

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5349490号  
(P5349490)

(45) 発行日 平成25年11月20日(2013.11.20)

(24) 登録日 平成25年8月30日(2013.8.30)

(51) Int.Cl.	F I
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/53 T
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/553
	GO 1 N 33/543 5 4 1 A
	GO 1 N 33/543 5 1 5 F

請求項の数 6 (全 20 頁)

(21) 出願番号 特願2010-537127 (P2010-537127)  
 (86) (22) 出願日 平成20年12月5日(2008.12.5)  
 (65) 公表番号 特表2011-506935 (P2011-506935A)  
 (43) 公表日 平成23年3月3日(2011.3.3)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2008/085737  
 (87) 国際公開番号 W02009/076235  
 (87) 国際公開日 平成21年6月18日(2009.6.18)  
 審査請求日 平成23年12月2日(2011.12.2)  
 (31) 優先権主張番号 60/992,624  
 (32) 優先日 平成19年12月5日(2007.12.5)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 502307210  
 ザイオミックス インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
 545 ハイワード リサーチ ロード  
 26101  
 (74) 代理人 100079108  
 弁理士 稲葉 良幸  
 (74) 代理人 100109346  
 弁理士 大貫 敏史  
 (72) 発明者 ザウグ, フランク  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア州 94  
 062, レッドウッド シティ, クォー  
 ツ ストリート 476

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞アッセイキット及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

所与の細胞表面抗原を有する被分析細胞の濃度を決定するためにヒト血液細胞試料をアッセイする方法であって、

(a) 被分析細胞を含むヒト血液細胞試料に、前記被分析細胞上の前記所与の細胞表面抗原に特異的かつ高親和性に結合可能な表面結合性の結合剤を有し、且つ、被分析細胞を含む前記所与の細胞表面抗原を有する細胞と特異的に反応し結合するのに有効な重粒子であって、該重粒子が結合した細胞の密度を増加させるための重粒子と、

試料中の第2の種類細胞であって前記所与の細胞表面抗原も含む細胞上に存在する第2の細胞表面抗原と特異的反應可能な表面結合性の結合剤が固定された磁性粒子であって、該磁性粒子が結合した細胞の磁化率を増加させるための粒子と、を加える工程と、

(b) 前記試料に磁界を作用させて、前記第2の細胞表面抗原を有する細胞と磁性粒子を該試料から除く工程と、

(c) 特定の媒体を含むマイクロチャンネルカラムを通じて、前記細胞試料中の前記重粒子の結合した細胞及び前記重粒子を移動させる工程であって、

前記重粒子の結合した細胞及び前記重粒子の実質的に全て(但し、粒子に結合していない細胞を除く)を、前記特定の媒体を通じて、試料中の被分析細胞の血液試料における濃度に対応するカラムの容積が表示されているカラムの底に向かって移動させるのに十分な期間にわたり、前記試料を重力又は遠心力に供する工程と、

(d) 前記カラム内の細胞レベルを検出するために前記カラムを検査し、前記特定の媒

体を通して前記カラムの底に移動した細胞の容積に基づいて、前記試料中の被分析細胞の濃度を決定する工程と、

を含む、方法。

【請求項 2】

前記重粒子が、工程 ( a ) において前記被分析細胞と結合すると、前記被分析細胞を検出可能なレポーターで標識する効果を有し、及び前記検査する工程が、前記検出可能なレポーターで標識された細胞の存在について、前記カラムを目視検査することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

工程 ( c ) が、前記カラムを実質的に直立した垂直配置状態に置くことによって前記粒子の結合した細胞を重力に供することを含み、前記特定の密度の媒体が前記粒子の結合した細胞より低い密度を有し、及び前記重粒子が実質的に球形の金属粒子である、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 4】

工程 ( c ) が、前記粒子の結合した細胞を遠心力に供することを含み、前記特定の密度の媒体が前記粒子の結合した細胞より低い密度を有し、及び前記重粒子が実質的に球形の金属粒子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

工程 ( a ) で加えられる磁性粒子が、実質的に球形の磁性粒子又は常磁性粒子である、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

H I V に感染している可能性のある個人の血液試料中における C D 4 + T リンパ球細胞の濃度を、前記個人の T 細胞カテゴリーの指標として検出するための、請求項 5 に記載の方法であって、前記個人の血液試料を、表面結合性の抗 C D 4 + 結合剤を有する重粒子と、表面結合性の抗 C D 1 4 結合剤を有する磁性粒子と、に曝露することによって添加工程 ( a )を実施する、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本願は、参照により本明細書に全体として援用される 2007 年 12 月 5 日出願の米国 30  
仮特許出願第 60 / 992, 624 号に対する優先権を主張する。

【0002】

本発明の分野

本発明は、細胞試料中における所与の型の細胞の存在及び / 又は濃度、特に、試料中における少なくとも特定の閾値レベルの細胞の存在を判定するための細胞アッセイキット及び方法に関する。

【背景技術】

【0003】

本発明の背景

病態の治療に対する応答を含む様々な疾患状態は、血液学的マーカーにより、血液試料中における特定の白血球細胞の近似濃度を、疾患に対する身体の応答の指標として用いてモニタすることができる。例えば、血液試料中における C D 4 + T リンパ球細胞の濃度は、H I V 感染後の A I D S の突発についてのマーカーを提供し得る。約 200 細胞 /  $\mu$  l 血液未満の細胞計数値は、免疫系が著しく弱まっており、従って、例えば抗レトロウイルス治療 ( A R T ) を直ちに開始する必要があることを示す。ウイルス感染症又は細菌感染症などの一部の疾患状態は、例えば約 10,000 細胞 /  $\mu$  l 血液を上回るような血液白血球濃度の上昇を特徴とし、従ってこれは、感染性病態の指標として機能し得る。逆に、白血病を有する人か、又は化学療法若しくは放射線療法を受けている人では、血液試料中における白血球濃度は、例えば約 4,000 細胞 /  $\mu$  l 血液を下回るまでに低下し得る。白血球細胞型のレベルの低下又は上昇を特徴とする以上の、及び他の疾患状態においては 40  
50

、マーカー細胞のレベルを用いることで、疾患状態を検出若しくは確認したり、又は病態の治療に対する身体の応答をモニタしたりすることができる。

【 0 0 0 4 】

現在、細胞試料中における所与の細胞の濃度を判定するためには、2つの一般的な血液学的方法がよく用いられている。第一の手法では、対象とする細胞型が、当該の細胞型と特異的に結合するマーカー、典型的には抗原特異的抗体で標識される。次に、細胞計数器、例えば、フローサイトメーター又は蛍光標線式細胞分取器 ( F A C S ) によって細胞試料が分析され、表面結合マーカーを有する細胞の割合が確定される。

【 0 0 0 5 】

第二の一般的な手法は、対象とする細胞を標識し、顕微鏡検査によって代表的な一容積の細胞を調べ、標識された細胞及び未標識の細胞の数を計数して、対象とする細胞型の割合を確定することである。

【 0 0 0 6 】

いずれの手法においても、特に所与の白血球型の濃度を判定しようとする場合、細胞試料はまず初めに、赤血球又は他の不要な細胞を除去する処理がなされ得る。

【 0 0 0 7 】

上記に概要を述べた方法は、十分な訓練を受けた研究所の職員がいて、細胞選別又は組織学的検査のための機器が利用可能な研究所又は診療所環境に好適である。しかしながら、店舗型の診療所又は第三世界諸国における現地の診療所などの、訓練を受けた研究所職員も、又は高性能の細胞選別若しくは顕微鏡機器もない実地環境においては、こうした方法は容易には適さない。例えば、アフリカの貧困地域において、H I V 感染後の A I D S の発病の指標として C D 4 + T 細胞計数値について大勢の人を試験したり、又は、例えば抗レトロウイルス薬に対するある人の応答をモニタしたりするには、こうした方法は不向きであり得る。

【 発明の概要 】

【 発明が解決しようとする課題 】

【 0 0 0 8 】

従って、血液試料中における疾患関連細胞、例えば特定の白血球に関する細胞計数値を確定するための、単純、迅速で安価なキット及び方法を提供するならば、望ましいであろう。特に、かかる方法及びキットは、最小限の訓練しか受けていなくとも容易に実行することができ、且つ、特別な検査用機器、例えば、単純な機器、例えば手動駆動式の卓上型遠心機以上のものをほとんど又は全く必要としないものでなければならない。

【 課題を解決するための手段 】

【 0 0 0 9 】

本発明は、一態様において、所与の型の細胞の少なくとも閾値濃度の存在について細胞試料をアッセイする方法を含む。この方法は、

( a ) 所与の細胞型の細胞を含む細胞試料を、細胞と特異的に結合可能な粒子であって、細胞と結合すると、細胞の密度又は磁化率を増加させる効果を有する粒子と反応させる工程であって、それにより、重力又は加えられる遠心力若しくは磁界の力の影響下に、特定の密度及び / 又は特定の粘度の媒体を通じたその移動速度がより大きいことに基づき、試料中の粒子の結合した細胞及び単体粒子を、粒子が結合していない細胞と分離させる工程と、

