

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5606000号
(P5606000)

(45) 発行日 平成26年10月15日(2014.10.15)

(24) 登録日 平成26年9月5日(2014.9.5)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/531 (2006.01)	GO 1 N 33/531 B
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 597
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 21/78 C

請求項の数 14 外国語出願 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2009-67450 (P2009-67450)	(73) 特許権者	505132183
(22) 出願日	平成21年3月19日 (2009.3.19)		アシスタンス ブブリケーオピトウ ドゥ
(65) 公開番号	特開2009-258097 (P2009-258097A)		パリ
(43) 公開日	平成21年11月5日 (2009.11.5)		フランス国 エフ-75004 パリ ア
審査請求日	平成24年2月24日 (2012.2.24)		ベニュー ビクトリア 3
(31) 優先権主張番号	PCT/FR2008/000380	(73) 特許権者	505429360
(32) 優先日	平成20年3月20日 (2008.3.20)		ユニヴェルシテ パリ 13 パリ ノー
(33) 優先権主張国	フランス (FR)		ル
			フランス、エフ-93430 ヴィルタヌ
			ーズ、アヴェニュー ジャン-バプティスト
			クレマン、99
			99, avenue Jean-Bapt
			iste Clement, F-9343
			O Villetaneuse, FRAN
			CE

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フローサイトメトリーによって細胞を分析する方法、そのような方法における酸化防止剤および／またはフリーラジカル捕捉剤の使用、ならびに酸化防止剤および／またはフリーラジカル捕捉

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

フローサイトメトリーによる細胞分析において、インキュベーション緩衝液と、タンデム蛍光色素 APC - Cy7 (アロフィコシアニン - シアニン7) 又は APC - H7 (アロフィコシアニン - Hilite (登録商標) 7 - BD) である少なくとも1つの蛍光色素と結合した1つまたは複数のラベリング抗体とを含むラベリング溶液中の前記少なくとも1つの蛍光色素の分解を抑制する方法であって、

前記ラベリング溶液中に酸化防止剤および／またはフリーラジカル捕捉剤を導入するステップと、

前記ラベリング溶液で細胞を標識するステップとを含むことを特徴とする方法。

10

【請求項 2】

前記細胞が血球であることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記酸化防止剤および／またはフリーラジカル捕捉剤がアスコルビン酸であることを特徴とする、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記酸化防止剤および／またはフリーラジカル捕捉剤がビタミンCであることを特徴とする、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

20

前記細胞がリンパ球であり、前記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤が、0.1 mMと10 mMとの間(端値を含む)の最終濃度で前記ラベリング溶液中に存在しているビタミンCであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

前記ビタミンCが1 mMと5 mMとの間(端値を含む)の濃度で前記ラベリング溶液中に存在することを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記ビタミンCが前記ラベリング溶液中に1 mMの最終濃度で存在していることを特徴とする、請求項5に記載の方法。

【請求項8】

10

前記細胞が単球であり、前記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤が、1 mMと10 mMとの間(端値を含む)の最終濃度で前記ラベリング溶液中に存在しているビタミンCであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【請求項9】

前記ビタミンCが前記ラベリング溶液中に1 mMの濃度で存在していることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

前記細胞が多核好中球であり、前記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤が、0.25 mMと10 mMとの間(端値を含む)の最終濃度で前記ラベリング溶液中に存在しているビタミンCであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

20

【請求項11】

前記ビタミンCが、0.75 mMと4 mMとの間(端値を含む)の濃度で前記ラベリング溶液中に存在する請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記ビタミンCが、0.75 mMと2 mMとの間(端値を含む)の濃度で前記ラベリング溶液中に存在する請求項10に記載の方法。

【請求項13】

前記ビタミンCが、0.75 mMの最終濃度の濃度で前記ラベリング溶液中に存在する請求項10に記載の方法。

【請求項14】

30

前記細胞がリンパ球であり、前記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤が、1 mMと10 mMとの間(端値を含む)の最終濃度で前記ラベリング溶液中に存在しているビタミンCであることを特徴とする、請求項1に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、フローサイトメトリーによって細胞を分析する方法、ならびにそのような方法における酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤の使用に関する。本発明は、酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤を含むインキュベーション緩衝液にも関する。

40

【背景技術】

【0002】

フローサイトメトリーの方法論は、細胞レベルにおける、異なった形態学的パラメータおよび蛍光パラメータの同時測定を可能にする。多色系の開発は、細胞それ自体のレベルにおける多量の情報、希少な細胞集団でさえ正確な測定、および新規な細胞特性の同定を提供するなど、多くの利点を有する。

【0003】

とりわけ、この技術は、全造血系内における細胞の亜集団を機能的に同定し、それによって、その細胞の生理学および悪性病態の生理病理学をよりよく理解するのを可能にする

50

のに重要である。

【0004】

したがってそれは、病的な血球の検出と、健康な血球と比較したそれらの差異の検出とを可能にする、様々な状態の診断または治療モニタリングを行うために、血液学で通例的に使用されている。

【0005】

フローサイトメトリー実験はますます複雑になっているので、様々な特性を有する新規蛍光色素の需要が増大している。

【0006】

蛍光色素は、所与の波長の光を吸収し、その結果として、それらの蛍光エネルギーをそれらより長い波長で発する。

10

【0007】

新規蛍光色素のなかで、タンデムAPC-Cy7（アロフィコシアニン-シアニン7）およびその類似体であるAPC-H7（アロフィコシアニン-Hillite（登録商標）7-BD）は、約650nmに吸収極大がある類似したスペクトル特性を示すAPCタンデムと呼ばれる蛍光色素である。赤色レーザー（HeNe、633nm）による励起下において、APCタンデム内に存在するAPC蛍光色素が、そのエネルギーをシアニン色素に移し、それが今度は767nmで発光する。APCタンデム蛍光色素は、細胞性抗原に対して向けられた抗体と結合される。

【0008】

20

しかし、これらの抗体-APCタンデム結合体の励起は、APCチャンネル内の発光をもたらさう。この発光は、フローサイトメトリー実験者によって一般的に観察されており、擬陽性の事象、およびラベリング感度の低下をもたらす。

【0009】

現在まで、APCチャンネルでの発光は少なくとも2つの作用機序によって説明されていた。第一に、APC色素とCy7またはH7色素との結合が最適でないと、Cy7またはH7色素による、APC分子が発した蛍光の不完全な再吸収を反映して、APCの蛍光の発光をもたらさう。第二に、APC-Cy7タンデムおよびAPC-H7タンデムの安定性が不足していると、「好ましくない」APCシグナルをもたらさう。この作用機序は通常、「デカップリング現象」と呼ばれる。

30

【0010】

APCタンデム（すなわち、そのうちの1つがAPCである、前後に並んだ色素）の安定性の不足は、光分解の結果であると一般的に考えられている。実際に、蛍光色素は光に対して感受性であることが知られている。それが、分析用の細胞の調製（溶解および免疫標識など）も含めて、分析を、光から保護した状態で行う理由であり、光からの保護は、APCタンデムを含む結合体に関してとりわけ強調されている予防措置である。

【0011】

さらに、アスコルビン酸は、酸化物質およびフリーラジカルの有害効果を阻止できる酸化防止剤である。

【0012】

40

L型のアスコルビン酸（ビタミンC）は、その上、ビタミン活性を有する。

【0013】

しかし、ビタミンCは、溶液中では非常にこわれやすく、空気との接触、光または熱によって破壊される。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

本発明の目的は、APCタンデムを蛍光色素として用いたフローサイトメトリーによる細胞分析を、デカップリング現象を起こさずに、またはデカップリング現象が少なくとも抑制されるように行うのを可能にする手段を提供することである。

