

(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2005-518553

(P2005-518553A)

(43) 公表日 平成17年6月23日(2005.6.23)

(51) Int. Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 G O 5 4
C 1 2 Q 1/06	C 1 2 Q 1/06	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	
C 1 2 Q 1/70	C 1 2 Q 1/70	
GO 1 N 21/76	GO 1 N 21/76	
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 119 頁) 最終頁に続く	

(21) 出願番号	特願2003-572353 (P2003-572353)	(71) 出願人	501486165
(86) (22) 出願日	平成14年9月6日 (2002.9.6)		ジェノミック プロファイリング システムズ インコーポレイティッド
(85) 翻訳文提出日	平成16年4月30日 (2004.4.30)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ベッドフォード ワン オーク パーク ドライブ フロアー 2
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/028434	(74) 代理人	100102978
(87) 国際公開番号	W02003/073817		弁理士 清水 初志
(87) 国際公開日	平成15年9月12日 (2003.9.12)	(74) 代理人	100108774
(31) 優先権主張番号	60/317, 658		弁理士 橋本 一憲
(32) 優先日	平成13年9月6日 (2001.9.6)	(74) 代理人	100128048
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 新見 浩一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞およびウイルスの迅速かつ高感度な検出方法

(57) 【要約】

本発明は、医学的試料、工業的試料、および環境試料中の細胞標的およびウイルス標的を迅速かつ高感度に同定するための効率的な方法を提供する。本発明は標的を標識し、次いで、広域画像処理を使用してそれらを検出する。本発明に基づく診断試験は迅速で、超高感度で、定量的で、多重化され、かつ自動化され得る。この試験は、試料の調製を最小限とし、核酸増幅または細胞培養は必要としない。広範囲の細胞およびウイルスがこの試験によって検出され得る。本発明に基づく試験により、核酸増幅試験の高レベルの感度、使い勝手のよさ、およびイムノアッセイの速度、ならびに微生物学的試験によって提供される費用対効果および定量性が実現され得る。本発明は、診断レポーターにおける格差に取り組みながら、現在の診断技術における最良の属性を具体化する。

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料中の標的細胞またはウイルスを検出するための方法であって、該標的は、

- a. 少なくとも2つの直行する次元において50ミクロン未満を測定し、かつ
- b. 密度が mm^2 あたり標的細胞100個未満の検出領域を含む検出ゾーンに無作為に分散しており、

該方法は、

- a. 該標的細胞に照射して検出可能なシグナルを生成する工程、および
 - b. 該検出領域の区画における該シグナルを同時に検出する工程であって、該区画の最も長い直線寸法は、20倍以下の倍率を使用して1mmより長い、工程、
- を含む、方法。

10

【請求項2】

工程(a)の前に、標的のカテゴリ-特異的結合部位にカテゴリ-結合分子を特異的に結合させる条件下で、該標的を該カテゴリ-結合分子と接触させ、複合体を形成する、請求項1記載の方法。

【請求項3】

カテゴリ-結合分子が、1つまたはそれ以上のシグナリング部分で直接的または間接的のいずれかにより標識される、請求項2記載の方法。

【請求項4】

検出工程が複合体を検出する、請求項3記載の方法。

20

【請求項5】

標的細胞と直接的または間接的のいずれかにより結合するシグナリング部分に試料を接触させる、請求項1記載の方法。

【請求項6】

複合体が、検出領域 mm^2 あたり10複合体未満の密度で検出ゾーン中に無作為に分散される、請求項2記載の方法。

【請求項7】

標的が、検出領域 mm^2 あたり1複合体未満の密度で検出ゾーン中に無作為に分散される、請求項1記載の方法。

【請求項8】

検出が5倍より大きい倍率を必要としない、請求項1記載の方法。

30

【請求項9】

検出が2倍より大きい倍率を必要としない、請求項8記載の方法。

【請求項10】

検出が1倍より大きい倍率を必要としない、請求項9記載の方法。

【請求項11】

検出が0.2倍より大きい倍率を必要としない、請求項10記載の方法。

【請求項12】

標的が細菌細胞または真核生物細胞である、請求項1記載の方法。

【請求項13】

標的がウイルスである、請求項1記載の方法。

40

【請求項14】

カテゴリ-複雑性が存在する、請求項1記載の方法。

【請求項15】

標的が存在する、請求項14記載の方法。

【請求項16】

標的細胞が、分類学的群：ウイルス、細菌、真菌、植物、多細胞動物、および原生生物のうちの2つまたはそれ以上に由来する細胞を含む、請求項1記載の方法。

【請求項17】

検出工程が、標的に関する非重複カテゴリ-の1つより多くを検出および同定する、請

50

求項1記載の方法。

【請求項18】

カテゴリー結合分子が、天然または組換えの抗体またはアプタマーに特異的に結合する、請求項2記載の方法。

【請求項19】

カテゴリー結合分子が、DNA、RNA、またはPNAのプロープに特異的に結合する、請求項2記載の方法。

【請求項20】

カテゴリー結合分子が、一塩基多型を含む核酸多型に直接隣接する部位に特異的に結合する、請求項2記載の方法。

10

【請求項21】

試料が、多細胞生物から得られた液体または組織を含む、請求項1記載の方法。

【請求項22】

試料が動物の体液または組織を含む、請求項21記載の方法。

【請求項23】

試料がヒト由来である、請求項22記載の方法。

【請求項24】

試料が非ヒト脊椎動物由来である、請求項22記載の方法。

【請求項25】

試料が、呼吸器、尿生殖器、生殖器、中枢神経系、尿、血液、真皮、血漿、血清、唾液、創傷組織、滲出液、生検、糞便、および固体組織の試料、からなる群のメンバーであるか、またはそれらのメンバーに由来する、請求項22記載の方法。

20

【請求項26】

試料が植物に由来する、請求項1記載の方法。

【請求項27】

試料が環境の大気もしくは水、または、環境に曝されている表面、物体、もしくは生物を採取することによって得られる、請求項1記載の方法。

【請求項28】

試料が、ヒトまたは動物における局所または体内での使用のための、医薬、化粧品、血液、または他の製品の製造における生の材料、完成した材料、または製造過程中的材料；食品または飲料の製造における生の材料、製造過程中的材料、または完成した材料；医療装置またはインビトロ診断装置の製造における生の材料、製造過程中的材料、または完成した材料；化学製品；工業的表面；器具類；および機械類からなる群より選択されるか、それらに由来するか、またはそれらから得られる、請求項1記載の方法。

30

【請求項29】

方法が、標的細胞に対して1つまたはそれ以上の物質または処理の効果を検出する、請求項1記載の方法。

【請求項30】

選択方法が、検出表面上に標的を沈着させるために用いられ、かつ該選択方法が磁気選択、遠心分離、沈殿、および濾過からなる群より選択される、請求項1記載の方法。

40

【請求項31】

方法が、カテゴリー結合分子に結合体化された磁気粒子と試料とを接触させる工程を含む、請求項30記載の方法。

【請求項32】

選択部分を使用することなく選択方法の1つを用いて、標的を検出ゾーンに沈着させる、請求項30記載の方法。

【請求項33】

標的を、液体中で、該液体の平均密度よりも大きい平均密度を有する標的特異的選択部分と接触させ、重力、遠心力、または求心力を用いて検出表面上に実質的に沈着させる、請求項30記載の方法。

50

- 【請求項34】
試料を液化および/または均質化するために該試料を処理する、請求項1記載の方法。
- 【請求項35】
接触を液相中で行う、請求項1記載の方法。
- 【請求項36】
接触を、液相と固相との間の界面で行う、請求項1記載の方法。
- 【請求項37】
標的以外の物質または物体を除去するために試料を処理する、請求項1記載の方法。
- 【請求項38】
接触工程の前に、標的が検出表面上に固定化される、請求項2記載の方法。 10
- 【請求項39】
標的が、検出ゾーンのマトリックスまたは部材に結合しているカテゴリー結合分子によって検出ゾーン中に特異的に結合している、請求項1記載の方法。
- 【請求項40】
標的が、検出ゾーンのマトリックスまたは部材への化学結合の形成によって検出ゾーン中に特異的に結合している、請求項1記載の方法。
- 【請求項41】
標的が、風乾、熱固定、および化学固定からなる群より選択されるプロセスによって検出ゾーン中に固定化される、請求項1記載の方法。
- 【請求項42】 20
標的上のカテゴリー特異的結合部位がカテゴリー結合分子による接触に対して接近可能となるように、試料が処理される、請求項2記載の方法。
- 【請求項43】
結合していないシグナリング分子が、検出工程の前に複合体から除去される、請求項3記載の方法。
- 【請求項44】
シグナリング部分が光子性シグナリング特性を有し、かつコロイド性または可溶性物質が、検出ゾーンにないシグナリング部分により放射されるシグナルを吸収するために付加される、請求項3記載の方法。
- 【請求項45】 30
試料が、標的に関する異なる非重複カテゴリーの存在について並行して試験するための個々のアリコートに再分割される、請求項1記載の方法。
- 【請求項46】
アリコートの各々を、カテゴリー結合分子に関する異なる非重複ファミリーに結合体化された標識粒子の集団と接触させる、請求項45記載の方法。
- 【請求項47】
試料を、標的実体の非重複カテゴリーに特異的に結合するカテゴリー結合分子の別個のファミリーと連続的に接触させる、請求項45記載の方法。
- 【請求項48】 40
検出ゾーンが、固体ガラス、固体プラスチック、マイクロタイタープレートのウェルの表面、吸水性メンブレン、プラスチックストリップ、キャピラリー管の表面、微小流体チャンバーの表面、および微小流体チャンネルの表面からなる群より選択される物質を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項49】
方法がラテラルフロークロマトグラフィーを含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項50】
方法が一連の試料で自動的に反復される、請求項1記載の方法。
- 【請求項51】
試料が、検出のための手段を備える機器に自動的にロードされる、請求項50記載の方法。

【請求項52】

検出のための手段を備える機器に物理的に結合しておりそして機器へと自動的かつ連続的にロードされる一連の検出ゾーンに、試料を自動的に沈着させる、請求項50記載の方法。

【請求項53】

方法が、複合体の照射の結果として、放射光、散乱光、反射光、または吸収光を検出する、請求項3記載の方法。

【請求項54】

検出工程が蛍光を検出する、請求項1記載の方法。

【請求項55】

検出工程が非発光性の化学発光を検出する、請求項1記載の方法。

10

【請求項56】

照射のための手段が1つまたはそれ以上のレーザーを含む、請求項1記載の方法。

【請求項57】

照射のための手段が1つまたはそれ以上の発光ダイオードを含む、請求項1記載の方法。

【請求項58】

照射のための手段が白色光の光源を含む、請求項1記載の方法。

【請求項59】

照射のための手段が、複合体の検出に適切な波長の光による試料の照射用に適合させた1つまたはそれ以上の光学フィルターを含む、請求項1記載の方法。

20

【請求項60】

照射のための手段が、シグナリング部分の検出に適切な波長の光による試料の照射用に適合させた1つまたはそれ以上の光学フィルターを含む、請求項3記載の方法。

【請求項61】

放射光、散乱光、透過光、または吸収光を検出するための手段が、シグナリング部分の照射に由来するシグナルの検出用に適合させた光学フィルターを含む、請求項3記載の方法。

【請求項62】

検出工程が熱放射を検出する、請求項1記載の方法。

【請求項63】

検出工程が光吸収を検出する、請求項1記載の方法。

30

【請求項64】

光吸収が赤外領域にある、請求項63記載の方法。

【請求項65】

検出工程が蛍光を検出する、請求項1記載の方法。

【請求項66】

検出工程が細胞の自己蛍光を検出する、請求項1記載の方法。

【請求項67】

検出工程が蛍光偏光を検出する、請求項1記載の方法。

【請求項68】

検出工程が光の反射を検出する、請求項1記載の方法。

40

【請求項69】

検出工程が光散乱を検出する、請求項1記載の方法。

【請求項70】

検出工程がラマン散乱を検出する、請求項1記載の方法。

【請求項71】

カテゴリー結合分子が直接的または間接的に標識粒子に結合体化される、請求項2記載の方法。

【請求項72】

標識粒子が20ミクロン未満のサイズである、請求項71記載の方法。

50

- 【請求項 7 3】
標識粒子が10ミクロン未満のサイズである、請求項71記載の方法。
- 【請求項 7 4】
標識粒子が5ミクロン未満のサイズである、請求項73記載の方法。
- 【請求項 7 5】
標識粒子が1ミクロン未満のサイズである、請求項74記載の方法。
- 【請求項 7 6】
標識粒子が100nm未満のサイズである、請求項75記載の方法。
- 【請求項 7 7】
標識粒子が10nm未満のサイズである、請求項76記載の方法。 10
- 【請求項 7 8】
標識粒子が、立方ミクロンの粒子体積あたり酵素シグナリング部分2つ以上の平均密度で酵素シグナリング部分を含む、請求項71記載の方法。
- 【請求項 7 9】
蛍光シグナル特性を有し、かつ有機蛍光団、アップレギュレートされた蛍光体、ランタニド、量子ドット、および非蛍光部材から蛍光生成物を生成する酵素、からなる群より選択されるシグナリング部分で着色されたか、または結合体化された粒子であるシグナリング部分を、標識粒子を含む、請求項71記載の方法。
- 【請求項 8 0】
標識粒子がラテックス粒子、シリカ粒子、量子ドット、共鳴光散乱粒子、アップコンバートされた蛍光体であるか、または主に金もしくは銀からなる粒子である、請求項71記載の方法。 20
- 【請求項 8 1】
シグナリング部分が酵素的シグナリング部分である、請求項3記載の方法。
- 【請求項 8 2】
シグナリング部分がアルカリホスファターゼ酵素または西洋ワサビペルオキシダーゼ酵素である、請求項81記載の方法。
- 【請求項 8 3】
シグナリング部分が、有機蛍光団、アップレギュレートされた蛍光体、ランタニド、量子ドット、および非蛍光部材から蛍光生成物を生成する酵素、からなる群より選択される、請求項3記載の方法。 30
- 【請求項 8 4】
シグナリング部分が蛍光シグナリング特性を有する、請求項3記載の方法。
- 【請求項 8 5】
シグナリング部分が化学発光シグナリング特性を有する、請求項3記載の方法。
- 【請求項 8 6】
分子がアクリジニウムエステルである、請求項85記載の方法。
- 【請求項 8 7】
シグナリング部分が色素原性シグナリング特性を有する、請求項3記載の方法。
- 【請求項 8 8】
シグナリング部分が光散乱シグナリング特性を有する、請求項3記載の方法。 40
- 【請求項 8 9】
カテゴリー結合分子が抗体を含む、請求項2記載の方法。
- 【請求項 9 0】
カテゴリー結合分子がアプタマーを含む、請求項2記載の方法。
- 【請求項 9 1】
カテゴリー結合分子が核酸またはペプチド核酸を含む、請求項2記載の方法。
- 【請求項 9 2】
カテゴリー結合分子がリガンドを含む、請求項2記載の方法。
- 【請求項 9 3】 50

カテゴリー結合分子が、100kD未満の分子量を有する分子を含む、請求項2記載の方法。

【請求項94】

カテゴリー結合分子が、10kD未満の分子量を有する分子を含む、請求項93記載の方法。

【請求項95】

カテゴリー結合分子が、1kD未満の分子量を有する分子を含む、請求項94記載の方法。

【請求項96】

試料をカテゴリー結合分子の集合に接触させる方法であって、該集合は、検出される標的実体の各非重複カテゴリーに特異的なカテゴリー結合分子の1つのファミリーを含む、請求項2記載の方法。

【請求項97】

カテゴリー結合分子のファミリーのすべてが、同じシグナル特性およびシグナルクラス
のシグナルを放出するシグナリング部分で標識される、請求項96記載の方法。

【請求項98】

カテゴリー結合分子のファミリーの各々が、別個のシグナルクラスのシグナルを放出する
シグナリング部分で標識される、請求項96記載の方法。

【請求項99】

カテゴリー結合分子の集合が、ファミリー複雑性1を有する、請求項96記載の方法。

【請求項100】

カテゴリー結合分子の集合が、1より大きいファミリー複雑性を有する、請求項96記載
の方法。

【請求項101】

集合が、5以上のファミリー複雑性を有する、請求項100記載の方法。

【請求項102】

集合が、10以上のファミリー複雑性を有する、請求項101記載の方法。

【請求項103】

集合が、20以上のファミリー複雑性を有する、請求項102記載の方法。

【請求項104】

集合が、少なくとも10種類の別個のカテゴリー結合分子を含む、請求項96記載の方法。

【請求項105】

集合が、少なくとも50種類の別個のカテゴリー結合分子を含む、請求項104記載の方法

【請求項106】

カテゴリー結合分子の各カテゴリー特異的ファミリーが、少なくとも2つの別個のカテ
ゴリー結合分子を含む、請求項96記載の方法。

【請求項107】

各カテゴリー特異的ファミリーが、少なくとも10個の別個のカテゴリー結合分子を含む
、請求項106記載の方法。

【請求項108】

標的細胞の非重複カテゴリーが、検出領域におけるそれらの異なる局在化によって同定
される、請求項96記載の方法。

【請求項109】

カテゴリー結合分子の各ファミリーが、同じシグナルシグニチャーを有する、請求項96
記載の方法。

【請求項110】

シグナリング部分によりカテゴリー結合分子のカテゴリー特異的ファミリーに与えられ
る別個のシグナルシグニチャーを検出し、それらのシグニチャー間を識別することによっ
て標的細胞の非重複カテゴリーが同定される、請求項96記載の方法。

【請求項111】

標識粒子が異なる集団を含み、各集団は、カテゴリー結合分子に関する異なる非重複フ
ァミリーに結合体化されている、請求項1記載の方法。

10

20

30

40

50

- 【請求項 1 1 2】
ファミリーの各々が、検出ゾーンの部分に安定に結合しているカテゴリー結合分子のファミリーにも特異的に結合する標的のカテゴリーに特異的に結合し、ここで、検出ゾーンに結合している該ファミリーの各々は別個の部位に結合しており、該部位は検出工程によって区別され得る、請求項96記載の方法。
- 【請求項 1 1 3】
ファミリーの各々が、同じシグナリングのクラスおよびシグニチャーを有する、請求項96記載の方法。
- 【請求項 1 1 4】
集団の各々が、別個のシグナリングのシグニチャーおよびクラスを有する、請求項96記載の方法。 10
- 【請求項 1 1 5】
方法が、カテゴリー結合分子ファミリーのシグナルシグニチャー間を識別するために適合させた光学フィルターを含む、請求項96記載の方法。
- 【請求項 1 1 6】
カテゴリー結合分子のファミリーが、1より大きいファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。
- 【請求項 1 1 7】
カテゴリー結合分子のファミリーが、5以上のファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。 20
- 【請求項 1 1 8】
カテゴリー結合分子のファミリーが、10以上のファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。
- 【請求項 1 1 9】
カテゴリー結合分子のファミリーが、20以上のファミリー複雑性を有する、請求項96記載の方法。
- 【請求項 1 2 0】
検出工程が、試料を自動的に追跡するためのバーコードまたはそれに相当する標識がある容器中で行われる、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 2 1】
検出工程が、同じ表面の複数の画像の整列を容易にするための位置決めマークを有する表面上で行なわれる、請求項1記載の方法。 30
- 【請求項 1 2 2】
方法が、検出ゾーンの特定の領域中の対照マークまたは対照細胞を検出する、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 2 3】
放射光、散乱光、透過光、または吸収光を検出するための手段が、複合体の発光に由来するシグナルの検出用に適合させた光学フィルターを含む、請求項53記載の方法。
- 【請求項 1 2 4】
検出工程が光電検出器の使用を含む、請求項1記載の方法。 40
- 【請求項 1 2 5】
検出工程が光電アレイ検出器の使用を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 2 6】
光電検出器がCCD検出器またはCMOS検出器を含む、請求項125記載の方法。
- 【請求項 1 2 7】
放射光、散乱光、または吸収光を検出するための手段が画像増感装置を含まない、請求項53記載の方法。
- 【請求項 1 2 8】
検出工程が光電子増倍管検出器の使用を含む、請求項1記載の方法。
- 【請求項 1 2 9】
 50

検出工程が光ダイオード検出器の使用を含む、請求項1記載の方法。

【請求項130】

標的を検出および同定するための手段が感光性フィルムを含む、請求項1記載の方法。

【請求項131】

検出工程が直接視覚的検出を含む、請求項1記載の方法。

【請求項132】

検出工程によって得られた画像を分析することによって、該検出工程から標的の数を推測する、請求項1記載の方法。

【請求項133】

画像分析ソフトウェアを使用して、検出工程から標的のカテゴリーを推定する、請求項1記載の方法。 10

【請求項134】

画像分析ソフトウェアが、他のシグナルから複合体によって生成されたシグナルを識別するための機能をさらに含む、請求項133記載の方法。

【請求項135】

試料中の標的細胞を検出するための方法であって、該標的細胞は、

- a. 少なくとも2つの直行する次元において50ミクロン未満を測定し、かつ
- b. 密度が mm^2 あたり標的細胞100個未満の実質的に平面の検出領域に無作為に分散しており、
- c. 該方法は、照射されていない検出領域の区画における標的実体を同時に検出するために画像増感装置を含まない光電検出器を使用する工程を含み、該区画の最も長い直線寸法は1mmより長い、 20
方法。

【請求項136】

試料中の標的細胞を検出するための方法であって、該標的細胞は、

- a. 少なくとも2つの直行する次元において50ミクロン未満を測定し、かつ
- b. 密度が mm^2 あたり標的細胞100個未満の検出領域を含む実質的に平面の検出表面に無作為に分散しており、
- c. 該方法は、該検出領域の区画における該標的細胞を同時に検出し、該区画の最も長い直線寸法は1mmよりも長く、そして該検出は、 30
 - i. 光検出器を使用する工程、または
 - ii. 該検出領域を照射する工程
 - iii. 細胞もしくはウイルスの培養工程
 を含まない、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の背景

本発明は、医学的、工業的、または環境的試料における細胞およびウイルスの同定に関する。 40

【0002】

概要

低レベルの特定の細胞およびウイルスを検出、計数、および同定することは、慣用的な医学的、工業的、および環境的な診断の基礎である。例えば、試料は、感染性の因子、癌細胞、食品病原体、薬品および化粧品の製品の微生物夾雑物、ならびに水および環境中の微生物を検出するために分析される。

【0003】

単純に言えば、以下の議論は慣用的な医学的診断に焦点を当てており；同様の方法が工業的および環境的な適用についても使用される。

【背景技術】

【0004】

微生物学的方法

微生物培養は、大量に迅速に増殖するそれらの性向を利用することによって、微生物（例えば、細菌、ウイルス、および真菌）の単純な視覚的検出を可能にする。例えば、栄養ブロス中に置いた場合、個々の細菌細胞（眼で見るとははるかに小さすぎる（約100万分の1メートル））個々の細菌細胞は、そのブロスを24時間未満で見た目に混濁させ得る。

【0005】

関連する微生物培養技術（微生物計数またはコロニー計数と呼ばれる）は、試料中の微生物細胞の数を定量する。インサイチューの微生物の複製に基づくこの微生物計数法は、一般的に、試料中の各々の微生物細胞について1つの視覚的に検出可能な「コロニー」を産生する。従って、目に見えるコロニーを計数することにより、微生物学者が試料中の微生物細胞の数を正確に決定することが可能となる。微生物の計数を実行するために、細菌細胞をペトリ皿中の栄養寒天（「寒天プレート」）の表面に播き、そしてインサイチューで細菌を複製させる条件下でインキュベートしてもよい。個々の視覚的に検出できない微生物は繰り返し複製して、始祖の微生物細胞が沈着した物理的な部位で、大量の娘の微生物を生成する。この娘の細胞はもともとの細胞とともに同時に局在化しているので（本質的に接触している）、その結果、娘細胞のコホート（1000万個または1億個の細胞にまで増殖し得る）は、最終的にはプレート上で目に見えるコロニーを形成する。

【0006】

微生物培養は、1世紀以上経っていても医学的微生物学および工業的微生物学における品質管理試験（例えば、製薬、食品、および飲料の製造）においてなお大半を占める方法であるという事実から証明されるように、著しく首尾よい方法である。この方法は安価であり、比較的単純で、かつ非常に感度が高い。微生物培養の感度は、牛挽き肉中の食物に起因する病原体についての一般的な試験において見ることができる。個々の顕微鏡的な細菌病原体細胞は、微生物培養を使用して、牛挽き肉25グラム中で検出され得る。微生物培養の別の利点は、医学的および工業的に重要性がある広い範囲の微生物を検出するその能力である。

【0007】

いくつかのウイルスは培養で増殖され得る。ウイルス培養は、研究の応用において、迅速に増殖するバクテリオファージ（細菌に感染するウイルス）について特に有用であった。核酸増幅のような方法が代わりに増加しているが、ウイルス培養は、時折、臨床的感染を診断するために使用される。

【0008】

慣習的な微生物培養は遅い。視覚的な検出のために必要とされる細胞またはウイルスの数を生成するために時間がかかる。微生物培養のために必要とされる増殖期間が長期であることは、医療および産業の両方において著しい問題である。例えば、患者の血液の感染を引き起こす微生物を培養および同定するには何日も要するため、真菌の血液感染を有する患者は、抗真菌治療が開始される前に死ぬ可能性がある。いくつかの感染性の因子（例えば、結核を引き起こす細菌）は、一般的に、培養で増殖するのに数週間を要する。M.ツベルクローシス（M.ツベルクローシス）を検出するために必要とされる期間が長いことで、結核を有する患者が、この伝染性の高い疾患を多くの他のヒトに感染させたり、または結核を有しない患者の隔離に費用がかかる。食品の製造においては、長時間の試験サイクルにより食品の変質が増加し得る。遅い微生物培養はまた、生物薬剤およびワクチンの製造にも有害な影響を与える。

【0009】

より迅速な微生物計数のための多数の微生物培養方法が開発されてきた。1つの迅速方法は、栄養培地でコートした顕微鏡スライド上に細菌細胞を沈着させる。顕微鏡試験を使用することで、微生物増殖が肉眼よりもはるかにより早期に検出され得る。なぜなら、顕微鏡は、少数の細胞分裂から生じる微小なコロニーを検出し得るからである。市販のシステムである、コリファースト迅速マイクロコロニーカウンター（Colifast Rapid Microco

10

20

30

40

50

lony Counter) (Colifast) は、目で観察され得る何時間も前に、蛍光標識された小さな大腸菌のコロニーを検出し得る。コロファーストシステムは、栄養寒天培地中に含まれる蛍光発生性の化合物（大腸菌によって代謝されるまでは蛍光性でない基質）を使用することによって検出の増強を達成する。生物発光標識を使用した微生物コロニーの迅速計数のためのシステムが最近市販されている。マイクロスター（MicroStar）システム（Millipore）は、適用するルシフェラーゼ酵素および基質の作用を介して光を生成するために微小なコロニー中の細胞ATPを使用する。この方法は、検出の時間を実質的に減少させる。マイクロスター画像化システムもまた、特定の細菌を同定するために標識されたプローブとともに使用されてきた（Stender, H.ら（2001）J. Microbiol Methods 46: 69-75）。

【0010】

10

免疫学的方法

免疫学的試験、すなわちイムノアッセイ法は、医学的診断において特定の細胞およびウイルスを同定するために頻繁に使用される。イムノアッセイ法は、標的およびウイルスの分子的成分上の部位に対する抗体の特異的結合を検出し得る。血清学的な試験は、抗原についての直接的な試験よりはむしろ、抗原に対し以前の曝露にตอบสนองする宿主の免疫学的応答について試験する免疫学的アッセイ法である。例えば、これらは、特定の細胞およびウイルスに対する宿主の抗体の存在について試験し得る。多数のイムノアッセイシステムは、大規模な自動化された中央検査室システムから、店頭で入手可能な妊娠検査薬に至るまでの範囲において利用可能である。この試験は、凝集アッセイ、沈降アッセイ、酵素結合免疫アッセイ、直接蛍光アッセイ法、免疫組織学的試験、補体結合アッセイ法、血清学的試験、免疫電気泳動的アッセイ法、および迅速「ストリップ」試験（例えば、ラテラルフロー試験およびフロースルー試験）を含む、広範囲の形式を網羅している。免疫学的試験は、極度に単純かつ迅速であり得る。従って、医院で、または患者が家で行い得る最も有望される試験の多くは、免疫学的試験である。

20

【0011】

遺伝子による方法

遺伝子による方法は、細胞およびウイルスからの核酸分子を検出および同定するための一般的かつ強力な手段である。核酸増幅に基づいて細胞およびウイルスの核酸含量を超高感度で検出および区別するための革命的な新規な方法が最近開発された。例えば、市販されている試験は、顕微鏡下での少数のHIVウイルス粒子（例えば、50粒子/ml）からの核酸を検出し得る。増幅技術には、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）、リガーゼ連鎖反応（LCR）、核酸配列に基づく増幅（NASBA）、転写媒介増幅（TMA）、およびローリングサークル増幅（RCA）が含まれる。増幅方法は、印象的な分析感度を与え、かつ、適度に迅速であり得る。例えば、スマートサイクラー（Smart Cycler）（Cepheid）は、1時間以内に結果が得られ得る（Belanger, S.D.ら（2002）Journal of Clinical Microbiology 40: 1436-40）。

30

【0012】

顕微鏡的画像処理方法

顕微鏡的画像処理は細胞およびウイルスを検出するための最も一般的な方法の一つである。標的は、例えば、染料、抗体、または核酸プローブを用いた標識によって顕微鏡的に可視化され得る。顕微鏡分析の感度は、触媒レポーター沈着（CARD）（これは、ヒト細胞中の単一コピーレベルのウイルスゲノムを検出するために使用されてきた（Huang, C.C.ら、Modern Pathology 11: 971-7, 1998））のような方法を用いて増強され得る。インサイチューハイブリダイゼーションの感度を増加させるための他の方法は、例えば、分枝DNAまたはデンドリマー技術（例えば、Orentas, R.J.ら、Journal of Virological Methods 77: 153-63, 1999）を使用するインサイチュー増幅もしくは複製、またはシグナル増幅に依存する。

40

【0013】

複数の蛍光標識が、インサイチュー分析を使用して一度に数種類の病原体を検出するために使用され得る。例えば、異なるカテゴリー特異的抗原に対する抗体は、異なる蛍光タ

50

グで標識され得る。コンビナトリアル標識ストラテジーもまた、いくつかの細菌病原体を同時に同定するために顕微鏡とともに使用されてきた (Amann, R.ら、Journal of Bacteriology 178: 3496-500, 1996; 米国特許第6,007,994号)。

【0014】

顕微鏡的標的のハイスループットインサイチュー顕微鏡的分析を達成するいくつかの市販のシステムが開発されてきた (例えば、国際公開公報第98/22618号および同第93/21511号)。代表的には、微生物または細胞はスライドまたはマルチウェルプレートのウェルの底に沈着される。次いで、ウェル中の標識された標的は顕微鏡的に画像処理される。

【0015】

非顕微鏡的画像処理方法

非顕微鏡的画像処理方法によって、より広い領域が細胞の存在について調査され得る。例えば、ハマツコーポレーション (Hamamatsu Corporation) の研究者は、拡大なしで個々の細菌細胞を画像化し得るシステムを開発した (Masuko, M.ら、FEMS Microbiol Lett 67: 231-8, 1991; Masuko, M.ら、FEMS Microbiol Lett 65: 287-90, 1991; Yasui, T.ら、Appl. Environ Microbiol 63: 4528-33, 1997)。このシステムは、光ファイバシステム、画像増感装置、および画像処理装置に連結された、超高感度光子計数CCDカメラを使用する。ELISAスポット試験法は、特定の抗体 (または他の豊富に分泌される産物; Logtenberg, T.ら、Immunol Lett 9: 343-7, 1985) を産生する単一の細胞を計数するための特殊化された技術である。この方法の感度は、多数の標的 (分泌されたタンパク質分子) が分泌細胞の周りに局在化しているという事実由来する。

【0016】

フローサイトメトリー法

フローサイトメトリーは、臨床診断検査室において細胞を特徴付けするための重要な手段である。フローサイトメトリー法は、それらの物理的特性および標識されたプローブ (例えば、染色剤、抗体、または核酸) を結合するそれらの能力に基づいて、特定の細胞型を定量的に検出するために使用される。個々の細胞または粒子は、レーザービームの先に、狭いチャンネルを通過して一度に1つ流されることを強いられる。蛍光照射およびサイズ/形状の情報が、生物/粒子によって引き起こされるスペクトルおよび光散乱を分析することによって収集される。何千もの個々の細胞または粒子が1分間あたりに分析され得る。例えば、フローサイトメトリーは、AIDS患者におけるリンパ球のクラスの集団サイズを定量的に検出するために使用される。タンパク質または核酸のような非細胞分子を検出および同定し得る高度に多重化されたフローサイトメトリー法は、ルミネックス (Luminex) から市販されている (米国特許第5,981,180号)。

【0017】

レーザー走査法

レーザー走査は、表面に沈着された細胞およびウイルスを検出するための強力かつ高感度の方法である。代表的には、顕微鏡的レーザービーム (例えば、直径20 μ m) が、多数の連続的で直線的な流路中の、固体表面に蛍光標識された標的を含む二次元試料にわたって追跡される。これらの流路の各々は前のものよりもわずかに片寄っており、その結果、試料全体の領域が最終的に走査される。蛍光標識された標的細胞がビームの下に落下したとき、放射された蛍光の閃光が、光電子増倍管のような検出装置によって検出される。顕微鏡的標的の数および位置はレーザーマルチビーム走査によって得られ得る。

【0018】

レーザー走査のための多数のシステムが開発されてきた。ScanRDI (登録商標) システム (Chemunex) は、フィルター上で微生物細胞を標識するための非特異的な蛍光色素を使用する (米国特許第5,663,057号; Mignon-Godefroy, K.ら、Cytometry 27: 336-44, 1997)。蛍光定量的微量アッセイ技術 (FMAT; PE Biosystems and Biometric Imaging; Miraglia, S.ら、J Biomol Screen 4: 193-204, 1999) もまた、マイクロタイターウェル中で細胞を検出するために使用されてきた。洗練されたレーザー走査システムは、コンピュータサイトコーポレーション (CompuCyte Corporation) (Kamentsky, L., 2001, 「Laser Sca

10

20

30

40

50

「Flow Cytometry」、*Cytometry*」、Z. Darzynkiewicz, H. CrissmanおよびJ. Robinsn編、*Methods in Cell Biology* 第63巻、A部、第3版、シリーズ編者L. WilsonおよびP. Matsudaira (San Diego: Academic Press))によって開発および販売されている。液体試料（例えば、全血）中で個々の顕微鏡的標的を検出するマイクロビームレーザー走査システムは、イムニコンコーポレーション (Immunicon Corporation) およびトウエンテ (Twente) 大学の共同研究者によって開発された (Tibbe, A.G.ら、*Nat Biotechnol* 17: 1210-3、1999)。

【0019】

生化学的、化学的、および物理的方法

細胞およびウイルス、またはそれらの分子的成分、細胞およびウイルスの分子的成分の高感度検出のための他の技術には、とりわけ、フローサイトメトリー、質量分析法、バイオセンサー、吸収スペクトル分析、蛍光偏光、蛍光変動スペクトル分析、電気泳動、クロマトグラフィー、その他が含まれる。 10

【0020】

バイオセンサー技術はまた、細胞およびウイルスの高感度分析のために期待される。バイオセンサーは、生物学的な事象を転換するための物理的方法、例えば、抗原への抗体の結合の検出可能なシグナルへの転換を使用する。分子検出のために使用される1つの評判のよいバイオセンサーは、表面プラズモン共鳴を使用する (Mullett, W.M.ら (2000) *Methods* 22: 77-91)。サーモバイオスター (Thermo BioStar) の光学的イムノアッセイ法 (Schultze, D.ら (2001) *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 20: 280-3) は、抗体への抗原の結合を検出するための光学的な干渉の原理を使用する。BARCバイオセンサー技術は、単一の磁気微粒子でタグ化された分析物の磁気抵抗検出 (ハードディスク保存のために使用されるように) を使用する (Edelstein, R. L.ら、*Biosens Bioelectron* 14: 805-13, 2000)。 20

【0021】

細胞およびウイルスの検出についてまだ知られていない必要性

低レベルの細胞およびウイルスの慣用的な検出についての多数の異種かつ強力な方法が市販されているが、試験するレパートリーにはなお格差が存在する。特に、非常に低レベルの細胞およびウイルスを検出するための、迅速であり、実験室中で増殖させる必要がなく、使い勝手がよく、そして費用効果の高い試験についてはその必要性が存在する。 30

【発明の開示】

【0022】

本発明の背景

本発明は、医学的、工業的、および環境的試料中の細胞およびウイルスの標的を迅速かつ高感度に同定するための効率的な方法を提供する。本発明は、標的を標識し、次いで、広域画像処理を使用してその標識を検出する。本発明に基づく診断試験は、迅速で、超高感度で、定量的であり、多重化され、かつ自動化され得る。この試験は、試料調製を最小化し、核酸増幅または細胞培養を必要としない。広範な細胞およびウイルスがこの試験によって検出され得る。本発明に基づく試験は、核酸増幅試験の高レベルの感度、使い勝手のよさ、およびイムノアッセイ法の迅速性、ならびに、微生物学的試験によって提供される費用効果のよさおよび定量性を与え得る。本発明は、現在の診断技術の最も良好な属性を具体化しながら、診断レパートリーの格差に取り組むものである。 40

【0023】

低レベルの標的およびウイルスを迅速かつ安価に検出する本発明の能力は、既製品の市販の構成要素から作られた器具を使用するか、または全く器具を使用しないかのいずれかに基づき、高い強度の標識、迅速な反応速度論を容易にする形式、および広域画像処理、を組み合わせる利点から生じる。表1は、本発明の利点のいくつかを列挙したものである。

【0024】

(表1)

- | |
|---|
| <p>選択される本発明の利点</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 迅速な結果 ● 超高感度 ● 使用が容易 ● 高い費用効果 ● 複数の標的の同時分析
<ul style="list-style-type: none"> ● 全ての種類の細胞およびウイルスについて走査 ● 大容量または小容量で分析 ● 自動化された定量的分析 ● 最低限の試料調製 |
|---|

【0025】

本発明は、低レベルの細胞およびウイルスを特異的に標識して、高い強度のシグナルを生成することによってそれらを検出する。種々のシグナル生成複合体を使用でき、これらには、蛍光染色、光散乱、量子ドット、蛍光体、および酵素コートされた粒子が含まれる。これらの粒子は、次には、様々な種類のシグナルを生成でき、これらには、蛍光、化学発光、および比色的なシグナルが含まれる。同様に、種々の分子が、シグナル生成標識の特異的結合を達成するために使用でき、これらには、抗体、核酸、リガンド、およびアダプターが含まれる。

【0026】

大きな容積での少ない数の標的およびウイルスの検出は、いくつかの臨床、環境、および製造に関わる試料を試験する場合に必要性がある。低レベルの標的について大きな試料を調査する本発明の能力は、部分的には、拡大を行わずに個々の細胞およびウイルスを検出するその能力に基礎を置いている。非拡大検出は、広い領域を単一の画像中で少ない数の粒子について調査することを可能にする。広域の画像処理は、次には、大容量の試料を効率的に分析する本発明の能力にとって重要となる。強力な顕微鏡または微小流体工学を使用して大容量中で標識された粒子を検出するには、困難な濃縮段階および何千もの画像の分析を必要とし得る。顕微鏡的なビームを使用して少ない数の粒子を走査する方法は、広域に適用された場合に非常に時間がかかりかつ高価となる。

【0027】

個々の顕微鏡的標識を計数することは、本発明に基づく試験の結果に強固さを付与する。細胞およびウイルスの標的を分析するための多くの広域画像処理方法とは対照的に、本発明は、一般的に、個々のシグナルを狭い隣接した領域に対して直接的に比較する。この比較により、広域における総シグナルおよびバックグラウンドを積算する方法と比べて、標識された標的を少量含む試料についてのシグナル対バックグラウンドの比率が改善される。

【0028】

個々の細胞またはウイルスの検出における別の利点は、検出領域のサイズの比例的な増加に伴い試料容量が増加してもその速度を犠牲とはせずに試験の感度を増大できることにある。

【0029】

広域画像における個々のシグナルを計数することはまた、偽陽性結果の割合を減少させる（偽陽性結果とは、実際の標的が存在しない場合に生じる陽性の試験結果である）。この計数方法は、試料中の分子（例えば、ATP、抗原、または核酸）の全体量を測定する方法のような単純な積算シグナルを検出する方法と比較して、利点である。シグナルを生じるいかなる人為産物（artifact）も、シグナルの積算を基礎とする方法を使用する場合には偽陽性を生じ得る。482の陽性シグナルを含む試料を考慮すると、これらの各々が100の蛍光単位を生成する。積算方法の結果は、ただ1つの数（48,200蛍光単位）である。同様の数の蛍光単位を生成する人為産物（例えば、大きな蛍光性のほこり粒子）は区別することができないかもしれない。対照的に、本発明は、単一の大きな蛍光性のほこり粒子と482個の陽性シグナルとの間を容易に区別できる。

【0030】

本発明を使用して構築された試験は、非常に低いレベルから高レベルまで、広い範囲の

濃度にわたって標的およびウイルスを検出し得る。本発明のこの特性、この広いダイナミックレンジにより、使用者は、狭いダイナミックレンジを有する技術にしばしば必要とされる試料調製の工程（例えば、複数回の希釈）を行わずに済む。

【0031】

本発明に基づく試験は、単純で、器具なしで、かつ費用効果のよい、単回使用のストリップ試験から、洗練された自動化ベンチトップシステムに至るまでの範囲にわたって、種々の有用な形式を開発し得る。

【0032】

種々の検出方法が本発明に使用でき、これらには、視覚的検出、フィルムに基づく検出、および電子的検出が含まれる。検出方法の範囲は、広範囲の診断問題および試験現場に取り組み際に利点となる。

【0033】

本発明の他の特色および利点は以下の記載および特許請求の範囲から明らかである。

【0034】

「標的」とは、試料中に潜在的に存在する細胞またはウイルスを意味し、その存在が本発明によって試験される。

【0035】

標的の「カテゴリー」とは、共通の1つまたはそれ以上の特徴を有し、かつ本発明を使用して構築される試験の目的のために同一であると見なされる複数の標的を意味する。例えば、すべてのHIVウイルスを検出するために設計された試験については、このカテゴリーは単にHIVである。このような試験は、HIV-1およびHIV-2の変異型を区別することなく、すべてのHIVウイルスを検出する。この場合において、標的のカテゴリーは、HIV-1とHIV-2の両方を含む。別の試験の目的が、HIV-2からHIV-1を区別することであってもよい。この場合においては、HIVの各タイプが異なるカテゴリーとして考慮される。

【0036】

標的の「非重複カテゴリー（non-overlapping categories）」とは、その和集合が空集合である標的のカテゴリーを意味する。すべての大腸菌（E.coli）の細菌のカテゴリー、すべてのシュードモナス（Pseudomonas）属の細菌のカテゴリー、すべての真菌のカテゴリー、およびすべてのHIVウイルスのカテゴリーは非重複カテゴリーである。すなわち、どのカテゴリーのメンバーも、他のセットのいかなるメンバーとはならない。対照的に、HIV-1ウイルスのカテゴリーおよびHIV-2ウイルスのカテゴリーは、標的に関する重複カテゴリーである。なぜなら、HIV-1カテゴリーの各メンバーは、すべてのHIVウイルスのカテゴリーのメンバーでもあるからである。

【0037】

複数のカテゴリーを検出および同定する試験は、一般的に、標的に関する複数の非重複カテゴリーを検出する。例えば、血液中のHIVウイルス、HCVウイルス、およびHBVウイルスを同定するために設計された試験を考慮する。このような試験は、標的に関する3つの非重複カテゴリー（3種類のウイルスの各々に対して1つのカテゴリー）を区別する。ウイルスの各種類は3つのカテゴリーの1つにのみ存在することに注意されたい（例えば、HCVカテゴリーにはHIVウイルスは存在しない）。

【0038】

試験の「カテゴリー複雑性」とは、試験において検出される標的の非重複カテゴリーの数を意味する。

【0039】

「カテゴリー特異的結合部位」とは、「特異的結合条件」下でカテゴリー結合分子に「特異的に結合する」標的上の部位であり（「」内の用語については定義を参照されたい）、かつ、そのカテゴリーのメンバーではないが試験試料中にも存在し得るような標的と、試験より同定しようとする特定のカテゴリーのメンバーである標的とを区別する、標的上の部位を意味する。すなわち、この部位は、代表的には、1つのカテゴリーのすべてのメンバー上に存在し、そして代表的には、非重複カテゴリーの任意のメンバー上には存在し

10

20

30

40

50

ない。カテゴリー特異的結合部位は、「カテゴリー特異的結合分子」に「特異的に結合する」。

【0040】

カテゴリー特異的結合部位は、常に標的と物理的に結合している。蛍光抗原を結合し、かつもともとの分泌細胞の近傍に固定化されている多数の抗体タンパク質を検出することによって単一の抗体分泌ハイブリドーマ細胞が同定される、ELISAスポットアッセイ法を考慮する。この場合において、抗原に対する結合部位を含む分泌抗体分子は、ハイブリドーマ細胞とは物理的に結合していない。従って、遊離の抗体上の抗原結合部位はカテゴリー特異的結合部位ではない。

【0041】

試験が分類学的な群を構成する標的のカテゴリーについて試料を走査する場合、カテゴリー特異的結合部位は、その分類学的な群の本質的にすべてのメンバーに存在しているものであるが、試験試料中に存在し得る他の分類学的な群の本質的にすべてのメンバーに存在しているわけではない。1つの例は、特定のモノクローナル抗体に結合するHIVの膜タンパク質上の部位である。

【0042】

または、試験は、異なる分類学的な群のメンバーによって共有されるカテゴリー特異的結合部位について試料を走査し得る。この種類のカテゴリー特異的結合部位の例には、抗生物質耐性を付与し、病原性を付与し、または生存度を示す種々の高分子（例えば、DNA）および遺伝子、mRNA、ならびにタンパク質が含まれる。カテゴリー特異的結合部位は、しばしば、より大きな分子または複合体の一部である。例えば、カテゴリー特異的なゲノム配列は、試験においてカテゴリー特異的結合部位として使用され得る。このようなカテゴリー特異的結合部位は、以下を含み得る、はるかにより大きなゲノムの一部となる：（1）カテゴリー特異的でない区画；（2）カテゴリー特異的結合部位であるが試験が走査しない区画；および（3）試験が走査しない別個のカテゴリー特異的配列である他の区画。

【0043】

カテゴリーのメンバーである標的の、例えば、80%、90%、95%、または99%より多くに存在するが、同じクラスで他のすべてのカテゴリーのメンバーである標的の、例えば、80%、90%、95%、または99%より多くに存在しない結合部位は、カテゴリー特異的部位と見なされる。カテゴリー特異的結合部位は、些細にまたは例外的に、そのカテゴリーのメンバーである標的に欠けていてもよいことに注意されたい。

【0044】

同様に、カテゴリー特異的結合部位は、些細にまたは例外的に、あるカテゴリーのメンバーでない標的に存在していてもよい。例えば、本質的にすべての大腸菌の細菌に存在するが、他の細菌種には存在しないタンパク質部位を考慮する。何百万もの細菌のなかで1細胞未満という場合であってもよいが、変異によりそのタンパク質が産生されなくなった場合、そのマーカはその大腸菌株には存在しない。しかし、このタンパク質部位は、なおカテゴリー特異的結合部位と見なされる。または、同じタンパク質についての遺伝子が、組換えDNA技術または天然の手段（例えば、ウイルス形質導入）によって異なる種の細菌株に遺伝子導入される。この場合において、大腸菌のカテゴリーのメンバーではない細菌株が、なお大腸菌特異的結合部位と見なされるものを発現する。

【0045】

「カテゴリー結合分子」とは、カテゴリー特異的結合部位に「特異的に結合する」分子または分子複合体を意味する。カテゴリー結合分子の例は、ゲノムDNAにハイブリダイズする核酸プローブ；タンパク質上の部位に特異的に結合するように選択されたか、またはインビトロで「進化した」核酸アダプター；細胞抗原または血清タンパク質に結合する抗体；および、ホルモンレセプターまたは結合分子（例えば、アピジン）に特異的に結合する上皮増殖因子またはビオチンのようなリガンドである。2つのカテゴリー結合分子は、それらが別個かつ非重複のカテゴリー特異的結合部位に結合する場合に、別個であるといわれる。カテゴリー結合分子は、それらの分子的組成に従って呼ばれ得る（例えば、カテ

10

20

30

40

50

ゴリー結合オリゴヌクレオチド、プローブ、抗体、リガンドなど)。

【0046】

「捕捉分子」とは、表面、メンブレン、または粒子ではない他のマトリックスに安定に結合するカテゴリー結合分子を意味する。

【0047】

標的のカテゴリーに「特異的に結合する」カテゴリー結合分子とは、試験によって走査されるカテゴリーのメンバーである本質的にすべての標的に、定義された「結合条件」下で結合するが、カテゴリーのメンバーではないが試料中に存在する可能性のある本質的に他の種には結合しない、カテゴリー結合分子を意味する。走査するカテゴリー中の標的に結合されるカテゴリー結合分子の数は、このようなカテゴリーには存在しない標的に結合される数と比較して、例えば、2倍、5倍、10倍、または15倍より多い。

10

【0048】

「結合条件」とは、カテゴリー特異的結合部位へのカテゴリー結合分子の特異的結合を達成するための試験において使用される条件を意味する。例えば、カテゴリー結合分子がカテゴリー特異的DNAプローブである場合、特定の試験についての結合条件は、ストリンジেন্টなDNAハイブリダイゼーション条件であり得る。適切なストリンジেন্টなDNAハイブリダイゼーション条件は、当業者によって周知であるように、プローブの性質に依存する。例えば、500塩基より長い長さの代表的なDNAプローブについては、適切な結合条件(通常、ハイブリダイゼーションの用語で「洗浄条件」という)は、 $0.2 \times \text{SSC}$ で65 である。抗原への抗体の結合については、代表的な結合条件は、PBS-TB中、室温である。

20

【0049】

カテゴリー結合分子の「ファミリー」とは、特定の標的のカテゴリーに特異的に結合するカテゴリー結合分子のセットを意味する。

【0050】

C型肝炎ウイルスに対して惹起されたポリクローナル抗体調製物は、カテゴリー結合分子のファミリーを構成する。なぜなら、この場合調製物は、標的であるHCVの同じカテゴリーに特異的に結合する複数の別個の抗体を含むからである。ポリクローナル抗体は、一般的に、カテゴリー結合分子のファミリーを構成する。なぜなら、これらは、一般的に、標的の同一カテゴリーに結合する複数の別個のカテゴリー結合分子を含むからである。アフニティー精製が使用されない限り、ポリクローナル抗体調製物は、代表的には、選択された標的のカテゴリーに結合「しない」抗体もまた含むこと、および、他のカテゴリーに結合する抗体を含み得ることに注意されたい。なぜなら、動物の抗体レパートリーは、動物の感染の履歴によって決定されるからである。従って、ポリクローナル抗体は、好ましくは、アフニティー法によって精製される。

30

【0051】

ファミリーにおけるカテゴリー結合分子は、カテゴリー中のいくつかの標的に結合し得るが、他には結合し得ない。例えば、HIV-2とは交差反応しないHIV-1特異的抗体、およびHIV-1とは交差反応しないHIV-2特異的抗体を考慮する。HIV-1とHIV-2の間を区別しない試験において1つのカテゴリーとしてHIVが検出される場合、2種類の抗体の混合物は、同じシグナルのシグニチャーを有するシグナリング部分で標識され得る。このカテゴリー結合分子のファミリー(これは、2つの抗体調製物の混合物である)が試験において使用される場合、HIV-1またはHIV-2が存在するか否かで同一のシグナルが得られる(この例において、抗体が、検出領域における部位でHIV標的を捕捉するために使用される場合には、抗HIV-1捕捉抗体および抗HIV-2捕捉抗体の混合物がこの部位で使用されることに注意されたい)。

40

【0052】

カテゴリー結合分子のファミリーの別の例は、すべての大腸菌0157:H7株に存在するが細菌の他の群のメンバーには存在しない、80のカテゴリー特異的ゲノムDNA配列のセットである。このカテゴリー結合分子のファミリーは、適切に調製した大腸菌0157:H7細胞に群としてハイブリダイズし得るが、他のカテゴリーの細胞にはハイブリダイズしない。フ

50

ファミリーは、異なるタイプのカテゴリー結合分子を含み得る。例えば、0157抗原に特異的に結合するモノクローナル抗体およびインチミン (intimin) タンパク質 (病原性因子) に結合するモノクローナル抗体はまた、カテゴリー結合分子の上記のファミリーに含まれる。カテゴリー結合分子のファミリーは、任意の数 (すなわち、1またはそれ以上) のカテゴリー結合分子を含み得る。

【0053】

カテゴリー結合分子の「非重複ファミリー」とは、各ファミリーが、非重複カテゴリーのセット中の1つに、および1つのみのカテゴリーに特異的に結合する際のカテゴリー結合分子のファミリーを意味する。すなわち、カテゴリー結合分子の非重複ファミリーのセットは、非重複カテゴリーの一致したセットに対応付けられる。例えば、4つのUSPで対象となっている生物、大腸菌、サルモネラ菌、シュドモナス属種 (Pseudomonas spp.)、およびスタフィロコッカス・アウレウス (Staphylococcus aureus) を走査する試験において、4つの重複しないカテゴリーが存在する。このような試験には、試験カテゴリーの1つに対して各々特異的な、4つの異なる交差反応しないポリクローナル抗体を組み入れ得る。従って、試験には、カテゴリー結合分子の4つの非重複ファミリーが含まれる。試験におけるカテゴリー結合分子の非重複ファミリーは、カテゴリー結合分子の集合と呼ばれる (以下の定義を参照されたい)。

10

【0054】

「カテゴリー結合分子の集合」とは、特定の試験のために混合物中に組み合わせるカテゴリー結合分子の1つまたはそれ以上の非重複ファミリーのセットを意味する。標的の複数の非重複カテゴリーについて走査する試験は、カテゴリーあたりにカテゴリー結合分子の1つのファミリーを含む。これらのファミリーを含むカテゴリー結合分子の全体のセットは集合といわれる。例えば、5つのウイルス特異的なモノクローナル抗体を使用して、5種類の上気道ウイルス (RSV、A型インフルエンザ、B型インフルエンザ、パラインフルエンザ、およびアデノウイルス) の存在について走査する試験を考慮する。この5つのモノクローナル抗体は、カテゴリー結合分子の5つの非重複ファミリーを構成する。この抗体の合わせは、カテゴリー結合分子の集合である。