( b ) 特定の密度の媒体を含み、且つその長さに沿って複数の細胞捕集領域を有する細長状の捕集チャンバを通じて、粒子の結合した細胞及び粒子が捕集チャンバの連続する細胞捕集領域を完全に充填するのに十分な期間にわたり、試料を重力又は特定の遠心力若しくは磁界の力に供することにより、細胞試料中の粒子の結合した細胞及び粒子を移動させる工程と、

( c ) 細胞試料が少なくとも閾値濃度の所与の細胞型の細胞を含むことの証拠として、少なくとも1つの特定の捕集領域が部分的又は完全に充填されているかどうかを判定するため、チャンバを検査する工程と、

10

20

30

40

50

を含む。

【 0 0 1 0 】

一般的な一実施形態において、捕集チャンバは捕集カラムを含み、カラム内の捕集領域はカラムの一部に沿って所定長のセグメントを含み、及び捕集領域は、工程 ( b ) において、捕集チャンバのカラム長さに沿って下流から上流方向に連続的に充填される。

【 0 0 1 1 】

別の一般的な実施形態において、捕集チャンバは、細長状の捕集管と、捕集管内に捕集領域を形成する複数のキャピティであって、工程 ( b ) において管を通じて上流から下流方向に移動する細胞が、最上流のキャピティに、それが充填されるまで捕捉され、その後キャピティが上流から下流方向に連続的に充填されるように管内に配置された複数のキャピティとを含む。

10

【 0 0 1 2 】

粒子は、工程 ( a ) において細胞と結合すると、細胞を検出可能なレポーターで標識する効果を有してもよく、及び前記検査する工程は、検出可能なレポーターで標識された細胞の存在について、捕集チャンバを目視検査することを含む。

【 0 0 1 3 】

本方法における工程 ( b ) は、チャンバを実質的に直立した垂直配置状態に置くことによって粒子の結合した細胞を重力に供することか、又は粒子の結合した細胞を遠心力に供することを含み得る。これらの実施形態において、特定の密度の媒体は、試料より高く、且つ粒子より低い密度を有し、及び粒子は実質的に球形の金属粒子であり、約 0 . 0 5 ~ 5  $\mu$  m の特定のサイズ範囲、好ましくは 0 . 2 ~ 5  $\mu$  m の範囲の好ましい直径を有し得る。

20

【 0 0 1 4 】

或いは、本方法における工程 ( b ) は、粒子の結合した細胞を磁界の力に供することを含み得る。この実施形態において、特定の密度の媒体は試料より大きい密度を有し、及び粒子は実質的に球形の磁性 ( 強磁性又は常磁性 ) 粒子であり、約 5 ~ 1 0 ' 0 0 0 n m 、好ましくは 5 ~ 5 0 n m の範囲の直径を好ましくは有し得る。

【 0 0 1 5 】

本方法における工程 ( b ) は、粒子の結合した細胞を含む試料を捕集チャンバの上流の接続域に添加し、接続域において試料中の細胞を特定の密度の媒体と物理的に混合することをさらに含み得る。

30

【 0 0 1 6 】

細胞試料が血液試料である場合、粒子は、血液細胞特異抗原、すなわち、1つ又は複数の特定の細胞型に特有の抗原との免疫反応が可能な表面結合性の結合タンパク質を有し得る。これらの粒子は、血液試料中における粒子凝集を低減するための表面処理が施され得る。

【 0 0 1 7 】

H I V に感染している可能性のある個人の血液試料中における C D 4 + T リンパ球細胞の濃度を、その個人の T 細胞カテゴリーの指標として検出するため、個人の血液試料を、表面結合性の抗 C D 4 + 結合剤を有する粒子に曝露することによって反応工程 ( a ) を実施してもよく、及び工程 ( c ) は、2 0 0 ~ 7 5 0 細胞 /  $\mu$  l 血液の特定の閾値範囲、例えば、2 5 0 、 3 5 0 、 4 5 0 、又は 7 5 0 細胞 /  $\mu$  l 血液の閾値の C D 4 + T リンパ球細胞の濃度を示す捕集領域における細胞の存在を観察することに基づき得る。

40

【 0 0 1 8 】

一実施形態において、工程 ( a ) は、試料中の細胞を、単球細胞上の C D 1 4 抗原と特異的に結合可能な第 1 の粒子、並びに T リンパ球細胞及び単球細胞上の C D 4 抗原と特異的に結合可能な第 2 の粒子と反応させる工程であって、それによって T リンパ球細胞に対しては密度の上昇を付与し、及び単球細胞に対しては密度と磁化率との双方の上昇を付与する工程をさらに含み得るとともに、工程 ( b ) は、まず初めに、細胞試料から粒子の結合した単球を除去する工程であって、粒子の結合した T リンパ球細胞から粒子の結合した

50

単球を選択的に除去する効果を有する磁力を加えることによって除去する工程をさらに含み得る。双方の粒子とも所定の比率で同時に加えてもよく、単球細胞は統計学的に少なくとも1個の磁化性粒子と確実に結合する。標的細胞と同じ表面マーカーを有する不要な細胞を除去するために可能な他の手法としては、以下が挙げられる：i) 妨害細胞型上の標的外の他の表面マーカーに対して親和性を有する立体的に大型のビーズにより、標的表面マーカーをマスキングし（例えば、非稠密及び非磁化性の抗CD14ビーズを用いてまず初めに単球をコーティングしてから、試料を抗CD4ビーズに曝露する）、従って、単球を被覆する抗CD14ビーズのマスキング効果によって、単球上のCD4マーカーに対する抗CD4ビーズの結合を阻止する。ii) 例えば、CD14抗原と赤血球表面マーカーとの双方に対して特異性を有する抗体媒介性の四量体抗体複合体を用い、従って、赤血球細胞の稠密層で被覆することにより単球をマスキングするなど、他の手段によって不要な細胞上の標的表面マーカーをマスキングする。iii) 妨害性の非標的細胞は、例えば、妨害細胞上にしか存在しない表面マーカーに対する抗体を含む固体マトリクスによって、そうした細胞を特異的に捕捉することにより除去することができる。例えば、抗CD14抗体は、フィルタマトリクスに固定化することができる。血液試料を当該のフィルタマトリクスに曝露した後、単球を当該のマトリクスと結合させることにより血液試料から枯渇させ、その後、血液試料を抗CD4粒子に曝露する。

10

**【0019】**

感染症又は他の血中の白血球上昇につながる病態を有し得る個人の血液試料中における白血球の濃度を検出するため、個人の血液試料を、表面結合性の抗白血球結合剤を有する粒子に曝露することによって反応工程(a)を実施してもよく、及び工程(c)は、約10,000細胞/ $\mu$ l血液より高い白血球の濃度を示す捕集領域における細胞の存在を観察することに基づき得る。

20

**【0020】**

化学療法、放射線療法又は白血病に起因した血中の白血球数の低下を有し得る個人の血液試料中における白血球の濃度をモニタするため、個人の血液試料を、表面結合性の抗白血球結合剤を有する粒子に曝露することによって反応工程(a)を実施してもよく、及び工程(c)は、約4,000細胞/ $\mu$ l血液未満の白血球の濃度を示す捕集領域における細胞の存在を観察することに基づき得る。

**【0021】**

化学療法又はインターフェロン療法に起因して血中の好中球数が低下している可能性のある個人の血液試料中における好中球の濃度をモニタするため、個人の血液試料を、表面結合性の抗好中球結合剤を有する粒子に曝露することによって反応工程(a)を実施してもよく、及び工程(c)は、500~2,500細胞/ $\mu$ l血液の特定の範囲、例えば、500、2,000又は2,500細胞/ $\mu$ l血液の好中球の濃度を示す捕集領域における細胞の存在を観察することに基づき得る。

30

**【0022】**

感染症を有する個人の血液試料中における細菌細胞の濃度を、感染の程度及び感染型の指標として検出するため、個人からの血液又は尿試料を、1つ又は複数の特定の細菌細胞壁抗原と特異的に結合可能な表面結合性の結合剤を有する粒子に曝露することによって反応工程(a)を実施してもよく、及び工程(d)は、血液試料中における検出可能な細菌細胞濃度に対応する捕集領域における細胞の存在を観察することに基づき得る。

40

**【0023】**

別の態様において、本発明は、試料中における特定の細胞型の細胞の少なくとも閾値濃度の存在について細胞試料をアッセイするためのキットを含む。このキットは、

(a) 細胞試料を受け入れるための試料チャンバと、それと流体連通した細長状の捕集チャンバであって、特定の媒体を含み、且つその長さに沿って複数の細胞捕集領域を有する捕集チャンバとを有するアッセイ装置と、

