

(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2004-503745
(P2004-503745A)

(43) 公表日 平成16年2月5日(2004.2.5)

(51) Int.Cl.⁷

G01N 1/10
G01N 1/00
G01N 33/48
G01N 33/53
G01N 33/543

F 1

G01N 1/10
G01N 1/00
G01N 1/00
G01N 33/48
G01N 33/48

テーマコード(参考)

2 G043
2 G052
1 O1M
B

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 97 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2002-509743 (P2002-509743)
(86) (22) 出願日 平成13年6月28日 (2001.6.28)
(85) 翻訳文提出日 平成15年1月7日 (2003.1.7)
(86) 國際出願番号 PCT/US2001/020697
(87) 國際公開番号 WO2002/004921
(87) 國際公開日 平成14年1月17日 (2002.1.17)
(31) 優先権主張番号 09/611,847
(32) 優先日 平成12年7月7日 (2000.7.7)
(33) 優先権主張國 米国(US)
(81) 指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR,
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), CN, JP

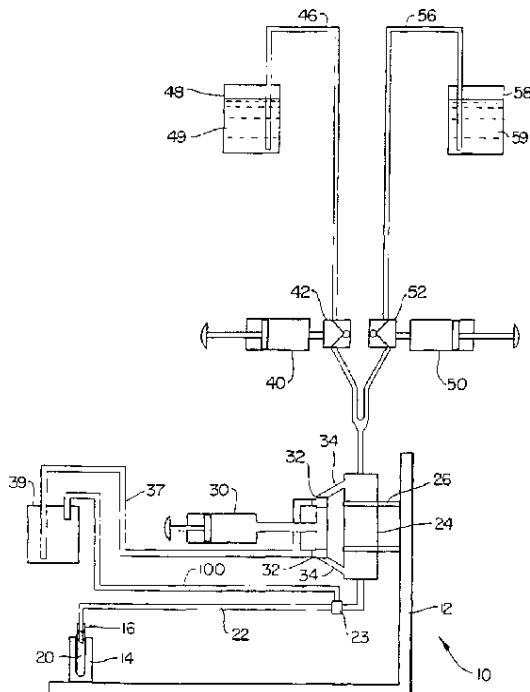
(71) 出願人 596163448
コールター インターナショナル コーポ
レイション
アメリカ合衆国, フロリダ 33196,
マイアミ, 32-エーオ2, サウスウェス
ト 147 アベニュー 11800
(74) 代理人 100077517
弁理士 石田 敏
(74) 代理人 100092624
弁理士 鶴田 準一
(74) 代理人 100108110
弁理士 日野 あけみ
(74) 代理人 100082898
弁理士 西山 雅也

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】生物試料の調製と分析のための装置及び方法

(57) 【要約】

含細胞試料(20)から干渉物質を除去するろ過機構(24)を自動化装置(10)に利用する方法を開示する。該ろ過機構は、細胞を残留させる一方でより小径の干渉物質(75)は通過させるような大きさの微孔(65)を多数備えた微孔性中空纖維膜(60)を含む。該装置はまた試料容器(16)とろ過機構の間で試料を移動させる手段を含む。開示の方法は真空源(30)を利用して中空線膜の内腔(66)中に試料を吸引し、試料を、分析用容器中に排出されるか又は分析装置へと導かれるまで、内腔空間内に残留せらるるようにする。



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

目的細胞と干渉物質とを含有する細胞試料から干渉物質を自動的に除去する装置であって、

a) 真空源、

b) 膜外室を形成する不透過性のハウジングを含むろ過機構であって、該室には目的細胞を選択的に残留させる一方で干渉物質は通過させるようなろ材が収納されており、また該ハウジングは3以上の出入口を備え、1以上の出入口を導管で真空源に接続したろ過機構、

c) 該ハウジングの該出入口群のうちの1出入口と接続した導管であって、該真空源により細胞試料を試料容器からろ過機構内へと吸引するよう調整した導管、及び

d) 該ハウジングの該出入口群のうちの1出入口と接続した導管であって、緩衝液貯槽と流体接続して、緩衝液を該ろ過機構内に流入させて残留細胞を該出入口群のうちの1出入口から回収するための手段を提供する導管

を含む装置。

【請求項 2】

緩衝液貯槽に流体接続するハウジングの出入口が、真空源により細胞試料を試料容器からろ過機構内へと吸引するよう調整した該ハウジングの出入口とは異なることを特徴とする請求項1の装置。

【請求項 3】

残留細胞の回収を、細胞試料を試料容器からろ過機構内へと吸引するよう調整した導管を通じて行う請求項1の装置。

【請求項 4】

細胞試料を吸引した試料容器の中に残留細胞を回収する請求項1の装置。

【請求項 5】

ろ材が、細胞の通過を妨げるような直径の微孔を多数備えた微孔性中空纖維膜を含む請求項1の装置。

【請求項 6】

微孔径が約0.1μm～約5μmである請求項5の装置。

【請求項 7】

微孔径が約0.2μm～約2μmである請求項5の装置。

【請求項 8】

微孔性中空纖維膜が内腔をもつ少なくとも1本の管状体をなし、該管状体は該管状体中に第1開口部と該管状体の反対端に第2開口部を有することを特徴とする請求項5の装置。

【請求項 9】

第1開口部を導管と流体接続して、細胞試料を細胞試料容器から第1開口部を経由して内腔中に導けるようにした請求項8の装置。

【請求項 10】

第2開口部を導管と接続して、緩衝液を緩衝液貯槽から第2開口部経由で内腔中に導けるようにした請求項8の装置。

【請求項 11】

真空源を膜外室と流体接続して、真空源から膜外室に真空を作ることで細胞試料を細胞試料容器から導管経由でろ過機構中に吸引し、また細胞試料中の干渉物質はろ材を通過し膜外室に入り、第2導管から排出されるようにする請求項1の装置。

【請求項 12】

1以上のポンプと複数個の弁をさらに含み、該1以上のポンプは緩衝液貯槽内の緩衝液をろ過機構内へ、また洗剤液貯槽内の洗剤液をろ過機構内へ、それぞれ導くための液圧を与え、該複数個の弁は開閉式にして、真空源由来の真空を膜外室へと作用させ、それによりろ過機構内の緩衝液、洗剤液、及び細胞試料中に含まれる干渉物質をろ過機構内から制御可能に除去しうるように調整し、また該1以上のポンプからの液圧は、緩衝液を緩衝液貯槽

10

20

30

40

50

槽からろ過機構へ、緩衝液を緩衝液貯槽から細胞試料容器へ、更に洗剤液を洗剤液貯槽からろ過機構内へと導けるように方向制御しうることを特徴とする請求項11の装置。

【請求項13】

1以上のポンプと複数個の弁を制御するためのコンピューター制御器をさらに含む請求項12の装置。

【請求項14】

出入口群のうちの1出入口が、洗剤液を入れるように調整した洗剤液貯槽に流体接続される請求項1の装置。

【請求項15】

細胞分析装置に流体接続される導管をさらに含む請求項1の装置。

10

【請求項16】

細胞分析装置が蛍光を測定することを特徴とする請求項15の装置。

【請求項17】

細胞分析装置がフローサイトメーターであることを特徴とする請求項15の装置。

【請求項18】

含細胞試料から干渉物質を除去するための自動化方法であって、

a) 第1試料容器中の血液細胞試料に真空力を作用させて該血液細胞試料をろ材へと接触させるステップ、

b) 蘿材と接触している血液細胞試料に力を作用させ、それにより該血液細胞試料中の干渉物質がろ材を通過する一方で該血液細胞試料中の細胞はろ材を通過しないようにするステップ、及び

c) 蘿材から細胞を回収するステップ

を含む方法。

【請求項19】

血液細胞試料中の干渉物質をしてろ材を通過させるための力が真空力であることを特徴とする請求項18の方法。

【請求項20】

血液細胞試料中の干渉物質をしてろ材を通過させるための力を作用させる前に血液細胞試料を緩衝液で希釈するステップを更に含む請求項18の方法。

【請求項21】

各1容積の血液細胞試料に対し1容積以上の緩衝液で、血液細胞試料を希釈することを特徴とする請求項20の方法。

30

【請求項22】

ろ材から細胞を第1血液細胞容器に回収することを特徴とする請求項18の方法。

【請求項23】

請求項22の方法であって、

a) 回収血液細胞試料に真空力を作用させて該血液細胞試料をろ材に接触させるステップ、

b) 蘿材に接触している血液細胞試料に力を作用させ、それにより血液細胞試料中の干渉物質がろ材を通過する一方で血液細胞試料中の細胞はろ材を通過しないようにするステップ、及び

c) 蘿材から細胞を回収するステップ

を更に含む方法。

【請求項24】

ろ材から細胞を、第1血液細胞試料容器とは異なる、第2血液細胞試料容器に回収することを特徴とする請求項18の方法。

【請求項25】

請求項24の方法であって、

a) 回収血液細胞試料に真空力を作用させて該血液細胞試料をろ材に接触させるステップ、

40

50

b) ろ材に接触している血液細胞試料に力を作用させ、それにより血液細胞試料中の干渉物質がろ材を通過する一方で血液細胞試料中の細胞はろ材を通過しないようにするステップ、及び

c) ろ材から細胞を回収するステップ
を更に含む方法。

【請求項 2 6】

血液細胞試料に血清物質を添加するステップを更に含む請求項 1 8 の方法。

【請求項 2 7】

方法が 5 分未満で実施される請求項 1 8 の方法。

【請求項 2 8】

方法が 1 分未満で実施される請求項 2 7 の方法。

【請求項 2 9】

ろ材から回収した細胞を分析するステップを更に含む請求項 1 8 の方法。

【請求項 3 0】

ろ材から細胞を回収する前に血液細胞試料中の赤血球を溶解するステップを更に含む請求項 2 9 の方法。

【請求項 3 1】

ろ材から細胞を回収した後で血液細胞試料中の赤血球を溶解するステップを更に含む請求項 2 9 の方法。

【請求項 3 2】

血液細胞試料中の干渉物質の 7 5 % 超がろ材を通過する請求項 1 8 の方法。

【請求項 3 3】

分析用の血液細胞試料を調製する自動化方法であって、

a) 血液細胞と反応する 1 以上の試薬を血液細胞試料に加えて試験試料混合液を調製するステップ、

b) 該試験試料混合液から干渉物質を自動的に除去して洗浄済み血液細胞試料とするステップ、及び

c) 該洗浄済み血液細胞試料を分析して血液細胞の特性を判別するステップを含む方法。

【請求項 3 4】

試薬が血液細胞試料中の血液細胞の表面上の 1 以上の標的抗原と特異的に結合する 1 以上の抗体を含むことを特徴とする請求項 3 3 の方法。

【請求項 3 5】

抗体が蛍光標識を含むことを特徴とする請求項 3 4 の方法。

【請求項 3 6】

洗浄済み血液細胞試料の分析が電気的又は光学的測定によることを特徴とする請求項 3 3 の方法。

【請求項 3 7】

試薬が、分析しようとする血液細胞中の赤血球を溶解する溶解性試薬を含むことを特徴とする請求項 3 3 の方法。

【発明の詳細な説明】

【0 0 0 1】

技術分野

本発明は一般に生物試料の調製と分析の分野に関する。本発明は特に、血液細胞分析の感度向上させる方法と装置に関する。

【0 0 0 2】

背景技術

フローサイトメトリーはきわめて多数の個別の細胞を対象に特異的細胞マーカーの定性及び定量分析を迅速に行う周知の方法である。一般的な適用例では、所定の細胞マーカーへと選択的に結合する蛍光分子プローブを、たとえば、細胞内抗原又は細胞表面抗原と特異

10

20

30

40

50

的に結合する蛍光標識抗体などを、分析対象の細胞試料に加え、プローブが、所定の細胞マーカーを発現する試料中の細胞に結合する、すなわち細胞を「染色」しうるようとする。次に試料をフローサイトメーターにかけて、光源で照射し試料中の各細胞に関連する蛍光を計量しうるようにする。

【0003】

特定の細胞から放出される蛍光の強さは該特定細胞の表面又は内部の細胞マーカーの量と相関する。この蛍光データを外挿すれば、試料中の細胞が発現する特異的表現型マーカーの相対量をすばやく正確に求めることができる。フローサイトメトリー分析の概要については、「Flow Cytometry and Sorting」 Myron R. Melamed, Tore Lindmo 及び Mortimer L. Mende1 sohn 編、New York : Wiley-Liss, Inc. (第3版、1995) ; Shapiro, H.M. 「Practical Flow Cytometry」 New York : Wiley-Liss, Inc. (第2版、1990) を参照。

【0004】

フローサイトメトリー用の試料調製は一般に、飽和濃度の細胞マーカー特異的プローブをマニアルピペッティングで細胞試料に添加し、次いでプローブが目的の細胞マーカーと結合するに足る時間にわたり混合液をインキュベートするという方法で行われ、自動化されていない。赤血球が干渉を引き起こしかねないような分析（たとえば、白血球の免疫表現型判定）では、赤血球を特異的に溶解する物質（たとえば、低張液、塩化アンモニウム又はカルボン酸）を用いて試料から赤血球を除去することができる。従来、フローサイトメトリー分析に先立って細胞試料から干渉性の未結合プローブを除去するには、混合液に過剰の緩衝液を加え、混合液を遠心にかけて緩衝液から細胞を分離し、未結合プローブを含有する緩衝液を除去し、細胞を新しい緩衝液に再懸濁させるという方法で混合液を洗う。残存の未結合プローブがあってもこの洗浄手順を何回も反復すれば更に除去することができる。この非自動化法は、フローサイトメトリー分析に際してバックグラウンドノイズ又は干渉を生む原因となりかねない干渉物質（たとえば、未結合プローブ又は細胞残屑）をほとんど含まない比較的クリーンな試料が得られるという点で有利である。しかし、少なからぬ適用分野ではこの非自動化法は比較的時間がかかり、1以上の洗浄ステップに起因する著しい細胞損失を招きかねず、また細胞を潜在的に有害な作用（たとえば、酵素作用の活性化、顆粒の放出、細胞破壊、遠心による高重力など）にさらす。

【0005】

前記の方法は少数の試料を対象とした時たまの分析には適するものの、きわめて多数の試料を対象とした反復分析を伴うプロトコールにはあまり適さない。一般にフローサイトメトリーを用いた臨床診断、高速大量のスクリーニングなどには、より自動化した方法が好ましい。たとえば、フローサイトメトリーを用いて白血球の免疫表現型を判別するといった一般的な臨床検査では、全血試料を自動処理装置にかけた後に分析を行う。Beckman Coulter, Inc. (米国フロリダ州マイアミ) 製のCOULTER (登録商標) TQ-Prep (登録商標) Workstation システムはそうした装置の一例である。同装置はコンピューター制御機構を用いて、プローブ添加後の試料に、試料中の赤血球を溶解する物質と細胞固定剤（パラホルムアルデヒドなど）を自動的に添加する。調製した試料は更なる処理を経ずにそのままフローサイトメーターで分析することができる。この自動化法は全血試料をすばやく能率的に調製しうるという点で有利である。

【0006】

この溶解処理法は、高感度が要求される適用分野で難点を露呈する可能性がある。こうした分野にこの自動化法を適用すると、同法は洗浄ステップを欠くため、干渉物質、たとえば、未結合プローブや溶解赤血球の残屑などが試料から除去されずに残り、未結合プローブからの蛍光、非特異的プローブ結合、及び／又は細胞や残屑からの自己蛍光に起因する高バックグラウンドノイズのために分析結果が分かりにくくなるおそれがある。

10

20

30

40

50

【 0 0 0 7 】

蛍光標識抗体を使用して細胞試料中の低濃度で存在するマーカーを調べる場合、洗浄ステップの欠落は試料中に存在する未結合抗体に起因する高バックグラウンド蛍光を招く一因となりかねない。試料中に存在する未結合蛍光抗体分子があまりに多いと、フローサイトメーターは抗体結合細胞から放出されるシグナルと未結合抗体から生ずる「ノイズ」を識別することができない。つまり、試料中の「ノイズ」が目的とする細胞由来の「シグナル」を圧倒してしまう。これを防ぐには、干渉物質を手動洗浄法で除去して試料中のシグナル／ノイズ(S/N)比を高めることができる。手動洗浄法の一例は、試料を遠心にかけて細胞をペレット化する、上清に含有された干渉物質をデカントする、細胞を新しい緩衝液に再懸濁させるというステップを含む。この手動洗浄法も前述の非自動化法の場合と同様に、時間がかかる、細胞を破壊する、細胞損失を招きかねないといった難点がある。

10

【 0 0 0 8 】

従って、分析前に細胞試料から干渉物質をすばやく能率的に除去する装置及び方法が求められている。更に、該装置及び方法は血液試料を取り扱う操作者に対する感染性血液との接触というリスクを最小限にとどめるべきである。前述の方法を低細胞損失で実行しつつ遠心に起因する高重力又は細胞充填に細胞をさらさないような装置が特に有利であろう。

【 0 0 0 9 】**発明の開示**

細胞試料から干渉物質をすばやく能率的に除去するための細胞試料調製装置には微孔性中空纖維膜などのろ材が利用できることはすでに発見されている。特に、目的細胞の直径を下回る平均直径の微孔を多数備えた中空纖維膜を細胞試料から干渉物質を除去するのに利用すれば、細胞検定でS/N比の改善を図れることがすでに判明している。中空纖維膜に真空を適用すると、ろ材内腔内の血液細胞試料から干渉物質を除去することが可能になる。細胞自体は膜の微孔を通過できないので、在来の連続ろ過機構と比べてろ材の目詰まりが起こりにくいし、また細胞が有害な力にさらされる心配も少ない。本発明のろ材は細胞処理装置内に取り付ければ、血液細胞試料を自動的に洗浄、分析できるようになる。

20

【 0 0 1 0 】

従って、本発明は含細胞試料から干渉物質を自動的に除去する装置を特色とする。該装置は真空源、膜外室を形成する不透過性のハウジングを含むろ過機構であって、該室内には、目的細胞を選択的に残留させる一方で干渉物質は通過させるようなろ材が収納されており、また該ハウジングは3以上の出入口を備え、1以上の出入口を導管で真空源へと接続したろ過機構、該ハウジングの該出入口群のうちの1出入口と接続した導管であって、該真空源により細胞試料を試料容器からろ過機構内へと吸引するよう調整した導管、及び該ハウジングの該出入口群のうちの1出入口と接続した導管であって、緩衝液貯槽と流体接続して、緩衝液を該ろ過機構内に流入させて残留細胞を該出入口群のうちの1出入口から回収するための手段となる導管を含む。

30

【 0 0 1 1 】

好ましい態様では、含細胞試料から干渉物質を自動的に除去する装置は、細胞試料を入れる細胞試料容器を保持するよう調整した試料容器保持体、細胞を選択的に残留させる一方で干渉物質は通過させるようなろ材を収納したろ過機構、試料容器をろ過機構へと流体接続して試料が試料容器とろ過機構の間を移動できるようにする1以上の導管、及びろ過機構から細胞を回収する手段を含む。該装置のろ材は好ましくは、細胞の通過を妨げるような直径の微孔を多数備えた微孔性中空纖維膜を含む。微孔は平均直径を、たとえば、約0.1~5.0μmとすることができます。好ましい装置の例では、微孔性中空纖維膜は内腔をもつ少なくとも1本の管状体をなし、該管状体は該管状体の第1開口部をなす第1出入口と該管状体の第2開口部をなす第2出入口を有する。この好ましい態様では、該導管を第1出入口経由で1以上の内腔へと流体接続して、細胞試料が細胞試料容器から第1出入口経由で該1以上の内腔へと移動しうるようにする。第2出入口は緩衝液を入れた緩衝液貯槽と、また洗剤液を入れた洗剤液貯槽とも、流体接続することができる。ろ過機構から細胞を回収する手段は緩衝液貯槽と流体連絡させることができる流体ポンプを含み、該流

40

50

体ポンプにより緩衝液を緩衝液貯槽からろ過機構へと流せるようにもよい。変法として、流体ポンプにより緩衝液をろ過機構から1以上の導管へも流せるようにもよい。

【0012】

本発明装置の別の態様では、ろ過機構が不透過性のハウジングを含み、該不透過性ハウジングと微孔性中空纖維膜の間に膜外室が形成されるようにすることもできる。膜外室を真空源と流体接続すれば、真空源から膜外室に真空を適用することで細胞試料を、細胞試料容器から1以上の導管を介して微孔性中空纖維膜の1以上の内腔へと第1出入口経由で吸引し、さらに細胞試料の一部を、微孔性中空纖維膜を通過して膜外室へと吸引することができる。

【0013】

本発明装置には1以上のポンプと複数個の弁を含めることもできる。該ポンプは緩衝液を緩衝液貯槽から微孔性中空纖維膜の内腔へと、また洗剤液を洗剤液貯槽から微孔性中空纖維膜の内腔へと、それぞれ輸送するための液圧を与える。また複数個の弁は開閉式にして、真空源由来の真空を膜外室へと適用し、以って微孔性中空纖維膜内の緩衝液、洗剤液、及び細胞試料の一部が内腔から膜外室へと制御可能に吸引されるようになることができる。またポンプからの液圧は方向制御により、緩衝液を緩衝液貯槽から内腔へ、緩衝液を緩衝液貯槽から細胞試料容器へ、更に洗剤液を洗剤液貯槽から内腔へと輸送するように利用することができる。別の態様では、本発明装置にポンプと弁を制御するためのコンピューター制御器を含めることができる。

【0014】

本発明はまた、試料細胞から干渉物質を除去するための細胞洗浄装置及び細胞試料を分析するための細胞分析装置を含むことを特色とする。細胞洗浄装置は前述のとおりであり、細胞分析装置は任意の細胞分析装置とすることができます。細胞分析装置は、好ましくはフローサイトメーターなどのように蛍光を測定する。

【0015】

本発明はまた含細胞試料から干渉物質を除去するための自動化された方法に関する。該方法は、第1試料容器中の血液細胞試料に真空力を作用させて該血液細胞試料をろ材へと接触させるステップ、ろ材と接触している血液細胞試料に力を作用させ、それにより血液細胞試料中の干渉物質がろ材を通過する一方で血液細胞試料中の細胞はろ材を通過しないようにするステップ、及びろ材から細胞を回収するステップを含む。本方法ではろ材は、細胞の通過を妨げるような大きさの微孔を多数もつ微孔性中空纖維膜を含むことができる。

【0016】

本発明はまた、試料中の細胞上の表現型マーカーを分析するための自動化された方法を特色とする。該方法は、血液細胞と反応する1以上の試薬を血液細胞試料に加えて試験試料混合液を調製するステップ、該試験試料混合液から干渉物質を自動的に除去して洗浄済み血液細胞試料とするステップ、及び該洗浄済み血液細胞試料を分析して血液細胞の特性を判別するステップを含む。該1以上の試薬は表現型マーカーと特異的に結合する抗体とすることができるし、該抗体は蛍光試験標識を含んでもよい。試験試料混合液から干渉物質を自動的に除去するステップは試験試料混合液から50%超の干渉物質を除去することができる。

【0017】

該方法はまた、分析しようとする細胞試料中の赤血球を溶解するステップ及び/又は試験試料混合液中の細胞に結合したプローブの量をフローサイトメトリーで定量するステップを更に含んでよい。

【0018】

好ましい態様の詳細な説明

以下の好ましい態様は本発明の様々な具体例を説明する。とは言え、これらの態様の説明からは、後述の構成要素やステップをわずかに調整又は変更するだけで容易に本発明の他の態様を創り出すことができる。

【0019】

10

20

30

40

50

本書で言及する出版物、特許出願、特許及び他参考資料はすべてその全体が、参照指示により本書に組み込まれる。矛盾が見られる場合には、用語の定義を含めて本明細書に従う。更に後述の特定の態様は例示にすぎず、発明の範囲を限定するものではない。

【 0 0 2 0 】

別段の定義がない限り、本書で使用する専門用語はすべて当業者が通常理解している意味と同じである。

【 0 0 2 1 】

本発明は、ろ材を利用して分析前の体液から干渉物質を除去する自動装置及び自動方法を提供する。本書で使用する用語「自動」は人間の直接介入なしで実行されることを意味する。たとえば、ある方法が自動装置により自動で実行されると言えるのは、たとえ、該装置への命令の入力又は該方法の1以上のステップの実行さえもが手動で操作者によってなされるとしても、該方法の1以上のステップが操作者ではなく該装置の構成部品により実行されるときである。同様に、「自動化（された）」方法は自動的に実行される方法である。「干渉物質」は分析を分かりにくくする物質又は粒子を意味する。特に、干渉物質は未反応化学物質、未反応生体物質、それに赤血球残屑及び目的の細胞物質よりも小さな細胞物質などの生体粒子を含む。蛍光分析の対象となる細胞試料中の干渉物質は一般に未結合蛍光プローブや自己蛍光細胞残屑などである。試料からの干渉物質除去%は(a)試料中の残屑量の減少%か又は(b)S/N比の上昇%で表わす。

