管内溶血）までの範囲でありうる。

30

【0003】

ドナーの赤血球は、レシピエントが、ドナーの赤血球抗原に対するいかなる循環抗体も有しない場合に、レシピエントの血液と適合性であるといわれる。

【0004】

血液型を構成する赤血球膜抗原の全ての抗原性変異体の中で、20より多い赤血球抗原方式が今日までにヒトにおいて同定されている：抗原 A、B、および H を用いる A B O 式、特に抗原 D（D 抗原の非存在は d と示される）、C、E、c、および e を用いる R h e s u s（RH）式、特に2つの抗原 K および k を用いる K e l l（K E L）式、特に抗原 F y a および F y b を用いる D u f f y（F Y）式、特に抗原 J k a および J k b を用いる K i d d（J K）式、あるいは M N S 式、L e w i s（L E）式などのような実際にはそれほど一般には研究されていない他の方式。赤血球抗原の同じ関連を有する個体は、同じ赤血球血液型に属する。

40

【0005】

自己免疫疾患の場合などの病理学的状況を除くと、個体の血清は赤血球抗原に対する2つの型の抗体を含みうる：

50

- (i) 定型といわれ、そしてA B O式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) 非定型（または免疫）といわれ、血清または血漿におけるその存在は環境性であり、そしてより特定して非A B O式抗原に対する抗体。

【0006】

「定型」または「規則」抗体は、インビトロで赤血球を凝集させることができる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。この現象を使用して、Beth-VincentおよびSimonin試験（それぞれ表（forward）または裏（reverse）型決定（grouping））により個体のA B O型を決定する。Beth-Vincent試験は、個体の赤血球によって保有される抗体（抗原性表現型）を決定することを可能にし、そしてSimonin試験は、相補試験を行うこと、すなわち、個体の血清中に存在する循環抗Aおよび/または抗B抗体を決定することを可能にする。

10

【0007】

Beth-Vincent試験において、個体の赤血球を、各々がA B O式の抗原に対する正確な抗体特異性を有する試験血清または試験抗体と接触させる。それゆえ、それは試験血清を用いる赤血球凝集試験である。

【0008】

Simonin試験（裏試験とも呼ばれる）において、後者の循環抗体を含む、個体の血清または血漿を、各々がA B O式の正確な抗原型に属する試験赤血球（test red blood cell）または試験赤血球（test erythrocyte）と接触させる。それゆえ、それは試験赤血球を用いる血清凝集試験である。

20

【0009】

「非定型」、または「不規則」、または「免疫」抗体は、最も一般にはGアイソタイプのものであり、外来赤血球による抗原刺激が存在するときに、例えば、輸血の間、あるいは母体の血液型に属さない胎児赤血球抗原に対する母体の免疫反応に起因して妊娠の間（特に出産時）に、1つ以上の抗原に対する免疫化の後に出現する。

【0010】

これらの「非定型」抗体についてのスクリーニングは、非定型凝集素スクリーニング（Atypical Agglutinin Screen）（AAS）と呼ばれる。この試験を使用して、個体の血液中における、種々の赤血球抗原に対する抗体の有無を検出する。このために、その抗原が既知である試験赤血球へのこれらの抗体（IgGおよび/またはIgM）の結合を実証することが求められる。平行した手順を多数の型の赤血球を用いて行い、結果の比較は、存在する抗体の特異性（単数または複数）を推定することを可能にする。

30

【0011】

免疫学的反応に関連する危険性は、Rhesus式（この方法についての危険性の勾配は以下の通りである：D > E > c > e > C）、および次いで、免疫原性の減少する順序に従って、Kell式のK抗原、Duffy式のFyaおよびFyb抗原、Kidd式のJkaおよびJkb抗原などのもののような、最も免疫原性の抗原をこの反応が含む場合にますます大きい。

【0012】

実際には、特定の抗原の組み合わせは非常に稀であるのでなおさら、輸血を実施するために全てのこれらの抗原を考慮することは不可能であるか、そうでなければ、適切な時に適切な血液型を有することはない。それゆえ、標準的な輸血は、最も一般には、A B O式およびRhesus D式（Rh+またはRh-）における型のみを考慮している。しかし、非定型凝集素が出現する危険性が存在する状況では、特定の数の他の方式、特にRhesus C、c、EおよびeならびにKell、または他の方式さえも考慮する。これらの危険性のある状況のために、次いで、それは、これらの非定型凝集素の存在または出現の危険性を考慮して、ドナーの血液型のレシピエントの血液のものとの適合性に従う場合である。

40

【0013】

50

従って、非定型抗赤血球抗体を保有するレシピエント患者において、または危険性のある状況において、例えば、特に、非定型の抗赤血球抗体を有さない複数回輸血した患者において、そして妊婦において、ドナーの赤血球が、レシピエントの抗体がそれに対するものであるかまたはそれに対して出現しやすい抗原を欠いているに違いないような方法で、輸血される赤血球濃縮物単位を選択することが重要である。

【0014】

輸血の実際には、現時点で、専門家は2つの姿勢のいずれかをとることができる：

- 患者の血清または血漿における非定型抗体の存在について体系的にスクリーニングし、そしてそのような抗体が存在する場合には、問題の抗原構造を欠く赤血球濃縮物を選択する（これは、フランスにおいて最も一般に遭遇する場合である）、
- または、レシピエントの血清または血漿の存在下でドナーの赤血球との直接的クロスマッチを行う。ここで、凝集および/または溶解反応は観察されないべきである。

10

【0015】

輸血の臨床の実際には、赤血球表現型決定 (erythrocyte phenotyping) (これは、赤血球の表面の血液型抗原をスクリーニングおよび同定することに対応する (対応する定型抗体の存在についてもスクリーニングされる、特定の A B O 式を例外として)) は、レシピエントおよびドナーの両方を含む。

【0016】

レシピエントおよびドナーのレベルで、3つのレベルの赤血球表現型が、危険性のある状況に応じて適合性の赤血球濃縮物をレシピエントに提供するために存在する：

20

- A B O 型決定表現型 (または A B O 型決定) および標準的 R h e s u s 表現型 (D 抗原の有無) の決定；
- K e l l R h e s u s 表現型 (C、E、c、e および K 抗原の有無) の決定；および
- 拡張された (または拡大された) 表現型の決定、すなわち、D u f f y 式の抗原、K i d d 式の F y a および F y b、M N S 式および L e w i s 式の J k a および J k b、ならびに、レシピエントの血清において明らかにされた危険性および/または非定型抗体の性質に従ってそれもまた研究されうる他の抗原の有無の決定。

【0017】

表現型決定のために通常使用される技術は、一般に、適切な抗体を含む試験血清を使用して、研究される抗原の有無についてのスクリーニングすることにある。好ましくは、これらの試験血清に含まれるこれらの抗体は、本来凝集性であり (I g M または I g A)、それにより、試験血清中に存在する抗体に対応する抗原を後者が保有するときに、表現型決定しようとする赤血球の全体的または部分的凝集を得ることを可能にする。それにもかかわらず、(I g G 型の) 非凝集試験抗体を使用することが可能であり、ここで、それらの存在は、抗免疫グロブリンによる凝集によって実証される (「間接クームス」技術)。

30

【0018】

試験しようとする患者からの血清または血漿の試料において、A B O 型決定のための定型抗体または A A S の場合非定型抗体である抗血液型抗原抗体をスクリーニングおよび同定するために、患者の血清または血漿を、一般に、特定の数の血液型方式 (A B O、R h e s u s、K e l l、D u f f y、K i d d、M N S など) における既知の抗原性の試験赤血球 (test erythrocyte) (試験赤血球 (test red blood cell) とも呼ばれる) と接触させる。A A S (それについて存在しやすい抗体はむしろ非凝集型である) のために、使用される技術は、抗免疫グロブリンを用いる凝集によるか、または特許 E P 0 3 6 7 4 6 8 に記載されるような固相上での免疫接着 (immunoadhesion) および抗免疫グロブリンでコートされた赤血球を用いた顕現 (revelation) による、間接クームス型のものである。

40

【0019】

A A S の場合、第 1 工程において、「スクリーニング」赤血球 (非定型抗体の有無を検出 (同定ではない)) するために輸血において重要な全ての抗原を含むように選択された異

50

なる型の2つまたは3つの赤血球)のパネルを利用する。スクリーニングが陽性のとき、次いで、存在する非定型抗体(単数または複数)の特異性を、一般に、大多数の既知の血液型方式において表現型決定された10~15、または20さえの異なる赤血球を含む、「同定」赤血球の少なくとも1つのパネルにより同定する。

【0020】

クロスマッチの場合、間接クームス技術も使用する。従って、輸血されうるバッグから取られた試料起源のドナー赤血球、レシピエントの血清および抗グロブリンを一緒にする。そのような分析は、抗体の有無の決定のみをもたらし、そしてその特異性を決定することを可能にしない。

【0021】

輸血の分野において表現型決定またはAASのために使用される技術の多数の変形が存在し、これらの技術は、手動であるか(乳白色プレート上、チューブ中もしくはマイクロプレートウェル中、またはゲルカラム中)、または、試料および試薬を分注するためのロボット、シェーカー、インキュベーター、遠心分離機および自動リーダー(そのプログラムは実行される技術に適切である)により完全に自動化されることが可能である。

【0022】

それにもかかわらず、現在の技術は特定の数の限界を有する。

【0023】

現在、血液型を決定するときに、最終的な結果は、同じ試験試料を用いて決定されたのではない、いくつかの分離した結果の積み重ねに相当する。同じ患者からのいくつかの試験試料の使用は、試験の信頼性に影響を及ぼす。さらに、それは多量の血液を取ることを必要とし、これは特定の患者において(例えば、乳児においてそして重篤な貧血に罹患した患者において)問題となりうる。

【0024】

特にABO型を決定するために、分析は、2つの型の分析の組み合わせおよび解釈の結果である:血漿または血清を用いる血清分析および血液細胞ペレットを使用する細胞分析。

【0025】

非定型抗体スクリーニングの場合、スクリーニングは、一般に、第一の方針として行われ、次いで結果が陽性である場合、抗体の特異性を同定するために、試料を選別する。これらの2つの工程は、結果が与えられる時を遅延させ、そして試料の分解を引き起こしうる。さらに、試料の容積は、研究を継続するために不十分であるとしばしば見出され(特に抗体混合物の場合にそうである)、このことは、患者からさらなる試料を取ることを必要にする。これらの工程の多重性は、誤りを回避するために厳密な追跡調査手順の設定を必要とする。

【0026】

さらに、凝集原理に基づく全ての型決定および表現型決定試験は、特定の方式(例えば、Duffy)について不可能である。ここで、アイソタイプGのヒト抗体のみが利用可能であり、後者は特異的抗原を保有する赤血球を直接的に凝集することができない。この場合、これらのヒト免疫グロブリンを認識し、そして試験しようとする赤血球に結合している抗体間の架橋を可能にするさらなる試薬(AHG)が利用される。しかし、この型の試薬を、抗体によってインビボで感受性化された赤血球を有する患者(自己免疫性貧血、新生児など)の場合に使用することはできない。なぜなら、非特異的な凝集反応(赤血球の表面での考慮中の抗原の非存在下でさえ凝集)を引き起こす危険性が存在するからである。それゆえ、このカテゴリーの患者について表現型を提供することは不可能であり、そしてこのことは真の公衆衛生問題を引き起こしている。これは、この場合、輸血する医師は、それについて最大数の抗原マーカーが陰性である赤血球を輸血することが義務付けられ、そのような赤血球は治療ユニットにおいて常に利用可能なわけではないからである。

【0027】

さらに、現在利用可能な技術を用いて、利用可能な結果(これは、しばしばいくつかの

10

20

30

40

50

試験の結果の組み合わせから生じる)を提供するために必要とされる時間は、少なくとも30分間を2回のオーダーであり、一方、輸血を必要とする状況は、一般に、できるだけ短時間にドナーとレシピエントとの間の適合性を決定することができることが所望される緊急の状況である。

【0028】

発明の概要

本発明は、完全に自動化することができ、そして赤血球の型決定および表現型決定、非定型抗赤血球抗体についてのスクリーニング、ドナーとレシピエントとの間の適合性の決定、ならびに抗体または血清補体分画のいずれかでコートされた赤血球の実証を行うことを可能にする、迅速でそして簡単な方法であって、好ましくは単一の試料を用いて多重フォーマットで行われる方法を提供することによってこれらの問題を解決する。

10

【0029】

従って、本発明は、特に赤血球または区別可能なビーズの、凝集なしに、適切であれば血清補体分画の活性化を伴って、抗体がそれらの抗原に結合することを可能にする条件下で、試料を、a) 抗原に特異的な抗体またはb) 赤血球、赤血球膜フラグメントもしくは血液型抗原にそれが結合した区別可能なビーズと接触させることを含む、好ましくは多重フォーマットで、個体において存在しうる、赤血球によって保有される抗原性分子および、また、抗赤血球抗体を同定するためのインビトロ方法を提供する。

【0030】

より具体的には、本発明の課題は、個体の赤血球によって保有される抗原性分子および/または抗赤血球抗体を同定するためのインビトロ方法であって、

20

a)

(i) 赤血球を含む試料を、単一の試験容器中で、またはいくつかの分離した試験容器中で、凝集なしに、赤血球が抗体に結合することを可能にする条件下で、ビーズの群ごとに互いに異なる、赤血球によって保有される抗原性分子に特異的な、所定の抗体を各々が保有する区別可能なビーズの群と接触させること(ここで、赤血球はそれがビーズの群と接触させられる前または後に標識される)、

(ii) 抗体に結合していない赤血球を除去すること、および

(iii) 標識された赤血球に結合しているビーズの群を同定し、それにより、検出された赤血球によって保有される抗原の同定を可能にすること、

30

によって生物学的試料中の赤血球によって保有される複数の抗原性分子を同定すること；および/または

b)

(i) 試料を、単一の試験容器中で、またはいくつかの分離した試験容器中で、凝集なしに、試料中に存在する抗体または活性化血清補体分画が赤血球、赤血球膜フラグメントまたは血液型抗原に結合することを可能にする条件下で、ビーズの群ごとに互いに異なる既知の表現型の、(1) 赤血球、(2) 赤血球膜フラグメントまたは(3) または血液型抗原を各々が保有する区別可能なビーズの群と接触させること、

(ii) 赤血球または赤血球膜フラグメントまたは血液型抗原に結合していない抗体または活性化血清補体分画を除去すること、

40

(iii) 結合している抗体および/または結合している活性化血清補体分画を標識すること、および

(iv) 標識された抗体または標識された活性化血清補体分画に結合しているビーズの群を同定し、それにより、存在する抗赤血球抗体の同定を可能にすること、

によって生物学的試料中の複数の抗赤血球抗体を同定すること、を含む、方法である。

【0031】

好ましくは、様式(a)および/または様式(b)は、多重フォーマットで、単一の容器で行われる。最終工程a-(iii)またはb-(iv)は、次いで、混合物を分析して、それぞれ、どのビーズの群が、標識された赤血球に結合しているか、または抗体も

50

しくは活性化血清補体分画に結合しているかを同定することを含む。

【0032】

本発明の主題はまた、上記の検出方法を実行するための一組の試薬であって、各々が、検出されることができる少なくとも1つの特定の物理的パラメータを保有し、そして、群の1つは赤血球によって保有される抗原性分子に特異的な捕獲抗体を保有し、そして他の群は(1)赤血球、(2)赤血球膜フラグメントまたは(3)捕獲抗原(これは血液型抗原である)を保有する、少なくとも2つの異なる群に属する、ビーズの群を含む、一組の試薬である。

【0033】

本発明の詳細な説明

10

定義：

本明細書において、「赤血球(erythrocyte)」または「赤血球(red blood cell)」という用語は同じ血液細胞を示すために区別なく使用される。

【0034】

「多重(multiplex)」という用語は、同時に単一の試料について単一の容器中でそして単一のシグナル読み取りシステムを使用して、いくつかの異なる抗原-抗体型反応が分析されることを意味する。