20

【0055】

集合の「カテゴリー結合分子複雑性」とは、集合中の別個のカテゴリー結合分子または部分の数を意味する。例えば、カテゴリー結合分子の集合が234個のオリゴヌクレオチドプローブからなる場合、この集合のカテゴリー結合分子の複雑性は234である。

30

【0056】

集合の「ファミリー複雑性」とは、集合中のカテゴリー結合分子の非重複ファミリーの数を意味する。ファミリー複雑性は、集合の各ファミリーにあるカテゴリー結合分子を結合するために必要とされる標的の最小数と同じである。試験のファミリー複雑性は、試験のカテゴリー複雑性に一致する。すなわち、試料はカテゴリーについて走査されるが、その別個のカテゴリーの数である。プローブに関し3つのファミリーからなるDNAプローブの集合を考慮する。1つのファミリーが12個の大腸菌カテゴリー結合DNA配列のセットからなり、別のファミリーが10個のロタウイルスカテゴリー結合DNA配列のセットからなり、そして別のファミリーが15個のジアルジア (Giardia) カテゴリー結合DNA配列のセットからなる。このプローブ集合のファミリー複雑性は3である。なぜなら、少なくとも3種類の標的 (大腸菌、ロタウイルス、およびジアルジア) のゲノムが、集合におけるプローブすべてに結合するために必要とされるからである。

40

【0057】

「シグナルエレメント」とは、検出可能なシグナルを直接生成する分子または粒子を意味する。「直接的に生成する」という語句は、シグナルエレメントが、検出可能なシグナルの直接的な供給源または決定的な調節因子であるという事実を意味する。従って、シグナルが蛍光団から生じる光子である場合、蛍光団は光子の直接的な供給源であり、従って、シグナルエレメントである。シグナルがRLS粒子によって散乱された光子である場合、RLS粒子がシグナルエレメントである。あるいは、シグナルが、酵素西洋ワサビペルオキシ

50

ダーゼの色素原性沈殿産物から透過または散乱した光である場合、色素原産物がシグナルエレメントである。

【0058】

シグナルエレメントの特性は、このようなエレメントが、各部分は全体に対して比較し得るシグナルを生成するような部分に分割することができないということである（特性としてであり、強度においてでは必ずしもない）。従って、2nm直径の量子ドットは、それを分割することが、得られるナノクリスタルの特性（照射スペクトル）を変化させるので、シグナルエレメントである。フルオレセインのような蛍光色素を浸透させた5 μ m粒子はシグナリングエレメントではない。なぜなら、これは、各部分が、インタクトな粒子と比較し得るシグナリング特性を有するように部分に分割され得るからである。分子フルオレセインは、対照的に、シグナリングエレメントである。シグナル生成酵素（例えば、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、西洋ワサビペルオキシダーゼ）の検出可能な産物もまた、シグナルエレメントと見なされる。このようなシグナルエレメント（または、前駆体からシグナルエレメントへの化学的転換が存在する場合、それらの前駆体）は、拡散性の基質、不溶性の産物、および/または不安定な中間体であり得る。例えば、酵素アルカリホスファターゼは化学発光性の基質CDPスター（CDP-Star）（NEN；カタログ番号NEL-601）を、活性化された生成物に転換する。この活性化した生成物が光子を放射する「シグナルエレメント」である。

【0059】

「シグナリング部分」とは、1つまたはそれ以上のシグナルエレメントを含むかまたは産生（酵素の場合）する、分子、粒子、または基質を意味し、そしてこれは、カテゴリー結合分子に結合体化され得る分子、粒子、または基質を意味する。シグナリング部分は、共有結合的または非共有結合的のいずれかで、および直接的または間接的のいずれかで、カテゴリー結合分子に結合され得る（例えば、1つもしくはそれ以上のアダプターまたは「化学リンカー」部分を介して、あるいは同じ粒子に結合体化された両方の部分によって）。シグナリング部分の例には、カルボキシル化された量子ドット；核酸プローブまたは抗体プローブへの結合のために修飾されたテキサスレッド（Texas Red）のような蛍光団；ストレプトアビジンコートされた蛍光ポリスチレン粒子（これは、ピオチン化されたカテゴリー特異的結合タンパク質に結合体化され得る）；反復核酸配列を含むローリングサークル複製産物（これらの各々は尾部に蛍光修飾したヌクレオチドを有するいくつかのオリゴヌクレオチドとハイブリダイズでき、これらは5'末端にカテゴリー特異的結合オリゴヌクレオチドを含む）が含まれる。シグナリング部分は、物理的に異なるエレメントを含み得る。例えば、いくつかの場合において、シグナリング部分は、カテゴリー結合分子（例えば、抗体）と結合体化された酵素（例えば、アルカリホスファターゼ）である。シグナルは、アルカリホスファターゼの基質（例えば、それぞれ、NENおよびRocheからのCDP-StarまたはBM purple）がシグナルエレメントである生成物（例えば、光子を放出する不安定な中間体または沈着可能な色素原性産物）に転換された場合に、生成される。カテゴリー結合分子、酵素的シグナリング部分、および基質を、別個の時間に反応に適用することは珍しいことではない。

【0060】

「シグナリング部分複合体」とは、1つより多いシグナリング部分および1つより多いカテゴリー結合分子を含む物理的実体を意味する。シグナリング部分複合体におけるシグナリング部分およびカテゴリー結合分子の物理的結合は安定でなくてはならない（例えば、シグナリング部分およびカテゴリー結合分子は、PBS中、4 において、複合体との結合の平均半減期は少なくとも1日を有すべきである）。シグナリング部分複合体の例として、2種類：標的特異的抗体およびアルカリホスファターゼ、の何千もの分子によりコートされるポリスチレン微粒子を考慮する。このようなシグナリング部分複合体は、結合体化された抗体カテゴリー結合分子を介して標的に結合する。色素原性アルカリホスファターゼ基質（シグナルエレメント；例えば、BM purple, Roche）とともにインキュベートした場合、着色スポットを生成でき、これは、肉眼で検出できる。または、同じシグナリング部分

複合体を、化学発光性または蛍光性のいずれかのアルカリホスファターゼ基質とともにインキュベートした場合、化学発光性または蛍光性のいずれかのシグナルが生成する。シグナリング部分複合体のさらなる例には、フルオレセイン標識抗体に結合体化されたナノゴールド粒子、およびオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子と、過酸化水素の添加に際して化学発光を生じるアクリジニウムエステルとの両方に結合体化されたラテックス粒子が含まれる。

【0061】

「粒子」とは、50ミクロンのサイズ未満である物体またはマトリックスを意味する。粒子の集団またはバッチのサイズは、粒子の試料について直交性の次元の最も長い対の平均の長さとして定義される。直交性の次元の最も長い対は、その長さの合計が粒子のすべてのこのような合計において最大となるような、粒子の直交性の次元の対である。2つの粒子の試料が、それぞれ、1ミクロン×2ミクロンおよび2ミクロン×3ミクロンの直交性の次元の最も長い対を有する場合、直交性の次元の最も長い対の平均の長さは2ミクロンである（ $(1+2+2+3)/4=2$ ミクロン）。粒子の試料についての直交性の次元の最も長い対の平均の長さは、例えば、50ミクロン未満、20ミクロン未満、または5ミクロン未満である。

10

【0062】

多くの粒子がある程度固体の特性を有する。しかし、分子骨格または複合体（これらは強固でないかもしれない）もまた、粒子として定義される。例えば、 dendrimer または他の分枝状分子構造は粒子と見なされる。同様に、リポソームは、別のタイプの粒子である。粒子は、シグナルエレメントで染色するか、またはシグナルエレメントに結合体化することができる。粒子は、しばしば、それらの寸法または幾何的構造を反映する用語で呼ばれる。例えば、「ナノスフェア」、「ナノ粒子」、または「ナノビーズ」という用語は、任意の所定の座標軸に沿って1ミクロン未満の大きさである粒子を指すために使用される。同様に、「マイクロスフェア」、「マイクロ粒子」、または「マイクロビーズ」という用語は、任意の所定の座標軸に沿って1mm未満の大きさである粒子をいうために使用される。粒子の例には、ラテックス粒子、ポリアクリルアミド粒子、マグネタイト微粒子、フェロフルイド（磁気ナノ粒子）、量子ドットなどが含まれる。

20

【0063】

「標識粒子」とは、標的に特異的に結合しかつシグナルを生成し得る粒子を意味する。標識粒子は、シグナリング部分およびカテゴリー結合分子の両方と結合体化されるか、または安定に結合される。

30

【0064】

標的：「標識粒子複合体」とは、1つまたはそれ以上の標的が特異的に結合している標識粒子を意味する。

【0065】

標的：「標識複合体」とは、1つまたはそれ以上のカテゴリー結合分子に特異的に結合し、かつ1つまたはそれ以上のシグナリング部分を結合している標的を意味する。

【0066】

「標識比」とは、接触工程における標識粒子に対する標的の比率を意味する。例えば、 1×10^7 の標識粒子を、 1×10^8 の標的を含む試料と接触させる場合、標識比は10である。

40

【0067】

シグナルエレメントまたはシグナル部分の「シグナル特性」とは、他のシグナルエレメントまたはシグナリング部分から区別するために有用であるシグナルエレメントまたはシグナリング部分によって生成されるシグナルの局面を意味する。例えば、フルオレセインおよびローダミンで標識されたシグナリング部分のシグナル特性は「蛍光」である。放射性トランスポンダーの特性は「放射性頻度」である。光子性シグナリング特性の例は蛍光、光散乱、燐光、反射率、吸光度、化学発光、および生物発光である。光子性シグナリング特性の最後の2つの例以外は、外因性の照射（例えば、白色光光源、レーザー光光源、または日光）に依存する。対照的に、化学発光および生物発光は、外因性の光源とは独立

50

したシグナリング特性である。

【0068】

シグナルエレメントまたはシグナリング部分の「クラス」とは、他のシグナルエレメントまたはシグナリング部分から区別するため有用であるシグナルの別個の性質を意味する。例えば、赤色素で標識されたりポソームは、異なる色で着色されたりポソームから区別される。赤色はそのクラスである。特定のラジオ周波数シグナルを送信するマイクロ電子送信機については、他のマイクロ電子送信機からそのマイクロ電子送信機を区別するラジオ周波数シグナルの性質がシグナルエレメントクラスを構成する。

【0069】

「シグナルシグニチャー」とは、試験において標的のカテゴリーに結合するシグナリング部分の組み合わせの別個のシグナリングの性質を意味する。4種類の抗体に結合する標的は、それらの1つがフルオレセイン分子に結合体化され、そして他の3つがローダミン分子に結合体化されていれば、組み合わせで重みをつけたフルオレセインおよびローダミンの吸収スペクトルおよび発光スペクトルによって記載されるシグナルシグニチャーを有する。

10

【0070】

試験または標識されたカテゴリー結合分子の集合の「シグナル複雑性」とは、試験において、または集合に対する結合によって明瞭に標識され得る標的のカテゴリーの数を意味する。または、シグナル複雑性は、各々の標的のカテゴリーのメンバーが存在する場合に生じると予測される別個の「シグナルシグニチャー」の数として定義される。いくつかの試験について、カテゴリー結合分子の集合のシグナル複雑性は、試験が走査するカテゴリーの数と同じである。多くのカテゴリーについて走査する他の試験は、1のシグナル複雑性のみを有し得る。

20

【0071】

「選択力」とは、標的を捕捉、単離、移動、または隔離するために使用される力を意味する。選択力の例には、重力、磁力、電氣的ポテンシャル、遠心力、求心力、浮力、および圧力が含まれる。標的は、標的単独に作用する選択力によって移動され得る。あるいは、選択力は、選択部分に結合した標的上に特異的に作用し得る（以下の定義を参照されたい）。

【0072】

標的を移動させる選択力の適用の例には、標的の遠心力；磁気粒子に結合した標的の磁気選択；金属粒子で標識した標的の重力沈殿；および真空濾過による他孔性メンブレンへの標的の沈着が含まれる。選択力の使用のさらなる例は、以下の実施例に含まれる。

30

【0073】

「選択部分」とは、カテゴリー結合分子に結合体化され、かつ選択力によって選択的に捕捉、単離、移動、または隔離されるための能力をカテゴリー結合分子に付与する、原子、分子、粒子、または他の実体を意味する。カテゴリー結合分子：選択性部分複合体が標的に特異的に結合する場合、標的はまた、一般的に、選択力によって、選択的に捕捉、単離、移動、または隔離され得る。本明細書中で使用される意味において、選択的とは、選択力によって、選択部分および結合している実体に対して、選択部分と結合していない実体よりも移動に対する感受性を優先的に付与することをいう。

40

【0074】

常磁性粒子およびフェリチンは、選択部分の例である。溶液中で沈む高密度シリカ粒子は、別のタイプの選択部分である。このような粒子は、カテゴリー結合分子でコートされ、標的に結合した場合、水溶液中で標的が沈むことを引き起こし、従って、他の試料が結合していない構成成分からの結合した標的の分離を可能にする。

【0075】

「選択特性」とは、選択部分を捕捉、選択、または移動させるために有用な選択部分の局面を意味する。例えば、常磁性粒子の選択特性は「磁気」である。水溶液中で迅速に沈むシリカ粒子の選択特性は「質量」である。

50

【0076】

「粗平面」の表面または基材とは、平面上の任意の1mm×1mmの正方形の中の点から架空の平面上の最も近接する点までの距離を測定した場合、その平均距離の絶対値が50μm未満であるような、架空の平面に対して平行に整列され得る表面を意味する。

【0077】

「検出表面」とは、標的が沈着される粗平面基材の表面を意味する。光子性シグナリング特性を使用する実施態様において、この検出表面が光学的に透明である場合、検出は検出表面の面のいずれかを介してもたらされ得る。検出表面が不透明である場合、検出は標的が沈着される検出表面の面を介してもたらされる。

【0078】

「検出領域」とは、本発明によって同時に分析される検出表面または検出ゾーンの領域を意味する。検出領域は、代表的には、その最も長い直線寸法において、1mmより長く、例えば、5mmより長く、10mmより長く、または15mmより長い。例えば、集光レンズおよびCCDチップを備えた光学的装置によって同時に画像処理されるガラススライドの部分は、0.8cm×0.5cmの大きさであってもよい。このときの検出領域は0.4cm²である。

【0079】

「検出ゾーン」とは、標的が検出され得る容積を意味する。この検出ゾーンは、検出領域と同じ寸法を有するが、シグナリング部分は、検出および同定され得る奥行きに対応させた奥行きを有する。従って、検出ゾーンの奥行きは、陽性シグナルについて点数付けするために使用される閾値の判断基準に依存する。光学的検出が使用される場合、検出ゾーンの奥行きは、視野の光学的な奥行きに依存する。

【0080】

検出領域の「最も長い寸法(dimension)」とは、検出領域の周囲の2点間に引かれ得る最長の長さの線を意味する。例えば、検出領域は、0.3cm×0.4cmの大きさの長方形であり、この検出領域の最も長い寸法は、対角線の0.5cmである。検出領域が、長軸の半分が7mmの長さであり、そして短軸の半分が2.5mmの長さである楕円である場合には、検出領域の最も長い寸法は14mmである。

【0081】

「広域検出または広域画像処理」とは、検出領域(検出装置によって同時に分析される領域)が標的よりもはるかに大きな、顕微鏡的標的を検出するための方法を意味する。広域検出のための検出領域は、少なくとも1mm以上である1つの直線寸法を有する。対照的に、顕微鏡的標的とは、実質的にはより小さいものであり、代表的には、少なくとも2つの直交性の次元が50μm未満の測定値となる。広域検出の例には、CCDカメラを用いた9mm直径の検出領域の画像処理；1cmの長い寸法を有するCCDラインスキャナーを用いた走査による2cm×1cmの長方形の画像処理；写真フィルム上の直接的露光を使用した微生物標識を含む4cm×4cmフィルターの画像処理；および、迅速ラテラルフローストリップ試験における1cm×3cm試験領域上の顕微鏡的標的に対応した着色スポットの視覚的検出が含まれる。

【0082】

いくつかの技術が顕微鏡的標的について試料を走査するが、広域検出を利用しない。例としては、フローサイトメトリー；固相レーザーマイクロビーム走査サイトメトリー；液相走査(Tibbeら、Nat Biotechnol 17: 1210-3, 1999におけるような)；およびスライド上の複数の高出力顕微鏡視野の検査/画像処理が含まれる。

【0083】

「結合体化された」または「安定に結合した」とは、平均の結合の半減期がPBS中で4において少なくとも1日である、2つの実体間の物理的結合を意味する。例えば、ポリスチレン粒子への受動的なタンパク質吸着の複合体の場合を考慮する。いくつかの異なる吸着したタンパク質のクラスが存在する。いくつかのタンパク質は、何ヶ月もの半減期で表面に安定に結合する。他のタンパク質(例えば、吸着したタンパク質の外側の層にゆるく結合するもの)は、粒子と安定に結合しない可能性があり、そして1時間以内に浸出し得る。

10

20

30

40

50

【0084】

「画像増感装置」または「画像チューブ」とは、Inoue, Shninyaら、「Video microscopy: the fundamentals」(Plenum Press, New York, 1997; 665頁) : 「感度を増加させるためにビデオカメラチューブに(光ファイバーまたはレンズによって)接続された装置。増感装置は、焦点を当てた画像に従って電子を放出する前部に光陰極を有し、後部に燐光に電子の焦点を当てる電子レンズおよび/またはマイクロチャンネルプレートを有し、ならびに、電子のエネルギーを増大させる高電圧加速器を有する真空管である。単一または複数のステージであり得る。」の用語において定義されているような、光子性のシグナルを増幅する装置を意味する。種々のこのような画像増感装置が同じ引用文献の第8章に詳細に記載されている。

10

【0085】

検出領域の区画における標的を「同時に検出すること」は、1回の工程で粗平面の検出表面の区画からのシグナルの検出を意味する。CCDチップ、視覚的検出、または光ダイオードに基づくシグナル積算を使用する検出領域中の標的の広域画像処理は、同時検出の例である。

【0086】

「静止相」における標的は、非移動性の標的を意味する。例えば、ガラススライド上に固定された標的は静止相にある。マイクロタイターディッシュのウェルの底に固定された位置においてカテゴリー結合分子によって捕捉された標的は静止相にある。このような標的が表面に固着されていない場合でさえ、そして流体力学的または他の力によって移動され得る場合でさえ、検出/画像処理の間、10秒より長い間隔で取られた連続的な画像が、本質的に同じ相対位置で本質的に同じ標的を検出する場合に、標的は静止相にあると見なされる。フローサイトメトリーの適用における標的は静止相にはない。しかし、ラテラルフロー試験の固相試験ゾーンに結合した抗体によって捕捉された標的は、静止相にある。

20

【0087】

「同種アッセイ法」または「同種イムノアッセイ法」とは、完了したアッセイの生成物から反応物が物理的に除去されないアッセイ法またはイムノアッセイ法を意味する。

【0088】

「同定」とは、標的がメンバーであるカテゴリーを決定することを意味する。例えば、標的のいくつかのカテゴリーについて走査するラテラルフロー試験を考慮する。これらの各々は1つの試料中に潜在的に存在する。特定のカテゴリーに属する標的は、対応するカテゴリー特異的抗体が結合するメンブレンの領域に捕捉される。どのメンブレンゾーンがどの捕捉抗体を含むか知られているので、標的は捕捉が生じるゾーンによって同定される。

30

【0089】

「試料」とは、標的の存在について本発明によって走査される材料を意味する。

【0090】

「直接的視覚的検出」とは、装着する集光レンズ以外は器具の補助なく行う視覚的検出を意味する。例えば、直接的視覚的検出は、いくつかの迅速ラテラルフロー試験におけるナノゴールド粒子の赤みがかった反射シグナルを検出するために使用され得る。

40

【0091】

「光電検出器」とは、光子シグナルを電子シグナルに変換する人工の装置または機器を意味する。光電検出器の例には、CCD検出器、光電子増倍管検出器、および光ダイオード検出器(例えば、アバランシェ光ダイオード)が含まれる。

【0092】

「エンサークルドエネルギー(encircled energy)」または「エンスクエアドエネルギー(ensquared energy)」とは、光検出器アレイのピクセル上で捕捉される無限に小さな光源からの光子のパーセンテージを意味する。

【0093】

「熱放射」とは、黒体放射を意味する。

50

【0094】

「細胞自己蛍光」または「自己蛍光」とは、NADHおよび酸化されたフラボタンパク質のような天然の固有の細胞成分の蛍光に起因して、細胞によって発現される蛍光を意味する。緑色蛍光タンパク質のような組換え蛍光タンパク質に起因する蛍光を発現する細胞は、自己蛍光とは見なされない。

【0095】

「照射」とは、電磁気的な放射を伴う照射を意味する。種々の波長の電磁気的な放射が照射するために使用され得る。これには、例えば、X線、UV、可視光、または赤外スペクトル領域の波長を用いた照射が含まれる。放射線を照射することは必ずしも可視範囲におけるものではないことに注意のこと。

10

【0096】

「光子性シグナリング特性」を有するシグナルエレメントまたはシグナリング部分とは、光子の発光、散乱、反射、吸収、捕捉、もしくは再方向付け、または光子の振る舞いの他の調節もしくは組み合わせを介して検出可能な、シグナルエレメントまたはシグナリング部分を意味する。光子性シグナリング特性を有するシグナルエレメントまたはシグナリング部分のいくつかの例には、蛍光団テキサスレッド（蛍光シグナリング特性）；CDPスター（化学発光シグナリング特性）；ルシフェラーゼ（生物発光シグナリング特性）；共鳴光散乱粒子（光散乱シグナリング特性）；BMパープル（BM purple）（光吸収または色素原性シグナリング特性）；およびアップコンバーティング燐光（2つの長波長光子の吸収および1つの短波長光子の発光）が含まれる。

20

【0097】

「数字」×「溶液名」は、その溶液（水を除く）の濃度を倍数の数字で示した、溶液の構成成分を含む水溶液を意味する。例えば、10×EEは、10mM EDTA/100mM EPPSを含む（EE、すなわち1×EEは、1mM EDTA/10mM EPPSを含む）。

【0098】

「EE」は、1mM EDTA/10mM EPPSの溶液である。これらを互いに混合する前に、両方の成分の共役酸は、NaOHでpH8.0に調整される。

【0099】

「HYB」は、1M NaCl、50mM EPPS pH8.0、2% ブロッキング試薬（Boehringer Mannheim）；0.5% v/v トウイーン（Tween）、20 μg/ml 酵母tRNA（Sigma）を含むハイブリダイゼーションのために使用される溶液である。

30

【0100】

「UBB」（ユニバーサル結合緩衝液）は、250mM NaCl、50mM EPPS pH8.0、2% ブロッキング試薬（Boehringer Mannheim）；0.5% v/v トウイーン、20 μg/ml 酵母tRNA（Sigma）を含む、様々な種類のカテゴリー結合分子（例えば、抗体および核酸）の結合混合物のために有用な溶液である。

【0101】

「BB」（ブロッキング緩衝液）は、100mM EPPS pH8.0/150mM NaCl/2% ブロッキング試薬（Boehringer Mannheim）を含む。

【0102】

40

「PB」は、0.1Mリン酸ナトリウム緩衝液 pH7.4である。

【0103】

「PBS」は、120mM NaCl、2.7mM KClおよび10mMリン酸緩衝液（ナトリウム塩）pH7.4を含む、リン酸緩衝化生理食塩水である。

【0104】

「PBS-B」は、PBS中0.1% BSA（IgGフリー；Sigmaカタログ番号A-7638）である。

【0105】

「PBS-T」は、PBS中0.05% トリトン（Triton）X-100（Sigmaカタログ番号X-100）である。

【0106】

50

「PBS-T」は、PBS/0.1%BSA/0.05トリトンX-100である。

【0107】

「PBT」は、PBS/0.1%BSA (IgGフリー ; Sigmaカタログ番号A-7638) /0.05%トリトン20 (Sigmaカタログ番号X-100) である。

【0108】

「LB」は、細菌増殖のためのルリア (Luria) プロスであり、以前に記載されているように作製する (Ausubel 1987, 前出)。

【0109】

「SSC」は、HClでpH7.0に調整した150mM NaCl/15mMクエン酸三ナトリウムである。

【0110】

「MES」(2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸)。

【0111】

「MESB」は、0.05M MES (2-[N-モルホリノ]エタンスルホン酸)、pH6.1である。

【0112】

「EDAC」(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド)。

【0113】

「ライゲーション液 (ligation buffer)」は、10mM MgCl₂/50mMトリス-HCl/10mMジチオスレイトール/1mM ATP/25μg/μlウシ血清アルブミンである。

【0114】

「プレ溶菌溶液」：この溶液はGraves, L.ら (1993)、「Universal Bacterial DNA isolation procedure」、「Diagnostic molecular microbiology: principles and applications」、D. Persing、T. Smith、F. TenoverおよびT. White編 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology) に従って調製される。この溶液 (用時調製し、氷上に維持する) は以下を含む：2Mトリス (pH7.0) 0.25ml、腓臓リパーゼ3.1ml (腓臓リパーゼ (Sigma) 6.1mgを59.8mlの水に溶解し、0.1M CaCl₂を1.2ml添加することによって調製し；3.1mlのアリコートで-20℃に保存する)、1%タウロコール酸ナトリウム (Difco) 0.3ml、0.1M CaCl₂ 0.5ml、5.25mlスクロース、およびリゾチーム0.05g。

【0115】

「標準PCRプロトコール」：すべてのPCR反応は、(特に注記されない限りは) 50mM KCl、1.5mM MgCl₂、10mMトリス-HCl pH8.3、250μM (各) dNTP、および10μM (各) プライマー中で、パーキンエルマー・ジェンアンプ (Perkin-Elmer Geneamp) 9700サーモサイクラーで、30サイクル、その後72℃で10分間のインキュベーションで実行する。1サイクルは以下の3つの工程：94℃、30秒間；55℃、30秒間；72℃、90秒間からなる。

【0116】

「AP」：アルカリホスファターゼ。

【0117】

「BAL」：気管支肺胞洗浄液。

【0118】

「BSA」：ウシ血清アルブミン。

【0119】

「CCD」：電荷結合素子。

【0120】

「CFTR」：嚢胞性線維症膜コンダクタンス制御因子。

【0121】

「cfu」：コロニー形成単位 (生存可能な細菌細胞の数に対応する細菌濃度の測定値)。

【0122】

「CMV」：サイトメガロウイルス。

【0123】

「FITC」：フルオレセインイソチオシアネート。

10

20

30

40

50

【 0 1 2 4 】

「HBV」：B型肝炎ウイルス。

【 0 1 2 5 】

「HCV」：C型肝炎ウイルス。

【 0 1 2 6 】

「HIV」：ヒト免疫不全ウイルス。

【 0 1 2 7 】

「pfu」：プラーク形成単位（感染可能なウイルス粒子の数に対応するウイルス濃度の測定値）。

【 0 1 2 8 】

「PNA」：ペプチド核酸。

【 0 1 2 9 】

「RSV」：呼吸器合胞体ウイルス。

【 0 1 3 0 】

「TCID₅₀」：50%のフラスコが感染を実証する組織培養感染用量。

【 0 1 3 1 】

オリゴヌクレオチド配列は、文字として書かれる場合、特に注記されない限り、5'から3'方向で示される。

【 0 1 3 2 】

特に注記されない限り、本明細書中に記載される微生物株は、アメリカン・タイプカルチャー・コレクション（American Type Culture Collection）（ATCC）、バージニア州マナッサスから入手する。

【 0 1 3 3 】

発明の詳細な説明

発明の概要

本発明は、多種（例えば、細胞、ウイルス、またはタンパク質分子）で数の少ない顕微鏡的および超顕微鏡的な標的について、最小限に処理した試料を、迅速かつ高い費用対効果で走査する。本発明によって提供される強力な特色は、現代の高強度の標識、低コストの画像処理技術、および非拡大的な広域検出を組み合わせた、新規な診断学的アプローチから生じる。

【 0 1 3 4 】

本発明がいかにして相対的に大きな試料中で少数の顕微鏡的な標的を検出するかを理解するために、最初に特定の実施態様を調べることが手助けとなる。図1は、広い領域にわたって広がった少数の細菌を検出する本発明の1つの実施態様の単純な図式を示し、この場合は、顕微鏡スライドの一部である。細菌は標識され、その結果、手短に述べるように、細菌は光を放射する。以下の実施例の多くにおいて使用されている、「増殖している」細菌を検出するために使用されるこのアプローチは、個々の細菌よりもはるかに大きな試料の領域の画像をキャプチャーするためにデジタルカメラ（CCDチップ）を使用する。このCCDチップは、光感受性のピクセルエレメントのアレイを有する。試料の1つの位置での「増殖している」細菌からの光は、CCDチップの対応する位置のピクセルエレメントに衝突する。エンドユーザは、CCDチップから得られた画像データ（すなわち、照射されたピクセルの数および強度）を処理するコンピュータからの試料中の細菌の数についての情報を受け取る。

【 0 1 3 5 】

次に、重要な細菌性の病原体である、マイコバクテリウム・ツベルクローシス（*Mycobacterium tuberculosis*）の存在について呼吸器の試料を走査する実施態様の特定の応用を考慮する（図1）。本明細書において、実施例2に示されるように、細菌は蛍光性の化学物質、蛍光団で標識され、その結果、これらは異なる色の光（励起スペクトル）により照射された場合、特定の色の光（発光スペクトル）を放射する。細菌を標識するための試薬を発色させるために、カテゴリー結合分子が最初に選択される。理想的なカテゴリー結合分

10

20

30

40

50

子は、M.ツベルクローシスに結合するが、呼吸器試料に存在し得る他のタイプの細菌または物質には結合しないモノクローナル抗体である。抗体は、例えば、M.ツベルクローシス細菌の表面上にのみ見出し出されている特定の分子の部位「カテゴリー特異的結合部位」に特異的に結合し得る。次に、M.ツベルクローシス特異的カテゴリー結合部位は、蛍光団（例えば、フルオレセイン）への結合体化によって標識される。このフルオレセイン分子は「シグナリング部分」と呼ばれる。なぜなら、これは試験において検出されるシグナルを提供するからである。シグナリング部分（フルオレセイン）で標識されたカテゴリー結合分子（抗M.ツベルクローシス抗体）を調製して、M.ツベルクローシスについての診断試験が実行され得る。

【0136】

図2は、試験が、患者がM.ツベルクローシスに感染しているか否かをいかにして決定するかを例証する。痰試料がガラススライド上に塗布されかつ貼付される。このスライドを蛍光団標識した抗体とともにインキュベートした後、未結合の抗体は洗浄によって試料から取り除かれる。フルオレセインの励起範囲の光で試料を照射することは、試料中に存在するM.ツベルクローシス細胞の表面をコートするフルオレセインタグ化抗体による蛍光放射を誘発する。拡大なしでCCDチップの表面の放射光に焦点を当てて、細胞の蛍光画像を収集する。このようにして、塗沫試料の広い領域（代表的には、約1~2cm²）がM.ツベルクローシス細胞について協同的に走査される。各細胞からの蛍光は、CCDチップからコンピュータ（ここで電子シグナルは画像ファイルの形態で保存され得る）に中継される局在化電子シグナルを生じるピクセルの小クラスターに衝突する。画像分析ソフトウェアは、細胞からの光に反応するピクセルクラスターの数进行計数すること、および反応するピクセルの全体の光子の強度を積算することによって試料中のM.ツベルクローシスを計数する。

【0137】

本発明は、多種類の、形式、標識方法、カテゴリー結合分子、および検出方法を使用して、試験を構築するために使用され得る。しかし、この試験は共通したいくつかの鍵となる特色を有する。本発明の多くの実施態様に共通の工程および処理を以下に示す。

【0138】

本発明の適用の一般的な構成は以下の工程からなる。

工程1：試験の問題の定式化、標的を検出するためのカテゴリー結合分子の選択

工程2：シグナリング部分の選択および調製

工程3：生物試料の調製

工程4：試料中の標的のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分への結合

工程5：標的および結合したカテゴリー結合分子の選択

工程6：標的に結合したシグナリング部分を検出することによる、試料中に存在する標的の同定および定量

【0139】

工程1：試験の問題の定式化、標的を検出するためのカテゴリー結合分子の選択

試験によって検出される標的のカテゴリーの選択

カテゴリーは、試験の目的のために同一であると見なされる関連する標的の範囲として機能的に定義される。試験によって同定される標的のカテゴリーを選択することは、診断試験の目的を定義することと同義である。カテゴリーを選択することは、試験において使用される分子試薬、カテゴリー結合分子を定義するために中心的なことでもある。

【0140】

本発明に基づく新規な試験を構築する場合、第1の工程は、標的のどのカテゴリーを試験が同定および区別すべきかを決定することである。例えば、患者に肺炎を引き起こす感染性の因子を同定するための試験を構築するためには、一般的に肺炎を引き起こす病原体（例えば、呼吸器合胞体ウイルスおよびストレプトコッカス・ニューモニエ（*Streptococcus pneumoniae*）のカテゴリーを選択し；または、食物由来の病原体について試験するためには、毒性を引き起こす細菌のカテゴリーを選択する。本発明は、多細胞生物、細菌、およびウイルスを含む広範な標的を同定し得る。さらに、種々のカテゴリーからの標的（

10

20

30

40

50

例えば、細菌およびウイルス)が同一アッセイにおいて試験され得る。

【0141】

本発明の重要な用途は、ヒト身体の液体試料(例えば、血液、尿、脳脊髄液、痰、または糞便)中の病原体の同定にある(本発明の方法はまた、組織試料を含む他のタイプの臨床試料への適用としても重要である)。試料の身体的な供給源および患者の症候に依存して、同定される生物の重要なタイプに関しての決定がなされる。例えば、下気道症候を有する患者からの痰試料の場合は、一般的に肺炎を引き起こすウイルス、細菌、および真菌を検出することを選択し得る。

【0142】

カテゴリーの選択は、試験によって取り込まれる診断的な問題に依存する。従って、2つの試験が2つの異なる診断的な問題に答える場合、試験が両方同じ標的について同じ種類の試料を走査する場合でさえ、異なるカテゴリーを選択できる。尿道感染について尿試料をスクリーニングするための試験を考慮する場合、効力のある診断的な問題はしばしば:「有意な数の細菌細胞が尿中に存在しているか」である。このような試験のために、試験のカテゴリーはすべての細菌を含み得る。すなわち、この試験は、異なる細菌の種を互いに区別しない。従って、例えば、大腸菌とエンテロコッカス・フェシウムは、このタイプのスクリーニング試験の目的としては同じ「全細菌(pan-bacterial)」のカテゴリーに入る。対照的に、尿道感染の試験の異なるタイプの目的は、種のレベルで病原体を同定することである。このタイプの試験では、一般的に尿道感染を引き起こす細菌の各々の種が異なるカテゴリーとして定義される(例えば、大腸菌およびエンテロコッカス・フェシウムは、別々の試験カテゴリーである)。

【0143】

いくつかの試験のために、複数の界にわたる複数の生物のカテゴリーが選択される。異なる病原体のパネルのどれが患者の症候の原因であるかを決定することがしばしば臨床的に重要である。本発明は、患者の試料を、種々のウイルス、細菌、および真菌の存在について同時に走査する、費用効率のよい効果的な試験についての決定的なまだ対処されていない必要性に取り組む。「カテゴリー複雑性」は、試験が走査する標的のカテゴリーの数の測定値である(定義の部分もまた参照されたい)。

【0144】

カテゴリー特異的結合部位およびカテゴリー結合分子

標的の異なるカテゴリーは、それらの別個の分子成分によって区別される。例えば、各々が下気道疾患を引き起こす異なる病原体の以下のセット:A型インフルエンザウイルス、RSV、ヘモフィルス・インフルエンザ(*Haemophilus influenzae*)、ストレプトコッカス・ニューモニエ、およびM.ツベルクローシスを考慮する。各々の病原体のカテゴリーは、カテゴリーに特徴的であるが、他のカテゴリーのメンバーまたは呼吸器試料の他の成分には存在しない分子的成分を有する。本発明に基づく試験は、カテゴリー特異的分子成分の存在について走査することによって特定のカテゴリーのメンバーを検出する。

【0145】

標的のカテゴリーの存在を検出するために、本発明は、カテゴリー特異的分子成分に特異的に結合する分子を配置する。標的上に存在するカテゴリー特異的分子成分は、「カテゴリー特異的結合部位」と呼ばれ、そしてそれらに特異的に結合する分子は「カテゴリー結合分子」と呼ばれる。カテゴリー特異的結合部位は、試験される試料中に潜在的に存在する標的の特性であることに注意されたい。対照的に、カテゴリー結合分子は診断試験キットにおいて提供される試薬である。

【0146】

本発明の1つの利点は、広いスペクトルのカテゴリー結合分子が使用され得ることである。このことは重要である。なぜなら、異なるタイプのカテゴリー結合分子が、異なるタイプの診断的な問題を尋ねるために使用されるからである(例えば、広い界(kingdom)のレベルでのスクリーニング対狭い亜種レベルの同定)。カテゴリー結合分子(時折、プローブともいわれる)のクラスには、核酸(オリゴヌクレオチド、アプタマー、クローニ

10

20

30

40

50

ングされた配列、ゲノムDNA、RNAなど)；核酸に関連する化学的改変体(例えば、ペプチド核酸(PNA))；抗体；酵素(これは、標的基質に結合し得る)；非酵素的タンパク質(例えば、アビジン(これは、標的分子ビオチンに結合し得る))；細胞成分に特異的に結合する分子(例えば、アクチンまたはアビジンを結合するビオチンを結合するファロイジン)；色素または染色剤(例えば、ヨウ化プロピジウム、オーラミン-ローダミン、またはSYTO 17)；リガンド(例えば、上皮増殖因子レセプターに特異的に結合する上皮増殖因子)；およびインビトロ進化技術(例えば、Zhangら、Nat. Biotech.18: 71-74, 2000)を使用して選択されたポリペプチドまたは核酸結合試薬が含まれる。

【0147】

カテゴリー結合分子は他の機能的ドメインまたは修飾を取り込み得る。例えば、カテゴリー結合分子は、しばしば、シグナリング部分(すなわち、蛍光団または色素化された微粒子のような標識ドメイン)または選択部分(例えば、磁気粒子または固体表面)と、共有結合的または非共有結合的に結合される。あるいは、カテゴリー結合分子はアダプター部分に連結でき、これは、次には、別の機能的部分への連結を容易にする。時折、カテゴリー結合分子は、二重の、分離されない機能を有する。例えば、核酸染色剤であるヨウ化プロピジウムは、カテゴリー結合分子として使用され得る(例えば、カテゴリー特異的結合部位は、酵母における細胞の核酸であり得る)のに対して、同時に、この結合した色素はシグナリング部分として機能する(すなわち、これは、カテゴリー特異的結合部位に結合した場合に蛍光を発し得る)。本発明に基づく試験は、1つより多いカテゴリー結合分子のクラスを組み入れ得る(例えば、抗体および核酸染色、または抗体およびオリゴヌクレオチド)。

【0148】

最も単純な試験は、単一の標的のカテゴリーについて走査するために、単一の種類のカテゴリー結合分子を組み入れ得る。例えば、M.ツベルクローシスについての試験は、M.ツベルクローシスの表面上のカテゴリー特異的結合部位に特異的に結合するモノクローナル抗体を使用し得る。あるいは、例えば、尿道感染についてスクリーニングする場合には、単一のカテゴリーは「すべての細胞」であり、-または、ヒト細胞が溶解される場合には、「すべての非ヒト細胞」であり-かつカテゴリー結合分子の単一の種類が核酸染色(例えば、ヨウ化プロピジウム)であり得る。

【0149】

カテゴリー結合分子の「ファミリー」は、標的の同じカテゴリーのメンバーに結合する別個のカテゴリー結合分子のセットである。例えば、C型肝炎ウイルスに対して惹起されたポリクローナル抗体は抗体のファミリーである。なぜなら、これは、標的の同じカテゴリー(この場合はHCV)に特異的に結合する複数のカテゴリー結合分子を含むからである。カテゴリー結合分子のファミリーの別の例は、すべての大腸菌0157:H7株に存在するが細菌の他の群のメンバーには存在しない、80のカテゴリー特異的ゲノムDNA配列のセットである。カテゴリー結合分子のこのファミリーは、適切に調製した大腸菌0157:H7細胞に群としてハイブリダイズできるが、他の細胞のタイプにはハイブリダイズしない。

【0150】

標的の複数のカテゴリーを検出するために、試験は、各カテゴリーについてカテゴリー結合分子の1つのファミリーを含む。カテゴリー結合分子のファミリーのセットは、カテゴリー結合分子の「集合」と呼ばれる。例えば、肺炎についての試験または薬物の乱用についての試験は、多数の標的のカテゴリーを互いに区別しなくてはならない。カテゴリー結合分子の1つのファミリーは、各々の標的のカテゴリーについて使用される。肺炎試験のために、肺炎を引き起こす微生物の表面上のカテゴリー特異的抗原に反応する抗体の集合が使用され得る。このカテゴリー結合分子集合の1つのファミリーは、ウサギ宿主において惹起され、ストレプトコッカス・ニューモニエに対して指向される抗血清の免疫グロブリン画分からのポリクローナル抗体を含み得る。別のファミリーは、アデノウイルスのコートタンパク質に対して指向される組換え抗体またはモノクローナル抗体を含み得る。

【0151】

10

20

30

40

50

集合によって試験される標的の別個の群またはカテゴリーの数、すなわち、「カテゴリー複雑性」は、集合におけるカテゴリー結合分子のファミリーの数によって反映される。集合におけるファミリーの数は、次には、集合の「最小カテゴリー偏差」と呼ばれる量によって正確に規定される。「ファミリー複雑性」は、試験集合においてカテゴリー結合分子のファミリーの各々からのメンバーを結合するために必要である別個の標的の最小数である。例えば、マイコバクテリウム・ツベルクローシス、レジオネラ属種 (*Legionella* spp)、コクシジオイデス・イミチス、インフルエンザウイルス、および呼吸器合胞体ウイルスの存在について、痰試料を同時に試験するために使用されるカテゴリー特異的抗体の集合を考慮する。集合のファミリー複雑性は5である。なぜなら、各病原体カテゴリーから1つの、最小で5つの標的が、集合におけるカテゴリー結合分子の各ファミリーのメンバーに結合することが必要とされるからである。単回の試験において標的の広いスペクトルを同定する本発明の能力は、大きなファミリー複雑性を有するカテゴリー結合分子の集合を使用して試料を走査するその能力の結果である。

【0152】

本発明とともに使用されるカテゴリー結合分子は、所望の標的（分析物）にアッセイ条件下で結合すべきであるが、他の種類の標的、または試料もしくは試験の他の可能な構成成分には結合すべきでない（アッセイによって区別されることを意味する）という意味で、特異的であるべきである。従って、上気道細菌感染についての試験において、強力なカテゴリー結合分子は、上気道の正常な（共生的な）微生物の構成成分と交差反応するものを除外するようにスクリーニングされる。

【0153】

カテゴリー結合分子を獲得および特徴付けるための代表的な方法は、以下の実施例に含まれる。

【0154】

工程2：シグナリング部分の選択および調整

シグナリング部分を用いたカテゴリー結合分子の標識

光学的な拡大または高価な機器なしで個々の顕微鏡的な標的を検出する本発明の能力は、一般的に、高いシグナル強度で標的を特異的に標識することに依存する。標識は、カテゴリー結合分子との結合を介する、シグナル分子の標的への特異的結合によって達成される。しかし、シグナリング部分として標的の固有の特性（例えば、細胞の自己蛍光）を使用する本発明の特定の使用のためには、標識は必要とされないことに注意されたい。

【0155】

本発明は、2つの一般的な方法で標的のカテゴリー間を識別する。シグナルの差別化と呼ばれる1つの方法は、シグナリング部分でカテゴリー結合分子の各カテゴリー特異的ファミリーを標識し、その結果、これは独特なシグナルシグニチャーを有する。多数の別個のシグナルシグニチャー（すなわち、高いシグナル複雑性）を生成および検出する能力は、多数の標的のカテゴリーについて走査する試験の構成（すなわち、高度に多重化された試験）を可能にする。複数の標的のカテゴリー、幾何学的な区別の間を区別するための他の方法は、検出領域の異なる領域において標的の異なるカテゴリーを沈着させることに頼っている。シグナリング部分のシグナルシグニチャーから独立し得る幾何学的な区別は、以下に議論される（工程5）。

【0156】

本発明は、様々な種類のシグナル特性を使用し得る。これらには、蛍光、散乱光、偏光、電磁波、粒子サイズ、磁場、化学発光、および放射能が含まれる。種々のシグナル特性を使用するシグナリング部分および検出スキームの例は以下に見られる。シグナル特性の中に複数のシグナルクラスが存在し得る。例えば、シグナル特性が蛍光である場合には、種々の特徴的な放射スペクトルはシグナルクラス（例えば、赤色蛍光、緑色蛍光、および青色蛍光）を含む。あるいは、別の例として、同じ蛍光団の異なる濃度で色素化された赤色蛍光微粒子を考慮する。蛍光はまた、シグナリング特性であるが；しかし、この場合は、異なる強度の粒子がシグナル特性のクラスを構成する。すなわち、蛍光強度は、1つの

粒子の群を別の群から区別するシグナル特性の性質である。

【0157】

以下の実施例において実証するように、多数の種々のシグナリング部分が本発明とともに使用され得る。シグナリング部分は、単一の蛍光団、アップレギュレートされた燐光、天然の蛍光タンパク質（例えば、緑色蛍光タンパク質およびその関連物）、色素、酵素：基質系（基質：生成物の色の变化または化学発光を生じる）、蛍光微粒子、光散乱粒子、磁気粒子、またはラジオ送信マイクロ装置を含み得る。

【0158】

高いシグナル複雑性は多数のタイプの標的について走査する試験（すなわち、高いカテゴリー複雑性を有する試験）を開発するために有用である。

10

【0159】

高いシグナル複雑性の達成

混合物中の区別可能な標識（またはシグナリング部分）の数はシグナル複雑性と呼ばれる。時折、高度に複雑化された試験のために、高いシグナル複雑性を有するシグナリング部分を使用することが有利である。高いシグナル複雑性を生成するために、本発明とともに使用され得る3つの一般的なアプローチは：（1）別個の標識、（2）コンビナトリアル標識、および（3）比標識である。

【0160】

1. 別個の標識のために、異なるプローブファミリーのプローブは、実験においてすべての他のシグナリング部分の存在下で容易に検出され得る単一のシグナリング部分とタグ化される。これまでは、高いシグナル複雑性で別個の標識を達成することは難しかった。なぜなら、大部分の標識方法は、光学的シグナル（例えば、色素原性、蛍光性、化学発光性）または放射性標識を使用するからである。光学的シグナルのスペクトルのバンド幅および現在の機器による検出可能なシグナルの制限された範囲のため、光学的シグナルを使用して解像され得るシグナル複雑性は、むしろ小さい。例えば、スペクトルの重複に起因して、異なる放射スペクトルを有する何十もの蛍光団の解像は現在不可能である。

20

【0161】

2. 本発明において使用される高いシグナル複雑性を達成するための別の方法は、コンビナトリアル標識アプローチを適用することである。コンビナトリアル標識は、比較的少ない数の別個のシグナリング部分を使用して、高いシグナル複雑性を達成するための技術である。このアプローチを用いると、シグナリング部分の別個の組み合わせは異なる標的に結合する。この概念は図5（実施例1もまた参照されたい）に例証されている。現在、蛍光団は、分子的診断のためのシグナル部分の好ましいクラスである。しかし、複数の別個の蛍光団（励起スペクトルおよび放射スペクトルの重複から多くの部分が生じる）の分析に關与する複雑性が与えられた場合、約7以下の慣習的な蛍光団を組み入れることのみが現在実用的である。しかし、組み合わせで使用される場合、7種の蛍光団は 127 の別個のシグナルを生成するために使用され得る（ N 種の蛍光団は $2^N - 1$ の組み合わせを生じる）。高いシグナル複雑性はまた、他のタイプのシグナリング部分を使用するコンビナトリアル標識を介して達成され得る。例えば、異なる色素を浸漬させた粒子、異なる別個のサイズのクラスに入る粒子、または別個の放射シグナルを放射する中継器は、このアプローチとともに使用され得る。蛍光団を使用するコンビナトリアル標識は、最近、ヒトの核型決定に首尾よく応用された（Speicherら、1996、前出；Schrockら、1996、前出）。コンビナトリアル標識実験の分析のための機器およびソフトウェアは市販されている。

30

40

【0162】

3. 高いシグナル複雑性はまた、比標識アプローチを使用して得られ得る（Fultonら、1997、前出）。比標識においては、コンビナトリアル標識と同様に、多くの別個のタイプのシグナリング部分が、比較的少数の別個のシグナリングエレメントを使用して生成される。しかし、コンビナトリアル標識と対照的に、比標識におけるシグナリング部分は、シグナリングエレメントの比によって区別される。例えば、異なる励起/放射特性を有する2つの蛍光団XおよびYは、ポリスチレン粒子に色素を付けるために使用され得る。蛍光団（[X

50

]、[Y])の異なる相対的濃度は、粒子の異なるセットに適用される。例えば、Xの8つの異なる濃度およびYの8つの異なる濃度が、すべての組み合わせ(X_1Y_1 、 X_1Y_2 、 X_8Y_7 、 X_8Y_8)の粒子に色素を付けるために使用され、64のクラスの区別し得る粒子を生じる。比標識は機器の使用を単純化する。少数のシグナルタイプのみが使用される必要があるからである。蛍光団以外であり、非光学的なシグナルエレメントを含むシグナルエレメントはまた、非標識アプローチを使用して、高いシグナル複雑性を生成するために使用され得る。

【0163】

強いシグナルを生成することは個々の顕微鏡的標的の検出を容易にする

必要とされるシグナル強度のレベルは、当然、シグナルの性質(光学的、粒子サイズなど)および検出の方法/機器に依存する(以下を参照されたい)。

10

【0164】

カテゴリー結合分子を標識するための種々のアプローチが、必要とされる感度を達成するために使用され得る。シグナル強度を最適化するための1つの方法は、高度に蛍光性のシグナリング部分を用いて標的分子を標識することである。例えば、量子ドット、蛍光を染色されたナノスフェア、およびポリマー化された蛍光団分子は、強力な蛍光シグナルを生成する。多数のシグナルエレメントを組み入れることは、シグナリング部分の蛍光強度を増加させ得る。例えば、蛍光ナノスフェア(直径~20nm; Molecular Probes)は、約180個のフルオレセイン分子と等価なシグナルを生成し得る。蛍光染色されたポリスチレン微粒子(例えば、直径1 μ m)は、何百万もの蛍光団のシグナリングエレメントを組み入れる得る。核酸カテゴリー結合分子と結合しているシグナル部分に複数の蛍光団を組み入れるための方法は、クローニングされたカテゴリー特異的配列のPCR増幅の間に蛍光団-dNTP結合体を組み入れることである。核酸カテゴリー結合分子に複数の蛍光団を組み入れるための代替的な方法には、複数のシグナル部分に結合したか、または多数のポリマー化した蛍光団で標識したヌクレオチドを末端に付与した、デンドリマー、分枝DNA、またはローリングサークルテンプレートを使用するアプローチが含まれる。複数のシグナリング部分にカテゴリー結合分子を結合体化させることもまた、シグナル強度を増大させる。例えば、シグナル増幅はまた、多数のシグナリング酵素(例えば、アルカリホスファターゼまたは西洋ワサビペルオキシダーゼ)をナノ粒子に結合体化させることによって達成され得る。

20

【0165】

強力なシグナルを得るための別のアプローチは、各標的に多数の標識したカテゴリー結合分子を結合させることである。このことは、以下を含む種々の手段によってなされ得る: 複数のカテゴリー結合分子を使用すること(同じ標的中で複数のカテゴリー特異的結合部位を認識すること)、または、標的中に高度に表されている標的分子に結合するカテゴリー結合分子を選択することによる。例えば、標識された微生物特異的ポリクローナル抗体は、微生物標的上の多数の別個のエピトープに結合することによって、高いシグナル強度を達成し得る(例えば、実施例11を参照されたい)。実施例1はまた、各標的生物において、多くの別個のカテゴリー特異的結合部位に結合する標識されたカテゴリー結合分子を使用して記載される。各標的に多くの数が存在するカテゴリー特異的結合部位を選択する戦略は、以前に頻繁に使用されてきた。この戦略の例には、リボソームRNAについての核酸プローブの使用が含まれる(これは、標的生物および細胞タイプに依存して、細胞あたり数1000コピーで存在し得る)。同様に、いくつかの抗原性標的分子が、標的生物の各々の細胞に、数百コピーまたは数千コピーで存在する。本発明は、これらの戦略の両方を利用し得る。別の例として、細菌に存在する多数のカテゴリー特異的結合部位は、核酸結合蛍光色素シーバグリーンI(Syber Green I)をカテゴリー結合分子/シグナリング部分として使用する場合に、強いシグナル強度を産生する(例えば、実施例を参照されたい)。

30

40

【0166】

標的への多数のシグナル部分の結合は、シグナル強度を増大させるだけでなく、本発明に強固さを与える。なぜなら、標的の非存在下では予測される複合性のシグナルシグニチャーを有する多数のシグナリング部分の多数のクラスターを観察する機会が少ないから

50

である。

【0167】

カテゴリー結合分子へのシグナリング部分の結合体化

本発明は、多数のタイプのシグナリング部分を組み入れ得る。このシグナリング部分は、当業者に公知の種々の方法を使用して、カテゴリー結合分子に直接的に結合体化され得る（例えば、Hemanson, G., 「Bioconjugate Techniques」 (Academic Press, 1996) および以下の特定の実施例を参照されたい）。例えば、抗体またはオリゴヌクレオチドのカテゴリー結合分子は、蛍光団または量子ドットシグナリング部分に直接的に結合体化され得る。あるいは、例えば、抗体またはオリゴヌクレオチドのカテゴリー結合分子は、蛍光微粒子ベースのシグナリング部分または光散乱ナノ粒子ベースのシグナリング部分をコートするために使用され得る。シグナリング部分は、カテゴリー結合分子に間接的に結合体化され得る。例えば、図6に示されるように、シグナル部分は、タグ相補物に直接的に結合体化でき、次いで、これは、カテゴリー結合配列も含むオリゴヌクレオチドの一部である、タグ配列にハイブリダイズされる。または、例えば、アビジンが、シグナリング部分を構成する複数のシグナルエレメントに直接的に結合体化され得る。次いで、標識されたアビジン分子は、ビオチン化されたカテゴリー特異的抗体に結合され得る。シグナリング部分は、結合工程の前、その間、またはその後、カテゴリー結合分子に結合体化され得る。例えば、本発明の1つの実施態様において、ジゴキシゲニン標識された核酸プローブは、カテゴリー結合分子として使用される。試料中の標識中のカテゴリー特異的結合部位にカテゴリー結合分子を結合させた後で、未結合のプローブは洗い流される。次いで、抗ジゴキシゲニン抗体：アルカリホスファターゼ結合体（シグナリング部分）は、結合したジゴキシゲニン標識されたプローブに結合体化される。次いで、アルカリホスファターゼ基質（例えば、化学発光基質CDP-Star；NEN）が、シグナルを生成するために結合したアルカリホスファターゼに加えられる。