10

【 0 0 2 2 】

図1について説明すると、本発明の好ましい態様の細胞洗浄装置10は支持枠12に取り付けた試料容器保持体14及びろ過機構24を含む。試料容器保持体14は細胞試料20を入れる試料容器16を格納するが、両者は干渉物質を含有する可能性のある細胞試料20中に試料ホース22の末端を挿入しうるように配置してある。試料ホース22は真空源30と流体接続して、真空源30の起動により真空力が生じ、試料容器16から細胞試料20がホース22中に吸引されるようとする。より詳細には、真空源30から真空力を作用させてろ過機構24を負圧状態とし、試料容器16から細胞試料20がろ過機構24中に吸引されるようにする。

20

【 0 0 2 3 】

真空源30は流体を移動させるための真空力又は液圧を与えることができる任意形式の機構でよい。たとえば、真空源30は流体ポンプ又は外部真空管路でもよい。真空源30は好ましくはシリニジポンプ、たとえば、5m³/シリニジポンプとし、プランジャーの引抜き又は押込み動作によりろ過機構24に真空力又は前進液圧がかかるようにする。

30

【 0 0 2 4 】

真空源30の形式として正圧ではなく真空力を生じさせる機構が好ましいのは、真空のほうが細胞への害が少ないと判明しているためである。より詳細には、血液細胞試料20はポンプ内を循環せずに内腔66(図示せず)に入るが、細胞がポンプ内を循環したら、細胞の変形や凝集及び損傷が起こる。そこで、細胞試料20は正圧の作用で内腔66中に押し込まれるのではなく、真空力の作用で内腔66中に引き込まれるようにする。

【 0 0 2 5 】

ろ過機構24はろ過機構留め具26で支持枠12に取り付け、また試料ホース22と真空源30の間に配して真空源30により真空力をかけると細胞試料20がろ過機構24内に吸引されるようとする。ろ過機構24は、細胞試料20から未結合抗体分子又は細胞残屑などの干渉物質を除去しうる任意の機構でよい。ろ過機構24は好ましい態様では、干渉物質が通り抜けうるようなろ材を含む。用いられるろ材は微細網目スクリーン、精密ろ過用平膜、渦巻き型膜カートリッジ、又は目的細胞から干渉物質を分離しうるような任意の他のろ材などである。より好ましい態様では、ろ材は微孔性中空纖維膜であり、直径を細胞試料20中の血液細胞より小さく干渉物質よりも大きくした微孔を多数備える。

40

【 0 0 2 6 】

ろ過機構24用の好適な中空纖維膜は当業者が創り出しても、種々の販売元から購入してもよい。本発明に有用な中空纖維膜は目的細胞に対し非反応性である素材を含み、また該

50

素材は疎水性又は親水性素材、ポリスルホン、ポリエステルスルホン、ナイロン、アクリル酸メチル、P e e k (商標) (U p c h u r c h S c i e n t i f i c , I n c .)とすることができます。該ろ材は目的細胞が通過しえない大きさの微孔をもつことになる。微孔径は約0.1μm～約5μmの範囲であろう。微孔径は好ましくは、目的細胞から血小板を干渉物質として除去しうる約0.1μm～約3μmであろう。より好ましくは、微孔径は約0.2μm～約2μm、最も好ましくは約0.3μm～約1μmであろう。本発明では、約0.65μmの微孔径で首尾よく干渉物質を除去し大多数の細胞成分を分析用に残留させることができた。平均径0.65μmの微孔を多数備えた好ましい市販ポリスルホン中空纖維膜機構の一例は、A / G T e c h n o l o g y C o r p o r a t i o n (米国マサチューセッツ州ニーダム)の商品(カタログ番号C F P - 6 - D - H 2 2 L A)である。同機構は、予め蛍光抗体で染色し、赤血球を溶解し、等張緩衝液又は試薬で希釈し全量を約4mlとした代表的な100μlのヒト全血試料から大多数の干渉物質を除去するのに好適である。本発明の変法に有用な他機構はA / G T e c h n o l o g y C o r p o r a t i o n 商品のC F P - 6 - D - M B 0 1 (15cm²)とC F P - 6 - D - M M 0 1 A (24cm²)、及びS p e c t r u m L a b o r a t o r i e s , I n c . (米国カリフォルニア州ランチョドミングス)のX 1 5 E 3 0 0 0 4 NとX 2 5 E 2 0 1 0 2 Nなどである。

10

【0027】

試料容器16とろ過機構24の間の流体の流れを調節するためにホース22上に試料ホース弁23を配置する。弁23はホース22内の流体の流れを調節しうる任意形式の機構でよい。弁23は好ましくは開位置と閉位置の切替えが可能である。開位置では、試料20は真空源30などから適当な力が作用すれば試料容器16とろ過機構24の間を流れることができる。閉位置では、流体接続が遮断されるため試料20は試料容器16とろ過機構24の間を流れることができない。前述の態様の好ましい変法では、弁23が半開位置をも有し、別の流体接続により流体の流れをホース22から廃液貯槽39へと導く。

20

【0028】

図1の態様では試料容器16とろ過機構24の間の流体接続が試料ホース22により実現され、弁23により調節されるが、別の好ましい態様では試料容器16とろ過機構24の間に1以上の流体接続が存在しうる。たとえば、試料ホース22は細胞試料20を試料容器16からろ過機構24へと輸送するために用いて、細胞試料20をろ過機構24から試料容器16に戻すには戻り用のホース又は流体接続を設けてもよい。戻りホース上にも弁23と類似の流体流れ調節器を介在させることができる。更に、試料20をろ過機構24から試料容器16に戻すための流体接続は設けず、試料20をろ過機構24から試料容器16の代わりに未使用試験管などのような清浄な試料容器に輸送するための別の流路を設けてもよい。

30

【0029】

図1に戻ると、真空源30とろ過機構24の間の流体接続内に真空源弁32を配置して、真空源30とろ過機構24の間の真空伝達を制御しうるようにする。弁32は好ましくは開位置と閉位置の切替えが可能である。開位置では、真空源30の起動によりろ過機構24に真空力がかかり、試料20が容器16から機構24内へと吸引される。閉位置では、真空源30と機構24の間で真空力の伝達が起こらない。

40

【0030】

真空源30は、廃液ホース37で廃液貯槽39と流体接続することもできる。真空源30は前述のように、前進液圧を与えるようにもしてある。この液圧を利用すれば流体を真空源30の近位部から廃液貯槽へと移動させることができる。たとえば、真空源30が好ましいシリジポンプ形式を取るとき、弁32及び23を開にしてシリジポンプのプランジャーを引き抜くと真空力により干渉物質と細胞試料20とを含む流体が吸引されてシリジの外筒内部へと分散する。この状態でプランジャーを押し込むと流体はシリジから押し出される。弁32を閉にしておけば、流体は廃液ホース37経由で廃液貯槽39へと導かれる。前記態様の代替変法では、真空源30を利用する代わりに追加の真空源、ポン

50

又は液圧変換器を使用して流体を真空源30の近位部から廃液貯槽39へと導くことができる。この変法が好ましいのは、廃液貯槽39と試料容器16及びそれらに付随する流体接続との間の潜在的な相互汚染を防止するのが望ましい場合である。

【0031】

ろ過機構24はまた、緩衝液ホース46で緩衝液貯槽48と流体接続することもできる。緩衝液貯槽48は、細胞試料20と相溶性の任意の等張液としうる緩衝液49を入れておく容器である。好適な緩衝液は生理食塩水又はリン酸緩衛生理食塩水(PBS)及びハンクス緩衝液などである。緩衝液49用として好ましい等張液はIsoFlow(商標)緩衝液、PBS及びIMMUNO-TROL(商標)Final Storage緩衝液(いずれも米国カリフォルニア州フラートンのBeckman Coulter, Inc.の商品)などである。10

【0032】

ろ過機構24と貯槽48の間には、ホース46で流体接続された緩衝液ポンプ40がある。緩衝液ポンプ40は液圧により緩衝液49を貯槽48からホース46、ろ過機構24及び試料ホース22経由で試料容器16へと導く。ポンプ40は緩衝液貯槽48、機構24及び試料容器16の間に液圧を生じさせる任意形式の機構、たとえば真空ポンプ、蠕動ポンプ、往復ポンプ、又は当業者に周知の他形式のポンプでよいが、好ましい態様ではシリジポンプである。

【0033】

貯槽48と機構24の間のホース46上には貯槽48と機構24の間の緩衝液の流れを制御するための緩衝液弁42がある。弁42は流体の流れを調節する任意の形式の弁でよいが、好ましくは吸込み位置、吐出し位置、閉位置のいずれかを選べる三位栓様の弁とする。吸込み位置では、ポンプ40と緩衝液貯槽48が流体接続されて、ホース46への液圧の伝達が可能になり、それがポンプ40をして緩衝液49を緩衝液貯槽48から緩衝液ホース46中に、又はポンプ40がシリジポンプである場合にはシリジ室中に、吸引させる。吐出し位置ではポンプ40と機構24が流体接続されるため、ポンプ40の起動たとえばシリジのプランジャーの押込みにより緩衝液49をポンプ40から機構24へと、また弁23が開の場合には試料容器16へと、導く。従って図1では、弁42を開にし、弁32を開にし、また弁23を開にした状態でポンプ40を起動すれば、緩衝液49によってろ過機構24内に留まる血液細胞試料20を試料容器16へと追い戻すことができる。弁42が閉であれば、貯槽48、機構24及び容器16の間の流体接続は遮断される。20

【0034】

洗剤液貯槽58は洗剤液ホース56によりろ過機構24と流体接続されている。洗剤液貯槽58はろ過機構24と装置10の流体接続手段の清浄処理に好適な洗剤液59を入れる容器である。洗剤液59は装置10の流体接続手段から残留試料、沈積物、タンパク質、核酸等を除去しうる任意の溶液でよい。洗剤液は、たとえば、0.5N NaOH溶液、1N KOH溶液、H₃PO₄溶液、0.05~10%漂白剤溶液又は類似の溶液でよい。洗剤液はTriton X-100(Rohm and Haas)、Tween 80(登録商標)(ICI America)、ブルロニック酸(BASF Corp.)、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、アジドなどの物質及び流体接続手段を清浄処理しうる他物質を含んでもよい。洗剤液59として使用するのが好ましい一組成物はCOULTER CLENZ(登録商標)(Beckman Coulter, Inc.米国カリフォルニア州フラートン)の商品名で販売されている溶液である。30

【0035】

洗剤液ポンプ50は液圧により洗剤液59を貯槽58からホース56経由でろ過機構24へと導く。ポンプ40と同様にポンプ50は洗剤液貯槽58と機構24の間に液圧を生じさせる任意形式の機構、たとえば、真空ポンプ、蠕動ポンプ、往復ポンプ、又は当業者に周知の他形式のポンプでよいが、好ましい態様ではシリジポンプである。40

【0036】

洗剤液ポンプ50と緩衝液ホース56の間のホース56上には貯槽58と機構24の間の洗剤液59の流れを制御するための洗剤液弁52がある。弁42と同様に弁52は流体の流れを調節する任意の形式の弁でよいが、好ましくは吸込み位置、吐出し位置、閉位置のいずれかを選べる三位栓様の弁とする。吸込み位置では、洗剤液ポンプ50と洗剤液貯槽58が流体接続するため、ホース56へと液圧の伝達が可能になり、それがポンプ50をして洗剤液59を洗剤液貯槽58から洗剤液ホース56中に、又はポンプ50がシリンジポンプである場合にはシリンジ室中に、吸引させる。吐出し位置では、ポンプ50と機構24が流体接続するため、弁32が閉で弁23が開のとき、ポンプ50の起動たとえばシリンジのプランジャーの押込みにより洗剤液59をポンプ50から機構24へと導く。また弁32が開で弁23が閉のときには、ポンプ50の起動により、真空源30の協力を得て又は該協力なしで、洗剤液59をしてろ過機構24内に留まる任意の流体又は物質を廃液貯槽39へと洗い流させることができる。弁52が閉ならば、貯槽58と機構24の間の流体接続は遮断される。

【0037】

装置10には、前述の緩衝液及び洗剤液機構の他に、他機構を含めることもできる。たとえば、赤血球溶解剤を添加するための機構を含めることができる。同様に、1以上の細胞マーカープローブ、たとえば、蛍光標識した抗原特異抗体を添加するための機構を装置10に含めることもできる。更に、1以上の細胞分析装置、たとえば、血液分析装置及びフローサイトメーターとの流体接続手段を設けることができる。従って、本発明は、血液細胞試料中の赤血球を溶解すること、細胞マーカープローブを血液細胞試料に添加すること、溶解した赤血球細胞の残屑及び未結合細胞マーカープローブを血液細胞試料から除去すること、及び細胞分析装置を用いて残存細胞を定量しまた特異的細胞マーカーを定量することにより、全血試料の自動処理を可能にする装置を包含する。

【0038】

好ましい態様では、装置の多様な構成部品をコンピューターなどの情報処理装置で制御する。すなわち弁23、32、42及び52、それに真空源30、ポンプ40及び50は、弁を開閉し真空源及びポンプを起動するためのオペレーティングアルゴリズムを予め内部にプログラムしてある情報処理装置(図示せず)へと操作可能に接続する。該情報処理装置はサーボ、ロボットアーム、歯車等の電気式、油圧式又は機械式マニピュレーターを介してポンプ、弁、真空源、及び装置10の他構成部品を作動させることができる。たとえば、一態様では、ホース22をロボットアームに取り付けければ、情報処理装置からの命令に従ってホース22の接続先を試料容器と他の場所(たとえば別の容器が置いてある場所)との間で変更させることができる。

【0039】

図2は、特に好ましい態様のろ過機構24を更に詳しく示す。本発明装置のこの好ましい態様では、ろ過機構24は内壁とそれによって形成された内腔66をもつ管状体の中空纖維膜60を含む。ろ過機構24はろ過機構に対して縦向きの底部出入口62を更に含み、管状膜60により試料ホース22と内腔66が流体接続されている。細胞試料20などの流体は試料ホース22から出入口62を通って内腔66に流入しうる。ろ過機構24はまたろ過機構に対して縦向きの頂部出入口64を含み、管状膜60によりホース46及び56と内腔66が流体接続されている。緩衝液49(図示せず)は緩衝液ホース46から出入口64を通って内腔66に流入しうる。同様に、洗剤液59(図示せず)も洗剤液ホース56から出入口64を通って内腔66に流入しうる。

【0040】

図2、3及び4A～4Kは膜60を1個だけ示すが、別の好ましい態様では機構24は2個以上の内腔66を形成する2個以上の膜60を含むことができる。特に、ろ過機構24はそれぞれ内腔を有する2個の膜を有し、都合2個の内腔を含むことができる。ろ過機構はより好ましくは3個の内腔を形成する3個の膜を含み、最も好ましくは4個の内腔を形成する4個の膜を含む。内腔が2個以上だと処理流量が増すと判明している。更に、内腔

が2個以上だと汚れが少なくなり、清浄サイクルが少なくて済むと判明している。またその一方で、ろ過機構内の膜は20個未満、従って内腔も20個未満とするのが好ましく、膜も内腔も10個未満とするのが最も好ましい。

【0041】

図2に示すように、ろ過機構24の外表面は好ましくは中空纖維膜60と膜外室68を外囲する非反応性、不透過性のハウジング70を含む。膜外室68はハウジング70の内壁と管状膜60の外壁の間の空間である。ろ過機構24に対し横向きとすることができる真空及び廃液出入口34は、膜外室68を真空源30及び廃液ホース37と流体接続する開口部である。出入口34は従って、不透過性ハウジングの壁を貫いて飛び出し、たとえば真空源30から真空力を出入口34に作用させると真空力は膜外室68に伝達される。膜外室68が真空になると流体と干渉物質72が内腔66から膜60を通過して膜外室68中に、さらには出入口34から外へと排出される。弁32を閉じて真空源30から前進液圧を加えれば、排出された流体と干渉物質72を廃液貯槽39へと導くことができる。

【0042】

機構24は、好ましくは、ハウジング70中に格納された膜60の全部分から流体と干渉物質が排出されうるように配置する。たとえば出入口34は好ましくは、真空源30からの真空が膜60の縦方向に対してほぼ直角に向けられるよう該機構上に配置する。こうした側面への真空の適用が好ましいのは、膜60の一端へと細胞を押し込むような機構（これはポンプを使用して膜60の内腔の内圧を高め膜の微孔から細胞を押し出すときに起こる）と比べて細胞への圧迫が少ないからである。

【0043】

図3は、目的細胞を選択的に保持する一方で干渉物質は通過させてしまうろ過機構24の好ましい仕組みの図解である。細胞試料20は細胞74と干渉物質72、たとえば、未結合プローブや細胞残屑の混合物として内腔66の液体媒質中に分散している。中空纖維膜は多数の微孔65を備えており、微孔平均径は細胞74の平均径よりも小さく、干渉物質72の直径よりも大きい。従って干渉物質72は微孔65を通過するが、より大径の細胞74は通過しない。出入口34から膜外室68に真空を作用させると、細胞試料20を分散させた液体は干渉物質72ごと微孔65を通って膜外室68に排出される。細胞74は大きすぎて微孔65を通り抜けられず内腔66内に選択的に保持される。

【0044】

図3に示す態様では、膜60は任意好適の素材からなる。膜の素材は、たとえば、疎水性又は親水性ポリマーでもよい。好ましい態様では、膜60の素材は微孔性ポリスルホンである。当業者は分析する細胞試料の性質に応じて膜60の微孔65径を適宜決定することができる。ヒトの白血球を分析するなら、微孔65は好ましくは平均径を約0.2~2.0μm、より好ましくは約0.3~約1μmとする。膜60の表面積もまた、分析する試料の特性、試料容量、及び使用する膜の種類といった要因に応じて当業者が選択することができる。たとえば、100μlのヒト全血試料を等張緩衝液で処理し次いで希釈して全容量を約4mlとした場合、試料中の干渉物質をほぼ除去するには直径0.65μmの微孔を備えた中空纖維膜20cm²で十分である。1ml試料の場合、好ましい内腔容積は約50μl~約2500μl、好ましくは約200μl~約1000μlであり、また好ましい膜外室容積は約100μl~約2500μl、好ましくは約500μl~約1000μlである。試料の容量と種類次第で、他の内腔容積及び膜外室容積が好ましい場合もある。膜60はまた非溶解性の界面活性剤、たとえば、Pluronic F68やPluronic 25R8(BASF Corp.)で処理して、その再使用適性を、試料20中の細胞に関する細胞計数や細胞マーカー密度にさほどの悪影響を及ぼすことなく、高めることもできる。

【0045】

本装置の好ましい操作の概略を図4A~4Eに示す。図4Aでは装置10は試料細胞20と流体連絡した試料ホース22を備える。たとえば、細胞試料20は溶解試薬、安定化緩衝液、及び固定剤たとえばIMMUNOPREP(商標)試薬(Beckman Co.

10

20

30

40

50

l t e r , Inc. 米国フロリダ州マイアミ、製造)を使用して予め処理した100μlの全血でもよい。図4B及び4Cに示すように、試料20は干渉物質72の除去%を高めやすくするために緩衝液49で希釈する。緩衝液貯槽48から試料容器16に既定量の緩衝液49を移して、たとえば、試料の総容量を約4mlとするには、装置10をコンピューター制御機構(図示せず)により、弁23が開、弁32と弁52が閉となるように設定する。次に図4Bに示すように、緩衝液弁42を吸込み位置に切り替え、緩衝液ポンプ40を起動して既定量の緩衝液49を吸引する。次に図4Cに示すように、弁42を吐出し位置に切り替え、ポンプ40を起動して吸引量の緩衝液49がろ過機構24を経由して試料容器16中に配給され、以って試料細胞20が希釈されるようとする。

【0046】

次に図4Dに示すように、試料20をろ過機構24中に吸引し、そこで干渉物質を膜60に通して試料から除去する。このステップでは、弁42と52が閉、弁23と32が開となるように装置10を設定する。次に真空源30を起動して真空を発生させ、細胞試料20が容器16からろ過機構24中に吸引されるようとする。真空がかかると、試料20中の干渉物質を含む液体は機構24を通過して真空源30へと吸引されるが、細胞は機構24中の内腔66に留まる。次に図4Eに示すように、弁32を閉じ、真空源30を起動して前進液圧を与え、吸引した液体を廃液ホース経由で廃液貯槽39に排出する。

【0047】

次に図4F及び4Gに示すように、干渉物質を除去した後の細胞試料20を容器16に戻す。このステップでは、弁23が開、弁32と52が閉となるように装置10を設定する。次に図4Fのように、緩衝液弁42を吸込み位置に切り替え、緩衝液ポンプ40を起動して緩衝液貯槽48から既定量の、たとえば、1.25mlの緩衝液49を吸引する。次に図4Gに示すように、弁42を吐出し位置に切り替え、ポンプ40を起動して吸引量の緩衝液49をろ過機構24経由で試料容器16に分配する。緩衝液49をろ過機構24に通すことで試料20はろ過機構から容器16へと押し流される。別の態様(図示せず)では、機構24から試料容器16ではなく清浄試料容器に至る追加の流体接続を設けて、干渉物質を除去した後の細胞試料20を機構24から清浄容器へと導くようとする。

【0048】

装置10は図4H～4Kに示す要領で洗浄することができる。装置の洗浄は各試料処理後に、所定件数の試料処理後に、又は膜60の汚れに応じて、行うことができる。洗浄ステップでは弁23が半開、弁32と42が閉となるように装置10を設定する。次に図4Hに示すように、洗剤液弁52を吸込み位置に切り替え、洗剤液ポンプ50を起動して洗剤液貯槽58から既定量の、たとえば、3mlの洗剤液59を吸引する。次に図4Iに示すように、弁52を吐出し位置に切り替え、ポンプ50を起動して吸引量の洗剤液59をろ過機構24中に配給する。弁23が半開のため、洗剤液59はホース100経由で廃液貯槽39へと排出される。次に図4Jに示すように、装置24内に残留する洗剤液59を残らず排除するために、緩衝液弁42を吸込み位置に切り替え、緩衝液ポンプ40を起動して緩衝液貯槽48から既定量の、たとえば、3mlの緩衝液49を吸引する。

【0049】

図4Kでは、緩衝液分配ステップに先立って、弁23を閉じ、弁32を開に切り替えることができる。弁42を吐出し位置に切り替えポンプ40を起動して、緩衝液49が配給され、ろ過機構内の残留洗剤液59と緩衝液49が廃液ホース経由で廃液貯槽39に排出されるようとする。代りに、又は加えて、弁23を半開にし弁32を閉じ、また弁42を吐出し位置に切り替えて、ポンプを起動し吸引量の緩衝液49をろ過機構24及びホース100経由で貯槽39に導く。以上の諸ステップを反復して機構24を多既定量の緩衝液で洗浄することにより、次の試料の分析に移れるようとする。

【0050】

図5にみると、本発明は試料細胞から干渉物質を除去する方法をも包含する。細胞試料から干渉物質を除去する好ましい方法は、真空力を血液細胞試料に作用させて該血液細胞試料を試料容器16から吸引し、ろ材と接触させる第1ステップ80を含む。前述のように

10

20

30

40

50

これは真空源により実現されるが、該真空源は一般に約4m¹の血液細胞試料を約7秒で試料容器から吸引し、ろ膜に通すことができる。当業者には自明であるが、試料容器16から吸引する血液細胞試料の量を加減することができ、時間も加減することができる。該真空力の制限は、細胞が内腔66内に保持される際に作用する細胞を凝結させるような力を下回る量であろう。好ましくはその力は細胞を変形させるような力を下回るだろう。

【0051】

本方法は、血液細胞試料に力を作用させてろ材に接触させ、以って血液細胞試料中の干渉物質がろ材を通過する一方で血液細胞試料中の目的細胞はろ材を通過しないようにする第2ステップ82を含む。本発明の好ましい態様では、干渉物質をしてろ材を通り抜けさせるために血液細胞試料にかける力は、血液細胞試料を試料容器から吸引するために用いる真空力と同じである。しかし、該力は別個の液圧とし、血液細胞試料が試料容器16から吸引された後に、血液細胞試料に作用させて血液細胞試料を内腔中に、さらには膜の外に押し出すことも当然可能である。ただし真空のほうが細胞への害は少ないと判明している。該力の制限は、細胞が内腔66内に保持される際に作用する細胞を凝集させるような力を下回る量である。好ましくは、それは細胞を変形させるような力を下回るだろう。

10

【0052】

本方法は、ろ材から細胞を回収する第3ステップ84を含む。好ましい態様では、細胞の回収は本発明の装置により、ある容量の緩衝液を内腔頂部から圧入して内腔内に残留する細胞を内腔底部経由で試料容器に戻すという方法で行う。あるいは残留血液細胞を内腔底部経由で新試料容器に導き、該容器を回収血液細胞の保存に使用するようにしてもよい。

20

【0053】

本方法のさらに好ましい態様では、血液細胞試料をまず各1容積の血液細胞試料に対して、1容積以上の緩衝液で希釈する。更にお好ましくは、全血試料細胞を2容積以上の緩衝液で希釈してから内腔に導き干渉物質を除去するようにする。全血細胞試料の1容積の希釈では70%超の干渉物質が血液細胞試料から除去され、2容積の希釈では80%超の干渉物質が血液細胞試料から除去されると判明している。90%超の干渉物質を血液細胞試料から除去するには血液細胞試料の3容積の希釈が望ましい。