50

【課題を解決するための手段】

【0015】

この目的のために、本発明は、インキュベーション緩衝液と、APCタンデムである少なくとも1つの蛍光色素と結合したラベリング抗体とを含むラベリング溶液中でのインキュベーションによって細胞を標識するステップを含む、フローサイトメトリーによって細胞を分析する方法であって、上記ラベリング溶液中に少なくとも1つの酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤を導入することを特徴とする方法を提案する。

【0016】

APCタンデムという表現は、APC-Cy7タンデム、APC-H7タンデムまたはAPC-Alexa 750タンデムを意味すると理解される。

10

【0017】

上記細胞は血球であることが好ましい。

【0018】

さらに、上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤はアスコルビン酸であることが好ましい。

【0019】

上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤はビタミンCであることがより好ましい。

【0020】

上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤がビタミンCであり、上記細胞がリンパ球である場合、上記ビタミンCは、0.1mMと10mMとの間(端値を含む)の最終濃度で、好ましくは、1mMと5mMとの間(端値を含む)の最終濃度で、最も好ましくは1mMの濃度で、フローサイトメトリーによって分析される溶液中に存在している。

20

【0021】

上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤がビタミンCであり、上記細胞が単球である場合、上記ビタミンCは、1mMと10mMとの間(端値を含む)の最終濃度で、最も好ましくは1mMの濃度で、フローサイトメトリーによって分析される溶液中に存在している。

【0022】

上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤がビタミンCであり、上記分析される細胞が多核好中球である場合、上記ビタミンCは、0.25mMと10mMとの間(端値を含む)、好ましくは0.75mMと4mMとの間(端値を含む)、より好ましくは0.75mMと4mMとの間(端値を含む)、最も好ましくは0.75mMの最終濃度で、分析される溶液中に存在している。

30

【0023】

本発明は、細胞のフローサイトメトリー分析中における、タンデム蛍光色素APC-Cy7、APC-H7またはAPC-Alexa 750の分解を抑制するための、酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤の使用も提案する。

【0024】

本発明の使用では、上記細胞が血球であることが好ましい。

40

【0025】

本発明の使用では、上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤がアスコルビン酸であることも好ましく、L型のアスコルビン酸(ビタミンC)であることが最も好ましい。

【0026】

上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤がビタミンCであり、上記細胞がリンパ球である場合、上記ビタミンCは、0.1mMと10mMとの間(端値を含む)の最終濃度で、好ましくは、1mMと5mMとの間(端値を含む)の最終濃度で、最も好ましくは1mMの濃度で、フローサイトメトリーによって分析される溶液中に存在している

50

。

【0027】

上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤がビタミンCであり、上記細胞が単球である場合、上記ビタミンCは、1 mMと10 mMとの間(端値を含む)の最終濃度で、最も好ましくは1 mMの濃度で、フローサイトメトリーによって分析される溶液中に存在している。

【0028】

上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤がビタミンCであり、上記分析される細胞が多核好中球である場合、上記ビタミンCは、0.25 mMと10 mMとの間(端値を含む)、好ましくは0.25 mMと4 mMとの間(端値を含む)、より好ましくは0.75 mMと4 mMとの間(端値を含む)、最も好ましくは0.75 mMの最終濃度で、分析される溶液中に存在している。

10

【0029】

本発明は、酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤を含むインキュベーション緩衝液も提示する。

【0030】

本発明のインキュベーション緩衝液では、上記酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤がアスコルビン酸であることが好ましく、L型のアスコルビン酸、すなわちビタミンCであることがより好ましい。

【0031】

添付図面について言及する下記の説明的記述を読んだ後、本発明がよりよく理解され、本発明の他の特徴および利点がよりはっきりと現れるであろう。

20

【図面の簡単な説明】

【0032】

【図1】APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45(-CD45)抗体で標識された多核好中球、単球、およびリンパ球の、任意の単位(x軸)における蛍光強度を、任意の単位における、それらの粒度の関数として示す、サイトメーターから得られた画像である。

【図2】インキュベーション直後(T0)における、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45(-CD45)抗体で標識されたリンパ球のAPCチャンネル内およびAPC-Cy7チャンネル内の蛍光シグナル強度を示す図である。

30

【図3】インキュベーションの30分後(T30)における、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球のAPCチャンネル内およびAPC-Cy7チャンネル内の蛍光シグナル強度を示す図である。

【図4】時間T0およびT30に観察された、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球のデカップリングのパーセントの変動を示す図である。

【図5】APC-H7タンデムと結合した抗CD45(-CD45)抗体で標識された多核好中球、単球、およびリンパ球の、任意の単位(x軸)における蛍光強度を、任意の単位における、それらの粒度の関数として示す、サイトメーターから得られた画像である。

40

【図6】インキュベーション直後(T0)における、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球のAPCチャンネル内およびAPC-H7チャンネル内の蛍光シグナル強度を示す図である。

【図7】30分間のインキュベーションの後(T30)における、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球のAPCチャンネル内およびAPC-H7チャンネル内の蛍光シグナル強度を示す図である。

【図8】時間T0およびT30に観察された、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球のデカップリングのパーセントの変動を示す図である。

【図9】Becton Dickinson社製のビーズであるCompbeads(登録商標)および細胞への、APCタンデムと結合した抗体の結合様式の模式図である。

50

【図10】APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された、Becton Dickinson社製のビーズであるCompbeads（登録商標）、およびAPC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図11】APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたビーズ（Becton Dickinson社製のビーズであるCompbeads（登録商標））、およびAPC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

10

【図12】APC-Cy7タンデムと結合した抗CD20（-CD20）抗体で標識されたリンパ球、およびAPC-H7タンデムと結合した抗CD20抗体で標識されたリンパ球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図13】APC-Cy7タンデムと結合した抗CD3（-CD3）抗体で標識されたリンパ球、およびAPC-H7タンデムと結合した抗CD3抗体で標識されたリンパ球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図14】APC-Cy7タンデムまたはAPC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、およびAPC-Cy7タンデムまたはAPC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

20

【図15】APC-Cy7タンデムまたはAPC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図16】a) 光から保護された、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、 b) 光に暴露された、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、 c) 光から保護された、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球、 d) 光に暴露された、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球、 e) 光から保護された、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球、 f) 光に暴露された、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

30

【図17】a) 光から保護された、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、 b) 光に暴露された、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、 c) 光から保護された、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球、 d) 光に暴露された、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球、 e) 光から保護された、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球、 f) 光に暴露された、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

40

【図18】光の存在下および非存在下における、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたビーズ（Becton Dickinson社製のビーズであるCompbeads（登録商標））の蛍光の平均強度の変動を時間の関数として示す図である。

【図19】光の存在下および非存在下における、APC-H7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたビーズ（Becton Dickinson社製のビーズであるCompbeads（登録商標））の蛍光の平均強度の変動を時間の関数として示す図である。

50

【図20】光の存在下および非存在下における、APC蛍光色素と結合した抗CD45抗体で標識されたビーズ(Becton Dickinson社製のビーズであるCompbeads(登録商標))の蛍光の平均強度の変動を時間の関数として示す図である。

【図21】a) APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された未結合のリンパ球、b) APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された結合済のリンパ球、c) APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された未結合の多核好中球、d) APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された結合済の多核好中球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図22】a) 室温でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、b) 4 でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、c) 室温でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球、d) 4 でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図23】APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された未結合の単球、およびAPC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された結合済の単球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図24】室温でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球、および4 でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図25】a) ビタミンCの非存在下でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、b) 1mMのビタミンCの存在下でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識されたリンパ球、c) ビタミンCの非存在下でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球、d) 1mMのビタミンCの存在下でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された多核好中球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【図26】ビタミンCの非存在下でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球、および1mMのビタミンCの存在下でインキュベートされた、APC-Cy7タンデムと結合した抗CD45抗体で標識された単球のフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0033】