【0035】

「単純(simples)」という用語は、いくつかの分離した容器中で、抗原-抗体型反応が分析されることを意味する。好ましくは、分析は、それにもかかわらず、同時に、そして好ましくは単一のシグナル読み取りシステムを使用して行われる。

20

【0036】

「赤血球によって保有される抗原性分子」という表現は、赤血球の表面に生理学的に見出される任意の赤血球抗原、特に血液型抗原だけでなく、赤血球抗原に起因する免疫学的反応から生じる赤血球の表面に存在する抗原も示す。この場合、「赤血球によって保有される抗原性分子」という用語は、インビボで感受性化された赤血球によって保有される、血清補体分画の活性化エレメントまたは抗体を含む。

【0037】

一般に、赤血球によって保有される抗原性分子は、それゆえ、血液型を構成する赤血球膜抗原、赤血球によって保有される活性化血清補体分画、および感受性化された赤血球の表面に存在する抗体からなる群より選択される。赤血球上に吸着されているが、他の細胞集団起源である抗原性分子(特に、Lewis抗原分子)も含まれる。

30

【0038】

「抗赤血球抗体」という表現は、赤血球によって保有される抗原に特異的に結合する任意の抗体を示す。「結合している抗体および/または結合している活性化血清補体分画の標識」という用語は、赤血球膜に可逆的に結合しているかまたは直接的に包埋されている抗体または活性化血清補体分画の標識を意味すると理解される。

【0039】

「個体」という用語は、複数の血液型を有する任意の動物を意味することが意図される。複数の血液型を有する動物として、例えば、イヌ(今日までに8個の異なる血液型が同定されている)、およびネコ(3個を有する)に言及しうる。もちろん、「個体」という用語は、ヒト(胎児期を含む)にも関する。

40

【0040】

「生物学的試料」という用語は、生理学的であろうと病理学的であろうと、赤血球または抗赤血球抗体を含みうる体液または組織バイオプシーの任意の画分を意味することが意図される。生物学的試料として、それゆえ、血液試料、特に全血試料または血液細胞ペレット試料(もしくは血液バッグ)、または任意の他の血液調製物に言及しうるが、それが血液を含むときには、唾液、汗、涙、乳汁または尿にも言及しうる。抗体スクリーニングのために血漿または血清試料を使用することも可能である。赤血球によって保有される抗原を決定するために、生物学的試料は血液細胞ペレットからなってもよい。様式(a

50

)において使用される試料は、様式(b)において使用される試料と同一であってもよくまたは異なってもよい。試料が同一であるときに、様式(a)および(b)を同じ容器中で同時に行うことができる。生物学的試料は前処理を経なくてもよい。

【0041】

「抗体」という用語は、抗原性化合物の少なくとも1つの抗原決定基に抗体が結合することを可能にする、少なくとも1つの抗原結合部位を含むかまたはそれからなる任意の抗体全体または抗体の機能性フラグメントを指す。抗体フラグメントの例として、Fab、Fab'およびF(ab')₂フラグメントに、そしてまたscFv鎖(単鎖可変フラグメント)、dsFv鎖(二重鎖可変フラグメント)などに言及しうる。これらの機能性フラグメントを、特に遺伝子工学によって得てもよい。

10

【0042】

「捕獲抗原」という用語は、抗体によって認識されることができ、そして後者との親和性結合を可能にする、固相に結合した抗原性フラグメントを意味することが意図される。ビーズに結合した血液型抗原は、化学的プロセスまたは遺伝子組換えによって産生される、合成抗原でありうる血液型抗原である。それは、生物学的試料から精製された抗原であってもよい。

【0043】

「捕獲抗体」という用語は、親和性結合によって、生物学的試料中に存在する抗原性化合物の少なくとも1つの抗原決定基を保持することができる、固相に結合された抗体または抗体の部分の意味することが意図される。

20

【0044】

検出ツールとして使用される抗体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体でありうる。本発明に関して使用することができるモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の産生は、従来技術の部類に入る。

【0045】

モノクローナル抗体を、Kohler and Milstein (Nature, 256, p. 495-497(1975))によって記載される従来のリンパ球融合およびハイブリドーマ培養方法に従って得てもよい。モノクローナル抗体を調製するための他の方法も公知である(Harlow et al. editors, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (1988))。モノクローナル抗体を、哺乳動物(例えばマウス、ラット、ウサギまたはヒトさえ等)を免疫し、そしてリンパ球融合物産生ハイブリドーマの技術を使用することによって調製してもよい(Kohler and Milstein, 1975、上記)。

30

【0046】

この習慣的技術に対する代替技術が存在する。例えば、モノクローナル抗体を、ハイブリドーマからクローン化された核酸の発現によって産生することができる。抗体を、典型的には繊維状ファージであるベクター(例えばE. coli用のfUSE5、Scott et al. (Science, 249, pp. 386-390 (1990)))中に抗体cDNAを導入することによって、ファージディスプレイ技術によって産生することもできる。後者は、ライブラリーを構成し、そしてその表面にscFvフラグメントを有する。この抗体ライブラリーを構築するためのプロトコルは、Marks et al. (1991) (J. Mol. Biol., 222, pp. 581-597, (1991))に記載されている。

40

【0047】

ポリクローナル抗体を、通常の手順に従って、抗原(好ましくはペプチド性質の)に対して免疫された動物の血清から得ることができる。

【0048】

一般に、ポリペプチド(特に組換えポリペプチド)またはオリゴペプチドを、例えば免疫原として、使用することができる。従来プロトコルによれば、Benoit et al. [PNAS USA, 79, pp. 917-921 (1982)]によって記載される手順に従って、ペプチド免疫原1mgの等価物でウサギを免疫する。

【0049】

50

ビーズ：

ビーズは、一般に、生物学的試料の構成要素に関して不活性であるポリマーからなり；それは固体であり、そして試料に不溶性である。使用されるポリマーは、ポリエステル、ポリエーテル、ポリオレフィン、ポリアミド、ポリサッカリド、ポリウレタンまたはセルロースでありうる。粒子に完全性および構造を与えるために結合剤を使用してもよい。

【0050】

生物学的な目的の高分子（タンパク質、脂質、炭水化物、核酸）の結合またはカップリングを可能にするように、これらのポリマーに官能基を組み入れてもよい。当業者に公知であるこれらの官能基は、アミン（ $-NH_2$ ）またはアンモニウム（ $-NH_3^+$ または $-NR_3^+$ ）官能基、アルコール官能基（ $-OH$ ）、カルボキシル官能基（ $-COOH$ ）またはイソシアネート官能基（ $-NCO$ ）でありうる。COOH官能基をポリオレフィン中に導入するために最も一般的に使用されているモノマーはアクリル酸またはメタクリル酸である。

10

【0051】

ビーズの表面への試薬の結合を、静電誘引、親和性相互作用、疎水性相互作用または共有結合によって行うことができる。共有結合が好ましい。

【0052】

本発明において使用されるビーズは、形状がほぼ球状であり、 $0.5 \sim 40 \mu m$ 、好ましくは $4 \sim 9$ 、より特定すると $5 \sim 8 \mu m$ でありうるサイズの粒子である。

【0053】

ここで使用されるビーズは、適切な検出器によってそれらを互いに区別することを可能にする差示的なマーカーをそれらが有するという点で、「区別可能」である。それゆえ、各々のビーズの群は、適切な検出器またはツール（例えばフローサイトメーター）によってそれらを互いに識別することを可能にする、異なる物理化学的特性（サイズ、密度、粒子サイズ、粗さ、吸光度、蛍光、常磁性成分）を有する。

20

【0054】

粒子を互いに区別するための差示的なパラメーターとして、特に、非重複サイズ範囲を選択することによって、粒子のサイズを利用しうる。別の好ましい実施態様において、区別可能な粒子は蛍光シグナルを発する。種々の蛍光標識を組み入れるビーズを、事実、その蛍光スペクトルによって区別することができる。このために、ビーズに1つ以上の色素（例えば蛍光、発光など）（適切であれば種々の濃度の）、または放射性同位元素型、酵素型などの標識を浸透させることができる（Venkatasubbarao S. << Microarrays-Status and prospects >> Trends in Biotechnology Dec 2004, 22(12):630-637 ; Morgan et al, << Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology >>, Clin. Immunol. (2004) 100:252-266)。光の散乱もしくは発光、またはその組み合わせを、粒子間の区別のために使用することもできる。

30

【0055】

好ましい実施態様において、区別可能なビーズは発光または蛍光シグナルを発する。

【0056】

使用されるビーズは、超常磁性、磁性または磁化可能でありうる。本発明に従って使用することができるビーズとして、特にUS 6,872,578に記載のものに言及しうる。特に好ましい実施態様によれば、使用されるビーズは、蛍光性でありそして超常磁性である。これらの物理化学的特性は、生物学的試料との反応の間に、これらの微粒子によって捕獲された画分を結合していないものから分離することを可能にしうる。この分離を、とりわけ、遠心分離、ろ過または磁化によって行うことができる。磁化による分離が好ましく、そしてこのために、常磁性、強磁性、フェリ磁性およびメタ磁性成分を含むビーズを使用しうる。常磁性成分が好ましい（例えば、鉄、コバルト、ニッケルまたは金属酸化物、例えば Mn_2O_3 、 Cr_2O_3 もしくは Fe_3O_4 ）。磁性成分の量は2%～50%（重量）、好ましくは3%～25%でありうる。

40

【0057】

50

抗体を、任意の適切な技術によって（aによる）ビーズに結合させうる。それらは、直接的共有結合によって、または非共有結合で、特に受動的吸着もしくは親和性によって結合されうる。直接的共有結合を、例えば、ヒドロキシスクシンイミドまたはカルボジイミドを介する結合を含む、ビーズの表面に存在するカルボキシル基の活性化によって行いうる。特定の実施態様において、抗免疫グロブリン抗体をまずビーズに結合させ（共有結合によって）、次いでビーズを結合させようとする抗体と接触させる。

【0058】

赤血球、赤血球膜フラグメントまたは血液型抗原を、ポリ-L-リジンを介する非共有結合によってか、または色素型のポリカチオンのような任意の型のリガンドによって、ビーズに結合させることができる。赤血球、赤血球膜フラグメントまたは合成抗原を、共有結合によって、特に過ヨウ素酸ナトリウムを使用して、ビーズに結合させることもできる。

10

【0059】

驚くべきことに、赤血球または膜フラグメントの結合が、共有結合であろうと非共有結合であろうと、フローサイトメトリープロセスに従って区別可能であるというビーズの有する特性を損なわないことが示された。

【0060】

さらに、これらのビーズの表面に、同様に、赤血球の表面に存在する特定の血液型抗原のホモログである合成抗原を結合させることが可能である。これらの抗原の結合は、区別可能であるというビーズの有する特性も損なわない。そのような合成抗原は、例えば、ポリサッカリドでありうる。

20

【0061】

ビーズは、例えばLuminexの特許出願WO97/14028に記載されるような、フローサイトメーターのような検出器による測定に供される。従って、反応物（抗体または赤血球または赤血球膜）を保有するビーズのサブグループが生物学的試料に曝露され、各々のサブグループは、1つのサブグループのビーズを別のサブグループのものから区別することを可能にする1つ以上の分類パラメーターを有している。次いで、このようにして試料に曝露されたビーズは、検査ゾーン（例えばフローサイトメーター）を通過し、ここで分類パラメーターに関連するデータ（例えば蛍光強度）が収集され、そして好ましくは反応物と目的の分析物との間（すなわち、ビーズと、本発明の方法における（a）による赤血球によって保有される抗原性分子または（b）による抗体との間）に形成された複合体の有無に関連するデータも収集される。

30

【0062】

標識：

検出可能に標識された赤血球（様式（a）における）を、当業者に公知の任意の技術によって標識することができる。例えば、それを、蛍光化合物、例えば細胞の膜中に挿入されるフルオロフォアで標識してもよい。それを、それ自体が蛍光標識で官能性付与されている、赤血球の表面の構造を認識することができるリガンドを使用して標識してもよい。これらのリガンドは、例えば、抗体または動物または植物レクチンでありうる。これらの型の標識を、試験の前に行ってもよく、または行わなくてもよい。

40

【0063】

様式b）において、標識されるのは抗体であるか、あるいは、活性化された血清補体画分である。任意の標識技術が可能である。標識の型を混合することもできる。

【0064】

特定の実施態様によれば、抗体は、蛍光、発光または放射性標識を保有する抗ヒト免疫グロブリン抗体と接触させられる。

【0065】

別の特定の、場合により累積的な、実施態様によれば、活性化血清画分を、活性化血清補体画分を特異的に認識する、例えば、蛍光、発光または放射性標識を保有する抗体と接触させる。そのような抗体は、モノクローナルまたはポリクローナルであり得、そして当

50

業者に周知である。

【0066】

非結合試薬の除去：

分析工程を行う前に、接触および試薬のインキュベーションの間に結合していない試薬を除去すべきである。バックグラウンドノイズを低下させ、それゆえ試験の良好な特異性を得るために、できるだけ多くの非結合試薬を除去することが望ましいが、徹底的過ぎる条件は前記試験の感度を低下させうる。それゆえ、非結合試薬の残存する存在は一般に容認できる。方法の感度と特異性との間の許容されうる妥協を得るための条件は、日常的な実験により当業者によって容易に決定されうる。

【0067】

非結合試薬の除去を、反復した遠心分離工程、またはビーズの超常磁性性質の使用および磁石の使用による洗浄のような、当業者に公知の任意の技術によって行うことができる。

【0068】

好ましい実施態様：

上記で規定するように、本発明による方法は、(a)により抗原を同定すること、または抗体を同定すること、あるいは結合している活性化血清補体画分を同定することを可能にする。それはまた、いくつかの型の同定の組み合わせを使用することを可能にする。従って、(a)による抗原の同定および(b)による抗体の同定を、同時にまたは別々に行うことができる。(b)による抗体の同定を、抗体および活性化血清補体画分の両方を明らかにすることによって行うことができる。

【0069】

容器は任意の固体容器、例えば試験管、マクロプレートウェル、または自動化システムにおける反応を可能にする任意の容器でありうる。容器を遠心分離する必要はない。

【0070】

反応物の混合および目的的分析物の混合を、凝集なしに、赤血球によって保有される抗原の抗体への特異的結合を可能にする条件(特にpH、温度、イオン強度などの)下で行う。凝集の実質的な非存在は、特にフローサイトメーターを使用することを可能にする。いかなる凝集反応をも回避するために、ビーズの量およびサイズを、そしてまた試料の濃度を調整することが有利である。凝集反応は、特にH.E. Hart, Bulletin of mathematical biology, vol 42, 17-36、K.C. Chak, Bulletin of mathematical biology, vol 42, 37-56およびC. DeLisi, Journal of Theoretical Biology, 1974, vol 45, pages 555-575によって記載されている数学的法則を満たす。これらの法則は、特に、試薬のサイズそしてまたその数での比率のようないくつかのパラメーターを含む。それゆえ、当業者は、実質的な凝集が生じないように、使用する試薬に応じてこれらの数学的法則を適用することによって、反応条件を選択する。例えば、赤血球および赤血球のサイズと類似するサイズ(すなわち7 μ mのオーダー)のビーズを使用する場合、当業者は30~150の範囲のビーズ数に対する赤血球数の比率を選択する。

【0071】

有利には、溶血のようなヘモグロビンの化学的または酵素的分解の工程を、好ましくは結合の後、抗原(aによる)または抗体(bによる)の同定の前に提供することが好ましい。

【0072】

溶血を種々の方法で行うことができる。例えば、混合物を低浸透圧モル濃度の媒質中でインキュベートすることができる。「低浸透圧モル濃度の媒質」という用語は、一般に、100mosmol/L以下の浸透圧モル濃度を有する媒質を意味することが意図される。低浸透圧モル濃度の適切な媒質として、40mM以下の濃度を有する塩化アンモニウム溶液、または蒸留水に言及しうる。溶血を超音波処理によって行ってもよい。