【0054】

本方法の諸ステップは、前述のステップを自動化することになる本発明の装置を用いて実現することができる。本書では、本方法の1サイクルは血液細胞試料の1洗浄サイクルと考えられる。もっと具体的に言えば、血液細胞試料の1洗浄サイクルは、血液細胞試料に真空力を作用させて血液細胞試料をろ材と接触させること、ろ材と接触している血液細胞試料に力を作用させて、以って血液細胞試料中の干渉物質がろ材を通過する一方で血液細胞試料中の細胞はろ材を通過しないようにすること、及び細胞を内腔から回収することを含む。従って、本発明の血液細胞試料の1洗浄サイクルは5分未満で実施することができる。好ましくは、血液細胞試料の1洗浄サイクルは3分未満、より好ましくは1分未満で実施される。更にもっと好ましい態様では、血液細胞試料の1洗浄サイクルは30秒未満で実施される。最後に、最も好ましい態様では血液細胞試料の1洗浄サイクルは15秒未満で実施される。

30

【0055】

多洗浄サイクルは細胞膜の収縮や細胞膜の破裂といった細胞の劣化の原因となることがすでに判明している。更に、血液細胞試料の希釈に使用する緩衝液に血清物質を添加すると劣化が最小限に抑えられることも判明している。本書では、血清物質はコレステロール、コレステロールエステル、血漿中に見出される1以上の他の化合物と結合したコレステロール、及びそれらの混合物を包含するものとする。好ましくは、そうした他の化合物はリポタンパク質、リン脂質、及びそれらの混合物を包含する。当業者には自明であるが、コレステロールは一般に約30%のエステルを含むだろう。やはり当業者には自明であるが、リポタンパク質はコレステロールを水溶液中に維持するだろう。血清物質は、好ましくは、コレステロール、コレステロールエステル、リポタンパク質コレステロール、リポタンパク質コレステロールエステル、リン脂質と結合したコレステロール、及びそれらの混

40

50

合物からなる群より選択される。

【0056】

図14は緩衝液へのウシ胎仔血清添加%と細胞事象回収率の向上との関係を示す。この図では、血液細胞試料を図中の「発明」として示される中空纖維膜装置で3回洗浄している。ウシ胎仔血清が増加すると、多洗浄サイクル後の細胞回収%が増加することを示している。

【0057】

また、血清物質を添加しない血液細胞試料の1洗浄サイクルでも高脂質含量の血液細胞試料のヒストグラムに見られるリンパ球及び好中球部分母集団の間のバナナ状の外観は排除されることも判明している。

【0058】

本方法の一実施例では、第1ステップ80で細胞試料、たとえば、一被検者から静脈穿刺で採取した100μlのヒト全血を準備することにより実施される。赤血球を除去する必要があれば、該試料を赤血球溶解試薬、たとえば、600μlのギ酸で希釈し、次いで該赤血球溶解試薬を中和する試薬、たとえば、265μlの炭酸塩緩衝液を添加して更に希釈する。随意に、固定剤、たとえば、100μlのパラホルムアルデヒド溶液を添加して細胞試料を固定してもよい。血液細胞試料は等張緩衝液で希釈して総容量を4mlとする。これらのステップに好適な試薬はBeckman Coulter, Inc.から入手可能である[IMMUNOPREP(商標)試薬系品番7546999又はSCATTER PAK(商標)試薬系]。次いで真空力を希釈血液細胞試料に作用させ、該試料をろ材に接触させる。ろ材は、好ましくは中空纖維膜(たとえば、A/G Technology CorporationのCat#CFP-6-D-H22LA)である。

【0059】

第2ステップ82では、ろ材に接触している血液細胞試料に力を作用させ、希釈血液細胞試料中の干渉物質がろ材を通過する一方で血液細胞試料中の目的細胞はろ材により保持されるようにする。すなわち、希釈血液細胞試料中の目的細胞はろ材を通過しない。中空纖維膜を使用する場合には、目的細胞は内腔内に残留する。好ましくは、真空力を血液細胞試料に作用させて干渉物質がろ材を通過する一方で目的細胞は内腔内に残留するようとする。

【0060】

最も好ましい態様では、干渉物質にろ材を通り抜けさせるために使用する真空力は血液細胞試料を試料容器から吸引する役目も果たす。すなわち、ろ過機構は緩衝液で満たされ、試料容器と流体連絡する。従って、十分な真空力が試料容器内の希釈血液細胞試料に作用すると、希釈血液細胞液は試料容器からろ過機構に吸引され、干渉物質はろ材を通過する。これは細胞容器からろ材を通過するまでの血液細胞試料の連続した流れによって実現される。前述のように、本発明の装置はこれらの機能を果たすうえで必要な真空力を自動的に作用させることができる。

【0061】

第3ステップ84はろ材からの細胞の回収である。これは力、たとえば、液体の流れなどをろ材に対して、ステップ80で血液細胞試料をろ材に接触させた力の向きとは反対向きに作用させることにより実現することができる。該液体の流れは目的細胞をろ材から引き離すであろう。回収細胞はその後、流体連絡により分析装置へと導くことができる。好ましくは、回収細胞は試験管に戻され、次いでその試験管は分析装置へと移送される。

【0062】

図6にみると、本発明は表現型マーカーについて細胞を分析する方法も包含する。試料中の細胞上の表現型マーカーを分析する好ましい方法は、分析しようとする細胞試料に該表現型マーカーと結合するプローブを加えて試験試料混合液を形成する第1ステップ90、血液細胞試料に真空力を作用させて血液細胞試料をろ材に接触させる第2ステップ92、ろ材に接触している血液細胞試料に力を作用させ、以って血液細胞試料中の干渉物質がろ材を通過する一方で血液細胞試料中の細胞はろ材を通過しないようにする第3ステップ9

10

20

30

40

50

4、及びろ材から細胞を回収する第4ステップ96を含む。該方法は更に、プローブ量を定量し細胞集団を識別する第5ステップ98(図示せず)を含んでもよい。

【0063】

ステップ92、94及び96の実行は図5のステップ80、82及び84と同じ要領による。ステップ98は、干渉物質を除去した後の試験試料をフローサイトメーター又は類似装置により分析することにより実施できる。

【0064】

たとえば、本方法の好ましい態様である、第1ステップ90では、飽和濃度の蛍光標識抗原特異抗体を血液細胞試料に添加して試験試料混合液を形成する。また第5ステップ98では、処理済みの試験試料混合液をフローサイトメーターにかけて処理済みの試験試料混合液中の各細胞に結合した蛍光標識抗原特異抗体の量を定量することにより実施できる。

【0065】

以上の説明から、本発明の装置及び方法は分析される細胞試料からの干渉物質の除去を容易にすることが理解されよう。以下、実施例を以って本発明を更に説明するが、以下の実施例は請求項記載の本発明の範囲を限定するものではない。

【0066】

実施例1 - 細胞洗浄装置

中空纖維膜カートリッジ(A/G Technology Corporation, cat# CFP-6-D-H22LA)を用いて装置を製作した。該装置は、数本の $12 \times 75\text{ mm}$ 培養管を保持するよう改造したカルーセル型細胞試料保持体を備える。代りに、該装置は他タイプの管保持体、たとえば、カセットを備えてもよい。該装置はまた、細胞試料を該管から吸引し、中空纖維膜カートリッジによるろ過で該試料から干渉物質を除去してから該管に戻せるようにするための種々のホース、弁及びポンプを備える。発明の詳細な説明でも述べたように(たとえば図4A~4Kに関する説明を参照)、該装置はまた、廃液(たとえば、干渉物質を含有するろ液)を廃液貯槽に排出し、また中空纖維膜を清浄処理したうえで新たな試料に使えるようにするための種々のホース、弁及びポンプを備える。該装置はまた、細胞試料洗浄工程と膜清浄処理手順とを連係させるためのコンピューター化システムを備える。カルーセル型試料保持体は回転可能であり、またコンピューター化システムの制御により、第1細胞試料の処理後に第2細胞試料を入れた第2管の位置を変えて、第2管から第2細胞試料を吸引し、中空纖維膜カートリッジによるろ過で試料から干渉物質を除去してから第2管に戻せるようにしてある。カルーセル内の全試料を洗浄するまでこのサイクルを繰り返すことができる。

【0067】

実施例2 - 細胞洗浄方法

実施例1の装置の使用方法を含めて種々の方法を用いて、前述の一般方法に従って処理した細胞試料から干渉物質を除去した。標準方法により細胞集団を蛍光標識抗体で染色した。たとえば、 $100\mu\text{l}$ のヒトの全血試料を一ヒト被検者から静脈穿刺法で採取し、次いで該全血試料に抗原特異的FITC標識抗体の $1\text{mg}/\text{ml}$ 溶液を $10\mu\text{l}$ 加えた。次に試料を室温で10分間インキュベートした後、Beckman CoulterのIMMUNOPREP試薬系とTQ-Prep装置を用いてメーカーの説明書に従って赤血球を溶解した(混合しながら溶液A $600\mu\text{l}$ で8秒間、混合しながら溶液B $265\mu\text{l}$ で10秒間及び混合しながら溶液C $100\mu\text{l}$ で10秒間)。次に処理済み血液細胞試料の分取量に次の3種の異なるプロトコールのいずれかを適用した:

【0068】

A. 等張緩衝液で希釈して総容量を約 4ml とし、次いで「Quick Spin」洗浄プロトコールに従い1回洗浄した。Quick Spin洗浄プロトコール:標準遠心機を用いて $400\times g$ で5分間遠心し、上清を捨て、 1ml の等張緩衝液に再懸濁する。

【0069】

B. 等張緩衝液で希釈し総容量を約 4ml とし、次いで「Sorvall」プロトコールに従い1回洗浄した。Sorvall洗浄プロトコール:標準遠心機を用いて $400\times g$ で5分間遠心し、上清を捨て、 1ml の等張緩衝液に再懸濁する。

10

20

30

40

50

ロトコールに従って、Sorval Cell Washer 2を用いて1回洗浄した（Autoモード80秒、高速2950～3000 rpm；デカント600 rpm）（洗浄後の細胞は最終容量1mlの等張緩衝液に再懸濁）。

【0070】

C. 等張緩衝液で希釈し総容量を約4mlとし、次いで実施例1の装置を用いて1回洗浄した（洗浄後の細胞は最終容量1mlの等張緩衝液に再懸濁）。

【0071】

実施例3 - 細胞試料の分析

実施例2に従って、ヒト全血試料を細胞表面抗原CD56に対応する蛍光標識単クローナン抗体と反応させ、赤血球を溶解し、固定化した。「TQ-Prep」試料は無洗浄である。10
 「Quick Spin」試料は実施例2で述べたQuick Spinプロトコールに従って洗浄した。「3ml予備希釈」試料は中空纖維膜装置を用いて実施例2Cのプロトコールに従って1回洗浄した。「2×洗浄」試料は中空纖維膜装置を用いて実施例2Cのプロトコールに従って2回洗浄した（2回目の洗浄には2ml予備希釈を用いた）。次にCOULTER EPICS XLフローサイトメーターによりメーカーの説明書に従い、処理済み血液細胞試料のフローサイトメトリーを行った。残屑%（光散乱分析で求めた）、CD56⁺細胞%、及びS/N比（ヒストグラムから外挿）に関する結果を図7に示す。

【0072】

残屑の量はどの試料も低かったが、中空纖維膜装置で2回洗浄した試料の残屑が比較的高かった。残屑の増加は希釈液に血清物質を添加しなかったことによる細胞劣化に起因した。20
 CD56細胞の%はQuick Spinでも中空纖維膜装置でもほぼ同じであった。S/N比は、どの洗浄プロトコールを用いても無洗浄コントロールを大幅に上回った。試料を中空纖維膜装置で2回洗浄すると最高のS/N比が得られた。

【0073】

無洗浄試料に関する同様の実験では、平均残屑%は10.3%、平均S/N比は11.4であった。本書では、残屑は測定下限値を下回る事象をいう。これに対して、中空纖維膜装置を使用した場合の平均残屑%は2.5%であったが、これは当初10.3%あった残屑の75%超が除去されたことを意味する。更に平均S/N比は23.8であったが、これはS/N比が200%超も改善したことを意味する。Quick Spinプロトコールの場合には、平均残屑%は2.6%、平均S/N比は38.7であった。他の実験では、細胞試料を中空纖維膜装置で2回又は3回洗浄すると、干渉物質がより多く除去され、S/N比もさらに向上した。30

【0074】

実施例4 - 細胞回収の評価

ヒトの全血試料を処理し、実施例2で説明したプロトコールに従って洗浄し、次いでEPICS XLフローサイトメーターによりメーカーの説明書に従いフローサイトメトリーを行った。図8に示すように、細胞回収結果（処理後の全血試料100μlから回収した表示細胞型の数）は、試料のいずれの画分すなわちリンパ球、単球、顆粒球でも細胞の損失がほとんど又はまったく起こらなかったことを示している（細胞型は光散乱法で判定）。更に、実施例1の装置を使用した細胞回収はQuick Spinによる細胞回収とほぼ同等であった。「TQ-Prep」試料（n=5）は無洗浄であり、「Quick Spin」試料（n=5）は前述のQuick Spinプロトコールに従って洗浄した。「自動」試料（n=32）は中空纖維装置で1回洗浄した。40

【0075】

実施例5 - 正確さ

数人のドナーに由来するヒトの全血試料をCD56識別用に染色し、処理し、実施例2に記載の種々のプロトコールに従って洗浄した。「TQ-Prep」試料は無洗浄であり、「Quick Spin」試料は前述のQuick Spinプロトコールに従って洗浄した。「中空纖維」試料は中空纖維装置で1回洗浄した。次いでEPICS XLフロー50

サイトメーターによりメーカーの説明書に従いフローサイトメトリーを行った。図9に示すように、CD56⁺細胞%はドナーによりまちまちであったが、各ドナーに関してはQuick Spinを用いようが中空纖維装置を用いようがほぼ同じであった。

【0076】

実施例6 - 精密さ

一ヒト全血試料の32分取量をCD56識別用に染色し、処理し、実施例2に記載の種々のプロトコールに従い洗浄し、次いでCOULTER EPICS XLフローサイトメーターによりメーカーの説明書に従いフローサイトメトリーを行い各分取量のCD56⁺細胞の%を求めた。32分取量の平均CD56⁺%は17.44%であり、標準偏差は0.74、変動係数は4.27%であった。28分取量に関する同様の実験では平均CD56⁺細胞%は15.6%、標準偏差は0.6、変動係数は3.5%であった。

【0077】

実施例7 - 細胞の持越し

全血細胞試料を実施例2の要領で処理し、次いで通常細胞濃度の4倍に濃縮した。次に各試料を実施例1の装置を用いて洗浄した(実施例2Cのプロトコールに従って洗浄し、試料洗浄後に中空纖維膜を清浄処理)。次に該装置を用いて、細胞を含まず緩衝液だけを含む空試料を「洗浄」した。フローサイトメーターで空試料を分析し、細胞の存在量を調べた。図10に示すように、試験から試験への細胞の持越しはごくわずかで、0.00%~0.03%の細胞が後続の分析に持ち越されたにすぎない。

【0078】

実施例8 - 他の適用分野

本発明の装置及び方法は本書で明記していない他の分析にも適用しうる。こうした他の適用分野はたとえば尿タンパク分析である。また、細胞分析方法の一環として従来遠心を利用してきた分野は本発明の中空纖維膜装置及び方法の適用が特に見込まれる。たとえば、多様な細胞集団がすでに本装置を使用して分析されている。更に本発明には多種多様なプローブがすでに使用されている。中空纖維膜装置を首尾よく適用することができた試料は、赤血球を溶解処理した全血試料の他に、たとえば、細胞系、精製白血球亜群、赤血球、血小板、骨髄細胞、及び脳脊髄液・滑膜液・腹膜液・腹水・胸膜液・心膜液中の細胞、及びホモジナイズ処理した組織などがある。血液バンク分野で血液型判定や適合性試験などに常用される赤血球凝集試験法は従来遠心法に依存しているが、本発明の方法及び装置を使用して実行するよう容易に調整することができる。

【0079】

本発明に首尾よく使用してきたプローブには蛍光標識単クローニング抗体などがあるが、これらの抗体は細胞表面抗原、たとえば、免疫グロブリン、カッパ-及びラムダ-因子、CD5、CD7、CD10、CD13、CD19、CD33、CD34、CD38、CD41、CD45、CD41、CD42b、CD61、CD63、CD64、CD71及びCD117、並びに細胞内抗原、たとえば、種々の型のヘモグロビンに対して特異的である。他の様々な抗体及び非抗体プローブ、たとえば、細胞表面の受容体分子と結合する化学及び生物コンストラクト、細胞内の細胞性酵素と反応する酵素基質、細胞内の細胞質抗原と反応する抗体及び非抗体プローブ、細胞内の核酸配列と反応するDNA及びRNAプローブ、それに細胞内の細胞質-及び核-構造物と反応する種々の細胞内染料も本発明に適合するものと見込まれる。従って、ほとんどの種類の細胞及びプローブが、特に選択した中空纖維膜の微孔が選択した細胞型よりも大きく、選択したプローブよりも小さい場合には、本発明に適合するものと見込まれる。

【0080】

たとえば、図11では本発明の血小板試料への適用例を、CD42b及びCD63識別用に染色した血小板試料のフローサイトメトリー結果で示している。更に図12では別の例として、本発明の骨髄細胞試料への適用例を、CD56識別用に染色した骨髄細胞試料のフローサイトメトリー結果で示している。細胞回収とS/N比は本発明の装置・方法である「発明」もSorval装置及び洗浄方法もほぼ同等であった。図13では、本発明

10

20

30

40

50

の細胞内分析への適用例を、ヘモグロビン識別用の染色をした透過性化処理済み血液試料のフローサイトメトリーで示している。S / N 比は、本発明の装置・方法である「中空纖維」も実施例 2 で述べた Quick Spin 洗浄方法もほぼ同等であった。

【0081】

実施例 9 - 細胞分析装置と一体化した細胞洗浄装置

特に、本発明の装置を 1 以上の在来の細胞分析装置と一体化すれば洗浄装置から洗浄済み細胞を分析装置へと移送する手動ステップを省略することが可能になると見込まれる。たとえば、本発明の細胞洗浄装置で洗浄した細胞試料を入れた試験管をフローサイトメーターによる分析を可能にする位置へと移送するためのロボット手段を提供することにより、本発明の細胞洗浄装置はフローサイトメーター、たとえば、COULTER EPICS (登録商標) フローサイトメーター、と一体化することができよう。一例として、数個の洗浄済み試料を収めたカルーセルを細胞洗浄に好適な(たとえば、細胞洗浄装置の近位)位置から細胞分析に好適な別の(たとえば、フローサイトメーターの近位)位置へとコンベヤーで運ぶことができよう。流体接続及び導管は、分析のために洗浄済み細胞試料をフローサイトメーター中に吸引するだろう。

【0082】

代りに、本発明の細胞洗浄装置を一以上の血液検査装置と一体化することも可能である。この態様では、赤血球溶解後に細胞残屑の除去を目的に血液細胞試料を洗浄することになる。更に、まず血液細胞試料を洗浄して干渉物質を血液細胞試料から除去した後に、血液細胞試料と生物反応又は化学反応させるようにしてもよい。

【0083】

以上の説明は多くの種類を含むが、それらは本発明の範囲を限定するものではなく、その好ましい態様の例示である。他にもいろいろな変法が可能である。たとえば本発明は、2 個のポンプと 1 個の真空源ではなく単一の液圧変換器だけを含むような干渉物質除去装置を包含する。該装置が備える多様なホース及び弁は、該単一液圧変換器と連係するように接続し、以って該装置が本書で述べた好ましい態様とほぼ同様に機能するようにしてもよい。別の例として、微孔性中空纖維膜を使用して細胞試料から液体を除去することにより細胞試料を濃縮する方法も本発明に包含される。従って、本発明の範囲は例示の態様によってではなく、添付の特許請求の範囲及びその法的同等物によって限定されるものとする。

30

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図 1 は本発明の装置の略図である。

【図 2】

図 2 は本発明のろ過機構の略図である。

【図 3】

図 3 は本発明のろ過機構の断面図であり、ろ過機構の中空纖維膜内腔内の細胞試料から干渉物質が除去される模様を示す。

【図 4 A】

図 4 A は本発明の装置の操作を図解した略図である。

40

【図 4 B】

図 4 B は本発明の装置の操作を図解した略図である。

【図 4 C】

図 4 C は本発明の装置の操作を図解した略図である。

【図 4 D】

図 4 D は本発明の装置の操作を図解した略図である。

【図 4 E】

図 4 E は本発明の装置の操作を図解した略図である。

【図 4 F】

図 4 F は本発明の装置の操作を図解した略図である。

50

【図4G】

図4Gは本発明の装置の操作を図解した略図である。

【図4H】

図4Hは本発明の装置の操作を図解した略図である。

【図4I】

図4Iは本発明の装置の操作を図解した略図である。

【図4J】

図4Jは本発明の装置の操作を図解した略図である。

【図4K】

図4Kは本発明の装置の操作を図解した略図である。

10

【図5】

図5は本発明の方法の概略である。

【図6】

図6は本発明の別法の概略である。

【図7】

図7は蛍光標識CD56単クローニング抗体と反応させた後の血液細胞試料のフローサイトメトリーで得られたデータのグラフである。データは残存%、CD56⁺%及びS/N比として表している。図のデータは1ドナーに関する10回の反復試験の平均値である。

【図8】

図8は、種々の洗浄プロトコールを適用した赤血球溶解及び固定処理済み血液細胞試料から回収した細胞のフローサイトメトリーで得られたデータのグラフである。リンパ球（「Ly.」）画分、単球（「Mo.」）画分、顆粒球（「Gr.」）画分、及び3画分すべての混合物に由来するデータを示している。画分の選別には光散乱法を用いた。図のデータは平均値であり、エラーバーは標準偏差を示す。

【図9】

図9は12人のドナーから採取し、CD56識別用の染色、赤血球溶解及び固定の各処理を施した血液細胞試料のフローサイトメトリーで得られたデータのグラフである。データはCD56⁺%であり、ドナー当たり2~12回の反復試験の平均値で示している。

【図10】

図10は中空纖維膜装置で洗浄した濃縮細胞試料からの細胞持越し量を示すグラフである。細胞試料を洗浄し次いで中空纖維膜を清浄処理した後に、同じ中空纖維膜を使用して空試料管を「洗浄」した。細胞試料から空試料管に持ち越された細胞数をフローサイトメトリーで定量した。図のデータは細胞試料から空試料に持ち越された細胞の%である。1ドナーに由来する17試料を試験した。当初の総事象数を基準にした持越し細胞%は0.03%以下である。従って図10では持越し細胞数に関するバーを示していない。

【図11】

図11はCD42b及びCD63識別用の染色をした血小板試料のフローサイトメトリーで得られたデータのグラフである。蛍光標識した各20μlの抗CD42b抗体及び抗CD63抗体を100μlの（重力沈降処理後の）血小板濃厚血漿と10分間、攪拌又は混合せずにインキュベートした。「コントロール」試料は無洗浄である。「Sorval」試料はSORVALL（登録商標）Cell washer 2（E.I. du Pont de Nemours）を用いメーカーの説明書に従いAUTOモードで洗浄した。「Quick Spin」試料は本書で説明しているQuick Spinプロトコールに従って洗浄した。また「発明」試料は中空纖維膜装置を用いて1回洗浄した。データはCOULTER（登録商標）EPICS（登録商標）XL（登録商標）フローサイトメーター（Beckman Coulter, Inc. 米国フロリダ州マイアミ）を用いて取り、大きさ（前方及び直交光散乱を基に測定）、CD42b%（平均チャンネル蛍光）及びCD63%（平均チャンネル蛍光）として表示した。図のデータは1ドナーに関する3回の反復試験の平均値である。

【図12】

50

図12はCD56識別用の染色、赤血球溶解及び固定の各処理を施した骨髄細胞試料に関する、TQ-Prep(登録商標)装置(Beckman Coulter, Inc.