「デカップリングのパーセント」、「%デカップリング」、「APC-Cy7に対するAPCの%デカップリング」、および「APC-H7に対するAPCの%デカップリング」という用語が、上記の本文および以下の本文、ならびに添付図面において、下記の比率を指示するのに使用されている。すなわち、

$$\left[\text{APCタンデムで標識されたが、APCチャンネルに蛍光を発する(かつ使用されたAPCタンデムのチャンネル内には蛍光を発しない)細胞の数} \right] / \left[\text{それらの細胞がどのチャンネル内に蛍光を発するかに関係なく、APCタンデムで標識された細胞の総数} \right]$$

であり、この比率に100が掛けられている。

【0034】

「室温」という用語は、上記の本文および以下の本文、ならびに添付図面において、18 と 25 との間(端値を含む)の温度を指示するのに使用されている。

10

20

30

40

50

【0035】

本発明は、免疫標識された細胞上での、APCタンデムと結合したマーカーの機能障害の作用機序に関する、発明者らによる解明に基づいている。APCタンデムを蛍光色素として用いたフローサイトメトリーによる、これらの細胞の分析中に観察されたデカップリング現象は、この機能障害によってもたらされる。

【0036】

デカップリング現象をもたらす作用機序を解明するために、本発明者らは、APC蛍光色素、またはAPC-Cy7、APC-H7もしくはAPC-Alexa 750タンデム蛍光色素と結合した様々な抗体で標識された細胞の試料をフローサイトメトリーによって分析した。

10

【0037】

使用された物質および方法は以下の通りである。

【0038】

物質

APC-Cy7蛍光色素またはAPC-H7蛍光色素と結合した抗CD45、抗CD20、抗CD3、および抗CD19抗体、ならびに溶解緩衝液BD Phosflow(商標)溶解/固定緩衝液5xは、BD Bioscience社から購入した。

【0039】

溶解緩衝液は塩化アンモニウム溶解緩衝液であった。

【0040】

リン酸緩衝食塩水(PBS)はBiomerieux社から入手した。ウシ胎児血清(FBS)は、Pan Biotech GmbH社から購入し、使用する前に56で30分間、加熱した。L-アスコルビン酸(ビタミンC)はSIGMA-ALDRICH社から入手した。

20

【0041】

方法

ヒト末梢血のアリコート(500,000個の白血球を含有している)を溶解緩衝液中でインキュベートし、その後、2.5%のFBSを補充した1xPBSで3回洗浄した。その後、上記細胞(500,000個)を、100 μ lのインキュベーション緩衝液中において、室温で20分間、所望のAPCタンデムまたはAPC単独と結合した所望の抗体のそれぞれ5 μ lで免疫標識し、PBS/FBS溶液で3回洗浄し、200 μ lのPBS/FBS溶液中に再懸濁した。

30

【0042】

フローサイトメトリーによって得られたデータの分析中に死細胞を除外するために、SIGMA-ALDRICH社製のインターカレート剤である7-アミノアクチノマイシン-D(7-AAD)を用いて、死細胞を標識した。

【0043】

各免疫標識実験について、上記細胞を混合し、それらのフローサイトメトリー分析をBecton Dickinson社製FACSCanto(商標)II装置で行った。1試験あたり10,000から50,000のイベントを獲得した。一般的に使用されている細胞ソーティング手順、すなわち2パラメータヒストグラムにおける3つのウィンドウ(P1、P2、およびP3)の交差によって、シングレット(singlet)細胞を選択した。

40

【0044】

各細胞型について、デカップリングのパーセントを、以前の記載の通り、BD FACS DIVA(商標)ソフトウェアを用いて計算した。

【0045】

添付図面は、3から4回の反復実験の代表的実験を示す。

【0046】

第一に、本発明者らは、細胞表面タンパク質に対して向けられた抗体と結合したAPC-Cy7およびAPC-H7タンデム蛍光色素の分解が上述した細胞モデルで起こり、A

50

P Cチャンネル内のシグナルの出現を引き起こすことを確認した。

【0047】

そのために、A P C - C y 7 タンデムまたはA P C - H 7 タンデムのいずれかと結合した抗C D 4 5抗体でヒト末梢血細胞を標識した。

【0048】

フローサイトメトリーによる分析用の細胞を含有する溶液を調製した直後、すなわち時間T 0の時、およびその30分後、すなわち時間T 30の時に、フローサイトメトリーによって上記細胞を分析した。

【0049】

図1および図5は、予測通り、A P C タンデム蛍光色素と結合した全白血球抗C D 4 5抗体が、リンパ球、単球、および多核好中性白血球を標識することを示す。

10

【0050】

これらの2つの図において、「P N N」という用語は、「多核好中性白血球、すなわち好中性白血球 (neutrophilic polynuclear leukocyte or leukocyte)」を意味する。

【0051】

A P C - C y 7 タンデムまたはA P C - H 7 タンデムのいずれかと結合した抗C D 4 5抗体で標識されたリンパ球集団を選択し、時間T 0および時間T 30におけるA P Cチャンネル内およびA P C - C y 7チャンネル内で観察された、それらの蛍光強度を表す二次元プロットを作成した。

【0052】

これらのプロットを図2、3、5および7に示す。

20

【0053】

時間T 0に、A P C - C y 7またはA P C - H 7チャンネル内で強い陽性であり、かつA P Cチャンネル内で弱い陽性である均一な細胞集団の形態で上記リンパ球が現れることが、図2および5から見て取れる。

【0054】

対照的に、室温かつ暗条件下における30分間のインキュベーションの後に、上記リンパ球細胞集団がA P Cチャンネル内に広がっていることが、図3および7から見て取れる。

【0055】

蛍光強度の中央値(M F I)を考慮すると、A P C - C y 7タンデムまたはA P C - H 7タンデムと結合したC D 4 5陽性細胞の間で、初期時間T 0と比較して、時間T 30におけるA P Cシグナルの増大が観察される。

30

【0056】

併せて、これらの観察は、A P Cチャンネル内のシグナルの増大が、A P Cタンデム蛍光色素の減失と連結していることを示している。

【0057】

この現象を評価するために、本発明者らは、A P C - C y 7またはA P C - H 7タンデムに関して陽性であるリンパ球集団、すなわちA P C - C y 7またはA P C - H 7チャンネル内に発光しているリンパ球集団における、A P Cチャンネル内に発光している亜集団、すなわちA P Cに関して陽性である亜集団、すなわち図3および7で「デカップリングした」と標識されている集団を対象とした。

40

【0058】

陽性閾値は、時間T 0におけるA P Cチャンネルで決定し、時間T 30と関係している。「デカップリングした」細胞のパーセントは、A P Cタンデム陽性のリンパ球の総数に対する、A P C陽性かつA P Cタンデム陽性である細胞の総数の比率として表した。

【0059】

結果を図4および8に示す。

【0060】

これらの図で見て取れるように、時間T 30における蛍光色素A P C - C y 7およびA P C - H 7のデカップリングのパーセントは、時間T 0におけるものより高い。

50

【0061】

A P C - A l e x a 7 5 0 タンデムと結合した抗 C D 4 5 抗体でも同様な結果が得られた。

【0062】

デカップリングのベースのパーセント（時間 T 0 におけるデカップリング）は、A P C - H 7 タンデム蛍光色素より、A P C - C y 7 タンデム蛍光色素の方が高いが、2 種の A P C タンデム蛍光色素のデカップリング比は、インキュベーション時間中、同様な変動、すなわち、図 4 および 8 で見て取れるように、4 倍から 5 倍の増大を有する。