(b) 細胞試料に添加されると、特定の細胞型の細胞と特異的に結合することが可能で、且つ細胞と結合すると、細胞の密度又は磁化率を増加させる効果を有する粒子であって

50

、それにより、細胞試料中における粒子の結合した細胞及び粒子を、重力又は特定の遠心力若しくは磁界の力の影響下に、粒子の結合した細胞及び粒子が捕集チャンバの連続した細胞捕集領域を完全に充填するまで、細長状の捕集チャンバを通じて選択的に移動させることが可能な粒子と、

(c) 装置の捕集チャンバにある少なくとも1つの捕集領域に関連した1つ又は複数の標線であって、粒子の結合した細胞及び単体粒子が捕集チャンバを通じて引き込まれるとき、当該の捕集領域を少なくとも部分的に充填する効果を有する特定の型の細胞の濃度を指示する標線と、を含む。

#### 【0024】

様々な実施形態において、(1) 捕集チャンバは捕集カラムを含み、カラム内の捕集領域はカラムの一部に沿って所定長のセグメントを含み、及び捕集領域は、捕集チャンバのカラム長さに沿って下流から上流方向に段階的に連続して充填されるように構成され；(2) 捕集チャンバは、細長状の捕集管と、捕集管内に捕集領域を形成する複数のキャビティであって、管内にその長さに沿って配置された複数のキャビティとを含み、及び捕集領域は、カラム長さに沿って上流から下流方向に連続的に充填されるように構成され；(3) 捕集チャンバは、複数の逆方向に傾斜したフローセグメントを有する捕集管と、捕集管内に捕集領域を形成する複数のリム状キャビティであって、あるフローセグメントから別のフローセグメントへと、上流から下流方向に移動する細胞が、2つのフローセグメント間にあるキャビティに、当該のキャビティが充填されるまで捕捉されるように、隣接するフローセグメントの間に配置されたキャビティとを含み；(4) 捕集チャンバは、重力下に管内で粒子の結合した細胞が流れる方向に対して傾斜した捕集管と、捕集管内に捕集領域を形成する複数のキャビティであって、捕集管を通じて上流から下流方向に移動する細胞が、最上流のキャビティに、それが充填されるまで捕捉されるように、管の外表面部分に沿って配置されたキャビティとを含み；及び(5) 捕集チャンバは、重力下に粒子の結合した細胞が流れる方向に対して実質的に横断方向に延在するフロー管と、捕集チャンバ内に捕集領域を形成する複数のキャビティであって、フロー管を通じて上流から下流方向に流れる細胞が、最上流のキャビティに、それが充填されるまで沈降し、その後キャビティが上流から下流方向に連続的に充填されるように、フロー管の長さに沿って配置されたキャビティとを含む。

#### 【0025】

本装置は、試料チャンバと連通する捕捉チャンバをさらに含んでもよく、及び粒子(b)は、特定の型の細胞上と特定されない型の細胞上に存在する抗原と特異的に結合可能な第1のタイプの粒子と、特定されない型の細胞上のみ存在する抗原と特異的に結合可能な第2のタイプの粒子とを含んでもよく、それにより、第2のタイプの粒子と結合した粒子を捕捉チャンバに移動させることによって選択的に除去してから、第1のタイプの粒子とのみ結合する特定の型の細胞を移動させることにより、それらを捕集チャンバを通じて選択的に移動させることが可能となる。

#### 【0026】

粒子の結合した細胞が、重力又は加えられる遠心力の影響下にある捕集域を通じて移動するように構成される場合、粒子は、約0.2~2µmの好ましい特定のサイズ範囲の直径を有する実質的に球形の金属粒子であり得る。血液試料中における所与の型の細胞を検出するため、粒子は、血液細胞特異抗原との免疫反応が可能な表面結合性の結合タンパク質を有し得る。粒子は、血液試料中における粒子凝集を低減するための表面処理が施されてもよく、例えば、ポリエチレングリコール高分子鎖などの親水性ポリマーコーティングで被覆されてもよい。

#### 【0027】

粒子の結合した細胞が、磁界の力の影響下にある捕集域を通じて移動するように構成される場合、粒子は、約5~50nmの好ましい特定のサイズ範囲の直径を有する実質的に球形の磁性粒子であり得る。

10

20

30

40

50

## 【0028】

HIVに感染している可能性のある個人の血液試料中におけるCD4+Tリンパ球細胞の濃度を、その個人のT細胞カテゴリーの指標として検出するため、粒子は表面結合性の抗CD4結合剤を有してもよく、及び標線は、約200細胞/μl血液のCD4+Tリンパ球細胞の濃度及び/又は約500細胞/μl血液の細胞の濃度を指示するように設計され得る。

## 【0029】

感染症又は他の血中の白血球上昇につながる病態を有し得る個人の血液試料中における白血球の濃度を検出するため、粒子は、表面結合性の抗白血球結合剤を有してもよく、及び標線は、約10,000細胞/μl血液より高い白血球の濃度を指示するように設計され得る。

10

## 【0030】

化学療法、放射線療法又は白血病に起因して血中の白血球数が低下している可能性のある個人の血液試料中における白血球の濃度をモニタするため、粒子は、表面結合性の抗白血球結合剤を有してもよく、及び標線は、約4,000細胞/μl血液未満の白血球の濃度を指示するように設計され得る。

## 【0031】

化学療法又はインターフェロン療法に起因した血中の好中球数の低下を有し得る個人の血液試料中における好中球の濃度を検出するため、粒子は、CD16などの表面結合性の抗好中球結合剤を有してもよく、及び標線は、500~2,500細胞/μl血液の特定の範囲にある好中球の濃度を指示するように設計され得る。

20

## 【0032】

感染症を有する個人の血液又は尿試料中における細菌感染の存在を検出するため、粒子は、細菌細胞壁抗原と特異的に結合可能な表面結合性の結合剤を有してもよく、及び標線は、血液又は尿試料中における細胞の存在を指示するように設計され得る。

## 【0033】

本キットは、装置を保持し、且つ保持された装置に遠心力又は磁界の力を加えるための装置ホルダをさらに含み得る。

## 【0034】

本発明の以上の、及び他の特徴は、添付の図面と併せて以下の本発明の詳細な説明を読むことで、さらに完全に明らかとなるであろう。

30

## 【図面の簡単な説明】

## 【0035】

【図1】一般的な一実施形態における、本発明のキットの一部をなすアッセイ装置の平面図である。

【図2】一般的な一実施形態における、本発明のアッセイキットの動作の基礎をなす結合及び細胞移動事象を示す。

【図3A】本発明の装置の第2の一般的な実施形態における捕集チャンバの側面断面図を示す。この捕集チャンバは、複数の傾斜したフローセグメントと、隣接するフローセグメントの間に配置されたリム状キャビティとを含む。

40

【図3B】本発明の装置の第2の一般的な実施形態における捕集チャンバの側面断面図を示す。この捕集チャンバは、複数の傾斜したフローセグメントと、隣接するフローセグメントの間に配置されたリム状キャビティとを含む。

【図3C】本発明の装置の第2の一般的な実施形態における捕集チャンバの側面断面図を示す。この捕集チャンバは、加えられる力のもとに管内で粒子の結合した細胞が流れる方向に対して傾斜しており、管の外表面部分に沿って配置された複数のキャビティを有する。

【図4】図3Bに示される装置のキャビティ内において、粒子の結合した細胞が上流から下流方向に連続的に蓄積しているところを示す。

【図5】本発明の第3の一般的な実施形態における捕集チャンバの側面断面図である。

50

【図6】個人におけるCD4+細胞の閾値レベルを検出するための本発明に係るアッセイ装置の使用を示す。

【図7】図7Aは、本発明の方法に従い実施されるアッセイ操作のエンドポイントを、概略図で示す。図7Bは、本発明の方法に従い実施されるアッセイ操作のエンドポイントを、写真画像で示す。図7Cは、本発明の方法に従い実施されるアッセイ操作のエンドポイントを、蛍光の読み取りで示す。

【図8】本発明のアッセイ方法におけるエンドポイント結果を、ビーズ単独（左側のレーン）、及び $1 \times 10^5$ 細胞、中央のレーン、及び $5 \times 10^5$ 細胞（右側のレーン）について示す。

【図9】図9Aは、対象とする細胞型と重要な表面抗原を共有する不要な細胞型を初めに除去することが可能な2チャンバ型の装置を使用したアッセイを示す。図9Bは、対象とする細胞型と重要な表面抗原を共有する不要な細胞型を初めに除去することが可能な2チャンバ型の装置を使用したアッセイを示す。