【0073】

適用：

方法は、多重フォーマットで、赤血球の表現型決定および/または型決定を行うことを可能にする。

【0074】

本発明による方法の実施態様(a)によって同定される抗原は、任意の血液型抗原、すなわち、A抗原、B抗原、同時に発現されるAおよびB抗原もしくはH抗原を用いるABO式、D、E、e、およびCもしくはc抗原を用いるRhesus式、Kもしくはk抗原を用いるKell式、Duffy式(Fya、Fyb)、Kidd式(Jka、Jkb)、あるいは実際にはそれほど一般には研究されていないが、それもまた存在する他の方式(例えばMNS、Lewisなど)でありうる。

【0075】

本発明の方法の実施態様(a)は、抗体によってあるいは血清補体分画によってインビボで感受性化された赤血球を有する患者由来の生物学的試料を使用して表現型を同定することの可能性も提供する。これらの患者は「直接クームス試験陽性」といわれる。それらは、例えば、特に新生児または溶血性貧血に罹患した患者である。これらの患者の赤血球がG型免疫グロブリンでコートされているという事実は、抗ヒトグロブリン二次試薬の関与をもたらす試薬の使用を禁止する。それゆえ、間接クームス試験をそのような場合に使用することはできない。この特殊性は、この型の患者の完全な表現型を確立する生物学者の能力を大いに制限する。事実、多くの表現型決定試薬は、IgG型の特異的ヒト抗体の溶液の形態でのみ存在し、抗ヒトグロブリン二次試薬の使用を必要とする。特定の場合、それゆえ、分析を行うことは不可能であり、それゆえ、患者に輸血することは不可能であり、このことは、もちろん、治療手順の質に影響を及ぼしうる。反対に、本発明による方法は、抗グロブリン二次試薬の使用を必要とせず、それゆえ、インビボで感受性化された赤血球の赤血球抗原の同定を可能にする。

【0076】

インビボで感受性化された赤血球の表面に存在する抗体または活性化血清補体分画は、それ自体、本発明による方法の実施態様(a)を用いて同定されうる赤血球によって保有される抗原を構成することができる。

【0077】

有利には、本発明の方法は、赤血球の表面に存在する免疫グロブリンのアイソタイプを決定することも可能にする。特定のアイソタイプは他よりも危険であるので、見出される抗体の性質を特定することができ、従って、臨床医が彼または彼女の治療手順を指図することを可能にすることは有利である。従って、実施態様bによれば、免疫グロブリンアイソタイプに特異的な抗体のための標識を使用することによって、非定型抗体のアイソタイプを決定することができる。

【0078】

本発明による方法の実施態様(a)は、複数回輸血した患者において、患者がその血液型と完全には適合性でない複数の輸血を受けたときに時々遭遇する、赤血球の複数の集団、すなわち、異なる表現型の赤血球(二重集団)を明らかにすることも可能にする。

【0079】

本発明の方法は、患者/移植片によってもう一度合成された非常に少量の赤血球を明らかにすることによって、骨髄移植をモニターすることも可能にする。

【0080】

本発明の方法は、適切な場合、Kleihauer試験の代わりとして、母親からの血液試料中に存在する胎児赤血球を同定することも可能にする。

【0081】

さらに、方法は、例えば蛍光シグナルの分析を通して、試料中の赤血球の表面の抗原の割合を定量的に決定することを可能にする。

【0082】

本発明の方法は抗体の定量化も可能にする。従って、得られる結果は数値的形態にあり得、そして電子データ処理システムによる促進された解釈のために利用可能でありうる。

10

20

30

40

50

【0083】

さらに、本発明の方法は、複数の抗赤血球抗体を同定することの可能性を提供する（bによる）。一般に、この方法は、Simonin裏試験のための任意の抗ABO型特異性を、または、非定型抗体についてのスクリーニングに関して任意の他の特異性を同定することを可能にする。一般に、これらの抗体は、特に本発明による方法を行うための条件下で、それらの抗原に安定に結合することができる、すなわち、それらの抗原に結合するだけでなく、それらに結合したままであることができる。これらの抗体を、本発明による方法の実施態様（b）によって同定することができる。

【0084】

さらに、ある特定の抗赤血球抗体は、それらのアイソタイプおよび温度に応じてのそれらの可変性の反応性によって、それらの対応する抗原に結合したままであることができないことが現在周知である。他方、これらの抗体は、補体系を構成する全てのタンパク質、特に血清画分C1q、C3およびC4を活性化することができる。この活性化の結果は、C3b、C3dgおよびC3dタンパク質などの改変タンパク質の形成を導き、後者の2つの場合、これらは赤血球膜中に固定されたままであり、一方、開始抗体は赤血球の表面から除去される。しかし、この複雑なプロセスは、抗体の赤血球抗原への一次結合の最初のそして特異的な反応に直接的に結び付けられる。活性化血清分画を同定する、本発明による方法の実施態様（b）は、開始抗体を同定することを可能にする。

【0085】

有利には、本発明の方法は、患者、例えば、妊婦の血清中に存在する免疫グロブリンのアイソタイプを決定することも可能にする。これは、胎児貧血をモニターするための主な興味の対象である。これは、新生児の溶血性疾患の重篤度が、母親中に存在しそして小児の赤血球の抗原決定基に対するものである抗体のアイソタイプに依存することが現在実証されているからである（Lambin et al., Transfusion, 2002, vol 42, pp1537-1546）。いくつかのアイソタイプは他よりも危険であるので、見出される抗体の性質を特定することができ、従って、臨床医が彼または彼女の治療手順を指図することを可能にすることは有利である。

【0086】

さらに、特に有利には、本発明による方法は、本発明の方法の実施態様（a）および（b）を同時にそして同じ容器中で実行することによって、単一の試験試料を使用して決定される、個体の血液中に存在する赤血球によって保有される赤血球抗原および抗赤血球抗体の両方をを用いたABO式における個体の血液型の完全な決定を可能にする。

【0087】

さらに、本発明の方法の特定の実施態様によれば、クロスマッチを確認するために後者を行う。それゆえ、それは、全ての血液型抗原（ABOのみではない）をクロスマッチすることの問題である。この場合、（i）患者の血清または血漿の試料を、同時に、好ましくは単一の試験容器中で、存在する可能な抗体が赤血球に結合することを可能にする条件下で、輸血されなければならない赤血球を保有する区別可能なビーズの群と接触させ、（ii）赤血球に結合していない抗体を除去し、（iii）結合している抗体を、特に、例えば蛍光標識で標識された抗グロブリンを使用して標識し、次いで（iv）混合物を、好ましくはフローサイトメトリーにより、分析して、ビーズの群が抗体に結合しているかどうかを決定し、ここで、ビーズの群の結合は、輸血されなければならない赤血球が患者に対して完全な適合ではないことを示す。

【0088】

そのような適用は、本発明の方法の高い信頼性の故に可能になる。

【0089】

有利には、方法は、完全な信頼できる結果を数分のみの中に得ることを可能にする。より詳細には、1時間未満のうちに、または30分未満のうちにさえ完全な結果を与えることが可能である。

【0090】

さらに、本発明の方法は、少なくともゲルカラムろ過などの現在販売されている技術のものと同様な、非常に良好な感度を有している。

【0091】

本発明の方法はまた、取る試験試料の容積をかなり低下させることを可能にする。今日、反応は、一般に、各々の試験について25 μ lの試験試料を用いて行われる(すなわち、20個の異なる赤血球および3つのスクリーニング赤血球を用いるAASの場合、575 μ l)。本発明の方法を行うためには、例えば50~100 μ lのみで十分である。

【0092】

以下の図面および実施例は本発明をその範囲を限定することなしに例証する。

【図面の簡単な説明】

10

【0093】

【図1】Luminex(登録商標)ビーズ上の抗体の直接的固定化を示すスキームである。

【図2】Luminex(登録商標)ビーズ上の、親和性による、ビーズ上の抗体の固定化を示すスキームである。

【図3】蛍光膜内化合物での種々の表現型の赤血球の標識を示すスキームである。

【図4】ポリ-L-リジンによりLuminex(登録商標)ビーズ上に赤血球を固定化するための手順を示すスキームである。

【図5a】赤血球の多重化表現型決定(multiplexed phenotyping)を示す。

【図5b】赤血球の多重化表現型決定を示す。

20

【図5c】赤血球の多重化表現型決定を示す。

【図5d】赤血球の多重化表現型決定を示す。

【図6】「直接クームス陽性」患者由来の赤血球の同時同定および多重化表現型決定を示すスキームである。

【図7】抗D抗体の多重検出を示すスキームである。

【図8】抗D抗体の多重較正を示すグラフである。

【図9】Centre de Reference pour les Groupes Sanguins(CNRGS)[Blood Group Reference Centre]からの参照血清中の抗D抗体の単純較正を示すグラフである。

【図10】抗Dおよび抗Fya抗体の多重検出を示すスキームである。

【図11】血液細胞ペレットまたは全血型の試料に対する多重型決定を示すスキームである。

30

【0094】

実施例:

実施例1:表現型決定および型決定

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

【0095】

本発明の技術を用いて赤血球を表現型決定/型決定することの可能性を実証するために、蛍光ビーズを使用して、抗赤血球抗体を固定化する。このようにして、異なる抗原特異性の抗体を、異なる色を有するビーズの種々の領域に結合させることができる。

40

【0096】

赤血球については、それを、企業Bio-Radによって「Bioplex 200」の名称の下に販売されている装置のレポーターレーザーの波長に適合する蛍光化合物で標識する。

【0097】

標識後、赤血球を、感受性化したビーズとともにインキュベートする。このようにして、ビーズに結合した赤血球を検出し、従ってその抗原特異性を決定することが可能である。

【0098】

50

1.1 材料および試薬

- ビーズ：

使用するビーズはLuminex (Luminex Corp., Austin Texas, United States) によって製造されている。それは、ポリスチレンおよびメタクリル酸 (COOH官能基) から構成される、直径8 μmの超常磁性ビーズである。

この実施例において、種々のビーズ領域19、21、32、34 (内部標準ビーズ (ISB))、71および98 (ブランクビーズ (BB)) を有する蛍光超常磁性ビーズを使用する。

ビーズ領域34を有するビーズ (ISB) にローダミン誘導体で官能性付与し、そしてそれを内部蛍光対照として使用する。このビーズは5000 ~ 15000 RFIの蛍光値を生じるはずである。

領域98 BBビーズをウシアルブミンを用いて飽和させる。このビーズは、抗原にも抗体にも結合することができず、それゆえ非特異的結合の非存在を確認するために使用される。このビーズは1000 RFI未満の蛍光値を生じるはずである。

- 抗ヒト免疫グロブリンモノクローナルIgG抗体、クローン125A15 (Bio-Rad)。

- 抗ヒトIgM (μ) ポリクローナル抗体 (Bio-Rad)。

- 抗DIGG (クローンH2D5D2F5)、抗Fya IgG (クローン5T72A13F5A93) および抗SIgM (クローンMS94) モノクローナル抗体 (Bio-Rad, Millipore)。

- PKH26細胞標識キット (Sigma)。

- 企業Bio-Radによって「ScanLiss」コード86442および「Stabiliss」コード86550の名称の下に販売されている希釈媒質。

- 非定型抗体スクリーニング用に「ScanGel Coombs」コード86432の名称の下に販売されているゲルカード (Bio-Rad)。

- 「ScanGel RhK」コード86428および「ScanGel Neutral」コード86430の名称の下に販売されているゲルカード (Bio-Rad)。

- ゲルカード技術による非定型抗体スクリーニング用に「ScanPanel」コード86593および「ScanCell」コード86595の名称の下に販売されている表現型決定された赤血球 (Bio-Rad)。

- SAG-MAN培地中に保存された濃縮され表現型決定された血液細胞ペレット (EFS Nord de France)。

- 患者試料起源の直接クームス陽性および/または陰性赤血球。

- コーティング液または緩衝液 (10 mMリン酸ナトリウム、150 mM NaCl、0.1% (v/v) プロクリン)。

- ウシ血清アルブミン (BSA) (Millipore)。

- PBS緩衝液、pH 7.4 (7 mMリン酸ナトリウム、2.7 mM KCl、136 mM NaCl)。

【0099】

1.2 プロトコル

1.2.1 血液型抗体でのビーズの感受性化

ビーズの表面での抗体の固定化を2つの異なる原理に従って行うことができる。第1の場合、抗体をビーズ上に直接的に共有結合によって固定化する (図1)。第2のアプローチは、親和性によって、非共有結合的に抗赤血球抗体の固定化を行うことにある。この場合、結合は、第1工程においてビーズに共有結合により結合された抗免疫グロブリン抗体により行われる (図2)。このアプローチを、示す実施例において選択した。

【0100】

ビーズ領域19、21および32を有するビーズを、抗ヒト免疫グロブリンの共有結合固定化のために使用した。ビーズ領域71を有する蛍光ビーズを、抗ヒトIgMの共有結合固定化のために使用した。ビーズの表面に存在するカルボキシル基を、ヒドロキシル基を、

10

20

30

40

50

シンイミドおよびカルボジイミドを含む技術に従って活性化した。このようにして、タンパク質をそのアミン基を介して固定化することができた。

【0101】

このようにして調製したビーズを、+4 で、10% (w/v) のBSA、0.5% (v/v) のTween 20および0.09% (w/v) のアジ化ナトリウムを含むPBS、pH 7.4中3mg/mlの濃度で貯蔵する。

【0102】

固定化抗ヒト免疫グロブリンを保有するビーズを、抗DIGまたは抗Fya IgG血液型抗体で感受性化することができる。抗免疫グロブリンは、事実、IgGがそのFcフラグメントを介して結合することを可能にする。それゆえ、血液型抗体を、この原理を使用してビーズ上に非共有結合的に固定化する。各々のビーズ領域を、異なる特異性の抗体で感受性化する。選択される抗免疫グロブリンは、ヒト免疫グロブリンに対する高親和性を有し、従ってこの結合を長時間安定にする。

10

【0103】

非精製抗Dおよび抗Fyaを、それぞれ最終濃度30および10μg/mlで、80μg/mgの抗Fcで官能性付与されたビーズとともに使用する。

【0104】

血液型抗体での感受性化を、PBS、pH 7.4中攪拌しながら37 で1時間行う。

【0105】

感受性化後、ビーズを数回すすぎ、次いで+4 でPBS、pH 7.4中で貯蔵する。

20

【0106】

固定化抗μを保有するビーズを抗SIgMで感受性化することができる。抗μは、事実、IgMの結合を可能にする。この抗μポリクローナル血清の親和性は、長時間安定な結合を確実にするために十分である。非精製抗Sを40μg/mgの抗μで官能性付与されたビーズ上に固定化する。感受性化を、PBS、pH 7.4中攪拌しながら37 で1時間行う。感受性化後、ビーズを数回すすぎ、次いで+4 でPBS、pH 7.4中で貯蔵する。

【0107】

赤血球とのインキュベーション(試験自体)の前に、血液型抗体で感受性化したビーズを、対照領域34ビーズ(ISB)および対照領域98ビーズ(BB)と混合する。

30

【0108】

1.2.2. 赤血球の標識

蛍光化合物での赤血球の標識を、種々の原理を使用して行うことができる。示す実施例において、赤血球をPKH26(これは赤血球膜中に挿入されるフルオロフォアである)を使用して標識する。このようにして、種々の表現型の赤血球を、同一のプロトコルに従って標識することができる(図3)。