【0063】

併せて、これらのデータは、抗 C D 4 5 抗体と結合した A P C タンデム蛍光色素がリンパ球内で、経時的に分解を受けていることを示唆している。

10

【0064】

この研究におけるこの第 1 部は、A P C タンデム、すなわち A P C - C y 7、A P C - H 7 または A P C - A l e x a 7 5 0 タンデムを用いたフローサイトメトリー分析中に観察されたデカップリング現象が、用いられた実験条件下で実際に生じることの確認を可能にした。これは、用いられたモデルの正当性を立証するものである。

【0065】

次に、本発明者らは、このデカップリング現象への細胞性の背景の影響を調査した。

【0066】

そのために、本発明者らは、リンパ球に結合した A P C タンデム蛍光色素の安定性を分析し、それを、ビーズに結合したこれらの同じ A P C タンデムの安定性と比較した。その A P C タンデムが使用されている背景にかかわらず、分解されたのが上記 A P C タンデムであるか否か、または上記 A P C タンデムが細胞の存在下でのみ分解されているのかが、この比較によって判定することが可能となる。

20

【0067】

これらの実験で用いたビーズは、B e c t o n D i c k i n s o n 社製のビーズである C o m p b e a d s（登録商標）であった。

【0068】

リンパ球を、ビーズと同様に、A P C - C y 7 タンデム蛍光色素または A P C - H 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で標識した。

30

【0069】

図 9 から 1 5 は、これらの実験中に取得されたデータを表す。

【0070】

より詳細には、図 9 は、模式図の形態で、ビーズ（B e c t o n D i c k i n s o n 社製のビーズである C o m p b e a d s（登録商標））またはリンパ球への抗体の結合を示す。

【0071】

図 9 で見て取れるように、抗体は、それらの抗原結合部位によって細胞マーカーに結合し、一方、ビーズは、軽鎖の認識を介してそれらのマーカーに結合する。

【0072】

40

A P C - C y 7 タンデムがビーズ（B e c t o n D i c k i n s o n 社製のビーズである C o m p b e a d s（登録商標））またはリンパ球と結合している時間の関数として観察されたデカップリングのパーセントの変動を図 1 0 に示し、ビーズ（B e c t o n D i c k i n s o n 社製のビーズである C o m p b e a d s（登録商標））またはリンパ球が A P C - H 7 タンデムと結合している時間の関数として観察されたデカップリングのパーセントの変動を図 1 1 に示す。

【0073】

これらの図から、極めて興味深いことに、細胞に結合した抗体でのみ、A P C - C y 7 および A P C - H 7 蛍光色素のデカップリングのパーセントが経時的に増大していることが見て取れる。実際、ビーズに結合した抗体では、デカップリングが観察されない。

50

【 0 0 7 4 】

同様な結果は、抗 C D 2 0 抗体などの他の抗体を用いても得られた。

【 0 0 7 5 】

これらのデータは、A P C タンデム蛍光色素の減失が、これらの蛍光色素の従来の使用条件下では、蛍光色素の内在的な不安定性ではなく、上記細胞のラベリングと結びついていることを示唆する。

【 0 0 7 6 】

A P C タンデム蛍光色素の分解が、使用された抗体に関係なく起こったことを確認するために、リンパ球細胞膜マーカーに対して向けられ、かつ A P C - C y 7 タンデム蛍光色素または A P C - H 7 タンデム蛍光色素と結合したいくつかの抗体を試験した。

10

【 0 0 7 7 】

そのために、Bリンパ球の抗 C D 2 0 もしくは抗 C D 1 9、またはTリンパ球の抗 C D 3 に対して向けられた抗体と結合した A P C - C y 7 および A P C - H 7 タンデム蛍光色素を用いた。

【 0 0 7 8 】

図 1 2 は、A P C - C y 7 タンデム蛍光色素または A P C - H 7 タンデム蛍光色素のいずれかと結合した抗 C D 2 0 抗体の使用中に観察されたデカップリングのパーセントの変動をインキュベーション時間の関数として示す。図 1 3 は、A P C - C y 7 タンデムまたは A P C - H 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 3 抗体の使用におけるデカップリングのパーセントの変動をインキュベーション時間の関数として示す。

20

【 0 0 7 9 】

図 1 2 および 1 3 で見て取れるように、インキュベーション時間の関数として増大するデカップリング現象が観察される。

【 0 0 8 0 】

この場合も、A P C - C y 7 タンデム蛍光色素の分解のレベルは、A P C - H 7 タンデム蛍光色素のものより高い。

【 0 0 8 1 】

これらの結果は、A P C タンデム蛍光色素の減失がTリンパ球およびBリンパ球の両方の表面マーカーのターゲティング中に起こることも確認する。

【 0 0 8 2 】

細胞型の影響も調査した。

30

【 0 0 8 3 】

そのために、様々な型の白血球細胞の集団を、A P C - C y 7 タンデム蛍光色素または A P C - H 7 タンデム蛍光色素のいずれかと結合した全白血球抗 C D 4 5 抗体で標識し、各亜集団におけるデカップリングを経時的に測定した。

【 0 0 8 4 】

得られた結果を、図 1 4 および図 1 5 に示す。図 1 4 は、

- A P C - C y 7 タンデムと結合した抗 C D 4 5 抗体で標識されたリンパ球、
- A P C - C y 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で標識された多核好中球

40

、

- A P C - C y 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で標識されたリンパ球、
- A P C - H 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で標識されたリンパ球、および

- A P C - H 7 タンデムと結合した抗 C D 4 5 抗体で標識された多核好中球
のデカップリングのパーセントを時間の関数として示し、図 1 5 は、A P C - C y 7 蛍光色素または A P C - H 7 蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で標識された単球で観察されたデカップリングのパーセントを示す。

【 0 0 8 5 】

これらの図で見て取れるように、抗 C D 4 5 抗体がリンパ球、単球および顆粒球に結合しているときに、A P C - C y 7 および A P C - H 7 タンデム蛍光色素のデカップリング

50

のパーセントが増大している。

【0086】

しかし、すべての結合APCタンデムに関して、分解速度はリンパ球、単球および顆粒球の間で漸増している。

【0087】

これらの結果は、APCタンデム蛍光色素の分解が細胞型に依存しているが、すべての場合で起こっていることを示す。

【0088】

第1の結論として、本発明者らの上記実験は、デカップリング現象が、細胞の存在下でのみ、この細胞の型に関係なく現れること、およびデカップリング現象が、その細胞型に従って、より大きな程度、またはより小さな程度で存在することを示している。

10

【0089】

これらの結果に基づいて、本発明者らは、次に、APCタンデム蛍光色素の細胞依存性分解を遮断する可能性のある経路を探求した。

【0090】

そのため、第一に、BD Phosflow (商標) 溶解/固定緩衝液を用いて、APCタンデム蛍光色素と結合した抗CD45抗体で標識された細胞を固定して、その後、蛍光色素の経時的な分解を測定した。

【0091】

図21は、APC-Cy7タンデム蛍光色素と結合した抗CD45抗体で標識された、結合済または未結合のリンパ球または多核好中球で生じたデカップリングのパーセントの経時的な変動を表し、図21で見て取れるように、この生じたデカップリングのパーセントは、リンパ球および多核好中性白血球で、経時的に安定しており、かつベースライン、すなわち時間T0で得られた値近くに維持されている。図23で見て取れるように、同じことが単球でも当てはまる。図23は、APC-Cy7タンデム蛍光色素と結合した抗CD45抗体が結合した単球で生じたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として表している。