米国フロリダ州マイアミ)使用によるフローサイトメトリーで得られたデータのグラフである。「Sorval1」試料はSORVALL(登録商標)Cell washer 2を用いメーカーの説明書に従いAUTOモードで洗浄し、また「発明」試料は中空纖維膜装置を用いて1回洗浄した。データは細胞回収量(30秒間操作での事象数)及びS/N比(本書で説明している意味での)であり、EPICS XLフローサイトメーターを用いて取った。図のデータはドナー当たり1回の試験による3ドナーの平均値である。エラーバーは標準偏差を表わす。

【図13】

図13はヘモグロビン識別用の染色をした血液細胞試料のフローサイトメトリーで得られたデータを示すグラフである。200μlの全血を、市販試薬を用い標準プロトコールに従って、架橋、透過性化及び固定化処理した。こうして調製、透過性化処理した赤血球20μlを下記量の個別抗体、すなわち、Ms1gG1-PE/Ms1gG1-FITC 20μl、PanHb-FITC 10μl、HbC-FITC 30μl(HbA0と交差反応性)、HbS-FITC 30μl、HbF-FITC 30μl又はHbA1c-FITC 10μlを用いて染色し、20分間混合し、次に洗浄した。「Quick Spin」試料は本書で説明しているQuick Spinプロトコールに従って洗浄し、また「発明」試料は中空纖維膜装置を用いて1回洗浄した。データは(本書で説明している意味での)S/N比であり、EPICS XLフローサイトメーターを用いて取った。図のデータは試験条件当たり1回の試験に基づいている。

【図14】

図14は、洗浄緩衝液のウシ胎仔血清含有量を遙増させながら実施した3洗浄サイクル後の無傷細胞回収率を示すグラフである。

【図5】

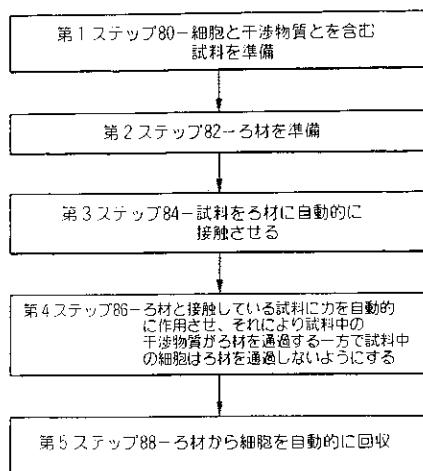


FIG. 5

【図6】

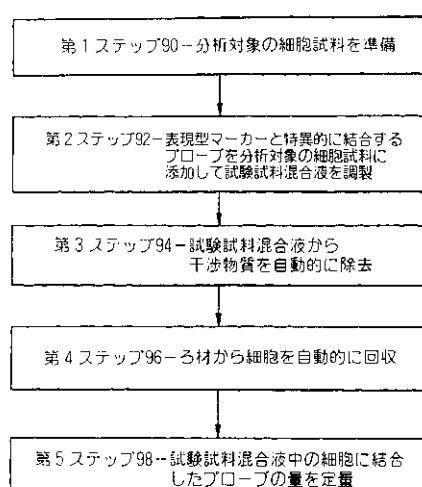


FIG. 6

【図7】

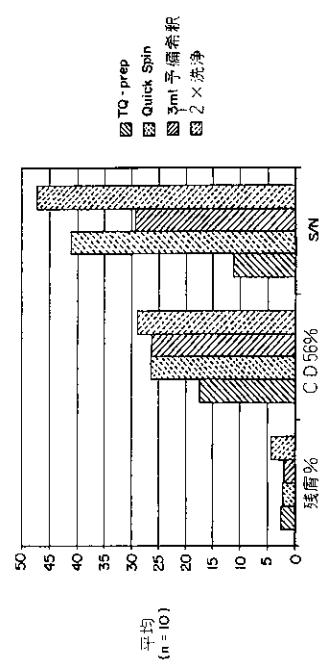


FIG. 7

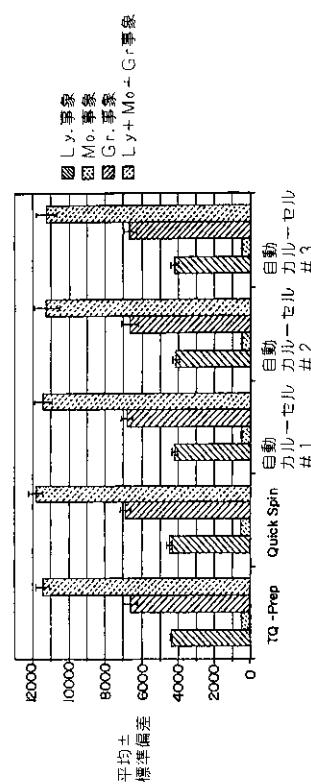


FIG. 8

【図9】

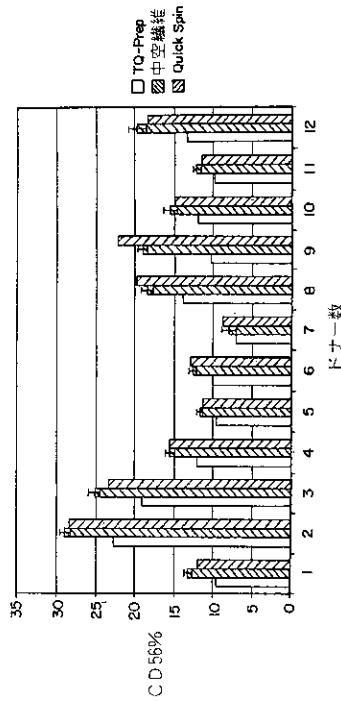


FIG. 9

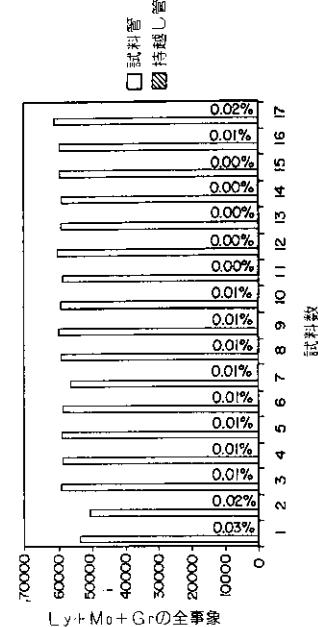


FIG. 10

【図10】

【図 1 1】

ヘモグロビンにふる細胞洗浄技術の評価
血小板を用いた洗浄技術の評価

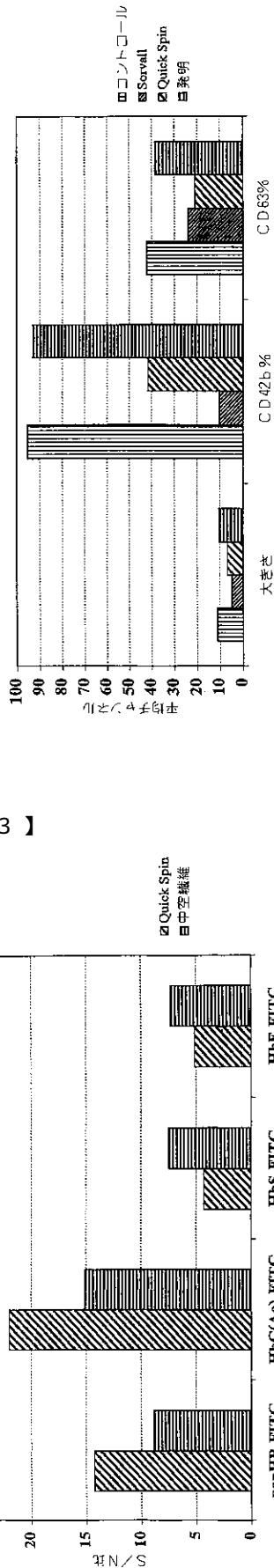


Figure 11

【図 1 2】

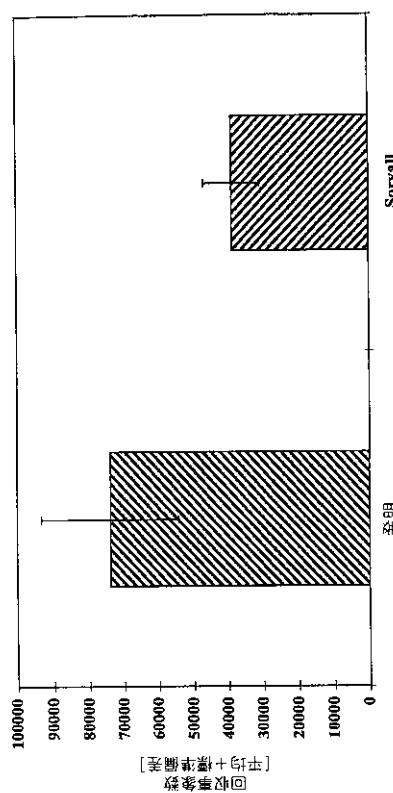


Figure 12

【図 1 3】

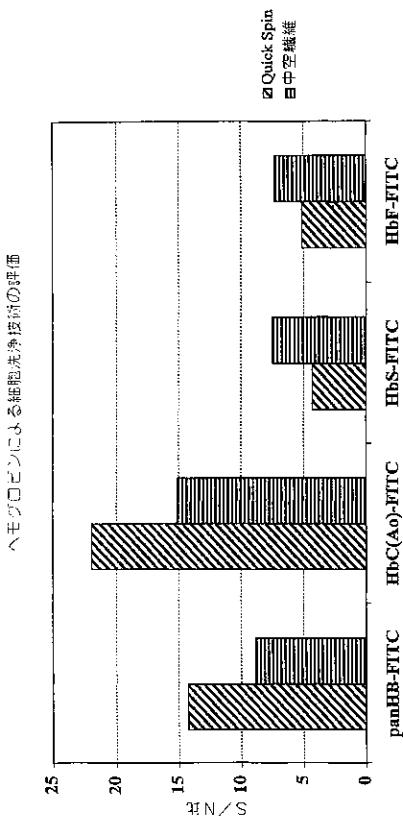


Figure 13

【図 1 4】

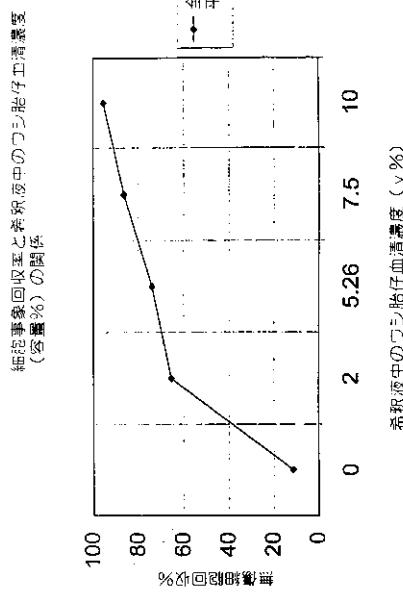


Fig. 14

【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/04921 A2

(51) International Patent Classification¹: G01N 1/34 KUYLEN, Nazle, 16053 S.W. 109 Street, Miami, FL 33196 (US); LUCAS, Frank, J., 2143 Belhel Boulevard, Boca Raton, FL 33431 (US).

(21) International Application Number: PCT/US01/20697

(22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001) (74) Agent: ALTER, Mitchell, E.; Coulter International Corp., PO. Box 169015, Mail Code 32 A02, Miami, FL 33116 9015 (US).

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 09/611,837 (81) Designated States (national): CN, JP.

7 July 2000 (07.07.2000) US (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

(71) Applicant: COULTER INTERNATIONAL CORP. [US/US]; 1180 SW 147 Avenue, Mail Code 32-A02, Miami, FL 33196 (US).

(72) Inventors: BURSHTEYN, Alexander, 6192 W. 26th Court, Hialeah, FL 33016 (US); JOUBRAN, John, W., 16340 SW 103 Terrace, Miami, FL 33196 (US). For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



WO 02/04921 A2

(54) Title: APPARATUS AND METHOD FOR BIOLOGICAL SAMPLE PREPARATION AND ANALYSIS

(57) Abstract: A method for utilizing a filtration device (24) for removing interferants from a sample containing cells (20) in an automated apparatus (10) is disclosed. The filtration device includes a microporous hollow fiber membrane (60) having a plurality of pores (65) sized to retain cells while allowing smaller diameter interferants (72) to pass through the membrane. The apparatus also includes a means of moving the sample from a sample container (16) to and from the filtration device. The disclosed method utilizes a vacuum source (30) to aspirate the sample into a lumen (66) of the hollow fiber membrane so that the sample is retained in the lumen space until expelled into an analysis container or transported to an analyzer.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

APPARATUS AND METHOD FOR BIOLOGICAL
SAMPLE PREPARATION AND ANALYSIS

TECHNICAL FIELD

5

The invention relates generally to the field of biological sample preparation and analysis. More particularly, the subject invention relates to a method and apparatus for enhancing the sensitivity of blood cell analysis.

10 BACKGROUND ART

Flow cytometry is a well known technique for qualitatively and quantitatively analyzing a large number of individual cells for a specific cellular marker in a rapid manner. In a typical application, a fluorescent 15 molecular probe that selectively binds to a predetermined cell marker, such as a fluorochrome-conjugated antibody that specifically binds an intracellular or cell surface antigen, is added to a cell sample to be analyzed so that the probe can bind or "stain" the cells within the sample that express the predetermined cell marker. The sample is then placed in flow cytometer and 20 illuminated with a light source to enable the fluorescence associated with each cell in the sample to be quantified. The magnitude of fluorescence emitted from a particular cell correlates with the quantity of cell marker on or in that particular cell. By extrapolating this fluorescence data, the relative quantity of specific phenotypic markers expressed by cells in a sample can be 25 rapidly and accurately determined. For an overview of flow cytometric analysis see, "Flow Cytometry and Sorting," Myron R. Melamed, Tore Lindmo, and Mortimer L. Mendelsohn, eds., New York:Wiley-Liss, Inc., (3rd ed., 1995); Shapiro, H.M., "Practical Flow Cytometry," New York:Wiley-Liss, Inc., (2nd ed., 1990).

30 Sample preparation for flow cytometric analysis is typically performed in a non-automated fashion, wherein a saturating concentration of a cell marker-specific probe is added to a cell sample by manual pipetting, and the

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- mixture is then incubated for a period of time sufficient to allow the probe to bind the cell marker of interest. For analyses where red blood cells might cause interference (e.g., immuno-phenotyping leukocytes), the red blood cells can be removed from the sample using an agent that specifically lyses
- 5 erythrocytes (for example, a hypotonic solution, ammonium chloride or carboxylic acid). Traditionally, to remove interfering unbound probe from the cell sample prior to flow cytometric analysis, the mixture is washed by adding excess buffer to the mixture, centrifuging the mixture to separate the cells from the buffer, removing the buffer containing the unbound probe, and
- 10 resuspending the cells in fresh buffer. The washing procedure can be repeated multiple times to further remove any remaining unbound probe. This non-automated technique is advantageous in that it results in a relatively clean sample that contains few interferants (for example, unbound probe or cell debris) which might generate background noise or interference during the
- 15 flow cytometric analysis. For many applications, however, this non-automated technique is relatively time-consuming, can result in significant cell loss due to one or more wash steps, and exposes the cells to the potentially deleterious effects (for example, activation of enzymatic processes, granule release, cell destruction, high gravity forces produced by centrifugation, etc).
- 20 While the foregoing technique is acceptable for infrequent analyses involving a small number of samples, it is less suitable for protocols involving repeated analyses of a large number of samples. A more automated procedure is generally preferred when flow cytometric analysis is employed for clinical diagnostics, high-throughput screening, or the like. For example,
- 25 in a typical clinical assay where leukocytes are immunophenotyped using flow cytometry, a sample of whole blood is placed into an apparatus that automatically processes the sample prior to analysis. One such apparatus is the COULTER® TQ-Prep™ Workstation system manufactured by Beckman Coulter, Inc. (Miami, Florida). After adding a probe to the sample, this
- 30 apparatus uses computer-controlled devices to automatically add an agent

WO 02/04921

PCT/US01/20697

that lyses erythrocytes in the sample and a cell fixing agent (for example, paraformaldehyde). The prepared sample can then be analyzed using a flow cytometer without further processing. This automated technique is advantageous in that samples of whole blood can be prepared for analysis

5 quickly and efficiently.

A drawback of this lysing technique can be encountered in applications requiring a high degree of sensitivity. In such applications, in the absence of a washing step, the automated technique does not remove interferants, such as unbound probe or debris from the lysed erythrocytes from the sample.

10 The high background signal caused by the fluorescence from the unbound probe, non-specific probe binding, and/or autofluorescence from the cells and debris can obscure results generated from the analysis.

Where a fluorescently-labeled antibody is used to analyze a cell sample for a marker present in low quantities, the absence of a washing step 15 can result in high background fluorescence caused by the unbound antibody present in the sample. Thus, if too many unbound fluorescent antibody molecules are present in the sample, the flow cytometer can not distinguish the signal emitted from the antibody-bound cells from the "noise" generated by the unbound antibody. That is, the "noise" in the sample overwhelms the 20 "signal" emanating from the cells of interest. To avoid this, the signal to noise ratio in the sample can be improved by removing the interferants by manually washing. An example of manual washing comprises centrifuging the sample to pellet the cells, decanting the interferants contained in the supernatant, and resuspending the cells in fresh buffer. As described above for the non- 25 automated technique, this manual washing is disadvantageous because it is time consuming, causes cell damage, and can result in significant cell loss.

A need therefore exists for an apparatus and method for quickly and efficiently removing interferants from a cell sample prior to analysis. In addition, the apparatus and method should minimize the risk of exposure to 30 infectious blood because of operator handling of the blood cell sample. An

WO 02/04921

PCT/US01/20697

apparatus that performs the foregoing method with only negligible cell loss, and does not expose cells to high gravitational forces or cell packing caused by centrifugation would be especially advantageous.

5 DISCLOSURE OF INVENTION

It has been discovered that filters, such as microporous hollow fiber membranes, can be utilized in cell sample preparation devices to quickly and efficiently remove interferants from a cell sample. More specifically, it has
10 been found that the use of a hollow fiber membrane having a plurality of pores with a mean diameter less than the diameter of the cells of interest can be utilized to remove interferants from a cell sample to improve the signal-to-noise ratio in a cellular assay. Application of vacuum to the hollow fiber membrane permits interferants to be removed from a blood cell sample within
15 a lumen of the filter with little or no cell damage. As the cells themselves do not pass through pores of the membrane, compared with conventional continuous filtration devices, clogging of the filter is less frequent, and cells are exposed to less deleterious forces. Filters within the invention can be installed in a cell processing apparatus such that a blood cell sample can be
20 washed and analyzed automatically.

Accordingly the invention features an apparatus for automatically removing interferants from a sample containing cells. The apparatus includes a vacuum source; a filtration device comprising an impermeable housing that forms an extramembrane chamber wherein said chamber
25 contains a filter that selectively retains cells of interest while allowing interferants to pass through the filter, and wherein said housing contains at least three port and wherein at least one port is connected by a conduit to the vacuum source; a conduit from one of said ports in said housing which is adapted to aspirate a cell sample from a sample container into the filtration
30 device by said vacuum source; and a conduit from one of said ports in said

WO 02/04921

PCT/US01/20697

housing which fluidly connects to a buffer reservoir, which provides a means for buffer to enter into said filtration device to recover the retained cells through one of said ports.

- In a preferred embodiment, the apparatus for automatically removing interferants from a sample containing cells includes a sample container holder adapted for holding a sample container containing the sample of cells; a filtration device comprising a filter that selectively retains the cells while allowing the interferants to pass therethrough; at least one conduit fluidly connecting the sample container to the filtration device whereby the sample
- 5 can move between the sample container and the filtration device; and a means for recovering the cells from the filtration device. The filter of the apparatus preferably includes a microporous hollow fiber membrane having a plurality of pores sized such that cells are prevented from passing therethrough. For example, the pores can have a mean diameter of between
 - 10 about 0.1 and 5.0 microns. In preferred versions of the apparatus, the microporous hollow fiber membrane is fashioned into at least one tube defining a lumen, the tube having a first port providing a first opening in the tube, and a second port providing a second opening in the tube. In this preferred embodiment, the conduit can be fluidly connected to the at least
 - 15 one lumen via the first port such that the cell sample can be moved from the cell sample container through the first port into the at least one lumen. The second port can be fluidly connected to a buffer reservoir containing a buffer and also fluidly connected to a detergent solution reservoir containing a detergent solution. The means for recovering the cells from the filtration
 - 20 device can include a fluid pump that can be in fluid communication with a buffer reservoir suitable for housing a buffer so that the fluid pump can cause the buffer to flow from the buffer reservoir into the filtration device. In variations, the fluid pump can also cause the buffer to flow from the filtration device into the at least one conduit.
 - 25

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- In another aspect of the apparatus of the invention, the filtration device can also include an impermeable housing that forms an extramembrane chamber between the impermeable housing and the microporous hollow fiber membrane. A vacuum source can be fluidly connected to the extramembrane chamber such that application of a vacuum from the vacuum source to the extramembrane chamber causes the sample of cells to be aspirated from the cell sample container through the at least one conduit into at least one lumen of the microporous hollow fiber membrane via the first port, and a portion of the sample of cells to flow through the microporous hollow fiber membrane into the extramembrane chamber.

The apparatus can also include one or more pumps and a plurality of valves. The pumps provide a hydraulic force for transporting the buffer from the buffer reservoir into the lumens of the microporous hollow fiber membrane, and the detergent solution from the detergent solution reservoir into the lumens of the microporous hollow fiber membrane; and the plurality of valves being adapted to open and close such that the vacuum from the vacuum source can be applied to the extramembrane chamber such that the buffer, the detergent solution, and portions of the sample of cells within the lumens of the microporous hollow fiber can be controllably aspirated from the lumens to the extramembrane chamber; and the hydraulic force provided from the pumps can be directed to transport the buffer from the buffer reservoir to the lumens, the buffer from the buffer reservoir to the cell sample container, and the detergent solution from the detergent solution reservoir to the lumens. In another aspect, the apparatus of the invention can include a computer controller for controlling the pumps and valves.

The invention also features a cell analyzing apparatus that includes both a cell washer for removing interferants from a sample of cells and a cell analyzer for analyzing the sample of cells. The cell washer is described above and the cell analyzer can be any cell analyzers. Preferably the cell analyzer measures fluorescence, such as a flow cytometer.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

Also within the invention is an automated method for removing interferants from a sample containing cells. This method includes the steps of applying a vacuum force to a blood cell sample in a first sample container to cause the blood cell sample to contact a filter; applying a force to the blood cell sample in contact with the filter, whereby interferants in the blood cell sample pass through the filter while the cells in the blood cell sample do not pass through the filter; and recovering the cells from the filter. In this method, the filter can include a microporous hollow fiber membrane having a plurality of pores sized such that the cells are prevented from passing therethrough.

The invention also features an automated method of analyzing a phenotypic marker on cells within a sample. This method includes the steps of adding at least one reagent that reacts with blood cells to a blood cell sample to form a test sample mixture; automatically removing interferants from the test sample mixture to yield a washed blood cell sample; and analyzing the washed blood cell sample to determine characteristics of the blood cells. The at least one reagent can be an antibody that specifically binds the phenotypic marker and the antibody can include a fluorescent test label. The step of automatically removing interferants from the test sample mixture can remove greater than 50% of the interferants from the test sample mixture.

The method can also further include the step of lysing erythrocytes in the sample of cells to be analyzed, and/or the step of quantifying the amount of probe bound to the cells in the test sample mixture by use of a flow cytometer.

25

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

Figure 1 is a schematic view of an apparatus within the invention.

Figure 2 is a schematic view of a filtration device within the invention.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

Figure 3 is a cross-sectional view of the filtration device of the invention shown with interferants removed from a sample of cells within a lumen of a hollow fiber membrane of a filtration device.

Figures 4A-4K are schematic views illustrating the operation of an apparatus of the invention.

Figure 5 is an outline of a method of the invention.

Figure 6 is an outline of another method of the invention.

Figure 7 is a graph showing data obtained from flow cytometric analysis of blood cell samples reacted with fluorescent labeled CD56 monoclonal antibodies. Data are presented as percent debris, percent CD56*, and signal-to-noise ratio. Data shown are averages of ten replicates using one donor.

Figure 8 is a graph showing data obtained from flow cytometric analysis of cell recovery from erythrocyte-lysed and fixed blood cell samples subject to different washing protocols. Data from lymphocyte ("Ly.") fractions, monocyte ("Mo.") fractions, granulocyte ("Gr.") fractions, and a combination of all three fractions are shown. Fractions were selected based on light scatter. Data are shown as averages with error bars indicating standard deviations.

Figure 9 is a graph showing data obtained from flow cytometric analysis of blood cell samples taken from 12 donors and stained for CD56, erythrocyte-lysed, and fixed. Data are presented as percent CD56*, and are shown as averages of two to twelve replicates per donor. Error bars indicate standard deviation.

Figure 10 is a graph showing the amount of cell carryover from concentrated cell samples washed with a hollow fiber membrane apparatus. After washing the cell sample and then cleaning the hollow fiber membrane, blank sample tubes were "washed" using the same hollow fiber membrane. The number of cells carried over from the cell sample to the blank sample tube were quantified using flow cytometry. Data are shown as percent of cells from cell sample carried over to blank sample. Seventeen samples from

WO 02/04921

PCT/US01/20697

one donor were tested. The percent of carryover cells from the original total number of events is 0.03% or less. Consequently, Fig. 10 does not show a bar for the number of cells that were carry overed.

Figure 11 is a graph showing data obtained from flow cytometric analysis of platelet samples stained for CD42b and CD63. 20 ul of anti-CD42b and 20 ul of anti-CD63 fluorescently-labeled antibodies were incubated with 100 ul of platelet rich plasma (after gravity sedimentation) for 10 minutes without shaking or mixing. "Control" samples were not washed; "Sorvall" samples were washed in a SORVALL® Cellwasher 2 (E.I. du Pont de Nemours) using the AUTO mode per the manufacturers instructions; "Quick Spin" samples were washed according to the Quick Spin protocol described herein; and "Invention" samples were washed one time using a hollow fiber membrane apparatus. Data were obtained using a COULTER® EPICS® XL™ flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Miami, Florida) and presented as size (determined based on forward and orthogonal light scatter), percent CD42b (mean channel fluorescence), and percent CD63 (mean channel fluorescence). Data shown are averages of three replicates using one donor.