【0109】

PKH26は企業Sigmaによって販売されている蛍光プローブである。このプローブは、551nmに最大励起を、そして567nmに最大発光を有する。

【0110】

キットは、蛍光標識(これは長い脂肪族鎖を有し、それが細胞膜の脂質層中に組み込まれることを可能にする)を含み、そして塩、緩衝液または有機溶媒を含まない等張水性希釈剤も含む。この希釈剤は、細胞生存率、標識溶解性および標識効率を高レベルに維持することを可能にする。PKH26での赤血球の標識を、製造業者によって推奨されるプロトコルを使用して行う。このようにして標識した赤血球を、Stabilis緩衝液中で希釈し、そして暗所で+4 で貯蔵する。

40

【0111】

標識赤血球の品質、生存率および安定性を、ゲル技術に従って表現型決定アッセイを行うことによって経時的に確認する。標識赤血球の抗原性完全性を、非標識赤血球のものと比較する。蛍光標識の品質および安定性は、それらに関する限り、Bio-Radからの「Bi

50

o p l e x 2 0 0」装置を使用して蛍光測定を行うことによって研究される。

【 0 1 1 2 】

1 . 2 . 3 . 血液型抗体 - ビーズおよび赤血球のインキュベーション

本発明による技術に従う型決定の実行可能性を実証し、そしてその特異性を確認するために、本発明者らは単体 (unitary) 様式で反応を行った。この場合、血液型抗体で官能性付与されたビーズを、種々の表現型の赤血球とともに個別にインキュベートする。

【 0 1 1 3 】

多重化反応の場合、異なる血液試料を異なるビーズ領域を有するビーズと個別に接触させ、そして異なる特異性の抗体で感受性化する。この型の実験は、同じ試験試料中でいくつかの抗原性血液型特異性を検出することの可能性を確認することを可能にした。

10

【 0 1 1 4 】

感受性化したビーズを、赤血球と、約 5 0 ~ 1 5 0 の赤血球 / ビーズ比率が得られるように混合する。混合物を、1 5 分間攪拌しながら 3 7 でインキュベートする。

【 0 1 1 5 】

インキュベーション後、ビーズ - 赤血球複合体を数回蒸留水で洗浄する。

【 0 1 1 6 】

1 . 2 . 4 . 企業Bio-Radからの「B i o p l e x 2 0 0」自動化デバイスを使用したフローサイトメトリーによる測定

最終洗浄の後、測定の前に、複合体を 1 8 5 μ l の「コーティング液」媒質で希釈する。各々の試験について、2 5 μ l の懸濁液を自動的に装置中に注入する。領域当たり 2 5 0 ビーズの捕獲によって測定を行う。

20

【 0 1 1 7 】

各々の型決定 / 表現型決定シリーズについて、研究する反応の特異性を確認するために、系統的な対照を行う。

【 0 1 1 8 】

1 . 3 . 単純 / 多重表現型決定 / 型決定実施例

この一連の試験の目的は、単体および / または多重化様式での赤血球の表現型決定 / 型決定の実行可能性を実証することである。D、F y a および S 抗原をモデルとして選択する。抗ヒト免疫グロブリンまたは抗 μ 鎖抗体で感受性化したビーズを使用して、抗 D、抗 F y a および抗 S 抗体を固定化する。

30

【 0 1 1 9 】

1 . 3 . 1 . R H D 陽性赤血球の単体表現型決定

抗 D 抗体で感受性化したビーズを、P K H 2 6 で標識した R h D 陽性および R h D 陰性赤血球とともに、1 5 0 の赤血球数 / ビーズ数比率を使用してインキュベートした。

【 0 1 2 0 】

2 つの R H D 陽性赤血球および 2 つの R H D 陰性赤血球を使用した。各々の試料を装置中に二連で注入した。

【 0 1 2 1 】

R H D 陽性赤血球は 2 1 0 0 0 ~ 2 5 0 0 0 R F I のオーダーの強く陽性のシグナルを生じ、一方、R H D 陰性赤血球は 4 0 ~ 4 0 0 R F I の陰性シグナルを示す。

40

【 0 1 2 2 】

6 5 0 0 R F I のオーダーのシグナルを与える I S B 3 4 対照ビーズおよび 1 0 0 0 R F I 未満を与える B B 9 8 対照ビーズにより結果を検証する。行う種々の陰性対照は、1 5 ~ 4 0 0 R F I のシグナルを示し、反応の特異性を確認する。R H D 陽性および R H D 陰性赤血球は、事実、抗 D 抗体の非存在下でビーズに結合しない。

【 0 1 2 3 】

これらの結果は、R H D 陽性および R H D 陰性赤血球を非常に明らかに区別すること、それゆえ赤血球の表面の D 抗原を同定することの可能性を実証する。

【 0 1 2 4 】

F y a および S 赤血球の単体表現型決定を、同じ原理に従って、アイソタイプ G 特異的

50

またはアイソタイプM型特異的抗体を使用して行うことができる。

【0125】

1.3.2. D、F y aおよびS赤血球の多重表現型決定

多重化表現型決定の原理を図5A～5Dにまとめる。

【0126】

この場合、抗D抗体で感受性化した領域19ビーズを、抗F y a抗体で感受性化した領域21ビーズと、そしてまた抗S抗体で感受性化した領域71ビーズと混合した。

【0127】

このビーズの混合物を、異なるD、F y aおよびS表現型を有する赤血球とともにインキュベートした：D + F y a + S + / D + F y a - S - / D - F y a + S - / D - F y a - S - / D - F y a - S + / D - F y a + S + / D + F y a - S + / D + F y a + S - 。50の赤血球数/ビーズ数比率を使用した。

【0128】

所定の抗体で感受性化したビーズが対応する抗原特異性を有する赤血球に結合したときに、13000～29000RFIの陽性シグナルが得られる。

【0129】

完全な相関が、測定される蛍光シグナルと、試験を行うために使用される赤血球の表現型との間に観察される。

【0130】

抗体で感受性化したビーズを、対応する抗原を保有しない赤血球と接触させたときに、1000RFI未満のシグナルが得られる。

【0131】

さらに、抗体感受性化していないビーズを用いて行う対照は、使用する赤血球にかかわらず、陰性シグナルを生じる。

【0132】

これらの結果は、測定されるシグナルが特異的であること：抗原-抗体対が関与するときのみビーズ-赤血球結合が起こることを実証する。

【0133】

対照ビーズISB34(11000RFI)およびBB98(1000RFI未満)を用いて得られた結果は、分析を検証する。

【0134】

試験間変動係数は1%～10%であり、これは満足な試験間再現性を実証する。

【0135】

これらの結果は、本発明による技術に従う赤血球の3パラメータ多重化表現型決定の実行可能性を実証する。

【0136】

1.3.3. 直接クームス陽性(CD+)赤血球の多重化表現型決定

マイクロビーズを用いる多重化アプローチの使用は、図6に記載の原理に従って同時にCD+性質を同定し、そして赤血球を表現型決定することを可能にする。

【0137】

抗Fc抗体で感受性化した領域32ビーズを、それぞれ抗D、抗F y aおよび抗S抗体で感受性化した領域19、21および71ビーズと混合する。抗体でインビボで感受性化したCD+赤血球は、領域32ビーズによって保有される抗ヒト免疫グロブリンに結合することができ、それによりCD+特徴を同定することを可能にする。さらに、これらの赤血球はまた、赤血球膜上に存在する特異性に従って、D、F y aおよびS抗原に特異的な抗体を保有する領域19、21および71ビーズに結合することができる。

【0138】

このアプローチを、40のオーダーの赤血球数/ビーズ数比率を使用して実証した。

【0139】

ISB34およびBB98対照ビーズは、予想される、すなわちそれぞれ13000R

10

20

30

40

50

F I および 1 0 0 0 R F I 未満のオーダーのシグナルを生じ、そして結果を検証する。

【 0 1 4 0 】

2つのCD + 赤血球は、抗ヒト免疫グロブリン抗体で感受性化した領域32ビーズを用いて3000RFIより高い陽性シグナルを生じる。2つのCD陰性赤血球は、それらに関する限り、この同じビーズ領域を用いて500RFI未満の陰性シグナルを生じる。これらの結果は、所定のビーズ領域のビーズに予め結合された抗グロブリンを使用してその特異的結合によりCD + 赤血球を同定することの可能性を実証する。

【 0 1 4 1 】

さらに、結果はまた、CD + 赤血球の赤血球抗原の多重化表現型決定を、CD + 性質の同定と同時にを行うことができることを実証する。事実、CD + 赤血球の一方はD + F y a - S - と、そして他方はD + F y a + S + と表現型決定される。

10

【 0 1 4 2 】

これら2つの試料のS表現型を、従来技術に従って、IgM型の抗S抗体を使用して確認した。得られた結果は、新たな技術に従って得られたものと完全に相関する。

【 0 1 4 3 】

他方、抗F y a表現型に関しては、この同じ分析を行うことができなかった。事実、赤血球を表現型決定するためのIgM型の試薬は存在しない。

【 0 1 4 4 】

しかし、分析したCD + 赤血球に従ってF y a表現型について差異が観察され、これは結果を検証し、そして非特異的結合の現象を排除することを可能にする。

20

【 0 1 4 5 】

変動係数は大部分の試料について1% ~ 5%であり、これは満足な試験間再現性を示す。

【 0 1 4 6 】

実施例2：非定型抗体スクリーニング - 単体および多重化方法

非定型抗体スクリーニング(AAS)は、一般に、最も高感度な方法に従って行われる(「Diamed ID」の名称の下に企業Diamedによって販売されている、「Scan Gel」範囲の企業Bio-Radによって販売されているゲルを通したる過、または、企業Immucoorによって販売されているCapture(登録商標)範囲のマイクロプレートフォーマットの免疫接着方法による)。最初の2つの場合、それは、その表現型が既知である赤血球を使用し、そしてこの赤血球は検討しようとする血清または血漿試料とインキュベートされる。存在する可能性のある特異的抗体は、赤血球の表面に結合する。それらは、続いて、抗ヒト免疫グロブリン抗体を含む試薬を使用して明らかにされる。陽性反応の場合、赤血球凝集物が形成される。反応が陰性である場合、赤血球は遊離しており、そして凝集物は形成されない。次いで、種々の抗原を有するかまたは有さない赤血球のパネルを使用することによって、試料中に存在する抗体の特異性を決定することが可能である。

30

【 0 1 4 7 】

この一連の試験の目的は、フローサイトメトリーを使用して、本発明による技術に従って、IgG型の血液型抗体の検出を行うために、表現型決定された赤血球がポリ-L-リジン(PLL)を介してその上に固定化されたビーズを使用することである。

40

【 0 1 4 8 】

フィコエリトリン(PE)標識抗Fc抗体コンジュゲートを使用して、結合している非定型抗体を検出する。

【 0 1 4 9 】

2.1 - 材料および試薬

- ビーズ領域17、21、32、および36を有する蛍光超常磁性ビーズ
ビーズを+4でPBS緩衝液、pH7.4中で貯蔵する。

領域34(内部標準ビーズ(ISB))および領域98(ブランクビーズ(BB))対照蛍光ビーズ。

分子量70000 ~ 130000のポリ-L-リジン(PLL)。

50

- PE当量当たり2抗体当量の比率でフィコエリトリン(PE)に結合された、抗ヒト免疫グロブリンモノクローナルIgG抗体、クローン125A15(Bio-Rad)。
- 抗D(クローンH2D5D2F5)および抗Fya(クローン5T72A13F5A93)モノクローナルIgG抗体(Bio-Rad)。
- 抗RH1 National Standard(Centre de Reference pour les Groupes Sanguins [Blood Group Reference Centre], France)。
- 非定型抗体スクリーニングの用に「ScanCell1」および「ScanPanel1」の名称の下に販売されている表現型決定された赤血球(Bio-Rad)。
- コーティング液または緩衝液(10mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、0.1%(v/v)プロクリン)。
- ウシ血清アルブミン(BSA)(Millipore)。
- PBS緩衝液、pH7.4(7mMリン酸ナトリウム、2.7mM KCl、136mM NaCl)。

10

【0150】

2.2 - プロトコル

2.2.1. PLLでのビーズの感受性化

領域17、21、32および36中性ビーズを、18時間周囲温度で攪拌しながらPBS、pH7.4中25 μ g/mlのPLLとともにインキュベートする。この工程の終わりに、ビーズをPBS、pH7.4中で洗浄し、次いで赤血球を固定化するために使用する。

20

【0151】

2.2.2. ビーズ上での赤血球の固定化

ビーズ-赤血球試薬を、100に等しい赤血球数/ビーズ数比率でPLLコートビーズと赤血球とを混合することによって調製する。インキュベーションを、PBS、pH7.4中で攪拌しながら5分間周囲温度で行う。各々のビーズ領域を使用して、既知のそして異なる表現型の赤血球の単一の型を固定化する。この工程の終わりに、ビーズ-PLL-赤血球試薬を、PBS、pH7.4で、次いで蒸留水で洗浄する。このようにして調製したビーズ-赤血球試薬を、PBS、pH7.4中+4で貯蔵する。

【0152】

PLLによるビーズ上での赤血球の固定化の原理を図4にまとめる。

30

【0153】

PLLによる赤血球の結合は、試験および分析の間にそれらが剥離しないようにするために十分に堅固である。

【0154】

スクリーニングされる抗体とのインキュベーションの前に、ビーズ-PLL-赤血球試薬を、領域34(ISB)および領域98(BB)対照ビーズと混合する。

【0155】

2.2.3. ビーズ-PLL-赤血球試薬の抗体との反応

単体反応の場合、反応の特異性を確認するために、ビーズ-赤血球試薬を個別に使用し、そして異なる抗体とともにインキュベートする。

40

【0156】

多重化反応を行うために、既知の表現型の種々の赤血球で感受性化したビーズを混合し、次いで検出しようとする抗体(単数または複数)とともにインキュベートする。

【0157】

測定しようとする抗体を、ビーズ-PLL-赤血球試薬とのインキュベーションの前に、タンパク質リッチ緩衝液(0.15M NaCl、60g/l BSA)中またはPBS緩衝液、pH7.4中のいずれかで希釈する。

【0158】

全ての場合に、125 μ lのビーズ-PLL-赤血球試薬を125 μ lの抗体と混合し、次いで60分間攪拌しながら37でインキュベートする。

50

【 0 1 5 9 】

インキュベーション後、複合体を数回洗浄する。

【 0 1 6 0 】

2 . 2 . 4 . P E 標識抗 F c を使用した複合体の顕現

ビーズ - P L L - 赤血球 - 抗体複合体を検出するために、P E で標識された、ヒト免疫グロブリンの F c フラグメントに特異的な抗体を使用する。この抗体コンジュゲートを P B S、p H 7 . 4 中 6 0 μ g / m l の濃度で使用し、そして 1 5 分間 3 7 ° C で攪拌しながら複合体とともにインキュベートする。次いで、複合体を蒸留水で洗浄する。

【 0 1 6 1 】

2 . 2 . 5 . 測定

最終洗浄の後、測定の前に、複合体を 1 8 5 μ l のコーティング液を用いて取る。各々の試験について、2 5 μ l の懸濁液を装置中に注入する。領域当たり 2 5 0 ビーズの捕獲によって測定を行う。

10

【 0 1 6 2 】

各シリーズについて、研究する反応の特異性を確認するために、体系的対照を行う。試験した各々の抗体について、陰性対象を、対応する抗原特異性を保有しない表現型決定された赤血球を使用して行う。

【 0 1 6 3 】

2 . 3 - 単純 / 多重 A A S 実施例

2 . 3 . 1 . タンパク質リッチ媒質における抗 D モノクローナル抗体の多重化検出

抗体を、既知の表現型の赤血球で感受性化した、種々のビーズ領域のビーズの混合物を使用して検出した。

20

【 0 1 6 4 】

P L L でコートした領域 1 7 ビーズを使用して、D、C C、e e に表現型決定された赤血球を固定化した。表現型 D、c c、E E の赤血球を領域 3 2 ビーズ上に固定化し、そして表現型 d、c c、e e の赤血球を領域 3 6 ビーズ上に固定化した。