20

【0092】

これらの同じ型の細胞で、今回はAPC-H7タンデム蛍光色素と結合した抗CD45抗体を用いて、同じ結果が得られた。

30

【0093】

細胞の代謝活性を停止させる固定緩衝液を用いた、デカップリング現象の強い抑制は、APCタンデム蛍光色素の減失における細胞代謝の役割を実証している。

【0094】

しかし、細胞の固定は、細胞死を引き起こし、とりわけ機能的エピトープの減失をもたらし得る。

【0095】

さらに、細胞の固定は、細胞の日常的分析のプロトコールを用いる際の状態の1つではない。

【0096】

40

したがって、細胞の固定はデカップリング現象の抑制を可能にするが、それは本発明の好ましい方法ではない。

【0097】

本発明者らは、次に、類似した白血球標識条件下で、4でインキュベーションを行うことによって、温度の影響を調査した。上述の通り、通常のアッセイでは、このインキュベーションが室温、すなわち18と25(端値を含む)との間の温度で行われる。

【0098】

結果を図22および24に示す。

【0099】

図22は、室温でインキュベートされたリンパ球および4でインキュベートされたり

50

ンパ球、ならびに室温でインキュベートされた多核好中球および4 でインキュベートされた多核好中球のフローサイトメトリー分析中に経時的に生じたデカップリングのパーセントの変動を示す。

【0100】

図24は、室温でインキュベートされた、APC-Cy7タンデム蛍光色素と結合した抗CD45抗体で標識された単球、および4 でインキュベートされた単球のフローサイトメトリー分析中に現れたデカップリングのパーセントの変動を示す。

【0101】

図22および24から見て取れるように、4 では、リンパ球、多核好中性白血球および単球におけるAPC-Cy7タンデム蛍光色素の分解のパーセント全てが、これらの同じ細胞で、同一条件下、但し室温でのインキュベーションを用いて観察されたパーセントと比較して経時的に増大せず、非常に低いままである。

【0102】

同じ結果が、APC-H7タンデム蛍光色素を用いて得られた。

【0103】

これらの実験から、APCタンデム蛍光色素の分解への細胞代謝の重要性が再度確認される。

【0104】

しかし、この場合も、4 でのインキュベーションは、細胞の日常的な分析プロトコールの状態ではない。さらに、4 でインキュベーションするためには、インキュベーションの持続時間がより長くなり、より限定的な条件を必要とする。したがって、この方法は効率的ではあるが、本発明の好ましい方法ではない。

【0105】

細胞が室温で維持されているときに、細胞の代謝活性を遮断するために、本発明者らは、次に、多くの結合体にしばしば添加されるアジ化ナトリウム(NaN_3)の影響を試験した。

【0106】

次いで、リンパ球でのデカップリング現象には、0.05% NaN_3 は弱い影響を与えるに過ぎなかったが、APC-H7タンデム蛍光色素の減失を0.05% NaN_3 が強く抑制したことが観察された。

【0107】

単球および多核好中性白血球で、同様な効果が細胞生存率に影響を与えずに観察された。

【0108】

これは、代謝活性の抑制がAPCタンデム蛍光色素の保護をもたらすことを実証するものである。

【0109】

しかし、アジ化ナトリウムはシトクロムオキシダーゼを非可逆的に抑制し、技師および環境にとって毒性であると考えられている。

【0110】

次に、本発明者らは、当技術分野に存在する先入観に反して、APCタンデム蛍光色素の分解に対する、光への暴露の影響を調査した。

【0111】

実際、従来技術によれば、概して、そしてこれはすべての蛍光色素に関して、細胞のラベリングは光の非存在下で行うことが強く推奨されており、そしてAPCタンデム蛍光色素に関しては、この点が製造会社の指示書において、とりわけ強調されている。

【0112】

それゆえ、本発明者らは、この先入観に挑戦して、免疫標識された血球を人工光源(ネオン管)に暴露し、これらの条件下で得られたデカップリングのパーセントを、免疫標識を光の非存在下で行った場合に得られたデカップリングのパーセントと比較した。

10

20

30

40

50

【 0 1 1 3 】

得られた結果を図 1 6 から 2 0 に示す。

【 0 1 1 4 】

図 1 6 は、光への暴露中または光への暴露なしで、A P C - C y 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で標識されたリンパ球、単球および多核好中球で生じたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す。

【 0 1 1 5 】

図 1 7 は、同じく光の存在下または光の非存在下で、これらの同じ細胞ではあるが、A P C - H 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で標識された細胞で得られたデカップリングのパーセントの変動を示す。

10

【 0 1 1 6 】

図 1 6 および 1 7 から見て取れるように、驚いたことに、これらの 3 つの細胞型における、A P C - C y 7 および A P C - H 7 タンデム蛍光色素の分解のパーセントは、1 時間という短い時間ではその全体を通して、光の存在下でも、光の非存在下でも同様であった。これらの実験条件下における、これらタンデムの分解への光の影響のこの欠如は、A P C 蛍光色素、および A P C - C y 7 または A P C - H 7 タンデム蛍光色素の同等な消光を伴う。

【 0 1 1 7 】

この仮説を、A P C - C y 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で免疫標識されたビーズ、A P C - H 7 タンデム蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で免疫標識されたビーズ、および A P C 蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で免疫標識されたビーズによって、すなわち細胞の非存在下で確認した。

20

【 0 1 1 8 】

時間の関数としての平均蛍光強度 (M F I) の変動を、図 1 8、1 9 および 2 0 に示す。

【 0 1 1 9 】

より詳細には、図 1 8 は、A P C - C y 7 タンデムと結合した抗 C D 4 5 抗体で免疫標識されたビーズの、光の存在下および非存在下における、平均蛍光強度 (M F I) の変動を時間の関数として示す。

【 0 1 2 0 】

図 1 9 は、光の存在下および非存在下における、A P C - H 7 タンデムと結合した抗 C D 4 5 抗体で標識されたビーズの平均蛍光強度 (M F I) の変動を時間の関数として示す。

30

【 0 1 2 1 】

図 2 0 は、光の存在下および非存在下における、A P C 蛍光色素と結合した抗 C D 4 5 抗体で標識されたビーズの平均蛍光強度 (M F I) の変動を時間の関数として示す。

【 0 1 2 2 】

これらの図から見て取れるように、3 種の蛍光色素の平均蛍光強度は、光の非存在下でも、存在下でも、同様な速度論で経時的に漸減し、これは、光の影響の欠如が A P C 蛍光色素の消光の過小評価と結びついていないことを示唆している。

40

【 0 1 2 3 】

併せて、これらの実験は、光への暴露がこれらの実験条件下で A P C タンデムの分解の触媒として働いているかもしれないとする仮説を強く排除する。

【 0 1 2 4 】

したがって、本発明者らは、当技術分野の先入観を克服した。

【 0 1 2 5 】

本発明者らは、次に、酸化現象の潜在的役割を探索した。

【 0 1 2 6 】

本発明者らは、次に、A P C タンデム蛍光色素の分解における、フリーラジカルの存在および / またはその基底にある酸化現象の潜在的影響を調査することを決定した。

50

【 0 1 2 7 】

実際、以前に得られた結果は、A P C タンデム蛍光色素の分解が単球内で、リンパ球内および多核好中球内より高い割合で生じたことを示しており、これは、調査された細胞の型の特性に、デカップリング現象が依存していたかもしれないことを示唆する。

【 0 1 2 8 】

単球およびマクロファージの主要機能の1つは、微生物の食作用および殺作用であり、これらはスーパーオキシドおよび過酸化水素 (H_2O_2) の産生に依存している。

【 0 1 2 9 】

A P C タンデム蛍光色素の分解への H_2O_2 の影響を試験するために、本発明者らは、A P C - C y 7 と結合した抗 C D 4 5 抗体で細胞を免疫標識し、 H_2O_2 の存在下または非存在下でそれらをインキュベートした。

【 0 1 3 0 】

これらの細胞を 2 0 から 6 0 分間分析した。

【 0 1 3 1 】

得られた結果は、0 . 0 1 m M H_2O_2 はリンパ球のデカップリングのパーセントを変化させないが、0 . 1 m M H_2O_2 はそれを増大させたことを示している。