【図10A】沈降による細胞移動に好適なホルダ内の試料装置を示す。

【図10B】加えられる遠心力下での細胞移動に好適なホルダ内の試料装置を示す。

【図10C】加えられる磁界の力のもとでの細胞移動に好適なホルダ内の試料装置を示す。

【発明を実施するための形態】

【0036】

本発明の詳細な説明

I. 定義

特に断らない限り、下記の用語は本明細書において以下の意味を有する。

【0037】

「細胞試料」は、懸濁液中に1つ又は複数の型の細胞を含むか、若しくは含むことが疑われる任意の液体試料を指す。細胞試料は「体液試料」を含み、これは、例えば、ヒト又は他の動物の身体から採取された血液、尿、又は唾液試料を指す。血液試料は、全血であっても、又は全て若しくは大部分の赤血球が除去された処理済みの血液若しくは全血であってもよい。他の可能な細胞試料としては、例えば、細胞培養物、組織試料から得られる細胞抽出物、廃水が挙げられる。細胞を含むことが疑われる細胞試料としては、例えば、望ましくない型の例えば細胞又は細菌で汚染されている乳及び他の食品が挙げられる。

【0038】

細胞試料中における細胞の「濃度」は、所与の細胞試料容積における細胞の数を指す。この用語は典型的には、細胞数/試料容積当たりとして表される。

【0039】

「所与の型の細胞の閾値レベル又は濃度」は、所与の試料容積に含まれる細胞の閾値数を指し、500細胞/ $\mu$ l血液試料より多いCD4+細胞数、又は200細胞/ $\mu$ l血液試料より少ないCD4+細胞数など、これもまた細胞濃度で表される。

【0040】

細胞の「沈降」は、液状の懸濁体中の粒子が、重力の影響下に、その懸濁液から離れて、又は懸濁液の底部に向かって、又は異なる密度若しくは粘度の別の液状媒体の中に沈殿することを指す。

【0041】

「所与の型の」細胞又は「被分析」細胞は、試料中におけるその濃度がアッセイされるべき細胞を指す。細胞は、例えば体液試料からの細菌粒子又はウイルス粒子、以下の表に列挙される白血球型又は血小板などの細胞断片などの、血液試料からの哺乳動物細胞、固形腫瘍又は他の組織塊に由来する癌細胞などの、組織由来又は器官由来哺乳動物細胞、培養されるか、又は他の方法で分離された植物又は動物細胞、酵母細胞などの単細胞真核生物からの細胞、及び、例えば土壌試料又は廃水試料に含まれる細菌などの、工業試料、環境試料又は都市試料に含まれる細胞であり得る。所与のタイプの白血球は、典型的には、CDなどの細胞表面特異的抗原マーカーによって特徴付けることができ、CD抗原マーカー

10

20

30

40

50

ーは、以下の表に示される白血球型に特有のものである。

【 0 0 4 2 】

【表 1】

細胞型	CDマーカー
幹細胞	CD34+, CD31-
全ての白血球グループ	CD45+
顆粒球	CD45+, CD15+
単球	CD45+, CD14+
Tリンパ球	CD45+, CD3+
Tヘルパー細胞	CD45+, CD3+, CD4+
細胞傷害性T細胞	CD45+, CD3+, CD8+
Bリンパ球	CD45+, CD19+又はCD45+, CD20+
血小板	CD45+, CD61+
ナチュラルキラー細胞	CD16+, CD56+, CD3-

10

20

【 0 0 4 3 】

細胞の「移動」は、重力が、又は加えられた遠心力若しくは磁界の力の影響下における、典型的には特定の密度を有する媒体を通じた細胞の移動を指す。

【 0 0 4 4 】

金属粒子などの粒子は、その粒子が結合する細胞の密度を増加させる効果を有する。細胞及び結合した粒子は、細胞単独より高い合成密度を有し、これは、例えば、重力又は加えられる遠心力の影響下で、所与の密度媒体を通じた細胞及び結合した粒子の移動速度がより高いことから明らかとなり得る。

30

【 0 0 4 5 】

磁性粒子は、強磁性及び常磁性のいずれの粒子も含め、細胞及び結合した粒子が細胞単独より高い合成磁化率を有するならば、その粒子が結合する細胞の磁化率を高める効果を有し、これは、例えば、加えられた磁界の影響下で、所与の密度及び/又は粘度媒体を通じた細胞及び結合した粒子の移動速度がより高いことから明らかとなり得る。

【 0 0 4 6 】

「磁化率」は、一様な磁界に置かれた物体の磁化の強さの尺度である。

40

【 0 0 4 7 】

「マイクロチャンネル」又は「マイクロスケールチャンネル又はカラム」は、マイクロスケールの範囲の寸法、典型的には10～500、例えば、50～100 μmの幅及び深さを有するチャンネル又はカラムを指す。

【 0 0 4 8 】

II. アッセイ装置及びキット

図1は、本発明の一実施形態に従い作製された細胞アッセイキット20を示す。この装置は基材又は支持材22を含み、その上に装置の他の構成要素が装着されるか、又は組み込まれる。例えば、以下に記載される特定のリザーバ及びチャンネル要素が、2枚の基材プ

50

レートの間において周知の方法に従い形成されたマイクロ流体要素として基材に組み込まれてもよく、この場合、例えば、リザーバ及びチャンネル要素は下部プレート24の凹部として形成され、下部プレート24は上部カバープレート26によって被覆される。好ましい実施形態において、装置のチャンバ及び連結するマイクロチャンネルは、ガラス又は硬質ポリマー材料のような平滑面材料で作製され、及びチャンバ及びチャンネルの表面は、細胞がチャンネル壁に非特異的に付着することを最小限に抑えるためコーティングで被覆される。例えば、チャンネル壁は、米国特許第5567440号、同第6884628号及び同第5462990号に記載されるとおりの、ペグ化されたポリイオン共重合体によって被覆することができる。特定のシラン、アルカンチオール自己組織化単分子膜、PEG共重合体、界面活性剤及び無機層、又は例えばBSA若しくは血清のような受動的に吸収されるタンパク質に基づくコーティングなどの、チャンネル壁に対する非特異的な、又は望ましくない細胞の付着を低減又は防止する当該技術分野において公知の他のコーティングが用いられてもよい。

10

#### 【0049】

図に見られるとおり、この装置は、ヘッドを試料中に浸すことにより、例えば毛管作用によって細胞試料を取り込むように設計された試料採取ヘッド28を含む。試料ヘッドは、フィンガープリックニードルか、又はその他の、一定量の試料を吸い込むための毛管構造であってよい。ヘッドは、マイクロチャンネル管32を通じて試料チャンバ30に連結される。試料チャンバは、(i)分析される所与の型の細胞と特異的に結合可能な粒子であって、(ii)細胞と結合すると、細胞の密度又は磁化率を実質的に増加させ、すなわち、粒子が結合する細胞に対し、実質的に高い密度又は磁化率を付与する粒子の、所与の容積の懸濁液が予め充填されていてもよい。本発明での使用に好適な粒子は、以下に図2を参照して説明される。図1に示される装置、及び試料と共に試料チャンバに含まれるか、又はそこに添加される粒子は、本明細書では、まとめてアッセイキットとも称される。

20

#### 【0050】

装置には、オーバーフローリザーバ34がマイクロチャンネル管36を通じて試料チャンバ30と連結され、これは、所与の試料容積が装置に添加されたときのオーバーフロー液を受け入れる働きをする。試料チャンバは、その下端に沿って接続チャンバ38と連通する。見て分かるとおり、図1のチャンバ38は、片側のみから下方に向かってテーパ状になっている；図2の同等機能の接続チャンバ38'は、試料チャンバの両側から対称的にテーパ状になっている；及び図6では、接続域が、それぞれ別個のチャンバ38"、39"として形成されている。

30

#### 【0051】

図1のチャンバ38（又は図2のチャンバ38'若しくは図6のチャンバ39"）の下端は、細長状の捕集チャンバ40と流体連通する。図1、図2、及び図6に示される一般的な実施形態において、捕集チャンバは、カラムの長さに沿って表示されるマーカー44などの、一対のマーカー又は標線によって画定されるセグメント42など、カラムの長さに沿って所定長のセグメントを有する細長状のマイクロチャンネルである。図2に見られるとおり、表示されている標線によって指示されるこれらのカラムセグメント又は領域は、カラムに移動してきた細胞の塞栓部の上面の高さによって測定するときの、試料の細胞の数、すなわち細胞計数値を判定するために用いられる。従って、カラムの長さに沿って表示される標線は、アッセイ結果の読み取りを提供する。ここには図示されないが、装置には、捕集チャンバの前方に置かれたレンズ素子が提供されてもよく、細胞領域内の細胞の検出を促進し得る。公知の方法に従い、分光器的又は電子的にモニタすることによって捕集チャンバ内にある細胞レベルを検出することもまた企図されるが、捕集チャンバ内の細胞の分布を単純に目視検査するだけでアッセイの読み取りを確定し得ることは、例示されるこの実施形態の1つの利点である。