【 0 1 6 5 】

D 陰性赤血球でコートした領域 3 6 ビーズを、反応の特異性を確認するために、陰性対象として使用した。

【 0 1 6 6 】

感受性化したビーズを混合し、次いで 0 . 1 5 M N a C l 緩衝液、6 0 g / l B S A 中種々の濃度で調製した抗 D モノクローナル抗体とともにインキュベートした。検出を、P E 標識抗 F c コンジュゲートを用いて行った。

30

【 0 1 6 7 】

このアプローチの原理を図 7 にまとめる。

【 0 1 6 8 】

結果を図 8 に与える。

【 0 1 6 9 】

D 抗原を有さない赤血球 (ビーズ 3 6) に関する応答が、陰性応答に対応する 1 0 0 0 R F I 以下の値を示すことが観察される。他方、D 抗原を有する赤血球を支持するビーズ (ビーズ 3 2 および 1 7) については、得られた値はずっと高い (2 0 0 0 ~ 7 0 0 0 R F I 超のオーダー)。さらに、陽性シグナルは、関与する抗 D 抗体の濃度に相関し、このフォーマットによる検出限界は約 5 n g / m l である。

40

【 0 1 7 0 】

同じ濃度の抗 D 抗体について、陽性における変動が、ビーズの表面に結合した赤血球の表現型に従って示されうる。この現象は免疫血液学において公知であり、そして D 抗原の抗原発現における差に関連する。

【 0 1 7 1 】

これらの結果は、考慮中の多重フォーマットを用いて行われる検出の特異性を実証する。

50

【0172】

さらに、領域34および98対照ビーズは、予想される、すなわち、それぞれ11000RFIおよび1000RFI未満のオーダーのシグナルレベルを与える。

【0173】

2.3.2. 参照血清における参照抗Dポリクローナル抗体の単体検出

CNRGS [National Blood Group Reference Centre] 抗D national reference standardを使用して、血漿に似せたタンパク質リッチ媒質中の抗D抗体の単体検出を行った。

【0174】

表現型D、cc、EEの赤血球を領域32ビーズ上に固定化した。領域21ビーズ上に固定化した表現型d、cc、eeの赤血球を使用して、陰性対象を別々に行った。標準品を、60g/lのBSAを含む0.15M NaCl緩衝液中で希釈した。

【0175】

図9に与える結果は、参照抗体を、RH D表現型の赤血球の存在下で1ng/ml未満の濃度で検出することができることを示す。ダイナミックレンジは少なくとも100ng/mlまで直線的に及び、RH D陰性赤血球を保有するビーズの存在下で得られた結果は650RFI未満である。対照ビーズ(ISBおよびBB)についての値は、観察された結果を検証することを可能にする。

【0176】

2.3.3. いくつかのモノクローナル血液型抗体の多重化検出

この場合、領域17ビーズを表現型D、CC、ee、Fya-b+の赤血球で感受性化し、領域32ビーズを表現型dd、cc、ee、Fya+b-の赤血球で感受性化し、そして領域21ビーズを表現型D、cc、EE、Fya-b+の赤血球で感受性化した。

【0177】

3つの型のビーズを、別々にまたは混合物として使用した抗Dおよび抗Fyaモノクローナル抗体と混合し次いでインキュベートした。全ての工程をPBS、pH7.4中で行った。このアプローチの原理を図10に与える。

【0178】

領域34および98内部対照ビーズは、予想される、すなわちそれぞれ11000RFIおよび1000RFI未満のオーダーのシグナルレベルを生じる。完全な相関が、ビーズの感受性化の間に使用した赤血球の表現型と反応混合物中に存在する抗体との間で観察される。このように、6000~25000RFIのオーダーの陽性シグナルが、抗Dおよび抗Fya抗体を対応する抗原を保有する赤血球の存在下でインキュベートした場合に観察される。対応する抗原を保有しない赤血球との抗体のインキュベーションは、1000RFI未満の陰性シグナルを生じる。反応は特異的である。

【0179】

これらの結果は、同じ試料中に存在するいくつかの抗体の多重化検出を行うために考慮したアプローチの有効性を実証する。

【0180】

実施例3：クロスマッチ

この分析の目的は、ドナーからの1つ以上の血液細胞濃縮物のレシピエントへの輸血に関して、完全なドナー-レシピエント適合性が存在することを確実にすること、および、適切な場合、ドナーの赤血球によって保有される血液型構造に対する、レシピエントの血漿中の抗体の存在に結び付けられる不適合性を実証することである。

【0181】

本発明の技術においてクロスマッチを行うことの可能性を実証するために、蛍光ビーズを使用して、ポリ-L-リジン(PLL)を介してドナーの赤血球を固定化する。この固定化を、最小量の時間(5分間)、即時に、ビーズとドナーの赤血球との間の単純な接触によって行う。

【0182】

10

20

30

40

50

次いで、これらのビーズをレシピエントの血漿または血清の存在下に置く。ドナーの抗原に対するレシピエントからの抗体の可能な存在を、フィコエリトリン (P E) で標識された抗 F c 抗体コンジュゲートによって検出する。

【 0 1 8 3 】

3 . 1 . 材料および試薬

- ビーズ領域 3 8 を有する蛍光超常磁性ビーズ

ビーズを + 4 で P B S 緩衝液、 p H 7 . 4 中で貯蔵する。

領域 3 4 (内部標準ビーズ (I S B)) および領域 9 8 (ブランクビーズ (B B)) 対照蛍光ビーズ。

- 分子量 7 0 0 0 0 ~ 1 3 0 0 0 0 のポリ - L - リジン (P L L)。 10

- P E 当量当たり 2 抗体当量の比率でフィコエリトリン (P E) に結合された、抗ヒト I g G マウス I g G モノクローナル抗体、クローン 1 2 5 A 1 5 (Bio-Rad)

- S A G - M A N 培地 (EFS Nord de France) 中で保存された表現型決定された血液細胞濃縮物。

- 企業 Bio-Rad によって「 S c a n L i s s 」コード 8 6 4 4 2 の名称の下に販売されている希釈媒質

- コーティング液または緩衝液 (1 0 m M リン酸ナトリウム、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 1 % (v / v) プロクリン)。

- ウシ血清アルブミン (B S A) (Millipore)。

- P B S 緩衝液、 p H 7 . 4 (7 m M リン酸ナトリウム、 2 . 7 m M K C l 、 1 3 6 m M N a C l)。 20

【 0 1 8 4 】

3 . 2 . プロトコル

3 . 2 . 1 . P L L でのビーズの感受性化

ビーズ - P L L 試薬を、 1 8 時間周囲温度で攪拌しながら P B S 、 p H 7 . 4 中 5 0 μ g / m l の P L L とともに領域 3 8 中性ビーズをインキュベートすることによって調製する。この工程の終りに、ビーズ - P L L 試薬を P B S 緩衝液、 p H 7 . 4 で洗浄し、次いでドナー赤血球を固定化するために使用する。

【 0 1 8 5 】

3 . 2 . 2 . ビーズ上でのドナー赤血球の即時固定化 30

ビーズ - P L L 試薬を、各々が別々に処置されている種々のドナーの赤血球と接触させる。

【 0 1 8 6 】

2 5 μ l のビーズ - P L L 試薬を、 1 0 0 に等しいビーズ数に対する赤血球数の比率で、 S c a n L i s s 中で希釈したドナー赤血球 2 5 μ l と混合する。インキュベーションを攪拌しながら 5 分間周囲温度で行う。

【 0 1 8 7 】

インキュベーション後、ビーズ - P L L - 赤血球複合体を蒸留水で数回洗浄し、次いで 2 5 μ l の P B S - B S A 1 0 g / l 、 p H 7 . 4 中に取り。 40

【 0 1 8 8 】

P L L によるビーズ上での赤血球の固定化の原理を図 4 にまとめる。

【 0 1 8 9 】

P L L による赤血球の結合は、試験および分析の間にそれらが剥離することを防止するために十分に堅固である。

【 0 1 9 0 】

次いで、このようにして調製したビーズ - P L L - 赤血球複合体ならびに領域 3 4 および領域 9 8 対照ビーズを、試験しようとする試料とともにインキュベートする。

【 0 1 9 1 】

3 . 2 . 3 . ビーズ - P L L - 赤血球複合体の抗体との反応

2 5 μ l のビーズ - P L L - 赤血球複合体を、試験しようとする患者の血漿または血清 50

50 μ l と混合し、そして15分間攪拌しながら37 でインキュベートする。インキュベーション後、複合体をPBS緩衝液、pH7.4で数回洗浄する。

【0192】

3.2.4. PE 標識抗Fcとの複合体の可視化

ビーズ-PLL-赤血球-抗体複合体を検出するために、ヒト免疫グロブリンFcフラグメントに特異的なPE標識抗体を使用する。この抗体コンジュゲートをPBS、pH7.4中5 μ g/mlの濃度で使用し、そして15分間37 で攪拌しながら複合体とともにインキュベートする。次いで、複合体をPBS緩衝液、pH7.4で数回洗浄する。

【0193】

3.2.5. 企業Bio-Radからの「Bioplex 200」装置を使用したフローサイトメトリー測定

10

最終洗浄の後、測定の前に、複合体を35 μ lのコーティング液を用いて取る。各々の試験について、25 μ lの懸濁液を装置中に注入する。領域当たり250ビーズの捕獲によって測定を行う。

【0194】

種々のドナー赤血球を使用した。研究する反応の特異性を確認するために、各々のドナー赤血球について、陰性対象を試験した。

【0195】

3.3. クロスマッチ実施例

PLLでコートした領域38ビーズを使用して、3つの異なるドナーからの赤血球を固定化した：表現型D、cc、kk、SSの1つのドナー、表現型dd、CC、kkの1つのドナー、および表現型dd、cc、K⁺、ssの1つのドナー。各々のドナー-レシピエント対を別々に試験した。

20

【0196】

感受性化したビーズを、抗D、抗c、抗Kまたは抗S反応を示すことが知られている種々の血清とともにインキュベートした。これらの血清は、選択したドナー赤血球と不適合性のクロスマッチを潜在的に示しうるレシピエントからの血清を代表する。これらの血清を、構造および抗原提示の点から、そしてまた赤血球上の抗原密度の点から異なる血液抗原方式と反応するように選択した。

【0197】

反応の特異性を確認するために、12個のドナー血漿もまた試験し、そして陰性対象として使用した。

30

【0198】

検出を、PE標識抗Fcコンジュゲートを用いて行った。

【0199】

結果を以下の表Iに与える。

【0200】

【表 1】

表 I: クロスマッチ

レシピエント血漿／血清	ドナー赤血球	予想結果	観察結果	輸血の危険
抗 D 血清 No. 42	Donor 0R2R2 (D)	+	+	不適合
	Donor 0rr (dd)	-	-	適合
抗 c 血清 No. 62	Donor 0R2R2 (cc)	+	+	不適合
	Donor 0R1R1 (CC)	-	-	適合
	Donor 0rr (cc)	+	+	不適合
抗 K 血清 No. 70	Donor 0R2R2 (kk)	-	-	適合
	Donor 0R1R1 (kk)	-	-	適合
	Donor 0rr (K+)	+	+	不適合
抗 S 血清 No. 54	Donor 0R2R2 (SS)	+	+	不適合
	Donor 0rr (ss)	-	-	適合

10

20

【 0 2 0 1 】

1 2 個のドナー血漿は、1 1 0 0 R F I 未満の平均陰性値を規定することを可能にする。

【 0 2 0 2 】

ドナー赤血球との不適合性を示さない血清は、1 0 0 0 R F I 未満の値および 1 に近い試料値 / 平均陰性値比率を生じる。

30

【 0 2 0 3 】

他方、ドナー赤血球と不適合性を示す血清は、3 0 0 0 ~ 2 7 0 0 0 R F I のオーダーの結果および 3 ~ 2 7 のオーダーの試料値 / 平均陰性値比率を与える。

【 0 2 0 4 】

さらに、領域 3 4 および 9 8 対照ビーズは、予想される、すなわちそれぞれ 8 0 0 0 R F I および 1 0 0 0 R F I 未満のオーダーのシグナルレベルを与える。

【 0 2 0 5 】

この方法は、R h e s u s、K e l l または M N S 式ほど異なる血液方式において、ドナー / レシピエント不適合性を明らかに実証することを可能にする。

40

【 0 2 0 6 】

実施例 4 : 裏 (「血清」または「Simonin」) A B O 型決定試験

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抗体の有無を示すことである。この分析の結果は、直接試験において得られる結果との組み合わせで、試料の A B O 型を確立することを可能にする。裏 A B O 型決定試験において使用する試料は、血清、血漿、または全血試料でありうる。

【 0 2 0 7 】

本発明の技術の範囲内のこの適用を行うことの可能性を実証するために、蛍光ビーズを使用して、ポリ-L-リジン (P L L) を介して既知の A B O 型の赤血球を固定化する。

【 0 2 0 8 】

50

次いで、これらのビーズを試験しようとする試料と接触させる。抗体の存在を、フィコエリトリン (P E) で標識された抗ヒト免疫グロブリン抗体コンジュゲートを使用して検出する。

【 0 2 0 9 】

4 . 1 . 材料および試薬

- ビーズ領域 3 8 および 7 1 を有する蛍光超常磁性ビーズ
ビーズを + 4 で P B S 緩衝液、 p H 7 . 4 中で貯蔵する。
領域 3 4 (内部標準ビーズ (I S B)) および領域 9 8 (ブランクビーズ (B B)) 対照蛍光ビーズ。
- 分子量 7 0 0 0 0 ~ 1 3 0 0 0 0 のポリ - L - リジン (P L L)。 10
- フィコエリトリン (P E) に結合された、抗ヒト I g M ヤギポリクローナル抗体、 7 3 7 4 V (Bio-Rad)。
- E D T A に取られた試料からの A 型および B 型赤血球 (EFS-Rungis)。
- E D T A に取られた試料からの血漿および全血試料 (EFS-Rungis)。
- 企業 Bio-Rad によって「 S c a n L i s s 」コード 8 6 4 4 2 の名称の下に販売されている希釈媒質。
- コーティング液または緩衝液 (1 0 m M リン酸ナトリウム、 1 5 0 m M N a C l 、 0 . 1 % (v / v) プロクリン)。
- ウシ血清アルブミン (B S A) (Millipore)。
- P B S 緩衝液、 p H 7 . 4 (7 m M リン酸ナトリウム、 2 . 7 m M K C l 、 1 3 6 20 m M N a C l)。

【 0 2 1 0 】

4 . 2 . プロトコル

4 . 2 . 1 . P L L でのビーズの感受性化

領域 3 8 および領域 7 1 中性ビーズを、 1 8 時間周囲温度で攪拌しながら P B S 、 p H 7 . 4 中 5 0 μ g / m l の P L L とともにインキュベートする。この工程の終りに、ビーズを P B S 緩衝液、 p H 7 . 4 で洗浄し、次いで赤血球を固定化するために使用する。

【 0 2 1 1 】

4 . 2 . 2 . ビーズ上での試料からの赤血球の固定化

ビーズ - 赤血球試薬を、 1 0 0 に等しいビーズ数に対する赤血球数の比率で、 P L L コートビーズと S c a n L i s s 中で希釈した赤血球とを混合することによって調製する。インキュベーションを、攪拌しながら 5 分間周囲温度で行う。各々のビーズ領域を使用して、既知の型の赤血球の単一の型を固定化する。この工程の終りに、ビーズ - P L L - 赤血球試薬を蒸留水で数回洗浄する。このようにして調製したビーズ - 赤血球試薬を、 P B S - B S A 1 0 g / l 、 p H 7 . 4 中 + 4 で貯蔵する。

【 0 2 1 2 】

P L L によるビーズ上での赤血球の固定化の原理を図 4 にまとめる。

【 0 2 1 3 】

P L L による赤血球の結合は、試験および分析の間にそれらが剥離することを防止するために十分に堅固である。

【 0 2 1 4 】

スクリーニングされる抗体とのインキュベーションの前に、ビーズ - P L L - 赤血球試薬を領域 3 4 (I S B) および領域 9 8 (B B) 対照ビーズと混合する。