【 0 1 3 2 】

これに匹敵する過酸化水素の働きが、細胞の生存率にいかなる影響も与えずに、単球および多核好中球で観察された。これは、フリーラジカルの存在および/または酸化現象がデカップリング現象で役割を果たしているかもしれないことを示唆している。

【 0 1 3 3 】

過酸化水素は、時間をかければ、ビーズに結合した A P C - C y 7 タンデム結合抗体のデカップリングを誘導できることに留意するべきである。

【 0 1 3 4 】

A P C タンデム蛍光色素の分解を抑制するのに細胞固定、低温またはアジ化ナトリウムを用いることには多くの不都合があるので、本発明者らは、デカップリング現象への酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤の使用を試験した。

【 0 1 3 5 】

そのために、ビタミン C それ自体は、溶液中で非常にこわれやすく、室温でのインキュベーションの前に、空気、光、および熱によって分解されるが、A P C タンデムと結合した抗 C D 4 5 抗体で免疫標識された細胞を、酸化防止剤および/またはフリーラジカル除去剤として使用されるビタミン C の存在下または非存在下でインキュベートした。結果を図 2 5 および 2 6 に示す。

【 0 1 3 6 】

図 2 5 は、ビタミン C の非存在下、および最終濃度 1 ミリモル (1 m M) のビタミン C の存在下における、A P C - C y 7 タンデムと結合した抗 C D 4 5 抗体で標識されたリンパ球、ならびにビタミン C の非存在下、および最終濃度 1 m M のビタミン C の存在下における、A P C - C y 7 タンデムと結合した抗 C D 4 5 抗体で標識された多核好中球で生じたデカップリングのパーセントの変動を時間の関数として示す。

【 0 1 3 7 】

図 2 6 は、ビタミン C の非存在下、および最終濃度 1 m M のビタミン C の存在下における、A P C - C y 7 タンデム結合抗 C D 4 5 抗体に結合した単球で得られたデカップリングのパーセントの変動を示す。

【 0 1 3 8 】

分解のパーセントを 1 時間モニターした。

【 0 1 3 9 】

図 2 5 および 2 6 から見て取れるように、驚いたことに、ビタミン C の存在は、リンパ球および多核好中性白血球におけるデカップリングのパーセントを経時的に強く抑制し、単球では、より少ない程度で抑制する。

【 0 1 4 0 】

この結果は、免疫標識された細胞表面のAPCタンデム結合体の減失における、酸化および/またはフリーラジカルの存在の重要な役割を示しており、驚いたことに、上記酸化および/またはフリーラジカルの存在は、溶液中のビタミンCによって抑制される。

【0141】

この役割は、1 mMのビタミンCを添加した、漸増する濃度のH₂O₂（0から1 mM）にCompbeads（登録商標）ビーズを暴露することによって確認した。ビタミンCのこの添加は、試験されたすべての濃度のH₂O₂で、APCタンデムのシグナルの減失を阻止する。

【0142】

それゆえ、ビタミンCの使用は、APCチャンネル内の異常なシグナルを阻止するのに非常に有利である。

10

【0143】

したがって、本発明は、免疫標識された血球におけるAPCタンデムの減失の作用機序、すなわち従来技術でそうであると考えられていたように光分解現象によるのではなく、フリーラジカルによるAPCタンデム蛍光色素の酸化および/または分解の作用機序の発見に基づいている。

【0144】

本発明は、ビタミンCが、上記分析を可能にするのに十分な時間にわたって溶液中に存在する場合でさえ、その酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉作用を効果的に行うという発見にも基づいている。

20

【0145】

上記の本文では、血球との関連において本発明を説明したが、当業者には、骨髄細胞または植物細胞、および同様の細胞など、フローサイトメトリーで分析できるすべての型の細胞に本発明が適用可能であることは明らかであろう。

【0146】

同様に、ビタミンCの使用は、デカップリング現象を引き起こす作用機序を発見するのを可能にしたが、細胞に毒性でないいかなる酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤も本発明で使用できることは当業者には明らかであろう。

【0147】

詳細には、あらゆる形態のアスコルビン酸が特に適している。

30

【0148】

しかし、L型のアスコルビン酸、すなわちビタミンCは、水性溶媒に可溶性であり、かつこれらの濃度で細胞に毒性でなく、その使用は、他の酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤と比較して、多数の利点を有する。

【0149】

同様に、記載および例示したアッセイは、1 mMの最終ビタミンC濃度で行ったが、0.1ミリモル濃度（0.1 mM）および10ミリモル濃度（10 mM）の濃度のビタミンCが存在する濃度でもアッセイを行った。

【0150】

上記細胞がリンパ球である場合には、ビタミンCは、0.1 mMの濃度で、既に効果をもたらすが、それは低減した効果しかもたらさない。それゆえ、それより低濃度のビタミンCはデカップリングのパーセントの十分な低減を得るのに適していない。さらに、10 mM超では、リンパ球の形態および生存率が変化する。

40

【0151】

最も良い結果は、リンパ球では、1 mMと5 mMとの間（端値を含む）のビタミンC濃度で得られる。

【0152】

したがって、リンパ球では、本発明における、ビタミンCの好ましい濃度は、それが最適なビタミンC濃度を用いたデカップリング現象の最適な抑制を得ることを可能にするので、1 mMである。

50

【0153】

上記細胞が単球である場合には、デカップリングのパーセントの十分な低減は、1 mMのビタミンC濃度で現れる。この低減は、最大10 mMのビタミンC濃度まで存在する。10 mMというこの濃度を超えると、単球の生存率および形態が変化する。

【0154】

上記細胞が多核好中球である場合には、デカップリングのパーセントの十分な低減は、0.25 mMのビタミンC濃度で得られる。

【0155】

この低減は、最大10 mMのビタミンC濃度まで存在する。10 mMを超えると、上記細胞は、それらの生存率を低下し始める。

10

【0156】

多核好中球では、0.75 mMと4 mM（端値を含む）との間のビタミンC濃度で、最も良い結果が得られる。4 mMを超えると、上記細胞は形態学的障害を起こし始める。

【0157】

この理由から、多核好中球では、0.75 mMと2 mM（端値を含む）との間が、より好ましいビタミンC濃度であり、0.75 mMが最も好ましい。

【0158】

さらに、上記の本文では、ラベリング溶液中でのインキュベーションの時点で酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤を添加したが、あらかじめそれを、例えばあらかじめ調製しておいたインキュベーション緩衝液に添加しておいて、蛍光色素と結合した抗体で標識するのに使用してもよいことは当業者には明らかであろう。

20

【0159】

したがって、本発明は、フローサイトメトリーによる分析法における、酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤、好ましくはアスコルビン酸、そして最も好ましくはL型のアスコルビン酸、すなわちビタミンCの使用に関する。

【0160】

ビタミンCは、上記ラベリング溶液中の最終濃度が0.1 mMと10 mMとの間（端値を含む）、好ましくは1 mMで用いるのが好ましい。

【0161】

同様に、本発明は、酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉剤、好ましくはアスコルビン酸、そして最も好ましくはビタミンCを含む、上記細胞のラベリング中に使用されるインキュベーション緩衝液にも関する。