10

20

【0168】

工程3：生物試料の調製

試料の調製

本発明の重要な属性は、迅速かつ単純な試料調製プロトコールとのその適合性である。このことは、他の高感度の診断方法（例えば、核酸増幅に基づく技術、これは、酵素阻害剤を除去するためにより多くの試料調製手順を必要とする）よりも主要な有利な点を表す。

30

【0169】

試料調製は、試料の性質および試験の形式に依存する、いくつかの機能を有し得る。いくつかの場合において、試料調製は、標的を濃縮し、および/または標的を基材上に沈着させる。例えば、水由来の微生物についての試験は、濾過によって微生物を濃縮でき、検出のための濾紙上に細胞を沈着させる。他の試料は、固体基材上（例えば、顕微鏡ガラススライド）に塗布される。

【0170】

カテゴリー結合分子による結合に対して標的上で接近可能なカテゴリー特異的結合部位を作製することは、試料調製の重要な機能である。いくつかの場合において、例えば、カテゴリー特異的結合部位がカテゴリー特異的抗体に自由に接近可能な水性試料中の微生物の表面上のエピトープである場合、処理はほとんど必要ないか、または全く必要ない（例えば、実施例8を参照されたい）。他の場合において、試料調製は、内部のカテゴリー特異的結合部位を接近可能にするために必要とされる。これは、例えば、カテゴリー特異的DNA配列がゲノムDNA上のカテゴリー特異的結合部位に結合するために使用される場合である。標的細胞は、プローブに対して透過性にしなければならず、かつ、それらのゲノムDNAは変性されなくてはならない。大量の異なる種類の標的が同じ試料中で試験された場合、試料調製は、標的の全体のスペクトルについて有効でなくてはならない。試料調製方法のさらなる特異的な例は、以下の実施例に詳述される。

40

【0171】

50

アッセイが陰性の結果を生じる場合、試料が標的生物を本当に含んでいないか、またはアッセイそれ自体が失敗であったか、すなわち、その結果が偽陰性であるか否かを知ることが重要である。偽陰性の結果を同定するために、1つまたはそれ以上の陽性対照標的が実験試料に加えられ得る。陽性対照標的は、試験される標的の範囲には存在しないカテゴリー-特異的結合部位を含む。陽性対照標的に対応するカテゴリー-結合分子は、使用される他のカテゴリー-結合分子とともに試験に含まれる。1つまたはそれ以上のアッセイ工程が成功する限りは、3つの標的がすべてのアッセイにおいて検出される。従って、陽性対照からのシグナルを検出することの失敗は、偽陰性結果を示し得る。

【0172】

工程4：試料中の標的の、カテゴリー-結合分子およびシグナリング部分への結合

10

この工程において、カテゴリー-結合分子および結合したシグナリング部分は、特異的結合を容易にする条件下で、試料中の標的と接触させられる。例えば、カテゴリー-特異的核酸配列の集合は、この工程で試料中の相補的標的配列にハイブリダイズする。同様に、試料中のカテゴリー-特異的抗原は、対応するカテゴリー-特異的抗体に結合することを可能にする。結合工程のための7つの可能な物理的構成が存在する。例えば、結合は、液相中で（例えば、実施例8を参照されたい）、顕微鏡スライド上で（例えば、実施例を参照されたい）、またはニトロセルロースストリップ上で、ラテラルフロークロマトグラフィーを使用して（例えば、実施例38を参照されたい）、実行され得る。カテゴリー-結合分子の濃度は、迅速な結合反応速度論を達成するために最適化される。特異的結合を選択するために選択される条件は、カテゴリー-結合分子およびそれらの標的分子との相互作用に依存する。特異的条件および手順は、以下の実施例に記載される。

20

【0173】

工程5：カテゴリー-結合分子およびシグナリング部分と結合体化した標的の選択

未結合のシグナリング部分からの、シグナリング部分に結合する標的の物理的分離は、引き続き検出プロセスを増強する。選択工程のさらなる目的は、検出ゾーン（例えば、画像処理装置の焦点のある平面の領域）において標的を沈着させることである。複合体は一般的に固相に結合するのに対して、未結合のカテゴリー-結合分子およびシグナリング部分は、液相に残存する。いくつかの場合において、未結合の物質は洗い流される。他の試験形式において（例えば、同質の液相形式およびメンブレンに基づくアッセイ法において）、洗浄は必要でない。

30

【0174】

結合工程の前に、試料が固体基材に固定されるアッセイ法では、未結合のカテゴリー-結合分子およびシグナリング部分が一般的には洗浄によって取り除かれる。以下の代表的な例には、インサイチュ-ハイブリダイゼーションおよび免疫組織化学の方法を使用するものが含まれる。

【0175】

他の試験形式は、液相中（例えば、マイクロタイターウェル中）で実施される。これらの例において、標的/カテゴリー-結合分子/シグナリング部分複合体は、一般的に結合工程後に表面に沈着される（例えば、実施例8を参照されたい）。表面上の標的複合体を沈着させるための方法には、遠心分離、濾過、重力沈降、磁気選択、または表面に結合したカテゴリー-結合分子への結合（例えば、実施例18におけるような捕捉抗体）が含まれる。いくつかの場合において（例えば、磁気分離）、別個の部分、選択部分が使用される。カテゴリー-特異的抗体でコートされた磁気微粒子は選択部分の例である（例えば、実施例8を参照されたい）。未結合のカテゴリー-結合分子およびシグナリング部分は一般的に液相に残存しており、取り除かれ得る。検出手順（例えば、画像処理）が、狭い奥行き視野で固体表面を選択的に分析する場合、未結合の物質（焦点の表面の外側に存在する）は時折取り除かれる必要はない（例えば、実施例8を参照されたい）。これらおよび他の方法の各々のさらなる例は、以下に提供される。

40

【0176】

ラテラルフロー形式およびフロースルー形式は、ポイントオブケア（point of care）

50

試験において論証できる、最も首尾よい試験形式である。これらの形式は、吸収剤のメンブレン中におけるキャピラリーフローの利点を利用する。これらは、一般的に、表面結合カテゴリー結合分子を使用して標的複合体を選択する。未結合のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分は、キャピラリー作用によって捕捉ゾーンから流れ出る。メンブレンに基づくアッセイ法の別の重要な利点は、幾何学的な区別を使用することによって多重化することの容易さである（以下を参照されたい）。

【0177】

多重化された試験を構築するための幾何学的な区別

幾何学的な区別は、標的の複数のカテゴリーについて走査する場合、重要な方法である（すなわち、多重化された試験）。幾何学的な区別は、高いシグナル複雑性の多重化された試験（工程2を参照されたい）と比較した場合に、多重化された試験についての単一のシグナルシグニチャーしか必要としないことに利点を有する。幾何学的な区別を使用する代表的なイムノアッセイ法において、異なるカテゴリー特異的捕捉抗体が、検出ゾーンの別個の領域に沈着される（例えば、ラテラルフロー試験における異なるストリップ、またはフロースルーもしくはマイクロタイターウェルに基づく試験における異なるスポット）。従って、標的の異なるカテゴリーは、捕捉ゾーンの異なるあらかじめ決定された領域に捕捉される。捕捉抗体に類似する他のタイプの捕捉部分には、抗原、リガンド、および核酸が含まれる。幾何学的な区別のいくつかの例は以下に見られる（例えば、実施例38および実施例34を参照されたい）。

10

【0178】

工程6：試料中の標的に結合するシグナリング部分を検出することによる試料中に存在する標的生物の検出、同定、および定量

本発明の顕著な利点（その感度および標的を定量するその能力を含む）は、個々の標的を検出するための広域画像処理を使用する能力に由来する。シグナリング部分で標識した標的の検出は、一旦複合体が検出ゾーンに配置されるともたらされる。使用される検出プロセスはシグナリング部分のシグナル特性（例えば、蛍光、化学発光、または光散乱）に依存する。いくつかのシグナル特性（例えば、光散乱および蛍光）については、検出ゾーンにおける複合体は、光源から照射されなくてはならない。他のシグナル特性（例えば、化学発光、放射送信、または磁場）については、照射は必要とされない。CCDカメラ、フィルム、および直接的可視化を含む種々の検出モードが使用され得る。

20

30

【0179】

非顕微鏡的な広域画像処理は、感度を非常に増大させ得る。顕微鏡なしで標的を検出することは、本発明の重要な局面である。なぜなら、これは、多くの場合において、標準的なインサイチュー分析方法において使用される顕微鏡的方法よりも、より迅速で、効率がよく、および感度の高い試料分析を達成し得るからである。顕微鏡的な検出よりも非顕微鏡的な広域検出の感度の増大は、標的について試料のはるかにより大きな容量を走査する能力から生じる。例えば、本発明は、顕微鏡的な画像処理を使用して画像化された代表的な領域よりも数千倍広い顕微鏡スライド上の領域を画像化し得る。得られる感度の増加は、肺炎の患者からのミリリットルあたり10,000個の細菌を含む痰試料を考慮することによって例証される。インサイチュー分析については、試料の一部を（例えば、約100のマイ

40

【0180】

単一の標的の検出は本質的に定量的である、検出または画像処理工程の間、本発明は、試料の規定された容量中の個々の標的を検出し得る。定量は、写真もしくはデジタル画像

50

中の個々の細胞を計数することによって手動で、またはデジタル画像の場合には、ソフトウェア分析によって自動的に達成され得る。試料にわたってシグナル強度を積算することもまた、標的を定量するために使用され得る。シグナルの積算は、高濃度の標的を含む試料または物理的に連結された標的（例えば、糸状菌）を用いると特に有用である。これらの場合において、同時発生的なシグナルを分解することは常に可能であるとは限らないかもしれない。それらを一緒に使用することが適切である場合（例えば、標的のレベルが十分に低くて分散した標的が区別され得る場合）、自動化されたシグナル積算および粒子の計数が強固さを提供し、従って好ましい定量の方式を提供する。

【0181】

標識されたプローブファミリーのシグニチャーを解読することは、標的の多数のカテゴリの同定を可能にする。この工程の重要な最終目的は、試料に付着した標識されたカテゴリ結合分子のシグニチャーを決定することによって試料中の標的のカテゴリを同定することである。 10

【0182】

画像処理対照標準は、同定の参照を提供し、アッセイが正しく機能していることを示す。強固性および再現性は、本発明において内部標準および対照を容易に組み入れる能力によって大きく増強される。例えば、一般的に肺炎を引き起こす24種類の病原体について下気道試料を走査する場合、各々の病原体を含む内部標準のセットが並行して走査され得る（例えば、実施例1を参照されたい）。すべての試薬および手順の包括的かつ高度に重複したチェックを提供するうえに、内部標準は、試料のシグナルが同定のために比較される参照シグナルのセットを提供する。 20

【0183】

図3に示すCCDカメラに基づく画像処理装置は、蛍光がシグナル特性として使用される場合に、広域画像処理のために使用する有用な装置である。この装置は、以下の実施例の多くについてデータを収集するために使用された。励起光は、高強度白色光源（1000Wキセノンアークランプ、モデルA-6000、Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ）から、液体光導体（5mmコア直径、モデル380、Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ）に光を導入することによって提供された。液体光導体は、光を励起フィルターホイール（BioPoint FW, Ludl Electronics, Hawthorne, NY）に運び、そしてフィルターを通ったビーム（代表的には、直径9mm）を標識された標的を含む検出表面に指向させる。図3に示された装置は、種々の検出表面（例えば、マイクロタイターウェル、顕微鏡スライド、カバーガラス、および平らな、光学的に透明な底を有するチューブ）上で標識された標的を検出し得る。入射光は検出表面に当たり、カテゴリ結合分子を介して標的に結合するシグナリング部分中で蛍光を誘発する。放射された蛍光の一部が高集光効率レンズシステムによって集光され、そして放射フィルターホイール（BioPoint FW, Ludl Electronics）を通してCCDカメラ（Orca II, Hamamatsu, Bridgewater, NJ）に伝達される。光学的方向の設計および構成は、当業者に公知の原理および実務に基づいている。 30

【0184】

以下の実施例の実験は、実施例3に図解される機器を使用し、これは、試料用容器（例えば、マイクロタイタープレート）を、励起および集光用の光学機器にわたって移動させるためのX-Y位置決めステージ（BioPoint XY, Ludl Electronics）を備える（このステージは図には示されていない）。Image-proおよびImage-Proアドインはすべての機器の要素および画像の獲得を制御する。フィルターホイールは、ScopeProアドイン（Media Cybernetics, Baltimore MD）で管理され、そしてStageProアドイン（Media Cybernetics, Baltimore MD）はステージの位置を処理するのに対して、カメラの制御はハママツオルカII（Hamamatsu Orca II）ドライバー（Hamamatsu, Bridgewater, NJ）を介する。Image-Pro Plusもまた、以下に記載するように、画像処理および分析のために使用される。 40

【0185】

試料領域の中程度の解像度の画像をキャプチャーする低コストカメラが使用され得る。 50

代表的な感染疾患に適用するためには、各試料は20×20mmの試料領域にわたって散らばった、1個の標的～10,000個の標的のオーダーを有することが予想される。単一の、非系状の、原核生物は、直径10μm未満の点光源として見えることが予想される。コスト意識のある医学的診断の研究室において実行される日常的な試験のために、中程度の解像度のカメラが使用され得る。例えば、優れた感度およびノイズの特性を有する高価でないカメラ（例えば、Roper ScientificのSenSys CCD）が容易に利用可能である。これらのシステムは、代表的には、500×500ピクセルまたはそれ以上の解像度を有する。20mm四方の試料領域を500×500ピクセルの解像度で画像化することは、250,000ピクセルを提供し、これは、代表的なアッセイ法において予想される1標的～10,000標的の大部分を区別するのに十分であり、それ以上のものである。

10

【0186】

より高感度のカメラを選択することによって、画像処理システムの感度が増大され得る（例えば、より低い温度にまで冷却したカメラ、または背部が薄くなったチップを使用するカメラ）。あるいは、検出感度および解像度は、ライン走査システムを実行することによって増大され得る（例えば、BT Image Array; Hamamatsu）。ライン走査のために、リニアCCDまたは光ダイオードアレイ（例えば、1×500または1×1000ピクセル）が画像をキャプチャーするために使用される。1つの次元における解像度は、アレイエレメントの数に対応するのに対して、2番目の次元は、一般的に、リニアアレイの下に垂直的に試料スライドを移動させることによってキャプチャーされる。より少ないエレメントが存在するので、同様の感度のリニアアレイは、代表的には、領域形式のCCDカメラよりもより安価

20

【0187】

白色光照射を使用する本発明の実施態様は、各々の蛍光団について最適な励起ピークを供給するためのスペクトルフィルターを使用する。白色光スペクトルは広いため、広範な種々の蛍光団が重複する放射スペクトルを除外するように選択可能である。白色光照射装置を用いて達成可能な代表的なスポットサイズ（例えば、2mm～5mm）は、広域画像処理に適切である。フィルターの変更は比較的単純であり、かつ自動化できるので、白色光のシステムは非常に適合性があり、同じ装置が別個の蛍光団のセットを使用する試験に使用可能である。

【0188】

図3に示すシステムの集光効率は、2つの要素：集光対物レンズおよび焦点エレメントからなる、カスタム設計の集光装置を組み入れることによって最大化される。この集光対物レンズは高い集光効率（ $f\#/1.2$ ）を有し、比較的平行なビームを出力する。焦点レンズは集光対物レンズからの光出力を捕捉し、そしてそれをCCDの検出表面に焦点を合わせる。この光学機器は、2つの部分に設計されており、フィルターホイールは集光レンズの光路に挿入可能である。本発明の特定の実施態様、例えば、フィルターの変更を必要としないいくつかの実施態様のために、高い集光効率を達成するには、先細りした光ファイバー繊維を含むことが所望され得る。この光ファイバー繊維は、試料に対して近位で光を集光し、およびCCDチップに直接光を伝達する繊維を含む。あるいは、本発明は、試料がCCDチップに直接適用されるか、またはCCDチップに非常に近接して適用される（最も高い感度のために、背面が薄いCCDチップの背面に適用される）ような直接的な近位検出を使用して、シグナルを非常に高感度に検出し得る。

30

40

【0189】

白色光、上記のマルチスペクトルシステムに加えて、本発明者らはまた、非拡大的な広域画像処理のための、より単純な単色蛍光画像処理システムを開発した。このシステムにおいては、励起光は532nm周波数二重ダイオードレーザー（50mMW，モデル#BWT-50E，B&W Tek，Newark，DE）によって供給される。角度を付けた照射を使用するこのシステムは、図3に示される。

【0190】

図3に示される検出システムが単色光であるので、フィルターホイールは必要ではない

50

。単一の励起フィルター（モデルHQ532/10x, Chroma Technology, Brattleboro, VT）により高調波スペクトルがレーザー出力から除去され、かつ単一の放射フィルター（モデルHQ620/60m, Chroma Technology, Brattleboro, VT）により、特定の蛍光シグナルのみをCCDカメラにまで通過させる。これらのシステムはまた、画像をキャプチャーするために、以前に記載したものよりも安価なCCDカメラ（モデルKX-2E, Apogee CCD, Auburn, CA）を使用する。これらの図に示す機器は、複数のレーザーおよびフィルターセットを組み入れることによって多色分析に容易に適用され得る。

【0191】

検出表面上に標的を沈着させるための手段が、検出システムに組み入れられてもよい。例えば、磁気ステーションが機器に組み込まれ得る。磁石（Dexter Laboratories）が、9 10
6ウェル形式マイクロタイターディッシュの底面に磁気ビーズを沈着させるために構成され得る。自動化ステージを使用して、マイクロタイターディッシュを、磁気ビーズが沈着するのに十分な時間をかけて、磁石を越える位置にまで移動し、そしてウェルの底面に標的を結合させる（一般的に、数分間が必要である）。次いで、マイクロタイターディッシュを磁気ステーションから移動し、ウェルを個々に画像化する。

【0192】

選択のための他の手段はまた、検出機器を含むシステムに組み入れられ得る。例えば、濾過ステーションが、標的をフィルター上に沈着させるために使用できる。これは、次いで、自動的に画像化され得る。同様に、標的は、オンボード遠心分離機における遠心分離によって検出表面法に沈着され得る。高密度の粒子を用いて標識された標的の重力による 20
選択では、単に検出機器内のインキュベーションを必要とする。

【0193】

他のモジュールは、検出装置を備えた機器システムに接続するか、またはそれに組み入れられてもよい。試料容器（例えば、マイクロタイターディッシュ）を扱うための自動化モジュールは1つの例である。

【0194】

本発明に組み入れられるCCDカメラは、一般的に、積算のために十分な時間、10秒間～約2分間（カメラの感度に依存）、累積したカメラのノイズが最小となるように、-5 ~ -20 の間の温度に冷却される。一般に、積算時間をより長くすると、延長された時間にわたって蛍光団から放射される光子の集光が可能になることで、より高い感度が提供される 30
。長い積算時間はライン走査のためには不適切である；しかし、感度の増大と、非常に高い量子効率とを有する、背面が薄い利用可能なリアアレイが存在する。

【0195】

本発明はまた、シグナルの検出および解読のために干渉計に基づくスペクトル画像処理を使用し得る（Schrock, E., 1997, 前出）。この技術を使用して、シグナリング部分によって放射または散乱された光は、2つの光路に分けられ、プリズムを通され（その結果、異なる波長は異なる距離を移動する）、そして干渉パターンを作製するために組換えることが許容される。干渉パターンのフーリエ解析は、画像の各点についての分光写真を生成する。

【0196】

または、写真フィルムを使用して、試料中の標的の画像を安価に記録してもよい。シグナリング特性が化学発光である場合、このアプローチは最も容易に実施される（例えば、実施例15を参照されたい）。 40

【0197】

画像処理検出器をシグナリングを使用する本発明の実施態様については、コンピュータソフトウェアが標的を同定および定量する。一般的に、ソフトウェアは：（1）照射の不均一性を修正する；（2）必要な場合、逆重畳積分マトリックスを通して蛍光のクロストークを修正する；（3）必要な場合、基材上に刻印された登録標識を使用して画像を整列させる；（4）標的を他のシグナルから区別するためのアルゴリズムを実行する；（5）試料中の各々の画像化された標的に身元を割り当てる；（6）各カテゴリーにおける標的の 50

総数を計算する；(7) 試料の同定のために試料のバーコードを画像化および記録する；
ならびに(8) 出力データ(内部標準および試料データを含む)、画像、およびバーコードを、ウェブブラウザインターフェースを介して照会可能なデータベースに自動的に保存する。市販の画像分析パッケージがこれらの機能を提供するために使用され得る。多色画像分析のためのソフトウェアパッケージが使用され得る(例えば、Image-Pro, Media Cybernetics; MetaMorph, Universal Imaging, MatLab, The Mathworks)。

【0198】

本発明は、個々に散らばった標的を計数できるが、標的は、物理的に連結されているか(例えば、糸状菌の場合)、または重複もしくは同時発生的であり得る。従って、本発明とともに使用されるソフトウェア分析パッケージは、好ましくは、画像処理した領域にわたってシグナルシグニチャーについてシグナル強度を積算することによって標的を定量するモジュールを含む。試料中の標的の数は、しばしば、試料の画像の積算されたシグナル強度を、内部標準対照における個々の標的の平均シグナル強度と比較することによって決定され得る。このソフトウェア定量モジュールは、好ましくは、多数の試料についての出力を「ゴールド標準」方法に対して比較することによって標的の各々のタイプについて「調整」される。例えば、糸状菌を含む試料は、好ましくは、顕微鏡的な定量に対する比較によって較正されたソフトウェアモジュールを使用して定量される。または、特定の細菌については、微生物培養による定量または染色された細菌の顕微鏡的検査による定量は、ソフトウェアを較正するために使用され得る。以下の実施例では、本発明を使用して得られる画像のソフトウェア分析の特定の例を提供する。

10

20

【0199】

以下に続く実施例の多くで収集された蛍光データを分析するために使用されたソフトウェアパッケージおよび方法をここで概観することは有用である。検出表面は蛍光標識された複合体の数および/または全体の蛍光シグナルを測定するために画像処理される。蛍光は、アッセイコンテナの底からCCDカメラによって捕捉され、そしてピクセルの位置および強度の記録を含むTIFF(Tagged Image File Format)画像ファイルとして保存された。3つのアプローチが、アッセイ結果を定量するために使用された。画像処理された検出ゾーンの全体の集積されたシグナルは、すべてのピクセルからの蛍光シグナルを合計することによって決定された。試料から積算されたシグナルは、陰性対照のそれと比較された。全体の積算されたシグナルを測定することは、多数の標的を含む試料に対してとりわけ有用である。第2のアプローチは、検出領域中の対象物を計数することであった。第3のアプローチは、蛍光対象物中に含まれるすべてのピクセルの強度を積算することであった(画像中のすべてのピクセルの強度を合計することとは反対に)。すべての画像分析は、Image-Pro v4.0(Media Cybernetics, Silver Springs, MD)を使用して実行された。

30

【0200】

全体の積算シグナルを得ることは、コンテナの底を表す画像(関心対象の領域)上の領域を最初に規定することによって達成された。Image-Proは、関心対象の領域が、単一の対象物に転換されることを可能にし、そして他のImage-Proツールは、この対象物中に表されるピクセルの全体のシグナルが合計されることを可能にする。次いで、標的が加えられていないアッセイコンテナからの同様の画像が同様の方法で分析され、かつ陰性対照として使用された。陰性対照の値は、標的を含む試料の値から減算された。このことは、アッセイノイズと電子的ノイズの両方を除去する。

40

【0201】

第2および第3の定量方法は、Image-Proの対象発見ユーティリティを使用した。このユーティリティは、自動的にまたはユーザー定義された閾値より上の値(シグナル)を有した近接するピクセルを結合させる。このことは、対象の周囲に輪郭線を確認する。周囲のピクセルおよび内部のピクセルは対象として定義され、そしてこれらのピクセル値を合計することは対象の集積値を生じる。次いで、試料コンテナの底を示す、目的の領域中のすべての対象物は分析ソフトウェアを使用して自動的に計数され、そしてさらに、見つかったすべての対象物の集積シグナル強度が計算され得る。

50

【0202】

IPP Image-Proマクロ言語を使用して、上記のユーティリティーは一度にいくつかの画像のバッチ処理を可能にするように自動化され得る。さらに、データは、他のユーザー定義されたIPPスクリプトを用いて操作され得る。例えば、特定のサイズ(領域)または強度を、下回るまたは上回る対象物は、含まれても排除されてもよい。これは、ほこりを排除するための有用な手段であり得る。

【0203】

実施例

以下の実施例は、応用の範囲と関連した使用のための本発明の種々の実施態様を実施するための技術的詳細を提供する。この実施例は限定を意図するものではない。

10

【0204】

実施例1. 蛍光DNA結合染色剤で標識した個々の細菌の広域画像処理

概要: この実施例は、拡大なしで多孔性膜上の個々の細菌細胞を検出するための本発明の使用を実証する。大腸菌の細菌細胞標的を蛍光核酸染色剤で標識し、メンブレンを通して濾過し、そして広域画像処理を使用してCCDカメラを用いて蛍光画像をキャプチャーした。

【0205】

実験方法: 大腸菌ATCC 8739の培養は、トリプチケースソイブロス(Trypticase Soy Broth) (TSB, BDカタログ番号211822)中で、37℃、18時間増殖させた。細胞の1mlアリコート、微量遠心分離機で遠心分離し、等量の水に再懸濁した。細胞を、1mlのアリコートを100倍で5分間加熱することによって死滅させた。核酸染色剤シーバークリーンI(Molecular Probes; カタログ番号S-7563)を、死滅した細胞に「10×」の最終濃度まで添加した(シーバークリーンIのストックは10,000×と定義される)。染色された大腸菌細胞を水で段階希釈し、真空濾過装置およびプラスチックファンネルキャップ(Millipore Microfil V User Guide, PF07114, Rev A 3/00)を使用して、0.22μmブラックポリカーボネート濾過メンブレン(Osmonicsカタログ番号K02BP04700)を通して濾過した。蛍光を、広域画像用の非拡大的CCD画像処理装置(上記の工程6; 図3において記載した)を使用して、FITC光学フィルターセット(色度/励起470/40nm、放射522/40nm)を用いて検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1(Media cybernetics)を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。

20

30

【0206】

結果: 図7の左のパネルは、シーバークリーンIで染色し、および非拡大的広域画像処理を使用して画像処理した個々の大腸菌細胞を示す。白色スポットとして見られる蛍光シグナルの数は、使用された希釈および視野の面積に基づいて、予測された約100個の大腸菌細胞の数と相関する。右のパネルは、細胞が同一の様式でメンブレンを通して濾過「されず」および画像処理され「なかった」陰性対象を示す。

【0207】

実施例2. DNA結合蛍光色素で染色した単一の細菌の広域画像処理

概要: この実施例において、カバーガラス上での広域画像処理を使用して、蛍光核酸染色剤で標識された単一の大腸菌の細菌細胞標的を検出した。染色された細胞を白色光で照射し、CCDカメラで画像処理した。

40

【0208】

実験設計: 大腸菌MG1655の培養は、LBブロス(BD; Sparks, MD)中で、37℃、18時間増殖させた。細胞を、ヒートブロック中で、18時間培養物の1mlアリコートを、95℃まで、5分間加熱することによって固定した。核酸染色剤シーバークリーンI(Molecular Probes; カタログ番号S-7563)を、固定した培養物に添加し、染色剤ストックの1:1000希釈を達成した(999μlの熱固定培養物に1μlのシーバークリーンIのストック(10,000×))。大腸菌細胞を10分間染色した。次いで、細胞を、11700gで10分間、微量遠心分離機で遠心分離した。上清を除去し、そして細胞のペレットを等量の水(タイプ1品質)に再懸濁した。染色した細胞を段階希釈し、10⁸~10⁴細胞/mlの範囲の濃度を達成した。1:10希釈の

50

ポリ-L-リジン溶液（45mlのタイプ1の水に5mlのポリ-L-リジン（Sigma Diagnostics；カタログ番号P-8920））にスライドを浸すことによって、Corning No.1 1/2カバーガラスをポリ-L-リジンでコートした。コートされたカバーガラスを1回水（タイプ1品質）で洗浄し、そして風乾させた。希釈した染色した細胞の5 μ lアリコートをし、ポリ-L-リジンカバーガラスにピペティングし、そして室温で乾燥させた（約20分間）。蛍光を、CCD画像処理装置（上記の工程6；図3において記載した）を使用して、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を用いて検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。画像処理装置で検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えるAxioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用することによって、大腸菌であると確認した。 10

【0209】

結果：図8は、シーバークリーンIで染色した細胞を、非拡大的な広域画像処理を使用して検出したことを示す。白色スポットとして見られる蛍光シグナルは、高拡大蛍光顕微鏡法（1000倍；図8）を使用することによって、単一の大腸菌細胞またはグループ化された細胞のいずれかに対応することが示された。

【0210】

実施例3．蛍光標識されたオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子へのハイブリダイゼーションによって標識された個々の細菌の広域画像処理

概要：この実施例において、広域画像処理を使用して、蛍光標識されたオリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子への細胞rRNAのハイブリダイゼーションによって標識された、単一の大腸菌細胞標的を検出した。細胞を実施例2と同様に画像処理した。 20

【0211】

実験手順：大腸菌細胞を実施例2と同様に増殖させた。細胞を、PBS中2.5%のホルムアルデヒド溶液中で、室温で30分間固定した。細胞を、11,700gで10分間、微量遠心分離機で遠心分離し、続いて細胞のペレットを等量のPBSに再懸濁することによって「洗浄」した。細胞を、前と同様に遠心分離し、50%エタノール中で再懸濁し、20 $^{\circ}$ Cで14時間放置し、そして上記のようにPBSで洗浄した。次いで、細胞を前と同様に遠心分離し、そしてハイブリダイゼーション緩衝液（1M NaCl/50mM EPPS/0.5% トウイーン20/0.4 μ g/ μ l 酵母t-RNA/2%ブロッキング剤（ここでブロッキング剤は100mMマレイン酸 pH7.65/150mM NaCl /10%ブロッキング剤（Boehringer Mannheim）であった））中に再懸濁した。次いで、細胞を49 $^{\circ}$ Cで30分間インキュベートした（プレハイブリダイゼーション工程）。FITC結合体化DNAリボソームプローブ（1 μ l；Synthetic genetics） 30

5' FITC-GCTGCCTCCCGTAGGAGT

）を添加し、そして細胞を49 $^{\circ}$ Cで1時間インキュベートした（ハイブリダイゼーション工程）。ハイブリダイゼーションの後、細胞を洗浄緩衝液（PBS-TB）で洗浄し、49 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。洗浄工程をさらに2回反復して、合計3回の洗浄を行った。標識された細胞（5 μ l）を、ポリ-L-リジンコートされたカバーガラス上に沈着させ（実施例2に記載）、そしてCCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）を使用して画像処理した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。 40

【0212】

蛍光顕微鏡（1000倍；図8）を使用する試料の検査を使用して、非拡大的なデジタル画像におけるスポットが大腸菌細胞に対応することを確認した。

【0213】

結果：FITC結合体化大腸菌特異的rRNAオリゴヌクレオチドプローブを用いて大腸菌細胞を探索後、個々の細胞はCCD画像処理装置を使用して容易に見られた（図8）。白色スポットとして見られる蛍光シグナルは、高拡大蛍光顕微鏡法（1000倍；図8）を使用することによって、単一の大腸菌細胞またはグループ化された細胞のいずれかに対応することが示 50

された。

【0214】

実施例4. 蛍光標識されたPNAカテゴリー結合分子へのハイブリダイゼーションによって標識された単一の細菌の広域画像処理

概要：この実施例において、広域画像処理を使用して、蛍光標識されたPNAカテゴリー結合分子への細胞rRNAのハイブリダイゼーションによって標識された、単一の大腸菌の細菌細胞標的を検出した。細胞を実施例2と同様に画像処理した。

【0215】

実験手順：大腸菌細胞を実施例2と同様に増殖させた。細胞をハイブリダイゼーションのために調製し、そして、PNAマイクロDxフィッシュ試薬キット (Boston Probes; カタログ番号KT11000) において製造者によって指示されるように、大腸菌に特異的なPNAプローブを用いてハイブリダイズさせた。標識された細胞 (5 μ l) を、実施例2と同様に、ポリ-L-リジンコートされたカバーガラス上にスポットし、そして画像処理した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1 (Media cybernetics) を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。 10

【0216】

結果：図8は、蛍光団標識種特異的PNAプローブでタグ化された単一の細菌細胞を拡大なしで広域CCD画像処理によって検出したことを示す。CCDを用いて得られた画像中の白色スポットは、高拡大蛍光顕微鏡法 (1000倍; 図8) を使用して同じ試料を分析することによって、単一の大腸菌細胞またはいくつかの細胞の群のいずれかに対応することが示された。 20

【0217】

実施例5. 蛍光標識された抗体への結合によって標識された単一の細菌の広域画像処理

実験手順：細胞を実施例2と同様に増殖させた。FITC標識ウサギ抗大腸菌ポリクローナル抗体 (1:200希釈; Biotools; カタログ番号C65110M) を、 $10^5 \sim 10^2$ 細胞/mlの範囲の細胞の希釈液に添加し、そして室温で1時間インキュベートさせた。次いで、遠心分離 (11,700g、10分間) によって細胞をスピンドウンし、そしてPBT中に再懸濁することにより、細胞を2回「洗浄」した。次いで、洗浄した細胞を、実施例2と同様に、ポリ-L-リジンコートされたカバーガラス上にスポットした。CCD画像処理および顕微鏡による確認を、実施例2に記載されるように実行した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1 (Media cybernetics) を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。 30

【0218】

結果：図8は、蛍光団標識カテゴリー特異的抗体プローブでタグ化された単一の細菌細胞を拡大なしで広域CCD画像処理によって検出したことを示す。CCDを用いて得られた画像中の白色スポットは、高拡大蛍光顕微鏡法 (1000倍; 図8) を使用して同じ試料を分析することによって、単一の大腸菌細胞またはいくつかの細胞の群のいずれかに対応することが示された。

【0219】

実施例6. 蛍光発生性エステラーゼ基質で染色した個々の生きている細菌の広域画像処理 40

概要および目的：この実施例において、広域画像処理を使用して、蛍光発生性エステラーゼ基質 (シグナリング部分) の組み合わせで染色した個々の生きている大腸菌の細菌細胞標的を検出した。この基質は、インタクトな生きている細胞の細胞膜 (ここで、代謝的に活性な細胞において見い出されるエステラーゼ酵素が作用する場合、基質は蛍光性および電荷の両方を帯びることとなる) を通して拡散し得る。これらの電荷をおびた生成物は、もはや細胞膜を通して受動的に拡散することはできず、インタクトな細胞によってトラップされる。この技術は、生きている細胞を死滅した細胞から区別することが重要である場合に有用であり得る。なぜなら、活性なエステラーゼおよびインタクトな細胞膜を有する細胞のみが適切に染色されるからである。この実施例において、生きている細胞または死滅した大腸菌細胞のいずれかをブラックポリエステル膜を通して濾過し、蛍光 50

発生性基質フルオレセインジアセテート (FDA) およびカルボキシフルオレセインジアセテート (CFDA) とともにインキュベートし、そして非拡大的な広域 CCD 画像処理を使用して画像処理した。

【0220】

実験方法：大腸菌 ATCC 8739 をトリプチケースソイブロス (TSB, BD カタログ番号 211822) 中で一晩増殖させ、大量の細胞を遠心分離し、上清を除去し、そして等量の PBS 中でペレットを再懸濁することによって 1 回洗浄した。死滅した細胞は、洗浄した細胞の 1ml アリコートに 100、20 分間加熱することによって調製した。生きている細胞および死滅した細胞の両方の適切な希釈物を、PBS 中で作製した。ミリポア (Millipore) 1225 マニホールドを使用して、細胞を、吸着パッド (Chemunex カタログ番号 200-C3012-02) 上に装着した 10
ブラックポリエステルメンブレン (Chemunex カタログ番号 200-C2010-01) を通して濾過した。濾過 マニホールド中になお存在する間、細胞に、500 μ l の濾過した TSB を重層し、そして 30 で 60 分間インキュベートした。培地を、メンブレンを通して吸引し、そして 500 μ l の ChemSolB16 (Chemunex カタログ番号 200-R2023-02) 中、20 μ M CFDA (Molecular Probes カタログ番号 C-195)、10 μ M FDA (Polysciences カタログ番号 00615) で置き換え、そして 37 で 60 分間インキュベートした。試薬をメンブレンを通して吸引した。マニホールドを分解し、ポリエステルメンブレンをガラススライド上に装着し、そして乾燥させた。ポリエステルメンブレン上の蛍光シグナルを、FITC 光学フィルターセット (色度/励起 470/40nm、放射 522/40nm) を用いて、CCD 画像処理装置 (上記の工程 6; 図 3 において記載される) を使用して捕捉した。Image-Pro Plus ソフトウェア、バージョン 4.1 (Media cybernetics) を使用して、CCD 画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。 20

【0221】

結果：図 9 は、生きている大腸菌細胞 (左のパネル) が明るい蛍光スポットとして検出されるのに対して、死滅した大腸菌細胞 (右のパネル) が検出可能な蛍光シグナルを有しないことを示す。生きている細胞の視野におけるスポットの数は約 400 であり、これは、フィルターに加えられた細胞の希釈物および視野の面積に基づく予測される細胞の数とよく相関する。

【0222】

変法 (variation)：生きている細胞または死滅した細胞を区別する他の色素が使用され得る。例えば、細胞膜と交差反応し得るか、または交差反応し得ない他の蛍光発生性基質または DNA 染色剤が、FDA および CFDA の代わりに、またはこれらと組み合わせて使用され得る。複数の染色剤および色素が、蛍光検出のための複数の励起波長および放射波長を使用することによって区別され得る。対象物と結合された蛍光のスペクトルは、細胞が生きてると計数されるかまたは死滅していると計数されるかを決定するために使用され得る。さらに、特定のタイプの細菌の生化学的活性について特異的である蛍光発生性基質が、その存在を決定するために使用され得る。例えば、蛍光発生性の β -ガラクトシダーゼ基質は、大腸菌に特異的である、 β -ガラクトシダーゼによるその蛍光生成物に切断され得る。 30

【0223】

実施例 7. 高度に蛍光性の粒子で標識された個々の細菌の非拡大的な広域画像処理 40

概要：この実施例において、広域画像処理を使用して、高度に蛍光性の粒子で標識された個々の大腸菌の細菌細胞標的を検出した。個々の細菌：粒子複合体を、3つの別個の波長の光で照射し、そして実施例 2 と同様に CCD カメラで画像処理した。

【0224】

実験手順：大腸菌 MG1665 培養物を、LB ブロス (BD, Sparks, MD) 中で 37、18 時間増殖させた。大腸菌細胞を、光学的に透明な底を有するマイクロタイタープレート (Greiner America, Inc.; カタログ番号 655896) に、ウェルあたり 10^5 細胞の最終濃度で加えた (50 μ l あたり 10^5 細胞)。次いで、マイクロタイタープレートを、細胞を含む溶液が完全に乾燥するまで、ヒートブロック上で 95 に加熱した。核酸染色剤であるシーバークリーン I (Molecular Probes カタログ番号 S-7563) を、固定した培養物に、染色ストックの 1:100 50

0希釈を達成するように加えた(999 μ lの熱固定した培養物に1 μ lのシーバークリーンIストック(10,000 \times))。染色剤に10分間曝した後、細胞を水で2回「洗浄」した(各洗浄について200 μ l、続いて吸引)。希釈していないヒツジ血清(Fitzgerald;カタログ番号88-NS55)を各ウェルに加え、室温で30分間インキュベートした。ウェルを吸引し、次いで、ヒツジ血清中で1:500に希釈したウサギ抗大腸菌抗体(Biodesign;カタログ番号C65110M)を適切なウェルに加え、そして37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。次いで、ウェルを3回洗浄した(洗浄溶液1(PBT)で2回、洗浄溶液2(PBS-B)で1回)。次に、ヒツジ血清中で1:500に希釈したビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG抗体(Jackson;カタログ番号111-005-003)を適切なウェルに加えた。抗体を、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートした。ウェルを洗浄溶液1で2回洗浄し、洗浄溶液2で1回洗浄した。アビジンコートしたテキサスレッド蛍光粒子(0.45 μ m; Spherotech;カタログ番号VFP-0562-5)を、すべてのウェルにウェルあたり10⁵粒子の最終濃度で加えた。プレートを、室温で一晩インキュベートした。次いで、ウェルを溶液1で5回洗浄し、続いて水で2回洗浄した。蛍光を、シーバークリーンIについてはFITC光学フィルターセット(色度/励起470/40nm、放射522/40nm)、アビジンコートしたテキサスレッド赤色粒子についてはテキサスレッド光学フィルター(色度/励起560/55nm、放射645/75nm)、およびSyber Green染色細胞とテキサスレッド粒子の両方を見るためにはGFPロングパスフィルターセット(色度/励起470/40nm、放射500LP)を備えたCCD画像処理装置上で画像処理することによって(詳細な説明の節の工程6に記載され、図3に示されるように)検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1(Media Cybernetics)を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。画像処理装置上で検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えたAxioplan II蛍光顕微鏡(Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY)を使用することによって、個々の大腸菌細胞であることを確認した。

10

20

30

【0225】

結果: 図10は、非拡大的な広域CCDに基づく画像処理を使用した、カテゴリー特異的抗体および蛍光粒子シグナリング部分でタグ化された個々の大腸菌細胞の検出を示す。白色スポットとして見える蛍光シグナルは、高拡大蛍光顕微鏡(1000倍; 図10)を使用することによって、複数の粒子を有する個々の大腸菌細胞であるか、または粒子で取り囲まれた細胞の群であるかのいずれかに対応することが示された。これらはアビジンコートされた粒子であった。細胞は、群特異的抗体で、次いで抗-抗体-ビオチン、次いでアビジン粒子で標識された。

【0226】

実施例8. 非拡大的な広域画像処理を使用して個々の細菌を検出する同種イムノアッセイ法

目的: この実施例は、個々の細菌細胞を検出するためのイムノアッセイ法を実証し、これには、少数の病原性大腸菌O157:H7細胞を検出するための使い勝手のよい同種イムノアッセイ法が含まれる。

【0227】

図11は、この実施例および引き続く実施例において使用される同種アッセイ法のアプローチを図示する。同種イムノアッセイ法は診断において好まれる。なぜなら、これらは、単純、迅速、安価、および容易に自動化可能であるからである(同種は、ここで使用される意味においては、抗体および分析物の結合が、試薬および試料を混合した後で検出されるが、未反応のカテゴリー結合分子のカテゴリー結合分子: 標的複合体からの物理的な除去(例えば、吸引による除去))を伴わないことを意味する。しかし、大部分の同種イムノアッセイ法は、非感受性(核酸増幅のような方法と比較して)、非定量的、および非多重化的(または非常に浅い程度に多重化される)である。ここで、対照的に、本発明は、感受性であり、定量的であり、および多重化される同種イムノアッセイ法を作製するために使用される。

40

【0228】

この実施例において、大腸菌O157:H7細胞を含む試料を磁気および蛍光粒子と混合し、

50

磁氣的に選択し、そして非拡大的な広域CCD画像処理を使用して画像処理した。洗浄工程は必要でなかった。

【0229】

実験方法：抗大腸菌磁気粒子を、活性トシル基を有する磁気粒子 (DynaI, Oslo, Norway, カタログ番号140.03) を大腸菌0157:H7細胞に対して惹起されたポリクローナル抗体 (BioTraceアフィニティー精製; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, カタログ番号01-95-90) にカップリングすることにより作製した。磁気粒子 (30mg/ml; 100 μ l; Dynal, Oslo, Norway, Dynaparticles M-280 Tosylactivatedカタログ番号140.03) を、粒子の磁気選択を使用して微量遠心チューブ (1.5ml) 中でPB (3回の洗浄の反復、各1ml) 中で洗浄し、続いて上清の除去を行った (この実施例におけるすべての磁気分離は、注記する以外は、Polysciences Inc.; カタログ番号8MB4111Sからの装置を使用して実行した)。粒子を、PB (70 μ l) に再懸濁した。大腸菌0157:H7に対して惹起された、アフィニティー精製されたポリクローナル抗体 (60 μ g; Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, カタログ番号01-95-90) を、遠心分離濾過装置 (Millipore MicroconモデルNo.YM-30) を通して製造業者の指示書に従って、名目上の分子量限界30,000ダルトン、製造業者から入手した溶液を通過させることによって精製した。フィルター上に収集された抗体を、PB (30 μ l) に再懸濁した。抗体 (30 μ l) を、微量遠心チューブ (1.5ml) 中で磁気粒子 (70 μ l) と合わせ、手短かにボルテックスした。この反応物を、回転機を用いて (特に注記されない限り、約30rpm)、37 $^{\circ}$ で20分間インキュベートした。20分後、BSA (IgGフリー) を0.1%の最終濃度で加え、そして回転させながら37 $^{\circ}$ で一晩インキュベートした。磁気粒子をPBS-Bで2回洗浄した (各1ml; 磁気分離を使用)。この磁気粒子を緩衝液 (0.1% (w/v) BSA (IgGフリー) を補充した、0.2Mトリス pH8.5) 中に再懸濁し、そして回転させながら37 $^{\circ}$ で4時間インキュベートした。最終的に、磁気粒子を2回洗浄し (磁気粒子を使用して、PBS-B中で)、そして再懸濁した (最終濃度はPBS-B中1%固体)。

【0230】

抗大腸菌蛍光粒子を、磁気粒子をコートするために使用する同じ抗体の受動的吸着によって蛍光粒子 (Fluospheres; Molecular Probes, Sulfate Microspheres, 1 μ m, 赤色蛍光 (580/605) カタログ番号F-8851) をコートすることによって作製した。ウサギ抗カンジダ・アルピカンス (Candida albicans) 抗体 (1.25nmolタイプAポリクローナル精製IgG; Biodesignカタログ番号B65411R, ロット番号3B03200) 抗体を上記に記載したように精製した。表面硫酸基に抗体を受動的に吸着させるために、粒子 (62.5 μ l; 2%固体; Molecular Probesカタログ番号F8851、1 μ m、赤色蛍光 (580/605)) を、遠心分離によって反復して (3回反復) 洗浄し (5分間; 10,200 \times g; Eppendorf Centrifugeモデル5417C、Eppendorf Swinging Bucket RotorモデルA-12-11)、そして粒子ペレットを再懸濁した (1ml PBS/.15M NaCl)。この粒子ペレットをPBS (125 μ l、濃度は1%固体) 中に再懸濁し、続いて精製した抗体をボルテックスしながら滴下して加えた (1nmol抗体/mg粒子の比で1.25nmol)。懸濁物を回転させながら25 $^{\circ}$ で2時間インキュベートし、続いて4 $^{\circ}$ で一晩インキュベートした。粒子を洗浄し (上記のように3回反復、しかしPBS-TB中で遠心分離後再懸濁)、PBS-TB (200 μ l) 中に再懸濁し、そして回転させながらインキュベートした (25 $^{\circ}$ で30分間)。粒子を、上記のように2回洗浄し、そしてPBS-TB中で再懸濁した (125 μ l、濃度は1%固体)。

【0231】

粒子調製の後、大腸菌0157:H7 (DEC 3B株、Tom Whittam博士、Pennsylvania State University) の接種物 (一晩培養もの200 μ l) を培養し (200ml LB; 4時間; 250rpm、37 $^{\circ}$)、そして以下のように段階希釈物を播くことによって滴定した。培養物を、さらなる増殖を妨害するために氷上ですぐに播いた。10mlアリコートを、細菌を含む培地への直接的なホルマリンの付加によって固定した (最終濃度 = 2.5%)。培養物のアリコート (100 μ l) の段階希釈を作製し (PBS中1:10)、そして各希釈物のアリコートを、固定した細菌のストック溶液中の細菌の濃度を決定するために播いた。このストック溶液は、 1×10^6 細菌

菌/mlの濃度を達成するように希釈した。ストック溶液(1ml)を、遠心分離(950×g)および再懸濁(1ml; PBS)、続いてPBS(1ml)中の細菌ペレットの再懸濁によって洗浄した。

【0232】

抗大腸菌磁気および蛍光粒子(10μlあたり各タイプ 1×10^6)の混合物を超音波処理した(1分間; 設定8; Fisher Scientific 550 Sonic Dismembrator)。96ウェルガラス底プレート(Whatman Inc., Clifton, NJ, カタログ番号7706-2370)のウェルを、Gel Slick(Biowhittaker Molecular Applications, カタログ番号50640)を用いて1分間処理した。このGel Slickを吸引によって除去し、各ウェルへの滅菌水の付加、続いて吸引によって3回洗浄した。ウェルを5分間乾燥させ、その後試料を加えた。ウェルに緩衝液(PBS-TB; 6ウェル各々に115μl)または血液(6ウェル各々に115μl)を加え、続いて、超音波処理した粒子スラリー(各ウェルに10μl)を加えた。固定した大腸菌0157:H7細胞(10μl中に 1×10^3)を、緩衝液を含む3つのウェルおよび血液を含む3つのウェルに加えた。ウェルを、保存マット(Corning COSTAR, カタログ番号3080)を使用してシールした。試料を、回転させながら(30rpm; Dynal Sample Mixer, Oslo, Norway, カタログ番号947.01)室温で1時間インキュベートした。磁気粒子を、磁気分離装置(Dexter Magnetics, Silver Spring, MD, LifeSep, カタログ番号2501008)を使用することによって、ウェルの底の検出表面上で捕捉した。

10

【0233】

血液中の個々の細菌細胞を検出する同種イムノアッセイ法の効力を試験するために、マウスの血液中で実行されたイムノアッセイを、図3Aに示すようにCCD画像処理装置を使用して画像処理した。検出領域の画像、すなわち、マイクロタイターウェルの光学的に透明な底を、テキサスレッドフィルターセット(励起560/55、放射645/75)(20msec露出)およびImage-Pro Plusデジタル画像処理ソフトウェア(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)を使用してキャプチャーした。次に、洗浄工程を組み入れたイムノアッセイ法の効力を試験するために、試料のすべて(すなわち、緩衝液および以前に画像処理した血液を含む試料を含む試料)を緩衝液で洗浄した(PBS-TB; 200μl; 10回ピペティングにて吸引および吐出を行うことによる3回の洗浄)。洗浄工程の間、磁気分離装置(Polyscience, Inc., Warrington, PA, カタログ番号8MB4111S)を使用して、磁気粒子および磁気粒子を含む複合体をウェルの表面に捕捉および確保した。各洗浄に続いて磁気分離(5分間)および上清の吸引を行った。試料を、蛍光DNA挿入色素YOYO-1(10nm; Molecular Probes, カタログ番号Y-3601)を含むPBS-TB(200μl)中に再懸濁し、そして磁気選択した(Dexter Magneticsによる装置を使用して)。96ウェルプレートを、上記のようにCCD画像処理装置を使用して画像処理した。CCD画像処理した後、プレートを裏返し、蛍光顕微鏡法を使用して調べた(Axioplan II fluorescent microscope, Carl Zeiss Inc., Thornwood, NY)。血液の同種イムノアッセイ(3連; 20msec露出)において得られた画像(すなわち、洗浄工程の前に得られた画像)を、ソフトウェア分析を使用して定量した。マクロ(Image-Pro Plus)を使用して、各ウェルの外周内に含まれる検出領域を含む関心対象の領域を囲んだ。囲まれた領域内の対象物の計数および対象物の強度積算を、一連のビジュアルベーシック(Visual Basic)スクリプトを使用して実行して、Image-Pro Plus分析データを分析した(詳細な説明の項の工程6において記載されるように)。血液中の同種イムノアッセイに対する分析を表す2つの棒グラフをプロットした(図12; Microsoft Excel; Microsoft Corp.)。同一の閾値の値の設定を、各実験において、比較された試料について使用した。

20

30

40

【0234】

結果: 図12は、非拡大的な広域画像処理によって大腸菌を高感度に検出するイムノアッセイの結果を示す。カテゴリ-特異的抗体でコートされた磁気および蛍光粒子は最初細菌細胞に結合し、次いでこの複合体は、磁力を使用して光学的に透明なウェル(検出領域)の底面に引き付けられる。そしてこの複合体を、非拡大的な広域CCDに基づく画像処理を使用して検出した。図12は、血液の同種イムノアッセイ(下のパネル)ならびに、血液(

50

上のパネル)および緩衝液(中央のパネル)における非同種(洗浄した)イムノアッセイの結果を比較する。最も単純な形式である、同種イムノアッセイ法は、優れたシグナル対バックグラウンド比で効果的に細胞を検出した(この図の同種アッセイ法の定量を参照されたい(下の右のパネルの棒グラフ))。

【0235】

2つの左よりのパネルは、非拡大的な広域CCDに基づく画像処理を使用して得られた画像を示す。3つすべてのアッセイが、大腸菌が存在した場合に(左のパネル)強力なシグナルを与えたが、大腸菌が加えられなかった場合には、低いバックグラウンドシグナルであった。CCDカメラを使用して得られるシグナルが、粒子でコートされた大腸菌細胞に一致することのさらなる確認を、高出力の蛍光顕微鏡分析を使用して得た(1000倍;上の2つの行、右よりの2つのカラム)。大腸菌細胞、磁気粒子、および蛍光粒子を含む代表的な複合体の画像を示す。各複合体の2つの画像を2つのフィルターセットを使用して作製した:1つはDNA蛍光を可視化するためのもの(シーバークリーンI;右から2つめのパネル)および蛍光粒子を可視化するためのもの(最も右のパネル)。この図は、磁気および蛍光粒子によって取り囲まれた大腸菌細胞からなる複合体を示す。

10

【0236】

イムノアッセイ法によって選択された大腸菌細胞のパーセンテージは、選択されなかった物質を測定する実験ならびにイムノアッセイ前後での試料の顕微鏡による比較(ここでは示していない)によって示されるように、一貫して95%より高い。顕微鏡的な調査は、大腸菌細胞を含む選択された複合体が、細胞あたり平均3.33蛍光粒子($n=10$;最小値=2;最大値=10)で結合したことを示した。