Figure 12 is a graph showing data obtained from flow cytometric analysis of bone marrow cell samples stained for CD56, erythrocyte-lysed, and fixed using a TQ-Prep™ apparatus (Beckman Coulter, Inc., Miami, Florida). "Sorvall" samples were washed in a SORVALL® Cellwasher 2 using the AUTO mode per the manufacturers instructions, and "Invention" samples were washed one time using a hollow fiber membrane apparatus. Data were obtained using an EPICS XL flow cytometer and are presented as cell recovery (number of event in a thirty second run) and signal-to-noise ratio (as described herein). Data shown are averages of three donors with one replicate per donor. Error bars represent standard deviation.

Figure 13 is a graph showing data obtained from flow cytometric analysis of blood cell samples stained for hemoglobin. 200ul of whole blood were cross-linked, permeabilized, and stabilized using commercially available

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- reagents according to standard protocols. 20ul of the prepared permeabilized RBCs were stained with the following amounts of individual antibodies: MsIgG1-PE/MsIgG1-FITC-20ul, PanHb-FITC-10ul, HbC-FITC-30ul (cross reactive with HbAo), HbS-FITC-30ul, HbF-FITC-30ul, or HbA1c-FITC-10ul; 5 mixed for 20 min, and then washed. "Quick Spin" samples were washed according to the Quick Spin protocol described herein; and "Invention" samples were washed one time using a hollow fiber membrane apparatus. Data were obtained using an EPICS XL flow cytometer and are presented as signal-to-noise ratios (as described herein). Data shown are based on one 10 replicate per test condition.

Figure 14 is a graph showing the percent of intact cells recovered after three wash cycles wherein the wash buffer had increasing amounts of fetal calf serum.

15 DETAILED DESCRIPTION OF THE PREFERRED EMBODIMENTS

The below described preferred embodiments illustrate various adaptations of the invention. Nonetheless, from the description of these embodiments, other aspects of the invention can be readily fashioned by 20 making slight adjustments or modifications to the components and steps discussed below.

All publications, patent applications, patents, and other references mentioned herein are incorporated by reference in their entirety. In the case of conflict, the present specification, including definitions will control. In 25 addition, the particular embodiments discussed below are illustrative only and not intended to be limiting.

Unless otherwise defined, all technical terms used herein have the same meaning as commonly understood by one of ordinary skill in the art to which this invention belongs.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

The invention provides an automatic apparatus and automatic method utilizing a filter to remove interferants from a body fluid prior to analysis. As used herein the term "automatic" means performed without direct human intervention. For example, an automatic apparatus automatically performs a 5 method when a component of the apparatus, rather than a human operator, performs one or more steps of the method, even though a human operator might input instructions into the machine or even perform one of the steps manually. Similarly, an "automated" method is a method performed automatically. The term "interferants" means substances or particles that 10 obscure an analysis. More specifically, the interferants comprise non-reacted chemical agents; non-reacted biological agents; and biological particles, such as red blood cell debris and cellular matter smaller than the cellular matter of interest. Interferants in a cell sample analyzed fluorescently typically include unbound fluorescent probe and autofluorescent cell debris. A particular 15 percentage of interferants is removed from a sample when either (a) the amount of debris in the sample is decreased by that percentage or (b) the signal to noise ratio is improved by that percentage.

Referring to FIG. 1 of the drawings, a presently preferred embodiment of a cell wash apparatus 10 includes a sample container holder 14 and a 20 filtration device 24 mounted to a frame 12. Sample container holder 14 accommodates a sample container 16 containing a sample of cells 20 in an arrangement such that an end of a sample hose 22 can be inserted into the sample of cells 20 which can contain interferants. Sample hose 22 is fluidly connected to vacuum source 30 so that actuation of vacuum source 30 25 supplies a vacuum force which aspirates the sample of cells 20 from sample container 16 into hose 22. More specifically, there is an absence of air in filtration device 24 such that when vacuum force 30 is applied, the cell sample 20 is aspirated from the sample container 16 into the filtration device 24.

Vacuum source 30 can take the form of any device that can provide a 30 vacuum or hydraulic force for moving fluids. For example, vacuum source 30

WO 02/04921

PCT/US01/20697

can be a fluid pump or an external vacuum line. Preferably, the vacuum source 30 is a syringe pump, for example a 5 ml syringe pump, that can provide a vacuum to filtration device 24 when its plunger is withdrawn and a forward hydraulic force when its plunger is depressed.

- 5 Devices that cause a vacuum force rather than a positive pressure are the preferred form of source 30, because it has been found that a vacuum is less damaging to cells. More specifically, the sample of blood cells 20 does not circulate through a pump to enter into the lumen 66 (not shown). If the cells circulate through a pump, then cell deformation, aggregation and
- 10 deterioration occur. Therefore, the sample of cells 20 enter the lumen 66 by action of a vacuum force rather than by the action of a force which is applied to the sample of blood cells 20 which cause the sample of cells 20 to be pushed into the lumen 66.

Filtration device 24 is attached to frame 12 by a filtration device

- 15 fastener 26 and interposed between sample hose 22 and vacuum source 30 so that application of a vacuum by vacuum source 30 causes aspiration of sample of cells 20 into filtration device 24. Filtration device 24 can be any device that can remove interferants such as unbound antibody molecules or cellular debris from sample of cells 20. In a preferred embodiment, filtration
- 20 device 24 includes a filter through which interferants can pass. Filters that can be used include fine mesh screens, flat microfiltration membranes, spiral wound membrane cartridges, or any other media that can separate interferants from the cells of interest. In a more preferred embodiment, the filter is a microporous hollow fiber membrane that has a plurality of pores
- 25 sized less than the blood cells within sample of cells 20 but greater than the interferants.

Suitable hollow fiber membranes for use as filtration device 24 can be fashioned by one of skill in the art or can be purchased from a variety of commercial sources. Hollow fiber membranes useful in the invention

- 30 comprise a material which is non reactive with the cells of interest and can be

WO 02/04921

PCT/US01/20697

a hydrophobic or hydrophilic material, polysulfone, polyestersulfone, nylon, methylacrylates, Peek™ (Upchurch Scientific, Inc.). The filter will have pores sized so that cells of interest cannot pass therethrough. The pore size will range from approximately 0.1 microns to about 5 microns in diameter.

- 5 Preferably, the pore size will range from approximately 0.1 microns to about 3 microns, which can eliminate platelets as interferants from the cells of interest. More preferably, the pore size will range from approximately 0.2 microns to about 2 microns and most preferably the pore size will range from approximately 0.3 microns to about 1 micron. In the present invention, a pore
- 10 size of about 0.65 microns has been successfully used to eliminate interferants leaving a majority of cellular components for analysis. One preferred commercially available polysulfone hollow fiber membrane device having a plurality of pores with a mean diameter of 0.65 microns is sold as Catalog # CFP-6-D-H22LA by A/G Technology Corporation (Needham, Massachusetts).
- 15 This device is suitable for removing the majority of interferants from a typical sample of 100 microliter of whole human blood that has been stained with a fluorescent antibody, erythrocyte-lysed, and diluted to a total volume of about 4ml using an isotonic buffer or reagent. Other devices useful for variations of the invention include CFP-6-D-MB01 (15 cm²), and
- 20 CFP-6-D-MM01A (24 cm²) from A/G Technology Corporation; and X15E300 04N and X25E201 02N from Spectrum Laboratories, Inc. (Rancho Dominguez, California).

A sample hose valve 23 for regulating fluid flow between sample container 16 and filtration device 24 is positioned on hose 22. Valve 23 can

- 25 take the form of any device that can control the flow of fluid through hose 22. Preferably, valve 23 is switchable between an open position and a closed position. In the open position, sample 20 can flow between container 16 and filtration device 24 when a suitable force is applied, such as by vacuum source 30. In the closed position, the fluid connection is blocked so that
- 30 sample 20 cannot flow between container 16 and filtration device 24. In a

WO 02/04921

PCT/US01/20697

preferred variation of the foregoing, valve 23 also has a partially open position that directs fluid flow from hose 22 to a waste reservoir 39 by another fluid connection.

- Although in the embodiment shown in FIG. 1 the fluid connection between sample container 16 and filtration device 24 is provided by sample hose 22 and regulated by valve 23, in an alternate preferred embodiment, more than one fluid connection can exist between sample container 16 and filtration device 24. For example, sample hose 22 can be utilized for transporting sample of cells 20 from container 16 to filtration device 24 and a return hose or fluid connector can be provided for returning sample of cells 20 from device 24 to sample container 16. A fluid flow regulator analogous to valve 23 can be interposed in the return hose. In addition, rather than having a fluid connection for returning sample 20 from device 24 to sample container 16, the apparatus can feature another pathway for transporting sample 20 from device 24 to a clean sample container, such as an unused test tube, rather than sample container 16.

- Referring again to FIG. 1, vacuum source valves 32 are positioned within the fluid connection between vacuum source 30 and filtration device 24 so that they can control transfer of vacuum between vacuum source 30 and filtration device 24. Valves 32 are preferably switchable between an open and a closed position. In the open position, actuation of vacuum source 30 causes a vacuum force to be applied to filtration device 24. The vacuum will cause aspiration of sample 20 from container 16 into device 24. In the closed position, no force is transmitted between vacuum source 30 and device 24.

- Vacuum source 30 can also be fluidly connected to a waste reservoir 39 by a waste hose 37. As indicated above, vacuum source 30 is also adapted to provide a forward hydraulic force. This hydraulic force can be used to move fluid from locations proximal to vacuum source 30 to waste reservoir 39. For example, when vacuum source 30 takes the preferred form of a syringe pump, with valves 32 and 23 open, withdrawal of the plunger of

the syringe pump causes a vacuum that aspirates a liquid which contains interferants and sample of cells 20 to be dispersed into the interior of the syringe's barrel. Depressing the plunger at this point forcibly expels the liquid from the syringe. With valves 32 closed, the liquid is directed through waste 5 hose 37 into waste reservoir 39. In an alternative variation of the foregoing, rather than using vacuum source 30, an additional vacuum source, pump, or hydraulic force transducer can be utilized to move fluid from locations proximal to vacuum source 30 to waste reservoir 39. This latter variation is preferred where it is desired to avoid potential cross contamination between 10 waste reservoir 39 and sample container 16 and their associated fluid connections.

Filtration device 24 can also be fluidly connected to buffer reservoir 48 by buffer hose 46. Buffer reservoir 48 is a container for housing buffer 49 which can be any isotonic solution compatible with sample of cells 20. 15 Suitable buffers include physiological saline or phosphate buffered saline (PBS) and Hanks Buffer. Preferred isotonic solutions for use as buffer 49 include IsoFlow™ buffer, PBS, and IMMUNO-TROL™ Final Storage buffer (all available from Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California).

Interposed between device 24 and reservoir 48, and fluidly 20 communicating with hose 46 is buffer pump 40. Buffer pump 40 supplies an hydraulic force which moves buffer 49 from reservoir 48 through hose 46, filtration device 24, and sample hose 22 into sample container 16. Pump 40 can take the form of any device that can cause a hydraulic force between 25 buffer reservoir 48, device 24, and sample container 16. For example it can be a vacuum pump, peristaltic pump, reciprocating pump, or other type of pump known to those skilled in the art. In preferred embodiments, however, it is a syringe pump.

Positioned on hose 46 between reservoir 48 and device 24 is a buffer 25 valve 42 for controlling flow of buffer between reservoir 48 and device 24. 30 Although it can be any fluid flow regulating device, valve 42 is preferably a

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- three position stopcock-like valve that can be placed in either a fill position, a dispense position, or a closed position. In the fill position, pump 40 is in fluid connection with buffer reservoir 48 such that it can transmit an hydraulic force to hose 46 that causes pump 40 to aspirate buffer 49 from buffer reservoir 48
- 5 into buffer hose 46 or into the chamber of the syringe when pump 40 is a syringe pump. In the dispense position, pump 40 is in fluid communication with device 24 such that actuation of pump 40, for example depressing the plunger of the syringe, causes buffer 49 to be transported from pump 40 to device 24 and, where valve 23 is open, into sample container 16. Thus,
- 10 referring to FIG. 1, with valve 42 in the open position, valves 32 in the closed position and valve 23 in the open position, actuation of pump 40 can cause buffer 49 to flush sample of blood cells 20 positioned within filtration device 24 back into sample container 16. With valve 42 in the closed position, the fluid connection between reservoir 48, device 24, and container 16 is blocked.
- 15 Detergent solution reservoir 58 is fluidly connected to filtration device 24 by detergent solution hose 58. Detergent solution reservoir 58 is a container for housing a detergent solution 59 which is suitable for cleaning filtration device 24 and the fluid connections of apparatus 10. Detergent solution 59 can be any solution that can remove residual samples,
- 20 accumulated deposits, proteins, nucleic acids and the like from the fluid connections of apparatus 10. For example, detergent solution can be 0.5N NaOH solution, 1N KOH solution, H₃PO₄ solution, 0.05-10% bleach solution, or a similar solution. The detergent solution can include substances such as Triton X-100 (Rohm and Haas), Tween 80[®] (ICI America), pluronic acids
- 25 (BASF Corp.), ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), proteases, nucleases, azide, and other substances which can clean fluid connections. One preferred composition for use as detergent solution 59 is the solution sold under the trade name COULTER CLENZ[®] (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, California).

Detergent solution pump 50 supplies a hydraulic force which moves detergent solution 59 from reservoir 58 through hose 56 into filtration device 24. Similar to pump 40, pump 50 can take the form of any device that can cause an hydraulic force between detergent solution reservoir 58 and device 24. For example it can be a vacuum pump, peristaltic pump, reciprocating pump or other type of pump known to those skilled in the art. In preferred embodiments, however, it is a syringe pump.

Positioned on hose 56 between detergent solution pump 50 and buffer hose 56 is a detergent solution valve 52 for controlling flow of detergent solution 59 between reservoir 58 and device 24. As with valve 42, although it can be any suitable fluid flow regulating device, valve 52 is preferably a three position stopcock-like valve that can be placed in either a fill position, a dispense position, or a closed position. In the fill position, detergent solution pump 50 is in fluid connection with detergent solution reservoir 58 such that it can transmit a hydraulic force to hose 56 that causes pump 50 to aspirate detergent solution 59 from detergent solution reservoir 58 into detergent hose 56 or into the chamber of the syringe when pump 50 is a syringe pump. In the dispense position, pump 50 is in fluid communication with device 24 such that when valve 32 is closed and valve 23 is open, actuation of pump 50, for example depressing the plunger of the syringe, causes detergent solution 59 to be transported from pump 50 to device 24. And when valves 32 are in the open position and valve 23 in the closed position, actuation of pump 50, with or without the cooperation of vacuum source 30, can cause detergent solution 59 to wash any fluid or material within filtration device 24 into waste reservoir 39. With valve 52 in the closed position, the fluid connection between reservoir 58 and device 24 is blocked.

In addition to the above-described buffer and detergent solution devices, other devices can be included within apparatus 10. For example, devices for adding an erythrocyte lysing agent can be included. Similarly, devices for adding one or more cell marker probes, such as fluorescently-

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- labeled antigen-specific antibodies, can be included within apparatus 10. In addition, fluid connections to one or more cell analyzers, such as hematology and flow cytometry analyzers, can also be provided. Thus, the invention can include an apparatus that can automatically process a sample of whole blood
- 5 by lysing the red blood cells within the blood cell sample, adding a cell marker probe to the blood cell sample, removing the lysed red blood cell debris and unbound cell marker probe from the blood cell sample, and quantifying the remaining cells and quantifying specific cell markers using a cell analyzer.

In a preferred embodiment, the various components of the apparatus

10 are controlled by an information processing unit, such as a computer. That is valves 23, 32, 42, and 52, and vacuum source 30 and pumps 40 and 50 are operatively connected to an information processing unit (not shown in the drawings) having programmed therein operating algorithms for switching the valves and actuating the pumps and vacuum sources. The information

15 processing unit can be connected to electrical, hydraulic, or mechanical manipulators such as servos, robotic arms, gears and the like to operate the pumps, valves, and vacuum source as well as other components of apparatus 10. For example, in one embodiment, hose 22 can be attached to a robotic arm that can move hose 22 between sample container 16 and a different site,

20 for example where another container is located, according to instructions provided by the information processing unit.

Referring now to FIG. 2, a particularly preferred embodiment of filtration device 24 is shown in further detail. In this preferred embodiment of the apparatus of the invention, filtration device 24 includes a hollow fiber

25 membrane 60 fashioned into a tube having a wall that defines a lumen 66. The filtration device 24 further includes a bottom port 62, which is longitudinal to the filtration device, so that tubular shaped membrane 60 fluidly connects sample hose 22 and lumen 66. Fluids, such as sample of cells 20, can enter lumen 66 from sample hose 22 by port 62. Filtration device 24 also includes

30 a top port 64, which is longitudinal to the filtration device, so that tubular

WO 02/04921

PCT/US01/20697

shaped membrane 60 fluidly connects hoses 46 and 56 to lumen 66. Buffer 49 (not shown) can enter lumen 66 from buffer hose 46 by port 64. Likewise, detergent solution 59 (not shown) can enter lumen 66 from detergent solution hose 56 by port 64.

- 5 Although the devices in FIGS. 2, 3 and 4 A-K show only one membrane 60. In another preferred embodiment, device 24 can include more than 1 membrane 60 which forms more than 1 lumen 66. More specifically, the filtration device can have 2 membranes each forming a lumen so that the filtration device contains 2 lumens. More preferably, the filtration device
- 10 contains three membranes which form 3 lumens. Most preferably, the filtration device contains four membranes which form 4 lumens. It has been found having more than 1 lumen will increase the processing flow rate. In addition, having more than 1 lumen will have less fouling and require less cleaning cycles. However, it is also preferred that the filtration device contains less
- 15 than 20 membranes which form less than 20 lumens, and most preferred that it contains less than 10 membranes which form less than 10 lumens.

As noted in FIG. 2, the outer surface of filtration device 24 preferably includes a non-reactive impermeable housing 70 which envelopes hollow fiber membrane 60 and extramembrane chamber 68. The extramembrane 20 chamber 68 is defined as the space between the inner wall of housing 70 and the outer wall of tubular membrane 60. Vacuum and waste port 34, which can be lateral to the filtration device 24, is an opening that fluidly connects extramembrane chamber 68 to vacuum source 30 and waste hose 37. Port 34 can thus project through the wall of impermeable housing 70, such that 25 application of a vacuum force to port 34, for example from source 30, transfers the vacuum force to extramembrane chamber 68. Vacuum in chamber 68 causes fluid and interferants 72 to be withdrawn from lumen 66 across membrane 60 into chamber 68 and out through port 34. After closing valves 32 and applying a forward hydraulic force from source 30, the 30 withdrawn fluid and interferants 72 can be transported to waste reservoir 39.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- Device 24 is preferably arranged such that fluid and interferants can be withdrawn throughout the entire portion of membrane 60 contained within housing 70. For example, port 34 is preferably positioned on the device such that a vacuum from vacuum source 30 is directed approximately
- 5 perpendicular with respect to the length of membrane 60. Application of a vacuum in such a crosswise manner is preferred as compression of cells is reduced compared to devices that force cells to one end of membrane 60, which occurs when a pump is used to increase pressure within the lumen of membrane 60 to expel cells through the pores of the membrane.
- 10 A preferred mechanism by which filtration device 24 selectively retains the cells of interest while allowing the interferants to pass through is illustrated in FIG. 3. Sample of cells 20 is shown in lumen 66 as a mixture comprising cells 74 and interferants 72, such as unbound probe and cellular debris, which is dispersed in a liquid medium. Hollow fiber membrane 60 is shown as
- 15 having a plurality of pores 65 having a mean diameter of less than the mean diameter of cells 74 but greater than the diameter of interferants 72. Interferants 72 can thus pass through pores 65 while the larger diameter cells 74 cannot. Application of a vacuum to chamber 68, through port 34, causes the liquid in which sample of cells 20 is dispersed to be withdrawn through
- 20 pores 65 into chamber 68 along with interferants 72 contained within the liquid. Cells 74, being too large to pass through pores 65, are selectively retained in lumen 66.

In the embodiment shown in FIG. 3, membrane 60 can be composed of any suitable material. For example, it can be composed of a hydrophobic or hydrophilic polymer. In one preferred version it is composed of microporous polysulfone. Suitable sizes of pores 65 of membrane 60 can be selected by one of skill in the art depending on the particular characteristics of the cell sample to be analyzed. For applications where human leukocytes are analyzed, pores 65 preferably have a mean diameter of between about 0.2

25 and 2.0 microns, and more preferably have a mean diameter of about 0.3

30

WO 02/04921

PCT/US01/20697

microns to about 1 micron. The surface area of the membrane 60 can also be selected by one of skill in the art depending on such factors as the particular characteristics of the sample to be analyzed, the sample volume, and the type of membrane used. For example, for a 100 microliter sample of a whole 5 human blood processed and then diluted to a total volume of about 4 ml using an isotonic buffer, 20 cm² of a hollow fiber membrane with 0.65 micron diameter pores is sufficient to remove the majority of interferants in the sample. For a 1ml sample, preferred lumen volumes range from about 50 µl to about 2500 µl and preferably about 200 µl to about 1000 µl, and preferred 10 extramembrane chamber volumes range from about 100 µl to about 2500 µl and preferably about 500 µl to about 1000 µl. Other lumen and extramembrane chamber volumes can be preferred depending on the volume and types of sample. Membrane 60 can also be treated with non-lytic 15 surfactants such as Pluronic F68 and Pluronic 25R8 (BASF Corp.) to enhance its reusability without having a material adverse effect on cell count or cell marker density on cells in sample 20.

An overview of a preferred operation of an apparatus of the invention is shown in FIGS. 4A-4E. In FIG. 4A, apparatus 10 is shown with sample hose 22 in fluid communication with sample of cells 20. For example, the sample 20 of cells 20 can be 100 µl of whole blood having been processed using a lysing reagent, a stabilizing buffer, and a fixative such as IMMUNOPREP™ reagents (manufactured by Beckman Coulter, Inc., Miami, Florida). As illustrated in FIGS. 4B and C, sample 20 is diluted with buffer 49 to facilitate removing a greater percentage of interferants 72. To transfer a predetermined 25 volume of buffer 49, such as to bring the total volume of the sample to about 4 ml, from buffer reservoir 48 into sample container 16, apparatus 10 is arranged by a computer control mechanism (not shown), so that valve 23 is open, and valves 32 and 52 are closed. As shown in FIG. 4B, buffer valve 42 is then switched to the fill position and buffer pump 40 is activated to 30 aspirate the predetermined volume of buffer 49. As indicated in FIG. 4C,

WO 02/04921

PCT/US01/20697

valve 42 is then switched to the dispense position and pump 40 is activated to dispense the aspirated volume of buffer 49 through filtration device 24 into sample container 16 thereby diluting sample of cells 20.

- As shown in FIG. 4D, sample 20 is then aspirated into filtration device 24 where interferants are removed from the sample by having them pass through membrane 60. In this step, apparatus 10 is configured so that valves 42 and 52 are closed, and valves 23 and 32 are open. Vacuum source 30 is then activated to produce a vacuum to aspirate sample of cells 20 from container 16 into filtration device 24. While the vacuum is being supplied, the liquid in sample 20 that contains interferants is passed through device 24 into vacuum source 30, while cells are retained in device 24, within lumen 66. As shown in FIG. 4E, valves 32 are then closed and vacuum source 30 is activated to provide a forward hydraulic force to expel the aspirated liquid through waste hose into waste reservoir 39.
- As illustrated in FIGS. 4F and G, sample of cells 20 from which interferants have been removed is then transferred back into container 16. In this step, apparatus 10 is configured so that valve 23 is open, and valves 32 and 52 are closed. In FIG. 4F, buffer valve 42 is then switched to the fill position and buffer pump 40 is activated to aspirate a predetermined volume of buffer 49, for example 1.25 ml, from buffer reservoir 48. Valve 42 is then switched to the dispense position and pump 40 is activated to dispense the aspirated volume of buffer 49 through filtration device 24 into sample container 16 as illustrated in FIG. 4G. Movement of buffer 49 through device 24 flushes sample of cells 20 from the device into container 16. In an alternative embodiment (not shown), an additional fluid connection from device 24 to a clean sample container rather than sample container 16 can be provided, such that after the interferants have been removed from sample of cells 20, the sample can be transported from device 24 to the clean container.
- The apparatus 10 can be washed as shown in FIGS. 4H-K. The washing of the apparatus can be after each sample, after a predetermined

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- number of samples, or upon fouling of the membrane 60. In the washing step, apparatus 10 is set up so that valve 23 is partially open, and valves 32 and 42 are closed. As shown in FIG. 4H, detergent solution valve 52 is then switched to the fill position and detergent solution pump 50 is activated to
- 5 aspirate a predetermined volume of detergent solution 59, for example 3 ml, from detergent solution reservoir 58. As indicated in FIG 4I, valve 52 is then switched to the dispense position and pump 50 is activated to dispense the aspirated volume of solution 59 through filtration device 24. Because valve 23 is partially open, solution 59 can flow through hose 100 into waste
- 10 reservoir 39. To purge any detergent solution 59 remaining in device 24, as shown in FIG. 4J, buffer valve 42 is then switched to the fill position and buffer pump 40 is activated to aspirate a predetermined volume of buffer 49, for example 3 ml, from buffer reservoir 48.