40

#### 【0052】

以下に記載されるアッセイ手順から理解されるであろうとおり、捕集チャンバに捕集さ

50

れる細胞の総容積は、粒子が結合した細胞と単体粒子との双方を合わせた容積を反映する。例えば0.5 ~ 5  $\mu\text{m}$ サイズの範囲の大型の粒子の場合、これらの粒子は、捕集チャンバ内の細胞の総容積に対して計測可能な寄与をなし得る。この場合、粒子の容積寄与は、粒子を単独で添加した容積に相当する「ヌル」セグメントをリザーバセグメントに提供することによって補償され得る。この構成では、粒子が結合した細胞にあらゆる単体粒子を加えた総容積が、単体粒子の総容積に粒子が結合していない元の細胞の総容積を加えたものに等しいと仮定される。粒子が非常に小さい場合、例えば、小型の磁性粒子については、粒子の容積寄与は無視することができ、この場合、粒子の容積効果についてリザーバ容積を調節する必要はないこともある。しかしながら、比較的小さい粒子の場合においてさえ、例えば、高濃度の被分析細胞を含む試料において反応を確実に完了させるため、大量の過剰な粒子が細胞に添加される場合、粒子は計測される付着容積又は枯渇容積に対して認め得るほどの寄与をなし得るため、リザーバ容積を調節して粒子容積を補償する必要がある。粒子の容積効果は、例えば、捕集チャンバを通じて試料に加わった量の粒子を遠心して粒子単独での容積寄与を計測することにより、容易に確定することができる。

10

## 【0053】

図1に示されるものの説明を完了すれば、マイクロチャンネル48を通じてカラム40の下端と連通する充填ポート46があり、これは、製造時又はアッセイの直前にカラム及び接続域を好適な密度媒体で充填することを可能にするものである。重力下又は加えられる遠心力下に細胞が媒体を通じて移動する一般的な実施形態において、媒体は、試料チャンバ内に形成される当該の粒子の結合した細胞より低く、且つ好ましくは粒子と結合しない試料細胞以上の特定の密度を有する。

20

## 【0054】

図2及び図3は、装置の動作の基礎をなす細胞の反応及び移動事象を示す。図2において、試料チャンバ30は、所与の既存の反応粒子若しくはビーズ懸濁液で充填され、さらにチャンバを充填するよう所定容積の試料を受け入れるか、又は所与の容積の粒子懸濁液と予め混合して予め反応させた所定の混合容積の試料を受け入れる。重力下又は加えられる遠心力下に細胞を捕集チャンバの中に、及びそこを通じて移動させる場合、試料細胞に添加される粒子は比較的密度が高く、典型的には約5  $\text{g}/\text{m}^3$ を上回り、金属、セラミック材料、高密度ガラスなどによって形成される。粒子は、例えば共有結合により、アッセイにおいて対象とする細胞に特有の細胞表面抗原と特異的に高親和性で結合することが可能な結合剤で被覆される。従って、例えば、CD4+細胞のアッセイでは、粒子はCD4+抗原に特異的な抗体、例えばモノクローナル抗体で被覆され得る。

30

## 【0055】

様々な細胞抗原特異的抗体が市販されており、又は公知のモノクローナル抗体法によって容易に入手することが可能である。例示的粒子の一つは1  $\mu\text{m}$ の金マイクロ粒子であり、これは、アミン又はカルボキシル化学基を介して粒子表面上に結合したモノクローナル抗体を有し、且つ金の密度に近い約19.3  $\text{g}/\text{m}^3$ の密度を有する。他の粒子としては、他の金属、酸化物又は高分子（例えば、鉄、銀、ガラス、ケイ素又はPTFEマイクロ粒子若しくはナノ粒子）のミクロンサイズの粒子又はコロイド粒子、並びに銀又は金SERIS（表面増感ラマン分光法）粒子、高分子によって被覆された金属粒子、及び量子ドットが挙げられる。粒子はまた、好ましくは、細胞を検出可能なレポーターで標識する効果も有する。レポーターは、金粒子などの、濃縮形態で容易に可視化され得る粒子それ自体であってもよく、又は、粒子と直接結合するか、若しくは粒子を被覆する結合剤と結合する蛍光標識などの、付加された標識であってもよい。生物学的適用における使用に好適で、且つ細胞特異的な結合剤の付加に好適な表面化学基を有する磁性粒子又は常磁性粒子は周知されており、例えばinvitrogen (Carlsbad, CA) から容易に入手することができる。

40

## 【0056】

加えて、粒子を表面処理するか、又は被覆することにより、粒子が懸濁液中で自己凝集する傾向を低下させてもよい。一例示的方法では、粒子は、親水性ポリマー、好ましくは

50

、ポリエチレングリコール高分子鎖などの、水性媒体中で高度に溶媒和される親水性ポリマーで被覆される。粒子を表面反応基、例えば、アルコール基、酸性基、又はアミン基などで調製し、高分子鎖をかかると結合させる方法が公知である。

【 0 0 5 7 】

図 2 では、細胞 5 0 などの分析対象外の細胞が白い四角で示され、細胞 5 2 などの被分析細胞が白い丸で示され、粒子 5 4 などの細胞結合性の粒子が黒い丸で示され、及び細胞 5 6 などの粒子の結合した細胞が濃く縁取りされた白い丸で示される。初めに、別個の管内で試料と粒子とを予め混合して反応させ、次に合わせて試料チャンバに添加し、反応した細胞を試料チャンバから沈降域を通じて捕集チャンバに沈降させる。或いは、試料は試料チャンバに直接添加し、チャンバ内で粒子と反応させてもよく、その場合、粒子及び細胞が、細胞の結合反応が完了する前に捕集カラムに向かって沈降することを防ぐため、装置は水平位置に置かれ得る。

【 0 0 5 8 】

好適な反応時間、例えば 1 0 分間の後、図 1 0 A ~ 図 1 0 C に示されるとおり、装置を好適なホルダに置き、粒子が結合した細胞の移動を促進して捕集チャンバに移動させる。捕集域を通じた粒子の移動が重力下の沈降による場合、ホルダは単に、捕集チャンバを直立した位置、好ましくは図 1 0 A に示されるとおり、垂直方向に直立した位置に置く役割をするのみであり、この場合、捕集チャンバ 1 4 0 を有するアッセイ装置 1 4 0 が、装置を実質的に垂直方向の直立位置に支持するよう構成された卓上ホルダ 1 4 4 に配置される。粒子の移動が遠心による場合、ホルダは単に管ホルダであってよく、これは、図 1 0 B に示されるとおり、遠心機のヘッド、例えば典型的な卓上遠心機の管ホルダに置くように構成される。ここでは捕集チャンバ 1 4 8 を有するアッセイ装置 1 4 6 が、装置の反対側にある受入ソケットにより、例えば、シャフト軸の周りに回転するよう、遠心機のシャフト 1 5 0 に回転用に担持された U 字型フォーク 1 5 2 の拡張可能なアーム 1 5 1 によって係合される。遠心機は、例えば安価な手動駆動式の卓上遠心機であり得る。従って、この実施形態では、遠心機及び取り付けられたフォークが装置ホルダとして機能する。粒子の移動が磁界を加えることによる場合、ホルダは、単に、その基部に永久磁石又は電磁石を有するスタンドであってよく、スタンド 1 5 8 に直立して装着された捕集チャンバ 1 5 6 を有するアッセイ装置 1 5 4 を示す図 1 0 C に示されるとおりである。スタンドの下端にある永久磁石 1 6 0 を用いて、磁性ビーズの結合した細胞を捕集チャンバの中に、及びそこを通じて引き込む。各態様において、アッセイは粒子の結合した細胞（及び単体粒子）を接続域（チャンバ 3 8 '）の中に、及びそこを通じてカラム 4 0 の中に移動させるよう促進し、ここで細胞は、添加された試料中における粒子の結合した細胞の数に比例する最終深さまで堆積する。カラムに沿って表示されるマーキングは、好ましくは細胞濃度として示される、所与の試料容積に対応した細胞数を指示するように基準が定められる。各実施形態に示されるホルダは、本発明に係るアッセイキットの一部をなし得るもので、このアッセイキットはまた、アッセイ装置及び細胞試料と反応する細胞特異的粒子も含む。

【 0 0 5 9 】

図 9 A 及び図 9 B に示される本発明の別の実施形態において、細胞試料は、所与の細胞表面マーカーを有する被分析細胞と、被分析細胞マーカー及び第 2 の細胞特異的マーカーの双方を有する不要な細胞とを含む。説明のため、血液試料中における C D 4 + T 細胞についての細胞アッセイを記載する。試料中の細胞は、表面 C D 4 抗原を有する C D 4 + T 細胞と不要な単球との双方を含み、一方、単球はさらに C D 1 4 表面抗原を含む。細胞試料は、2 つの抗原のうち的一方に対する抗体で被覆された重粒子と、2 つの細胞表面抗原のうち他方に対する抗体で被覆された磁気ビーズと反応させる。1 3 0 で示されるアッセイ装置は、試料受入れ及び接続域 1 3 6 と、捕集チャンバ 1 3 6 と、不要な単球を捕集するための捕捉チャンバ 1 3 4 とを含む。