20

【0237】

画像の定量的分析を、蛍光対象物の数を計数し(図12,下のパネル、左の棒グラフ)、そして対象物のすべての強度を積算する(図12,下のパネル、右の棒グラフ)ソフトウェアによって実行した。両方の測定において、大腸菌(1000細胞)を含む試料は、大腸菌を含まない試料よりも有意に高いスコアである。このソフトウェア分析において見い出される全体の対象物は、試料における細胞の数よりも約15倍多いことに注意のこと(1.5×10^4 対象物)。この観察は、以下の段落において記載される複合体の顕微鏡的な分析と一致する。ソフトウェア分析によって、大腸菌を含む試料は、大腸菌を含まない試料と比較して75倍より多い対象物および約400倍の積算強度を有した。両方の分析は、試料中の 1×10^3 大腸菌細胞を用いて得られるシグナルが、細胞なしの対照から生じたシグナルより3標準偏差より上であることを示す。

30

【0238】

複合体の形成は、イムノアッセイにおける大腸菌細胞の存在に強く依存するが(図の最も左よりの2つのカラムを比較して見られ得るように)、顕微鏡的検査は、大腸菌細胞を欠く多くの複合体を示す。このことは、大腸菌イムノアッセイの一貫した特色である。細胞を含まない複合体の形成が非細胞構造(例えば、顕微鏡では見えない大腸菌鞭毛(flagella)のフラグメント)の存在に起因することは、あり得ることである。あるいは、大きな粒子:細胞複合体が、アッセイの間に分かれて細胞を伴ういくつかのフラグメントおよび細胞を伴わないいくつかのフラグメントを生じることがあり得ることである。単一の細胞を含む複合体および細胞を欠く複合体に加えて、顕微鏡分析は、1つより多い細胞を含む複合体のいくつかを示した。

40

【0239】

これらの結果に基づいて、非拡大的な広域画像処理と組み合わせた、単純、迅速、および使い勝手のよい同種イムノアッセイ法により、血液中における少数の細菌を検出および同定する。

【0240】

変法:引き続き実施例に示されるように、この実施例の方法は、多種類の試料(生物試料および非生物試料)において他の標的を検出するために応用され得る。例えば、粒子をコートするための適切な抗体を使用することによって、この実施例に記載される方法は、

50

特定のウイルス（例えば、HIV）、細菌、真菌、寄生生物、タンパク質、低分子、またはヒト細胞（例えば、癌細胞または感染細胞）を検出するために応用され得る。

【0241】

代替的な形式もまた、この実施例の方法と合わせて使用され得る。この実施例において記載される機器のために記載される磁石および光学モジュールの適切な再構成によって、種々のコンテナが適応され得る。例えば、より大きな容量またはより小さな容量の試料が、他のタイプの容器において使用され得る（例えば、光学的に透明な底および/または側面を有する試験管）。

【0242】

カテゴリー結合分子を標識する種々の方法もまた、可能である。種々のサイズの粒子および種々のシグナリング特性を有する粒子が使用され得る。種々のスペクトル特性を有するか、または蛍光カスケードを含む1つまたはそれ以上の蛍光色素を含む蛍光粒子が使用され得る（例えば、Molecular ProbesからのTransfluorosphere）。他のタイプの蛍光粒子（例えば、量子ドット）もまた、使用され得る。光を散乱させる粒子（例えば、RLS、PRP、またはナノゴールド粒子）は、この実施例において蛍光粒子と置き換えられ得る。目に見える色素で標識された粒子（例えば、色素をつけたポリスチレン粒子または色素を含むリポソーム）が使用され得る。あるいは、抗体または他のタイプのカテゴリー結合分子は、蛍光団（または他のシグナリング部分）で直接標識され得る。このような直接標識された抗体は、標的をコートし得、これらを検出可能にする。同様に、カテゴリー結合分子は、選択部分で直接標識され得る。例えば、抗体はフェリチン（磁気選択部分）にカップリングされ得る。

【0243】

標的を染色することはまた、蛍光粒子の代わりに検出のために使用され得る。この場合、特異性は選択部分、カテゴリー特異的磁気粒子によって付与される。例えば、核酸染色剤（例えば、ヨウ化プロピジウム、STYO 17、またはDAPI）が使用されて標的を非特異的に標識し得る。病原体特異的磁気粒子に結合する標的は、試料ウェルの底に選択的に運ばれて、非特異的な染色剤によって可視化される。カテゴリー特異的染色手順もまた、使用され得る（例えば、実施例9を参照されたい）。

【0244】

粒子に抗体をカップリングするための代替的な方法もまた、可能である。このような方法は当業者に公知であり、そして多数の参考文献に詳述されている（例えば、Hermanson、「Bioconjugate Techniques」(Academic Press, San Diego, CA, 1996); およびEdwards編(1999)「Immunodiagnosics: A Practical Approach」Oxford:Oxford University Press）。

【0245】

他の形態の抗体もまた使用され得る（例えば、Fab、Fab'、Fv）。異なるカテゴリー特異的抗体が組み合わせて使用され得る。例えば、上記の応用において、異なるM.ツベルクローシス抗原についての抗体が結合され得、黄色-緑色蛍光粒子を分離し、次いで合わされる。あるいは、異なる抗体が同じ粒子に結合し得る。他の種類のカテゴリー結合分子（例えば、レクチン、ポリペプチド、またはリガンド）が抗体と置き換えられ得る。

【0246】

実施例9。「模擬痰」中での抗酸染色マイコバクテリアの広域画像処理

背景：結核は、1995年において三百万人より多くの死亡例を起こしており、これは同じ年のAIDS/HIVの死亡数の約3倍である。発展途上国において避けることのできる死亡例の約25%は、マイコバクテリウム・ツベルクローシス感染によって引き起こされる。不運なことに、マイコバクテリウム・ツベルクローシス感染の診断には問題がある。結果的に、高価でない、高速な、単純な、および迅速な診断試験に対する、まだ対処されていない、地球規模の大きな必要性が存在する。結核の大部分の症例が発生する発展途上国において優勢である抗酸性のパチルス（AFB）試験法は感度が低く、従って、感染した患者の多くの割合を見逃してしまう。結果として、偽陰性の試験結果を伴って処置されない結核患者

は、その地域社会においてこの非常に感染性の高い疾患を伝染させ続ける。AFB試験はまた、時間がかかりかつ労力を要する。なぜなら、多くの顕微鏡の視野を、染色された細胞の存在について注意深く検査しなければならないからである。培養は、最も基準になる検査であるが、極端に遅い。一般に、研究室でマイコバクテリウム・ツベルクローシスのコロニーを増殖させるのには数週間を要する。増幅に基づく新しい分子試験は迅速かつ高感度であるが、高い費用がかかり、最も裕福な国々においてさえ、試験の定着を阻害している。

【0247】

目的：この実施例において、本発明は、迅速かつ高感度な蛍光抗酸性バチルス試験を構築するために使用される。この試験は、この試験の顕微鏡に基づくバージョンにおいて試験されるよりもより大きな領域を画像処理（1秒未満）することによって、その感度および労力の低減を達成する。

10

【0248】

実験方法：「模擬痰」およびマイコバクテリア（マイコバクテリウム・スクロフラセウム（*Mycobacterium scrofulaceum*））（これは、結核を引き起こす因子に非常に類似している）の塗沫を含む準備したスライド（Remel；カタログ番号40-146）を、オーラミン0およびオーラミン-ローダミンで染色した。各スライドは、模擬痰塗沫中に陽性対照（*M.スクロフラセウム*）および陰性対照（大腸菌）を含んだ。スライドを、TBオーラミン-ローダミン染色（Remel；カタログ番号40090）またはTBオーラミン0染色キット（Remel；カタログ番号40086）のいずれかを使用して調製した。スライドを、手短かに4回、炎に通した。このスライドを、オーラミン0染色またはオーラミン-ローダミン染色のいずれかに浸漬し、そして室温で15分間インキュベートし、続いて脱イオン水で3回すすいだ。スライドを、TB脱色剤（Remel；カタログ番号40-107）で2分間脱色し、続いて脱イオン水中で3回すすいだ。スライドを、過マンガン酸カリウム対比染色剤（カタログ番号40-092）に3分間浸漬し、続いて脱イオン水で3回すすいだ。次いで、スライドを風乾した。オーラミン-ローダミン染色したスライドを、蛍光顕微鏡法を用いて（AxioPlan II蛍光顕微鏡；Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY；Cy3チャンネル；励起546/11、放射567/15、400倍拡大；500m sec露出）、およびCCD画像処理装置を使用する非拡大的な広域画像処理によって（詳細な説明の項の工程6において記載され、および図3Aにおいて示されるように；TRITCのために最適化されたフィルターセット（励起545/30、放射610/75、1秒間露光）を使用して）画

20

30

【0249】

結果：図13は、蛍光に基づく広域画像処理がオーラミン-ローダミン試薬を用いて染色された個々のマイコバクテリア細胞を検出することを示す。広域画像処理における蛍光シグナルは、高倍率の蛍光顕微鏡法（1000倍；図13）を使用することによって、個々のマイコバクテリア細胞または細胞の小クラスターに一致することが示された。同じ手順に供された大腸菌は、有意な蛍光を示さなかった。

【0250】

変法：他のマイコバクテリア種（例えば、*M.アビウム*（*M.avium*））と*M.ツベルクローシス*感染との区別はしばしば重要である。実施例27は、カテゴリー特異的抗*M.ツベルクローシス*抗体を使用して*M.ツベルクローシス*を特異的に同定する、この実施例の変法を提供する。

40

【0251】

実施例10. 広域画像処理を使用する、迅速な抗微生物剤感受性試験

概要：抗微生物剤感受性試験の目的は、患者から単離された病原体を無効にする際に、種々の抗微生物治療のどれが最も効果的であるかを決定することである。迅速な抗微生物剤感受性試験は、感染性の疾患診断において、決定的な（時折、救命的な）適用である。タイミングよく、かつ有効な抗微生物治療の選択は、抗微生物剤感受性試験の結果に依存する。

【0252】

50

同定後、感染性因子は、一般的に、種々の濃度のいくつかの抗微生物化合物に抵抗するそれらの能力について試験される。固定する方法では、結果が出るまでに長く時間がかかる（最も頻繁には、試料収集時間から2～4日）ことが欠点である。このことは、時間が致命的である医学的な救命（例えば、中枢神経系および血流の感染）のためには特に問題である。

【0253】

この実施例において、広域画像処理を使用して、モデルの大腸菌細胞の抗生物質テトラサイクリンに対する感受性を迅速に検出した。2つの株の細胞（1つは耐性、1つは感受性）は抗生物質中で数時間の間に増殖するそれらの能力について試験された。増殖を、蛍光核酸染色剤で染色した個々の細胞の広域画像処理によって検出した。

10

【0254】

実験手順：テトラサイクリン感受性試験を、抗微生物剤感受性についてのNCCLSガイドラインに概略されるプロス希釈法（「Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for bacteria That Grow Aerobically」第5版，NCCLS，M7-A5 第20巻第2号，2000年1月）に従って、2つの大腸菌株：MG1655（感受性株）およびMG1655/pLAFRI（耐性株）で実行した。試験培地の接種後6つの時点で（0、1、2、4、6、および18時間）、1mlのアリコートを各テトラサイクリン希釈物から、耐性株および感受性株の両方から採取した（耐性株および感受性株について、それぞれ、0 μ g/ml～320 μ g/mlおよび0 μ g/ml～4 μ g/ml）。これらの時点においてまた、目視の濁度での増殖チェックおよびプレート計数の両方を実行した。濁度チェックを、NCCLSプロス希釈ガイドラインに従って実行した。「+」は、濁った培養物について記録し、「-」は濁っていない培養物について記録した。次いで、1mlのアリコートを実施例2と同様に「シーバークリーンI」を用いて染色した。染色された細胞のアリコート（10 μ l）を、90 μ lの水（タイプI品質）を含む、96ウェルプレート（Greiner America, Inc.; カタログ番号655896）の別々のウェル（光学的に透明な底を有する）に配置した。プレートを遠心分離機（Beckman Allegra）にて600g、10分間遠心分離し、次いで画像処理した。蛍光を、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を備えたCCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）を使用する画像処理によって検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。広域画像処理によって検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えたAxioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用することによって、単一の大腸菌細胞であることを確認した。

20

30

【0255】

結果：図14は、非拡大的な広域画像処理による個々の細胞検出および定量を使用した抗微生物剤感受性試験の結果を示す。この図の下側の2つのパネルの比較からは、細胞増殖を決定するために、非拡大的な広域画像処理が培養と比較可能であることが示される（寒天プレート上のコロニーを計数することによる定量もまた、比較可能な結果を与えた）。CCD画像処理および培養によって決定された、抗生物質の最小阻害濃度（MIC）は比較し得るものであったが、一晚増殖後に決定されたMICよりもいくぶん低いものであった（図14の一番上のパネルから2番目のパネル）。

40

【0256】

この図は、この迅速な画像処理方法が、抗生物質耐性株（図14の右のパネル）を抗生物質感受性株（図14の左のパネル）から容易に区別することを実証する。増殖の4時間後、耐性株の劇的な増殖は、1つの抗生物質濃度（64 μ g/ml）中で明らかであった。この濃度は、抗生物質感受性株の増殖を阻害した濃度（0.25 μ g/ml）の数百倍であった。この結果は、CCD画像処理（一番下のパネル）、液体培養（一番下から2番目のパネル）、またはコロニー計数（示さず）によってアッセイされた場合と比較し得るものであった。

【0257】

従って、4時間のインキュベーションの後、非拡大的な広域画像処理は、培養アッセイ（濁度として点数付けされる）およびプレート計数の両方に比較し得る、抗微生物剤感受

50

性試験の結果を提供する。

【0258】

利点および応用：この実施例で記載した方法について、慣習的な抗微生物剤感受性試験技術を超えたいくつかの臨床的な重要な利点が存在する。カテゴリー特異的結合分子で標識することによって（例えば、実施例2～実施例6を参照されたい）、細菌の同定は、抗生物質の存在下での細菌の増殖を定量するのと同じ時間で達成され得る。少数の同定された細胞を検出および定量する能力は、未だ達成されていない重要な診断的な必要性：細菌の継代培養を伴わない、臨床試料中での抗微生物剤感受性試験、に合致する。この目的を達成することで、適切な抗微生物治療を決定するために必要とされる時間を有意に減少させることによって、患者に大きな利益を提供する。

10

【0259】

実施例11. 磁気選択された、個々の蛍光標識されたカンジダ・アルビカンス細胞の広域画像処理

目的：この実施例は、マイクロタイタープレートの底の検出ゾーンで磁気選択および沈着された個々の細胞を検出するための非拡大的な広域画像処理の有用性を実証する。カンジダ・アルビカンスは、血管由来の感染および膣の酵母感染を含む疾患を引き起こす一般的なヒト病原体である。この実施例では、C.アルビカンス細胞が蛍光核酸染色剤で染色され、ウサギIgG抗カンジダ・アルビカンス抗体で標識され、次いで、マイクロタイタープレートのウェル中で、抗ウサギIgG抗体でコートされた磁気粒子と混合される。磁場の適用は、細胞：粒子の複合体がウェルの底に配置されることを引き起こす。次いで、細胞が

20

CCDに基づく非拡大的な広域画像処理を使用して検出された。

【0260】

実験手順：カンジダ・アルビカンス株10453 (American type Culture Collection, Manassas VA) をYM培地 (BD, Sparks, MD) 中、22℃で18時間増殖させた。細胞を、PBS中2.5%のホルムアルデヒド溶液中で5分間固定し、PBS-Bで洗浄し、次いで、YOYO-1 (1μl) 核酸染色剤 (Y-3601 Molecular Probes, Eugene, OR) およびウサギ抗カンジダ・アルビカンスポリクローナル抗体 (B65411R, Biodesign International, Saco, ME) で30分間、染色および標識した。次いで、細胞をPBS-TBで3回洗浄し、未結合の染色剤および抗体を除去した。細胞のアリコートを、光学的に透明で、平らな、ガラス底のマイクロタイタートレイ (Uniview; カタログ番号7706-2370, Whatman, Inc. Ann Arbor, MI) のウェル中、PBS-TB中で、表面に結合したヤギ抗ウサギIgG抗体 (8430050, Polysciences inc., Warrington, PA) を有する磁気粒子の懸濁液とともに混合した。15分後、磁場を、磁性鉄ブロック (Cortex Biochem, Inc., San Leandro, CA) を使用して適用し、その結果、磁気粒子がウェルの底面にわたって実質的に均一に整列された。ウェルの底の画像を、FITCフィルターセット (480/40nm励起、535/50nm放射; Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT) を使用するCCD画像処理装置 (詳細な説明の項の工程6に記載し図3において示した)、およびMetaMorph画像キャプチャーソフトウェア (Universal Imaging Corp., West Chester, PA) を使用して、キャプチャーした。広域画像処理において見られる別個のシグナルが単一の細胞に一致することの確認を、同じFITCフィルターセットを使用するツァイスAxio plan II蛍光顕微鏡 (Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY) を使用する、1200倍の拡大の高

30

40

拡大率の顕微鏡を使用して達成した。

【0261】

結果：図15は、細胞を含むマイクロタイタートレイの反応ウェルの非拡大的な広域画像処理が、点状の蛍光シグナルを与えたことを示す。これらの蛍光シグナルは、同じ反応ウェルの高拡大 (1200倍) 蛍光顕微鏡法を使用することにより、個々のカンジダ・アルビカンス細胞または細胞の小さな群に一致することが示された。対照的に、細胞を含まないウェルまたは未染色の細胞を含むウェル (陰性対照ウェル) は、陽性シグナルを与えなかったが、または非常にわずかな陽性シグナルを与えた。陰性対照の画像中の少ない数の蛍光対象物は、ほこりの粒子または他の非生物的物质に起因する可能性が高い。

【0262】

50

実施例12. 蛍光および常磁性ポリスチレン粒子に特異的に結合した個々のカンジダ・アルビカンス細胞の広域画像処理

目的：この実施例において、個々のC.アルビカンス細胞が、細胞特異的常磁性粒子を用いる分離およびC.アルビカンス特異的蛍光粒子を用いる標識の後、非拡大的な広域画像処理を使用して検出された。

【0263】

実験手順：以下の混合物を、光学的に透明で、平らな、ガラス底のマイクロタイタートレイ（Uniview; カタログ番号7706-2370, Whatman, Inc. Ann Arbor, MI）のウェル中で作製した：実施例6において以前に記載した、表面吸着したウサギ抗カンジダ・アルビカンスポリクローナル抗体（B65411R, Biodesign International, Saco, ME）を有する、YO 10 YO-1（50nM）、 5×10^7 磁気粒子（ME03N直径 $1 \mu\text{m}$; Bangs Labs Inc., Fishers, IN）を含むPBS-TB緩衝液、および、標準EDACカップリング化学を使用して表面に共有結合的にカップリングされた同じ抗体を有する 5×10^7 蛍光粒子（Fluospheres F-8821, 直径 $1 \mu\text{m}$, 赤色 20 蛍光, Molecular Probes, Eugene, OR）。抗体を粒子に共有結合的にカップリングさせるために、蛍光カルボキシル化粒子（ $1 \mu\text{m}$ 、25ml、2% 固体、赤色（580/605）、ポリスチレン、Molecular Probesカタログ番号F-8821）をMESB（2ml）中、室温での遠心分離によって（5分間； $11,000 \times g$ ；Eppendorf Centrifugeモデル5417C、Swinging Bucket Rotor A-1 2-11）洗浄し、そしてボルテックスおよびピペティングによって再懸濁した。磁気粒子 20 を使用するカップリング実験において、洗浄を、SPHERO（商標）FlexiMagセパレーターJr .デバイス（Spherotech, カタログ番号FMJ-1000）を使用して実行した。これは、懸濁液 から磁気粒子の分離を5分間で可能にした。粒子の洗浄を2回反復し、続いてMESB中で粒子の再懸濁を行った（ $500 \mu\text{l}$ ；10mg/mlの濃度）。新鮮に調製したEDAC（Sigmaカタログ番号 E-6383）を、0.2mg/mlの最終濃度で加え、そして室温で5分間穏やかに混合した。この懸濁物に、ウサギ抗C.アルビカンス抗体（5nmol；タイプAポリクローナル；Biodesignカタログ番号B65411R、ロット番号3B03200；実施例8に記載するように精製）を、ボルテックスしながら滴下して加え、回転させながら（約30rpm）室温で2時間インキュベートした。粒子を、上記のように遠心分離によって、MESB中で4回洗浄した。粒子を、エタノールアミンを含むMESB中に再懸濁し（0.03%；Sigmaカタログ番号E9508）、そして回転させながら室温で30分間インキュベートした。粒子を上記のように遠心分離によってMESB中で4回 30 洗浄し、続いて0.1M酢酸ナトリウムpH4.0中で3回洗浄した。最終的に、粒子をPBT中で2回 洗浄し、そしてPBT中1% 固体に再懸濁した。

【0264】

PBS-TB緩衝液中に再懸濁されたカンジダ・アルビカンス細胞を加え、その結果、最終反応容量は $200 \mu\text{l}$ であった。この混合物を、振とう機上で60分間インキュベートした。未結合の蛍光粒子を、96ウェルマイクロタイタートレイ（8MB4109S Polysciences Inc., Warrington, PA）と境界を接して配列されたネオジニウム-鉄-ホウ素磁石のアレイを使用する磁場の適用後、3回の $200 \mu\text{l}$ PBS-TB緩衝液洗浄によって磁気粒子複合体から分離した。蛍光を、赤色蛍光粒子のために適切な光学フィルターセット（テキサスレッドフィルターセット、560/55nm励起、645/75nm放射；Chroma Technology Corp., Brattleboro, VT）、および核酸結合色素YOYO-1（FITCフィルターセット、480/40nm励起、535/50nm放射）を用いた 40 CCD画像処理装置を使用して（詳細な説明の項の工程6に記載され、図3に示される）、非拡大的な広域画像処理によって検出した。磁気粒子と同時に精製された蛍光粒子の存在は、カンジダ・アルビカンス細胞の存在を示す。CCD画像処理装置上で検出された陽性シグナルは、蛍光粒子を観察するためにセットされた同じテキサスレッドフィルターセットおよびYOYO-1染色細胞の核酸を見るためにセットされたFITCフィルターを装着したAxioPlan II 40 蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用することによって、細胞、蛍光粒子、および磁気粒子の複合体であることを確認した。画像を、Image Pro Plus画像キャプチャーソフトウェア（Media Cybernetics, Silver Spring, MD）を使用して、100msの露出時間を使用してキャプチャーした。

【0265】

結果：図16は、細胞を含む反応の非拡大的な広域画像処理が点状の蛍光シグナルを与えたのに対して、細胞を有しない反応はこのようなシグナルを与えなかったことを示す。これらの蛍光シグナルは、同じ反応ウェルの高倍率の蛍光顕微鏡法を使用することによって、単一のYOYO-1（緑色）染色カンジダ・アルビカンス細胞（または細胞の小さな群）を取り囲む赤色蛍光粒子に一致することが示された。

【0266】

実施例13．蛍光抗体および磁気粒子に特異的に結合した個々のカンジダ・アルビカンスの広域検出

目的：この実施例は、蛍光標識した抗体（シグナル部分：カテゴリー結合分子）および抗体コートされた常磁性粒子（選択部分）を使用して、個々の細胞を検出および同定するための非拡大的な広域画像処理の有用性を実証する。この実施例において、マイクロタイターディッシュ形式における非拡大的な広域画像処理を使用して、細胞への常磁性粒子および蛍光団標識抗体の結合後にカンジダ・アルビカンス細胞および大腸菌細胞を別々に検出した。

【0267】

実験手順：光学的に透明で、平らな、ガラス底のマイクロタイタートレイ（Uniview 77 06-2370, Whatman, Inc. Ann Arbor, MI）のウェルを、「ブロックエイド（Block Aid）」（B-10710 Molecular Probes, Eugene, OR）を室温で30分間使用してブロックした。実施例6に記載するように調製した、表面吸着したウサギ抗C.アルビカンス（B65411R, Biodesign International, Saco, ME）または抗大腸菌ポリクローナル抗体（B65003R, Biodesign International, Saco, ME）を伴う約 5×10^7 の磁気粒子（ME03N 直径 $1 \mu\text{m}$, Bangs Lab Inc., Fishers, IN）を、ウェル中で一定容量のPBS-TB緩衝液に加え、 $200 \mu\text{l}$ の最終反応容量とした。C.アルビカンス細胞または大腸菌細胞を、5分間、PBS中ホルムアルデヒドの2.5%溶液中で固定し、PBS-B中で2回洗浄した。細胞を、常磁性粒子の懸濁物に添加し、そしてこの混合物を振とう機上で室温で30分間インキュベートした。FITC標識した抗カンジダ・アルビカンスポリクローナル抗体（ $5 \mu\text{g}$ ）（CR2155RF, Cortex Biochem, San Leandro, CA）またはAlexa Fluor（商標）488（Molecular Probes, Eugene, OR., カタログ番号A10235）で標識した抗大腸菌抗体（ 1mg ; Biodesign, Saco, ME. B65001R）（これらは、製造業者の指示書に従って標識した）を加え、この混合物をさらに15分間インキュベートした。未結合の抗体を、反復する洗浄および磁気鉄ブロック（CD2001, Cortex Biochem, Inc., San Leandro, CA）を使用する磁場の適用によって、磁気粒子：細胞複合体から分離し、その結果、磁気粒子がウェルの底面にわたって実質的に均一に整列された。蛍光を、CCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され；図3において示される）を使用して、FITC光学フィルターセット（480/40nm励起、535/50nm放射フィルター、FITCおよびAlexa488蛍光団の検出のため）を用いて検出した。磁気粒子と同時に精製された蛍光シグナルは、C.アルビカンス細胞または大腸菌細胞の存在を示す。画像上で検出された陽性シグナルを、赤色蛍光核酸結合色素YOYO-3（ $1 \mu\text{l}$ ）（Y-3636, Molecular Probes, Eugene, OR）で細胞核酸を染色後、Axioplan II蛍光顕微鏡（Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY）を使用する高拡大蛍光顕微鏡法（1200倍）によって、細胞：蛍光抗体複合体であることを確認した。

【0268】

結果：図17は、カンジダ・アルビカンス細胞または大腸菌細胞を含むウェルが多数の点状の蛍光スポットを与えたことを示す。これらの蛍光シグナルは、高拡大蛍光顕微鏡法（1200倍）および赤色蛍光色素YOYO-3（Molecular Probes, Eugene, OR）を使用する核酸についての染色細胞を使用することにより、個々の細胞（または細胞の小クラスター）に一致することが示された。細胞を含まないウェル（または非常にわずかな細胞を含むウェル）はこのようなシグナルを与えなかった。陰性対照の画像中の数の少ない蛍光対象物は、ほこりの粒子または他の非生物的物质に起因する可能性が高い。

【0269】

実施例14．CCDカメラを使用した、個々の化学発光酵母細胞の非拡大的な広域検出

目的：この実施例の目的は、化学発光シグナリング部分で標識した個々の細胞を可視化するための非拡大的な広域画像処理を使用することであった。この実施態様において、C.アルビカンス細胞の表面は、フルオレセイン結合抗体でコートされ、続いて、アルカリホスファターゼ結合体化抗フルオレセイン抗体でコートされ、そしてCDPスター基質と反応して光を生成した。化学発光画像中での個々の細胞の存在は、蛍光顕微鏡法によって確認した。画像増感剤は、個々の細胞の検出には必要とされなかった。

【0270】

材料および方法：C.アルビカンス 90028 (American Type Culture Collection) を、YM培地 (VWRカタログ番号DF0711-17) 中で25、48時間増殖させた。細胞を、PBS中2.5%ホルムアルデヒドにおいて5分間固定し、続いてPBS中で洗浄し、そして4で保存した。10容量のブロッキング緩衝液 (0.5% NENブロッキング試薬 カatalog番号FP329、0.1M トリス-HCl pH8、0.15M NaCl) を細胞のアリコートに添加し、そして懸濁物を30分間インキュベートした。ポリクローナルウサギ抗C.アルビカンス、フルオレセインイソチオシアネート結合抗体 (Bioscienceカタログ番号B65411F) を1/100希釈で加えた。細胞懸濁物を、穏やかに混合しながら60分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、そしてブロッキング緩衝液で2回洗浄し、続いてブロッキング緩衝液中1/25希釈の抗フルオレセイン、アルカリホスファターゼ結合抗体 (NENカタログ番号NEF-709) 中に再懸濁した。再度細胞を穏やかに混合しながら60分間インキュベートした。細胞を遠心分離し、0.1M トリス-HCl pH8、0.15M NaCl 中で3回洗浄し、続いて0.1M トリス-HCl pH9.5、0.1M NaCl 中で1回洗浄した。最終的な細胞の懸濁物はpH9.5緩衝液中であった。

10

20

【0271】

広域画像処理のために、細胞の希釈物を、pH9.5緩衝液であらかじめ湿らせておいた、CDPスター試薬 (NEN NEL-601) を重層したCASTナイロンコートガラススライド (Schleicher and Schuellカタログ番号10484181) 上にスポットした。化学発光を、CCD画像処理装置 (詳細な説明の項の工程6に記載し；図3において示した) を使用して、発光フィルターなしで、10分間の露光で可視化した。化学発光画像がキャプチャーされた後、スローフェード (Slow Fade) 試薬 (Molecular Probesカタログ番号S-2828) をスライド上にスポットし、カバーガラスをのせた。このスライドを、FITCフィルターキューブ (Chroma番号SP101) を備えた蛍光顕微鏡法を介して、個々の細胞を同定するために400倍の拡大率で観察した。

30

【0272】

結果：化学発光シグナリング部分で標識した個々のC.アルビカンス細胞は、図18に見られるように、拡大なしで検出することができた。3つの異なる希釈は、左から右に、それぞれ、約200、60、および20細胞を表す。最も低い希釈では、化学発光画像上の各スポットを、蛍光顕微鏡法によって観察した場合の細胞または細胞の小さな群と関連させることができた。空間的な配置は、鉛筆で書いたグリッド線の存在および相対的な細胞の位置によって補助された。左のパネルに特により大きく、より明るく見えるスポットは、1つより多い細胞を表す。

【0273】

実施例15. インスタントフィルムの直接的な露光を使用した、個々の化学発光酵母細胞の非拡大的な広域検出

40

目的：この実施例の最終目的は、化学発光シグナリング部分で標識した個々の細胞の非拡大的な広域検出を達成するためのインスタント写真フィルムを使用することであった。この実施態様において、C.アルビカンス細胞の表面は、フルオレセイン結合抗体カテゴリー結合分子でコートされ、アルカリホスファターゼ：抗体結合体に結合し、そしてCDPスター基質と反応して光を生成した。

【0274】

材料および方法：C.アルビカンス90028 (American Type Culture Collection) を実施例14と同様に増殖および標識した。ポラロイドフィルム上での画像化のために、一片のハイボンドN (Hybond-N) メンブレン (Amersham-Pharmacia RPN1782B) を、一片の吸収性の

50

濾紙上に置き、0.1Mトリス-HCl pH9.5、0.1M NaClであらかじめ湿らせた。細胞の希釈物をメンブレン上にスポットし、続いてCDPスター試薬 (NEN NEL-601) を加えた。メンブレンを、製造業者の指示書に従ってスポットライト (SpotLight) カメラ (Boston Probes D T10000) にマウントし、ASA 2000フィルム (Boston Probes DT20000) に30分間露光させた。

【0275】

結果：化学発光シグナリング部分で標識した個々のC.アルピカンス細胞を、図19に示されるようにインスタントフィルム上で直接的に検出することができた。この図は、標識細胞の3つの異なる希釈物の画像を示す。図19に示す試料の希釈物は実施例14 (図18) において画像処理されたものと同じであり、約200、60、および20細胞 (左から右に、それぞれ図において) を表す。左のパネルに特により大きく、より明るく見えるスポットは、多数の細胞を含むクラスターに対応する。この図の右のパネルにおけるスポットは、個々の細胞またはいくつかの細胞のクラスターのいずれかを表す。

10

【0276】

実施例16. 非拡大的な広域画像処理を使用する、下気道感染に關与する生物体の検出

目的：非拡大的な広域画像処理を使用して、下気道感染に關与する生物体：クラミジア・ニューモニエ (*Chlamydia pneumoniae*)、マイコプラズマ・ニューモニエ (*Mycoplasma pneumoniae*)、およびレジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) を同定すること。

【0277】

概要：肺炎は、世界規模での主要な死因であり、米国において6番目に多い死因である。傾向としては、他の要因と同様に、65歳より高い年齢の個体の割合が高くなることが示される。現在の診断方法はしばしば経験的であるが、決定的な診断方法は適切な抗生物質を処方することによって患者の予後を改善すると考えられている。非拡大的な広域画像処理の能力と組み合わせた、痰の直接的な蛍光染色によって、特定の生物体 (そのうちのいくつかは培養するのが困難である) の検出が診断を補助し、それによって肺炎ならびに医療費に起因する致死率の発生を減少させる。

20

【0278】

実験方法：クラミジア・ニューモニエ対照スライドおよびマイコプラズマ・ニューモニエ対照スライドを入手した (Bion, Park Ridge, IL; それぞれカタログ番号CP-4212およびMP-1212)。スライドを室温まで暖め、そしてブロッキング溶液でインキュベートした (PBS/1% BSA、15分間、25℃)。ブロッキング溶液を吸引によって取り除き、そしてブロッキング溶液中の一次抗体の希釈物を (抗クラミジア・ニューモニエ; DAKO Corporation, Carpinteria, CA, コードNM660, クローンRR402、1/5希釈、および抗マイコプラズマ・ニューモニエ; Fitzgerald International Industries, Inc., Concord, MA, カタログ番号10-M40、1/1000希釈)、クラミジア・ニューモニエ対照スライドおよびマイコプラズマ・ニューモニエ対照スライドの個々のウェルに加えた。スライドをインキュベートし (25℃で30分間)、続いて洗浄手順を行い (PBS-BT、各4×5分間)、そしてCy3結合体二次抗体とともにインキュベーションした (25℃で15分間、ヤギ抗マウスIgG-Cy3、Jackson ImmunoResearch Laboratories, West Grove, PA, カタログ番号111-165-144)。スライドを、ウェルにPBS-BTおよびタイプ1滅菌水で浸すことによって洗浄した (それぞれ、各4×5分間および各2×5分間)。レジオネラ・ニューモフィラの広域画像処理の実証のために、L.ニューモフィラ血清型1に対するFITC結合抗体 (カタログ番号92-103-FL) ならびに熱固定したレジオネラ・ニューモフィラ血清型1 (Philadelphia 1, カタログ番号92-103-H) および6 (Chicago 2, カタログ番号92-110-H) を入手した (mTECH (商標) Monoclonal Technologies, Alpharetta, GA)。2つの熱殺菌したレジオネラ・ニューモフィラ血清型 (1および6) からの細胞の塗沫を、ポリリジンコートされたスライド (Sigma、カタログ番号P0425) 上で調製した。ブロッキング溶液をスライド上に浸し、そしてインキュベートし (25℃で15分間)、続いて吸引を行った。レジオネラ・ニューモフィラ血清型1に対するFITC結合一次抗体をスライドに浸し (25℃で30分間)、続いて、吸引ならびにPBSお

30

40

50

よびタイプ1水を用いた洗浄（それぞれ、各2×5分間および各2×5分間）を行った。すべてのスライドを風乾させ、続いて非拡大的な広域画像処理を使用して画像のキャプチャーを行った（Cy3結合体についてはTRITCフィルターセット、Chroma Id. No. 41002b、励起544/30nm、放射610/75nm、およびFITC結合体についてはFITCフィルターセット、Chroma Id. No. SP101、470/40nm、放射522/40nm）。スライドをマウントし（Pro Long Antifade Reagent, Molecular Probes, Eugene, OR, カタログ番号P-4781）、そして蛍光顕微鏡法（Axioplan II 蛍光顕微鏡、Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY; Cy3結合体についてはCy3.5フィルターセット、Chroma Id. No. 41002b、励起544/30nm、放射610/75nm、またはFITCフィルターセット、Chroma Id. No. SP101、励起470/40nm、放射522/40nm）を実行して、詳細を観察した（400倍）。

10

【0279】

結果：この実施例は、下気道感染に関与する生物体が、直接的な蛍光抗体染色技術と組み合わせた、非拡大的な広域画像処理を使用して検出され得ることを実証する。陽性対照および陰性対照の広域画像処理は、この検出が特異的であることを示す（図20）。広域画像処理を使用して見られるシグナルが標識された細菌細胞によって生成されるものに対して特異的であることは、蛍光顕微鏡分析によって確認した。

【0280】

変法：非拡大的な広域画像処理の能力は、他の細菌、酵母、およびカビ、ならびに、尿路感染症、敗血症、および性感染症を含む他の疾患のカテゴリーに適用され得る。

【0281】

実施例17. 非拡大的な広域画像処理を使用して3つの別個の微生物について試料を同時に走査する、多重化直接蛍光イムノアッセイ法

20

概要：この実施例において、非拡大的な広域画像処理を使用して、3種類の微生物を検出および同定する多重化試験において使用された。細胞を3つのカテゴリー特異的（この場合、種特異的）抗体（これらの各々が別個の蛍光色素で標識された）の混合物とともにインキュベートした。個々の細胞をCCD画像処理装置を使用して検出した。

【0282】

実験手順：大腸菌およびカンジダ・アルピカンスを、実施例2および実施例11にそれぞれ従って、増殖および固定させた。ストレプトコッカス・ピオゲネス（*Streptococcus pyogenes*）を、Brain Heart Infusion（Difcoカタログ番号237500）中、37℃で一晩増殖させ、実施例2に従って固定および洗浄した。3つすべての種類の細胞を、個々に水で高解像度視野（40倍）あたり20～50細胞まで希釈し、これは、位相差顕微鏡によって観察できた。これらの希釈物のアリコート（3μl）を、ポリ-L-リジンコートしたカバーガラス上に配置し、そして直径約5mmの領域にわたって広げ、そして乾燥させた。

30

【0283】

抗大腸菌抗体（1mg; Biodesign, Saco, ME. B65001R）、抗C.アルピカンス抗体（1mg; Biodesign, Saco, ME. B65411R）、および抗ストレプトコッカスGrp A抗体（1mg; Biodesign, Saco, ME. B10601R）を、製造業者（Molecular Probes, Eugene, OR）の指示書に従って、Alexa Flour（商標）488（カタログ番号A10235）、Alexa Flour（商標）350（カタログ番号A10170）、およびAlexa Flour（商標）546（カタログ番号A10237）、タンパク質標識キットでそれぞれ標識した。

40

【0284】

標識された抗体の混合物を、正常ウサギ血清（カタログ番号88-NR50; Fitzgerald, Concord, MA）中（各20μg/ml）で調製した。カバーガラスにスポットした細胞を、抗体混合物で覆い、そして、水で飽和させたペーパータオルを含み、サララップで覆った、湿らせたプラスチック製のピペットボックスのフタの中で室温で1時間インキュベートした。次いで、カバーガラスを、1%正常ウサギ血清を含むPBS中で1回洗浄し、次いで、PBS中で2回洗浄した（洗浄あたり10分間）。カバーガラスを、洗浄液から回収し、そしていかなる残った液体も圧縮空気を用いて吹き飛ばした。各カバーガラスの関連する領域を、FITC（励起480nm/40nmおよび放射535nm/50nm）（Alexa488特異的）チャンネル、テキサスレツ

50

ド（励起560nm/55nmおよび放射645nm/75nm）（Alexa546特異的）チャンネルおよびDAPI（励起360nm/40nmおよび放射460nm/50nm）（Alexa350特異的）チャンネルにおいて、CCD画像処理装置で（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）1秒間画像処理した。

【0285】

結果：多重化細菌アッセイ法の結果は図21に示される。各別個の細菌試料について、対象物の数および強度が予想される蛍光チャンネルにおいて最大であった。従って、FITC（Alexa488）チャンネルにおいて見られる対象物の数および強度は、大腸菌試料について最大であった。同様に、C.アルピカンス試料およびS.ピオゲネス試料は、DAPIチャンネルおよびテキサスレッドチャンネルにおいて、それぞれ最強の強度および最も多くの対象物を有した。従って、このアッセイは、非拡大的な広域画像処理を使用して、抗体カテゴリー結合分子の混合物を有する3つのカテゴリーの細胞を区別し得る。

10

【0286】

実施例18. アデノウイルスについての固相捕捉アッセイ法

目的：この実施例は、固体支持体上で捕捉された少数のウイルスを、蛍光粒子で標識でき、そして非拡大的な広域画像処理によって可視化できることを示す。最初に、96ウェルプレートのウェルが抗アデノウイルス抗体でコートされた。次に、アデノウイルスおよび抗アデノウイルス抗体でコートされた粒子がウェルに加えられ、そして抗体コートされた表面によって、ウイルスおよび粒子が捕捉された。未結合の粒子は除去され、そして捕捉された粒子（捕捉されたウイルスを示す）は、広域の蛍光画像処理によって検出された。

20

【0287】

材料および方法：96ウェルグライナー（Greiner）プレート（Greiner Labortechnikカタログ番号655097）に、100mM重炭酸ナトリウムpH10中の0.2mg/ml溶液50 μ lを加え、かつ室温で一晩インキュベートして、ピオチン化BSA（Sigmaカタログ番号A-8549）をコートした。ウェルを100 μ l PBSで1回洗浄した。次いで、ピオチン化BSA層を、50 μ lの、PBS中0.1mg/mlストレプトアビジン（Jackson Immunoresearch Laboratoriesカタログ番号016-000-013）で、室温にて2時間コートし、続いてPBSで洗浄し、次いで、50 μ lの、PBS中0.1mg/mlのピオチン化抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052、Molecular Probesキットカタログ番号F-6347でピオチン化した抗体）で、室温にて2時間コートした。ウェルを、100 μ lのPBS-TB中で3回洗浄し、そして4 で保存した。

30

【0288】

2型アデノウイルス（ATCC VR-846）および呼吸器合胞体ウイルス（RSV）（ATCC VR-1302）を、4%ホルムアルデヒド/PBS（最終濃度）中で、室温で30分間再構成することによって固定した。グリセロールを最終濃度16%に加え、そしてアリコートで-80 で凍結した。ウイルス粒子の力価（titer）を、TCID₅₀として表現される、製造業者によって提供される力価に基づいて見積もり、そして製造業者（ATCC）によって推奨されるように、0.7の因子を乗算することによりpfu（プラーク形成単位）に転換した。pfuが、調製物中のウイルス粒子の数にほぼ等しいという仮定がなされた。使用前に、アリコートで氷上で解凍した。解凍後、未使用の部分はさらなる実験のために4 で保存した。

【0289】

粒子を、0.2 μ m直径の蛍光粒子を1%固体で使用した（Molecular Probesカタログ番号F-8848）以外は、実施例8に記載されるように抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052）でコートした。

40

【0290】

アッセイ法を実行するために、保存用緩衝液をウェルから取り除いた。約10,000ウイルス粒子および3 \times 10⁸粒子を、ブロックエイド緩衝液（Molecular Probesカタログ番号10701）中100 μ lの最終容量でウェルに加えた。マイクロタイタートレイを、振盪台の上で室温にて1時間インキュベートした。ウェルをPBS-TB中で3回、次いで水中で1回洗浄した。水を除去した後、ウェルを、FITC励起フィルター（470nm/40nm）および放射フィルター（522nm/40nm）のセットを使用して、CCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され

50

、および図3に示される)を使用して画像処理した。画像を、Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1(Media cybernetics)を使用して、処理および分析した。対象物計数ユーティリティを使用して、ウェル中の粒子の数を見積もった。

【0291】

結果：この実施例は、固相上に捕捉されたウイルス粒子を蛍光粒子シグナリング部分で標識でき、そして図22に見られるように、拡大なしで検出できることを示す。Image-Pro Plusソフトウェアを使用する画像の分析(一番下のパネル)は、対象物(粒子)の数が約13,000であることを示し、これは、加えたアデノウイルス粒子のおよその数(～10,000)と大体一致する。しかし、調製物中のピリオンの数は正確に決定されていないことに注意すべきである。どれほどの数の感染組織培養細胞またはこのような細胞のフラグメントが調製物中に存在しているかもまた、未知であった。RSV陰性対照(一番上のパネル)における対象物の計数は約800であった。これは、非特異的なバックグラウンドを表す。

10

【0292】

実施例19. 血中のウイルスの固相捕捉

目的：この実施例は、血液試料中の少数のウイルスが固体支持体上に捕捉され、蛍光粒子で標識され、そして非拡大的な広域画像処理によって可視化され得ることを示す。アデノウイルスが感染した血液を、96ウェルプレート中の抗アデノウイルス抗体でコートされたウェルに加えた。ウイルスの捕捉後、抗アデノウイルス抗体でコートされた蛍光粒子を加えた。未結合の粒子を除去し、そして捕捉された粒子(捕捉されたウイルスを表す)を、CCDに基づく蛍光画像処理によって検出した。

20

【0293】

材料および方法：96ウェルプレート(Greiner Labortechnikカタログ番号655097)のウェルを、ビオチン化抗アデノウイルス抗体でコートした。2型アデノウイルス(ATCC VR-846)およびRSV(ATCC VR-1302)を再構築し、実施例18と同様に固定した。粒子を、0.2 μ m直径の蛍光粒子(Molecular Probesカタログ番号F-8848)を1%固体で使用した以外は実施例8に記載されるように抗アデノウイルス抗体(Chemiconカタログ番号MAB8052)でコートした。このアッセイを実行するために、保存用緩衝液をウェルから除去した。約10,000ウイルス粒子を、最終容量100 μ l中、50%ブロックエイド緩衝液(Molecular Probesカタログ番号10701)、50%マウス血液中で、ウェルに加えた。マイクロタイタートレイを、振盪台上で室温にて1時間インキュベートした。ウェルを、PBS-TB中で2回洗浄し、続いて100 μ lブロックエイド緩衝液中、 3×10^8 粒子を加えた。振盪しながら1時間のインキュベーションの後、ウェルをPBS-TBで3回、水で1回洗浄し、そしてFITC励起フィルター(470nm/40nm)および放射フィルター(522nm/40nm)のセットを使用して、CCD画像処理装置(詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される)を使用して可視化した。

30

【0294】

結果：この実施例は、特定のウイルス粒子(この場合はアデノウイルス)を、50%血液の存在下で固相に捕捉でき、蛍光粒子シグナリング部分で標識でき、そして、図23に見られるように拡大なしで検出できることを示す。Image-Pro Plusソフトウェアを使用する画像の分析(一番下のパネル)は、対象物(粒子)の数が13,489であり、これは、加えたアデノウイルスのおよその数(10,000)と大体一致する。RSV陰性対照(一番上のパネル)における対象物の計数は約2,173であった。これは、非特異的なバックグラウンドを表す。このアッセイ法の結果は実施例18の結果(血液の存在は、固相へのウイルス粒子の捕捉、蛍光粒子を用いるそれらの標識、または拡大なしでのそれらの検出を妨害しないことを示す)と同様である。

40

【0295】

実施例20. アデノウイルスについての液相アッセイ法

目的：この実施例は、本発明が液相サンドイッチ形成方法を使用して少数のウイルスを走査できることを示す。アデノウイルスを含む試料を、抗ウイルス抗体でコートした磁気および蛍光粒子の組み合わせとインキュベートした。磁気および抗体粒子の複合体は、アデノウイルスの存在下で(しかし対照ウイルスの非存在下で)形成するように誘導された

50

。これらの蛍光複合体は磁氣的に選択され、光学的に透明な表面に沈着され、そして非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理された。

【0296】

材料および方法：アデノウイルスおよびRSVを、実施例18に記載されるように再構成および固定した。抗体コートされた蛍光および磁気粒子を、抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052）を用いて、1 μ m直径赤色蛍光粒子（Molecular Probesカタログ番号F-8851）および2.8 μ m直径磁気粒子（DynaI；カタログ番号142.03）を使用して、実施例8に記載されるように調製した。この実施例において、 5×10^5 赤色蛍光粒子を、ブロックエイド緩衝液（Molecular Probesカタログ番号B-10710）中で、 5×10^6 磁気粒子とともに、最終容量250 μ lに混合した。アデノウイルスまたはRSVを、試料あたり約1000ウイルス粒子の力価でアッセイに加えた。混合しながら室温で4時間後、磁気粒子および任意の結合粒子を、微量遠心チューブ用ポリサイエンス（Polysciences）BioMag磁気分離機を使用して分離し、PBS-TB中で3回洗浄した。洗浄した磁気粒子をマイクロタイターウェル（Greiner Labortechnikカタログ番号655097）に移し、そしてテキサスレッド励起フィルター（560nm/55nm）および放射フィルター（645nm/75nm）のセットを使用して、CCD画像処理装置（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）において可視化した。画像を、実施例18と同様に、Image-Pro Plusソフトウェア（Media cybernetics）を用いてキャプチャーおよび分析した。

10

【0297】

結果：この実施例は、特定のウイルス粒子が、磁気および蛍光粒子を用いる液相サンドイッチ形成方法を使用して捕捉され、そして、図24に見られるように拡大なしで検出され得ることを示す。およそ1000個のウイルス粒子がアッセイに加えられた。この図の一番下のパネルにおいて、Image-Pro Plus対象計数ユーティリティを使用する分析は、2324個のアデノウイルス粒子を検出するのに対して、RSV陰性対照においては（一番上のパネル）、46粒子のみが検出された。これは、非特異的なバックグラウンド結合を表す。

20

【0298】

実施例21．血液中のアデノウイルスの同種アッセイ法

実施例の概要：効率的かつ費用対効果の高いウイルスロード試験（ヒト試料中のウイルス濃度を決定すること）は、医学的診断における未だ達成されていない主要な必要性を表す。この実施例は、本発明が試料中のウイルスをいかにして迅速に計数し得るかを実証する。この実施例は、重要なヒト病原体であるアデノウイルスについて試験する。技術的には、この実施例は実施例8と同様である。

30

【0299】

抗体を用いての粒子のコーティング：粒子を、実施例8におけるように抗体でコートし、そして2%固体の濃度に再懸濁する。この実施例において、抗アデノウイルスモノクローナル抗体（anti-hexon；カタログ番号MAB8052；Chemicon）を使用して、黄色-緑色蛍光粒子（TransFluoSpheres；カタログ番号T-8871；Molecular Probes）および磁気ナノ粒子（カルボキシポリマーコートしたフェロフルイド；Immunicon；カタログ番号F3000）をコートする。等量の蛍光および磁気粒子を混合し、その結果、混合物中の各タイプの粒子の最終濃度は1%固体となる。この粒子混合物は、実施例8におけるように超音波処理を使用して分散される。

40

【0300】

血液中のアデノウイルスの検出および定量：この実施例において記載される試験は血液中のアデノウイルスピリオンを検出する。種々の量（0、 10^3 、 10^4 、 10^5 pfu）の精製アデノウイルスピリオン（CsCl勾配精製；Frank Graham, McMaster University）を含む試料（PBS-B中10 μ l）を、全血および粒子混合物に加え、そして反応物を実施例8におけるように処理する。実験試料における蛍光粒子クラスターの数 - 陰性対照試料におけるクラスターの平均数は、試料におけるアデノウイルス粒子の数を示す。

【0301】

実施例22．細菌およびウイルスを同時に走査する、多重化された広域画像処理イムノアッ

50

セイ法

目的：この実施例は、本発明が、複数の異なった分析物（ここでは、細菌およびウイルス）について試料を同時に走査する試験を構築するために使用され得ることを実証する。対の抗体コートされた微粒子（1つは蛍光および1つは常磁性）を使用して、以前のいくつかの実施例におけるように（例えば、実施例8）標的に結合させた。しかし、この実施例では、2つのこのような対の粒子を使用した。1つは抗大腸菌抗体でコートしたセット、および1つは抗アデノウイルス抗体でコートしたセットであった。2種類の粒子：分析物複合体を互いから区別するために、各分析物について別個の蛍光粒子を使用した。大腸菌特異的粒子が緑色蛍光特性を有したのに対して、アデノウイルス特異的粒子は赤色蛍光特性を有した。試料および分析物特異的粒子を混合後、得られる粒子：分析物複合体を検出ゾーンに磁気選択し、そして非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理した。赤色粒子または緑色粒子のいずれかについて調整された光学フィルターセットを使用し、そのとき得られた2つのCCD画像の分析によって、ウイルス標的および細菌標的を同定および定量した。

【0302】

材料および方法：大腸菌細胞を、実施例8に記載されるように増殖および固定し、そしてアデノウイルスを、実施例18に記載されるように、再構成および固定した。抗体コートされた蛍光および磁気粒子を、実施例8に記載されるように調製した。抗アデノウイルス抗体（Chemiconカタログ番号MAB8052）を使用して赤色蛍光粒子（Molecular Probesカタログ番号F-8851）をコートし、そして抗大腸菌抗体（KPLカタログ番号01-95-90）を使用して緑色蛍光粒子（Molecular Probesカタログ番号8852）をコートしたのに対して、磁気粒子（DynaL.カタログ番号142.03）のバッチを、各々の抗体を用いて作製した。アッセイ法のために、粒子を、以下の量：各蛍光粒子について 2.5×10^7 粒子および各磁気粒子について 5×10^6 粒子で、250 μ lの最終容量のブロックエイド緩衝液（Molecular Probesカタログ番号B-10710）中で混合した。アデノウイルスおよび/または大腸菌を、各々約1000ウイルス粒子/細胞でアッセイに加えた。室温で混合しながら1時間後、磁気粒子および任意の結合粒子を磁場で分離し、そしてPBS-TB中で3回洗浄した。洗浄した磁気粒子を、グライナーマイクロタイターウェル（Greiner Labortechnikカタログ番号655097）中で、FITCおよびテキサスレッド励起/放射フィルターの両方のセットを用いた（フィルターの詳細については実施例18および実施例20を参照されたい）CCD画像処理装置を使用して（詳細な説明の項の工程6に記載され、および図3に示される）可視化した。

【0303】

結果：この実施例は、細菌およびウイルスを同じ試料中で走査でき、そして非拡大的な広域画像処理を使用して検出できることを実証する。図25において見られるように、およそ1000個のアデノウイルスが混合物に加えられた場合、検出される粒子の大部分は抗アデノウイルス赤色蛍光粒子である（テキサスレッドフィルターセット）（一番上の行）。およそ1000個の大腸菌が加えられた場合、抗大腸菌緑色蛍光粒子がFITCフィルターセットを使用して検出されるのに対して（2番目の行）、アデノウイルスおよび大腸菌の両方が加えられた場合、粒子は両方のチャンネルで検出される（3番目の行）。いずれの病原体も加えられない場合、1桁低い強度の粒子が検出された。これは、非特異的なバックグラウンドを表す（一番下の行）。

【0304】

実施例23. 非拡大的な広域画像処理を使用する個々の細菌を検出するためのフィルターフロースルーアッセイ法

概要：この実施例において、高度に蛍光性の粒子で標識された少数の細菌を検出するために迅速フロースルーアッセイを非拡大的な広域画像処理と組み合わせる。細菌およびビーズと一緒にインキュベートした後、細菌：ビーズ複合体を含む得られる溶液を、抗細菌抗体でコートしたフィルターに通過させる。次いで、フィルターによって捕捉された複合体を、実施例1におけるように、非拡大的な広域画像処理を使用して検出する。