【 0 2 1 5 】

4 . 2 . 3 . ビーズ - P L L - 赤血球試薬の抗体との反応

試験しようとする試料は、この場合、血漿または全血のいずれかである。

【 0 2 1 6 】

2 5 μ l のビーズ - P L L - 赤血球試薬を、試験しようとする試料 5 0 μ l と混合し、そして 1 5 分間攪拌しながら 2 2 でインキュベートする。

【 0 2 1 7 】

インキュベーション後、複合体をPBS緩衝液、pH7.4で数回洗浄する。

【0218】

4.2.4. PE標識抗免疫グロブリンを使用した複合体の可視化

ビーズ-PLL-赤血球-抗体複合体を検出するために、ヒト免疫グロブリンに特異的なPE標識抗体を使用する。この抗体コンジュゲートを、PBS、pH7.4中5µg/mlの濃度で使用し、そして15分間37で攪拌しながら複合体とともにインキュベートする。次いで、複合体をPBS緩衝液、pH7.4で数回洗浄する。

【0219】

4.2.5. 企業Bio-Radからの「Bioplex 200」装置を使用したフローサイトメトリー測定

最終洗浄の後、測定の前に、複合体を35µlのコーティング液を用いて取る。各々の試験について、25µlの懸濁液を装置中に注入する。

【0220】

領域当たり250ビーズの捕獲によって測定を行う。

【0221】

既知の型の種々の赤血球を使用した。研究する反応の特異性を確認するために、各々の赤血球について、陰性対象を試験した。

【0222】

4.3. 血漿または全血型の試料における血清ABO型決定試験の実施例

抗体を、既知のそして異なる型の赤血球で感受性化した異なる領域のいくつかのビーズを使用して検出した。PLLでコートした領域38ビーズを使用して、A型赤血球を固定化した。PLLでコートした領域71ビーズを使用して、B型赤血球を固定化した。

【0223】

陽性の場合および陰性の場合を試験するために、感受性化したビーズを、A、B、ABおよびO型の血漿または全血型の試料と混合し、次いでインキュベートした；陰性の場合、各々のビーズ-PLL-赤血球試薬についての反応の特異性を確認することを可能にする。検出を、PE標識抗ヒト免疫グロブリンコンジュゲートを用いて行う。

【0224】

結果を以下の表IIに与える：

【0225】

【表2】

表 II: 血漿又は全血型の試料における血清 ABO 型決定試験

試料		試薬	
		<u>R38/GRA ビーズ</u>	<u>R71/GRB ビーズ</u>
O 型	血漿型	+	+
	全血型	+	+
A 型	血漿型	-	+
	全血型	-	+
B 型	血漿型	+	-
	全血型	+	-
AB 型	血漿型	-	-
	全血型	-	-

【0226】

提示した赤血球（ビーズ - P L L - 赤血球試薬）に対する抗体を有さない試料は、1000RFI未満の値を示す。

【0227】

他方、提示した赤血球に対する抗体を有する試料については、得られた値はずっと高い（2900～19000RFI）。これらの結果は、それが血漿型であろうと全血型であろうと、任意の型の試料について得られる。

【0228】

さらに、領域34および98対照ビーズは、予想される、すなわちそれぞれ8000RFIおよび1000RFI未満のオーダーのシグナルレベルを与える。

【0229】

これらの結果は、血漿または全血型の試料における天然抗体の検出を行うために考慮中のアプローチの有効性を実証する。

【0230】

実施例5：全血の型決定

本発明の技術を用いて赤血球の型決定を行うことの可能性を、実施例1において、抗赤血球抗体を固定化するために蛍光ビーズを使用することによって、そして「Bioplex 200」装置（Bio-Rad）のレポーターレーザーの波長と適合性の蛍光化合物で試料の赤血球を標識することによって実証した。

【0231】

これらの試験の目的は、型決定適用において使用する試料が、血液細胞ペレット試料であり得、全血試料でもありうることを示すことである。

【0232】

5.1 - 材料および試薬

- ビーズ領域36および52を有する蛍光超常磁性ビーズ

ビーズを+4でPBS緩衝液、pH7.4中で貯蔵する。

領域34（内部標準ビーズ（ISB））および領域98（ブランクビーズ（BB））対照蛍光ビーズ。

- 抗マウスIgGヤギポリクローナル抗体、コード115-005-164（Jackson Imm. Lab.）

- 抗マウスIgMヤギポリクローナル抗体、コード115-005-020（Jackson Imm. Lab.）

- 抗BモノクローナルIgG抗体、クローンX9（Bio-Rad）。

- 抗AモノクローナルIgM抗体、クローン15750F7（Bio-Rad）。

- EDTAに取られた血液細胞ペレットおよび全血の試料（EFS-Rungis）。

- PKH26細胞標識キット（Sigma）。

- 企業Bio-Radによって「ScanLiss」コード86442および「Stabiliss」コード86550の名称の下に販売されている希釈媒質。

- コーティング液または緩衝液（10mMリン酸ナトリウム、150mM NaCl、0.1%（v/v）プロクリン）。

- ウシ血清アルブミン（BSA）（Millipore）。

- PBS緩衝液、pH7.4（7mMリン酸ナトリウム、2.7mM KCl、136mM NaCl）。

【0233】

5.2 - プロトコル

5.2.1. 血液型に対する抗体でのビーズの感受性化

ビーズの表面での抗体の固定化の原理を図2にまとめる。

【0234】

領域36ビーズを使用して、抗マウスIgGを共有結合的に固定化した。

【0235】

領域52蛍光ビーズを使用して、抗マウスIgMを共有結合的に固定化した。ビーズの

10

20

30

40

50

表面に存在するカルボキシル基を、ヒドロキスクシンイミドおよびカルボジイミドを含む技術に従って活性化した。

【0236】

このようにして、タンパク質をそれらのアミン基を介して固定化することができた。

【0237】

このようにして調製したビーズを、+4 で、10% (w/v) のBSA、0.5% (v/v) のTween 20および0.09% (w/v) のアジ化ナトリウムを含むPBS、pH 7.4中3mg/mlの濃度で保存する。

【0238】

固定化した抗マウスIgGを保有するビーズを、抗B抗体で感受性化することができる。固定化した抗マウスIgMを保有するビーズを、抗A抗体で感受性化することができる。抗免疫グロブリンは、事実、それらのFcフラグメントを介した免疫グロブリンの結合を可能にする。それゆえ、抗赤血球抗体を、この原理を使用して、非共有結合的にビーズ上に固定化する。各々のビーズ領域を、異なる特異性の抗体で感受性化する。選択される抗免疫グロブリンはマウス免疫グロブリンに対する高い親和性を有し、従って、この結合を長時間にわたり安定にする。

10

【0239】

非精製抗Aおよび非精製抗Bを、それぞれ最終濃度165および640 μg/mlで、40 μg/mgの抗Fcで官能性付与されたビーズとともに使用する。

【0240】

抗赤血球抗体での感受性化を、PBS、pH 7.4中で攪拌しながら37 で1時間行う。

20

【0241】

感受性化後、ビーズをPBS緩衝液、pH 7.4で数回洗浄し、次いで+4 でStabiliss中で貯蔵する。

【0242】

赤血球とのインキュベーションの前に、抗赤血球抗体で感受性化したビーズを、領域34対照ビーズ(ISB)および領域98対照ビーズ(BB)と混合する。

【0243】

5.2.2. 赤血球の標識

30

赤血球の標識を、PKH26を使用して実施例1におけるように行う(図3)。

【0244】

PKH26での赤血球の標識を、製造業者によって推奨されるプロトコルを使用して行う。このようにして標識した赤血球を、血液細胞ペレット試料の場合はStabiliss緩衝液中で直接希釈するか、または全血試料の場合はStabiliss中でそれらを希釈する前にそれらの血漿中で40% (v/v) に希釈するかのいずれかである。希釈した試料を暗所で4 で貯蔵する。

【0245】

5.2.3. 抗赤血球抗体 - ビーズおよび赤血球のインキュベーション

試験しようとする試料は、この場合、血液細胞ペレットまたは全血のいずれかであり、赤血球含量は40%までになる。

40

【0246】

50~100の赤血球数/感受性化ビーズ数比率を得るために、感受性化したビーズを試料と混合する。混合物のインキュベーションを、Stabiliss中15分間攪拌しながら22で行う。

【0247】

インキュベーション後、ビーズ - 赤血球複合体を蒸留水で数回洗浄する。

【0248】

5.2.4. 企業Bio-Radからの「Bioplex 200」装置を使用したフローサイトメトリー測定

50

最終洗浄の後、測定の前に、複合体を35 μlのコーティング液を用いて取る。各々の試験について、25 μlの懸濁液を装置中に注入する。領域当たり250ビーズの捕獲によって測定を行う。

【0249】

研究する反応の特異性を確認するために、各々の感受性化したビーズについて、陰性試料を試験した。

【0250】

5.3 - 血液細胞ペレットまたは全血型の試料に対する多重型決定の実施例

多重化型決定の原理を図11にまとめる。

【0251】

抗B抗体で感受性化した領域36ビーズを、抗A抗体で感受性化した領域52ビーズと、ISB 34対照ビーズと、そしてBB 98対照ビーズと混合した。

【0252】

ビーズのこの混合物を、O、A、BまたはAB型の試料とともに、約50の赤血球数/感受性化ビーズ数比率でインキュベートした。

【0253】

結果を以下の表IIIに与える。

【0254】

【表3】

表 III: 血液細胞ペレット又は全血型の試料に対する多重型決定

試料		多重試薬	
		<u>R52/抗A ビーズ</u>	<u>R36/抗B ビーズ</u>
O型	血液細胞ペレット型	-	-
	全血型	-	-
A型	血液細胞ペレット型	+	-
	全血型	+	-
B型	血液細胞ペレット型	-	+
	全血型	-	+
AB型	血液細胞ペレット型	+	+
	全血型	+	+

【0255】

ビーズ - 抗A 試薬を用いて、A 陽性赤血球は30000RFIより高いシグナルを生じ、一方、A 陰性赤血球は30 ~ 50RFIのシグナルを与える。

【0256】

同様に、ビーズ - 抗B 試薬を用いて、B 陽性赤血球は30000RFIより高いシグナルを生じ、一方、B 陰性B 赤血球は30 ~ 50RFIのシグナルを与える。

【0257】

これらの結果は、血液細胞ペレットの形態であろうと全血の形態であろうと、任意の型の試料について得られる。

10

20

30

40

50

【 0 2 5 8 】

さらに、領域 3 4 および 9 8 対照ビーズは、予想される、すなわちそれぞれ 7 5 0 0 R F I および 1 0 0 0 R F I 未満のオーダーのシグナルレベルを与える。

【 0 2 5 9 】

これらの結果は、血液細胞ペレットまたは全血型の試料における型決定を行うために考慮中のアプローチの有効性を実証する。

【 0 2 6 0 】

実施例 6：非定型抗体のスクリーニングおよび同定 - 10 個の赤血球の同定パネルを用いる多重化方法

非定型抗体スクリーニング (AAS) を一般に 2 つの工程で行う：第 1 の工程は赤血球の制限されたパネルに対して行われ、その目的は、それらが同定されることを可能にすることなしに血液型抗原に対する非定型抗体の有無を示すことである。抗体の存在が検出される場合、問題の抗体 (単数または複数) の特異性を同定するために、第 2 の工程が行われる。この第 2 の工程は、同定しようとする抗体の混合物の複雑さに依存して、10 個またはそれ以上の赤血球のパネルを用いて行われる。2 つの工程を行うために、少なくとも 350 μ l の試料容積が必要とされる。この試験の目的は、試料中に存在する可能性のある非定型抗体を、直接的に単一の試験において、そして試験しようとする血漿または血清の単一の試験試料 (50 ~ 100 μ l) を用いて同定することの実行可能性を示すことである。

【 0 2 6 1 】

本発明の技術におけるこの適用の実行可能性を実証するために、蛍光ビーズを使用して、ポリ-L-リジン (PLL) を介してパネルの赤血球を固定化する。パネル中に赤血球が存在するのと同様に多くのビーズ領域が存在し、各々のビーズ領域は、既知のそして異なる表現型を有する、パネルの赤血球の単一の型を固定化するために使用される。

【 0 2 6 2 】

これらのビーズを、試験しようとする試料と混合しそして接触させ、そして非定型抗体を、フィコエリトリン (PE) で標識された抗ヒト免疫グロブリン抗体コンジュゲートを使用して検出する。

【 0 2 6 3 】

6.1 - 材料および試薬

- ビーズ領域 6、8、36、38、52、71、79、81、94 および 96 を有する蛍光超常磁性ビーズ

ビーズを +4 で PBS 緩衝液、pH 7.4 中で貯蔵する。

領域 3 4 (内部標準ビーズ (ISB)) および領域 9 8 (ブランクビーズ (BB)) 対照蛍光ビーズ。

- 分子量 70000 ~ 130000 のポリ-L-リジン (PLL)。
- フィコエリトリン (PE) に結合された、抗ヒト免疫グロブリンマウス IgG モノクローナル抗体、クローン 125A15 (Bio-Rad)。
- SAG-MAN 培地中に保存された表現型決定された血液細胞濃縮物 (EFS Nord de France)。
- 企業 Bio-Rad によって「ScanLiss」コード 86442 の名称の下に販売されている希釈媒質。
- コーティング液または緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、0.1% (v/v) プロクリン)。
- ウシ血清アルブミン (BSA) (Millipore)。
- PBS 緩衝液、pH 7.4 (7 mM リン酸ナトリウム、2.7 mM KCl、136 mM NaCl)。
- EDTA に取られた血漿試料 (EFS-Rungis)。
- 以下の特異性の非定型血液型抗体を有する血清試料：抗 D、抗 Jka、抗 Kell。

【 0 2 6 4 】

10

20

30

40

50

6.2 - プロトコル

6.2.1. PLLでのビーズの感受性化

領域6、8、36、38、52、71、79、81、94または96中性ビーズを、18時間周囲温度で攪拌しながらPBS、pH7.4中50 µg/mlのPLLとともにインキュベートすることによって、ビーズ-PLL試薬を調製する。この工程の終りに、ビーズ-PLL複合体をPBS緩衝液、pH7.4で洗浄し、次いでドナー赤血球を固定化するために使用する。

【0265】

6.2.2. ビーズ上での赤血球の固定化

ビーズ-PLL-赤血球試薬を、100に等しい赤血球数/ビーズ数比率で、PLLコートビーズとScanLiss中で希釈したパネルの赤血球とを混合することによって調製する。インキュベーションを、攪拌しながら5分間周囲温度で行う。既知のそして異なる表現型の10の赤血球を使用して、同定パネルを構成する。各々のビーズ領域を使用して、このパネルからの赤血球の単一の型を固定化する。

【0266】

インキュベーション後、ビーズ-PLL-赤血球試薬を蒸留水で数回洗浄し、次いでPBS-BSA 10g/l、pH7.4中に取り。

【0267】

PLLによるビーズ上での赤血球の固定化の原理を図4にまとめる。

【0268】

PLLによる赤血球の結合は、試験および分析の残りの間にそれらが剥離することを防止するために十分に堅固である。

【0269】

このようにして調製したビーズ-PLL-赤血球試薬ならびに領域34および領域98対照ビーズを試験しようとする試料と混合し次いでインキュベートする。

【0270】

6.2.3. ビーズ-PLL-赤血球試薬の抗体との反応

異なる赤血球から個別に調製したビーズ-PLL-赤血球試薬の混合物は、抗体を同定するためのパネルを構成する。このパネルの25 µlを試験しようとする試料(血漿または血清)100 µlと混合し、そして15分間攪拌しながら37でインキュベートする。