In FIG. 4K, prior to the buffer dispensing step, valve 23 can be closed

15 and valve 32 can be switched to the open position. Valve 42 is switched to the dispense position and pump 40 is activated so that buffer 49 is dispensed and the remaining detergent solution 59 in the filtration device and buffer 49 are transferred to waste reservoir 39 by a waste hose. Alternatively, or in addition, valve 23 is switched to being partially open, and valve 32 is closed,

20 and valve 42 is switched to the dispense position and pump 40 is activated to dispense the aspirated volume of buffer 49 through filtration device 24 and hose 100 into reservoir 39. The foregoing steps can be repeated so that device 24 is washed with multiple volumes of buffer prior to analysis of the next sample.

25 Referring now to FIG. 5, the invention also includes methods for removing interferants from a sample of cells. A preferred method for removing interferants from a sample of cells comprises a first step 80 of applying a vacuum force to a blood cell sample to cause the blood cell sample to leave the sample container 16 and contact a filter. As previously explained, this is accomplished by a vacuum force, which typically is capable

WO 02/04921

PCT/US01/20697

of causing approximately 4 ml of a blood cell sample to be withdrawn from the sample container and pass through the membrane filter in approximately 7 seconds. As appreciated by one skilled in the art, the amount of blood cell sample withdrawn from the sample container 16 can be increased or reduced 5 and the time can also be increase or reduced. The limitation on the vacuum force is that it will be less than the amount of force that would cause the cells to aggregate when being retained in the lumen 66. Preferably, the force will be less than that which would cause the cells to deform.

The method includes a second step 82 of applying a force to the blood 10 cell sample in contact with the filter, whereby interferants in the blood cell sample pass through the filter while the cells of interest in the blood cell sample do not pass through the filter. In a preferred embodiment of the invention, the force that is applied to the blood cell sample to cause the interferants to pass through the filter is the same vacuum force which is used 15 to withdraw the blood cell sample from the sample holder. However, it is appreciated that the force could be a separate hydraulic force which after the blood cell sample is withdrawn from the sample container 16, could be applied to the blood cell sample to push the blood cell sample into the lumen and through the membrane. However, it has been found that a vacuum is less 20 damaging to cells. The limitation on the force is that it will be less than the amount of force, which would cause the cells to aggregate when being retained in the lumen 66. Preferably, the force will be less than that which would cause the cells to deform.

The method includes a third step 84 of recovering the cells from the 25 filter. In a preferred embodiment, the cells are recovered by the apparatus of the invention wherein a volume of buffer is pumped through the top portion of the lumen causing the cells that were retained in the lumen to pass through the bottom portion of the lumen back into the sample container. Alternative, the retained blood cells can pass through the bottom portion of the lumen into

WO 02/04921

PCT/US01/20697

a new sample container which can be employed to store the recovered blood cells.

In a more preferred embodiment of the present method, the blood cell sample is first diluted with at least one volume of buffer to each volume of blood cell sample. Even more preferable is that the blood cell sample be diluted with at least two volumes of buffer before entering the lumen to remove the interferants. It has been found that with a one volume dilution of the blood cell sample that greater than 70% of the interferants are removed from the blood cell sample, and with a two volume dilution, greater than 80% of the interferants are removed from the blood cell sample. A three volume dilution of the blood cell sample is preferred to remove greater than 90% of the interferants from the blood cell sample.

The steps of this method can be accomplished using the apparatus of the invention which will provide automation of the steps described above. As defined herein, one cycle of the method is considered to be one wash cycle of the blood cell sample. More specifically, one wash cycle of the blood cell sample comprises applying a vacuum force to a blood cell sample to cause the blood cell sample contact a filter; applying a force to the blood cell sample in contact with the filter, whereby interferants in the blood cell sample pass through the filter while the cells in the blood cell sample do not pass through the filter; and recovering the cells from the lumen. Accordingly, one wash cycle of the blood cell sample wash cycle of this invention can be performed in less than 5 minutes. Preferably, one wash cycle of the blood cell sample is performed in less than 3 minutes, and more preferably less than 1 minute. In an even more preferred embodiment one wash cycle of the blood cell sample is performed in less than 30 seconds. Finally, in a most preferred embodiment, one wash cycle of the blood cell sample is performed in less than 15 seconds.

It has been found that multiple wash cycles cause the cells to deteriorate such as shrinkage of the cell membranes and rupture of the cell

WO 02/04921

PCT/US01/20697

membranes. It has been further found that the addition of a serum substance to the buffer which dilutes the blood cell sample minimizes the deterioration. As defined herein, serum substance comprises cholesterol, cholesterol esters, and cholesterol which has been combined with one or more other 5 compounds found in serum plasma, and mixtures thereof. Preferably, such other compounds further comprise lipoproteins and phospholipids, and mixtures thereof. As appreciated by those skilled in the art, typically cholesterol will contain approximately 30% esters. As further appreciated by those skilled in the art, the lipoprotein will maintain the cholesterol in an 10 aqueous solution. Preferably, the serum substance is selected from the group comprising cholesterol, cholesterol esters, lipoprotein cholesterol, lipoprotein cholesterol esters, cholesterol combined with phospholipids and mixtures thereof.

FIG. 14 depicts an increase in the recovery of cellular events as 15 related to the percent addition of fetal calf serum in a buffer. In this figure, the blood cell sample was washed 3 times with a hollow fiber membrane apparatus shown as "Invention" in the figure. An increase of fetal calf serum indicates that there will be an increase in the percent of cells recovered after multiple wash cycles.

20 It has also been found that one wash cycle of the blood cell sample without the addition of a serum substance eliminates the banana appearance between the lymphocytes and neutrophils subpopulations in histograms of blood cell samples containing a high lipid content.

In an example of the present method, first step 80 is performed by 25 providing a sample of cells such as a 100 microliters of whole human blood obtained by venipuncture from a human subject. If the removal of erythrocytes is desired, the sample can be diluted in a reagent which lyses red blood cells such as 600 microliters of formic acid, and then further diluted by addition of a reagent that neutralizes the red blood cell lysing agent such 30 as 265 microliters of a carbonate buffer. Optionally, a fixative such as 100 µl

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- of a paraformaldehyde solution can also be added to fix the cell sample. The blood cell sample is diluted to a total volume of about 4 ml with an isotonic buffer. Suitable reagents for these steps can be obtained from Beckman Coulter, Inc. (IMMUNOPREP™ reagent system part no. 7546999 or 5 SCATTER PAK™ reagent system). A vacuum force is then applied to the diluted blood cell sample to cause it to contact a filter. Preferably the filter is a hollow fiber membrane (e.g., Cat# CFP-6-D-H22LA from A/G Technology Corporation).

- In second step 82, a force is applied to the blood cells sample which is 10 in contact with the filter to cause the interferants in the diluted blood cell sample to pass through the filter while the cells of interest in the blood cells sample are retained by the filter. More specifically, the cells of interest in the diluted blood cell sample do not pass through the filter. When the hollow fiber membrane is used, the cells of interest will be retained in the lumen.
- 15 Preferably, a vacuum force is applied to the blood cell sample to cause the interferants to pass through the lumen while the cells of interest are retained in the lumen.

- In a most preferred embodiment, the vacuum force that is used to cause the interferants to pass through the filter also aspirates the blood cell 20 sample from the sample container. More specifically, the filtration device is in fluid communication with the sample container since it is filled with a buffer. Therefore, when a sufficient vacuum force is applied to the diluted blood cell sample in the sample container, the diluted blood cell sample is aspirated from the sample container into the filtration device and the interferants pass 25 through the filter. This is accomplished by a continuous flow of the blood cell sample from the sample container through the filter. As previously discussed, the apparatus of this invention can automatically apply the vacuum force necessary to perform these functions.

- The Third step 84 is recovering the cells from the filter. This can be 30 accomplished by providing a force, such as a flow of liquid, to the filter in a

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- direction opposite the direction from which the blood cell sample contacted the filter in step 80. The flow of liquid will move the cells of interest away from the filter. The recovered cells can thereafter be transported by fluid communication to an analytical instrument. Preferably, the recovered cells
5 are returned to a test tube that is then transported to an instrument for analysis.

Referring now to FIG. 6, methods for analyzing cells for phenotypic markers are also included in the invention. A preferred method of analyzing a phenotypic marker on cells within a sample includes: a first step 90 of adding
10 a probe that binds the phenotypic market to the sample of cells to be analyzed to form a test sample mixture; a second step 92 of applying a vacuum force to a blood cell sample to cause the blood cell sample contact a filter; a third step 94 of applying a force to the blood cell sample in contact with the filter, whereby interferants in the blood cell sample pass through the
15 filter while the cells in the blood cell sample do not pass through the filter; a fourth step 96 of recovering the cells from the filter. The method can further include a fifth step 98 (not shown) of quantifying the amount of probe and differentiating the cell populations.

- Steps 92, 94 and 96 can be performed as described above for FIG. 5
20 for Steps 80, 82 and 84 respectively. Step 98 can be performed by analyzing the test sample from which the interferants have been removed using flow cytometry or a similar analytical device.

For example, in a preferred version of this method, first step 90, a saturating concentration of a fluorescently-labeled antigen-specific antibody is
25 added to the blood cell sample to form the test sample mixture. And fifth step 98 can be performed by running the processed test sample mixture on a flow cytometer equipped to quantitatively measure the amount of fluorescently-labeled antigen-specific antibody associated with each cell in the processed test sample mixture.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

From the foregoing, it can be appreciated that the apparatus and methods of the invention facilitate the removal of interferants from a sample of cells to be analyzed. The invention will be further described in the following examples, which do not limit the scope of the invention described in the claims.

Example 1- Cell Washing Apparatus

An apparatus was built with a hollow fiber membrane cartridge cat# CFP-6-D-H22IA from A/G Technology Corporation. The apparatus included a carousel-type cell sample holder adapted to hold several 12 X 75 mm culture tubes. Alternatively, the apparatus can include other types of tube holders such as a cassette. The apparatus also included various hoses, valves, and pumps so that a sample of cells could be aspirated from the tube, filtered through the hollow fiber membrane cartridge to remove interferants from the sample, and then returned to the tube. As described in the detailed description (for example see, discussion of FIGS. 4A-4K), the apparatus also included various hoses, valves, and pumps so that waste fluids (for example, filtrate containing interferants) could be removed to a waste reservoir, and the hollow fiber membrane could be cleaned for use with additional samples. The apparatus also included a computerized system for coordinating the cell sample washing process and the membrane cleaning procedure. The carousel-type cell sample holder was rotatable and also controlled by the computerized system such that after processing a first cell sample, a second tube containing a second cell sample could be repositioned to allow the second cell sample to be aspirated from the tube, filtered through the hollow fiber membrane cartridge to remove interferants from the sample, and then returned to the second tube. This cycle was repeatable such that all samples in the carousel could be washed.

30

Example 2- Method of Washing Cells

Various methods, including a method employing the apparatus of Example 1, were used for removing interferants from a cell sample processed according to the general method described below. A cell population was stained with a fluorescently labeled antibody according to standard techniques. For example, 100 μ l of whole human blood was obtained by venipuncture from a human subject, and then 10 μ l of a 1 mg/ml solution of an antigen-specific FITC-labeled antibody was added to the blood sample.

5 Samples were then incubated for 10 minutes at room temperature, after which erythrocytes were lysed using Beckman Coulter's IMMUNOPREP reagent system and TQ-Prep apparatus according to the manufacturer's instructions (600 μ l of solution A for 8 seconds with mixing; 265 μ l of solution B for 10 seconds with mixing; and 100 μ l of solution C for 10 seconds with mixing). Separate aliquots of the processed blood cells samples were then subjected to one of three different protocols:

10 A. diluted with an isotonic buffer to a total volume of about 4 ml and then washed 1 time per a "Quick Spin" wash protocol. The Quick Spin was protocol means centrifuge 400Xg for 5 minutes using a standard

15 B. centrifuge, decant supernatant, and resuspend in 1 ml of an isotonic buffer ;

20 C. diluted with an isotonic buffer to a total volume of about 4 ml and then washed 1 time per a "Sorvall" protocol using a Sorvall® Cell Washer 2 (auto mode 80 seconds; high speed 2950-3000 rpm; decant 600 rpm) according to the manufacturer's instructions (washed cells resuspended in

25 final volume of 1 ml isotonic buffer) ; or

C. diluted with an isotonic buffer to a total volume of about 4 ml and then washed 1 time using the apparatus described in Example 1 (washed cells in final volume of 1 ml isotonic buffer).

Example 3- Analysis of Cell Samples

- Samples of whole human blood were reacted with a fluorescent labeled monoclonal antibody directed against the cell surface antigen designated CD56, erythrocyte lysed and fixed according to Example 2. "TQ-Prep" samples were not washed. "Quick Spin" samples were washed according to the Quick Spin protocol described in Example 2. "3 ml predilution" samples were washed one time using a hollow fiber membrane apparatus according to the protocol described in Example 2C. "2x wash" samples were washed two times (second wash with a 2 ml predilution) using a hollow fiber membrane apparatus according to the protocol described in Example 2C. The processed blood cell samples were then subjected to flow cytometric analysis using a COULTER EPICS XL flow cytometer according to the manufacturer's instructions. Results for %debris as determined by light scatter analysis, % CD56 positive cells, and signal-to-noise ratio (extrapolated from histograms) are shown in FIG. 7.

- The amount of debris was low for all samples, although more debris was noted in the samples subjected to two washings with the hollow fiber membrane apparatus. The increase of debris was caused by cell degradation because no serum substance was employed in the diluent. The percent of CD56 cells was about the same whether the Quick Spin was used or the hollow fiber membrane apparatus was used. Signal-to-noise ratios were greatly improved over the no wash control, no matter which washing protocol was used. Washing the sample two times with the hollow fiber membrane apparatus produced the best signal-to noise ratio.

- In similar experiments, for unwashed samples the average percent of debris was 10.3% and the average signal to noise ratio was 11.4. As defined herein, debris means events falling below threshold measurement values. In comparison, using the hollow fiber membrane apparatus, the average percent

WO 02/04921

PCT/US01/20697

of debris was 2.5%, which means that greater than 75% of the original 10.3% of debris was removed. In addition, the average signal to noise ratio was 23.8, which means that there was greater than a 200% improvement in the signal to noise ratio. Using the Quick Spin protocol, the average percent
5 debris was 2.6% and the average signal to noise ratio was 38.7. In other experiments, when cell samples were washed 2 or 3 times with the hollow fiber membrane apparatus more interferants were removed and the signal to noise ratio further improved.

10 Example 4-Evaluation of Cell Recovery

Samples of whole human blood were processed, and washed according to the protocols described in Example 2, and then subjected to flow cytometric analysis using an EPICS XL flow cytometer according to the
15 manufacturer's instructions. As shown in FIG. 8, results for cell recovery (number of indicated type of cells recovered from 100 microliter sample of whole blood after processing) show that little or no cell loss occurs in either the lymphocyte, monocyte, granulocyte (cell type determined by light scatter) fractions of the samples. Moreover, cell recovery using the apparatus of
20 Example 1 was about equivalent to that obtained using the Quick Spin protocol. "TQ-Prep" samples (n=5) were not washed; "Quick Spin" samples (n=5) were washed according to the Quick Spin protocol described herein. "Auto" samples (n=32) were washed one time using a hollow fiber membrane apparatus.

25

Example 5-Accuracy

Samples of whole human blood from several different donors were stained for CD56, processed, and washed according to the protocols
30 described in Example 2. "TQ-Prep" samples were not washed; "Quick Spin"

WO 02/04921

PCT/US01/20697

samples were washed according to the Quick Spin protocol described herein; and "Hollow Fiber" samples were washed one time using a hollow fiber membrane apparatus. The samples were then subjected to flow cytometric analysis using an EPICS XL flow cytometer according to the manufacturer's instructions. As shown in FIG. 9, the percentage of cells that were CD56⁺ varied from donor to donor but, for any one donor, was about the same whether the Quick Spin was used or the hollow fiber membrane apparatus was used.

10 Example 6-Precision

Thirty-two aliquots of one sample of whole human blood were stained for CD56, processed, and washed according to the protocols described in Example 2, and then subjected to flow cytometric analysis using a COULTER EPICS XL flow cytometer according to the manufacturer's instructions to determine the percent of CD56⁺ cells in each aliquot. The average percent of CD56⁺ cells among the aliquots was 17.44% with a standard deviation of 0.74 and a coefficient of variation of 4.27%. In a similar experiment using 28 aliquots, the average percent of CD56⁺ cells among the aliquots was 15.6% with a standard deviation of 0.6 and a coefficient of variation of 3.5%.

Example 7-Cell Carryover

Whole blood cell samples were processed as described in Example 2 and then concentrated to four times normal cell concentrations. Each sample was then washed using the apparatus of Example 1 (per the protocol of Example 2C with cleaning of the hollow fiber membrane after sample washing). The apparatus was then used to "wash" a blank sample containing only buffer without cells. The blank sample was analyzed for the presence of cells using a flow cytometer. As shown in FIG. 10, carryover of cells from test

WO 02/04921

PCT/US01/20697

to test was very low, ranging from 0.00% to 0.03% of cells being carried over to subsequent analysis.

Example 8- Other Applications

5

The apparatus and methodology of the invention are also suitable for other analyses not explicitly described in detail herein. Such other applications include protein analysis of urine. In addition, applications which have traditionally utilized centrifugation as part of their cellular analysis

- 10 method are specifically envisioned for use with the disclosed hollow fiber membrane apparatus and method described herein. For example, many different cell populations have been analyzed using the apparatus. Additionally, many different probe types have been used in the invention. For instance, aside from erythrocyte-depleted whole blood samples, the hollow
- 15 fiber membrane apparatus has been successfully used with cell lines, purified white blood cell subsets; erythrocytes; platelets; bone marrow cells; and cells in cerebrospinal, synovial, peritoneal, ascites, pleural, pericardial fluids and homogenized tissue. The erythrocyte agglutination techniques commonly practiced in the blood banking field for the typing of blood and for compatibility
- 20 testing, which are traditionally centrifugation dependent, can be readily adapted for performance using the methodology and apparatus of the invention. Probes that have been successfully used in the invention include fluorescently labeled monoclonal antibodies that are specific for the cell surface antigens such as immunoglobulin, kappa and lambda factors, CD5,
- 25 CD7, CD10, CD13, CD19, CD33, CD34, CD38, CD41, CD45, CD 41, CD42b, CD 61, CD63, CD64, CD71, and CD117; as well as intracellular antigens such as various types of hemoglobin. Various other antibody and non-antibody probes such as chemical and biologic constructs that bind to receptor molecules on the cell surface, enzymatic substrates which react with
- 30 cellular enzymes within the cell, antibody and non-antibody probes which

WO 02/04921

PCT/US01/20697

react with cytoplasmic antigens within the cell, DNA and RNA probes which react with nucleic acids sequences within the cells and various intracellular dyes that react with cytoplasmic and nuclear structures within the cell are expected to be compatible with the invention. It is thus envisioned that most 5 types of cells and probes are compatible with the invention, especially if the selected cell type is larger and the selected probe is smaller than the pores of the selected hollow fiber membrane.

For example, referring to FIG. 11, application of the invention to platelet samples is shown by flow cytometric analysis of platelet samples 10 stained for CD42b and CD63. Additionally, as another example, referring to FIG. 12, application of the invention to bone marrow samples is shown by flow cytometric analysis of bone marrow cell samples stained for CD56. Cell recovery and signal-to-noise ratio were comparable between "Invention" which is the apparatus and method described herein and the Sorvall 15 apparatus and washing method. Referring now to FIG. 13, application of the invention for intracellular analysis is shown by flow cytometric analysis of permeabilized blood cell samples stained for hemoglobin. Signal-to-noise ratios were comparable between "Hollow Fiber" which is the apparatus and method described herein and Quick Spin washing method described in 20 Example 2.

Example 9- Cell Washing Apparatus Integrated with a Cell Analyzer

It is specifically envisioned that the cell washing apparatus of the 25 invention can be integrated with one or more conventional cell analyzers thereby obviating a manual step of transferring a sample of washed cells from the washing device to the analyzer. For example, the cell washing apparatus described herein could be integrated with a flow cytometer such as a COULTER EPICS® brand flow cytometer by providing robotic means for 30 transferring a test tube from a cell sample washed using the cell washing

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- apparatus of the invention such that the tube becomes positioned so that it can be analyzed in the flow cytometer. As one example, a conveyor could transport a carousel containing several washed samples from a position suitable for washing the cells (e.g., proximal to the cell washing device) to another position suitable for analyzing the samples (e.g., proximal to the flow cytometer). Fluid connections and conduits would aspirate washed cell samples into the flow cytometer for analysis.

Alternatively, the cell washing apparatus of the invention can be integrated with one or more hematology instruments. In this embodiment, the blood cell sample would be washed after lysing the erythrocytes to remove remaining cellular debris. Still further, the blood cell sample could be washed prior to any biological or chemical reaction with the blood cell sample so that interferants are removed from the blood cell sample.

While the above specification contains many specifics, these should not be construed as limitations on the scope of the invention, but rather as examples of preferred embodiments thereof. Many other variations are possible. For example, the invention includes an apparatus for removing interferants from a cell sample that has only one hydraulic force transducer rather than two pumps and a vacuum source. The various hoses and valves within this apparatus can be connected in a manner to cooperate with the sole hydraulic force transducer, so that the apparatus functions much as the described preferred embodiments. As another example, a method of concentrating a cell sample by removing liquid from the sample using a microporous hollow fiber membrane is included within the invention. Accordingly, the scope of the invention should be determined not by the embodiments illustrated, but by the appended claims and their legal equivalents.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

What is claimed is:

1. An apparatus for automatically removing interferants from a sample of cells containing cells of interest and interferants, the apparatus comprising:
 - 5 a) a vacuum source;
 - b) a filtration device comprising an impermeable housing that forms an extramembrane chamber wherein said chamber contains a filter that selective retains cells of interest while allowing interferants to pass through the filter, and wherein said housing contains at least three port and wherein at least one port is connected by a conduit to the vacuum source;
 - 10 c) a conduit from one of said ports in said housing which is adapted to aspirate a cell sample from a sample container into the filtration device by said vacuum source; and
 - d) a conduit from one of said ports in said housing which fluidly connects to a buffer reservoir, which provides a means for buffer to enter into said filtration device to recover the retained cells through one of said ports.
2. The apparatus of claim 1, wherein the port in said housing which fluidly connects to a buffer reservoir is different from the port in said housing
20 which is adapted to aspirate a cell sample from a sample container into the filtration device by said vacuum source.
3. The apparatus of claim 1, wherein recovery of the retained cells occurs through the same conduit which is adapted to aspirate a cell sample
25 from a sample container.
4. The apparatus of claim 3, wherein the recovery of the retained cells occurs in the sample container from which the cell sample has been aspirated.

30

WO 02/04921

PCT/US01/20697

5. The apparatus of claim 1, wherein the filter comprises a microporous hollow fiber membrane having a plurality of pores sized such that the cells are prevented from passing therethrough.
- 5 6. The apparatus of claim 5, wherein the pores have a diameter of approximately 0.1 microns to about 5 microns.
7. The apparatus of claim 5, wherein the pores have a diameter of approximately 0.2 microns to about 2 microns.
- 10 8. The apparatus of claim 5, wherein the microporous hollow fiber membrane is fashioned into at least one tube defining a lumen, and wherein the tube having a first opening in the tube, and at the opposite end of the tube has is a second opening.
- 15 9. The apparatus of claim 8, wherein the first opening is fluidly connected to the conduit such that the sample of cells can be moved from the cell sample container through the first opening into the lumen.
- 20 10. The apparatus of claim 8, wherein the second opening is fluidly connected to the conduit such that the buffer can be moved from the buffer reservoir through the second opening into the lumen.
11. The apparatus of claim 1, wherein said vacuum source is
- 25 fluidly connected to the extramembrane chamber such that application of a vacuum from the vacuum source to the extramembrane chamber causes the sample of cells to be aspirated from a cell sample container through the

WO 02/04921

PCT/US01/20697

conduit into the filtration device, and interferents contained in the sample of cells to flow through the filter into the extramembrane chamber and exit through a second conduit.

- 5 12. The apparatus of claim 11, further comprising at least one pump and a plurality of valves, the at least one pump providing an hydraulic force for transporting a buffer contained within a buffer reservoir into the filtration device, and a detergent solution contained within a detergent solution reservoir into the filtration device; and the plurality of valves being adapted to
10 open and close such that the vacuum from the vacuum source can be applied to the extramembrane chamber such that the buffer, the detergent solution, and interferants contained in the sample of cells within the filtration device can be controllably removed from the filtration device; and the hydraulic force provided from the at least one pump can be directed to transport the buffer
15 from the buffer reservoir to the filtration device, and the buffer from the buffer reservoir to the cell sample container, and the detergent solution from the detergent solution reservoir to filtration device.