【0305】

実験設計：ニトロセルロースメンブレン（Pall Biodyne A; 5 μ m孔; カタログ番号BNCF

10

20

30

40

50

810S) を、2つの1cm×1cmの正方形に切断した。この正方形を、抗大腸菌0157 (PBS中200 μg/ml) を含む溶液中に浸漬した。室温で乾燥後、このメンブレンをブロッキングした (200ml; 30分間; 室温; PBS中、1%カゼイン (Hammerston grade; EM sciences; カタログ番号CX0525-1) および0.1%トウイン20 (Sigma; カタログ番号P1379))。次いで、メンブレンを吸収ペーパー上にプロットし乾燥させた。このメンブレンをパラフィルムに移し、そしてこのメンブレンをPBS (300 μl) で飽和させた。大腸菌0157 (10⁵細胞) の溶液および、抗大腸菌0157抗体 (Kirkegaard and Perry Laboratories; カタログ番号01-95-90; 実施例8に記載されるように受動的に吸着された抗体) でコートした赤色蛍光ビーズ (10⁶ビーズ/Molecular Probes; 1 μm; サルフェート; 580/605nm; カタログ番号F-8851) をチューブ中で一緒に混合し、15分間インキュベートさせ、次いで、ニトロセルロース正方形の1つに加えた。他の正方形には、抗体のみをコートした蛍光ビーズを加えた (このフィルターは、「細菌を含まない」陰性対照であった)。さらなる15分間のインキュベートの後、メンブレンを一片の濾紙 (Whatman 50 μm孔) 上に置き、余分の液体を吸収させた。次いで、メンブレンを洗浄した (PBS-T; 50ml; 20分間)。蛍光を、赤色蛍光ビーズのためのFITC光学フィルターセット (励起560/55nm、放射645/75nm) を用いてCCD画像処理装置を使用して画像処理することによって検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1 (Media cybernetics) を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。画像処理装置で検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えたAxioplan II蛍光顕微鏡 (Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY) を使用することによって、大腸菌に結合したビーズであると確認した。

10

20

【0306】

結果：図26は、特異的に結合する蛍光性が高度のビーズで修飾された細菌を検出するためのフロースルーアッセイ法を使用した結果を示す。細菌含有試料が通過した実験フィルターのCCD画像は、多数の白色スポットを含んだのに対して、細菌を欠く試料が通過した対照フィルターはほとんどビーズを含まなかった。高出力顕微鏡法は、実験のフィルターがビーズに取り囲まれた細菌からなる多数の複合体を含んだのに対して、対照フィルターが分散した単一のビーズ以外に複合体を含まなかったことを確認した。

【0307】

実施例24. 蛍光発生性エステラーゼ基質で染色された細胞の広域画像処理を使用する細菌の定量

30

目的：多くの適用においては、生きている細菌細胞を定量するための広いダイナミックレンジを有することが必要である。理想的なシステムは、0もしくは1個の細菌細胞から数百万もしくは数千万個の細菌細胞までの正確な計数が可能であり、従って、慣習的な微生物学的プレーティング方法にかかせない段階希釈と、段階希釈特有の正確性の欠如とを除外する。この実施例において、本発明者らは、CCDに基づく、非拡大的な広域画像処理と共役させた、生細胞の蛍光発生性基質による染色が、いかにして少なくとも5オーダーの大きさにわたる細胞の定量に使用され得るかを示す。

【0308】

実験方法：大腸菌ATCC 8739細胞を、実施例Y (細胞指向実施例) において記載されるように増殖および処理した。10倍の細胞の段階希釈をPBS中で作製し、ミリポア1225マニホールド中で、吸収パッド (Chemunexカタログ番号200-C3012-02) に装着したブラックポリエステルメンブレン (Chemunexカタログ番号200-C2010-01) を通して2連の試料を濾過し、そして実施例Y (細胞指向実施例) において記載されるように染色した。さらに、10 μl の10⁻⁵希釈物を、TSA (BDカタログ番号236950) 上に3連で播き、そして細胞の力価を得るために37 °Cで一晩増殖させた。ポリエステルメンブレン上の蛍光シグナルを、FITC光学フィルターセット (色度/励起470/40nm、放射522/40nm) を備えたCCD画像処理装置 (上記の工程6; 図3に記載される) を使用してキャプチャーした。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1 (Media cybernetics) を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。各フィルターから生成したシグナルを、すべての対象物のピクセル強度の合計として定義した (ここで対象物は、この特定の実施例においては、350~653

40

50

01のピクセル強度を含むと定義する)。このシグナルを定義する方法は、いかなる染色された細胞を含まないフィルターの領域から得たバックグラウンドを除外するが、重複する対象物からの強度をマスクまたは実際より少なく数えることはない(なぜなら、細胞は小さく、全く透明であるので、細胞の層が薄い限りはシグナルは相加的であるからである)。

【0309】

結果：図28に示されるように、この方法から生成したシグナルは、少なくとも5オーダーの大きさにわたって直線的であり、これは、この試験のための広いダイナミックレンジと見なされる。

【0310】

変法：少ない数の対象物では、正確な定量は、それらのピクセル強度の合計を使用するよりも、個々の対象物を計数することによって達成され得る。なぜなら、対象物が重複する可能性は低いためである。このことは、1個もしくは0個の細胞までを正確に計数することに拡張され得る(とりわけ、複数の色素および複数の励起および/または放射波長が、どの対象物が生存している細胞を表すかを決定するために使用される場合)。さらに、より洗練された対象物発見アルゴリズムを利用して、局所的なバックグラウンド強度および照射のバリエーションを考慮に入れてもよい。

【0311】

実施例25. 非拡大的な広域画像処理を使用した、フィルター上での個々の染色された細菌の検出

概略：この実施例においては、核酸に結合する蛍光色素を用いて染色される個々の大腸菌の細菌細胞標的を広域画像処理を使用して検出する。染色された細胞はブラックポリカーボネートフィルターを通して濾過され、白色光で照射され、そしてCCDカメラで画像処理される。

【0312】

実験設計：大腸菌MG1655の培養物を、実施例2におけるように、シーバークリーンIを用いて染色した。この培養物を希釈し、そして約 10^5 細胞を、真空ポンプおよびプラスチックファンネルカップ(Millipore Microfil V User Guide, PF07114, Rev A 3/00)を使用して、ブラックポリカーボネートフィルターを通して濾過した。次いで、このフィルターを水(50ml; タイプ1品質)で洗浄した。蛍光を、広域CCDに基づく画像処理装置(図3)および、シーバークリーンIを検出するために適切なFITC光学フィルターセット(励起470/40nm、放射522/40nm)を使用して検出した。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1(Media cybernetics)を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。画像処理装置で検出された陽性シグナルを、同じフィルターセットを備えたAxio plan II蛍光顕微鏡(Carl, Zeiss Inc., Thornwood, NY)を使用することによって、細胞であると確認した。

【0313】

結果：図27は、フィルター上での細菌の捕捉および検出を示す。フィルターの表面上でシーバークリーンI染色された細胞は白色スポットとして観察される。高出力拡大下で観察した場合、スポットは染色された細胞として観察される。

【0314】

実施例26. 機器不使用の、拡大なしで行う、少数の細菌細胞の検出

概要：この実施例において、アルカリホスファターゼおよび抗大腸菌抗体の両方でコートされた粒子を使用して、液体捕捉アッセイ法において大腸菌0157細菌を検出した。細菌は、液体中で二重にコートされた粒子および抗体コートされた磁気粒子の両方に結合し、そして粒子：分析物複合体は、未結合の粒子から粒子複合体を分離するために磁力を使用することによって分離および洗浄された。この複合体は、濾過を使用して $0.2\mu\text{m}$ 孔ニトロセルロースメンブレン上に沈着され、次いで、化学発光基質および比色定量基質の両方を使用して可視化された。

【0315】

10

20

30

40

50

実験手順：二重にコートされた粒子を、ビオチン化アルカリホスファターゼ（2.9mg/ml ストックを5 μ l；Pierce；カタログ番号29339）およびビオチン化ロバ抗ヤギIgG抗体（1.6mg/ml ストックを5 μ l；Jackson；カタログ番号705-065-147）の両方を、ストレプトアビジンコートされた粒子（10⁸粒子；Bangs：0.95 μ m，非蛍光性；カタログ番号CP01N）に加えることによって作製した。反応レベルは、PBSで100 μ lまで上げられた。30分間のインキュベーション後、粒子を2回洗浄した。洗浄は、微量遠心チューブ中で、粒子を3000g、5分間、遠心分離し、次いで、上清を取り除き、かつPBS（100 μ l）中で粒子を再懸濁することから構成された。洗浄後、ヤギ抗大腸菌0157抗体（1mg/mlストックの5 μ l；Kirkegaard and Perry Laboratories；カタログ番号01-95-90）を粒子に加えた。粒子を、室温で30分間インキュベートさせ、次いで、上記のように2回洗浄した。二重コートした粒子の作製後、大腸菌0157培養物を2.5%ホルムアルデヒド中で固定し（実施例1、蛍光DNA結合色素で染色した個々の細菌の広域画像処理を参照されたい）、10倍に増加する段階希釈を行い、10⁷～10³細胞/mlを達成した。別々の1.5mlチューブに、各希釈物10 μ l（2連で行う）を、ヤギ抗大腸菌0157抗体コートされた磁気粒子（10⁶粒子；Dyna1；2.8 μ m；トシル化；カタログ番号M-280；実施例8におけるように調製）および二重コートされた粒子（10⁶粒子）と合わせた。粒子：細菌懸濁物は、PBS-TBで100 μ lにされ、室温で1時間、混合しながらインキュベートした。インキュベーション後、チューブを4回、PBS-TB中で洗浄した。洗浄は、磁気粒子：細菌：粒子サンドイッチをチューブの一方に引き付ける磁気分離、続いて上清を除去するための吸引、およびPBS-TB（100 μ l）中での再懸濁からなつた。洗浄した粒子：細菌サンドイッチの各希釈の両方の複製を、別々に濾過した。各複製をPBS（50ml）に加え、そして真空ポンプおよびプラスチックフネルカップ（Millipore Microfil V User Guide, PF07114, Rev A 3/00）を使用して、0.2 μ m孔ニトロセルロースメンブレンを通して濾過した。BMパープルAP基質（500 μ l；Roche；カタログ番号1442074）を、1つのフィルターの設定に加えた。他のフィルターの設定には、CDPスター（500 μ l；NEN；カタログ番号NEL-601）をそれらに加えた。1時間のインキュベーション後、BMパープルメンブレンを水中で洗浄し、BMパープルを除去し、そしてメンブレンを風乾させた。CDPスターメンブレンを、製造業者の指示書に従ってスポットライトカメラ（Boston Probes；カタログ番号DT10000）に装着し、ASA2000フィルム（Boston Probes；カタログ番号DT20000）に2秒間露光させた。次いで、同じフィルターを、非拡大的な広域画像処理を使用して露光させた。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）を使用して、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理した。

【0316】

結果：図29は、カテゴリ-特異的結合分子および酵素的シグナリング部分に結合体化された二機能性粒子が、色素原性または化学発光性シグナルエレメントのいずれかを使用して検出され得ることを示す。二重に標識された粒子を使用する、本明細書に記載のアッセイ法は、高感度で、少数の細菌を検出する（約100細胞）。肉眼で見る能力は、多くの酵素分子を含むこれらの粒子の莫大なシグナリング能力に起因する（大腸菌：ビーズ複合体は、通常は高解像度の顕微鏡下でのみ観察できる）。実際、単一の分散した顕微鏡的ビーズは、この実施例におけるように、調製され、フィルター上に沈着され、そして色素原性基質で処理された場合に肉眼で検出可能であった。この実施例において使用されたアプローチにより、単純で、高価でなく、かつ機器を使用しないポイントオブケア試験を提供する、現在の迅速な試験と対照的に極度に高感度である、本発明の潜在能力を実証する。

【0317】

実施例27．臨床試料中でのマイコバクテリウム・ツベルクローシスについての迅速、同種、高感度、および定量的イムノアッセイ法

概要：M.ツベルクローシスについての診断試験の医学的重要性は、実施例9の概要において議論している。この実施例において、本発明は、カテゴリ-特異的抗M.ツベルクローシス抗体を使用する同種イムノアッセイ法（実施例8および図11を参照されたい）を構築するために使用される。この種の試験は、迅速、高感度、安価、および取り扱いが容易である。ここで記載されるアッセイ法は、実施例9において実証された抗酸バチルスアプロ

ーチを補足するものである。なぜなら、これは、M.ツベルクローシスを他のマイコバクテリア種から区別するからである。

【0318】

M.ツベルクローシス特異的抗体：この実施例におけるカテゴリー結合分子は、M.ツベルクローシスに特異的に結合する抗体である。この実施例は、M.ツベルクローシス複合体における種について特異的なモノクローナル抗体（MPB64-ICA）を利用する（Abeら、J.Clin. Microbiol. 37: 3693-2881, 1999）。あるいは、ポリクローナル抗体が使用され得る。例えば、本発明のために、M.ツベルクローシスと反応するウサギポリクローナル抗体（BioDesign, カタログ番号B65601R）を使用し得る。

【0319】

カテゴリー特異的ポリクローナル抗体は、当業者に公知の方法を使用して、免疫アフィニティークロマトグラフィーによって好ましく精製される。この実施例において、M.ツベルクローシス特異的抗体は、活性化された粒子（例えば、Affigel 10; BioRad）上に固定化された標的病原体を含むカラムを使用して精製される（Harlowら、「Using Antibodies: A Laboratory Manual」（Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1999）。この方法において所望の抗体の陽性選択の後、抗体は、他の下気道病原体および気道に典型的な共生フローラ（結核を引き起こさないマイコバクテリア種（例えば、M.アビウム、「Pathogens are fixed」（Amannら、Appl Environ Microbiol 56: 1919-25, 1990）を含む）との交差反応についてチェックされ（例えば、Murrayら編（1999）「Manual of Clinical Microbiology」第7版、Washington, D.C.: American Society for Microbiology、第3章、表1）、ポリリジンコートされたガラススライド（Sigma; カタログ番号P-0425）上にスポットされ、そして抗M.ツベルクローシス抗体で処理され（PBS-B中で1:500希釈; 20分間; 室温）、PBS-TB（50ml）で4回洗浄され、次いで、フルオレセイン標識ヤギ抗ウサギIgGで同様に処理された。次いで、抗体と交差反応する生物体を使用して、特異的に反応する抗体から交差反応する抗体を取り除いた。この交差反応する生物体は粒子に結合され、そして上記に記載したように、M.ツベルクローシス特異的抗体の陽性選択のために免疫アフィニティークロマトグラフィーによる交差反応抗体の吸着に使用される。しかし、交差反応抗体を取り除くために、未結合の抗体は収集され、そして結合した抗体が廃棄される。得られる抗体はM.ツベルクローシス特異的である。

【0320】

あるいは、市販されていない抗体（ポリクローナルもしくはモノクローナル）または組換え抗体が、種々の研究およびその中の引用文献（例えば、Coligan, J.ら編（1994）「Current Protocols in Immunology」New York; John Wiley & Sons; Knott, C.ら（1997）「Development of Antibodies for Diagnostic Assays. Principles and Practice of Immunoassay」C. Price および D.Newman編: Stockton Press; George, A.（1997）「Antibody Engineering: Potential Applications for Immunoassays」 「Principles and Practice of Immunoassay」C. Price および D.Newman編: Stockton Press）において記載されている、当業者に公知の標準的な方法を使用することによって産生され得る。

【0321】

カテゴリー特異的抗体を用いた磁気粒子および蛍光粒子のコーティング：カテゴリー特異的抗体を使用して、実施例8に記載されるように、磁気粒子および蛍光染色されたポリスチレンを粒子コートした。

【0322】

M.ツベルクローシス特異的粒子の下気道試料への結合：次の工程において、蛍光性および磁性M.ツベルクローシス特異的粒子を、下気道試料中のM.ツベルクローシス細胞に結合させる。液体状態にした下気道試料（200 μ l）を、光学的に透明な底を有する96ウェルマイクロタイターディッシュのウェル（Greiner Labs; カタログ番号665097）中で、M.ツベルクローシス特異的粒子混合物（各タイプ 1×10^6 粒子）と混合する。BAL下気道試料を前処理なしで使用。痰試料を、NALC-NaOH法（Isenberg編（1992）「Clinical microbiology procedures handbook. Washington, D.C.: American Society of Microbiology」3.

10

20

30

40

50

4節)を使用して調製する。

【0323】

試料中のM.ツベルクローシスの検出および定量：試料を、実施例8に記載されるように処理、画像処理、および分析する。

【0324】

対照：陽性対照実験および陰性対照実験を、好ましくは、臨床試料と並行して処理する。陽性対照試料（これは、臨床試料と同じに処理される）は、好ましくは、PBS中に既知の量（約1000細胞）のM.ツベルクローシスを含む。陽性対照中の細胞の正確な量の検出は、生化学的および画像の分析手順が正しく機能していることを示す。陰性対照試料はPBSを含むが細胞を含まない。すべての手順が正しく機能した場合には、陰性対照実験において陽性シグナルは見られないはずである。

10

【0325】

変法：標的の染色はまた、蛍光粒子を使用することの代わりに、または蛍光粒子を使用することに加えて、検出のために使用され得る（実施例8における変法を参照されたい）。M.ツベルクローシスについての特異的染色手順（例えば、オーラミン0またはオーラミン-ローダミン染色）もまた使用され得る（実施例9を参照されたい）。

【0326】

実施例28. 蛍光染色を使用した、臨床試料中でのマイコバクテリウム・ツベルクローシスの迅速同種抗微生物感受性試験

概要：M.ツベルクローシスの迅速な同定（実施例9を参照されたい）および迅速な感受性試験に関連する、大きな医学的重要性が存在する。この実施例は、臨床試料中の直接的なM.ツベルクローシスの迅速な増殖を、単純であるが高感度の抗酸性塗擦技術（実施例9、図13）と組み合わせて、現在必要とされている数週間の時間を節約し、結核を有する患者についての感受性データを提供する。

20

【0327】

M.ツベルクローシスについて、感受性試験について結果が出るまでの時間は、数週間から数ヶ月の範囲にわたっており、この時間の間に、最適以下の抗微生物治療で処置された患者は、多くの他のヒトにこの疾患を伝染させ得る。存在する感受性試験は、培養した試料から開始する。従って、多くの生物体について、感受性試験の開始は、一般に試料収集後24~48時間であり、M.ツベルクローシスについては、試験の開始は一般に数週間遅れる。現在の迅速試験レジメは、一般に7~12日間を要し、抗生物質感受性試験の前に薬物を使わずに増殖させる。マイコバクテリウム・ツベルクローシスのためのより迅速な感受性試験が決定的に必要とされている。なぜなら、世界的規模で多剤耐性マイコバクテリウム・ツベルクローシスの伝染が増えているからである。

30

【0328】

この実施例に記載される抗微生物感受性アッセイ法は、臨床的に価値のある特色を提供し、これらには：最小限の増殖の必要性（数世代）、単純さ、費用対効果、多数の抗微生物レジメの並行分析、細菌の低い力価を含む生物学的に複雑な臨床試料を直接試験する能力が含まれる。この試験のこれらの固有の特色は、顕微鏡を使用せずに試料中の少数の微生物を同定および計数する本発明の能力の結果である。本発明は、別の薬物を含まない必須の培養工程をバイパスすることによって、および抗生物質を伴うインキュベーションを4日間まで短くすることによって、古典的な感受性試験の結果が出るまでの時間を数週間節約する。本発明を使用する試験の結果が出るまでの時間は、新しい迅速試験の最も速いもの（例えば、Nordenら、J. Clin. Micro. 33: 1231-1237, 1995）の半分未満である。本発明は、他の迅速感受性試験方法（例えば、BACTEC-460およびフローサイトメトリー）によって必要とされるよりもはるかに安価な機器しか必要としない。

40

【0329】

この実施例において使用されるアプローチはまた、抗微生物的治療を受けている患者をモニタリングするために使用され得る（別の重要な未だ達成されていない臨床的な必要性）。抗生物質を投与されている患者における生細胞の数をモニタリングすることは、治療

50

的な効力を決定するために重要である。核酸増幅に基づくM.ツベルクローシスについての現在の迅速試験は、患者のモニタリングのためには使用することができない。これは、増幅可能な核酸を含む生存していないマイコバクテリウム・ツベルクローシスが、治療が有効である場合でさえ、長期間にわたって存続しているからである。生存している生物体の数は、数世代の増殖のためのインキュベーションの前後で試料中の細胞の数を評価することによって決定され得る（この適用においては抗生物質の非存在下）。

【0330】

M.ツベルクローシスの同定：痰試料を、オーラミン-ローダミン抗酸パチルス法（Isenberg編、1992、前出）を使用して調製および染色し、そして実施例9に記載されるようにM.ツベルクローシスについて試験する。M.ツベルクローシスが存在する場合、痰のアリコートを使用して、病原体の抗微生物剤感受性を分析する。

10

【0331】

種々の抗生物質を用いた、臨床試料中のM.ツベルクローシスの直接増殖：抗生物質感受性試験を、プロス微量希釈法を使用して、マイコバクテリウム・ツベルクローシスを含む試料で実行する。液体化した痰のアリコート（100 μ l；実施例27と同様に調製）を、濃縮した7H9プロス（100 μ l；通常の濃度の3倍で調製；DIFCO番号211417）を含む試験管（2mlポリプロピレンスクリーキャップチューブ；Sarstedt）に加え、そして以前に記載されたように（Mooreら、J.Clin Microbiol 37: 479-83, 1999）、種々の濃度のエタンプトール、イソニアジド、およびリファンピン（各チューブに100 μ lの抗生物質を加える；Sigma）を接種する。2つのチューブには抗生物質ではなくPBS（100 μ l）を接種する。これらの一方のチューブを、感受性試験試料と並行してインキュベートして、薬物がない場合の細菌の増殖を測定する（陽性対照）。他のチューブは、増殖を妨げるために4 \times でインキュベートする（陰性対照）。すべてのチューブを4日間インキュベートし、次いで、以前に記載されたように（Mooreら、1999、前出）、1%パラホルムアルデヒドを用いる処理によって死滅させる。

20

【0332】

蛍光抗酸パチルス試験を使用した、抗微生物剤感受性の確認：抗生物質の存在下または非存在下で増殖させた試料を、次に、実施例9に記載の蛍光抗酸パチルスを使用して計数する。試料のアリコート（例えば、100 μ l）を、上述したように（実施例9）、スライド上に塗布し、非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理し、そして分析する。試験する各抗生物質について、試料計数データを使用して、2つの曲線をプロットする。1つの曲線は、画像の全体の積算強度に基づき、そして他方は、画像処理ソフトウェアを使用して見出し出された対象物の総数に基づく。種々の抗生物質の最小阻害濃度（MIC）を、これらの曲線の検査によって決定する（実施例10を参照されたい）。

30

【0333】

同種イムノアッセイ形式を使用する変法：本発明の他の実施態様がこの適用に適用され得る。これは、例えば、実施例27において使用された同種イムノアッセイ形式である（図11もまた参照されたい）。液相形式を使用する場合、種々の抗生物質濃度において増殖した試料のアリコート（100 μ l）を、M.ツベルクローシス特異的蛍光および磁気粒子の混合物に加え、そして実施例27に記載されるように処理する。

40

【0334】

実施例29. 血液中のヒト免疫不全ウイルスについての迅速、同種、定量的試験

概要：血液中のHIVレベルを検出および測定することは、HIV感染のあらゆるステージで決定的に重要である。HIV感染の初期の診断は、血漿中の低レベルのウイルスを検出する能力に依存する。血漿中のウイルスのレベルを定量することは、AIDS患者の健康をモニタリングするための鍵となる戦略であり、抗ウイルス処理の有効性を理解するために必須である。HIV検出方法に必要なとされる感度は、100ビリオン/ml未満である。現在の超高感度方法は、核酸検出（例えば、PCR、TMA、およびbDNA）に基づいている。しかし、これらの方法は、イムノアッセイ法と比較して、高価でありかつ遅い。しかし、現在のイムノアッセイ法は、血漿中で低レベルのウイルスを測定するのに十分な感度がない。

50

【0335】

この実施例は、単純、迅速、かつ経済的な同種イムノアッセイ形式で核酸増幅試験の超高感度を提供する本発明の能力を実証する。本発明の重要な特色である、非顕微鏡的試料中での個々の標的の検出および同定は、感度および簡易性の組み合わせを達成するために必須である。

【0336】

抗体での粒子コーティング：HIV特異的粒子を作製するために、黄色-緑色蛍光粒子（FluoSphere；カタログ番号T-8803；Molecular Probes）および磁気粒子（カルボキシポリマーコートしたフェロフルイド；Immunicon；カタログ番号F3000）を、抗HIV gp160/120（Chemicon；カタログ番号MAB8836）を使用する以外は、実施例8と同様に抗体でコートする。

10

【0337】

対照粒子：この実施例は、陽性および陰性の両方の内部対照を組み入れる。すべての手順および試薬が正しく機能した場合、陽性対照粒子は明白であるが、有意な数の陰性対照粒子は検出されない。陽性対照粒子はオレンジ蛍光粒子（TransFluoSpheres；100nmカタログ番号T-8872）および磁気ナノ粒子（フェロフルイド）からなる。陽性対照粒子は、抗バクテリオファージFd抗体（Accurate；カタログ番号BYA-3163-1）でコートされる。既知の数（～1000）のバクテリオファージFdビリオンは各実験試料に加えらる。手順が正しく機能している場合、すべてのFdビリオンはFd特異的オレンジ蛍光ナノ粒子とFd特異的磁気ナノ粒子の両方に結合する。

20

【0338】

陰性対照粒子は、抗ジゴキシゲニン抗体（Roche；カタログ番号1 333 062）でコートされた暗赤色蛍光粒子である（TransFluoSpheres；100nmカタログ番号T-8876）。アッセイ法において検出される暗赤色蛍光粒子はバックグラウンドレベルを示す（すなわち、磁気的に標識された標的との結合と独立して検出される粒子の数）。

【0339】

粒子の集合の作製：HIV特異的粒子および対照粒子を混合して、その結果、全体の合わせた粒子濃度は2%固体である。この粒子を、実施例8と同様に超音波処理によって分散させる。

【0340】

血漿の調製：血液を、EDTAを抗凝血剤として使用して滅菌チューブ（例えば、Becton-Dickinson；カタログ番号6454）内に収集する。血漿を、スクリーキャップ微量遠心チューブ（例えば、Sarstedt；カタログ番号782.694.006）中で、室温で10分間、900RPMの遠心分離によって、全血から分離する。血漿は、-20℃で数週間凍結して保存されてもよく、または冷却しない場合には1日以内に使用され得る。約1000Fdバクテリオファージ（PBS中100pfu/μlの10μl；ATCCカタログ番号15669-B2）を各血漿試料（200μl）に加える。

30

【0341】

イムノアッセイ法およびHIV検出：次いで、粒子混合物（100μl）および試料を、マイクロタイターディッシュのウェル中で互いに混合し、インキュベートし、磁気選択し、そして3種類の粒子に適切なフィルターセットを使用して3つの画像を収集する以外は、実施例22と同様に画像処理した。このフィルターセットには以下のものが含まれる：単一の励起フィルター（Chroma HQ480/40x）および3つの異なる放射フィルター（黄色-緑色粒子についてはChroma HQ522/40m、オレンジ粒子についてはChroma HQ567/15m、および暗赤色粒子についてはChroma HQ667/30m）。黄色-緑色粒子（HIV特異的）の数 - 暗赤色粒子（陰性対照）の数は、試料中のウイルスの数を示す。暗赤色粒子の数対インプットのFdバクテリオファージ粒子の数の比は、試験の効力を示す。

40

【0342】

実施例30. 免疫表現型決定によるヒト細胞の分析：AIDS患者におけるCD4+細胞の定量

ヒト疾患の診断（癌および免疫不全の診断を含む）は、それらの別個の分子的な構成成分に基づくヒト細胞の同定に依存する。免疫表現型決定は、特定の細胞型を同定する重要

50

な手段であり、標的細胞をタグ化および染色するために抗体を使用する。免疫表現型決定のための共通の技術的形式には、フローサイトメトリーおよび高倍率顕微鏡法（免疫組織化学）が含まれる。しかし、フローサイトメトリーは高価な機器を必要とし、そして高倍率顕微鏡法は、感度が高くない可能性がある。対照的に、本発明を使用する免疫表現型決定アッセイ法は、高感度かつ比較的安価の両方であり得る。この実施例は、AIDS患者の免疫状態、従って健康状態を決定するための鍵となる試験に本発明を使用する。このアッセイ法は、血液中のCD4⁺T細胞の濃度を決定する。この実施例は、この実施例において標的細胞がヒト細胞であること、および試料が血液であること以外は、実施例8と技術的に同様である。

【0343】

磁気粒子および蛍光粒子の調製：CD4+特異的蛍光および磁気粒子を、CD4特異的抗体（BioDesign；カタログ番号P54400M）をこの実施例で使用すること以外は実施例8と同様に調製する。コートされた粒子を、実施例8と同様に混合し、そして、PBS-TB（175μl）を含む、光学的に透明な底を有する96ウェルマイクロタイターディッシュ（例えば、Greiner；カタログ番号655896）の6つのウェルの各々に加えた（1%懸濁物の25μl）。

【0344】

全血中でのCD4+細胞の定量：AIDS患者からの全血（5μl）を、6つのマイクロタイターディッシュのウェルの各2つのウェルに粒子混合物を加える（2連の実験試料ウェルを構成する）。健康なドナーからの全血（5μl）（既知のCD4+細胞濃度を有する）を各2つのウェルに加える（2連の陽性対照ウェルを構成する）。ヒト血清（細胞枯渇；Biochemed；カタログ番号758AB）を、粒子混合物を含む3つ目の対のウェルに加える（2連の陰性対照ウェルを構成する）。細胞および粒子を室温で20分間インキュベートする。CD4+特異的磁気粒子と結合したCD4+細胞を、実施例8と同様に、磁石を使用してウェルの底面に引きつける。未結合物質を、磁場を維持しながら、洗浄（3回の洗浄；各洗浄200μl PBS-TB）によって除去する。CD4+細胞を、実施例8と同様に画像処理および定量する。試験の効力を、陽性対照におけるCD4+細胞計数を既知の濃度に対して比較することにより決定する。アッセイのバックグラウンドレベルを、陰性対照ウェルから決定する。

【0345】

実施例31. クラミジア・トラコマチス（*Chlamydia trachomatis*）およびナイセリア・ゴノレエ（*Neisseria gonorrhoeae*）についての迅速同種イムノアッセイ法

概要：この実施例において開発された診断アッセイ法は、2つの性感染症の病原体であるクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエ（これらは共通して尿道炎を引き起こす）を試験する。これらの感染は、重篤な続発症を有する（骨盤炎症性疾患、不妊症、およびHIV感染に対する感受性の増加が含まれる）。約1億5千万人の人が、1995年にこれらの2つの病原体の1つに新規に感染したと見積もられている（米国において1998年にほぼ百万人の人が感染した）。ほぼ年間あたり10億ドルが、C.トラコマチスおよびN.ゴノレエについての試験に費やされる。現在の試験は、グラム染色（N.ゴノレエについて）からDNA増幅までの複雑な方法の範囲を使用する。不運なことに、この試験は、安価かつ低感度であるか（例えば、グラム染色、直接蛍光アッセイ法）、または高感度かつ高価であるか（例えば、核酸増幅試験）のいずれかである傾向がある。

【0346】

この実施例は、尿試料中のC.トラコマチスおよびN.ゴノレエを、安価かつ高感度で検出し、同定し、そして計数する試験を構築するために本発明を使用する。

【0347】

病原体特異的粒子および対照粒子の作製：病原体特異的粒子を、実施例8に記載する手順を使用して作製する。緑色蛍光粒子（FluoSpheres；カタログ番号T-8803；Molecular Probes）および磁気粒子は、抗クラミジア抗体（BioDesign；カタログ番号C65641M）でコートする。赤色蛍光粒子（Molecular Probes TransFluoSpheres；カタログ番号T-8861）および磁気粒子は、抗N.ゴノレエ抗体（BioDesign；カタログ番号C65618M）でコートする。陽性対照粒子および陰性対照粒子は実施例29と同様に作製する。

10

20

30

40

50

【0348】

尿中でのN.ゴノレエおよびC.トラコマチスの検出および定量：尿試料（10ml）を、市販のキット（B-D尿採取キット（Urine Collection Kit）（Becton-Dickinson, BD Vacutainer（商標）Brand urine collection cups））を使用して収集する。尿を、4000×gで10分間遠心分離し、そして上清を取り除く。ペレットを400μlのPBS-B中に再懸濁する。試料を、実施例29と同様に、粒子と混合し、インキュベートし、磁気選択し、画像処理し、そして分析する。しかし、この実施例においては、4つの画像が試料から得られ、3つは、実施例29において記載されたフィルターセットを用い、そして1つは赤色蛍光粒子（Chroma HQ617/40m）を画像処理するために適切なフィルターを用いるものである。黄色-緑色蛍光粒子は、試料中のC.トラコマチスの数を示す。赤色蛍光粒子の数は、試料中のN.ゴノレエの数を示す。

10

【0349】

変法：この実施例における試験は、尿道炎を引き起こし得る他の病原体（例えば、膾トリコモナス（*Trichomonas vaginalis*）、ウレアプラズマ・ウレアリチカム（*Ureaplasma urealyticum*）およびマイコプラズマ・ボヴィゲニタリウム（*Mycoplasma genitalium*））についての走査を含むように拡張され得る。さらなる別個のシグナリング部分（すなわち、区別可能な蛍光特性を有する粒子）またはコンビナトリアル標識ストラテジーを使用して、さらなる標的が検出および同定され得る。多形核白血球の存在についての定量的試験（これは、尿道炎の診断において役立つ）は、これらの細胞に特異的な抗体でコートされた粒子を使用することによって試験に組み入れられ得る。

20

【0350】

実施例32. 下気道病原体についての、迅速で、多重化された、同種のサイトメトリー試験
肺炎：肺炎は、米国における感染性の疾患による最も一般的な死因である。この疾患の病因論は、年齢および免疫状態に依存している。ウイルスは大部分の小児の肺炎を引き起こすのに対して、細菌病原体は、成人の肺炎を引き起こす最も一般的な病原体である。免疫無防備状態の宿主において肺炎を引き起こす病原体のスペクトルは大きく変化し、そして、免疫系または保護表面（粘膜または皮膚）に影響を与える癌を有する患者、移植被提供者、およびHIV感染患者については異なる。

【0351】

肺炎の首尾よい処置のために、病原体を迅速に同定することが本質的である。しかし、現在の診断実務は、効率的な病原体の同定ができない。肺炎の原因を決定するための診断的努力の半分より多くが病因論の因子を同定し損なっている（このことは、病原体を同定するための試みがなされていない場合の大きな割合を含んでいない）。下気道感染を引き起こす多くの細菌およびすべてのウイルスおよび真菌の病原体は、日常的な微生物培養方法によって同定することはできない。例えば、結核、百日咳、レジオネラ症、およびマイコプラズマによって引き起こされる肺炎を引き起こす病原体を同定するためには、特別な方法が必要である。下気道診断は、正常な上気道フローラが夾雑していない下気道試料を得る際の困難さによって複雑化されている。さらに、上気道において害のない正常なフローラが、患者によって吸引された場合に肺炎を引き起こし得る。診断によって同定された株が上気道の夾雑物であるか、または病因論的な因子であるかを識別することは、注意深い試料品質の規制措置および微生物学的定量を必要とする。

30

40

【0352】

肺炎の症例は、一般的に2つのクラス：地域社会由来の肺炎および病院由来の肺炎、にあると見なされている。地域社会由来の肺炎は、約20,000例の死亡を引き起こし、かつ米国において年間80億より多い治療費用が課せられている。病院由来の肺炎は最も深刻であり、かつ2番目に最も一般的なタイプの病院由来の感染症である。集中治療室にいる患者の10%より多くが、病院にいながら肺炎になっている。死亡率は高い：院内肺炎患者の1/3がこの疾患で死亡している。迅速かつ正確な診断は決定的である。なぜなら、最適な救命抗生物質治療は、多数の潜在的な病原体のどれが疾患を引き起こしているかに依存する。広い範囲の潜在的な病原体（このうちのいくつかは表2に列挙される）は下気道診断のチ

50

チャレンジに寄与する。

【0353】

下気道感染を有する患者は、米国において経口抗生物質処方75%を占めている。大部分の下気道感染において病原体を同定するための現在の診断の失敗に起因して、年間ほぼ10億ドルが役に立たない抗生物質に浪費されている。ウイルス感染に対する抗生物質治療の不正確な適用は、大部分、抗生物質の乱用および抗生物質耐性病原体の現在の世界的規模の蔓延の原因である。従って、下気道病原体の包括的なセットについて試験する単一の診断アッセイ法には大きな必要性が存在する。

【0354】

試験の利点：この実施例において、本発明は、超高感度、定量的、かつ高度に多重化された同種イムノアッセイ法を作製するために使用される。一般的な細菌、ウイルス、および真菌の病原体を同時に試験することによって、記載されるこの方法は、現在の実務を超えた実質的な改善を提供する。培養、増幅、または酵素的な工程を有しない高感度のイムノアッセイは、使い勝手がよく、費用対効果が高く、迅速で、かつ商品化されやすい(同種イムノアッセイ法の利点については実施例8を参照されたい)。この試験は、診断的に有効性のある主要な改善をもたらし、適切かつ時期を得た抗微生物学治療が導かれ、究極的には多くの生命を救う。

【0355】

この実施例の技術的概要：図32は、この実施例において使用されるスキームを図示する。下気道感染症候を有する患者からの下気道試料(例えば、BALまたは液体化した痰)を、各々が特定の標的病原体に結合する抗体でコートされた粒子の集合と混合する。各々の病原体特異的粒子を、比標識によって独特な色でコードした。実施例31において使用されるものと類似したアプローチを、より高度に多重化したこの試験において使用する。

【0356】

(表2) 一般的な下気道病原体

ストレプトコッカス・ニューモニエ	ヘモフィルス・インフルエンゼ	マイコプラズマ・ニューモニエ
モラクセラ・カタラ・リス	クラミジア・ニューモニエ	アシネトバクテラ属種 (<i>Acinetobacter spp.</i>)
レジオネラ属種 (<i>Legionella spp.</i>)	スタフィロコッカス・アウレウス	大腸菌
クレブシエラ属種 (<i>Klebsiella spp.</i>)	セラチア・マルセッセンス (<i>Serratia marcescens</i>)	シュードモナス・エルジノーサ
プロテウス属種 (<i>Proteus spp.</i>)	エンテロバクテラ属種 (<i>Enterobacter spp.</i>)	呼吸器合胞体ウイルス
アデノウイルス	A型インフルエンザウイルス	B型インフルエンザウイルス
パラインフルエンザウイルス	サイトメガロウイルス	カンジダ・アルピカンズ
アスペルギルス属種 (<i>Aspergillus spp.</i>)	クリプトコックス・ネオフォルマンズ	ニューモシスチス・カリニ

【0357】

病原体特異的抗体：この実施例におけるカテゴリー結合分子は、表2に列挙された下気道病原体に特異的に結合する抗体である。各病原体に対する抗体は、可能な場合、商業的な供給源(例えば、BioDesign, Biotrend GmbH, Cologne, Germany, Fitzgerald Industries International, Inc., Concord, MA, およびAccurate Chemical and Scientific Corporation, Westbury, NY)から得られる。あるいは、抗体は実施例27に記載されるように、入手され、アフィニティー精製され、そして試験され得る。

【0358】

抗体は、結合特異性および標的病原体を標識するための能力について試験される。最適な標識を得るために、特定の病原体に特異的なくつかの抗体は、好ましくは互いに比較される。標的病原体(10µlのPBS-T中、約10⁵病原体細胞またはウイルス感染した細胞)を、カテゴリー特異的抗体(10µlのPBS-T中、約10µg)および余分の(例えば、20µg)蛍光標識(例えば、フルオレセイン)二次抗体(例えば、ヤギ抗マウスまたはヤギ抗ウサギ、カテゴリー特異的一次抗体の供給源に依存する)とともに混合し、そして室温で20分

間インキュベートする。未結合の抗体を、PBS-T (1ml) 中で2回洗浄することによって除去する。洗浄は、微量遠心チューブ中で希釈した生物を遠心分離することによって達成される (12,000 × g; 1分間)。次いで、蛍光標識された標的生物を、蛍光顕微鏡 (Zeiss Axioptan 2) において画像処理し、そして画像処理ソフトウェアを使用して記録する (Image-Pro Plus, Media Cybernetics, Silver Spring, MD)。

【0359】

類似のアッセイ法を使用して、標的病原体の最適な標識を提供する抗体が、気道の病原体のパネルおよび下気道において一般に見い出される共生フローラにそれらを結合させることによって、特異性について試験される。同様に、抗体が気道の内因性の成分とは反応しないことを保証するために、各抗体はまた、正常な患者および下気道疾患 (これは、標的病原体によって引き起こされないことが既知である) を有する患者からの上気道および下気道の試料のパネルに結合することについて試験される。

10

【0360】

これらの試験を使用して、標的病原体に効率的に結合するが、気道試料において見い出されるいかなる他の微生物または成分にも結合しない抗体が選択される。

【0361】

カテゴリ-結合分子でコートされた粒子の集合の構築：表2に列挙された下気道病原体の各々についてのカテゴリ-特異的抗体を使用して、実施例8と同様に、2つの種類の粒子：ポリスチレンコートされた磁気粒子および蛍光染色されたポリスチレン粒子をコートする。しかし、この実施例において、病原体特異的抗体の各ファミリーは独特に比標識された蛍光粒子に結合体化される。従って、各病原体カテゴリ-について、磁気粒子および蛍光粒子のコードされたセットを含むカテゴリ-特異的粒子のセットの対を作製する。この実施例において使用される蛍光粒子は、カスタムメイドの比標識された硫酸誘導体化ビーズ (Bangs Laboratories; 5つの異なる濃度のフルオレセイン (505/515) およびテキサスレッド (595/615) の組み合わせ) である。このビーズは標識される。この粒子の集合は、最終粒子濃度が2% 固体 (PBS-TB中) となるように合わされる。陽性および陰性の対照粒子を調製し、そしてこの実施例における対照粒子が、病原体特異的粒子から区別される色のコードを有する比標識粒子を使用して構築される以外は、実施例29と同様に粒子集合に含まれる。

20

【0362】

試料中の病原体の検出、同定、および定量：液体化された下気道試料 (1000対照ファージが実施例29と同様に加えられた200 μl BAL試料) をマイクロタイターディッシュ中の粒子集合で混合する。この試料を実施例8と同様にインキュベートし、磁気選択する。2つの画像を、比標識のために使用される2つの色素について適切な2つのフィルターセットを使用して収集する (フルオレセインについては：励起Chroma HQ480/40xおよび放射Chroma HQ535/50m; テキサスレッドについては：励起Chroma HQ560/55xおよび放射Chroma HQ645/75m)。画像をImage-Pro Plusソフトウェアを使用して整列させる。このソフトウェアによって見い出される各対象物の蛍光シグニチャー (すなわち、比標識のために使用される2つの色素の比) を点数付けし、蛍光シグニチャーと病原体特異性を相関させる検査表 (look-up table) (比標識蛍光粒子の異なるクラスを使用して経験的に作製したもの) と比較する。対象物の数および分類を、ImagePro Plusソフトウェアパッケージを用いて作製されたカスタム化ソフトウェアモジュールを使用して表にする。試験の効力を、陽性対照粒子および陰性対照粒子に対応する対象物の計数によってモニターする。試験のバックグラウンドを、PBS (200 μl) がBAL試料の代わりに置き換わっている並行した試験の実行の分析によって見積もる。

30

40

【0363】

Chroma HQ560/55xおよび放射 (Chroma HQ645/75m) Chroma励起HQ560/55、放射HQ645/75m。

【0364】

実施例33. 非拡大的な広域画像処理を使用する多数の下気道病原体について並行して走査

50

するイムノアッセイ法

概要：この実施例の医学的目的および重要性は、実施例32と同じである。本明細書においては、前の実施例と同様に、カテゴリ-特異的抗体を使用して、肺炎を引き起こす多数の多岐にわたる病原体（ウイルス、細菌、および真菌を含む）について下気道試料を同時に走査する。しかし、この実施例では、試料をガラススライドに固着する。下気道病原体の同一性は、並行した免疫組織化学的分析、続いて非拡大的な広域画像処理による個々の標的の画像処理によって決定される。図33は、この実施例において使用されるスキームを示す。

【0365】

下気道試料の間接的な蛍光アッセイ法：下気道試料の塗沫をガラススライド上で調製し、以前に記載したように固着させる（例えば、Isenberg編、1992、前出；9.5節）。ガラススライドの異なる部分に異なる抗体を結合させるために、接着性ウェル（例えば、接着性シリコンflexiPerm細胞培養チャンパー、30ウェルを有するカスタム製造品；IVSS；Sartorius）をスライドに固着させる。この実施例において使用されるカテゴリ-特異的抗体は、実施例32において記載される。各々のタイプのカテゴリ-特異的抗体（200 μ l；PBS中10 μ l/ml）を異なるウェルに加える。陰性対照として、免疫前のウサギ血清から精製したIgG（200 μ l；PBS中10 μ g/ml；ウサギIgG試薬等級，Sigma，カタログ番号I5006）および免疫前のマウス血清から精製したIgG（マウスIgG試薬等級，Sigma，カタログ番号5381）を、別々のウェルに加える。スライドを室温で30分間インキュベートする。ウェルをPBSで洗浄する（200 μ l；4回洗浄）。次いで、固着ウェルを移動して、全体のスライドが単一のユニットとして効率的に処理され得るようにする。PBS中、次いで蒸留水中にスライドを浸し（Coplインジャー中で）、スライドを風乾した。試料に、ヤギ抗ウサギおよびヤギ抗マウスビオチン化ポリクローナル二次抗体（PBS中5 μ g/ μ l各ポリクローナル抗体）の混合物を完全に重層させ、そして湿式スライドチャンパー（Boeckel）中で室温で30分間、インキュベートさせた。すすいだ後（PBS中で2回；蒸留水で1回；Coplインジャー中で）、試料に、ストレプトアビジンコートされた蛍光粒子（Molecular Probes；カタログ番号F-8780；0.5%固体）を完全に重層し、インキュベートし、そして以前の工程と同様に洗浄した。

【0366】

画像処理および分析：試料を、以前と同様にCCDに基づく画像処理装置を使用して画像処理する（詳細な説明の工程6に記載され、図3に示される）。この画像処理装置は、病原体特異的抗体または対照抗体を含むウェルに対応するスライドの各区画の画像を獲得する。次いで、画像分析ソフトウェア（Image-Pro Plus）が、各画像中の全体の蛍光および蛍光染色された対象物の数を計算する。陰性対照ウェルよりも有意に多い蛍光対象物および蛍光強度を有するウェルは、対応する病原体によって引き起こされる感染の可能性を示す。

【0367】

変法および関連する実施態様：代表的には、下気道試料に夾雑する、口/食道領域において通常見い出される共生種についての試験は、この化合物アッセイ法における有用な抱き合わせ試験であり得る（さらなるウェルにおいて）。扁平上皮細胞（これは下気道の性質を示し得る）および/または免疫系の細胞（これは感染の可能性についての情報を与え得る）に特異的な抗体を含むこともまた有用であり得る。

【0368】

高いシグナル複雑性を達成するための潜在能力を有する他の種類のシグナリング部分が、比標識された粒子の代わりに使用され得る。例えば、蛍光団標識された抗体が類似して使用され得る。2つまたはそれ以上の蛍光団を有する各々の病原体特異的抗体の2つのプールを標識することは、高いシグナル複雑性を生成し得る。このアッセイ法において使用される最終的な抗体ファミリーは、ディファレンシャルに標識された独特な比の病原体特異的抗体を混合することによって作製される。例えば、病原体Xに特異的な抗体ファミリーは、1部赤色蛍光抗体、1部黄色抗体、および1部青色抗体を有し得る。病原体Yに特異的な

抗体ファミリーは、2部黄色抗体、および1部青色抗体を有し得る、などである。蛍光抗体で標識した標的のシグナル強度は、一般的には、この実施例において使用されるより高度な蛍光粒子と比較してはるかに減少していることに注意されたい。シグナル強度はまた、標的上の抗原の数に依存する。従って、小さな標的、および比較的少ない数のカテゴリー特異的結合部位を有する他の標的については、この方法はより高感度のシグナル検出機器を必要とし得る。

【0369】

この実施例におけるものに類似するアプローチはまた、インサイチュウ核酸ハイブリダイゼーションに基づく試験のために使用され得る。この場合、細胞は、カテゴリー特異的プローブの各ファミリーがビオチンで標識される（標準的な方法を使用して；例えば、PCRの間の取り込み）以外は、実施例1に記載されるように調製、固定、およびハイブリダイズされる。ハイブリダイゼーションおよび洗浄の後に、スライドは、この実施例におけるように処理および画像処理される（すなわち、未結合のビオチン化二次抗体を除去した後に行う工程）。

【0370】

実施例34. 培養を伴わない、尿路感染の多重化された同定

尿路感染（UTI）は、一般的であり（年間約1億5千万件）、数十億ドルの保健医療のコストを示す。UTIの確認された診断は一般的に尿の培養を必要とする。これは時間がかかり、そしていくつかの病原体については、標準的な微生物学的方法および培地を使用することができない（例えば、クラミジア・トラコマチス）。この実施例は、高度に多重化されており、かつ細菌培養を必要としない単純かつ高感度のUTI試験を構築するための本発明の使用を記載する。この試験方法のスキームは図34に示される。

【0371】

一般的なUTI病原体に結合する抗体：表3は、共通してUTIを引き起こす細胞病原体を示す。各病原体に特異的に結合する抗体は、実施例27および実施例32におけるものと類似して入手および選択する。種特異的抗体に加えて、広い群の細菌と反応する抗体がこの実施例において使用される。大部分のグラム陰性細菌と結合する抗体（カタログ番号15306、QED Bioscience, Inc., San Diego, CA）および大部分のグラム陽性細菌と結合する抗体（例えば、カタログ番号15711、QED Bioscience, Inc., San Diego, CA）が、種特異的抗体が含まれない、より一般的でない生物の検出のために含まれる。

【0372】

（表3） 尿路感染（UTI）を引き起こす細菌病原体

大腸菌	モルガネラ属種 (<i>Morganella spp.</i>)
スタフィロコッカス・サプロフィチカス	シトロバクテラ属種 (<i>Citrobacter spp.</i>)
クレブシエラ属種	B群連鎖球菌
エンテロバクター属種	D群連鎖球菌
プロテウス属種	腸球菌
クラミジア・トラコマチス	シュードモナス・エルジノーサ
ナイセリア・ゴノレエ	アシネトバクテラ属種
コリネバクテリウム・ウレアリチカム	セラチア属種 (<i>Serratia spp.</i>)

【0373】

ガラススライドへの捕捉抗体の付着：抗体を、アルデヒドを含むガラススライド（Tele Chem International; SuperAldehyde Substrates）に共有結合させる。ガラススライドの異なる部分に異なる抗体を結合させるために、接着性ウェル（例えば、接着性シリコンflexiPerm細胞培養チャンパー、24ウェルを有するカスタム製造品；IVSS；Sartorius）をスライドに固着させる。各々のタイプのカテゴリー特異的抗体を（PBS中100 μg/ml；深さ約2.5mm）、異なるウェルに加え、次いで以前に記載されるように処理する（MacBeath, G.ら、Science 289: 1760-3, 2000；著者によって供給される補足の材料を含む、<http://www.sciencemag.org/feature/data/1053284.sh1>）における

10

20

30

40

50

ワールドワイドウェブ上で)。遊離の抗体を洗浄によって除去した後、引き続き処理工程の前にシリコンウェルを除去する。

【0374】

固定化された捕捉抗体への尿試料中のUTI病原体の直接結合：標準的な手順（Isenberg編、1992、前出）に従って尿試料を収集する。試料（50mlディスプレイポリプロピレンチューブ；Falcon中に28ml）を、1M EPPS pH8.0（4ml；ナトリウム塩）、100mM NaEDTA pH8.0（4ml；ナトリウム塩）、および10×PBS-TB（4ml；定義を参照のこと）の添加によって中性にする。捕捉抗体が結合した顕微鏡スライドを、尿試料中に浸し、そして穏やかに攪拌しながら（Bambino回転機；Boekel）室温で2時間インキュベートする。インキュベーションの間、細菌は、対応する捕捉抗体を含むスライドの部分に接触および付着する。このアッセイ法の実行実現性は、細菌UTI感染が一般的に高い病原体力価で生じる（例えば、 $10^3 \sim 10^5$ 細胞/ml）という事実によって可能になる。

10

【0375】

捕捉細胞の染色および画像処理：スライドを尿試料から取り出し、洗浄し（3×；50ml PBS-TB；5分間；穏やかに攪拌しながら；続いて50ml EE洗浄；穏やかに攪拌しながら15分間）、風乾し、そして熱固定する（100℃に加熱したヒートブロックの表面上で5分間）。次いで、スライドを、シーバークリーンI（10,000×ストック溶液の1:1000希釈；Molecular Probesカタログ番号S7563）を含む溶液で覆い、インキュベートし（室温で10分間）、そして洗浄する（EE中で2回の50ml洗浄；各1分間；穏やかに攪拌しながら）。

【0376】

スライドの各区画を、図3Aに示され上記の詳細な説明の項の工程6に記載される画像処理装置を使用する非拡大的な広域の蛍光画像処理により分析する。

20

【0377】

代替的な試験、方法、および形式：この実施例において記載される試験は、多数の応用を有する（例えば、呼吸器、感染した外科的な傷、食品、または環境の試料における病原体を同定することを含む）。類似のアッセイ法が、代替的な標識技術（例えば、蛍光粒子、アルカリホスファターゼ/抗体コートされた粒子、西洋ワサビペルオキシダーゼ；抗体結合体、蛍光抗体、RLS粒子、磁気粒子）、形式（例えば、微流体またはラテラルフローおよびフロースルーの形式、ここで捕捉抗体は吸収性メンブレンに結合される）、および画像処理方法（例えば、色素発生性アッセイ法の可視的または反射率計検出ならびに化学発光性および生物発光性のアッセイ法のフィルムルミノグラフィー）を使用して構築され得る。これらの多くは本願の別の箇所に記載される。