【0271】

インキュベーション後、複合体をPBS緩衝液、pH7.4で数回洗浄する。

【0272】

6.2.4. PE標識抗Fcを使用した複合体の可視化

ビーズ-PLL-赤血球-抗体複合体を検出するために、ヒト免疫グロブリンFcフラグメントに特異的なPE標識抗体を使用する。この抗体コンジュゲートをPBS、pH7.4中1 µg/mlの濃度で使用し、そして15分間37で攪拌しながら複合体とともにインキュベートする。次いで、複合体をPBS緩衝液、pH7.4で数回洗浄する。

【0273】

6.2.5. 企業Bio-Radからの「Bioplex 200」装置を使用したフローサイトメトリー測定

最終洗浄の後、測定の前に、複合体を35 µlのコーティング液を用いて取る。各々の試験について、25 µlの懸濁液を装置中に注入する。領域当たり250ビーズからの蛍光シグナルの捕獲によって測定を行う。

【0274】

6.3. 血漿および/または血清中の非定型抗体の特異性を同定するためのAASの実施例

異なる領域のPLLコートビーズを使用して、既知のそして異なる表現型の10個の赤血球を固定化した：表現型D、kk、Jka+b+の赤血球を領域6ビーズ上に、表現型

10

20

30

40

50

D、K k、J k a + b - の赤血球を領域 8 ビーズ上に、表現型 D、k k、J k a + b - の赤血球を領域 3 6 ビーズ上に、表現型 D、k k、J k a + b - の赤血球を領域 3 8 ビーズ上に、表現型 D、K k、J k a + b + の赤血球を領域 5 2 ビーズ上に、表現型 d d、K k、J k a - b + の赤血球を領域 7 1 ビーズ上に、表現型 d d、k k、J k a - b + の赤血球を領域 7 9 ビーズ上に、表現型 d d、K k、J k a + b + の赤血球を領域 8 1 ビーズ上に、表現型 d d、k k、J k a - b + の赤血球を領域 9 4 ビーズ上に、そして表現型 d d、k k、J k a + b + の赤血球を領域 9 6 ビーズ上に固定化した。

【 0 2 7 5 】

感受性化したビーズを、種々の特異性の非定型血液型抗体を有する種々の血清（抗 D、抗 K e l l、抗 J k a）、または抗体混合物を再現するためのこれらの血清の混合物と混合し、次いでインキュベートした。これらの血清は、パネルの赤血球に対する抗体を潜在的に有しうる陽性試料を代表する。構造および抗原提示の点で、そしてまた赤血球上での抗原密度の点で異なる血液抗原方式を検出するために、それらを選択した。

10

【 0 2 7 6 】

反応の特異性を確認するために、非定型抗体を有さない 8 個のドナー血漿もまた試験し、そして陰性対象として使用した。

【 0 2 7 7 】

検出を、P E 標識抗ヒト F c コンジュゲートを用いて行った。

【 0 2 7 8 】

結果を以下の表 I V に与える。

20

【 0 2 7 9 】

8 個のドナー血漿は 1 1 0 0 R F I 未満の平均陰性値を規定することを可能にする。

【 0 2 8 0 】

パネルの赤血球に対する抗体を有さない血清は、1 0 0 0 R F I 未満の値を生じる。

【 0 2 8 1 】

他方、パネルの赤血球によって保有される抗原に対する抗体を有する血清は、2 0 0 0 ~ 3 1 0 0 0 R F I のオーダーの結果および 1 5 ~ 2 0 7 のオーダーの試料値 / 平均陰性値比率を与える。

【 0 2 8 2 】

さらに、領域 3 4 および 9 8 対照ビーズは、予想される、すなわちそれぞれ 8 0 0 0 R F I および 1 0 0 0 R F I 以下のオーダーのシグナルレベルを与える。

30

【 0 2 8 3 】

この方法は、非定型抗体の存在を明らかに実証すること、および R h e s u s、K e l l または K i d d 式ほど異なる血液方式においてそれらの特異性を同定することを可能にする。

【 0 2 8 4 】

【表 4】

表 IV: 血漿及び/又は血清中の非定型抗体の特異性を同定するための AAS

ピーズ領域	赤血球の表現型	試料													
		8つの陰性血漿		抗D血清No.42		抗Jka血清No.65		抗Kell血清No.70		抗D(No.42) + 抗Jka(No.65)血清		抗D(No.42) + 抗Kell(No.70)血清		抗Jka(No.65) + 抗Kell(No.70)血清	
		予想結果	観察結果	予想結果	観察結果	予想結果	観察結果	予想結果	観察結果	予想結果	観察結果	予想結果	観察結果	予想結果	観察結果
領域6	D, kk, Jka+b+	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
領域8	D, Kk, Jka+b-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
領域36	D, kk, Jka+b-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
領域38	D, kk, Jka+b-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
領域52	D, Kk, Jka+b+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
領域71	dd, Kk, Jka-b+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
領域79	dd, kk, Jka-b+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
領域81	dd, Kk, Jka+b+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
領域94	dd, kk, Jka-b+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
領域96	dd, Kk, Jka+b+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

10

20

30

40

【 0 2 8 5 】

b コンボ (Ag-Ab combo)

本発明の技術を用いて赤血球上の抗原のスクリーニングを行うことの可能性を、実施例 1 および 3 において、抗赤血球抗体を固定化するために蛍光ビーズを使用することによって、そして「Bioplex 200」装置 (Bio-Rad) のレポーターレーザーの波長と適合性の蛍光化合物で試料の赤血球を標識することによって実証した。同様に、本発明の技術を用いて定型および非定型抗体を検出することの可能性を、実施例 2、4 および 6 において、ポリ-L-リジン (PLL) を介して赤血球を固定化するために蛍光ビーズを使用することによって、そしてフィコエリトリン (PE) で標識した抗ヒト免疫グロブリン抗体コンジュゲートを使用して、提示された赤血球に対する試料中の抗体の存在を検出することによって実証した。これらの試験の目的は、本発明の技術が、1つのそして同じ容器中で抗原についてスクリーニングしそして抗体についてスクリーニングすることを可能にすることを示すことである。

10

【0286】

この二重決定の実行可能性を実証するために、試験しようとする試料中に存在する抗 A および / または抗 B 抗体を検出するために、試験しようとする試料の赤血球によって保有される A および / または B 抗原を検出するための蛍光ビーズ、ならびに既知の ABO 型の赤血球に結合している蛍光ビーズを組み合わせ、多重試験を行った。試験しようとする試料は、全血型の試料である。上記の 2 つの可視化系を使用する：赤血球の表面の抗原を検出するための蛍光化合物での試料の赤血球の標識、および試験しようとする試料の血漿中の抗体を検出するための PE 標識抗ヒト免疫グロブリン二次抗体の使用。

20

【0287】

7.1 - 材料および試薬

- ビーズ領域 6、56、71、81 および 94 を有する蛍光超常磁性ビーズ
ビーズを +4 で PBS 緩衝液、pH 7.4 中で貯蔵する。
- 領域 34 (内部標準ビーズ (ISB)) および領域 98 (ブランクビーズ (BB)) 対照蛍光ビーズ。
- 抗マウス IgG ヤギポリクローナル抗体、コード 115-005-164 (Jackson Imm. Lab.)
- 抗マウス IgM ヤギポリクローナル抗体、コード 115-005-020 (Jackson Imm. Lab.)
- 抗 B モノクローナル IgG 抗体、クローン X9 (Bio-Rad)。
- 抗 A モノクローナル IgM 抗体、クローン 15750F7 (Bio-Rad)。
- フィコエリトリン (PE) に結合された、抗ヒト IgM ヤギポリクローナル抗体、コード 709-116-073 (Jackson Imm. Lab.)
- PKH26 細胞標識キット (Sigma)。
- 分子量 70000 ~ 130000 のポリ-L-リジン (PLL)。
- EDTA に取られた全血試料 (EFS-Rungis)。
- 企業 Bio-Rad によって「ScanLiss」コード 86442 および「Stabiliss」コード 86550 の名称の下に販売されている希釈媒質。
- コーティング液または緩衝液 (10 mM リン酸ナトリウム、150 mM NaCl、0.1% (v/v) プロクリン)。
- ウシ血清アルブミン (BSA) (Millipore)。
- PBS 緩衝液、pH 7.4 (7 mM リン酸ナトリウム、2.7 mM KCl、136 mM NaCl)。

30

40

【0288】

7.2 - プロトコル

7.2.1. 試薬の調製

7.2.1.1 抗原を検出するための試薬の調製：血液型に対する抗体でのビーズの感受性化

ビーズの表面での抗体の固定化の原理を図 2 にまとめる。

50

【0289】

領域6 ビーズを使用して、抗マウスIgGを共有結合的に固定化した。

【0290】

領域5 6 蛍光ビーズを使用して、抗マウスIgMを共有結合的に固定化した。ビーズの表面に存在するカルボキシル基を、ヒドロキシスクシンイミドおよびカルボジイミドを含む技術に従って活性化した。

【0291】

このようにして、タンパク質をそれらのアミン基を介して固定化することができた。

【0292】

このようにして調製したビーズを、+4 で、10% (w/v) のBSA、0.5% (v/v) のTween 20および0.09% (w/v) のアジ化ナトリウムを含むPBS、pH 7.4中3mg/mlの濃度で貯蔵する。

10

【0293】

固定化した抗マウスIgGを保有するビーズを、抗B抗体で感受性化することができる。固定化した抗マウスIgMを保有するビーズを、抗A抗体で感受性化することができる。それゆえ、抗赤血球抗体を、この原理を使用して、非共有結合的にビーズ上に固定化する。各々のビーズ領域を、異なる特異性の抗体で感受性化する。選択される抗免疫グロブリンは、長時間にわたる安定な結合を可能にする。

【0294】

非精製抗Aおよび非精製抗Bを、それぞれ最終濃度165および640 μg/mlで使用する。

20

【0295】

抗赤血球抗体での感受性化を、PBS、pH 7.4中で攪拌しながら37 で1時間行う。

【0296】

感受性化後、ビーズをPBS緩衝液、pH 7.4で数回洗浄し、次いで+4 でPBS-BSA 10g/l、pH 7.4中で貯蔵する。

【0297】

7.2.1.2 抗体を検出するための試薬の調製：PLLでのビーズの感受性化ならびに既知の型および既知の表現型の赤血球の固定化

30

領域71、領域81および領域94中性ビーズを、18時間周囲温度で攪拌しながらPBS、pH 7.4中の50 μg/mlのPLLとともにインキュベートする。この工程の終りに、ビーズをPBS緩衝液、pH 7.4で洗浄し、次いで赤血球を固定化するために使用する。

【0298】

ビーズ-赤血球試薬を、100に等しいビーズ数に対する赤血球数の比率で、PLLコートビーズとScanLiss中で希釈した赤血球とを混合することによって調製する。インキュベーションを、攪拌しながら5分間周囲温度で行う。各々のビーズ領域を使用して、既知の型の赤血球の単一の型を固定化する。この工程の終りに、ビーズ-PLL-赤血球試薬を蒸留水で数回洗浄する。このようにして調製したビーズ-赤血球試薬を、PBS-BSA 10g/l、pH 7.4中4 で貯蔵する。

40

【0299】

PLLによるビーズ上での赤血球の固定化の原理を図4にまとめる。

【0300】

PLLによる赤血球の結合は、試験および分析の間にそれらが剥離することを防止するために十分に堅固である。

【0301】

7.2.2. 試験しようとする試料の赤血球の標識

赤血球の標識を、PKH26を使用して実施例1におけるように行う(図3)。

【0302】

50

P K H 2 6 での赤血球の標識を、製造業者によって推奨されるプロトコルを使用して行う。このようにして標識した赤血球を、それらの血漿中で40% (v/v) に希釈する。

【0303】

7.2.3. 試験しようとする試料と血液型抗体 - ビーズおよび赤血球 - ビーズとのインキュベーション

試験しようとする試料は全血である。

【0304】

試験しようとする試料50μlを、既知の表現型の赤血球で感受性化したビーズ(ビーズ - P L L - 赤血球試薬)25μlと混合し、そして10分間攪拌しながら22℃でインキュベートする。

【0305】

次いで、抗赤血球抗体で感受性化したビーズ(ビーズ - 抗赤血球抗体試薬)25μlを加え、そして5分間攪拌しながら22℃でインキュベートする。

【0306】

インキュベーション後、試薬をP B S緩衝液で数回洗浄する。

【0307】

7.2.4. 陽性複合体の検出

ビーズ - 抗赤血球抗体試薬が結合している赤血球(ビーズ - 抗体 - 赤血球複合体)の検出を、試料の赤血球の事前標識によって提供する。

【0308】

ビーズ - P L L - 赤血球試薬への試料の抗体の結合(ビーズ - P L L - 赤血球 - 抗体複合体)を検出するために、ヒト免疫グロブリンに特異的なP E標識抗体を使用する。この抗体コンジュゲートをP B S、p H 7.4中5μg/mlの濃度で使用し、そして15分間37℃で攪拌しながら複合体とインキュベートする。次いで、複合体をP B S緩衝液、p H 7.4で数回洗浄する。

【0309】

7.2.5. 企業Bio-Radからの「B i o p l e x 2 0 0」装置を使用したフローサイトメトリー測定

最終洗浄の後、測定の前に、複合体を35μlのコーティング液を用いて取る。各々の試験について、25μlの懸濁液を装置中に注入する。領域当たり250ビーズの捕獲によって測定を行う。

【0310】

研究する反応の特異性を確認するために、各々の感受性化したビーズについて、陰性試料を試験した。

【0311】

7.3 - 多重直接および間接A B O型決定の実施例

P L Lでコートした領域94ビーズを使用してA1型赤血球を固定化し、P L Lでコートした領域71ビーズを使用してB型赤血球を固定化し、そしてP L Lでコートした領域81ビーズを使用してO型赤血球を固定化した。既知の表現型の赤血球で感受性化したこれらのビーズを混合した。

【0312】

抗B抗体で感受性化した領域6ビーズを、抗A抗体で感受性化した領域56ビーズと、I S B 34対照ビーズと、そしてB B 98対照ビーズと混合した。A、B、A BおよびO型の全血の試料を試験した。

【0313】

試料の赤血球を、それらが抗赤血球抗体 - ビーズによって結合された場合にそれらが検出されることを可能にするように、予め標識した。赤血球 - ビーズに結合している試料の抗体を、P E標識抗ヒト免疫グロブリンコンジュゲートを用いて検出した。

【0314】

結果を以下の表Vに与える：

10

20

30

40

50

【 0 3 1 5 】

【 表 5 】

表 V: 多重直接及び間接 ABO 型決定

試料	多重試験				
	抗原検出		抗体検出		
	<u>R56/抗A</u> ビーズ	<u>R6/抗B</u> ビーズ	<u>R94/GR A1</u> ビーズ	<u>R71/GR B</u> ビーズ	<u>R81/GR O</u> ビーズ
O 型	-	-	+	+	-
A 型	+	-	-	+	-
B 型	-	+	+	-	-
AB 型	+	+	-	-	-

10

【 0 3 1 6 】

血液細胞試験の結果（抗原検出）：

ビーズ - 抗 A およびビーズ - 抗 B 試薬は、それぞれ A 陽性赤血球および B 陽性赤血球と反応する：陽性試料は 2 8 0 0 0 R F I より高い陽性シグナルを生じ、一方、陰性試料は 1 8 0 0 ~ 8 3 0 0 R F I のずっと低いシグナルを与える。

20

【 0 3 1 7 】

血清試験の結果（抗体検出）：

提示された赤血球に対する抗体を含まない試料は 1 8 0 0 R F I 未満の値を生じ、平均陰性値は 1 0 2 0 R F I である。

【 0 3 1 8 】

ビーズ - P L L - A 1 赤血球およびビーズ - P L L - B 赤血球試薬によって提示される赤血球に対する抗体を有する試料は、3 0 0 0 ~ 8 2 0 0 R F I の陽性シグナルを与え、試料値対平均陰性値比率は 3 ~ 8 のオーダーである。