【 0 0 6 0 】

図 9 A に示されるアッセイでは、C D 4 抗原との免疫反応性を有し、従って C D 4 + T 細胞及び C D 4 + 単球の双方と結合する重粒子、例えば金粒子と、C D 1 4 との免疫反応

10

20

30

40

50

性を有し、従ってCD4/CD14単球と反応する磁気ビーズとの混合物と、細胞試料を反応させる。好適な反応時間の後、装置において重力下に粒子の結合した細胞を沈降させる。細胞が沈降するとき、捕捉チャンバの近傍に当てられた磁石138が不要な単球を捕捉チャンバに引き込み、CD4+T細胞は拘束されないため、不要な単球の捕集チャンバには沈降しない。

#### 【0061】

図9Bに示されるアッセイでは、2つの粒子の役割が逆転し、重粒子がCD14に対する免疫反応性を有し、磁気ビーズがCD14抗原に対する免疫反応性を有する。細胞が2つの粒子タイプと反応した後、アッセイ装置を図示のとおり傾けることにより、重粒子で標識された単球を捕捉チャンバ134に沈降させ、こうした細胞をCD4+T細胞から取り除き、CD4+T細胞はチャンバの下端にある磁石138によって捕集チャンバの中に引き込まれる。

10

#### 【0062】

図3A~図3Cは、上記と同様の細胞沈降アッセイ装置における捕集チャンバの構成を示し、但しこれは、本発明の第2の一般的な実施形態に従い作製される。これらの装置の全てにおいて、捕集チャンバは、細長状の捕集管と、その捕集管内に捕集領域を形成する複数のキャビティであって、管に沿って配置されたキャビティとを含む。キャビティは、管を通じて上流から下流方向に移動する細胞が、最上流のキャビティに、それが充填されるまで捕捉され、その後キャビティが上流から下流方向に連続的に充填されるように管内に配置される。

20

#### 【0063】

図3Aは、捕集管又はチャンバ64と連通する接続域62を有するアッセイ装置60を示す。捕集管は、セグメント66、68などの複数の逆方向に傾斜したフローセグメントを有する。管内の捕集領域は、隣接するフローセグメント66、68の間のキャビティ70などの、隣接するフローセグメントの間に配置された複数のリム状キャビティである。

#### 【0064】

図3Bに示される捕集チャンバは、図3Aのものと同様である。ここでアッセイ装置74の捕集管72は、セグメント76、78などの逆方向に傾斜したフローセグメントと、フローセグメント76、78の間のキャビティ80などの、隣接するフロー要素間にある一連のキャビティとで形成される。この構成の一部が図4に示され、これは、捕集管を通じて移動する細胞が、どのようにして上流から下流方向に連続的にキャビティに捕捉されるかを示し、粒子の結合した細胞を含む最下流のキャビティを特定することにより、細胞計数値を容易に確定することが可能である。図4に見られるとおり、上流から下流方向に(図では上から下に向かって)、矢印75によって示される力の線に沿ってあるフローセグメントから別のフローセグメントに移動する細胞79などの粒子の結合した細胞は、最上流キャビティ80に、そのキャビティが充填されるまで捕捉され、充填された時点で、細胞は次に下流側にあるキャビティを充填し始めるというようにして、最終的には全ての細胞が捕捉される。捕集管に捕捉された細胞の数は、細胞を含む最下流のキャビティを判定することにより、半定量的に確定することができる。実際のアッセイ装置では、捕集領域は、連続する各捕集域が、例えば約200細胞/キャビティ当たりなどの、対象とする試料細胞の特定の総数を表すように基準が定められ、従って上からn番目のキャビティに細胞が存在すると、それは、例えば、約 $(n-1) \times 200 \sim n \times 200$ 細胞の細胞計数値を示す。上記のとおり、キャビティのサイズと細胞の数との間の関係を調節することにより、リザーバを充填する粒子(結合粒子及び単体粒子の双方)の容積を補正することができる。

30

40

#### 【0065】

図3Cでは、装置84の捕集管82が、重力下又は加えられる遠心力若しくは磁界のもとにある管内で、矢印86によって示される粒子の結合した細胞の流れる方向に対して傾斜している。捕集管内の捕集領域は、キャビティ88などの、管の外表面部分90に沿って配置された複数のキャビティを含み、従って、捕集管に沿って上流から下流方向へと、

50

矢印 86 によって示される力の方向に移動する細胞は、まず初めに最上流のキャビティに捕捉され、その後さらに下流のキャビティに連続的に、各キャビティを充填しながら捕捉される。図 3 A 及び図 3 B に示される実施形態と同様に、この装置は、粒子の結合した細胞を含む最下流のキャビティを特定することによって細胞計数値を容易に確定することが可能である。

【 0 0 6 6 】

3つの装置の全てに、捕集管の下端と連通する予備充填チャンネル 92 も示され、これは捕集管及び接続域を充填することのできるポートを提供する。

【 0 0 6 7 】

図 5 は、上記と同様の細胞沈降アッセイ装置 94 における捕集チャンバの構成を示し、但しこれは、本発明の第 3 の一般的な実施形態に従い作製される。この装置において、96 で示される捕集チャンバはフロー管 98 を含み、これは、その上流端で沈降域 97 と連通し、且つ重力下に粒子の結合した細胞が流れる方向に対して実質的に横断方向に延在する。すなわち、矢印 100 によって示される管を通じた流れ方向は、例えば重力下において、矢印 102 によって示される細胞に加えられる力の方向と実質的に垂直である。チャンバは、管 98 の下面に沿って離間された複数のキャビティ 104 を含む。動作時、106 で示されるような粒子の結合した細胞は、チャンバを通じてある流動速度で流れ、従って粒子はまず初めに、108 で示される最上流のキャビティのみに実質的に移動し、このキャビティが充填されると、キャビティ 108 に捕集され続ける粒子が、流体の流れによって運ばれて次に下流のキャビティに沈降し、及び同様に隣接する各キャビティに沈降し、最終的に全ての細胞がキャビティに捕捉される。この一般的な実施形態における他の装置と同様に、粒子の結合した細胞の細胞計数値は、細胞を含む最下流キャビティから確定することができる。

【 0 0 6 8 】

III. アッセイ方法

本発明の方法は、所与の型の細胞の少なくとも閾値濃度の存在について細胞試料をアッセイするための上記の細胞アッセイ装置を使用する。説明のため、本方法は、感染症の状態をモニタされている HIV 感染症を有する個人に存在する CD4 + T 細胞の閾値濃度（細胞計数値）を確定する方法に関して説明される。一般に、重力下で所定密度の媒体を通じた沈降によって細胞移動を生じさせる場合に、CD4 + 細胞計数値が 500 ~ 1500 個の CD4 + T 細胞 /  $\mu$ l 血液であれば、個人における T 細胞免疫は正常に機能していることが示される。HIV によって CD4 + T 細胞が 200 個の CD4 + T 細胞 /  $\mu$ l 血液より少なくなるまで死滅すると、細胞性免疫が失われ、AIDS との診断可能性に至る。ここで説明されるアッセイは、250 /  $\mu$ l 血液未満の CD4 + T 細胞の閾値レベルを検出するように設計され、この閾値で治療が勧告されることを意味する。この閾値は、例えば個人の年齢に応じて、例えば、350、450、550、又は 750 /  $\mu$ l 血液に調節され得る。

【 0 0 6 9 】

アッセイに用いられるアッセイ装置は図 6 に示される。110 で示されるこの装置は、図 1 及び図 2 に関連して記載された装置と同様に、上流から下流方向に流体連通する試料チャンバ 30、沈降チャンバ 38、及び集中チャンバ 39（まとめて接続チャンバ）と、捕集管 40 とを含み、ここで捕集管の捕集領域は、管の長さに沿ったマーキング 44 によって示される。この装置は、特定の密度の媒体で予め充填されていることが仮定され、接続チャンバ及び捕集チャンバは充填されている。試料チャンバは、CD4 + T 細胞の CD4 + 抗原と特異的に反応することが可能な検出可能粒子の懸濁液を特定の容積だけ含んでもよく、或いは、粒子は別個に供給し、試料チャンバに添加する前に試料と混合してもよい。

【 0 0 7 0 】

アッセイの第 1 の工程として、患者から血液試料が採取される。試料を装置に入れる前に、例えば、検査血液学において周知の方法に従い、RBC を特異的に除去する溶解、抗

10

20

30

40

50

体沈殿、遠心によるか、又は遠心によって全ての血球細胞をペレット状にし、続いて白血球画分を再懸濁することにより、試料中のRBCを部分的又は完全に除去し得る。いずれの場合にも、最終的な白血球試料は、既知の容積の元の血液試料に対応した容積に調整される。