30

【0378】

実施例35. 血液由来のウイルス：HIV、HCV、HBV、およびCMVの迅速で、多重化された同定血液由来のウイルスの検出は、個々の患者の試料および血液バンク申請の試料を試験するために不可欠である。血清学的な試験（標的ウイルスに特異的な抗体についての試験）が一般に用いられる。しかし、標的ウイルスについて直接的に試験する方法は、血清学的方法よりも感染プロセスにおいてより初期に感染した試料を検出する利点を有する。このことは、病原体に特異的な抗体（セロコンバージョン）が、一般的には感染した個体の血液中に3~4週間現れないからである。不運にも、ウイルスについての直接的試験は、感受性が低い（大部分の抗原試験）または高価である（大部分の核酸試験）のいずれかである。

40

【0379】

この実施例は、迅速で、多重化された試験を構築するための本発明の使用を記載する。この試験は、顕微鏡を使用することなく、血液試料中での個々の遊離のウイルス粒子を検出し得る。この試験のスキームを図35に示す。

【0380】

抗ウイルス抗体を用いた、蛍光粒子およびウェルのコーティング：標的ウイルスに特異的な抗体は、多数の商業的な供給源から購入できる。例えば、以下の抗体は示した業者から入手する：抗HIV（抗gp120；モノクローナル；Biodesign；カタログ番号C65199M）；抗

50

HCV (Biodesign; カタログ番号C8A024M); 抗HBV (抗B型肝炎表面抗原; モノクローナル; Biodesign; カタログ番号C86132M); および抗CMV (抗糖タンパク質B; モノクローナル; Biodesign; カタログ番号C8A024M)。

【0381】

抗体は、受動的な吸収により、ウェルあたり4つの隣接した別個のスポットでマイクロタイターディッシュのウェルに結合する(抗体あたり1スポット)。各々の抗ウイルス抗体を、96ウェルマイクロタイタープレート(Greiner America; カタログ番号55896)のウェルにスポットし(1 μ l; 1 μ g/ μ l)、そして湿式チャンパー中で(Boekel Slide Moat; モデル240000)、室温で2時間インキュベートする。次いで、記載されたように、ウェルを洗浄およびブロッキングする。

10

【0382】

別個の放射スペクトルを有する蛍光的に着色されたポリスチレン粒子に、実施例8に記載された方法を使用して抗ウイルス抗体でコートすることによって、色でコードされたウイルス特異的な蛍光粒子を作製した。蛍光粒子(Molecular Probes)を以下のようにコードする: HIV特異的粒子(黄色-緑色; カタログ番号F8823); HCV特異的粒子(オレンジ色; カタログ番号F8820); HBV特異的粒子(深い赤; カタログ番号F8816); およびCMV特異的粒子(赤外; カタログ番号F8818)。4種類の抗体コートした粒子を、等しい濃度で混合する(PBS-T中 10^7 粒子/ml)。使用前に、抗体を超音波処理および洗浄する(実施例8)。種々の抗体がウェル中のスポットに分離されているので、各ウイルスについて同じタイプの蛍光粒子を使用することもまた可能であることに注意されたい。しかし、別個のシグナリング部分の使用は試験の強固さを増大させる。

20

【0383】

血液試料中のウイルスの検出: 血液試料を以下を含む種々の供給源、例えば、患者から(例えば、Isenberg編、1992、前出において記載されるように、抗凝血剤EDTAでの処理を含む標準的な方法を使用する); 供与された血液の単位から; または血液画分(例えば、血漿)から収集する。全血(200 μ l)を、各捕捉抗体のスポットを含むマイクロタイターディッシュウェルに加える。この試料を、37 $^{\circ}$ Cで2時間インキュベートさせ、ウイルスがウェル表面上で捕捉抗体に吸着し得ることを確実にする。血液試料を、ウェルから徹底的に洗浄して除去する(4回; 各洗浄について200 μ l PBS-TBを使用)。ウイルス特異的粒子の混合物(200 μ l)をウェルに加え、手短に遠心分離して(Beckman Allegra 6; GH-3.8

ローター; 1200g)、ウェルの底を粒子でコートする。短いインキュベーション(室温で10分間)の後、未結合の粒子を、攪拌しながら洗浄することによって(4回、200 μ l PBS-TB、ボルテックスを伴う; 各洗浄1分間)除去する。最後に、ウェルをEEですすぎ(200 μ l)、乾燥させる。次いで、複数の画像が適切なフィルターセット(黄緑: 励起Chroma HQ480/40xおよび放射Chroma HQ535/50m; オレンジ: 励起Chroma HQ535/50xおよび放射Chroma HQ610/75; 深い赤: 励起Chroma HQ560/55xおよび放射Chroma HQ645/75m; および赤外: 励起Chroma HQ710/75xおよび放射Chroma HQ810/90m)を使用して得られる以外は、実施例8に記載されるように、CCD画像処理装置を使用して、ウェルを画像処理および分析する。ウイルスを、付着した粒子に結合したスポットによって同定する。さらなる診断の強固さは、アッセイ法が成功した場合に、予想した色の粒子のみが特定のスポットに付着するという事実によって提供される。

30

40

【0384】

実施例36. 非拡大的な広域画像処理を使用する、A型インフルエンザウイルスについての超高感度ラテラルフロー試験

目的: この実施例は、使い勝手のよいラテラルフローアッセイ形式および非拡大的な広域画像処理を用いて低レベルのウイルスを迅速に検出するための本発明の使用を実証する。以下に記載する実験において、A型インフルエンザ粒子の希釈物は、多孔性メンブレンストリップに適用され、結合体パッド中の標識粒子と接触され、そしてウイルス: 標識粒子複合体を選択するために、キャピラリー作用によって捕捉抗体を過ぎて移動される。次いで、これらの捕捉された複合体は、非拡大的な広域画像処理を使用して可視化される。

50

【0385】

実験方法：ラテラルフロー試験ストリップを、記載されるように組み立てた。抗体線を、A型インフルエンザ特異的捕捉線（QED、カタログ番号1302）および対照線（Jackson immuno Research Laboratories, Inc.; ビオチン抗マウスIgG、カタログ番号115-165-146）の両方を、メンブレン上で（wicking padより5~10mm）ストリップ化することによって作製した。使用前にこれらの線を乾燥させた（約15分間）。ストレプトアビジン標識した蛍光ビーズ（Bangs Laboratories Inc.; カタログ番号CP01F-5121）を、ビーズ（10 μ lの1.23 \times 10¹¹ストック）、抗体（10 μ lの1.0 μ g/mlストック）、およびPBS（80 μ l）を合わせること、ならびに混合すること（1.5時間/室温）によって、ビオチン抗A型インフルエンザ抗体で標識した。次いで、このビーズを遠心分離し（5000g、10分間）、そしてPBS-B（100 μ l）中に再懸濁した。抗A型インフルエンザコートされた蛍光ビーズ（2 μ l）を各ストリップの結合体パッドに加えた。精製したA型インフルエンザのストック（Advanced Biotechnologies Inc.: Influenza A/PR/8/34 (H1N1)、カタログ番号10-210-000）を、PBS-Bを使用して段階希釈した。試験試料（100 μ lのIL-2希釈）をPBS-TB（50 μ l）と合わせて、試験ストリップの試料パッドに加えた。アッセイを実行した後（~15分間）、ストリップを、非拡大的な広域画像処理を使用して可視化した。

【0386】

結果：図36は、蛍光標識粒子で標識し、非拡大的な広域画像処理を使用して分析したA型インフルエンザウイルスについてのラテラルフロー試験の結果を示す。この図は、（左から右に）0、10⁵、10⁶、10⁷、および10⁸ピリオン/mlを含む試料をアプライした試験ストリップからの捕捉線および対照線の画像を示す。蛍光シグナルは、A型インフルエンザピリオンの濃度が増加するに従って増加する。示したデータは、この試験が少なくとも10⁵ピリオン/mlまで低い濃度を検出し得ることを示す。従って、この実験は、本発明に基づくラテラルフロー試験の感度を実証する。

【0387】

実施例37．視覚的検出を使用するM.ツベルクローシスについての迅速ラテラルフロー試験
概要：迅速ラテラルフロー、すなわち「ストリップ」試験形式は、ポイントオブケア診断（例えば、医院、救命室、および家庭における試験）を提供するために重要性が増している。しかし、ラテラルフロー試験は、しばしば、感度が低すぎて、臨床試料に低レベルで存在し得る病原体によって引き起こされる感染を検出するために使用できない。例えば、痰中のM.ツベルクローシス感染を検出することは、痰の数千細胞/ml（これは、現在のストリップ試験の感度の閾値より下である）を検出することを必要とする。M.ツベルクローシスについての単純で機器を用いない試験について、発展途上国において、決定的な、未だ達成されていない、公的な健康に関する必要性が存在する。核酸増幅試験はM.ツベルクローシスの低い力価を検出し得るが、これらの試験は、あまりに高価かつ複雑で、大部分の臨床的な設定において利用できない。

【0388】

この実施例は、高価でなく、単純で、迅速な、かつ高感度な、M.ツベルクローシスについてのラテラルフロー試験を記載する。使用者は、機器の使用を伴うことなく、試験を視覚的に解釈する。

【0389】

ナノ粒子への抗M.ツベルクローシス抗体およびアルカリホスファターゼの結合：等モル濃度のモノクローナル抗M.ツベルクローシス抗体（MPB64-ICA; Abeら、1999、前出）およびアルカリホスファターゼ（Pierce; 31391）を、製造業者の推奨に従う受動的吸着によって金結合体化粒子（30nm; Nanoprobes; CG3054）に結合させ、そして10¹¹粒子/mlで再懸濁させた

【0390】

ラテラルフローユニットを、ラテラルフロー試験の当業者に理解されている説明書、材料、および手順を使用して、設計および構築する。設計および構築の問題は、ラテラルフロー試験の製造業者によって提供されるテクニカルノート番号（例えば、「Millipore's

Short Guide for Developing Immunochromatographic Test Strips」第2版、Millipore、テクニカルノート番号TB500、1999；「Lateral Flow Tests」第1版、Bangs Laboratories、テクニカルノート番号303、1999）および他の文献（例えば、Chandler, J.ら、IVD Technology 6: 37-49, 2000；Weiss, Alan, IVD Technology 5: 48-57, 1999；Wild, D.編（2001）「Immunoassay Handbook」第2版、New York, NY: Nature Publishing Group, 2001）において記載されている。

【0391】

ラテラルフロー成分を、製造業者の指示書に従って、キット（Millipore:カタログ番号HFMI-DAK015；Hi-Flow Plus Membrane Assortment Assembly Kit）から組み立てる。試験ゾーン中の抗体および対照ゾーン中の因子を、製造業者の指示書に従って試薬分配装置（matrix 1600；Kinematics）を使用して、線として適用する。 10

【0392】

液体化した痰またはBAL試料（200 μ l；実施例27）を、試料パッドにスポットする。試料は、キャピラリー作用によってメンブレンを通過して移動する。短い時間の後（3分間）、PBS-T（200 μ l）を試料パッドに適用し、試料がキャピラリー作用によってメンブレンを通過して進行することを可能にする。このPBS-T洗浄工程を別の短い時間（3分間）の後に反復する。別の3分間の後、次いで、金結合体（10 μ l；抗M.ツベルクローシス/アルカリホスファターゼでコートされた 10^9 粒子）を試料に適用し、続いて2回のPBS-Tでの洗浄（前と同様）を行う。アルカリホスファターゼ基質（1ml；BM purple；Boehringer Mannheim）をメンブレンに直接的に適用し、そしてスポットが陽性対照ゾーンにおいて見られるまで（30分～1時間）発色させ、その後残りの比色定量用検出試薬を注ぎ出し、水（1ml）をメンブレンに直接的に適用する。3分後水を注ぎ出す。試験が正しく機能する場合には、陽性対照ゾーンにおいて見ることのできる約1000スポットが存在する。試験ゾーンにおけるスポットの数は試料中のM.ツベルクローシスの数を示す。 20

【0393】

「フロースルー」配置を含む種々の代替的な免疫クロマトグラフィーの構成もまた、可能である（実施例23を参照されたい）。

【0394】

実施例38. 非拡大的な広域画像処理を使用する多数の異なる細菌戦因子（biowarfare agent）を検出するための迅速ラテラルフロー試験 30

細菌戦因子に起因する感染を診断することは、日常的な感染疾患の診断において遭遇するものを超えた、いくつかの困難を提供する。バイオテロリズムまたは細菌戦において利用される可能性のある因子は、通常の医学的な実務において見られるものとは異なることが予想され、従って、標準的な診断プロトコールを使用して認識することは困難であり得る。フィールドにおける非慣習的な因子の使用を診断することは、力価が非常に低い場合に初期の段階で感染を検出し得る、携帯型の、使い勝手のよいシステムを使用して、異なる因子（毒素、ウイルス、および細菌を含む）について走査することを必要とする。

【0395】

この実施例は、迅速な、携帯型の、かつ使い勝手のよい、ラテラルフローイムノアッセイ法を記載する。これは、臨床的または環境的試料において少ない数で存在する広範な因子について試料を走査し得る。技術的には、この実施例は、多数の病原体が1回のアッセイにおいて検出されること、および化学発光シグナルが電子的に検出されること以外は実施例36に類似している。 40

【0396】

（表4） 細菌戦またはバイオテロリズムにおいて使用される可能性のある非慣習的な因子

バシラス・アンスラシス	赤痢菌属種 (<i>Shigella spp.</i>)	天然痘ウイルス
エルシニア・ペスティス	サルモネラ属種 (<i>Salmonella spp.</i>)	マルブルクウイルス
フランシセラ・ツラレンシス	ビブリオコレラ	エボラウイルス
ブルセラ・スイス	リシン毒素	
コクシエラ・バ・ネッティイ	ボツリヌス毒素	

【0397】

細菌戦またはバイオテロリズムにおいて使用される可能性のある因子に特異的なナノゴールド抗体結合体：この実施例は、表4に列挙された因子（これらのいくつかは、細菌、ウイルス、およびタンパク質毒素である）について試料（例えば、血液）を走査する。表4における各因子に特異的な抗体は、実施例32および実施例27に記載されるように、入手、アフィニティー精製、および特異性について試験される。タンパク質毒素については、別個のかつ非重複的なエピトープを有するモノクローナル抗体がナノゴールド粒子への結合体化のために、またはラテラルフローメンブレン上の試験ゾーン（または捕捉ゾーン）のために使用されることに注意されたい（以下を参照されたい）。

10

【0398】

表4の因子に特異的なナノゴールド結合体は、実施例26に記載されるように、アフィニティー精製された各タイプの抗体、および等モルのアルカリホスファターゼの受動的吸収によって作製される。PBS-TB中の得られた因子特異的結合体を等モルの濃度と一緒に混合し、その結果、最終的な全体の結合体濃縮物はPBS-TB中での固形分である。

20

【0399】

ラテラルフロー装置：この実施例におけるラテラルフロー試験は、多数の分析物が試験されること、異なるシグナル特性（この実施例では化学発光、実施例36では比色分析）、およびこの実施例における結合体パッドの使用以外は、実施例36におけるアッセイ法と同様に構築および実施される。図38は、ラテラルフロー試験の構成を示す。この図は、明確化のために単純化されている（例えば、表4において試験は3つのみの因子についてのアッセイを示し、図の一番上の結合体パッド上に示される3つの結合体が因子特異的結合体の集団を表している）。ディスプレイのラテラルフロー装置は、実施例36におけるように、試験ゾーンおよび対照ゾーンを有するが、この場合、試験ゾーンは固着させた因子特異的な抗体の並行した線を含む（1本の線が各々の因子特異的抗体に対してである）。この対照ゾーンは固着した非慣習的な因子の並行した線を含む（1本の線が各々の標的因子に対してである）。因子特異的結合体の混合物は、種々の参考文献に記載されているように（例えば、Millipore, テクニカルノート番号TB500、1999、前出；Bangs Laboratories, テクニカルノート番号303、1999、前出；Chandler, J.ら、2000、前出；Weiss, A., 1999、前出；Wild, 2001、前出）、結合体パッド中に包埋される。

30

【0400】

ラテラルフローアッセイ法：液体化した試料（200 μ lの、例えば、唾液、液体化した痰、血清）を、試料パッドに適用し、続いて200 μ lのPBS-TBの試料への3回の適用を行う（試料パッドへの適用の間は60秒間待つ）。液体化した試料は、結合体を動かす。それは、キャピラリー作用を介して、試料パッドから結合体パッドを通して動くからである（図38）。試料中に存在し得るいかなる標的因子も、対応するナノゴールド：抗体：AP結合体に結合する。因子：ナノゴールド複合体は、これらが、特定の因子に対応する試験ゾーンの線における対応する因子特異的抗体に接触するまで、キャピラリー作用によって移動し続ける。ここで因子：ナノゴールド複合体は固定化される。因子に結合していないナノゴールド結合体は、対照ゾーンまで進行し、そして対照抗原の対応する線に結合する。

40

【0401】

試験ストリップをCDPスター（PE Biosystems）で覆い、そして5分間インキュベートさせた。次いで、このストリップを、実施例38に記載されるように、CCD画像処理装置（Orca II；Hamamatsu）を使用して画像処理した。個々の因子（生物、ウイルス、またはタン

50

パク質)を、因子が結合しているアルカリホスファターゼコートされた粒子によって放射された化学発光によって検出する。このアッセイ法が正しく機能した場合、すべての対照の線は化学発光粒子でコートされる。1つ(またはそれ以上)の因子が試料中に存在した場合、対応する線が固定化された化学発光粒子を含む。因子の同一性は、対照の線からの陽性試験の線の距離によって決定される(対照の線から各因子の試験の線の距離)。画像処理ソフトウェア(Image-Pro Plus)は、試験の線におけるスポットの数を定量し、対照の線からの距離を測定することによって因子に対する同一性を割り当てるマクロを使用することにより、CCDカメラの収集した画像を処理する。

【0402】

実施例39. 核酸プローブを使用する呼吸器系病原体についての包括的試験

10

目的および利点：この実施例において、単回のアッセイが、下気道疾患の症候を有する患者からの試料中の一般的な呼吸器系病原体の異なるアレイの存在について包括的に試験する。この実施例の医学的な目的および重要性は、実施例32と同じである。しかし、この実施例は、抗体カテゴリー結合分子およびイムノアッセイ形式ではなく、ゲノムDNAプローブおよびインサイチュハイブリダイゼーション形式を使用する。

【0403】

実施例の技術的概要：カテゴリー特異的配列はゲノム差分(細菌および真菌)またはコンピュータ分析(ウイルス)を使用して種々の下気道病原体から単離する。各病原体群に特異的なカテゴリー特異的配列に対応するオリゴヌクレオチドプローブのファミリーを合成する。カテゴリー特異的プローブの各ファミリーを、蛍光量子ドット標識の別個の組み合わせで標識する。全体のプローブ集合(すなわち、すべてのプローブファミリー)が試料とハイブリダイズされ、これは、スライドに固定され、次いで、未結合プローブが洗い流される。CCDカメラを使用して、病原体特異的プローブのどのファミリーが(すなわち、どの量子ドット標識の組み合わせが)試料中の微生物にハイブリダイズするかを確認することにより、臨床試料中の病原体の同一性が決定される。

20

【0404】

下気道疾患を引き起こす病原体からのカテゴリー特異的配列の単離：表2は、下気道感染を引き起こす一般的な病原体を列挙する。ゲノム差分方法(Straus 1995, 前出)を使用して、細菌および真菌(すなわち、非ウイルス)病原体からカテゴリー特異的配列を単離する。以下の節では、ストレプトコッカス・ニューモニエに特異的な診断マーカーを精製および同定するためのプロセスを記載することによって差分ストラテジーを例証する。S.ニューモニエは、肺炎のはるかに最も一般的な原因である；これは、一般社会での肺炎にかかったすべての場合の約30~50%の原因である(米国において年間500,000件)。

30

【0405】

ゲノム差分を使用した、S.ニューモニエカテゴリー特異的配列を含むDNAフラグメントのセットの単離：図39Aは、S.ニューモニエとその最も密接な関連物の系統学的な関連性を示す(Kawamuraら、International Journal of Systematic Bacteriology 45: 406-8, 1995)。カテゴリー特異的配列を単離するためのストラテジーは2つの工程に分けられ得る：ゲノム減算(genomic subtraction)工程(図39B)およびスクリーニング工程(図39C)である。最初に、ゲノム減算(Straus, 1995, 前出)が、系統学的な株(この場合、S.ニューモニエ)からのDNAを「+」ゲノム差分試料として使用して実行される(図39B)。「-」ゲノム差分試料は、最も密接な関連物である株(肺炎を一般的に引き起こさない株)のいくつかをプールすることによって構築される。得られる減算産物は、病原体のゲノムにハイブリダイズするが密接に関連する種のゲノムにはハイブリダイズしないフラグメントである。次いで、これらのフラグメントは、パーシャルフィルイン法(Corrette-Bennettら、Nucleic Acids Res 26: 1812-8, 1998)を使用して、pBluscriptIベクターのXhoI部位にクローニングされる。

40

【0406】

カテゴリー特異的配列である減算産物の同定：次の工程は、カテゴリー特異的である(すなわち、すべてのS.ニューモニエ株にハイブリダイズするが他の群のいかなる株にもハ

50

イブリダイズしない) S.ニューモニエ特異的な減算産物のサブセットを単離することである。すべての減算産物がカテゴリー特異的配列であるわけではないことに注意されたい。減算産物のセットは、所望のすべてのカテゴリー特異的配列フラグメントを含むが、いくつかのカテゴリー特異的でないフラグメントも含む。このことは、ゲノム差分実験(前の段落を参照されたい)が、

単一のS.ニューモニエ株(ゲノム差分における「+」株)にハイブリダイズし、かついくつかの関連する種の単一の株にはハイブリダイズしないフラグメントを選択したことが原因である。従って、例えば、いくつかの減算産物は、他のいくつかのS.ニューモニエ株にハイブリダイズせず、そしていくつかは減算において使用されたS.ミチス(S. mitis)の異なる株にハイブリダイズする。

10

【0407】

カテゴリー特異的配列である減算産物のサブセットを同定するために、クローニングされたフラグメントが、多くの異なるストレプトコッカス単離物のゲノムDNAへのハイブリダイゼーションによってスクリーニングされる。すべてのS.ニューモニエ株へのハイブリダイゼーションについてプローブを試験することは不可能であるので、最も良好な推定は、世界中から単離され、かつ数十年の期間にわたって単離されてきた何百ものS.ニューモニエ株(S.ニューモニエ株については、American Type Culture Center、およびCenter for Disease Controlにおいて達成されたコレクションから得られる)に対するハイブリダイゼーションについてプローブを試験することによってなされる。同様に、各プローブは、ストレプトコッカスの多くの非S.ニューモニエ株に対するハイブリダイゼーションについて試験される。図39Cは、プローブがカテゴリー特異的配列であるか否かを試験するための便利な方法を示す。ゲノムDNAは、S.ニューモニエおよび関連するストレプトコッカスの種の異なった単離物から調製され(GravesおよびSwaminathan, Gravesら(1993)、「Universal Bacterial DNA isolation procedure」、「Diagnostic molecular microbiology: principles and applications」D. Persing, T. Smith, F. Tenover および T. White編(Washington, D.C.: American Society for Microbiology), 617-621頁の方法を使用する)、変性し、そして、ドットプロットアレイの形式で、プラスに荷電したナイロンフィルター(例えば、GeneScreen Plus, NEN)上にスポットされる(Ausubel 1987 前出)。「ドットプロットング」ではなくコロニーハイブリダイゼーションに敏感な種については、株がナイロンフィルター上でインサイチューに増殖および溶菌され得、従って、多数の株からのDNAを精製することを避ける)。

20

30

【0408】

クローニングされた減算産物がカテゴリー特異的配列であるか否かを試験するために、これは、アレイ化されたゲノムDNAにハイブリダイズされる。クローンは、それがすべてのS.ニューモニエ株からのゲノムDNAにハイブリダイズするが、関連するストレプトコッカス属の種からのゲノムDNAにはハイブリダイズしない場合に、カテゴリー特異的配列として分類される(図39C)。クローニングされた減算産物は、クローニングされた組換えプラスミドのPCR増幅の間にジゴキシゲニンを取り込むことによって標識される。反応がジゴキシゲニン-dUTP(100 μM; Boehringer Mannheim)で補充される以外は、XhoIおよびXhoRプライマー(これは、Bluescriptベクター中でクローニングされた減算産物にじかに隣接する)を用いた、標準的なPCR条件が使用される(定義を参照されたい)。次いで、個々の標識されたプローブが、高ストリンジェンシーのハイブリダイゼーションのための標準的な方法を使用して、ゲノムDNAのドットプロットアレイにハイブリダイズされ(Ausubel 1987, 前出)、続いて製造業者(Boehringer Mannheim)の推奨するプロトコールに従って、アルカリホスファターゼ:抗ジゴキシゲニン抗体結合体(Genius; Boehringer Mannheim)およびCDPスター(NEN)を使用する検出を行う。化学発光画像を、遮光用の覆い(Alpha Innotech Corp., MultiImage II キャビネット, カタログ番号DE-500-110)の中に備えられたCCDカメラ(ORCA II; Hamamatsu)を使用して得、Image-Pro Plus画像処理ソフトウェアパッケージ(Media Cybernetics, Silver Spring, MD)を使用して分析する。

40

50

【0409】

カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドのファミリーの合成：次に、上記に記載したドットプロット分析によって同定された30個のカテゴリー特異的クローンに対応するオリゴヌクレオチドプローブを合成する。最初に、30個の選択されたS.ニューモニエカテゴリー特異的配列の各々を配列決定する。すべてのDNA配列決定は、パーキンエルマー (Perkin Elmer) からのABI 377自動シーケンサーを使用して、および製造業者によって推奨される方法を使用して実行する。オリゴヌクレオチドプローブを合成するために、30個のカテゴリー特異的配列の各々からの約20塩基長の2つのサブ配列を、プログラム「プライマー3 (Primer3)」(S.Rozen, H. Skaletsky (1998), コードはhttp://www-genome.wi.mit.edu/-genome_software/other/primer3.htmlから利用可能)を使用して、最低溶解温度を59

10

【0410】

5'末端にアミノ基修飾を有する各オリゴヌクレオチドを合成する (Midland Certified Scientific Reagent Co.)。アミノ修飾オリゴヌクレオチドは、高度に蛍光性の量子ドットに共有結合的に結合され得る (以下を参照されたい)。

【0411】

(表5) 量子ドットを使用するコンビナトリアル標識

	ストレプトコッカス・ピルリ・モリス	ハモフィリス・イエンセンゼ	マイコプラズマ・マヨリス	モラクセラ・カタラリス	クラミジア・トラキマリス	アンネネバクター属種	レジオネラ属種	スタフィロコッカス・アウレウス	大腸菌	クレブシエラ属種	セラチア・マルセッセンス	シユ・ドモナス・ホルジノ・サ	プロバクテリウム属種	エンテロバクター属種	呼吸器合胞体ウイルス	アデノウイルス	A型インフルエンザウイルス	B型インフルエンザウイルス	パインフルエンザウイルス	サイトメガロウイルス	カンジダ・アルビカンス	アスペルギルス属種	クリプトコッカス・ネオフォルマンシス	ニューモシスチス・カリニ
紫色	◆	◆	◆	◆						◆	◆	◆	◆	◆	◆					◆		◆	◆	◆
青色	◆				◆	◆					◆	◆	◆				◆	◆	◆		◆	◆	◆	◆
緑色		◆					◆	◆			◆		◆	◆			◆	◆		◆	◆	◆	◆	◆
黄色			◆					◆	◆		◆		◆	◆			◆	◆		◆	◆	◆	◆	◆
赤色				◆			◆	◆			◆		◆	◆			◆	◆		◆	◆	◆	◆	◆

20

30

5種類の別々に着色された量子ドットを組み合わせることによって、31 (2⁵-1) の異なる色の組み合わせが可能である。表2の一番上の行に列挙された24種の病原体の各々について、病原体特異的オリゴヌクレオチドのサブセットが、カラム中の菱形でマークした各々のタイプの量子ドットに結合される。従って、別個のシグナルシグニチャーを有するプローブのファミリーが各病原体について構築される。5つの標識の色の31の可能な組み合わせのうち7つ (すなわち、色なし、1色、および5色に対応する組み合わせ) は表に示されていないことに注意のこと。

40

【0412】

量子ドットを用いた、カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドプローブのコンビナトリアル標識：包括的な下気道感染試験の目的を達成するために、S.ニューモニエプローブファミリーは、表2における他の病原体に対応するプローブファミリーからそれを区別する方法で標識されなくてはならない。この実施例において、各々のプローブファミリーは、量子ドット標識の別個の組み合わせで標識される。コンビナトリアル標識の原理は図5に示される。量子ドットは、ナノメートルサイズの半導体結晶であり、これは、単純かつ安価な機器を用いて単一の粒子として容易に検出されるに十分明るい蛍光を発する (Bruchezら、Science 281: 2013-6, 1998; Chanら、Science 281: 2016-8, 1998; Service, Science 281: 1930-1, 1998)。要約すれば、本発明のために非常に有用である量子ドットの特

50

性には、放射スペクトルが非常に狭い；放射スペクトルがナノクリスタルのサイズによって決定される-変動するサイズによって、多数の別個の放射スペクトルを有する量子ドット標識試薬が生成される（この多色適用のために重要である）；発光が非常に強く、その結果、単一の粒子が画像化され得る；粒子のサイズが小さく、そのサイズは小さなタンパク質のサイズと比較され得る（インサイチュー分析の間に、固定された細胞中での標的へのプローブの接近しやすさを増強する）；量子ドットは生物学的に重要な分子（例えば、核酸、タンパク質、ビオチン）で共有結合的に修飾され得る；および、単一の光の波長が異なる放射スペクトルを有する量子ドットからの放射を引き起こす、という事実が含まれる。

【0413】

24種のカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドプローブファミリー（表2に列挙された呼吸器系の病原体に対応する）の各々を別々に標識するために、量子ドットの異なる組み合わせが使用される。別々に着色した5種類の量子ドットを組み合わせることによって、 $31(2^5-1)$ の異なる色の組み合わせが可能である（表2）。病原体特異的オリゴヌクレオチドの各セットについて、100のオリゴヌクレオチドが、表2の病原体のカラム中の菱形でマークした量子ドットの各々のタイプに結合体化される。従って、S.ニューモニエについて、100の異なるS.ニューモニエカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドは、紫色量子ドットで標識される。同様に、100の他のS.ニューモニエカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドが青色量子ドットで標識される。200の量子ドット標識されたS.ニューモニエカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドは、S.ニューモニエカテゴリー特異的プローブファミリーを構成する。個々のS.ニューモニエ細胞に対するプローブファミリーのインサイチューハイブリダイゼーションは、青色および紫色の量子ドットのクラスターとして検出される。同様に、スタフィロコッカス・アウレウス細胞が、紫色および緑色の量子ドットの局在化したクラスターとして検出される（表2のカラム2において示されるように）。オリゴヌクレオチドは、製造業者の推奨する手順に従って、量子ドット（Quantum Dot Corp）に共有結合的に結合される。

【0414】

偶発的なオリゴヌクレオチドプローブは、それがカテゴリー特異的配列のサブ配列である場合でさえ、カテゴリー特異的配列として振る舞わないかもしれない。これは、より大きなカテゴリー特異的配列中のパッチ配列の分岐に起因して生じ得る。オリゴヌクレオチドがカテゴリー特異的配列であることの確認は、量子ドット標識されたオリゴヌクレオチドの、ドットプロットへのハイブリダイジングによって、上記に記載したように、しかし、オリゴヌクレオチドに適切なハイブリダイゼーション条件を使用して、達成される（Ausubel 1987, 前出）。このドットプロットは、ORACAM CCDカメラ（Hamamatsu）を使用して、ベンチトップの覆い（Alpha Innotech Corp., Mutilmage II cabinet; カタログ番号 DE-500-110）中のUV落射照明、および画像処理ソフトウェア（MetaMorph Universal Imaging Corporation, Downingtown, PA）を用いて、分析される。カテゴリー特異的配列として振る舞わないプローブセット中のオリゴヌクレオチド（すべてのS.ニューモニエ株にハイブリダイズするが他のストレプトコッカス株にハイブリダイズしない）は、カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドプローブファミリーには含まれない。

【0415】

他のシグナル生成部分が、この実施例において量子ドットの代わりに置き換え得ることに注意されたい。例えば、カルボキシレート修飾蛍光標識粒子（40ナノメートル直径、TransFluoSpheres, Molecular Probes）が、EDAC化学を使用して（製造業者の指示書に従って）、5'末端アミノ修飾オリゴヌクレオチドに結合され得る。次いで、別個の放射スペクトル（560、605、645、685、および720nm）を有するが、すべて同じ吸収極大（488nm）を有する、5種類のTransFluoSpheresを使用して、表5における5つの異なるタイプの量子ドットを使用するものと類似する組み合わせで、病原体特異的オリゴヌクレオチドを標識する。

【0416】

10

20

30

40

50

または、より大きなクローニングされたカテゴリー特異的配列は、修飾されたヌクレオチドの存在下で、核酸ポリメラーゼ（例えば、DNAポリメラーゼIのクレノウ（Klenow）フラグメント、逆転写酵素、またはTaqポリメラーゼ）を使用して標識され得る。有用なヌクレオチド修飾の例には、蛍光団に直接結合体化されたヌクレオチド（例えば、Molecular ProbesからのAlexaシリーズ、またはフルオレセイン-12-dUTP（NEN Life Sciences; カタログ番号NEL413））、一級アミンを含むヌクレオチド（これは、ポリヌクレオチドへの取り込みの後に蛍光団に結合体化され得る）、およびハプテン修飾ヌクレオチド（例えば、ジゴキシゲニン-dUTP; Boehringer Mannheim）が含まれる。ハプテン修飾ポリヌクレオチドについては、シグナリング部分（例えば、フルオレセイン標識抗ジゴキシゲニン抗体）は、プローブが試料にハイブリダイズされた後に、しばしば、プローブに結合体化される。ポリメラーゼ標識カテゴリー特異的配列を使用するコンビナトリアル標識のために、オリゴヌクレオチドについては、標識スキームは区別可能なシグナリング部分のセットを使用しなくてはならない。

10

【0417】

他の下気道病原体についてのカテゴリー特異的プローブの単離：表2における他の細菌および真菌の病原体についてのカテゴリー特異的プローブファミリーは、上記のように、S.ニューモニエについて作製される。しかし、上記および表5に示すように、各カテゴリー特異的プローブファミリーは、量子ドットの異なる組み合わせで標識される。この試験を開発するために使用される病原体は、アメリカン・タイプカルチャー・コレクション（ATCC; Manassas, VA）から入手する。

20

【0418】

ウイルスカテゴリー特異的プローブファミリーは、ウイルスカテゴリー特異的配列が公的に利用可能なゲノム配列の比較によって単離される以外は、同様に調製される。第一に、公的なデータベース（例えば、GenBank; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>）が、ウイルス病原体（例えば、A型インフルエンザウイルス）由来の配列について走査される。次いで、これらの配列は、プログラムMegAlign（DNASTar）中でインポートおよび整列される。カテゴリー特異的配列は、ゲノム中で不変であり、かつウイルスの1つより多い単離物から配列決定された領域より選択される。オリゴヌクレオチドは、設計され、合成され、量子ドットに結合され、そしてS.ニューモニエについて上記のように試験される。ウイルス単離物は、培養物レポトリ（例えば、American Type Culture Collection（ATCC））から、ゲノム核酸（ドットプロットのために）を調製するために得られる。例えば、ATCCは、A型インフルエンザウイルスおよびB型インフルエンザウイルスの大きなコレクションを維持している。ウイルス種の種々の単離物からの核酸は、標準的な方法によってゲノムドットプロットのために調製される（例えば、Stephensonら編（1988）「Diagnostic virology-Laboratory manuals」（Totowa, NJ: Humana Press）307頁を参照されたい）。

30

【0419】

病原体特異的プローブファミリーは、下気道病原体プローブ集合を作製するために合わせられる。このプローブ集合は、EE緩衝液（定義を参照されたい）中で合わせられ、その結果、各プローブの濃度は10nMである。

【0420】

臨床試料中に存在する病原体の同定：病原体特異的プローブ集合を使用して、同時に24種の病原体について呼吸器系試料を走査する（図40）。試料の好ましいレイアウトおよび対照を図40に示す。顕微鏡スライドを、画像の整列を容易にするために試料および対照領域中に位置決めマークでエッチングする（以下を参照のこと）。

40

【0421】

呼吸器系の試料（例えば、痰、気管支肺胞洗浄液、または保護された気管支ブラシ試料）は、対照標的とともに、ガラス製の顕微鏡スライドに塗布され、そして風乾する。スライド上の内部対照部分が各スライド上に構築され、その上で精製された呼吸器系の病原体を含むスポットが整列される。このスライドの対照部分の目的は、ハイブリダイゼーションが正確に進行していることを確認すること、および試料中のシグナルと比較される、内

50

部の蛍光標識された標準を提供することである。プローブ集合中に示される24種の呼吸器系の病原体（表2に列挙される）の各々がスライド上にスポットされ（0.1 μ l PBS中～250生物体）、そして風乾される。次いで、試料および対照を、Braun-Howlandらの方法（Braun-Howlandら、Biotechniques 13: 928-34, 1992）を使用して固定する。ハイブリダイゼーションの前に、固定した試料中の核酸は、試料を70%ホルムアミドで、75、10分間覆うことによって変性させた。過剰の液体を注ぎ出し、そしてスライドをEEですすぎ、風乾させた。

【0422】

次に、プローブ集合をガラススライド上で試料にハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーションは5 μ lのプローブ集合（各プローブの最終濃度は1nMである）を含むHYB緩衝液（50 μ l；定義を参照されたい）中で実行する。ハイブリダイゼーション溶液はカバーガラスで覆い、湿式スライドモウト（Boekel）で、50、30分間インキュベートする。スライドを、HYB緩衝液中で、50で5回洗浄する（各洗浄30秒間）。スライドを室温まで冷却した後、これらをEEですすぎ風乾する。

10

【0423】

図3Aのものと同様のCCD画像処理装置（しかし、自動化ステージはついていない）を使用して、試料および内部標準の画像を得る。ローディングトレイは3つの位置を有する：オープン、第1の画像処理位置、および第2の画像処理位置である。量子ドット標識プローブを結合したスライドを、画像処理装置のローディングトレイに挿入する（オープン位置で）。内部標準部分の位置は画像処理装置の方に向かって配置している。ローディングトレイを、スライドの内部標準部分を見るための第1の画像処理位置に移動させる。標準を画像処理した後、スライドを、実験試料を分析するために第2の画像処理位置に移動させる。

20

【0424】

画像の獲得は、好ましくはコンピュータソフトウェア（Image-Pro Plus）によって制御される。5つの画像を自動的に獲得し、1つが各々の蛍光団シグナリング部分に対応する。各蛍光団を画像処理するために、このソフトウェアは、正しい励起フィルターおよび放射フィルターを自動的に選択し、そしてユーザ定義のパラメーター（例えば、露光時間、標準の強度値など）に従って画像を収集する。このソフトウェアは、5つの画像の各々からの情報を組み合わせることによって、合成画像を構築する。画像を、位置決めマークの補助で（マークは試料領域および対照領域にエッチングされ、その結果、これらは各画像中で見られる）自動的に整列させる。整列は必要である。なぜなら、連続した画像は、一般的には、フィルター交換の間の小さな機械的な摂動に起因して、わずかに補正されるからである。次いで、このソフトウェアは、合成画像における各ピクセルに、5つの画像の各々の強度に対応する値のマトリックスを割り当てる。

30

【0425】

標準のソフトウェアに基づく分析は2つの主な機能を有する。第1に、これは、実験手順が正しく機能しているかを確認する。標準のアレイにおける24個の「スポット」の各々が、実験試料において存在し得る病原体と同じに処理された標的病原体の個々の細胞またはウイルスを含む。カテゴリー結合分子の各病原体特異的ファミリーについてのシグナル部分の組み合わせは既知である。従って、このソフトウェアは、各スポットにおける細胞/ウイルスがシグナリング部分の予想される組み合わせに一致するか否かをチェックする。さらに、各スポットにおいて観察される病原体の数が、既知の数（約250生物体）と実験的に比較される。正確な数の病原体が、結合したプローブによって予想されるように標識される場合、実験手順は正しく機能していると思なされる。このソフトウェア分析は、拒否の判断基準に対し結果を比較することを含む。これは、利用者によって設定される。実験は、好ましくは以下を含む理由によって拒否される：1つまたはそれ以上の病原体が、正確または効率的に標識されなかったため、過度のバックグラウンド（病原体を有しない画像の区画を分析することによって決定される）、および乏しいシグナル対ノイズ比。5つの画像の各々についてこのステージで評価されるバックグラウンド蛍光の値は、

40

50

好ましくは、標準画像および試料画像から減算される。

【0426】

標準の分析の第2の機能は、シグナルシグニチャーを既知の病原体と関連付けるための正確なキーを生成することである。各病原体について、5つの画像の各々についての予測値のマトリックスが構築される（すなわち、蛍光団最適化された励起/放射フィルタで収集された各々の画像について）。1つの画像における病原体についての予測される範囲を確立するために、1つのスポットにおける～250生物体の各々についての強度値が表にされる。本発明の好ましい実施態様において、閾値は、標準において検出される強度値の観察される範囲に基づいて選択される。従って、次に、各病原体について、各画像についての予測範囲のセットが構築される。偽の色を特定の病原体について予測される範囲内に収まる値のセットと関連付ける検査表もまた、構築される。偽の色を割り当てるプロセスは、核型分析のために使用されるものと同様である（Schrockら、1996、前出；Speicherら、1996、前出）。

10

【0427】

試料同定のためのバーコード（種々の厚さの黒い棒を適用することによって構築する）が、スライド上に好ましく配置され、その結果、これは、標準と同時に画像化される。バーコード適用および分析のための方法は、当業者によって理解されている。

【0428】

標準の分析の後、スライドローダーが第2の位置まで移動し、スライドの試料部分を画像処理領域中に配置する。ソフトウェアは、試料の5つの画像のコレクションを駆動する（標準については、先のように自動的に画像処理する）。標準の分析の間に構築された検査表を使用して、偽の色は、特定の病原体について予測される範囲内に収まる色の比の値のセットに対応する、個々の対象物に割り当てられる。偽の色の対象物の各々のタイプについての強度は合計され、対照試料中の標的の平均強度の値によって割り算され、各試料中に存在する標的の数を見積もりを得る。この画像分析の最初の関門は、標的の単一のカテゴリーを表す対象物中の病原体を同定および計数する。第2の関門において、このソフトウェアが、任意の標的病原体の複合物とは一致しない、値の比を登録するピクセルを試験して、これらが1つより多いタイプの病原体の登録と一致する比を有するか否かを決定する。最後に、このソフトウェアは、利用者のために、診断（すなわち、感染または感染なし）、試料中の病原体の同一性および数、試料のID番号（スライド上のバーコード化された情報から抽出されたもの）、ならびに標準および試料の両方の合成画像（偽の色のピクセルを伴う）を示す。

20

30

【0429】

実施例40. 核酸プローブを使用する多数の病原体についての血液試料の同時試験

血流感染：心臓血管系の病原体侵入は、最も深刻な感染性疾患の1つである。米国において毎年約200,000件の血流感染が起こっており、そのうち20～50%が致命的である。特にリスクがあるのは、免疫無防備な患者、非常に若い患者および非常に年をとっている患者、皮膚または軟組織の感染および創傷を有する患者、ならびに侵襲的な医学的処置の受け手である。すべての主要な種類の病原体は、血流に感染し得、これらには、細菌、ウイルス、真菌、および寄生生物が含まれる。血流感染における病原体の迅速な同定は、適切な、潜在的な救命治療を設定するために決定的である。

40

【0430】

治療の選択は、病原体の同定に依存する。多くの試験および多くの費用が感染源を決定するために必要とされ得る。しかし、最適な治療の素早い開始は、しばしば、生死の問題である。従って、広範な一般的な血流感染源の同定を迅速に決定する単回のアッセイ法に必要性が存在する。

【0431】

実施例の概要：この実施例における試験は、インサイチューハイブリダイゼーションのための間接的に標識された病原体特異的プローブを使用することにより、血液試料中の広範な血流病原体の存在について走査する。一般的な細菌、ウイルス、および原生生物の病

50

原体を同時に試験することによって、この方法は、現在の実務を超えて実質的な改善を提供する。この試験の迅速性（これは、微生物の培養を必要としない）は、これを、血流病原体の迅速診断の決定的な作業のため、および適切かつ時期を得た治療を設定するために特に有用にする。

【0432】

(表6) 血流感染を引き起こす病原体

細菌	真核生物
ブドウ球菌属種 (<i>Staphylococcus</i> spp.) スタフィロコッカス・アウレウス ビリダンス連鎖球菌 (<i>Viridans streptococci</i>) 腸球菌属種 (<i>Enterococcus</i> spp.) 連鎖球菌属種 (<i>Streptococcus</i> spp.) ストレプトコッカス・ニューモエ エシユリキア属種 (<i>Escherichia</i> spp.) クレブシエラ属種 シュードモナス属種 (<i>Pseudomonas</i> spp.) エンテロバクテリウム属種 プロテウス属種 バクテロイド属種 (<i>Bacteroides</i> spp.) クロストリジウム属種 (<i>Clostridium</i> spp.) シュードモナス・エルジノーサ コリネバクテリウム属種	プラスモディウム属種 (<i>Plasmodium</i> spp.) 熱帯リーシュマニア トキソプラズマ属種 (<i>Toxoplasma</i> spp.) ミクロフィラリア (<i>Microfilariae</i>) ヒストプラスマ・カプスラ・ツム コクシジオイデス・イミチス クリプトコックス・ネオフォルマンズ カンジダ属種 (<i>Candida</i> spp.)
	ウイルス
	HIV 単純ヘルペスウイルス C型肝炎ウイルス B型肝炎ウイルス サイトメガロウイルス エプスタインバーウイルス

10

20

【0433】

血流感染を引き起こす病原体からのコンビナトリアル標識されたカテゴリー特異的プローブの集合の組み立て：表6は、血流感染を引き起こすいくつかの一般的な病原体を列挙する。カテゴリー特異的配列が、Tinslayら（1996、前出）によって修飾された表示差分方法によって、非ウイルス性（すなわち、細菌、真菌、および寄生生物）病原体から単離される。この方法は、実施例39において使用されるものと技術的に別であるが、これは、同一の特性を有する減算産物を単離する。ゲノム差試料は、実施例39において記載されるように構築され、その産物は、標準的な方法を使用して、Bluscript IIベクターにクローニングされる（Ausubel、1987、前出）。カテゴリー特異的配列の病原体特異的ファミリーは、実施例39におけるように同定および配列決定される。

30

【0434】

オリゴヌクレオチドプローブは、実施例39におけるように合成および試験される。スペクトル的に別個の5つの量子ドットを使用するコンビナトリアル標識が、以前の実施例と同様に、表5に示されるものと類似したスキームを使用して使用される。しかし、この実施例において、各オリゴヌクレオチドは、2つの部分を有するように設計される：カテゴリー特異的配列およびタグ配列である（図6および図41）。タグ部分は、オリゴヌクレオチドプローブの間接的標識のための手段を提供する。プローブ分子を間接的に標識するために、アンチタグ（またはタグ相補物）配列がシグナリング部分で標識され、次いで、二機能性のオリゴヌクレオチドプローブにハイブリダイズされる（図41）。5つの別個のタグが使用され、1つが各々の色のクラスに対応する。例えば、S.アウレウスについての「色のコード」が緑色、紫色、および青色であると仮定する。約100個のS.アウレウス特異的なプローブが「緑色タグ」を用いて合成され、100個の別のプローブが「青色タグ」を用いて、そして100個の別のプローブが「紫色タグ」を用いて合成される。このタグ配列およびカテゴリー特異的配列が設計され、その結果、溶解温度（ T_m ：Suggs (Suggs, S.V. 1981, Proc Natl Acad Sci USA 78: 6613-7, 1981) のアルゴリズムを使用して1M NaClで計算される)は、各部分およびその相補物について60 (±1) である。このタグはまた設計されて、その結果、それらは互いに、各々の他の相補物、カテゴリー特異的オリゴヌクレオチド、またはカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドの相補物と、交差ハイブリダイ

40

50

ズしない（すなわち、オリゴヌクレオチドのすべてのこのような組み合わせは、好ましくは40（すなわち、 $T_m(\text{perfectmuch}) - 20$ ）の融解温度（ $T_m(\text{mismuch})$ ）を有する）。このストラテジーの利点は、5つのみの標識アンチタグ配列が合成される必要があること（およびこれらは多数の適用のために使用され得る）、ならびにタグおよびアンチタグは試料へのハイブリダイゼーションの間に互いにハイブリダイズし得ることである（代替的な実施態様において、単一のユニバーサルタグ配列がすべてのオリゴヌクレオチド上で使用され得るか、またはファミリー特異的タグが使用され得ることに注意されたい）。

【0435】

オリゴヌクレオチドは、実施例39におけるように、それらが、ゲノムDNAのドットプロットへのハイブリダイゼーションによって、厳密なカテゴリー特異的配列として振る舞うことを確認するためにチェックされる。しかし、この実施例において、プローブは、酵素アルカリホスファターゼ（Synthetic Genetics）と共役するアンチタグで間接的に標識される。プローブは、HYB緩衝液中で、52（オリゴヌクレオチド/ゲノムDNAのハイブリッドの融解温度（ T_m ）（60）-8に等しい温度）でドットプロットにハイブリダイズされる。このプロットを、同じ緩衝液で同じ温度で洗浄し（10分間、3回）、150mM NaClおよび100 mM トリス-HCl pH9.5の溶液で手短にすすぎ、そしてCDPスター（NEN）を重層する。プロットのデジタル画像は、以前の実施例において記載されるように得る。

【0436】

このように、病原体特異的プローブファミリーに対応するオリゴヌクレオチドの各々のセット（各プローブファミリーは表6に列挙した30個の病原体のうちの1つに特異的にハイブリダイズする）は、コンビナトリアル標識スキームを使用して、蛍光色素の独特の組み合わせで標識される。標識されたプローブファミリーは、実施例39におけるように、血流病原体特異的プローブ集合を形成するように組み合わせられる。

【0437】

血液病原体プローブの集合の血液試料に対するインサイチューハイブリダイゼーション：血液試料を標準的な方法を使用して収集する（Isenberg編（1992）「Clinical microbiology procedures handbook」Washington, D.C.; American Society of Microbiology）。血液試料（0.5ml）を、インサイチューハイブリダイゼーションのために、Lischewskiら（Lischewskiら、J Clin Microbiol 35: 2943-8, 1997）の方法を使用して調製する。血液試料に隣接して、対照スポットのアレイを、この実施例ではスポットが表6に列挙される血流病原体からの生物を含む以外は、以前の実施例と同様にスポットする。スライドにまた、以前の実施例と同様にバーコードを付ける。ハイブリダイゼーションおよび洗浄工程を、この実施例では、プローブの集合（最終濃度は各プローブ1nM）およびアンチタグ（プローブの集合における対応するタグ配列の対応する濃度と等モル）の両方が含まれる以外は、以前の実施例と同様に実行する。

【0438】

スライドは、実施例39と同様に画像処理および分析する。

【0439】

実施例41. 核酸プローブを使用する多数の中枢神経系ウイルスについての迅速な協同的試験

実施例の概要：中枢神経系（CNS）の感染は、医学的な緊急事態である。感染因子の迅速な診断は、最適な治療結果のために決定的である。ウイルス感染の診断は特に問題であり、しばしば高価である。この実施例において記載される方法は、脳脊髄液（CSF）試料を、様々な種類のウイルスの存在について同時に試験するために使用され得る。

【0440】

この実施例は、試料調製、必要とされる機器、および実験的複雑さを最小化する、迅速な、高度に多重化された試験を詳述する。CSF試料を、ラテラルフロークロマトグラフィ法を使用して、フィルター上にスポットおよび固定し、変性させ、そしてウイルスプローブの集合（量子ドットでコンビナトリアルに標識されたもの）にハイブリダイズさせる。結合したプローブは、非拡大的な広域画像処理によって画像処理および同定される。

【0441】

ウイルス特異的配列の集合の組み立て：表7に列挙されたウイルスのパネルにおけるウイルスの群の各々に特異的なカテゴリー特異的配列を選択する。いくつかの場合において、ウイルス特異的カテゴリー特異的配列は、文献にすでに記載されている。他の場合において、配列は、データベース中の他のウイルスと配列を比較した後で、公的なデータベース中のウイルスのゲノム配列から選択される。配列比較は、標準的な方法を使用してなされる（Ausubelら、1987、前出）。カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドが、実施例39と同様に、選択され、合成され、そして量子ドットで標識される。コンビナトリアル標識スキームは、表7におけるウイルスからのカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドが量子ドットに結合体化される以外は、表5に示されるものと類似である。中枢神経系病原体特異的プローブ集合は、種々のカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドを、EE中で10nM（各オリゴヌクレオチド）の濃度で合わせることによって構築される。

10

【0442】

（表7） CNS感染を引き起こすウイルス

A 型コクサッキーウイルス 単純ヘルペスウイルス セントルイス脳炎ウイルス エプスタインバーウイルス ミクソウイルス JC ウイルス エコーウイルス ブンヤウイルス サイトメガロウイルス 水痘帯状疱疹ウイルス HIV	B 型コクサッキーウイルス トガウイルス 麻疹ウイルス 肝炎ウイルス パラミクソウイルス 流行性耳下腺炎ウイルス ウマ脳症ウイルス リンパ球脈絡髄膜炎ウイルス 狂犬病ウイルス BK ウイルス
---	--

20

【0443】

試料調製：CSFを、標準的な方法を使用して収集する（Isenberg、1992、前出）。試料（1ml）を、微量遠心分離（12,000×g；1分間）で、手短に遠心分離して、細胞および粒子状物質を除去する。上清中のウイルス（1ml）を、Biomax-5グレードウルトラフリー（grade Ultrafree）-4 遠心分離ユニット（カタログ番号UFV4 510XB；Millipore, Bedford, MA）中で、7,500gでの遠心分離によって濃縮する。保持物（10μl）を、95℃で5分間加熱し、核酸を変性させて、支持体のニトロセルロースストリップ（0.5×2cm；5μm孔径；Osmonics）にスポットする。試料とは別個のストリップの領域中で、表7におけるウイルスの各々からの変性したゲノム核酸の対照試料（各1×10⁵ゲノム）を、以前に記載したように（Gravittら、Journal of Clinical Microbiology 36: 3020-7, 1998）隣接する線に配置する（バーコードにおけるように）。インクの参照線を同様に適用する。