30

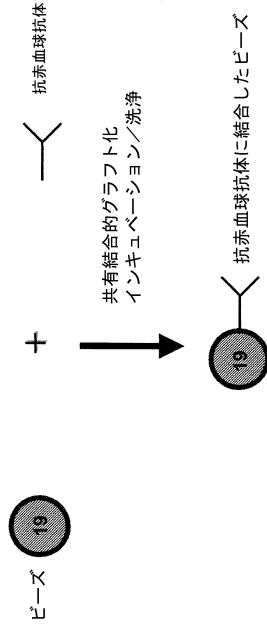
【 0 3 1 9 】

さらに、領域 3 4 および 9 8 対照ビーズは、予想される、すなわちそれぞれ 8 0 0 0 R F I および 1 4 0 0 R F I 未満のオーダーのシグナルレベルを与える。

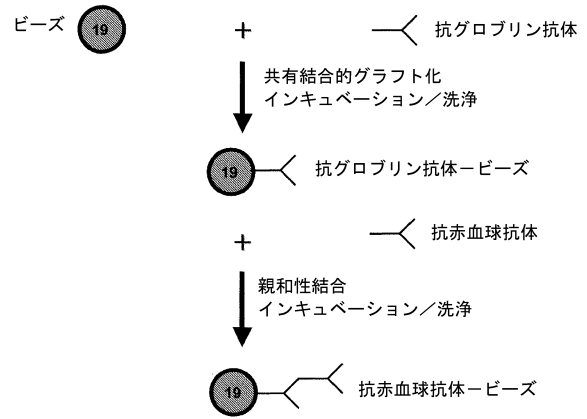
【 0 3 2 0 】

これらの結果は、1 つのそして同じ容器中で、そして全血試料の単一の試験試料を使用して、抗原および抗体の多重化検出を行うことの実行可能性を実証する。

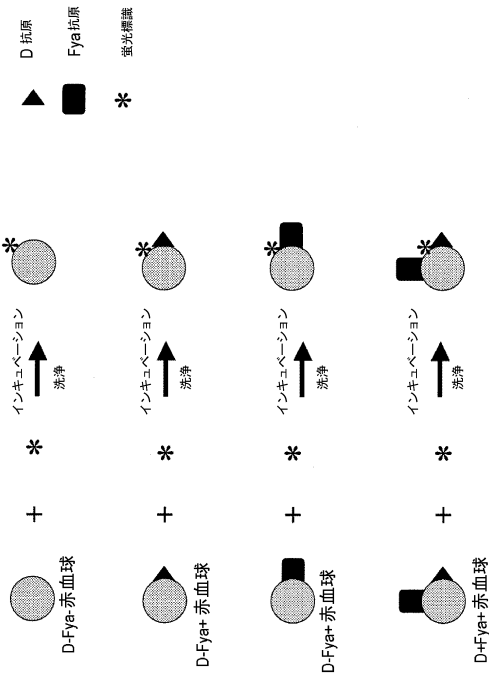
【 図 1 】



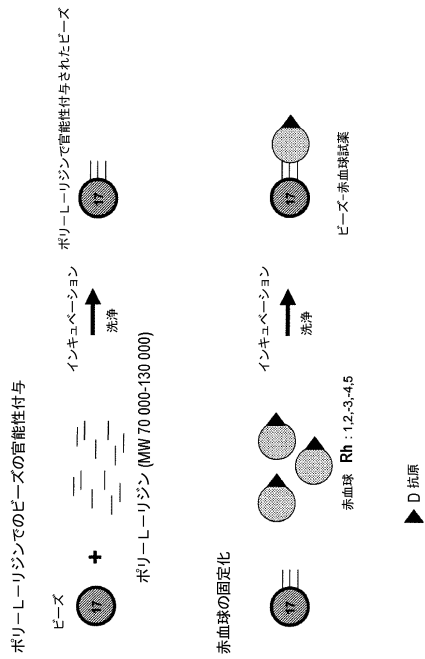
【 図 2 】



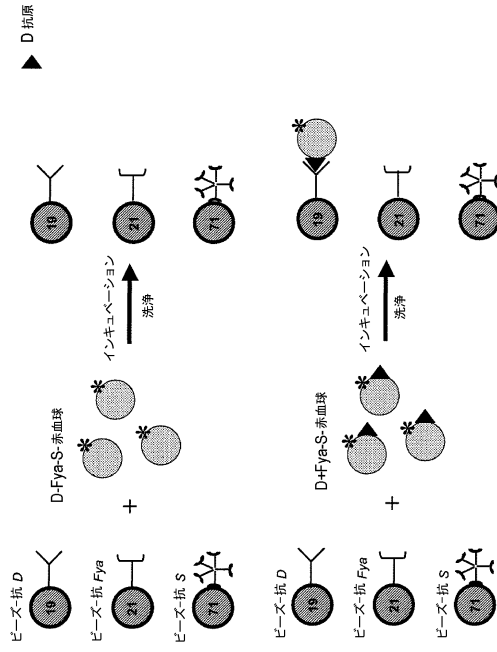
【 図 3 】



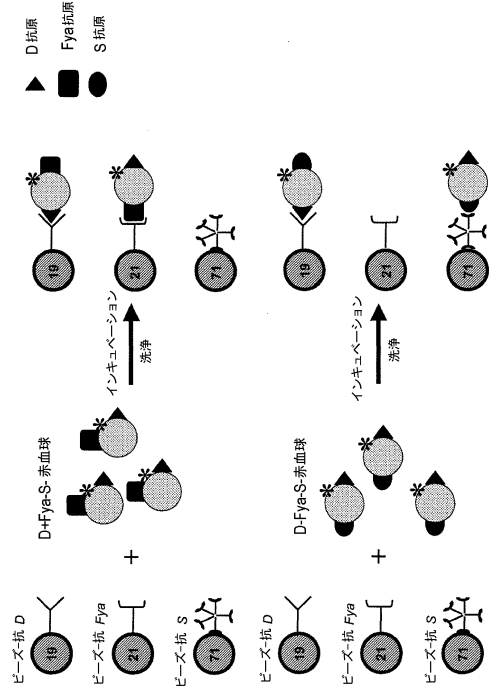
【 図 4 】



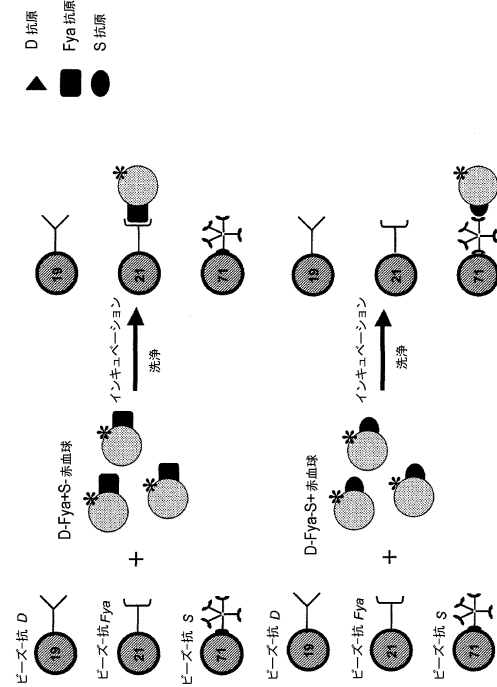
【 図 5 a 】



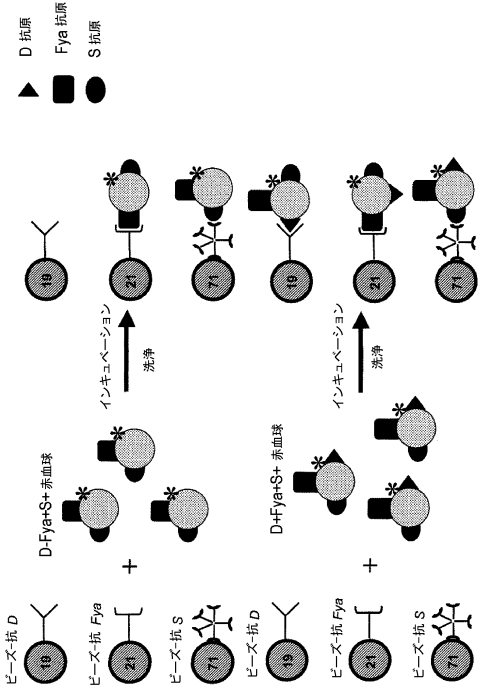
【 図 5 b 】



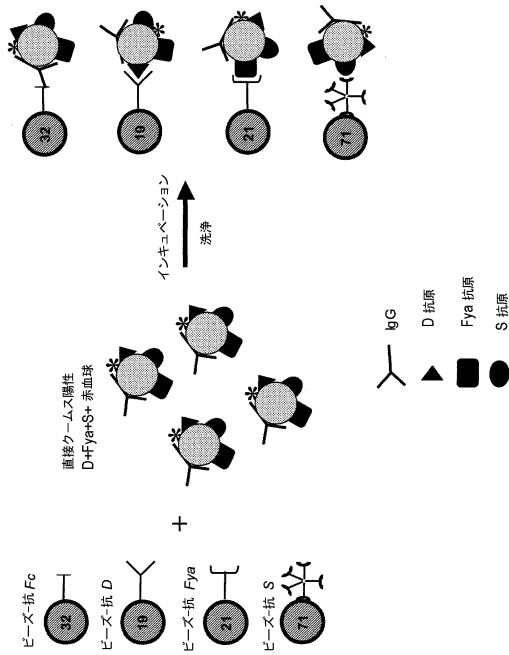
【 図 5 c 】



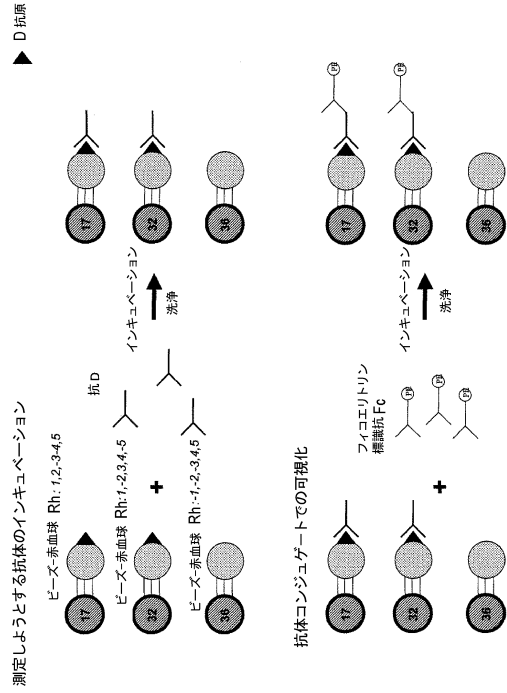
【 図 5 d 】



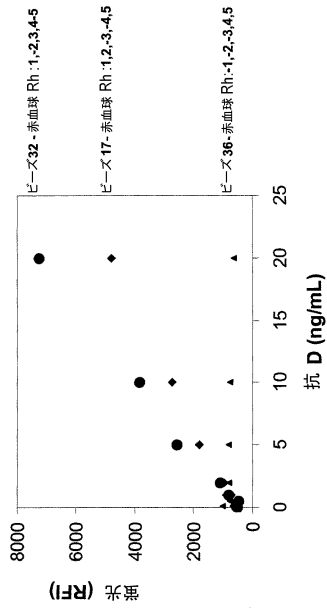
【 図 6 】



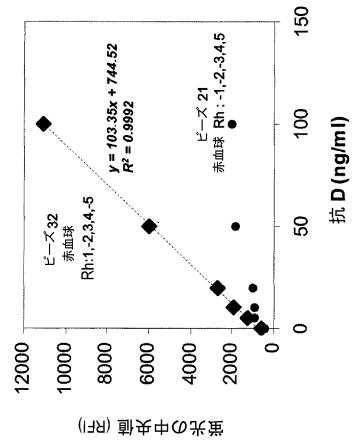
【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 1 N 21/78 C

- (72)発明者 レザン, イヴ
フランス国、エフ - 9 5 1 2 0 エルモン、リュ・デ・ブルート 9
- (72)発明者 リヴァリン, エリアヌ
フランス国、エフ - 7 8 2 4 0 エーグルモン、リュ・ドゥ・フシュロール 17エー
- (72)発明者 サンジュアン, アンパーロ
フランス国、エフ - 9 2 1 3 0 イッシー - レ - ムリノー、リュ・クロード・マトラ 7

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 特開2001-281248(JP, A)
国際公開第98/021593(WO, A1)
米国特許第05776711(US, A)
特許第2532670(JP, B2)
国際公開第2005/005986(WO, A1)
特開平09-054091(JP, A)
国際公開第2006/100477(WO, A1)
特表2000-516345(JP, A)
米国特許出願公開第2003/0194818(US, A1)
米国特許出願公開第2005/0059095(US, A1)
特公平03-031390(JP, B2)
特開平02-165052(JP, A)
国際公開第85/001354(WO, A1)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
- | | |
|---------|-------------|
| G 0 1 N | 3 3 / 5 3 |
| G 0 1 N | 2 1 / 7 8 |
| G 0 1 N | 3 3 / 5 4 3 |

专利名称(译)	血液样本的多重分析		
公开(公告)号	JP5768371B2	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	JP2010510825	申请日	2008-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	Bio-Rad公司巴斯德 BIO RAD巴斯德		
申请(专利权)人(译)	生物 - Rad公司巴斯德		
当前申请(专利权)人(译)	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 レザンイヴ リヴァリンエリアヌ サンジュアンアンパーロ		
发明人	ビュフィエール,フレデリック レザン,イヴ リヴァリン,エリアヌ サンジュアン,アンパーロ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/80 G01N33/537 G01N33/54333 Y10T436/101666 Y10T436/25125		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.541.A G01N33/543.575 G01N33/543.597 G01N33/53.N G01N21/78.C		
代理人(译)	津国 肇 田畑幸四郎		
审查员(译)	三木 隆		
优先权	2007055624 2007-06-08 FR 60/929052 2007-06-11 US		
其他公开文献	JP2010529444A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)
 本发明涉及一种检测由红细胞和/或多种抗红细胞抗体携带的多种抗原分子的方法，所述红细胞携带的抗原分子不仅由红细胞携带，而且至少由红细胞携带。除了血型抗原分子之外的另一种细胞群，所述方法包括使样品与可区分的珠子接触，其上附着有 a) 对所述抗原特异的抗体，或 b) 红细胞或红细胞膜片段。

(21) 出願番号	特願2010-510825 (P2010-510825)	(73) 特許権者	506215582
(86) (22) 出願日	平成20年6月6日 (2008.6.6)		バイオ・ラッド・イノベーションズ
(65) 公表番号	特表2010-529444 (P2010-529444A)		BIO-RAD INNOVATIONS
(43) 公表日	平成22年8月26日 (2010.8.26)		フランス国、エフ-92430 マルヌー
(86) 国際出願番号	PCT/EP2008/057116		ラーコケット、ブルヴァール・レイモン
(87) 国際公開番号	W02008/148886		・ポアンカレ 3
(87) 国際公開日	平成20年12月11日 (2008.12.11)	(74) 代理人	100078682
審査請求日	平成23年5月6日 (2011.5.6)		弁理士 津国 肇
(31) 優先権主張番号	0755624	(74) 代理人	100113653
(32) 優先日	平成19年6月8日 (2007.6.8)		弁理士 東田 幸四郎
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(74) 代理人	100116919
(31) 優先権主張番号	60/929,052		弁理士 齋藤 房幸
(32) 優先日	平成19年6月11日 (2007.6.11)	(72) 発明者	ビュフィエール,フレデリック
(33) 優先権主張国	米国 (US)		フランス国、エフ-33600 ペサック
			、リュ・ヂ・ラヴァンダイエール 32
			最終頁に続く