#### 【0071】

白血球を含む試料を、装置における所与の容積の試料チャンバに加え、細胞を細胞結合性の粒子と、反応を完了させるのに十分な時間、例えば10分間にわたり反応させる。或いは、この反応は別個の管で実施し、次に合わせて試料チャンバに添加する。図6に示される装置において、CD4+結合性粒子は小さい黒い丸として112で示され、CD4+陽性細胞は陰影付きの丸により114で示され、CD4+陰性細胞は白い丸として116で示され、及び粒子の結合したCD4+細胞は、結合した粒子を表す濃い縁取りの粒子コーティングを有する陰影付きの丸として示される。上記に指摘されるとおり、粒子の結合した細胞は密度が実質的に増加し、好ましくは肉眼で容易に検出可能である。

10

#### 【0072】

ここで、例えば装置を直立位置に置くか、又は低速遠心機に置くことにより、実質的に粒子の結合した細胞が全て捕集管に沈むまで、試料中の細胞を、重力下に、粒子の結合した細胞の密度未満の密度を有する沈降媒体を通じて、複数の捕集領域を有する捕集チャンバの中に沈降させる。図6は、粒子の結合した細胞の一部がまだ捕集管に沈んでいない、完了前の沈降過程を示す。

#### 【0073】

沈降が完了すると、装置は、好ましくは目視検査により、少なくとも1つの特定の捕集領域における粒子の結合した細胞の存在について検査される。例示される装置において、捕集領域は、管の側面に沿ったマーキング44に対応する管の増分セグメントに相当し、各マーキングにつきおよそ100細胞/ $\mu\text{l}$ ずつの増分に対応する。

20

#### 【0074】

本方法の最終工程として、充填された、又は部分的に充填された捕集領域の数に基づき、添加された試料容積が、分析される細胞型の細胞を特定の閾値数だけ含むかどうかの判定が行われる。この例示では、アッセイにおける細胞計数値が、完了時において500細胞/ $\mu\text{l}$ を上回ることが見て分かり、これは、被験者が正常に機能する免疫系を有することを示している。

30

#### 【0075】

図7C~図7Cは、概略的に(7A)、写真によって(7B)、及び蛍光読み取りによって(7C)見たときの例示的アッセイ方法の結果を示す。蛍光読み取りは、 $7.6 \times 10^5$ 細胞が添加されたもの(図7Cの左側のレーン)及び $7.6 \times 10^4$ 細胞が加えられたもの(図7Cの右側のレーン)を含む2つの異なる試料に対し、PBMC(末梢血単核球)の蛍光標識を使用して得た。図に見られるとおり、細胞容積がより大きい試料は、アッセイ捕集管に2倍より高い高さの塞栓を生じた。

#### 【0076】

図8は細胞アッセイの結果を示し、ビーズ単独(左側のレーン)、ビーズ+ $1 \times 10^5$ 個のCD4+細胞(中央のレーン)、及びビーズ+ $5 \times 10^5$ 個のCD4+細胞を含む試料についてのカラム高さである。沈降するビーズは、単独では、図において120で示されるカラム高さを生じた。 $1 \times 10^5$ 細胞が加わると、高さはわずかな増分だけ増加し、これは122で示される；及び $5 \times 10^5$ 細胞が加わると、予想通り、124で示されるように、それより低い細胞計数値の試料のおよそ5倍の増分だけ高さが増加する。

40

#### 【0077】

健全な状態又は治療状態の指標として白血球細胞をモニタするための他の適用としては、限定はされないが、以下が挙げられる：

#### 【0078】

感染症又は他の血中の白血球上昇につながる病態を有し得る個人の血液試料中における白血球の濃度の検出又はモニタ。この適用において、細胞は、CD45などの、表面結合

50

性の抗白血球結合剤を有する粒子と反応させ、及び対象とする1つ又は複数の閾値捕集領域に対応する1つ又は複数の標線は、約10,000細胞/μl血液より高い白血球の濃度を指示する。

【0079】

化学療法、放射線療法又は白血病に起因して血中の白血球数が低下している可能性のある個人の血液試料中における白血球の濃度の検出又はモニタ。この適用において、細胞は、CD45などの、表面結合性の抗白血球結合剤を有する粒子と反応させ、及び対象とする1つ又は複数の閾値捕集領域に対応する1つ又は複数の標線は、約4,000細胞/μl血液未満の白血球の濃度を指示する。

【0080】

化学療法又はインターフェロン療法に起因して血中の好中球数が低下している可能性のある個人の血液試料中における好中球の濃度の検出又はモニタ。この適用において、細胞は、CD16などの、表面結合性の抗好中球結合剤を有する粒子と反応させ、及び対象とする1つ又は複数の閾値捕集領域に対応する1つ又は複数の標線は、500~2,500細胞/μl血液の特定の範囲にある好中球の濃度を指示する。

【0081】

感染の程度及び感染型の指標としての、感染症を有する個人の体液試料中における細菌細胞の濃度の検出又はモニタ。この適用において、細胞は、1つ又は複数の特定の細菌細胞壁抗原と特異的に結合可能な表面結合性の結合剤を有する粒子と反応させ、及び対象とする1つ又は複数の閾値捕集領域に対応する1つ又は複数の標線は、血液試料中の検出可能な細菌細胞濃度を指示する。

【0082】

前述から、本発明の様々な目的及び特徴がどのように達成されるかが分かる。アッセイ及び装置の原理は、特定のマイクロ毛細管又ははしご型細胞捕集装置において、粒子の結合した細胞を選択的に移動させることに基づく。この装置は、特に粒子容積に応じて調整されたとき、細胞の堆積高さ又は充填された捕集領域の数が細胞計数值に対応するように基準が定められる。この方法は装置表面を抗体で被覆する必要がなく、追加的な染色工程又は読取り機器は一切なしに、肉眼によって読み取りを実現することができる。従って、この方法は、血球計における細胞計数の正確性と、明確で単純な読取り機なしの読み取りの簡便性とを併せもつ。その単純性から、この方法は理想的には、一部の発展途上国における苛酷な環境条件に適し得る。

【0083】

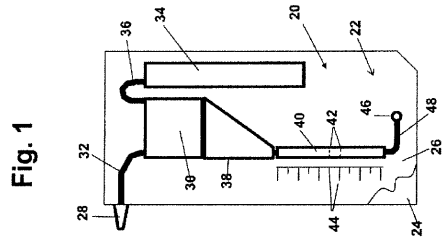
本発明は特定の実施形態及び例に関して記載されているが、本発明の趣旨から逸脱することなく様々な変更及び修正が加えられ得ることは理解されるであろう。