30

【0444】

キャピラリー作用媒介ハイブリダイゼーション：量子ドット標識プローブ集合は、Reinhartzら（Reinhartz、1993、前出）によって記載されるペーパークロマトグラフィーハイブリダイゼーションアッセイ法を使用することによって、試料および対照の変性試料DNAと接触される。図42は、この実施例において使用される手順を図示する。ハイブリダイゼーション溶液中のプローブは、ストリップの一端に適用され、キャピラリー作用を介して、固定された変性された試料核酸を過ぎて流れることを可能にする。ハイブリダイゼーション溶液は、溶液に含まれるDNAが血液由来の病原体プローブ集合である（最終濃度は各量子ドットオリゴヌクレオチドプローブについて1nMである）以外は、1%ポリビニルピロリドンで補充した、Reinhartzらによって使用されたものである。このストリップをハイブリダイゼーション溶液（100μl）に沈め、そしてハイブリダイゼーションクロマトグラフィーを50℃で25分間実行する。試料を0.3%トウイン/PBS中、37℃で5分間、2回洗浄し、次いで、風乾させた。

40

【0445】

50

フィルターストリップのCCD画像処理による病原体の同定：病原体を、実施例39と同様に画像処理によって同定する。試料中のウイルス核酸分子は、量子ドット標識の特徴的な組み合わせを有するプローブとハイブリダイズする。量子ドットの各クラスターには偽の色を割り合てる。CSF試料中のウイルスの同定は、試料中のスポットの偽の色を、対照の線（既知のウイルスゲノムを含む）に割り当てられた偽の色と比較することにより、達成される。

【0446】

実施例42. ゲノムDNAプローブを使用した、マイコバクテリウム・ツベルクローシスについての迅速な同定および抗微生物剤感受性試験

概要：M.ツベルクローシスについての迅速感受性試験の医学的重要性は、実施例28の概要で議論している。この実施例は、M.ツベルクローシス特異的株、非特異的株、または抗体ではなく、M.ツベルクローシス特異的ゲノムDNA配列がカテゴリー結合分子として使用されるといふ点で以前の実施例（実施例9、実施例27、および実施例28）とは異なる。

10

【0447】

ゲノム減算によって得られるM.ツベルクローシス特異的ゲノムDNA配列は、ハプテンジゴキシゲニンによって修飾される。患者の痰試料のアリコートは、種々の濃度で種々の抗生物質を含む増殖培地中でインキュベートされる。フィルター上に試料を配列した後、ハプテン標識したM.ツベルクローシス特異的配列でプロービングし、化学発光および非拡大的な広域CCD検出を使用して、細胞を計数する。

【0448】

ハプテン修飾したM.ツベルクローシスカテゴリー特異的配列の調製：M.ツベルクローシス特異的配列は、実施例39に記載され、図40に示されるようなゲノム減算およびドットプロットスクリーニングによって単離される。ゲノム減算のために、プラスゲノム差分試料はM.ツベルクローシスであり、そしてマイナスゲノム差分試料はマイコバクテリウム・アビウム（*Mycobacterium avium*）である。どのクローニングされた減算産物がM.ツベルクローシス特異的配列であるかを決定するために、クローニングされた産物を使用して、50個のM.ツベルクローシス単離物（別々の地理的位置由来）および実施例39におけるようにドットプロットにおける関連するマイコバクテリウム属種の50個の単離物をプロービングする。プローブをジゴキシゲニン標識し、そしてドットプロットを実施例39に記載されるように画像処理する。ジゴキシゲニン標識カテゴリー特異的配列（n=96）をプールする（各プローブの最終濃度は250pg/μlである）。

20

30

【0449】

M.ツベルクローシスについての下気道試料の試験：痰試料を、NALC-NaOH法（Isenberg編（1992））を使用して調製する。次いで、調製した痰（100μl）をナイロンフィルター（GeneScreen；NEN）に適用し、以下のように一連のフィルターの配置によって調製する。フィルターを、プレ溶解溶液（溶液の節を参照されたい）で、37℃で45分間飽和させた数枚のフィルターの積み重ね（蒸発を防ぐためにプラスチックラップに包む）上に連続的に配置する（注記される以外は、各室温で5分間）；フィルターを乾燥させる（Whatman 3MM）；フィルターを、1% SDS/100μg/ml プロテイナーゼK（Life Technologies）の溶液で、37℃、30分間飽和させる（プラスチックラップに包む）；フィルターを乾燥させる；フィルターを0.5N NaOHで飽和させる；フィルターを乾燥させる；フィルターを1MトリスpH7.5で飽和させる；およびフィルターを乾燥させる。陽性対照として、M.ツベルクローシス（10μl中～1000生物体）を痰試料に隣接してスポットする。陰性対照として、大腸菌（～1000細胞）を陽性対照に隣接してスポットする。ハプテン標識したプローブを用いるインサイチュハイブリダイゼーションは、実施例39に記載されるように実行する。次いで、アルカリホスファターゼ（Genius kit；Boehringer Mannheim）に結合体化された抗ジゴキシゲニン抗体は、ハイブリダイズしたプローブに結合される。フィルターは、製造業者の推奨に従って、ガラススライド上に配置され、そしてCDPスター（NEN）とともにインキュベートされる。このスライドを、非顕微鏡的なCCD画像処理装置（図3）を使用して画像処理および分析する。

40

50

【0450】

臨床試料の種々の抗生物質とのインキュベーション：抗生物質感受性試験を、実施例28と同様にM.ツベルクローシスを含む試料上で実行する。

【0451】

フィルター上の試料の配列およびハイブリダイゼーションのための調製：培養した試料（100 μ l）のアリコートをし、真空フラスコに装着したディスポーザブル濾過装置（Millipore; Micro Funnel (100ml), カタログ番号MIHAWG072）を使用して、グリッド付きのナイロンフィルター上に配列する。試料（100 μ l）を、真空を適用しながら（例えば、Gast（モデル；DOA-P104-AA）真空ポンプを使用して1/3最大真空レベルで）、交互のグリッドの正方形上にピペティングする。フィルターを取り出し、風乾する。次いで、このフィルターを、この実施例よりも先に記載したように、一連のフィルター上に置くことによってハイブリダイゼーション用に準備する。

10

【0452】

ハイブリダイゼーション、化学発光画像処理、および分析：M.ツベルクローシス特異的プローブ（上記のジゴキシゲニン標識）を、製造業者（Boehringer Mannheim）の推奨するプロトコルに従って、高ストリンジェンシーハイブリダイゼーションおよび洗浄（Ausubel 1987, 前出）、続いてアルカリホスファターゼ：抗ジゴキシゲニン抗体結合体（Genius; Boehringer Mannheim）への結合、ならびに、化学発光性アルカリホスファターゼ基質、CDPスター（NEN）とのインキュベーションを使用して、配列されたM.ツベルクローシスに結合させる。化学発光画像は、上記のように非拡大的なCCDカメラに基づく画像処理を使用して得られる。各試料スポット中の別個の対象物の数および積算された強度は、発明の詳細な説明、工程6において上述したように計算する。

20

【0453】

実験スポット中の標的の数は、陰性対照および陽性対照のスポットを比較して、種々の抗生物質希釈物中に存在する増殖の量を決定する。細胞数の減少は、エタンプトール、イソニアジド、およびリファンピンを含む試料について、それぞれ、45、50、または25%である。このことは、所定の抗生物質レジメに対する感受性を示す（Mooreら、1999、前出）。

【0454】

上記に記載するこのアプローチは、同じ様式で他の細菌に対して適用され得る。

30

【0455】

微小コロニーのインサイチュー増殖を非顕微鏡的にモニタリングすることによる、迅速な感受性試験：種々の抗生物質を含む培地中での微小コロニーの増殖（例えば、2~1000個のクローンに関連する細胞からなるコロニー）はまた、株の抗生物質感受性プロフィールを評価するために使用され得る。概念的に、このアプローチは古典的なディスク希釈もしくは寒天希釈技術、またはより新しい固定グラジエント法（例えば、Eテスト）に類似する。これらのすべての方法において、細胞は、異なる濃度のいくつかの抗生物質を含む固形増殖培地上に配置される。株の抗生物質感受性プロフィールを確認するために、細菌単離物が種々の抗生物質上の増殖について点数付けされる。

【0456】

本発明は、このアプローチを使用して、決定的な抗生物質感受性試験データの獲得を非常に加速し得る。例えば、ディスク希釈感受性試験は、NCCLSによって推奨されるように実行され得る（「NCCLS Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests」；認可標準（Approved Standard）第7版 M2-A7 第20巻、第1号、2000年1月）。しかし、寒天プレート上に細菌を直接的に播くのではなく、細菌は、寒天培地プレート上に配置されたナイロンフィルター上に配置される。種々の抗生物質を含む小さなフィルターディスク（2.5mm直径）がナイロンフィルター上に配置され、そして細菌は約5の倍加時間で（速く増殖する細菌では通常数時間）増殖させられる。次に、フィルターは、引き続いて乾燥したフィルター上に置かれ（各Whatman 3MMフィルター上で室温で5分間）；フィルターを100%メタノールで飽和させ；フィルターを乾燥させ；フィルターをヨウ化プロ

40

50

ピジウム（水中10 μ g/ μ l）で飽和させ；フィルターを乾燥させる。次いで、この実施例で使用される、非拡大的な蛍光画像処理装置を使用して、ディスクを取り囲む個々の細胞を直接的に可視化する。増殖阻害の部分の直径を、古典的なディスク拡散抗生物質感受性試験において肉眼によるディスクの周りのゾーンまたはハローを測定するプロセスに類似して、画像処理ソフトウェア（Image-Pro Plus、バージョン4.1 Media cybernetics）により自動的に測定する。あるいは、細胞は、この実施例および他の実施例において記載されるように、病原体特異的染色、または、光散乱、もしくは蛍光、もしくは化学発光シグナリング部分を有するカテゴリー結合分子のような方法を使用して画像処理され得る。

【0457】

迅速な抗ウイルス感受性試験：多くの新規な抗ウイルス化合物が現在開発されている。抗ウイルス耐性の問題は、HIVにおける耐性の進化が急速であるために顕著になってきた。このように、感受性試験は重要になりつつある。耐性を決定するための遺伝子型決定方法は有用になりつつあるが、核酸配列における変異の組み合わせを検査することによる薬物耐性の評価は、極端に複雑であり、かつ常に正確に耐性を予測するわけではない。不運なことに、ウイルス継代培養での表現型の感受性試験は時間がかかる。しかし、上記のM. ツベルクロシスについて記載されたものと類似して、細胞培養中でウイルス複製をモニターする方法を使用することによって、本発明は、ウイルス感受性試験のための結果が出るまでの時間を大幅に改善し得る。

10

【0458】

実施例43：核酸プローブを使用する性感染症病原体についての試験

20

実施例の概要：この実施例は、2つの主要な性感染症の病原体であるクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについて尿を同時に試験するために本発明を利用する。この試験の重要性についてのより多くの情報は、実施例31の概要を参照されたい。これらの株からのカテゴリー特異的配列は、ゲノム減算を使用して（ナイセリア・ゴノレエ）またはコンピュータに基づく仮想的な減算ストラテジー（クラミジア・トラコマチス）を使用して単離される。カテゴリー特異的配列を、ハプテンジゴキシゲニン（クラミジア・トラコマチス）またはフルオレセイン（ナイセリア・ゴノレエ）を用いて標識し、そしてフィルター上で濃縮かつ固定化された、固定された細胞にハイブリダイズされる。強いシグナリング部分（共鳴光散乱粒子（RLS粒子）と呼ばれる）を使用して、病原体を検出および同定する。抗ジゴキシゲニン抗体（赤色散乱RLS粒子）または抗フルオレセイン抗体（緑色散乱RLS粒子）に結合体化されたRLS粒子は、試料中の病原体に結合される。シグナリング部分の強度のために、病原体は、照射した試料の単純な視覚的検査によって同定され得る。赤色のスポットはクラミジア・トラコマチス感染を示し、緑色のスポットはナイセリア・ゴノレエ感染のシグナルを示す。

30

【0459】

仮想的減算を使用するクラミジア・トラコマチスカテゴリー特異的配列の単離：クラミジア・トラコマチスの株についての完全なゲノム配列（Stephensら、Science 282: 754-9, 1998）の存在は、クラミジア・ニューモニエ（Kalmanら、Nat Genet 21: 385-9, 1999）が、他のゲノムとは異なる1つのゲノムからの領域のコンピューターに基づく決定を可能にする。このプロセスは、ゲノム減算実験との類似性から仮想的減算と呼ばれる。公的なデータベース（NCBI；<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMGifs/-Genomes/bacbt.html>）において利用可能であるゲノム配列は、全体のゲノムを整列および比較するソフトウェアによって処理される（MUMmer；Delcherら、Nucleic Acids Res 27: 2369-2376, 1999）。MUM Mer（最小MUM長さのパラメーターについて20bpを使用する）は、アラインメントにおいてすべてのギャップを示す詳細なファイルを生成する。これらのギャップには、挿入/欠失および高度に多型性の領域が含まれる。プログラム、プライマー3（S. Rozenら、1998、前出）を使用して、クラミジア・トラコマチスに存在するがクラミジア・ニューモニエには存在しない増幅領域（～200から500bp）についてPCRプライマーを選択した。これらのPCRプライマーは、図43に示される二成分性構造を有するように設計される。1つのプライマーは、クラミジア・トラコマチスにおける挿入/欠失領域の「左側」末端に対応する20

40

50

bpのプライマーに連結されたXhoLプライマー配列を有する(5'-XhoL-クラミジア・トラコマチス左側プライマー-3')。他のプライマーは、構造5'-XhoR-クラミジア・トラコマチス右側プライマー-3'を有し、ここで、クラミジア・トラコマチス右側プライマーは、同じ挿入/欠失領域の「右側」末端に対応する20bpのプライマーである。これらのプライマーを使用して、EE緩衝液中、5分間の細胞の沸騰後、仮想的な減算配列がクラミジア・トラコマチス細胞(10 μ l EE中 \sim 10⁵細胞; ATTCから入手)から増幅される。増幅産物をジゴキシゲニン-dUTPで標識し、実施例39におけるようにドットプロット分析を使用してカテゴリー特異性についてスクリーニングする。

【0460】

ゲノム減算を使用するナイセリア・ゴノレエカテゴリー特異的配列の単離：潜在的なナイセリア・ゴノレエが、実施例39において記載されるようなゲノム減算(Straus、1995、前出)を使用して、この実施例において単離される。プラスゲノム差分試料はナイセリア・ゴノレエゲノムDNAのSau3A消化物からなり、そしてマイナスゲノム差分は、切断したナイセリア・メニンジティディス(*Neisseria meningitidis*) DNAからなる。ナイセリア・ゴノレエおよびナイセリア・メニンジティディス(ATTCから入手)を適切な培地中で増殖させ(ATCC; 814 GC培地)、そしてCTAB法(Ausubel 1987、前出)を使用して調製する。減算産物を、実施例39と同様に、クローニングし、標識し、そしてドットプロット(種々のナイセリア属種由来のDNAを含む)に対してスクリーニングする。蛍光標識したカテゴリー特異的配列を、製造業者の推奨する手順に従って、フルオレセイン-12-dUTP(NEN Life Sciences; カタログ番号NEL413)ならびにXhoLプライマーおよびXhoRプライマー(略号の節において配列を参照されたい)を使用する組換えプラスミドの増幅によって合成する。

【0461】

クラミジア・トラコマチス/ナイセリア・ゴノレエプローブ混合物の集合：ジゴキシゲニン標識したクラミジア・トラコマチスカテゴリー特異的配列(n=96)を、フルオレセイン標識したナイセリア・ゴノレエカテゴリー特異的配列(n=96)と合わせる(等量の増幅反応物が一緒に混合され、その結果、各プローブの最終濃度は約250pg/ μ lである)。

【0462】

プローブ特異的RLSシグナリング部分の作製：RLS粒子(これは、強力な光散乱によって容易に可視化される)を結合プローブに結合させることによって、個々の病原体細胞が検出および同定される。2つの異なるタイプのRLS粒子(米国特許第6,214,560号に記載されるように調製する)を使用して、クラミジア・トラコマチス結合プローブおよびナイセリア・ゴノレエ結合プローブをディファレンシャルに標識する。赤色散乱RLS粒子(160nm直径金粒子)を使用して、クラミジア・トラコマチスプローブに結合させるのに対して、緑色散乱RLS粒子(60nm直径金粒子)を使用して、ナイセリア・ゴノレエプローブに結合させる。クラミジア・トラコマチスプローブに特異的な赤色散乱粒子は、抗ジゴキシゲニン抗体(Roche、カタログ番号1 333 062)を、以前に記載されているように(Hermanson, 1996、前出、およびその中の引用文献)粒子に結合体化することによって作製される。同様に、ナイセリア・ゴノレエプローブに特異的な緑色散乱RLS粒子は、抗フルオレセイン抗体(Roche、カタログ番号1 426 320)を粒子に結合体化することによって作製される。赤色および緑色散乱RLS：抗体結合体は、等濃度(3.8 \times 10⁻¹¹M)で一緒に混合する。

【0463】

インサイチューハイブリダイゼーションのための尿試料の調製：市販のキット(B-D尿採取キット(Becton-Dickinson))を使用して収集した尿試料(10ml)を、ブラックポリカーボネートメンブレン(0.22 μ m; Osmonics)を通して濾過し、存在し得る細菌を濃縮する。細菌DNAを変性させ、そしてフィルターを処理することによりコロニーの隆起に本質的に接近しやすくする(Ausubel 1987、前出)。試料を含むフィルターを、連続して、0.5M NaOHで飽和させたフィルター(Whatman 3MM)(5分間); 乾燥したフィルター(5分間); 1Mトリス pH7.5で飽和させたフィルター(5分間); および乾燥したフィルター(5分間)の上に配置する。

【0464】

対照フィルターを同様に調製する。10ml PBS中のクラミジア・トラコマチス(～1000エレメンタルボディ；ATTC)をフィルターを通して濾過し、そして実験試料について記載したように調製する。GC培地(10ml)中のナイセリア・ゴノレエ(～1000細胞)を同様に収集し、別個のフィルター上で調製する。最後に、LB(10ml)中の大腸菌(～1000細胞)を含む陰性対照フィルターを、同じ様式で調製する。

【0465】

代替的な実施態様において、他の基材(例えば、ガラススライド、ポリリジン処理したガラススライド、シラン処理したガラススライド、ニトロセルロースフィルターなど)がナイロンフィルターの代わりに置き換えられてもよいことに注意されたい。また、尿試料は、濾過ではなく遠心分離によって濃縮してもよい(例えば、12,000×g、1分間)。あるいは、尿試料は、より少量で(例えば、100μl)、直接基材に適用し、続いて、固定化およびゲノムDNAを接近可能にする処置を行ってもよい。

10

【0466】

ハプテン標識したクラミジア・トラコマチス/ナイセリア・ゴノレエプローブ集合の、濾過した尿試料および対照への結合：上記に記載したようなプローブ集合混合物の1:2希釈物(各プローブの最終濃度は約125ng/μlである)を含む1ml HYB溶液(定義を参照されたい)中で、フィルターをハイブリダイズさせる。反応を、インキュベーター(Hybrid)中で、65℃、4時間実行する。未結合のプローブを、ガラスハイブリダイゼーションボトル(Hybrid)中で、0.2×SSC(100ml；定義を参照のこと)で2回洗浄することによって(各洗浄につき20分間)除去する。

20

【0467】

プローブ標識した病原体細胞へのプローブ特異的RLSシグナリング部分の結合：フィルターを、室温で(～22℃)、穏やかに振盪しながら(～60rpm)、回転プラットフォーム上で、プラスチックトレイ(RubberMaid)において、BB(ブロッキング緩衝液；100ml；定義を参照されたい)中でのインキュベーションによって「ブロック」する。1×BB(1ml)中でRLS粒子(200μlの上記の混合物)を、シールしたポーチ(Seal-A-Meal)中のフィルターに加え、そして穏やかに振盪しながら室温で1時間インキュベートする。未結合のRLS：抗体結合体を、穏やかに振盪しながら室温でBB(100ml)中で2回洗浄することによって除去した。可視化の前に、フィルターをガラススライド上で風乾する。

30

【0468】

試料中の病原体の視覚的同定：CCD画像処理装置中のキセノンアークランプからの光(詳細な説明の工程6に記載)を、フィルターの平面に対して傾斜した角度でフィルターに向ける。RLS粒子の2つのクラスに対応する励起フィルターおよび放射フィルターを使用して、2つを画像処理および加工する。実験手順は、対照フィルターを評価することによって評価する。クラミジア・トラコマチス対照フィルターは～1000個の赤色スポットを有し、ナイセリア・ゴノレエフィルターは同様の数の緑色スポットを有し、そして、陰性対照フィルター(大腸菌を含む)は、緑色または赤色のスポットを有していないはずである。最後に、臨床的な尿試料からの細胞を含むフィルターは、クラミジア・トラコマチスの存在(赤色スポット)、ナイセリア・ゴノレエの存在(緑色スポット)、混合感染(赤色および緑色スポット)およびクラミジア・トラコマチス/ナイセリア・ゴノレエ感染の非存在(陰性対照を超える統計学的に有意な数のスポットの欠如)について評価される。

40

【0469】

他の関連する適用：多くの関連する臨床的に重要な診断試験が、この実施例に記載されるものと同じ線に沿って容易に開発される。他の尿路病原体(例えば、大腸菌)についての試験が構築され得る。このような試験は、コンビナトリアル標識が使用される場合には、多数の病原体を含み得る。スワブ(swab)によって収集された試料を使用するクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエ(および泌尿生殖器の他の感染因子)についての試験は、重要な関連する適用を表す(Isenberg, 1992, 前出)。例えば、尿道(男性または女性)、子宮頸部、および膣のスワブを使用して収集した資料は、泌尿生殖器病

50

原体診断のために重要である。スワブ上の試料は、これらの例において、フィルターまたはスライド上に直接的に塗布され得る。このような試験はまた、泌尿生殖器の重要なウイルス病原体（例えば、ヒトパピローマウイルス、1型単純ヘルペスウイルス、および2型単純ヘルペスウイルス、真菌（例えば、カンジダ）、ならびに寄生生物（例えば、膾トリコモナス））を診断するために価値があり得る。この実施例において使用される方法は（適切に修飾された試料収集技術と組み合わせて）、多くの異なるタイプの臨床試料（例えば、外科的創傷、血液、および呼吸器系の試料）に適用可能である。さらに、様々な種類のカテゴリー結合分子（例えば、抗体、mRNAについてのプローブ）と組み合わせて、同様の方法が非病原体分析物（罹患組織、血清タンパク質、および毒素を含む）に適用され得る。

10

【0470】

技術的変法：上述の試料収集および基材のバリエーションに加えて、本発明は、他の有用な技術的変法を取り込み得る。例えば、操作的により単純な試験が、蛍光団または蛍光粒子で標識した蛍光性カテゴリー特異的抗体を使用して構築され得る。このような試験は、いくつかの工程（例えば、ハイブリダイゼーション）を除外することを可能にする。多くのタイプのシグナリング分子（例えば、蛍光ナノ粒子、量子ドット、および慣習的な蛍光団）を取り込み、そしてCCDカメラを使用して自動的に画像処理できる。制限フラグメントサイズのカテゴリー特異的配列ではなく、いくつかの他の実施例に記載されるように、標識したオリゴヌクレオチドもまた使用され得る。この実施例のハイスループットの適用は、マイクロタイターフィルタープレート（例えば、384ウェルプレート）を組み入れ、ここでは、各ウェルが異なる試料を含むことができる。結合工程の後で、各ウェルのフィルター上の標識された細胞が、マイクロタイタープレートリーダーまたは光散乱を検出できるCCD画像処理装置を使用して画像処理され得る。

20

【0471】

他の実施態様

本願において参照されるすべての特許、特許出願、および刊行物は、本明細書に参照として組み入れられる。本発明の他の実施態様は、本明細書および本明細書中で開示される本発明の実施を考慮することから、当業者には明白である。本明細書および実施例は例示としてのみ見なされることを意図しており、本発明の真の範囲および精神は添付の特許請求の範囲によって示される。本明細書中に記載された方法に対して適用され得る他の実施態様の例は、2002年9月6日に出願された「RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF REPLICATING CELLS」という標題の米国特許出願第___号、および2002年9月6日に出願された「RAPID AND SENSITIVE DETECTION OF MOLECULES」という標題の米国特許出願第___号において見い出される。これらの各々は、本明細書によって参考として組み入れられる。

30

【0472】

他の実施態様は特許請求の範囲内にある。

【図面の簡単な説明】

【0473】

（図1）CCDアレイを用いる個々のシグナル生成粒子の非拡大的な広域画像処理の原理を示す。この図は、CCDアレイ検出器を使用する個々の標的の画像処理の原理を示す。

40

（図2）非拡大的な広域画像処理を使用するM.ツベルクローシスの検出を示す。この図は、M.ツベルクローシス（結核を引き起こす細菌性の病原体）の存在について痰試料を走査する、本発明に基づく試験を示す。顕微鏡スライドへの痰試料の熱固定の後、この試料は、M.ツベルクローシスに特異的に結合する標識された抗体（抗MTB抗体）とともにインキュベートされる。結合していない抗体は、M.ツベルクローシス細菌に結合している抗体のみを残して除去される。この抗体は蛍光団で標識され、その結果、1種の光の色（励起スペクトル）で照射された場合に、第2の色を放射する（放射スペクトル）。励起スペクトルでスライドを照射することによって、細菌がスライドに固定されている部位に局在化している抗体が、放射スペクトルの光を放射することを可能にする。放射光はCCDチップのピクセルのアレイに焦点を合わせられる。蛍光性細菌の下にあるピクセルは照射され

50

、コンピュータに電子的シグナルを伝達し、ここで画像として保存される。ソフトウェアが画像を分析し、そしてユーザインターフェースが走査において見いだされた細菌の数を報告する。

(図3) 広域画像処理のためのCCD画像処理装置を示す。この図に示されたCCDに基づく画像処理装置は、実施例に記載されたデータの多くを収集するために使用された(詳細な記載の部分の工程6もまた参照されたい)。励起光は高強度の白色光源(1000ワットキセノンアークランプ、モデルA-6000、Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ)から液体光導体(5mmコア直径;モデル380、Photon Technology Incorporated, Monmouth Junction, NJ)に導入することによって提供する。液体光導体は、光を励起フィルターホイール(BioPoint FW, Ludl Electronics, Hawthorne, NY)に運び、フィルターを通ったビーム(代表的には、9mm直径)を標識された標的を含む検出表面に方向付ける。この装置は、種々の検出表面(例えば、多孔性メンブレン、顕微鏡スライド、マイクロタイターディッシュ、カバーガラス、および、平らな光学的に透明な底を有するチューブ)上で標識された標的を検出し得る。入射光が検出表面に達し、カテゴリー結合分子を介して標的に結合しており、かつ光学的に透明な表面上に沈着しているシグナリング部分において蛍光を誘導する。放射された蛍光性の光の部分は、高集光効率レンズシステムによって集光され、そして放射フィルターホイールを通して、CCDカメラ(Orca II, Hamamatsu, Bridgewater, NJ)に伝達される。

10

(図4) 非拡大的な広域画像処理のためのCCD画像処理システムを示す。この図は、角度を付けた照射の構成を有するCCD画像処理装置を示す。ここでは、光が、集光光学装置の側から一定の角度で検出表面(ここでは、マイクロタイタープレートのウェルの底として示される)に導入される。この角度は、集光の効率を最適化するため、および集光レンズによる入射ビームの妨害を避けるために選択される。この構成の利点は、試料ホルダーの底面からの反射が集光レンズによって集光されず、それゆえに蛍光バックグラウンドノイズに寄与しないということである。

20

(図5) コンビナトリアル標識を使用する、異なる病原体の検出を示す。複数のシグナリング部分(標識)を使用するコンビナトリアル標識が、高いシグナル複雑性を達成するために使用され得る(すなわち、多数の別個のシグナルシグニチャー;詳細な説明の項の工程2における議論もまた参照されたい)。図解において表されている3つの病原体の各々は、量子ドットの別個の組み合わせで標識される。従って、各病原体は、別個のコードされたシグナルを放出する(病原体の右側に色を付したカラーバーコードとして示すように)。示されるカテゴリー結合分子は、ゲノムDNAにハイブリダイズする病原体特異的オリゴヌクレオチドプローブである。各プローブは、蛍光性の量子ドットに結合体化されている。多くのタイプのカテゴリー結合分子(例えば、抗体、リガンド、PNAプローブなど)が他のタイプのシグナリング部分(蛍光団、蛍光粒子、RLS光散乱粒子など)が使用され得るのと同様に、コンビナトリアル標識のために使用され得る。

30

(図6) シグナル部分を結合体化するためのタグ相補物の使用を示す。この図は、カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドカテゴリー結合分子を間接的に標識するための方法を示す。カテゴリー特異的結合部分およびタグ配列部分を含む二成分性のオリゴヌクレオチドが合成される。シグナリング部分は、タグ配列と相補的な、タグ相補物と呼ばれる第2のオリゴヌクレオチドと結合体化される。間接的な標識のためのこのシステムを使用して、タグを有するカテゴリー特異的オリゴヌクレオチドのファミリーは、シグナリング部分の組み合わせで容易に合成およびコードされ得る。

40

(図7) 蛍光性DNA結合染色剤で標識した個々の細菌の広域画像処理を示す。この図は、多孔性メンブレン支持体上で蛍光染色した個々の細菌細胞の検出を示す。細胞は、核酸染色剤シーバグリーンIで染色し、そしてブラックポリカーボネートメンブレンを通して濾過した。蛍光シグナルは、CCDに基づく非拡大性の広域画像処理装置で、FITC光学フィルターセットを用いて画像処理した。左のパネルは、約100個の大腸菌細胞からの蛍光画像を示す。スポットの数は、メンブレンに加えた細胞の数と相関する。右のパネルは、細胞がメンブレンに加えられていない陰性対照を示す。

50

(図8) 種々のカテゴリー結合分子およびシグナリング部分で標識した個々の細菌細胞の広域画像処理を示す。この図は、カバーガラス上の大腸菌細胞が4種類のシグナリング部分(シーバークリーンI、実施例2; 蛍光団標識されたオリゴヌクレオチドプローブ、実施例3; 蛍光団標識されたPNAプローブ、実施例4; 蛍光団標識された抗体、実施例5)で標識された実験の結果を示す。個々の細胞は、図3に示された装置を使用して非拡大的な広域画像処理によって検出した。標識された細胞の希釈物は、ポリ-L-リジンでコートされたカバーガラス上にスポットした。標識された細胞をCCD画像処理装置を使用して画像処理した後、画像処理された物体は、蛍光顕微鏡によって、単一の細胞または偶発的ないくつかの細胞の群を含むことを確認した。画像の上のパネルは、CCD画像処理によって検出した場合の標識された細胞を示す。明るいスポットが標識された細胞に対応する。下のパネルは蛍光顕微鏡で見た場合(1000倍に拡大)の同じ標識された細胞を示す。

10

(図9) 非拡大的な広域画像処理を使用する個々の生存可能な細菌細胞の検出を示す。この図は、本発明が、蛍光発生的に実行可能である染色剤を使用して生存している細菌を検出し得ることを示す。生存している大腸菌細胞(左のパネル)は、明るい蛍光スポットとして検出されたのに対して、死滅した大腸菌細胞(右のパネル)は、検出可能な蛍光シグナルを有しない。約400個の生存している大腸菌細胞が左のパネルの画像処理された領域中に存在し、約400の死滅した大腸菌細胞が右のパネルに存在する。

(図10) 蛍光性が高度の粒子で標識した個々の細菌の非拡大的な広域画像処理を示す。この図は、病原性大腸菌細胞がマイクロタイターディッシュウエルの光学的に透明な表面に結合され、蛍光粒子で標識し、そして非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理した実験(実施例7)の結果を示す。大腸菌0157細胞(シーバークリーンIで染色)は、熱を用いて96ウェルプレートの底に固定され、そして抗大腸菌0157抗体でコートされた蛍光粒子への結合によって標識された。左のパネルは、CCD画像処理装置で見られた細胞: 粒子複合体を示す。中央のパネルは、低出力の蛍光顕微鏡法(50倍拡大)によって見られる同じ試料を示す。染色された大腸菌0157細胞は、高出力蛍光顕微鏡法(右のパネル; 1000倍拡大)によって示されるような多数の蛍光粒子によって囲まれている。

20

(図11) 蛍光粒子: ウイルス: 磁気粒子複合体の液相磁気選択、引き続いて非拡大的な広域画像処理を使用する、ウイルス(HCV)についての同種イムノアッセイ法を示す。この図は、液相試料中で、顕微鏡的な標的(この場合はC型肝炎ウイルス(HCV))について走査するための有用な方法を図示する。ウイルスに特異的に結合する抗体でコートされた磁気粒子および蛍光粒子は、潜在的にウイルスを含む試料とともにマイクロタイターディッシュのウェル中で混合される。次いで、試料中のウイルスはこれらの粒子に結合する。いくつかのウイルスは、図の突き出した拡大部分に表されるように、磁気粒子および蛍光粒子に結合する。この磁気粒子: ウイルス: 蛍光粒子の複合体は、磁力または高度に蛍光性であることによって選択可能な特性を有する。マイクロタイターディッシュは磁石の上に置かれ、その結果、磁気粒子、ならびに磁気粒子と結合したHCVウイルスおよび蛍光粒子が、ウェルの光学的に透明な底面に引き付けられる。CCD画像処理装置(図3に示されるようなもの)を使用して、ウェルの底が画像処理される。ウイルス複合体は、ウイルスに結合する高度に蛍光性の粒子のために、画像中で明るいスポットとして見える。この画像のソフトウェア分析は、検出表面上の複合体の数を定量し、および標識された複合体由来のシグナルの全体の強度を積算する(同種イムノアッセイ法の結果を表す図8および図12を参照されたい)。

30

40

(図12) 非拡大的な広域画像処理を使用して個々の細菌を検出する同種イムノアッセイ法を示す。この図は、実施例8に記載される非拡大的な広域画像処理によって大腸菌を高感度に検出するイムノアッセイ法の結果を示す。カテゴリー特異的抗体でコートされた磁気粒子および蛍光粒子は、最初に細菌細胞に結合され、次いで、この複合体は、磁力を使用して光学的に透明なウェルの底面(検出領域)に引き付けられ、そしてこの複合体は、非拡大的な広域CCDに基づく画像処理を使用して検出された。この図は、血液における同種イムノアッセイ法の結果(一番下のパネル)、ならびに血液(一番上のパネル)と緩衝液(中央のパネル)の両方における同種でない(洗浄した)イムノアッセイ法の結果

50

の比較を示す。最も単純な形式である、同種免疫アッセイは、優れたシグナル対バックグラウンド比で細胞を効果的に検出した（図の最も下の右側のパネルにおける同種アッセイ法の定量を参照されたい）。

最も左のパネルは、非拡大的な、広域CCDに基づく画像処理を使用して得られた画像を示す。3つすべてのアッセイ法が、大腸菌の存在する場合に強力なシグナルを与えたが（左のパネル）、大腸菌が加えられなかった場合には、低いバックグラウンドシグナルであった。CCDカメラを使用して得られたシグナルが、粒子でコートした大腸菌細胞に一致することは、高解像度の蛍光顕微鏡分析（1000倍；上の2つの列、最も右の2つのカラム）を使用してさらに確認された。大腸菌細胞、磁気粒子、および蛍光粒子を含む代表的な複合体の画像が示される。各複合体の2つの画像は2つのフィルターセットを使用して作製された：1つはDNA蛍光についてのもの（シーバークリーンI；右から2つめのパネル）および1つは蛍光粒子の可視化についてのもの（最も右のパネル）である。この図は、この複合体が磁気粒子および蛍光粒子によって取り囲まれた大腸菌細胞からなることを示す。画像の定量的分析は、蛍光物体の数を計数し（図12、一番下のパネル、左の棒グラフ）、および物体のすべての強度を積算する（図12、一番下のパネル、右の棒グラフ）ソフトウェアによって実行された。示されるデータは6つの試料の分析を表す：1000個の大腸菌細胞を含む3つの試料および細胞を含まない3つの試料である。両方の測定において、大腸菌（1000個の細胞）を含む試料は、大腸菌を含まない試料よりも有意に高いスコアであった。棒の高さは、3つの試料の平均値を示す。エラーバーは3つの試料の平均値からの3つの標準偏差を示す。

10

20

さらなる詳細および議論については、実施例8を参照されたい。

（図13）「模擬痰」中における抗酸染色マイコバクテリアの広域画像処理を示す。この図は、実施例9において記載される試験の結果を示す。ここでは、結核を引き起こす病原体に密接に関連しているマイコバクテリアの株が、非拡大的な広域画像処理と組み合わせた抗酸パチルス（AFB）染色法を使用して検出された。「模擬痰」中にマイコバクテリア細胞（マイコバクテリア・スクロフラセウム；左のパネル：1A、2A）または大腸菌（右のパネル：1B、2B）のいずれかを含む市販のスライドガラスは、オーラミン-ローダミンで染色し、そして非拡大的な、広域の、CCDに基づく画像処理を使用して可視化した（一番上のパネル：1A、1B）。大腸菌を含む試料におけるはるかに少ないバックグラウンドスポット数と比べて、多数の対象物がマイコバクテリア細胞を含む試料中で検出された。蛍光顕微鏡分析（400倍；一番下のパネル：2A、2B）は、CCDカメラを用いて、拡大なしでキャプチャーされたシグナルが単一のマイコバクテリア細胞に対応することを確認した。

30

（図14）広域画像処理を使用する迅速な抗微生物剤感受性試験を示す。この図は、非拡大的な広域画像処理を使用することによって、大腸菌の増殖に対する抗微生物剤の最小阻害濃度（MIC）を決定するために設計された実験の結果を示す（実施例10）。種々の時間点における2連の細胞のアリコートは、LB寒天上で培養され、そしてCCD画像処理装置（図3）を使用する画像処理のために96ウェルマイクロタイターディッシュのウェルの光学的に透明な表面上に沈着される。増殖（図中では、+/-の記号で定性的に表示される）は、LB寒天プレート上のコロニーを計数することで測定され（図には示していない）、そしてCCDカメラによってキャプチャーされた画像の対象物および強度を測定することで測定される。18時間の培養時間の点は、NCCLS標準プロトコールに対応する。4時間培養の結果および4時間のCCD画像処理結果もまた示される。培養およびCCD画像処理によって検出されるような、耐性株および感受性株の増殖に関し抗生物質濃度依存性を比較することにより、2つのアプローチが比較できることが示される。

40

（図15）磁気的に選択された、個々に蛍光標識されたカンジダ・アルビカンス細胞の広域検出を示す。この図は、実施例11に記載される実験の結果を示す。C.アルビカンス細胞は、核酸染色剤（YOYO-1）およびウサギ抗カンジダポリクローナル抗体であらかじめ標識された。標識された細胞は、ガラス底のマイクロタイタートレイのウェル中で、ヤギ抗ウサギIgG抗体でコートされた磁気粒子に加えられた。細胞は、磁場の適用によって、ウェルの底にわたって均一に整列された。細胞は、CCD画像処理装置ならびに、YOYO-1蛍

50

光色素のために適切な励起フィルターおよび放射フィルター（FITCセット、480/40nm励起、535/50nm放射）を使用して、ウェルの底面全体を画像処理することによって検出された。

C. アルビカンス細胞を含むマイクロタイタートレイのウェルの非拡大的な広域CCD画像は、記載されるようにYOYO-1で染色された。蛍光シグナル（図中の白いスポット）は、高解像度の拡大（1000倍）の下で蛍光顕微鏡でマイクロタイターウェルを調べることによって単一または小さな群のC. アルビカンス細胞に対応することが示された。

C. アルビカンス細胞が加えられていないマイクロタイタートレイウェルの非拡大的な広域CCD画像（陰性対照）。

（図16）蛍光性および常磁性のポリスチレン粒子に特異的に結合する個々のカンジダ・アルビカンス細胞の広域検出を示す。この図は、実施例12に記載される実験の結果を示す。細胞は、マイクロタイターディッシュ中で、抗カンジダ抗体でコートされた磁気粒子および赤色蛍光粒子の混合物に加えられた。磁石に結合した細胞は、磁場および流体洗浄の適用によって未結合の粒子から分離された。細胞-蛍光粒子複合体は、CCD画像処理装置（AおよびB）または蛍光顕微鏡法（C-E）ならびに蛍光粒子のための適切な励起フィルターおよび放射フィルターを使用して、ウェルの全体の底面を画像化することによって検出された。

A. 複数の赤色蛍光粒子で標識されたC. アルビカンス細胞を含むマイクロタイターウェルの非拡大的な広域CCD画像。

B. C. アルビカンス細胞が加えられていないマイクロタイターウェルの非拡大的な広域CCD画像（陰性対照）。

C. Aにおいて十分に画像化されたのと同じウェルの領域の拡大的な蛍光顕微鏡画像（100倍拡大）。単一または小さな塊のC. アルビカンス細胞（緑色染色）が複数の赤色蛍光粒子によって取り囲まれている。

D. Bにおいて十分に画像化されたのと同じウェルの領域の拡大的な蛍光顕微鏡画像（100倍拡大）（細胞が加えられていない陰性対照）。

EおよびF. Aにおいて示されるのと同じ試料の領域の高解像度増幅（1000倍）蛍光顕微鏡画像。C. アルビカンス細胞（約5μm直径、緑色染色）が、複数の1μm直径の赤色蛍光粒子によって取り囲まれている。磁気粒子は見られない。

（図17）蛍光抗体および磁気粒子に特異的に結合した個々のカンジダ・アルビカンスの広域検出を示す。この図は、実施例13に記載される実験の結果を示す。C. アルビカンス細胞は、ガラス底のマイクロタイタートレイのウェル中で、抗C. アルビカンス抗体または大腸菌抗体でコートされた磁気粒子と混合された。30分後、蛍光団標識された抗C. アルビカンス抗体または大腸菌抗体を加えた。磁気複合体は洗浄され、次いで、磁場の適用によって、ウェルの底にわたって均一に整列された。細胞は、本発明のCCD画像処理装置ならびに蛍光団のための適切な励起フィルターおよび放射フィルターを使用して、ウェルの全体の底面を画像化することによって検出された。

A. 蛍光性抗C. アルビカンス抗体で標識されたカンジダ・アルビカンス細胞を含む反応ウェルの非拡大的な広域CCD画像。

B. 細胞が加えられていない反応ウェルの非拡大的な広域CCD画像（陰性対照）。

C. 蛍光性抗大腸菌抗体で標識された大腸菌細胞を含む反応ウェルの非拡大的な広域CCD画像。

D. 細胞が加えられていない反応ウェルの非拡大的な広域CCD画像（陰性対照）。注記：点状の蛍光シグナルは、赤色蛍光性核酸結合色素（YOYO-3）を用いる染色および高解像度拡大（1200倍）下での蛍光顕微鏡におけるマイクロタイターウェルの検査による、単一または小さな群の細胞に対応することが示された。

（図18）CCDカメラを使用した、個々の化学発光酵母細胞の非拡大的な広域検出を示す。この図は、実施例14に記載される実験の結果を示す。C. アルビカンス細胞は、FITC結合抗C. アルビカンス抗体で標識され、これは、次には、抗フルオレセイン抗体：アルカリホスファターゼ複合体に結合される。標識された細胞の希釈物は、ナイロンメンブレン

でコートされたスライド上にスポットされ、そして化学発光基質CDPスターが添加された。細胞は、CCD画像処理装置において拡大なしで画像処理された。単一の細胞の位置は、蛍光顕微鏡法によって確認された。左から右に、パネルは、およそ200、60、および20の個々のC.アルピカンス細胞を表す。多くの個々の細胞は、中央および右のパネル中に画像化されている。より大きく明るいスポットは、互いに近接している2つまたはそれ以上の細胞を表す。

(図19) インスタントフィルムの直接的な露出を使用した、個々の化学発光酵母細胞の非拡大的な広域検出を示す。この図は、実施例15に記載される実験の結果を示す。C.アルピカンス細胞は、FITC結合抗C.アルピカンス抗体で標識され、これは、次には、抗フルオレセイン抗体：アルカリホスファターゼ結合体に結合された。標識された細胞の希釈物は、ナイロンメンブレン上にスポットされ、そして化学発光基質CDPスターが添加された。ナイロンメンブレンは、スポットライトカメラ(Boston Probe)上にロードされ、そしてASA 2000ポラロイドフィルム(Polaroid Film)で画像化した。

左から右に、パネルは、図15と同様に、およそ200、60、および20の個々のC.アルピカンス細胞を表す。各パネルにおいてスポットされた細胞の数が与えられるが、そのスポットの多くは個々の細胞、とりわけ、最も右のパネルにある細胞を表すことが結論され得る。

(図20) 非拡大的な広域画像処理を使用した、下気道感染に關与する生物の検出を示す。この図は、実施例16に記載される、蛍光標識された下気道生物から生成したシグナルを高感度で検出する非拡大的な広域画像処理を使用してキャプチャーされた画像の結果を示す。この図は、種々の下気道病原体からの非拡大的な広域画像処理を使用して生成されたシグナルを示す(左寄りの2つのパネル)。上から下に、クラミジア・ニューモニエ、マイコプラズマ・ニューモニエ、およびレジオネラ・ニューモフィラである。右寄りの2つのパネルは蛍光顕微鏡法を使用して得られた画像を示す。

(図21) 非拡大的な広域画像処理を使用して、3つの異なる微生物について1つの試料を同時に走査する、多重化直接蛍光イムノアッセイ法を示す。この図は、実施例17に記載される実験の結果を示す。3種類の異なる微生物(大腸菌、C.アルピカンス、およびS.ピオゲネス)を含む3つの試料はカバーガラスに固定され、そしてカテゴリー特異的(この場合、種特異的)抗体の集合とともにインキュベートされた。集合中の各抗体のファミリーは、異なる蛍光団と結合体化された(大腸菌=緑色、C.アルピカンス=青色、S.ピオゲネス=赤色)。非結合の抗体を洗い流した後で、試料の画像は3つの異なるフィルターセット(緑色、青色、および赤色のチャンネル)を使用してキャプチャーされた。3つすべての試料について、最も強いシグナルが、試料中の微生物に結合する標識された抗体に対応するチャンネル中で得られた。

(図22) アデノウイルスについての固相捕捉アッセイ法を示す。この図は、ウイルスを捕捉するために固相に結合した抗体を使用してアデノウイルスについて試料を走査する試験の結果を示す。マイクロタイタープレートのウェルは、抗アデノウイルス抗体でコートされた。固定されたアデノウイルス試料または固定されたRSV試料は、抗アデノウイルスコートされた蛍光粒子とともにウェルに添加された。1時間のインキュベーション後、すべての未結合の粒子が洗い流され、そして残りの結合粒子が、CCD画像処理装置において拡大なしで可視化された。

陰性対照(RSVのパネル)は、ウェルに残存する非常に少量の粒子を示す。アデノウイルスのパネルにおいて、抗アデノウイルスコートされたウェル、アデノウイルス、および抗アデノウイルスコートされた粒子の相互作用によって、何千もの蛍光粒子がウェル中に捕捉された。

(図23) 血中のウイルスの固相捕捉を示す。この図は、固相に結合した抗体を使用してウイルスを捕捉する、アデノウイルスに關し血液試料の走査用に使用された試験の結果を示す(実施例19)。マイクロタイタープレートのウェルは、抗アデノウイルス抗体でコートされた。固定されたアデノウイルス試料または固定されたRSV試料は、50%マウス血液中にウェルに添加された。1時間のインキュベーション後、すべての未結合の粒子が

10

20

30

40

50

洗い流され、そして抗アデノウイルスコートされた蛍光粒子がウェルに添加された。洗浄後、結合した粒子は、CCD画像処理装置において拡大なしで可視化された。陰性対照（RSVのパネル）は、ウェルに残存する非常に少量の粒子を示す。アデノウイルスのパネルにおいて、抗アデノウイルスコートされたウェル、アデノウイルス、および抗アデノウイルスコートされた粒子の相互作用によって、何千もの蛍光粒子がウェル中に捕捉された。アデノウイルス捕捉フェーズにおいて血液の存在はアッセイを妨害しなかった。

（図24）アデノウイルスの液相アッセイ法を示す。この図は、「二重粒子」試験形式を使用してアデノウイルスを検出する試験の結果を示す（実施例20、図11の図解もまた参照されたい）。固定されたアデノウイルスおよび固定されたRSVは、抗アデノウイルスコートされた磁気粒子および蛍光粒子と混合された。4時間インキュベートした後、磁気粒子および任意の結合粒子が他の物資から分離され、マイクロタイタープレートに移され、そしてCCD画像処理装置において拡大なしで可視化された。

10

アデノウイルスのパネルは、アデノウイルスとのそれらの相互作用によって、磁気粒子によって捕捉された抗アデノウイルスコートされた何千もの蛍光粒子を示す。非常に少ない蛍光粒子がRSVパネルにおいて捕捉された。

（図25）細菌およびウイルスについて同時に走査する多重化広域画像処理イムノアッセイを示す。この図は、大腸菌およびアデノウイルスの存在について試料を同時に走査する試験を用いた実験の結果を示す（実施例22）。抗アデノウイルスコートされた赤色蛍光粒子および磁気粒子、ならびに抗大腸菌コートされた緑色蛍光粒子および磁気粒子は、固定されたアデノウイルスの存在下、固定された大腸菌の存在下、両方の存在下、またはそのいずれも非存在下において混合された。1時間のインキュベーションの後、磁気粒子および任意の結合粒子が他の物質から分離され、マイクロタイタープレートに移され、そしてCCD画像処理装置において拡大なしで可視化された。

20

1番目の行：アデノウイルスのみが粒子混合物に加えられた。シグナルの大部分はテキサスレッドフィルターセットを用いて観察できた。このフィルターセットは、赤色蛍光抗アデノウイルス粒子を可視化する。

2番目の行：大腸菌のみが粒子混合物に加えられた。シグナルの大部分はFITCフィルターセットを用いて観察できた。このフィルターセットは、緑色蛍光抗大腸菌粒子を可視化する。

3番目の行：アデノウイルスと大腸菌の両方が混合物に加えられた。シグナルは、テキサスレッドフィルターセットとFITCフィルターセットの両方を用いて観察できた。

30

（図26）非拡大的な広域画像処理を使用した、単一の細菌を検出するためのフィルターフロースルーアッセイ法を示す。この図は、液体試料中の単一の分散している細菌を検出する迅速な「フロースルー」アッセイ法の結果を示す（実施例23）。2枚のニトロセルロースメンブレンは、抗大腸菌0157抗体中に浸され、そして乾燥された。1枚のフィルターが蛍光性大腸菌特異的粒子とともにプレインキュベートされた大腸菌細胞を収集するために使用された（「大腸菌」；これらの粒子は大腸菌0157:H7特異的抗体でコートされた）。大腸菌特異的な粒子を含むが大腸菌細胞を含まない試料は他のフィルターを通した（「大腸菌なし」）。未結合の粒子はフィルターを洗浄することによって除去された。CCD画像処理装置は、非拡大的な広域画像処理を使用して蛍光シグナルを検出するために使用された（一番上のパネル）。2つのフィルターの、確認のための顕微鏡画像が中央のパネル（50倍拡大）および一番下のパネル（100倍拡大）に示される。

40

（図27）蛍光発生性エステラーゼ基質を用いて染色した細胞の広域画像処理を使用して行う細菌の定量を示す。

目的：多くの応用において、生きている細菌細胞を定量するために広いダイナミックレンジを有することは有用である。理想的なシステムでは、0または1個の細菌細胞から数100万または数1000万個までの細胞を正確に計数でき、従って、慣習的な微生物学的プレーティング方法のためにかかせない段階希釈と、それに特有の正確性の欠如とを除外することができる。この実施例において、本発明者らは、CCDに基づく非拡大的な広域画像処理と関連した、蛍光発生性の基質を用いる生細胞の染色が、どのようにして、少なくとも5

50

桁の大きさにわたる細胞の定量に使用され得るかを示す。

実験方法：大腸菌ATCC 8739細胞は、実施例Y（細胞指向実施例）において記載されるように増殖および処理された。細胞の段階的な10倍希釈はPBS中で作製され、ミリポア1225マニフォールド中の吸収パッド（Chemunexカタログ番号200-C3012-02）上に載せられたブラックポリエステルメンブレン（Chemunexカタログ番号200-C2010-01）を通して2連の試料を濾過し、そして実施例Y（細胞指向実施例）において記載されるように染色した。さらに、10～5倍希釈の10 μ lを3連でTSA（BDカタログ番号236950）上に播き、細胞の力価を得るために37 $^{\circ}$ Cで一晩増殖させた。ポリエステルメンブレン上の蛍光シグナルは、CCD画像処理装置（上記の工程6；図3に記載される）を使用して、FITC光学フィルターセット（色度/励起470/40nm、放射522/40nm）を用いてキャプチャーされた。Image-Pro Plusソフトウェア、バージョン4.1（Media cybernetics）が、CCD画像処理装置からの画像をキャプチャーおよび処理するために使用された。各フィルターから生成したシグナルは、すべての対象物のピクセル強度の合計として定義された（ここで、対象物は、350-65301からのピクセル強度を含むようなこの特定の実施例において定義される）。このシグナルを定義する方法は、いかなる染色細胞をも含まないフィルターの領域からバックグラウンドを除去するが、重複する対象物からの強度を覆い隠したりまたは実際より少なく計数することはない（細胞は小さくかつ全く透明であるので、細胞の層が薄い限りはシグナルは相加的である）。

10

結果：図28に示されるように、この方法から生成されたシグナルは、少なくとも5桁の大きさにわたって直線的であり、これは、この試験についての広いダイナミックレンジと見なされる。

20

変法：小さい対象物の数では、正確な定量は、これらのピクセル強度の合計を使用するよりも、個々の対象物を計数することによって達成され得る。なぜなら、対象物は、重複することがないらしいからである。このことは、とりわけ、複数の染色ならびに複数の励起および/または放射の波長が、どの対象物が目に見える細胞を表すかを決定するために使用される場合に、1または0個の細胞にまで下げたときの正確な計数に拡張し得る。さらに、より洗練された対象発見アルゴリズムが、局所的なバックグラウンド強度および照射のバリエーションを考慮に入れるために利用され得る。

非拡大的な広域画像処理を使用した、フィルター上での個々の染色細菌の検出：この図は、CCDカメラを使用する非拡大的な広域画像処理が、メンブレン上に沈着された個々の細菌細胞を検出することを示す（実施例24）。シーバークリーンIで染色された大腸菌細胞は、ブラックポリカーボネートフィルターを通して濾過された。次いで、このフィルターは、CCD画像処理装置を使用して画像処理した（一番上のパネル）。一番下のパネルは、CCD画像中の発光物体が、確かに、Syber Green染色された大腸菌であることの蛍光顕微鏡的な確認を示す（1000倍）。