13. The apparatus of claim 12, further comprising a computer
20 controller for controlling the at least one pump and the plurality of valves.

14. The apparatus of claim 1, wherein one of the ports is fluidly connected to a detergent solution reservoir adapted for containing a detergent solution.

- 25 15. The apparatus of claim 1, further comprising a conduit which is fluidly connected to a cell analyzer.

16. The apparatus of claim 15, wherein the cell analyzer measures
30 fluorescence.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

17. The apparatus of claim 15, wherein the cell analyzer is a flow cytometer.

- 5 18. An automated method for removing interferants from a sample containing cells comprising:
- a) applying a vacuum force to a blood cell sample in a first sample container to cause the blood cell sample to contact a filter;
 - b) applying a force to the blood cell sample in contact with the filter,
- 10 whereby interferants in the blood cell sample pass through the filter while the cells in the blood cell sample do not pass through the filter; and
- c) recovering the cells from the filter.

19. The method of claim 18, wherein the force which causes the
15 interferants in the blood cell sample to pass through the filter is a vacuum force.

20. The method of claim 18, which further comprises diluting the blood cell sample with a buffer prior to applying the force which causes the
20 interferants in the blood cell sample to pass through the filter.

21. The method of claim 20, wherein diluting the blood cell sample with at least one volume of buffer to each volume of blood cell sample.

25 22. The method of claim 18, wherein the recovering the cells from the filter is into the first blood cell container.

23. The method of claim 22, which further comprises:
25 a) applying a vacuum force to the recovered blood cell sample to
30 cause the blood cell sample to contact a filter;

WO 02/04921

PCT/US01/20697

- b) applying a force to the blood cell sample in contact with the filter, whereby interferants in the blood cell sample pass through the filter while the cells in the blood cell sample do not pass through the filter; and
- c) recovering the cells from the filter.

5

24. The method of claim 18, wherein the recovering the cells from the filter is into a second blood cell container which is different than the first blood cell container.

10 25. The method of claim 24, which further comprises:

- a) applying a vacuum force to the recovered blood cell sample to cause the blood cell sample to contact a filter;
- b) applying a force to the blood cell sample in contact with the filter, whereby interferants in the blood cell sample pass through the filter while the
- 15 cells in the blood cell sample do not pass through the filter; and
- c) recovering the cells from the filter.

26. The method of claim 18, which further comprises adding a serum substance to the blood cells sample.

20

27. The method of claim 18, wherein the method is performed in less than 5 minutes.

28. The method of claim 27, wherein the method is performed in less
25 than 1 minute.

29. The method of claim 18, which further comprises analyzing the cells which are recovered from the filter.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

30. The method of claim 29, which further comprises lysing erythrocytes in the blood cell sample prior to recovering the cells from the filter.

5 31. The method of claim 29, which further comprises lysing erythrocytes in the blood cell sample after the cells are recovered from the filter.

10 32. The method of claim 18, wherein greater than 75% of the interferants in the blood cell sample pass through the filter.

33. An automated method of preparing blood cells for analysis comprising:

- 15 a) adding at least one reagent that reacts with blood cells to a blood cell sample to form a test sample mixture;
- b) automatically removing interferants from the test sample mixture to yield a washed blood cell sample; and
- c) analyzing the washed blood cell sample to determine characteristics of the blood cells.

20 34. The method of claim 33, wherein the reagent comprises at least one antibody that specifically binds to at least one target antigen on the surface of the blood cells within the blood cell sample.

25 35. The method of claim 34, wherein the antibody contains a fluorescent test label.

30 36. The method of claim 33, wherein analyzing the washed blood cell sample is by electrical or optical measurements.

WO 02/04921

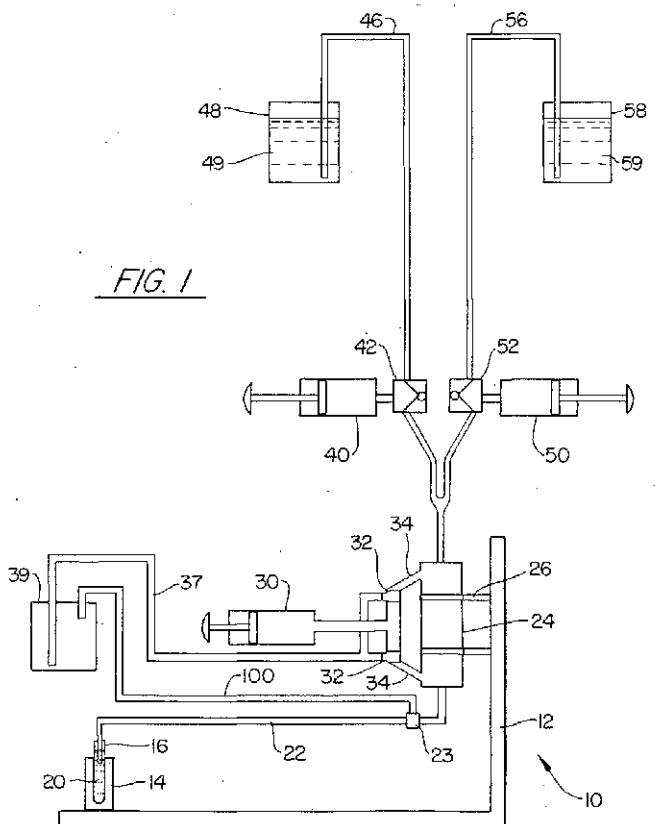
PCT/US01/20697

37. The method of claim 33, wherein the reagent comprises a lytic reagent that lyses erythrocytes in the blood cell sample to be analyzed.