30

【 図 1 】

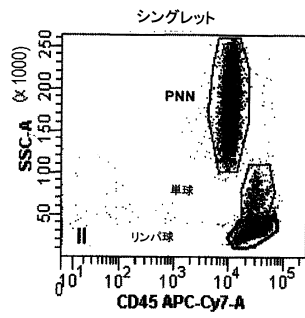


Figure 1

【 図 3 】

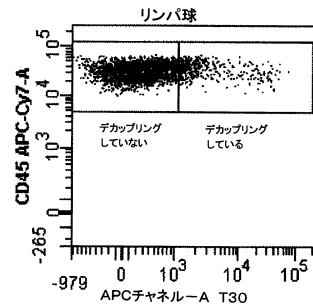


Figure 3

【 図 2 】

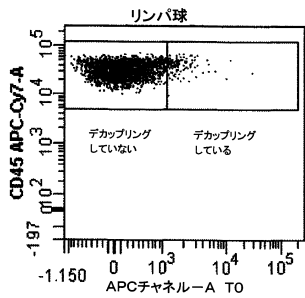


Figure 2

【 図 4 】

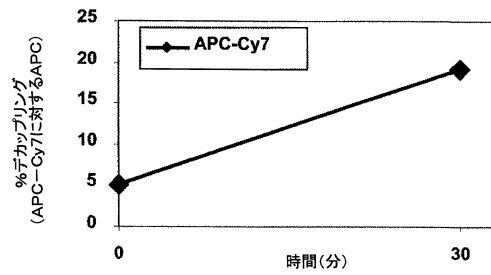


Figure 4

【 図 5 】

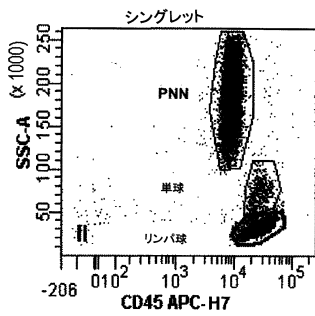


Figure 5

【 図 7 】

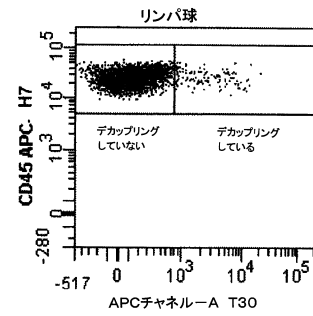


Figure 7

【 図 6 】

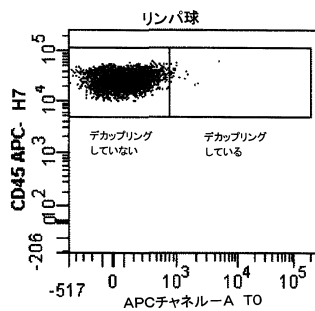


Figure 6

【 図 8 】

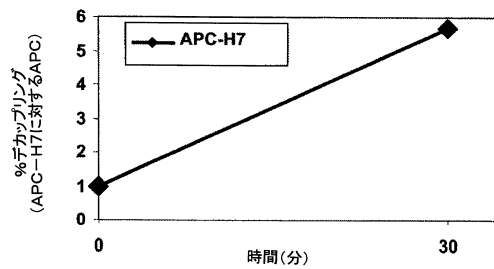


Figure 8

【 図 9 】

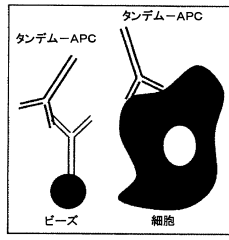


Figure 9

【 図 11 】

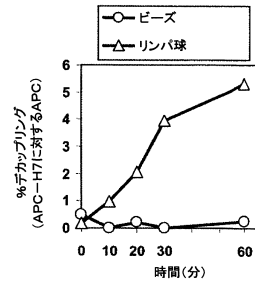


Figure 11

【 図 10 】

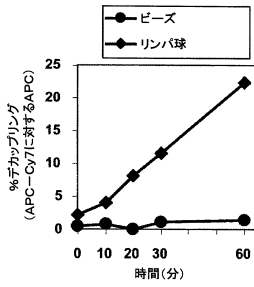


Figure 10

【 図 12 】

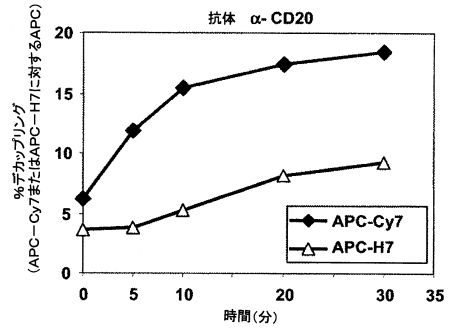


Figure 12

【 図 13 】

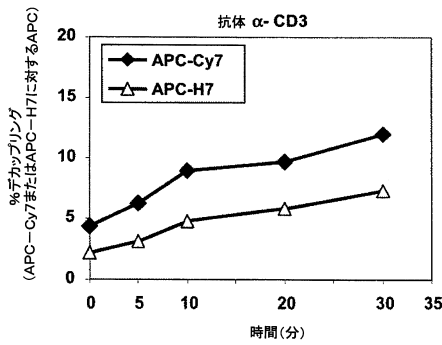


Figure 13

【 図 15 】

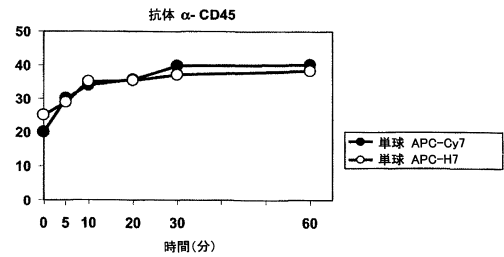


Figure 15

【 図 14 】

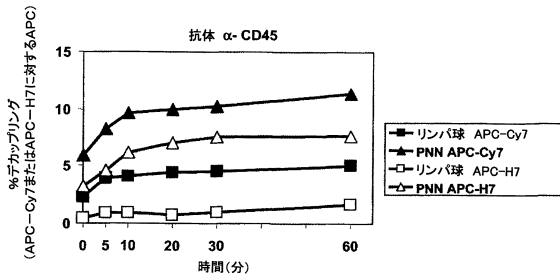


Figure 14

【 図 16 】

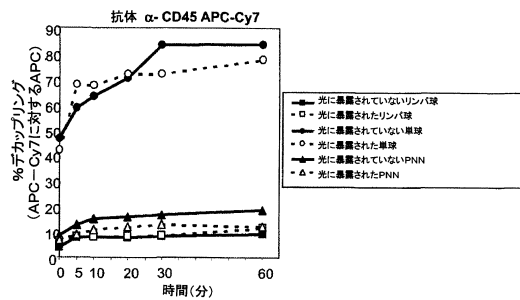


Figure 16

【 図 17 】

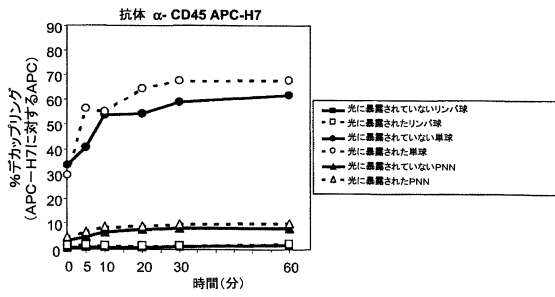


Figure 17

【 図 19 】

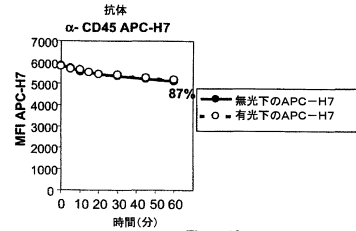


Figure 19

【 図 18 】

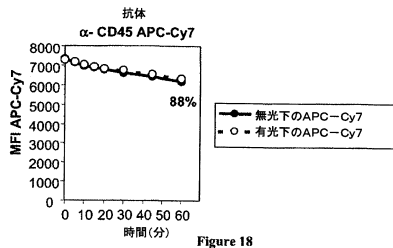


Figure 18

【 図 20 】

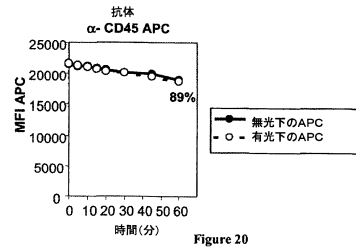


Figure 20

【 図 21 】

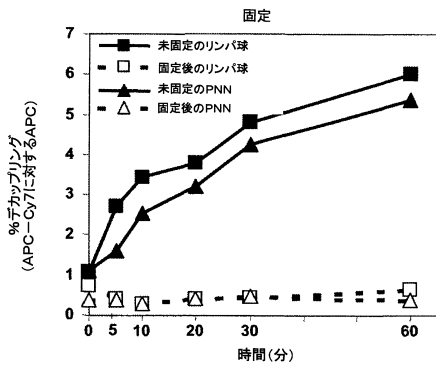


Figure 21

【 図 22 】

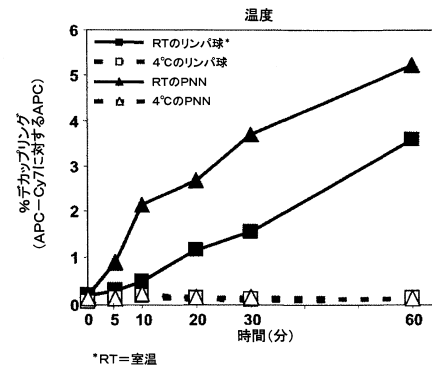


Figure 22

【 図 2 3 】

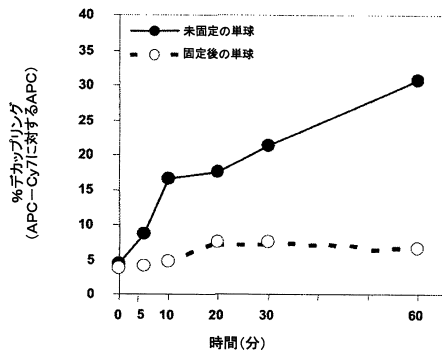


Figure 23

【 図 2 4 】

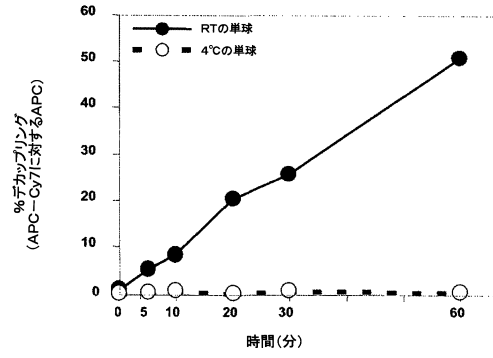


Figure 24

【 図 2 5 】

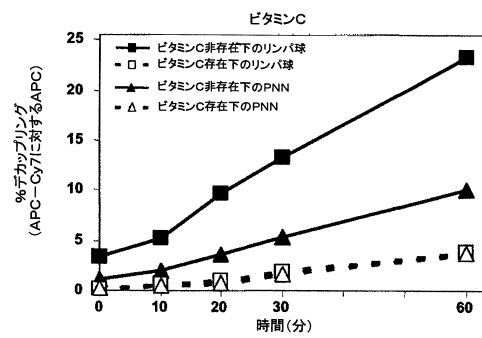


Figure 25

【 図 2 6 】

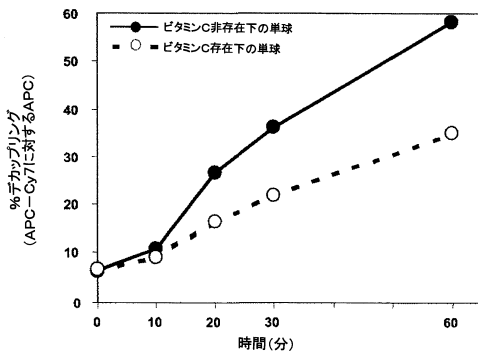


Figure 26

フロントページの続き

- (74)代理人 110000796
特許業務法人三枝国際特許事務所