10

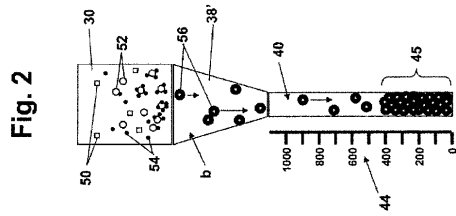
20

30

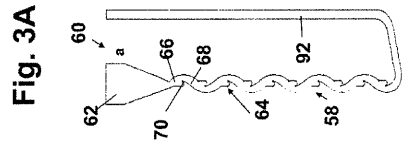
【 図 1 】



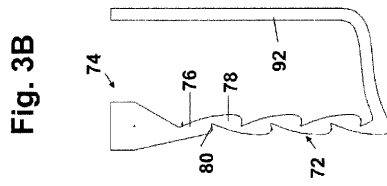
【 図 2 】



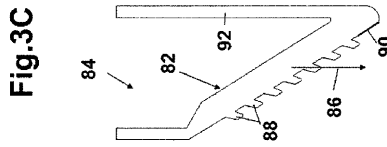
【 図 3 A 】



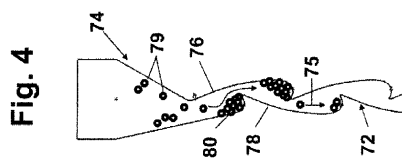
【 図 3 B 】



【 図 3 C 】

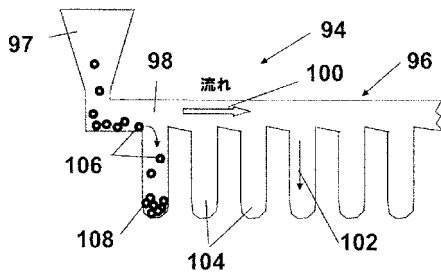


【 図 4 】



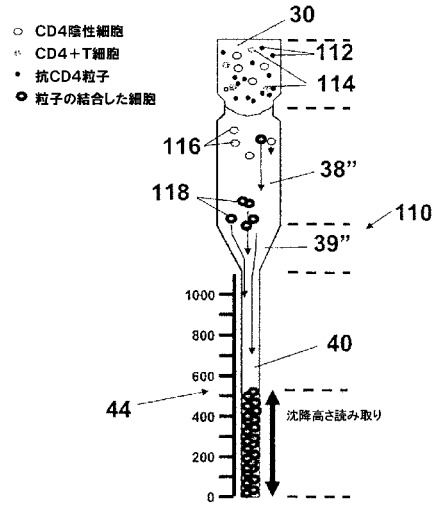
【 図 5 】

図 5

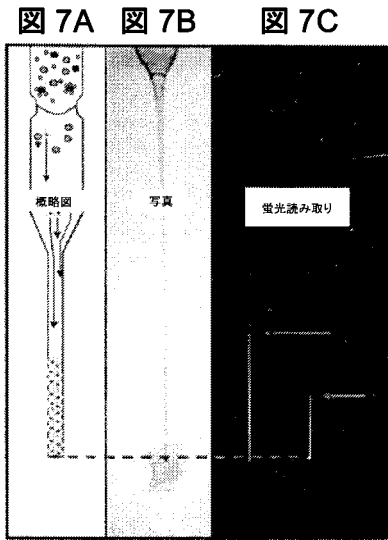


【 図 6 】

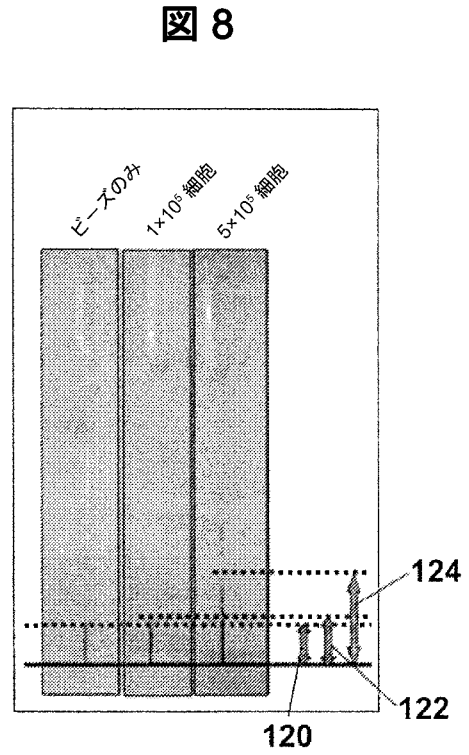
図 6



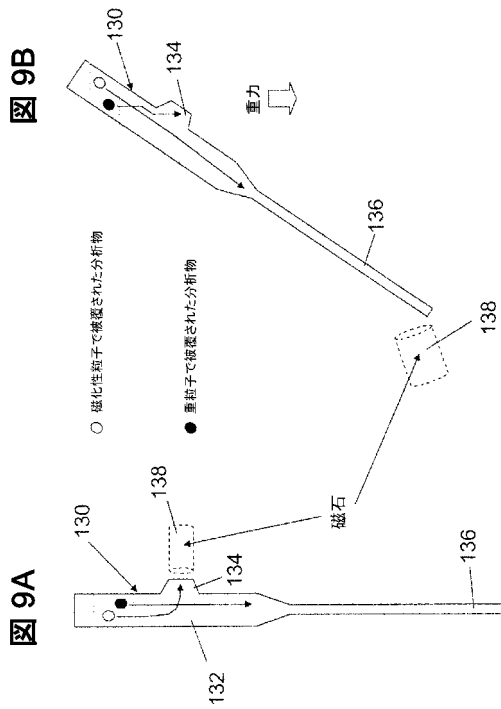
【 図 7 】



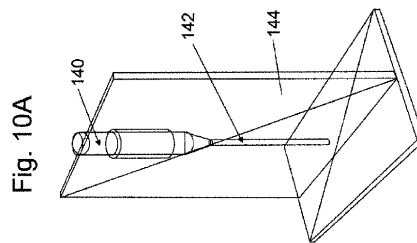
【 図 8 】



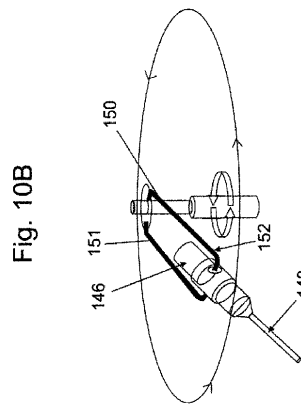
【 図 9 】



【 図 10 A 】

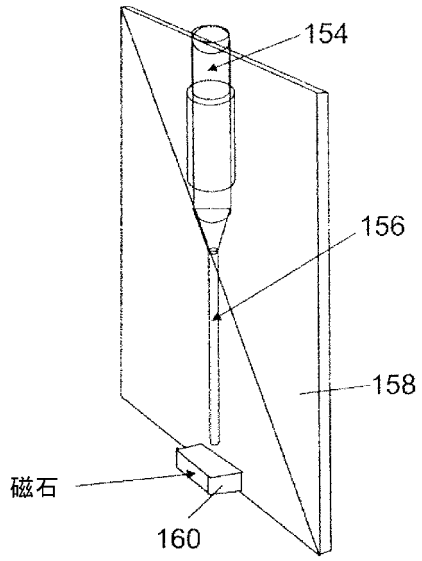


【 図 10 B 】



【 図 10 C 】

図 10C



## フロントページの続き

- (72)発明者 トバイアス, レネイ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 2 6 8 8, カストロ パレー, グローブ ウェイ 2 6 8  
8
- (72)発明者 ケルネン, ピーター  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 0 6 5, レッドウッド シティ, ポートウォーク ブ  
レイス 7 0 7
- (72)発明者 ルイス - テイラ, ローレンス  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 0 0 2, ベルモント, リンカーン アベニュー 2 5 1  
8
- (72)発明者 ワーグナー, ピーター  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 0 2 5, メンロ パーク, クラウド アベニュー 1 1  
3 0
- (72)発明者 マクマナス - ムノス, シルビア  
アメリカ合衆国, カリフォルニア州 9 4 5 4 6, カストロ パリー, レイクリッジ ロード 1  
9 2 2 4

審査官 三木 隆

- (56)参考文献 米国特許第0 5 6 4 6 0 0 4 ( U S , A )  
米国特許第0 6 2 8 0 6 2 2 ( U S , B 1 )  
特表平0 8 - 5 1 1 3 4 0 ( J P , A )  
特表平0 8 - 5 0 1 3 9 0 ( J P , A )  
特表2 0 0 7 - 5 1 9 9 3 8 ( J P , A )

## (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 3 3 / 5 3  
G 0 1 N 3 3 / 5 4 3  
G 0 1 N 3 3 / 5 5 3

专利名称(译)	细胞分析试剂盒和方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP5349490B2</a>	公开(公告)日	2013-11-20
申请号	JP2010537127	申请日	2008-12-05
申请(专利权)人(译)	Zaio混合公司		
当前申请(专利权)人(译)	Zaio混合公司		
[标]发明人	ザウッグフランク トバイアスレネイ ケルネンピーター ルイスティラローレンス ワーグナーピーター マクマナスムノスシルビア		
发明人	ザウッグ,フランク トバイアス,レネイ ケルネン,ピーター ルイス-ティラ,ローレンス ワーグナー,ピーター マクマナス-ムノス,シルビア		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/553 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/491 G01N33/538 G01N33/54313 G01N33/54326 G01N33/56972 Y10T436/13 Y10T436/25125 Y10T436/25375		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.T G01N33/553 G01N33/543.541.A G01N33/543.515.F		
审查员(译)	三木隆		
优先权	60/992624 2007-12-05 US		
其他公开文献	JP2011506935A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了用于测定细胞样品中存在至少阈值数量的给定类型细胞的方法和试剂盒。该试剂盒包括具有用于接收细胞样品的样品室的测定装置和包含选定密度和/或粘度介质并且沿其长度具有多个细胞收集区域的细长收集室，以及能够接收细胞样品的颗粒。特异性附着于所选细胞类型的细胞，并且当附着于细胞时，它们是有效的，以增加细胞的密度或磁化率。在操作中，细胞样品中的颗粒结合细胞和颗粒在重力或选定的离心或磁场力的作用下被拉过细长的收集室，直到颗粒结合的细胞和颗粒完全填充连续的细胞收集区域。收集室。与至少一个收集区域相关联的标记指示有效至少部分填充该收集区域的所选类型的细胞浓度。

細胞型	CDマーカー
幹細胞	CD34+, CD31-
全ての白血球グループ	CD45+
顆粒球	CD45+, CD15+
単球	CD45+, CD14+
Tリンパ球	CD45+, CD3+
Tヘルパー細胞	CD45+, CD3+, CD4+
細胞傷害性T細胞	CD45+, CD3+, CD8+
Bリンパ球	CD45+, CD19+又は CD45+, CD20+
血小板	CD45+, CD61+
ナチュラルキラー細胞	CD16+, CD56+, CD3-