WO 02/04921

PCT/US01/20697

1/24

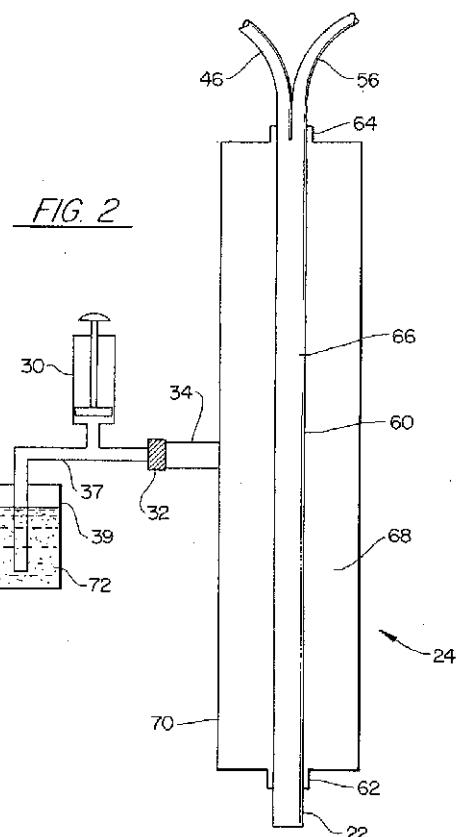


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

2/24

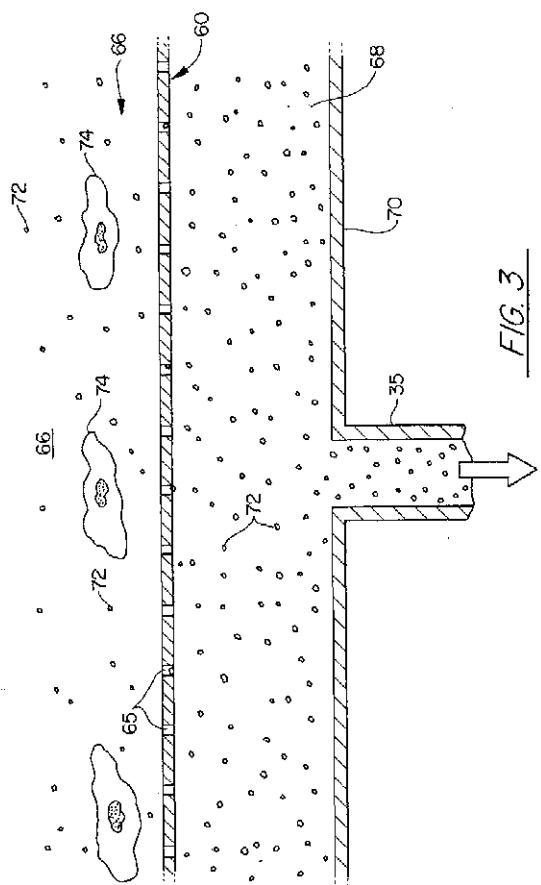


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

3/24



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

4/24

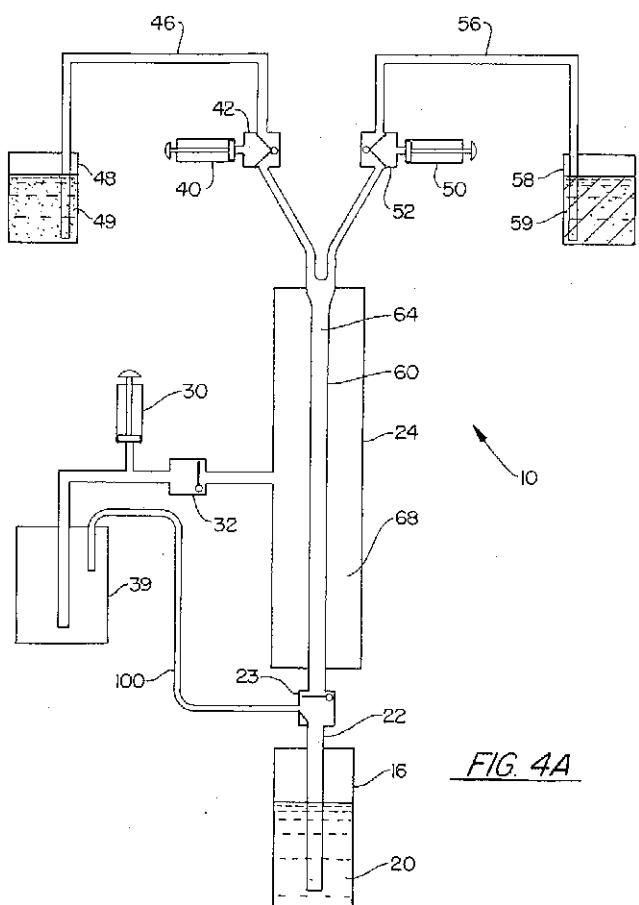


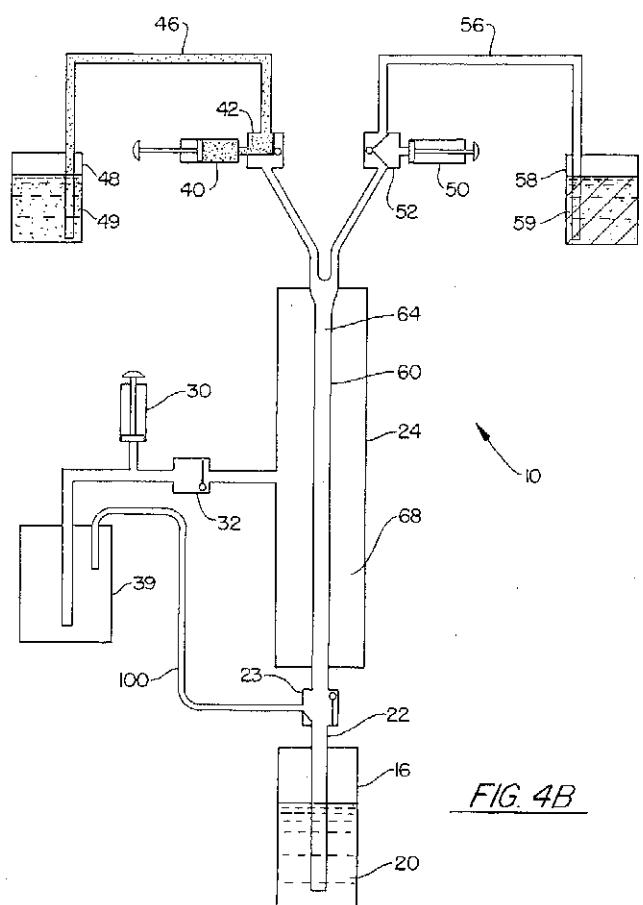
FIG. 4A

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

5/24



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

6/24

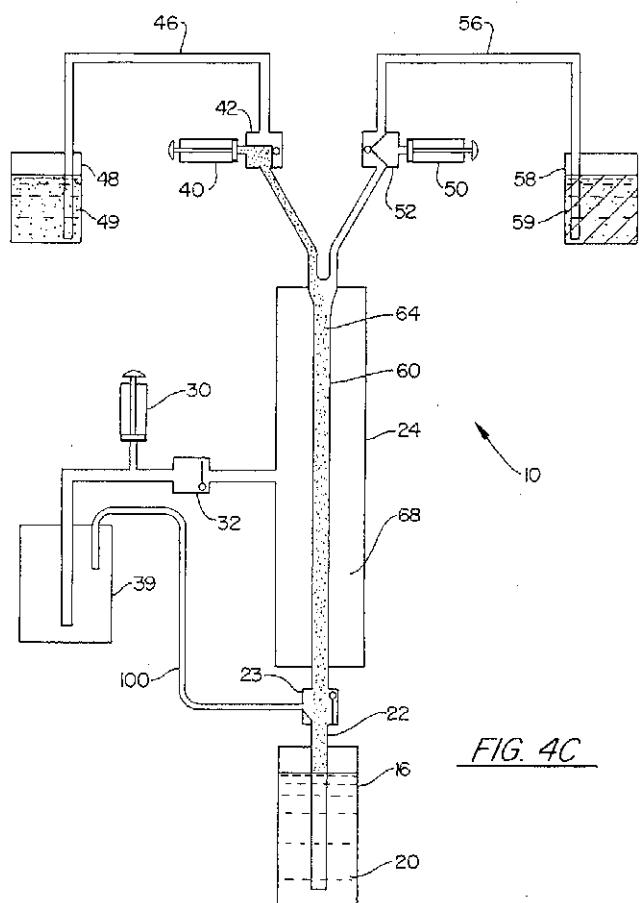


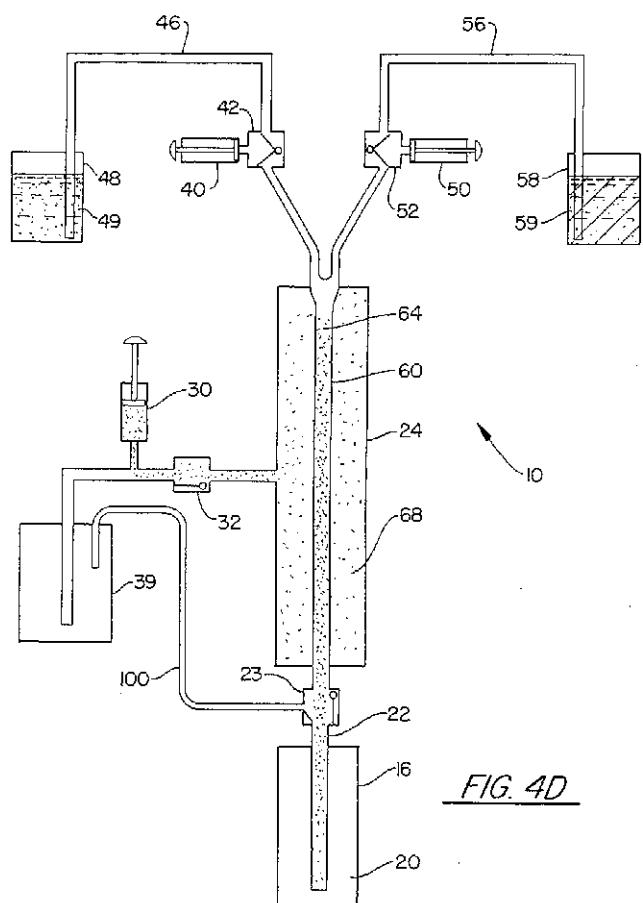
FIG. 4C

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

7/24

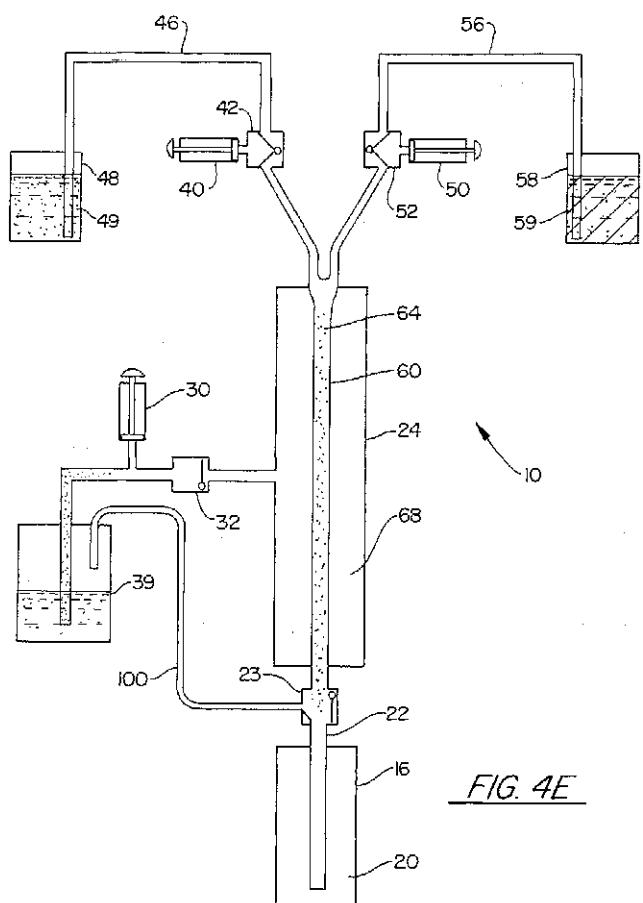


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

8/24

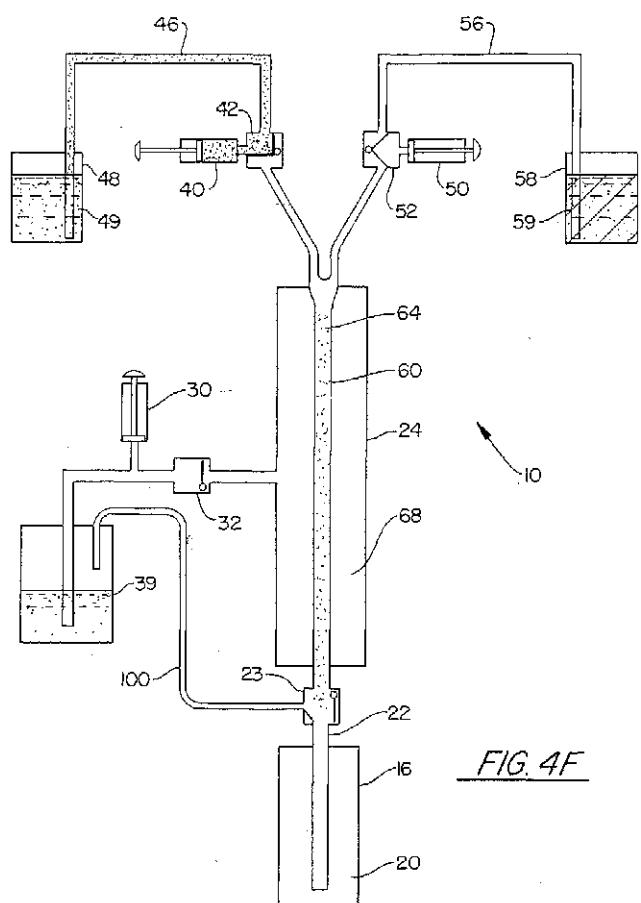


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

9/24

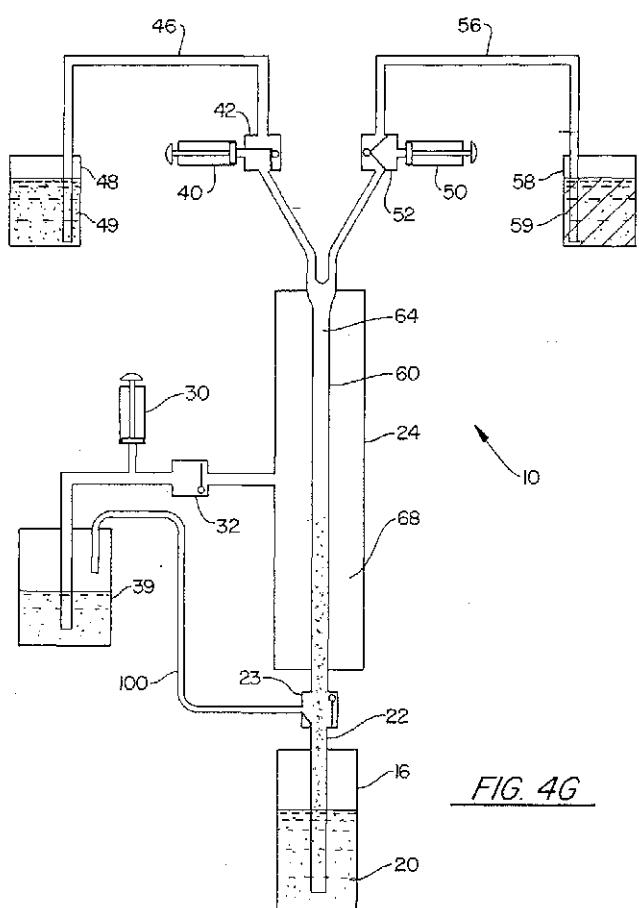


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

10/24

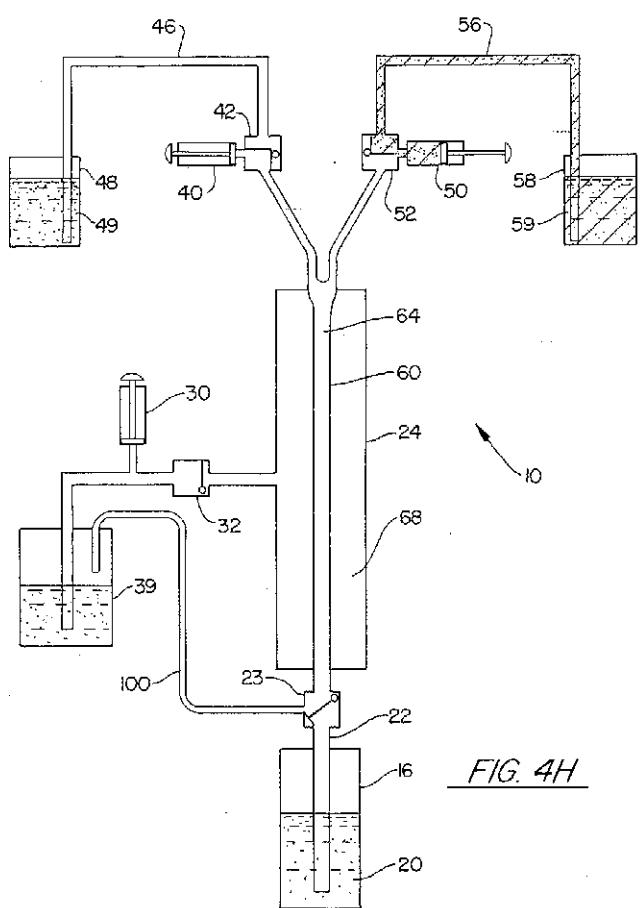


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

11/24

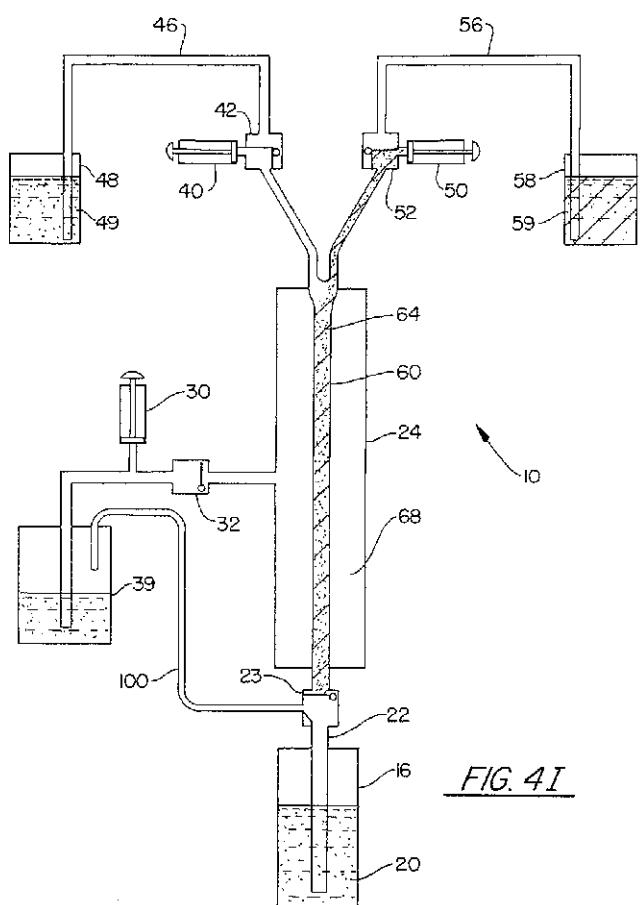
FIG. 4H

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

12/24

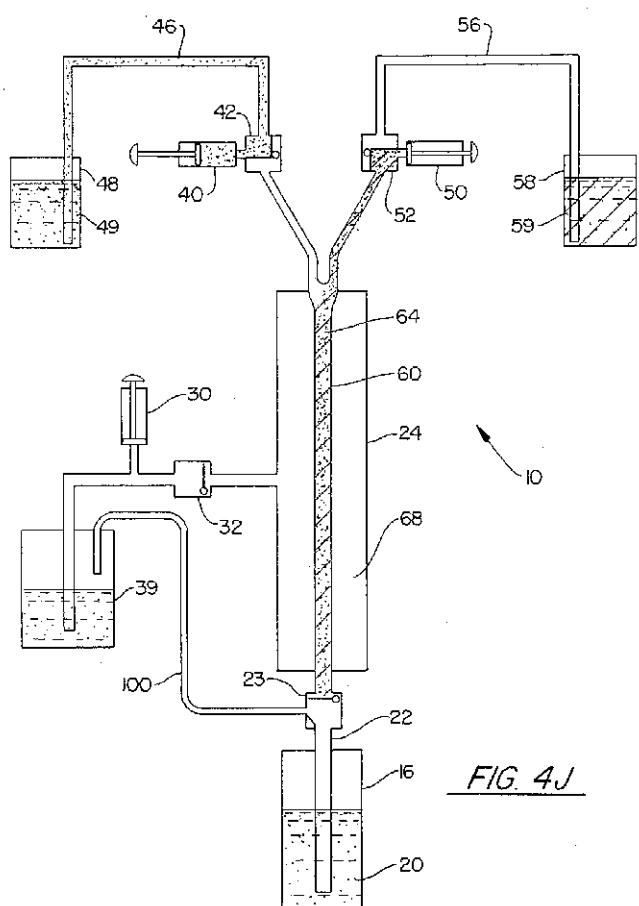
FIG. 4I

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

13/24

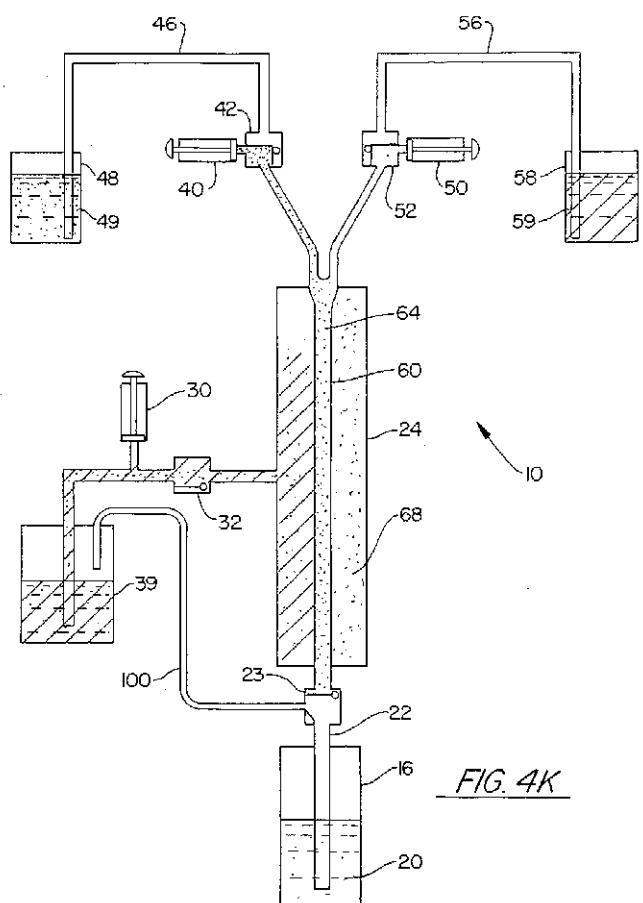


SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

14/24



SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

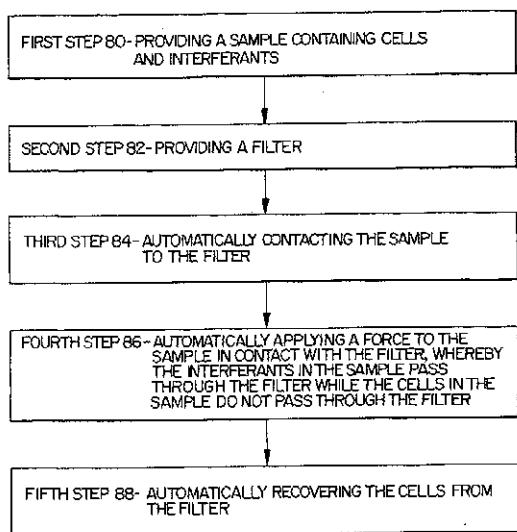


FIG. 5

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

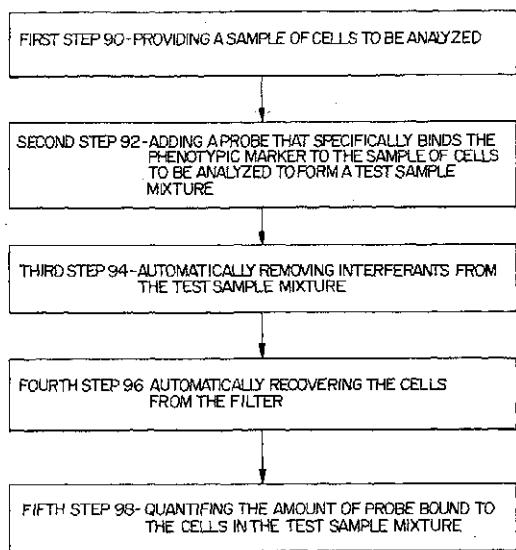


FIG. 6

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

17/24

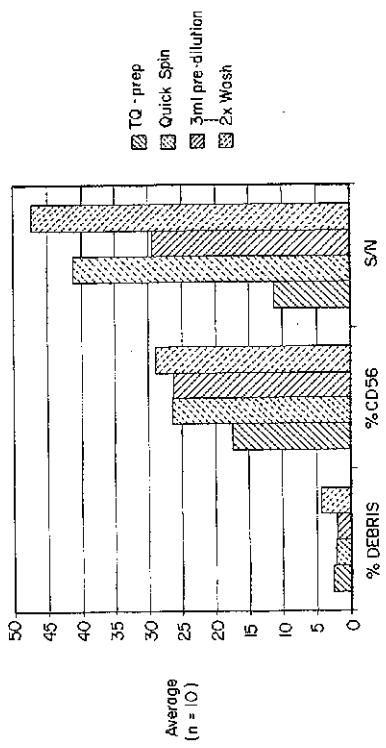


FIG. 7

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

18/24

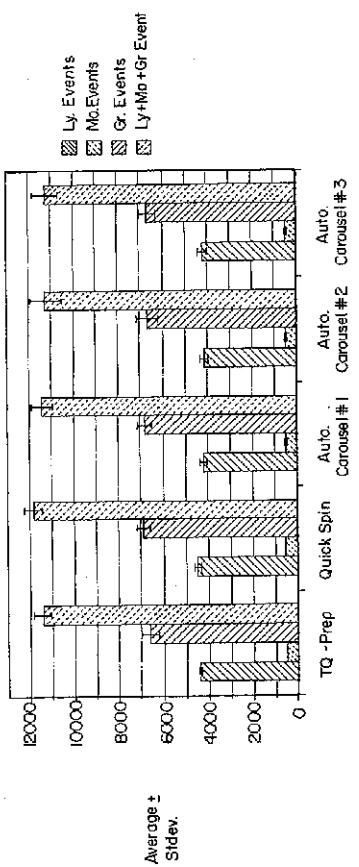


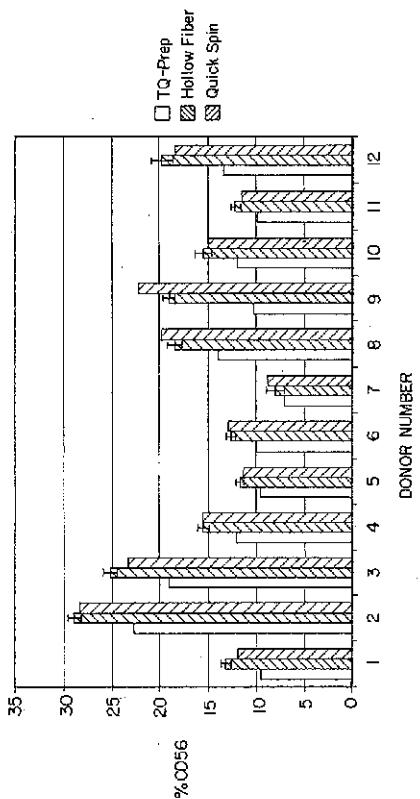
FIG 8

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

19/24

FIG. 9

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

20/24

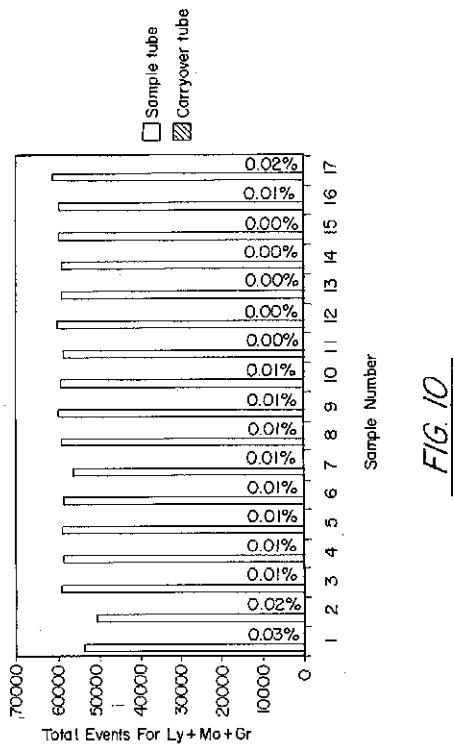


FIG. 10

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

21/24

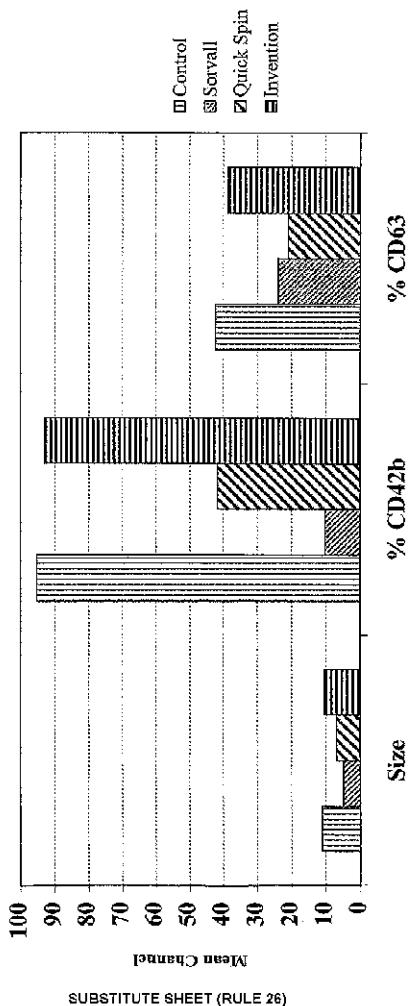
Evaluation of Wash Technologies Using Platelets

Figure 11

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

22/24

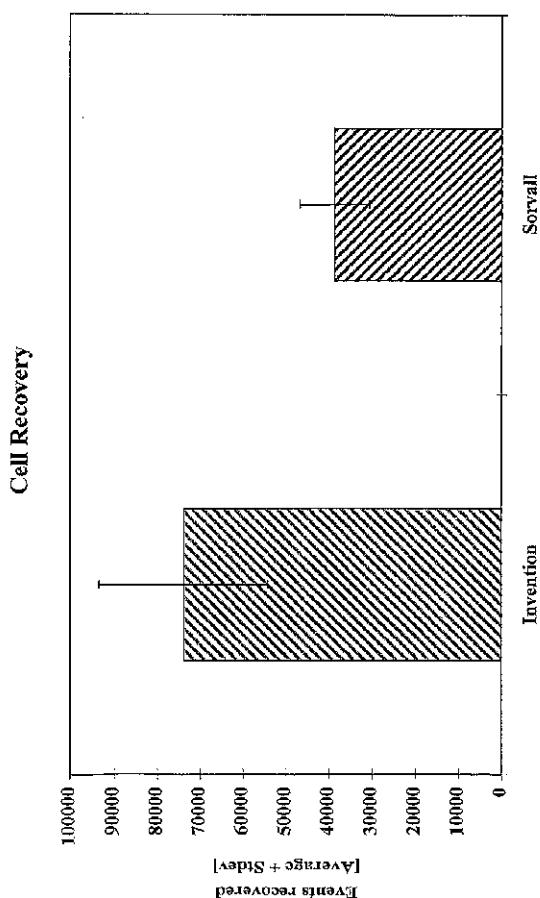


Figure 12

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

23/24

PCT/US01/20697

Evaluation of Cell Wash Technology for Hemoglobin

Figure 13

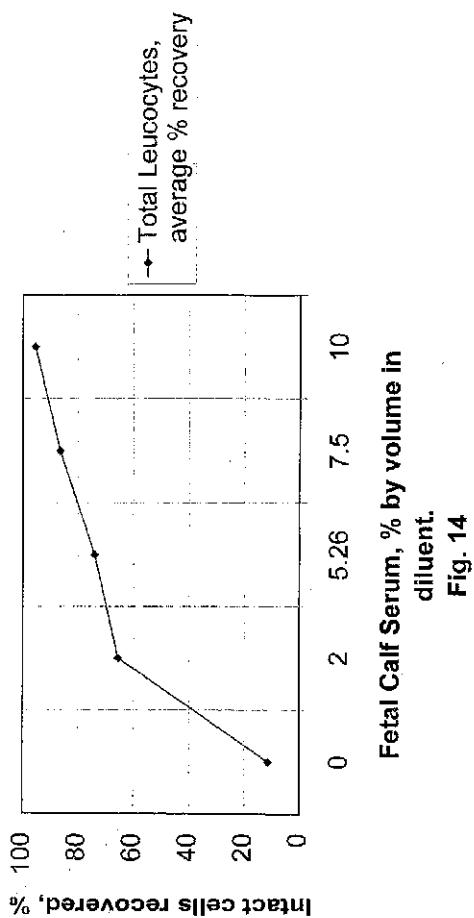
SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

WO 02/04921

PCT/US01/20697

24/24

Cellular event recoveries vs percent of Fetal Calf Serum by volume in diluent.



Fetal Calf Serum, % by volume in diluent.
Fig. 14

SUBSTITUTE SHEET (RULE 26)

【国際公開パンフレット（コレクトバージョン）】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
17 January 2002 (17.01.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/004921 A3

- (51) International Patent Classification⁵: G01N 1/34 33196 (US); LUCAS, Frank, Jr.; 2143 Bethel Boulevard,
Boca Raton, FL 33431 (US).
- (21) International Application Number: PCT/US01/20697
- (22) International Filing Date: 28 June 2001 (28.06.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 09/611,847 7 July 2000 (07.07.2000) US
- (71) Applicant: COULTER INTERNATIONAL CORP.
[US/US]; 11800 SW 147 Avenue, Mail Code 32-A02,
Miami, FL 33196 (US).
- (72) Inventors: BURSHTEYN, Alexander; 6192 W. 26th
Court, 15thFloor, FL 33196 (US); JOUBRAN, John,
W.; 16341 SW 103 Terrace, Miami, FL 33196 (US);
KOVALEX, Nade, 16955 S.W. 109 Street, Miami, FL.
- (74) Agent: ALITER, Mitchell, E.; Coulter International Corp.,
P.O. Box 169015, Mail Code 32-A02, Miami, FL 33116-
9015 (US).
- (81) Designated States (national): CN, JP.
- (84) Designated States (regional): European patent (AT, BE,
CIL, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE, TR).

Published:
*with International search report
-- before the expiration of the time limit for extending the
claims and to be republished in the event of receipt of
a request*

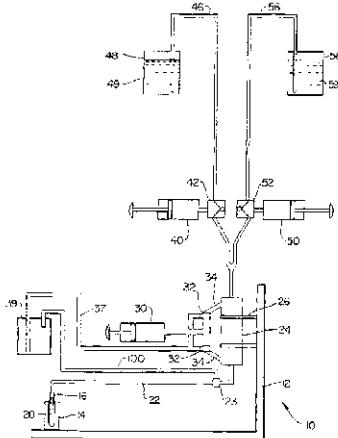
(88) Date of publication of the international search report:
4 July 2002

It continued on next page

(54) Title: APPARATUS AND METHOD FOR BIOLOGICAL SAMPLE PREPARATION AND ANALYSIS



WO 02/004921 A3



(51) Abstract: A method for utilizing a filtration device (124) for removing inter顆ts from a sample containing cells (120) in an automated apparatus (10) is disclosed. The filtration device includes a microporous hollow fiber membrane (60) having a plurality of pores (65) sized to retain cells while allowing smaller diameter inter顆ts (72) to pass through membrane. The apparatus also includes a means of moving the sample from a sample container (16) to and from the filtration device. The disclosed method utilizes a vacuum source (30) to aspirate the sample into a lumen (66) of the hollow fiber membrane so that the sample is retained in the lumen space until expelled into an analysis container or transported to an analyzer.

WO 02/004921 A3

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guide and Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		
		In- doal Application No. PCT/US 01/20597
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7 GOIN1/34		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum document searched (classification system followed by classificatory symbols)		
IPC 7 GOIN B01D		
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 practical, search terms used)		
EPO-Internal, WPI Data, PAJ		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96 04067 A (FSM TECHNOLOGIES LTD ; HOOD ROBERT GORDON (GB)) 15 February 1996 (1996-02-15) page 1, line 3 -page 1, line 12 page 2, line 23 -page 2, line 26 page 3, line 1 -page 3, line 5 page 4, line 11 -page 5, line 9 page 6, line 12 -page 6, line 24 page 7, line 16 -page 7, line 27 page 8, line 17 -page 9, line 4 page 10, line 19 -page 10, line 26 page 10, line 36 -page 11, line 22 page 13, line 9 -page 13, line 12 page 14, line 19 -page 14, line 26 page 17, line 23 -page 20, line 6 page 20, line 23 -page 21, line 22 page 22, line 26 -page 23, line 20 -/-	1-15
Y		1-17, 22, 23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C		<input checked="" type="checkbox"/> Parent family members are listed in annex.
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>*A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>*E* earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>*L* document which may throw doubts on priority claims(s) or which is cited to establish the publication date of another document or other relevant facts (see specification)</p> <p>*C* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>*P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>*1* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but related to a different line of principle or theory underlying the invention</p> <p>*2* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or can not be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>*3* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered valid or can not 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</p> <p>*5* document member of the same parent family</p>		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
19 April 2002		26/04/2002
Name and mailing address of the ISA		
U.S. Patent and Trademark Office, P.O. Box 5000 1400 L Street, NW Tel. (202) 707-5460-2040, Tx. 31 651 4000, Fax. (202) 707-5460-3070		
Authorized officer		Koch, A

Form PCT/ISA/212 (Version 01/01, July 1995)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		In International Application No PCT/US 01/20697
C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Character of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	figures 2,4,5C,6,7-11 US 5 711 871 A (MILTENYI STEFAN) 27 January 1998 (1998-01-27)	33,34
Y	column 2, line 34 -column 2, line 54 column 3, line 20 -column 4, line 10 column 4, line 50 -column 5, line 17 column 8, line 66 -column 9, line 13 column 10, line 54 -column 10, line 65 column 12, line 58 -column 13, line 18 column 14, line 43 -column 18, line 8 figures 1-3 US 4 968 600 A (MORI YUICHI ET AL) 6 November 1990 (1990-11-06) column 1, line 7 -column 1, line 13 column 2, line 47 -column 3, line 12 column 7, line 9 -column 7, line 60 column 9, line 37 -column 10, line 26 column 12, line 41 -column 13, line 40 figures 1,5,7 US 5 798 221 A (AEGIDIUS POU L ERIK) 25 August 1998 (1998-08-25) column 1, line 4 -column 1, line 8 column 1, line 13 -column 1, line 22 column 2, line 10 -column 2, line 29 column 7, line 29 -column 7, line 67 column 9, line 34 -column 10, line 7 figure 1	1-15, 18-26, 29,30, 35,36 18-26, 29,30 16,17, 35,36
1		

Form 142 (1992) (continuation of annex sheet 1 (May 1992))

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on parent family members

International Application No
PCT/US 01/20697

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9604067	A	15-02-1996	AU 3183195 A EP 0775014 A1 WO 9604067 A1 JP 10503847 T	04-03-1996 28-05-1997 15-02-1996 07-04-1998
US 5711871	A	27-01-1998	US 5705059 A AU 4765396 A EP 0869838 A1 IL 116914 A WO 9626782 A1 US 5691208 A	06-01-1998 18-09-1996 14-10-1998 06-12-2000 06-09-1996 25-11-1997
US 4968600	A	06-11-1990	JP 1720365 C JP 4004908 B JP 62217973 A AU 687114 B2 AU 7018587 A CA 1334395 A1 CN 87103201 A, B DE 3771535 D1 EP 0238335 A2 IN 170744 A1 KR 9105292 B1	24-12-1992 29-01-1992 25-09-1987 03-08-1989 24-09-1987 14-02-1995 16-12-1987 29-08-1991 23-09-1987 09-05-1992 24-07-1991
US 5798221	A	25-08-1998	AT 184319 T AU 1946095 A DE 69512037 D1 DE 69512037 T2 WO 9525174 A1 DK 750678 T3 EP 0750678 A1 ES 2135713 T3 JP 9510105 T NZ 282381 A	15-09-1999 03-10-1995 14-10-1999 27-01-2000 21-09-1995 20-12-1999 02-01-1997 01-11-1999 14-10-1997 24-06-1997

Form PCT/ISA/210 (Parent family annex) (July 1992)

フロントページの続き

(51) Int.Cl.⁷

// G 0 1 N 21/64

F I

G 0 1 N	33/53	Y
G 0 1 N	33/543	5 7 5
G 0 1 N	21/64	Z

テーマコード(参考)

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 バーシュテイン, アレキサンダー

アメリカ合衆国, フロリダ 33016, ハイアリーア, ウエスト トゥエンティーシックスス
コート 6192

(72)発明者 ジュブラン, ジョン ダブリュ.

アメリカ合衆国, フロリダ 33196,マイアミ, サウスウェスト 103 テラス 1634
1

(72)発明者 クイレン, ナズル

アメリカ合衆国, フロリダ 33196,マイアミ, サウスウェスト 109 ストリート 16
055

(72)発明者 ルーカス, フランク ジェイ.

アメリカ合衆国, フロリダ 33431, ボカラ レートン, ベセル ブールバード 2143

F ターム(参考) 2G043 AA01 BA16 DA01 EA01 GA07 GB21 LA01 MA01 NA13

2G052 AA30 AA33 AD09 AD46 BA22 CA02 CA04 CA12 EA03 GA11

HC10

专利名称(译)	用于制备和分析生物样品的装置和方法		
公开(公告)号	JP2004503745A	公开(公告)日	2004-02-05
申请号	JP2002509743	申请日	2001-06-28
申请(专利权)人(译)	库尔特国际公司		
[标]发明人	バーシュテインアレキサンダー ジュブランジョンダブリュ クイレンナズル ルーカスフランクジェイ		
发明人	バーシュテイン,アレキサンダー ジュブラン,ジョン ダブリュ. クイレン,ナズル ルーカス,フランク ジェイ.		
IPC分类号	G01N21/64 B01D61/14 B01D61/18 B01D61/20 B01D63/02 G01N1/00 G01N1/10 G01N1/28 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N1/4077 B01D61/147 B01D61/18 B01D61/20 B01D63/02 Y10T436/25375 Y10T436/255		
FI分类号	G01N1/10.B G01N1/00.101.F G01N1/00.101.M G01N33/48.B G01N33/48.M G01N33/53.Y G01N33/543.575 G01N21/64.Z		
F-TERM分类号	2G043/AA01 2G043/BA16 2G043/DA01 2G043/EA01 2G043/GA07 2G043/GB21 2G043/LA01 2G043/MA01 2G043/NA13 2G052/AA30 2G052/AA33 2G052/AD09 2G052/AD46 2G052/BA22 2G052/CA02 2G052/CA04 2G052/CA12 2G052/EA03 2G052/GA11 2G052/HC10		
代理人(译)	石田 敬 西山雅也		
优先权	09/611847 2000-07-07 US		
其他公开文献	JP2004503745A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种利用过滤机构(24)从用于自动化设备(10)的含细胞样本(20)中去除干扰物质的方法。过滤机构包括具有多个微孔(65)的微孔中空纤维膜(60)，所述微孔的大小被确定为保留细胞同时允许较小直径的干扰物(75)通过。该装置还包括用于在样品容器(16)和过滤机构之间移动样品的装置。所公开的方法利用真空源(30)将样品吸入中空纤维膜的内腔(66)中，并将样品引导至分析容器，直至其被排入分析容器或被引导至分析仪，留在管腔内。