- (72)発明者 レミ レテツ
フランス国 93160 ノイジー レ グランド アベニュー ドゥ ラブニール 27
- (72)発明者 クリスティーン レ ロイ
フランス国 75014 パリ メゾン デュ カンボッジ スタディオ 14 シテ ユニヴェ
ルシテール インターナショナル ドゥ パリ プルバード ジョーダン 27
- (72)発明者 フローレンス シンバリスタ
フランス国 75011 パリ リュ サン セバスチャン 37
- (72)発明者 ナディーヌ ヴァリン - ブラン
フランス国 78500 サートロービル リュ ダサス 5

審査官 草川 貴史

- (56)参考文献 国際公開第2006/090283(WO, A1)
特表2002-528723(JP, A)
特開2004-226395(JP, A)
国際公開第2007/098557(WO, A1)
特表2007-526469(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
G01N 21/78

- (54)【発明の名称】フローサイトメトリーによって細胞を分析する方法、そのような方法における酸化防止剤および
/またはフリーラジカル捕捉剤の使用、ならびに酸化防止剤および/またはフリーラジカル捕捉
剤を含むインキュベーション緩衝液

专利名称(译)	通过流式细胞术分析细胞的方法，在这些方法中使用抗氧化剂和/或自由基清除剂，以及含有抗氧化剂和/或自由基清除剂的孵育缓冲液		
公开(公告)号	JP5606000B2	公开(公告)日	2014-10-15
申请号	JP2009067450	申请日	2009-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	援助最多的黄郭皮托UDU巴黎		
申请(专利权)人(译)	芦苇的立场プブリク-オピトウ嘟嘟巴黎		
当前申请(专利权)人(译)	芦苇的立场プブリク-オピトウ嘟嘟巴黎 巴黎大学13巴黎北		
[标]发明人	レミレテツ クリスティーヌレロイ フローレンスシンバリスタ ナディーンヴァリンブラン		
发明人	レミ レテツ クリスティーヌ レ ロイ フローレンス シンバリスタ ナディーン ヴァリン-ブラン		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/543 G01N33/53 G01N33/536 G01N21/78		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/537 G01N33/582		
FI分类号	G01N33/531.B G01N33/543.597 G01N33/53.K G01N33/536.D G01N21/78.C		
F-TERM分类号	2G054/AA08 2G054/AB05 2G054/BB13 2G054/CA21 2G054/CE01 2G054/CE02 2G054/EA03 2G054/EB01 2G054/GA03 2G054/GA04 2G054/GA05		
优先权	PCT/FR2008/000380 2008-03-20 WO		
其他公开文献	JP2009258097A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种通过流式细胞术分析细胞的方法，并提供抗氧化剂和/或自由基清除剂的引入，用于在这种方法中抑制荧光染料的降解。解决方案：通过流式细胞术分析细胞的方法包括在标记溶液中标记细胞的步骤，所述标记溶液包含孵育缓冲液和一种或多种标记抗体或与至少一种作为APC串联的荧光染料缀合的抗体。将抗氧化剂和/或自由基清除剂引入标记溶液中以抑制至少一种荧光染料的降解。

【 图 4 】

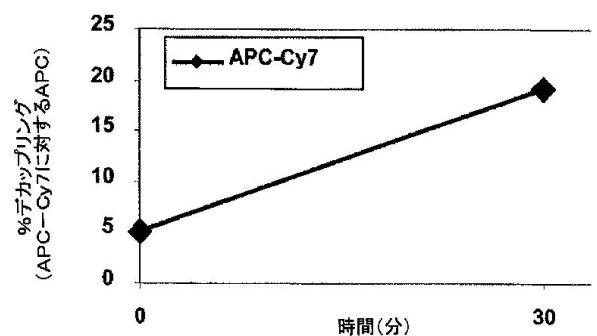


Figure 4