30

（図28）本発明に基づく試験のダイナミックレンジを示す。この図は、本発明を使用した場合に可能である、大きなダイナミックレンジを示す。大腸菌細胞は、数百万の細胞から数百にまで希釈され、濾過され、および蛍光原性エステラーゼ基質で染色された。CCDに基づく非拡大的な広域画像処理によって生成された蛍光画像は、分析され、そしてそれらのシグナルが細胞計数に対してプロットされた。そのシグナルは、少なくとも5桁の大きさにわたって直線的である。

40

（図29）拡大なしで機器不使用の、少数の細菌細胞の検出を示す。この図は、単一の大腸菌細胞を検出する液体捕捉アッセイ法における、二重にコートした（アルカリホスファターゼ/抗大腸菌抗体）粒子の使用（実施例26に記載）を実証する。パネルの3つのカラムの各々において、画像は異なる検出方法を使用して得られた。パネルの一番上の行は、100細胞を含む試料に適用した場合のアッセイを示す。パネルの一番下の行は、試料が細胞を含まない場合の結果を示す。「100細胞」と標識された各々のパネルは、対応する「細胞なし」の対照よりも有意に多いスポットを有する。化学発光シグナルについては、スポットは白色または黒色のバックグラウンドであるのに対して、色素発生シグナルについては、スポットが白色のバックグラウンド上で黒色に現れる。後者のスポットはまた、

50

拡大の使用なしで、裸眼でのメンブレンの検査によって観察されることに注意されたい。従って、この実施例の結果は、二機能性のビーズを使用する非拡大的な広域画像処理が、複雑な機器を使用しない場合でさえ、高感度の検出にとって強力な手段となり得ることを実証する。

(図30) クラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについての迅速同種イムノアッセイ法；その1；クラミジア・トラコマチスの存在の検出を示す。この図は、一般的な性感染症の病原体であるクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについて走査する、実施例31に記載の同種イムノアッセイ法を図示する。この図は、このイムノアッセイ法が試料中のクラミジア・トラコマチスの存在をいかにして検出するかを示す。試験が2つの病原体をいかにして区別するかを理解することは図31に言及される。このアッセイ法の形式は図11において図示されるものに対応する。実験の詳細は、実施例22(図25)におかると細菌およびウイルスを検出するために使用される多重化アッセイ法と同様である。

10

(図31) クラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについての迅速同種イムノアッセイ法；その2；多重化検出の原理を示す。この図は、図30の続きで、実施例31に記載の同種イムノアッセイ法を図示し、これは、一般的な性感染症の病原体であるクラミジア・トラコマチスおよびナイセリア・ゴノレエについて走査する。赤色の粒子の検出は、クラミジア・トラコマチス感染を示すのに対して、緑色の粒子の検出は、ナイセリア・ゴノレエ感染を示す。

このアッセイ法の形式は図11において図示されるものに対応する。実験の詳細は、実施例22(図25)において細菌およびウイルスを検出するために使用される多重化アッセイ法と同様である。

20

(図32) 非拡大的な広域画像処理を使用した、高シグナル複雑性を有する多重化同種イムノアッセイ法を示す。この図は、高度に多重化した同種イムノアッセイ法についての図式を示す。このアッセイ法が2対の分析物特異的蛍光粒子ではなくむしろ、多くの分析物について同時に走査する多くの分析物特異的粒子対を組み込む以外は、このアッセイの原理は図30に図解されたものと同じである。多数の標的のカテゴリーを同定するために必要とされる高度なシグナル複雑性(すなわち、別個の多数のシグナル)を達成するための方法は、詳細な説明の項の工程6に記載される。

(図33) 多数の下気道病原体について並行して走査するイムノアッセイ法を示す。この図は、実施例33に記載されるイムノアッセイ法を図解する。下気道試料(例えば、痰またはBAL)は顕微鏡スライドに固定される。マルチウェルプレートのスライドに添付した後、病原体特異的なビオチン化された抗体の異なるファミリーが各ウェルに添加される(例えば、抗S.ニューモニエ抗体または抗レジオネラ抗体が別々のウェルに添加される)。未結合の抗体が洗い流され、そしてストレプトアビジンでコートされた蛍光粒子がビオチン化された抗体に結合した病原体に結合される。蛍光粒子が結合した区域の位置が病原体の同定を示す。なぜなら、このような区域は既知の病原体に対する抗体を含んだウェルに対応するからである。この粒子含有の区域は、CCD検出を使用して画像処理される。

30

(図34) 培養を伴わない、下気道感染の多重化された同定を示す。この図は、実施例34に記載の試験を図示する。異なる尿道病原体についての捕捉抗体を、ガラススライド上で平行した線に付着させる。スライドは、細菌細胞中の核酸に結合する蛍光染色で処理した尿溶液に浸漬する。細菌病原体が、存在する場合、細菌病原体はスライド上の捕捉抗体の対応する線に付着し、そして非拡大的な広域画像処理を使用して画像処理される。

40

(図35) 血液由来のウイルス：HIV、HCV、HBV、およびCMVの迅速かつ多重化された同定を示す。この図は、実施例35に記載される試験を図示する。4つの異なるウイルス(HIV、HBV、HCV、およびCMV)に特異的な4つの異なる捕捉抗体を含む4つの別個のスポットが、光学的に透明なマイクロタイターディッシュの底に吸着された。血液(図ではHIVを含む)がウェルに添加され、そしてウイルスを捕捉抗体に結合させる。血液を取り除いた後、4種類のウイルス特異的蛍光粒子の混合物がウェルに添加される。各々の種類の粒子

50

が別個のスペクトル特性（シグナルシグニチャー）を有する蛍光団で染色され、そして異なるウイルス特異的抗体でコートされる。ウェルの表面上にトラップされるウイルス粒子は、CCDに基づく非拡大的な広域画像処理によって検出および定量される対応する蛍光粒子に結合する。結合粒子の位置およびシグナルシグニチャーの両方が血液中のウイルスを同定する。

（図36）非拡大的な広域画像処理を使用した、A型インフルエンザウイルスの超高感度ラテラルフロー試験を示す。この図は、蛍光標識粒子で標識され、かつ非拡大的な広域画像処理を使用して分析される、A型インフルエンザウイルスについてのラテラルフロー試験の結果を示す。この図は、（左から右に） 0 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、および 10^8 ピリオン/mlを含む試料を適用された試験ストリップからの捕捉線および対照線の画像を示す。蛍光シグナルは、A型インフルエンザピリオンの濃度の増加に伴って増加する。示されたデータは、この試験が少なくとも 10^5 ピリオン/mlまで低い濃度を検出し得ることを示す。従って、この実験により、本発明に基づくラテラルフロー試験の感度が実証される。

10

（図37）可視的検出を使用したM.ツベルクローシスについての迅速ラテラルフロー試験を示す。この図は、実施例36に記載の試験を図示する。一番上のパネルは、ラテラルフロー試験の構成の側面図を示す。試験ゾーンは、吸収剤のメンブレンに結合した抗M.ツベルクローシス捕捉抗体の線を含む。陽性対照ゾーンは、メンブレンに結合したM.ツベルクローシス細菌を含む。試料（図ではM.ツベルクローシスを含む）は試料パッドに適用される。キャピラリーフローは、メンブレンに沿って病原体細胞を引っ張り、その結果、これらは試験ゾーン中の捕捉抗体と接触し、かつトラップされる。抗M.ツベルクローシス抗体およびアルカリホスファターゼに結合体化された粒子は、試料パッドに適用される。キャピラリーフローを経由して吸収パッドに向かう移動の過程で、結合体は、試験ゾーン中で捕捉されたM.ツベルクローシス細胞に結合し、そして対照ゾーン中でフィルターに結合したM.ツベルクローシスに結合する。これらの結合した結合体は、アルカリホスファターゼ基質を用いる色素発生性染色後に直接的に可視化される。

20

（図38）非拡大的な広域画像処理を使用した、多数の異なる細菌戦因子を検出するための迅速ラテラルフロー試験を示す。この図は、実施例38に記載される試験を図示する。この戦略は、以下の例外を除いて、図37の説明文中に記載されたものと同様である。この試験は、細菌、ウイルス、および毒素を含む、多数の異なる細菌戦因子について、試料を走査する（単純化のために、この図は実施例38において記載される試験中の標

30

的、結合体、および捕捉抗体のすべてを示しているわけではないことに注意のこと）。この実施例において、試料は、結合体パッドにおいて結合体と接触し、かつ結合体を移動させる。最終的に、この試験は、アルカリホスファターゼの化学発光性基質およびCCD画像処理を使用して、特異的に結合した結合体粒子を検出する。

（図39）ゲノム減算を使用した、S.ニューモニエカテゴリー特異的配列の単離を示す。この図は、実施例39に記載のS.ニューモニエ特異的配列の単離を図示する。図39Aは、S.ニューモニエとその最も密接な関連物との間の系統学的な関連性を示す（Kawamuraら、International Journal of Systematic Bacteriology 45: 406-8, 1995）。カテゴリー特異的配列を単離するための戦略は2つの工程に分けられ得る：ゲノム減算段階（図39B）およびスクリーニング段階（図39C）である。最初に、ゲノム減算（Straus、1995、前出）が、系統学的な株（この場合、S.ニューモニエ）からのDNAを「+」ゲノム差分試料として使用して実行される（図39B）。「-」ゲノム差分試料は、最も密接な関連物である株（肺炎を一般的に引き起こさない株）のいくつかをプールすることによって構築される。得られる減算産物は、病原体のゲノムにハイブリダイズするが最も密接に関連する種のゲノムにはハイブリダイズしないフラグメントである。減算産物をクローニングした後、カテゴリー特異的であるサブセットが単離される（図39C）。これらは、すべてのS.ニューモニエ株にハイブリダイズするが他の群のいかなる株にもハイブリダイズしないDNAフラグメントである。試験されたすべてのS.ニューモニエ株にハイブリダイズするが他の種であるストレプトコッカス属の菌株とはハイブリダイズしないプローブが選択される。詳細については実施例39を参照されたい。

40

50

(図40) 核酸プローブを使用した、呼吸器系の病原体についての包括的な試験を示す。この図は、実施例39に記載の試験を図示する。病原体特異的プローブの集合は、2つの区域(1つは呼吸器系の試料を含み、そして1つはスポットのアレイを含み、これらの各々は異なるカテゴリーの対照である呼吸器性病原体を含む)を含むスライドにハイブリダイズされる。集合中の各プローブのファミリーは、別個のシグナルシグニチャーで標識される。対照スポットのシグナルシグニチャーと、臨床試料における病原体のシグナルシグニチャーとを比較することで、臨床試料中の病原体を同定する。画像分析ソフトウェアによって見い出された対象物の数および強度は、試料中の病原体の数を定量する。詳細については実施例39を参照されたい。

(図41) カテゴリー特異的配列の間接的なコンビナトリアル標識を示す。この図は、実施例40における、高いシグナル複雑性を達成するために使用される方法を示す。カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドであるカテゴリー結合分子の各ファミリーは、表5に示す図式に類似の図式を使用して特定のシグナルシグニチャーで標識される。従って、図に示されるように、S.ニューモニエプローブは、紫色または青色のいずれかの量子ドットで間接的に標識されるのに対して、S.アウレウスプローブは、黄色または緑色のいずれかの量子ドットで標識される。例えば、紫色の量子ドットで標識されるプローブは、2つの隣接する部分：カテゴリー特異的オリゴヌクレオチドおよび「紫色タグ」を用いて合成される。この紫色タグの配列は、紫色の量子ドットに結合体化された「紫色タグ相補物」にハイブリダイズし得る。

10

(図42) CNSストリップ試験を示す。この図は、実施例41に記載の試験を図示する

20

(図43) 仮想的な減算によって特定されるゲノム上の差分の配列を増幅するための二成分性PCRプライマーを示す。この図は、クラミジア・トラコマチスにおいて存在するが、クラミジア・ニューモニエにおいては存在しない領域(~200から500bp)を増幅するために、実施例43において使用されるPCRプライマーを示す。二成分性の構造を有するPCRプライマーが設計される。「左側プライマー」は、クラミジア・トラコマチスにおける挿入/欠失領域の「左側」末端に対応する20bpのプライマーに連結されたXhoLプライマー配列

(5'-GGG CCC CCC CTC GAT C-3')

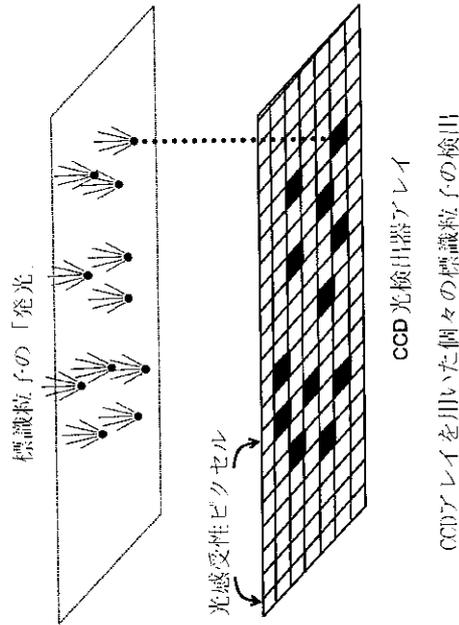
30

を有する(5'-XhoL-クラミジア・トラコマチス左側プライマー-3')。「右側プライマー」は、クラミジア・トラコマチスにおける挿入/欠失領域の「右側」末端に対応する20bpのプライマーに連結されたXhoRプライマー配列

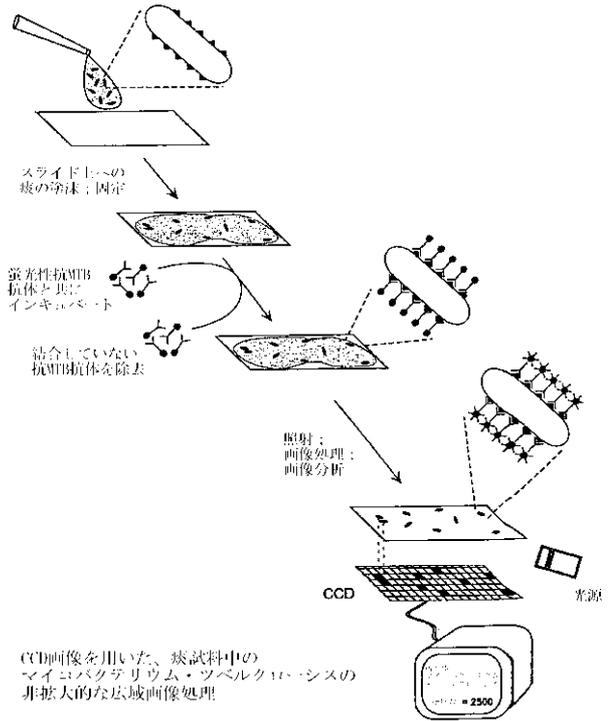
(5'-ATC GAT ACC GTC GAC CTC-3')

を有する(5'-XhoR-クラミジア・トラコマチス右側プライマー-3')。

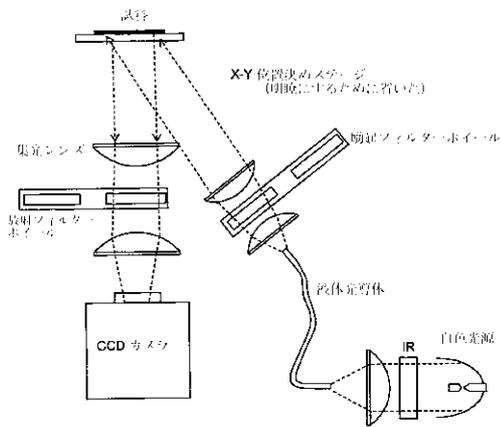
【図1】



【図2】

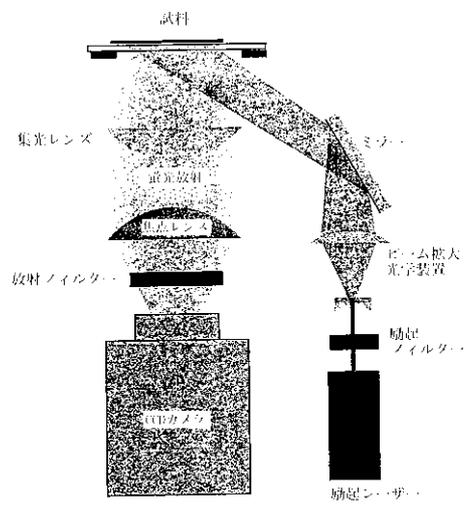


【図3】



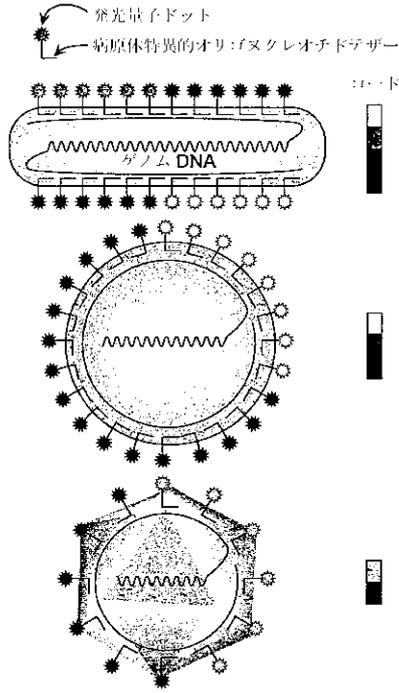
広域画像処理のためのCCD画像処理装置

【図4】



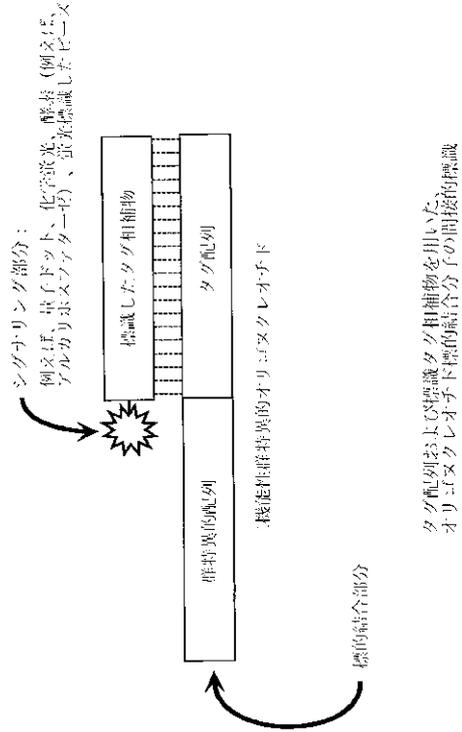
非拡大的な広域画像処理のためのCCD画像処理システム

【 図 5 】

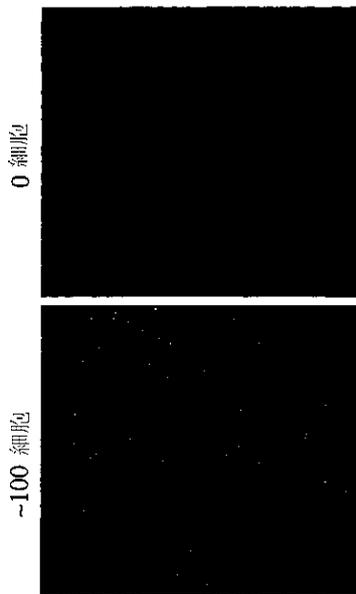


コンビナトリアル標識を用いた、異なる病原体の別個への標識

【 図 6 】

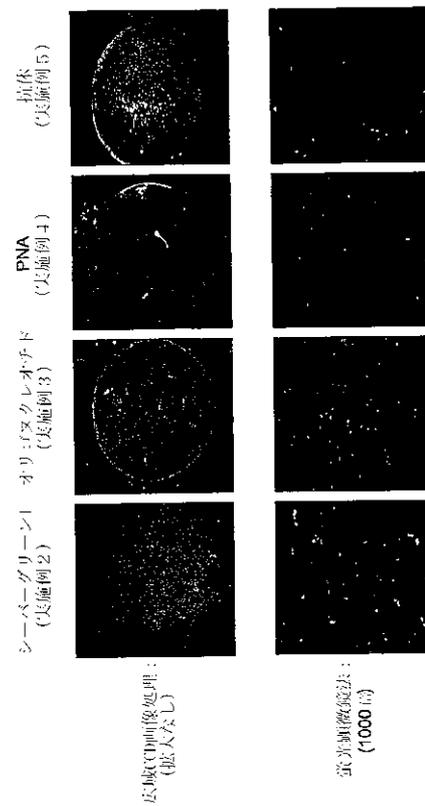


【 図 7 】



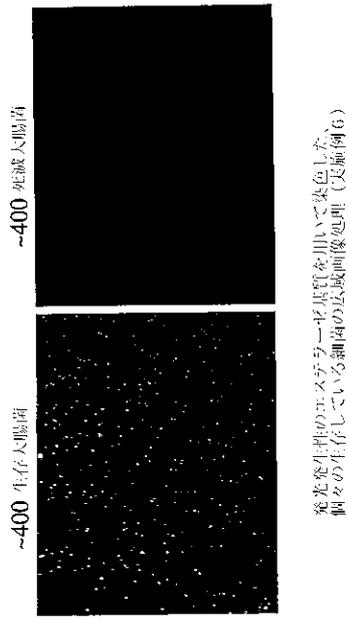
蛍光性DNA結合染色剤で標識した個々の細菌の
広域画像処理（実施例1）

【 図 8 】

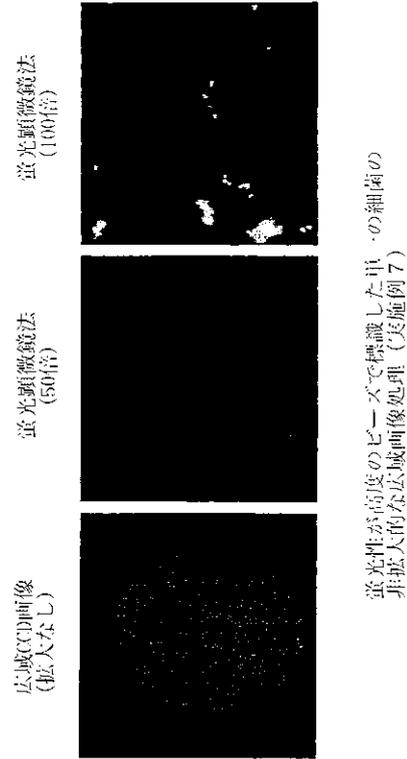


種々のシグナリング部分を用いた、単一の
非拡大的な広域画像処理（実施例2～5）

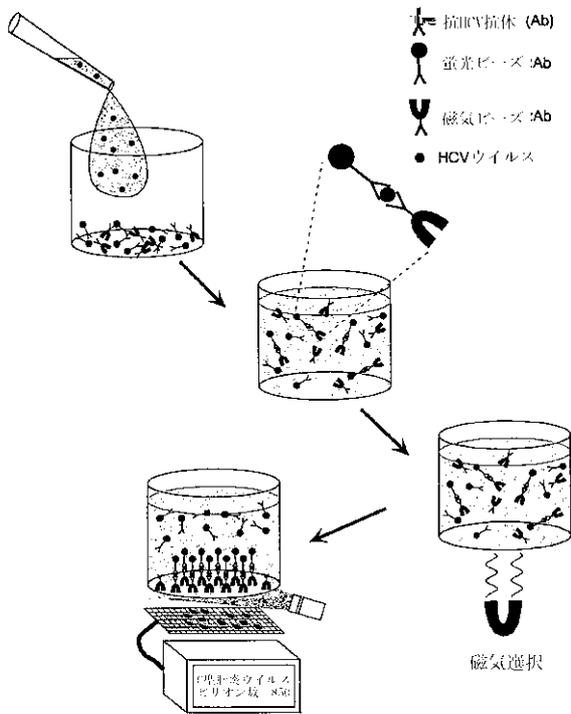
【 図 9 】



【 図 10 】

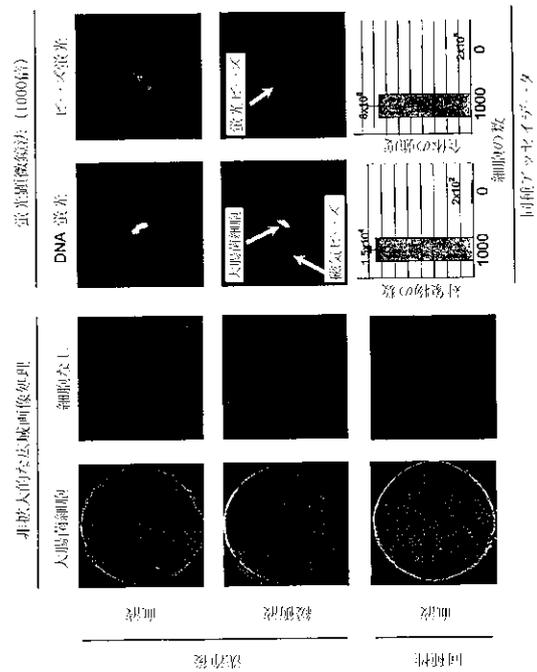


【 図 11 】



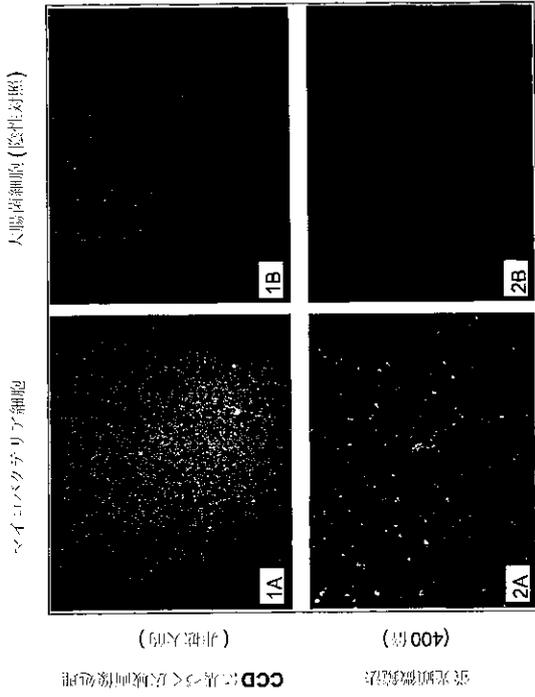
蛍光ビーズ: ウイルス: 磁気粒子複合体の液相磁気選択、
引き続いて非拡大的な広域画像処理を用いた、
ウイルス(HCV)についての同種免疫アッセイ法

【 図 12 】



非拡大的な広域画像処理を用いて個々の細菌を
検出する、同種免疫アッセイ法 (実施例8)

【 図 1 3 】



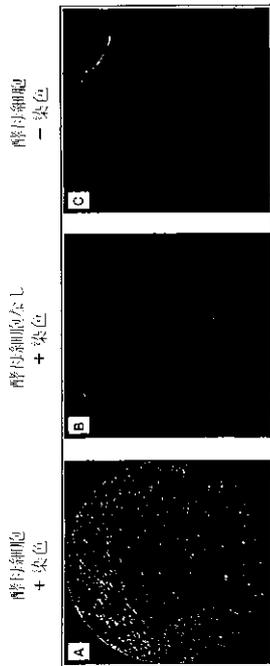
1 枚撮像中の高感彩色マイコプラズマの広域画像処理 (実施例 9)

【 図 1 4 】

tet (µg/ml)	感受性株				耐性株						
	0	.25	1	2	4	0	32	64	128	256	320
18時間 (培養)	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-
4時間 (培養)	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-
4時間 (CCD)											

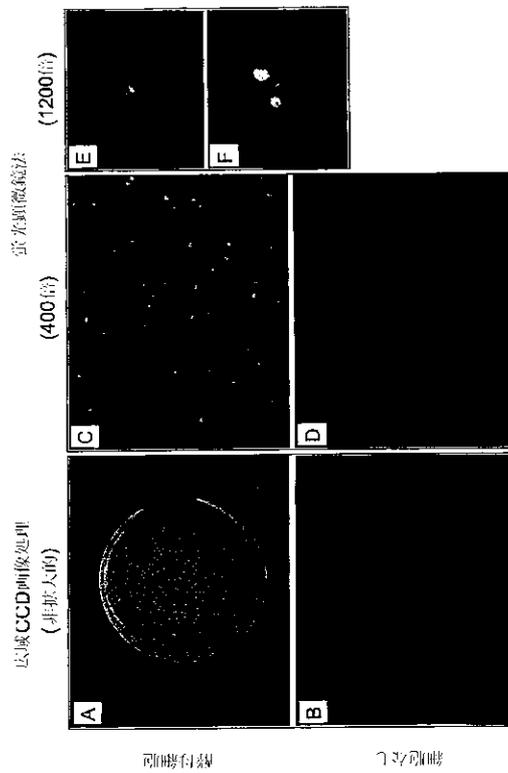
広域画像処理を用いた迅速な抗微生物剤感受性試験 (実施例 10)

【 図 1 5 】



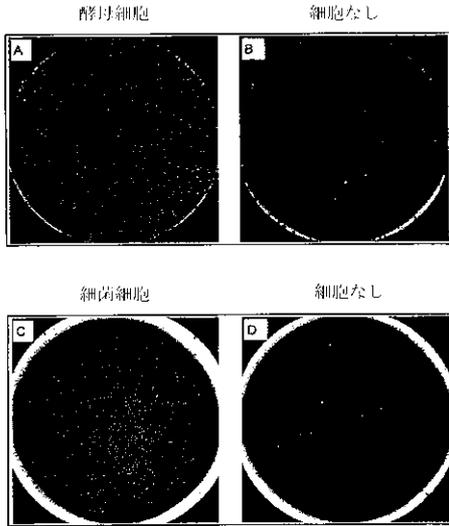
磁気的に選択された、個々に蛍光標識したカンジダ・アルビカンズ細胞の広域での検出 (実施例 11)

【 図 1 6 】



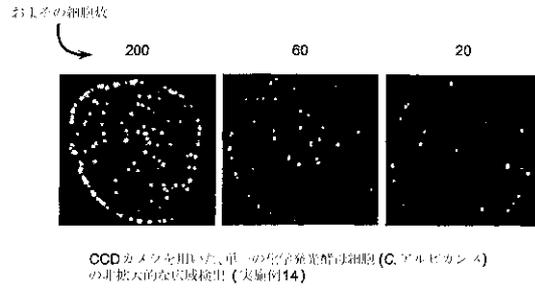
蛍光標識による常磁性のボリスチレン粒子に特異的に結合する個々のカンジダ・アルビカンズ細胞の広域検出 (実施例 12)

【 図 17 】



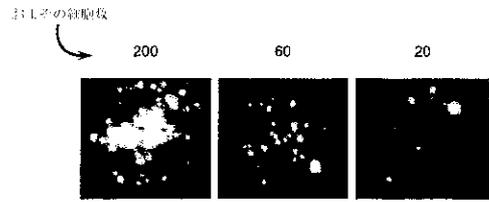
蛍光抗体および磁気粒子に特異的に結合した個々のカンジダ・アルビカンスの広域検出(実施例13)

【 図 18 】



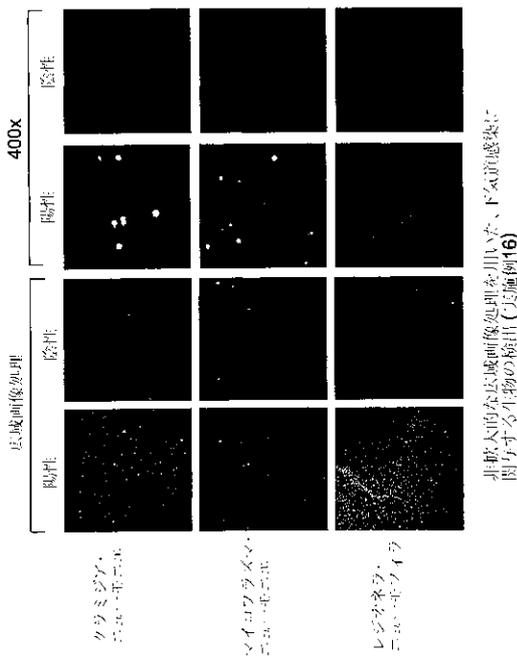
CCDカメラを用いた、単一の光学発酵母細胞(C.アルビカンス)の非拡大的な広域検出(実施例14)

【 図 19 】

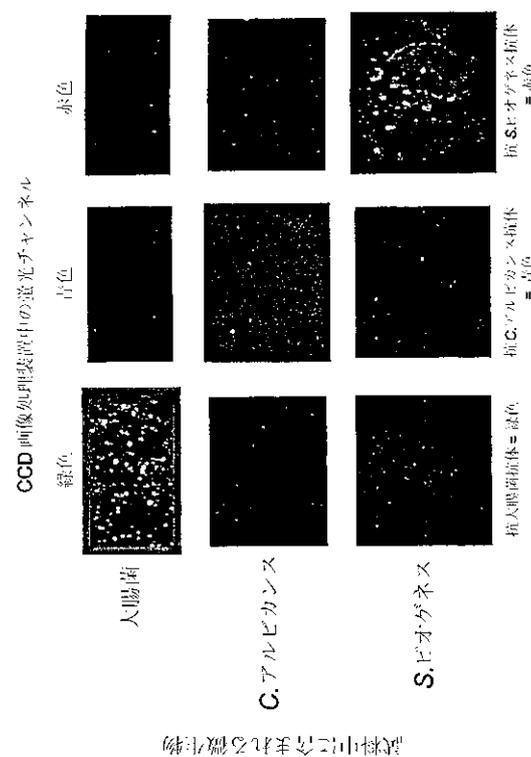


インスタントフィルムの直視的な露出を用いた、単一の光学発酵母細胞(C.アルビカンス)の非拡大的な広域検出(実施例15)

【 図 20 】



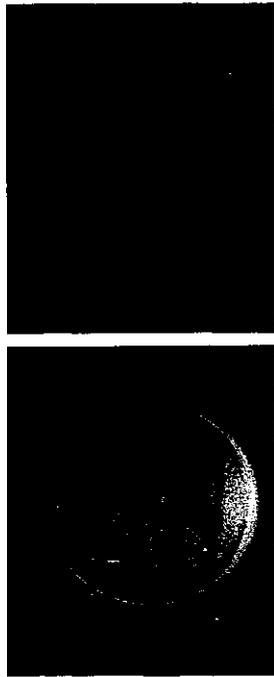
【 図 21 】



試料中に含まれる微生物

非拡大的な広域画像処理を用いて、3つの異なる微生物について1つの試料を同時に走査する、多重化直接蛍光イメージング法(実施例17)

【図 2 2】

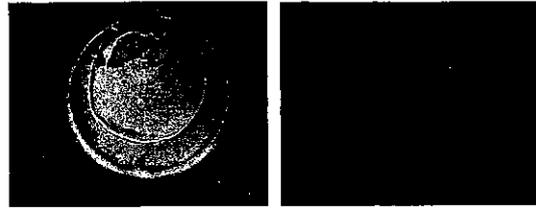


RSV (陰性対照)

アデノウイルス

図相捕獲および非拡大的な広域画像処理を用いたウイルスイムノフッッセイ法 (実施例18)

【図 2 3】

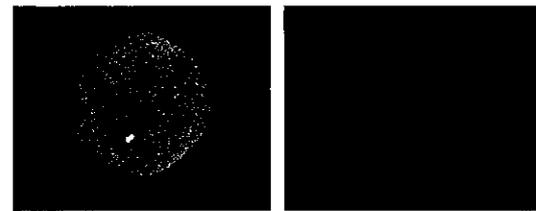


アデノウイルス

RSV (陰性対照)

図相捕獲および非拡大的な広域画像処理を用いた、血液中のウイルスイムノフッッセイ法 (実施例19)

【図 2 4】

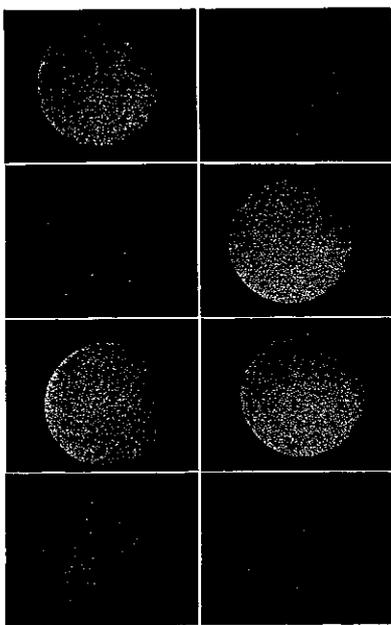


アデノウイルス

RSV (陰性対照)

液相サンドイッチを形成する磁気ビーズおよび蛍光ビーズ、続いて非拡大的な広域画像処理を用いたウイルスイムノフッッセイ法 (実施例20)

【図 2 5】



アデノウイルスのみ

大腸菌のみ

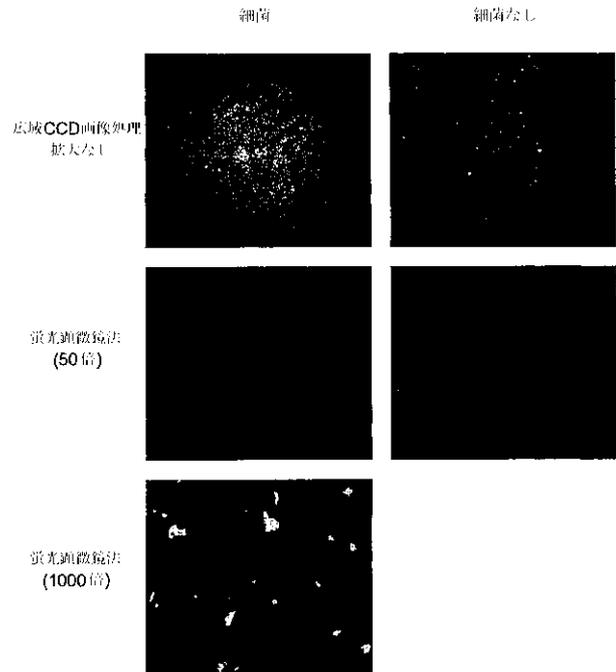
アデノウイルス および大腸菌

アデノウイルスなし、大腸菌なし

アデノウイルス 特異的蛍光ビーズ 大腸菌特異的蛍光ビーズ

細菌およびウイルスについて同時に非査する多重化広域画像処理イムノフッッセイ法 (実施例22)

【図 2 6】



細菌

細菌なし

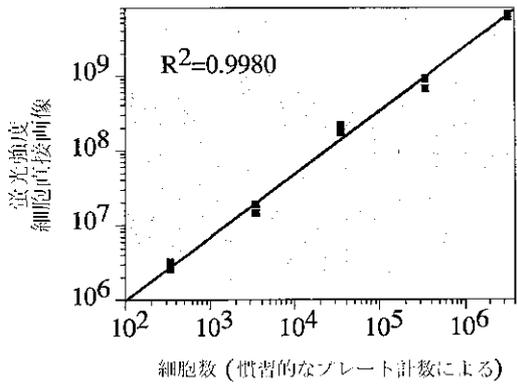
広域CCD画像処理 拡大なし

蛍光顕微鏡法 (50倍)

蛍光顕微鏡法 (1000倍)

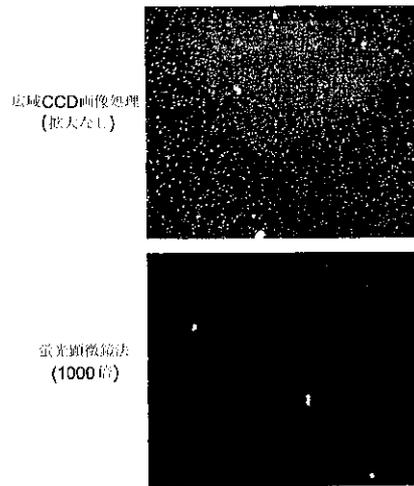
非拡大的な広域画像処理を用いた、単一の細菌を検出するためのフィルターフッッセイ法 (実施例23)

【 図 2 7 】



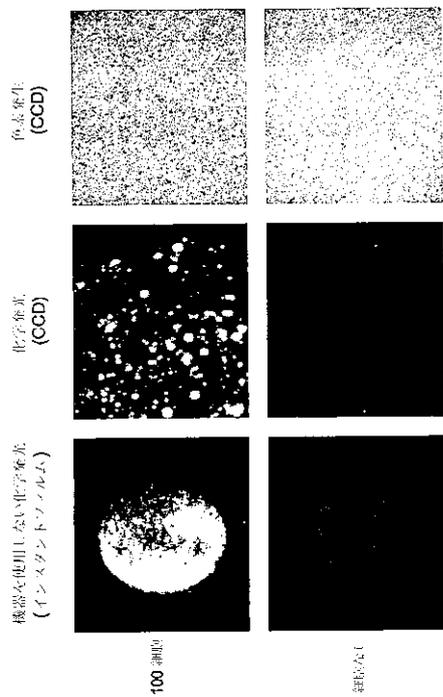
蛍光発光性エステラーゼ基質を用いて染色した細胞の広域画像処理を用いた細菌の定量(実施例24)

【 図 2 8 】



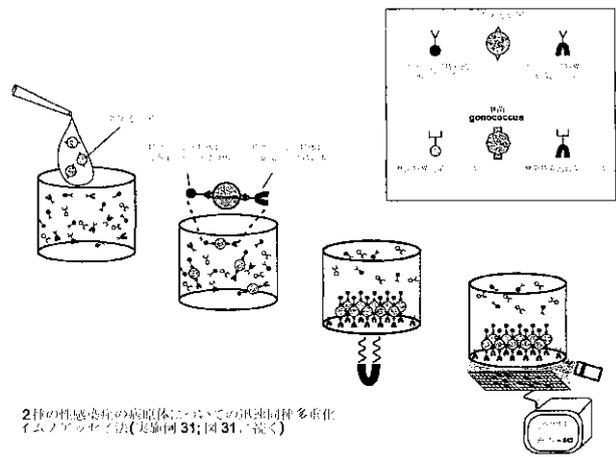
非拡大的な広域画像処理を用いた、フィルタリングでの個々の染色された細菌の検出(実施例25)

【 図 2 9 】



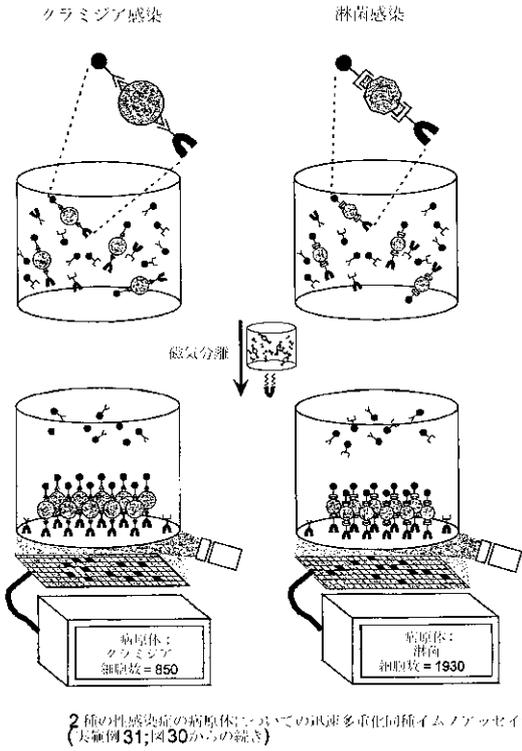
酵素反応による、機器不使用、拡大なしで行う少数の細菌細胞の検出(実施例26)

【 図 3 0 】

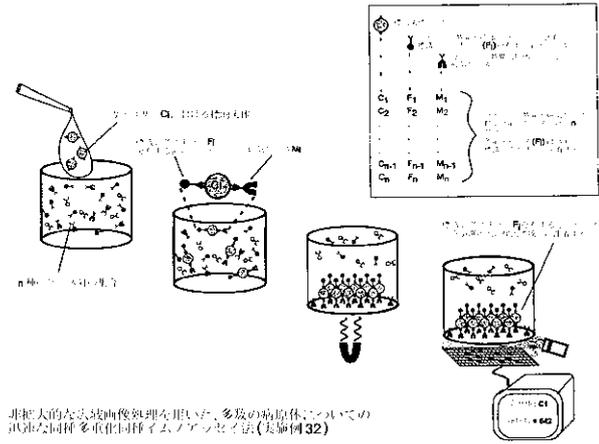


2種の増殖可能な病原体についての迅速同種多変化イムノッセイ法(実施例31;図31, 続く)

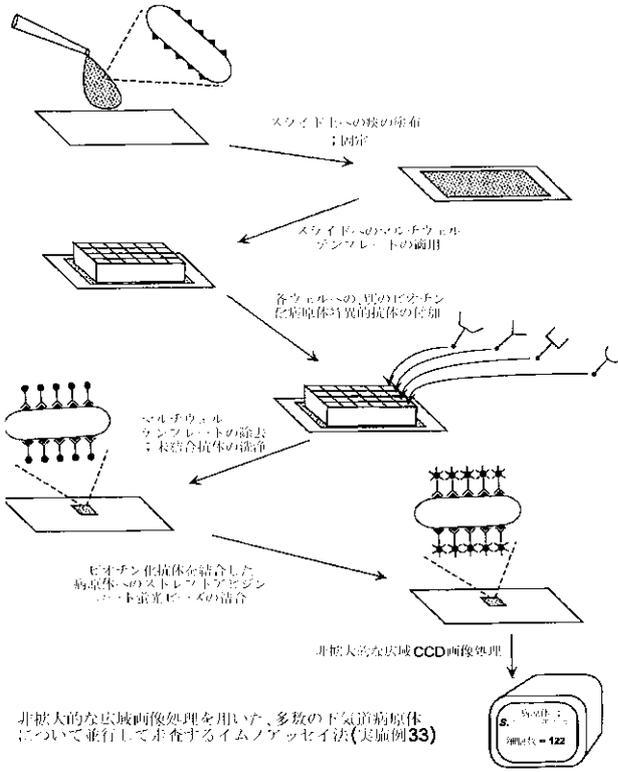
【図 3 1】



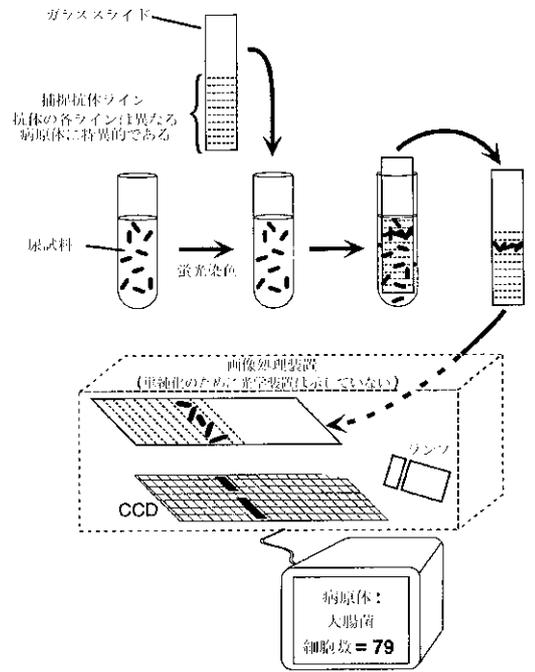
【図 3 2】



【図 3 3】

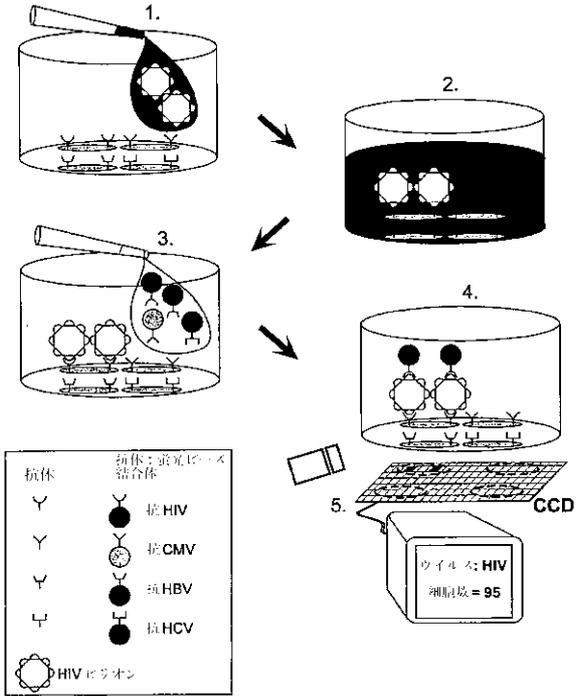


【図 3 4】



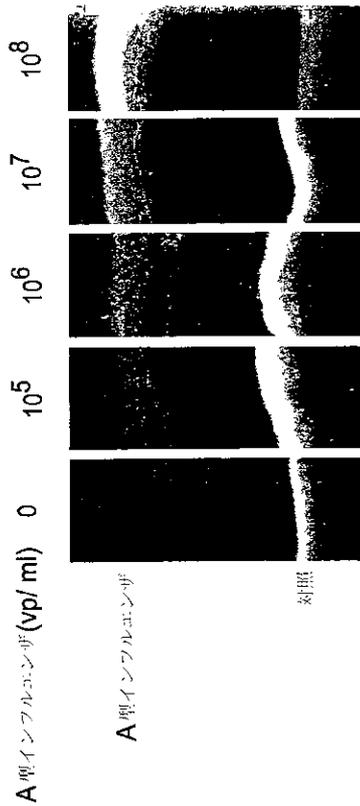
非拡大的な広域画像処理を使用して単一細胞を検出する、下気道感染の
多重化イムノアッセイ法(実用例34)

【図 35】



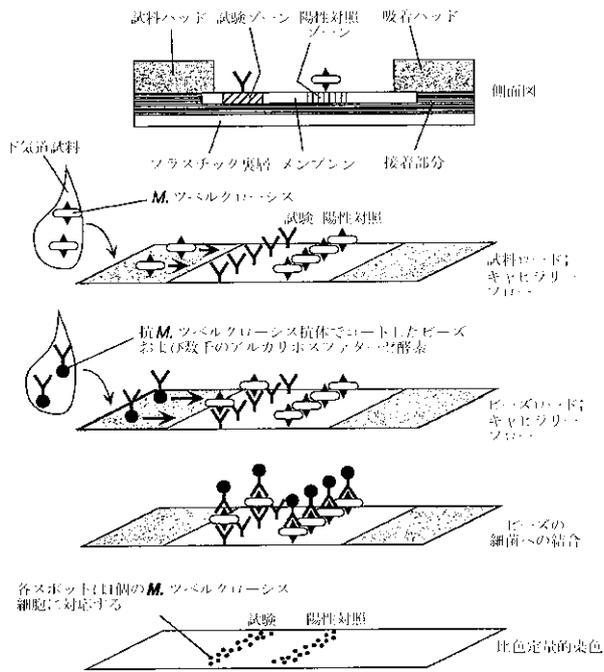
非拡大的な広域画像処理を用いた、血液由来のウイルスの多重化イムノッセイ法(実施例 35)

【図 36】



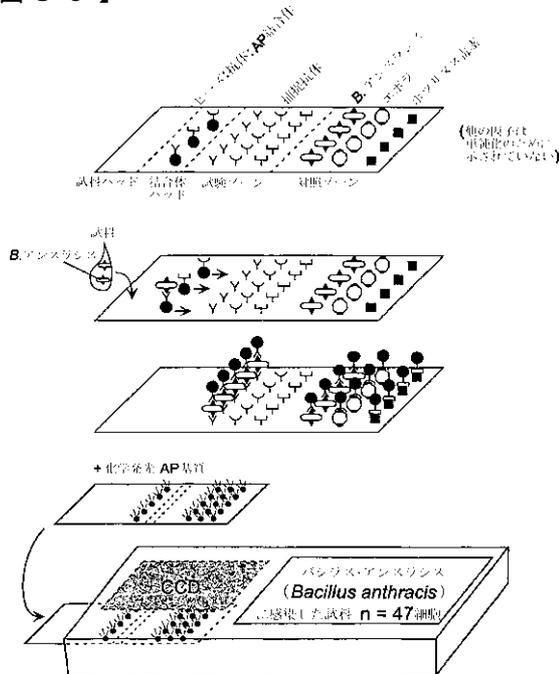
非拡大的な広域画像処理を用いた、低レベルのウイルスを検出するための超高感度ラテラルフローッセイ法(実施例 36)

【図 37】



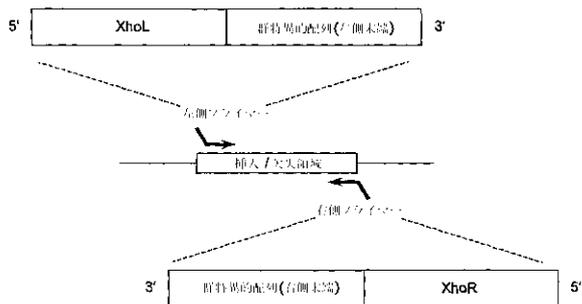
可視的検出を用いた *M. ツバルクローシス* についての迅速ラテラルフロー試験(実施例 37)

【図 38】



非拡大的な画像処理を用いた、多数の異なる細菌検出因子を検出するための迅速ラテラルフロー試験(実施例 38)

【 図 4 3 】



仮想的な試薬の両側のPCR増幅するための二成分性PCRプライマー(未编号43)

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成16年9月2日(2004.9.2)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 0 4 7 2

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 0 4 7 2 】

他の実施態様は特許請求の範囲内にある。

【 配列表 】

SEQUENCE LISTING

<110> Genomic Profiling Systems, Inc.

<120> Rapid and Sensitive Detection of Cells and Viruses

<130> CE-A0408

<140> JP 2003-572353

<141> 2002-09-06

<150> US 60/317,658

<151> 2001-09-06

<160> 3

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 1

gggccccccc tcgatc

16

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> primer

<400> 2

atcgataccg tcgacctc

18

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Escherichia coli

<400> 3

gctgcctccc gtaggagt

18

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/28434
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 31/00 US CL : 435/7.1 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.1 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched NONE Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST, CAPLUS, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 5,891,394 A (DROCOURT et al.) 06 April 1999(06.04.1999), abstract, columns 1-3.	1-12, 16-135
Y	US 6,214,560 B1 (YGUERABIDE et al.) 10 April 2001(10.04.2001), abstract, columns 1-2, column 6, lines 13-22, columns 9-10, column 12 lines 51-62	1-12, 16-136
A	US 4,587,213 A (MALECK, George) 06 March 1986(06.03.1986), document, abstract, columns 1-3.	1-12, 16-136
A	US 5,981,180 A (CHANDLER et al.) 09 November 1999(09.11.1999), columns 1-4.	1-12, 16-136
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A"	document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E"	earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L"	document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot 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
"O"	document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family
"P"	document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	
Date of the actual completion of the international search 26 September 2004 (26.09.2004)		Date of mailing of the international search report 06 OCT 2004
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Zachariah Lucas</i> Telephone No. 571.272.1600

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US02/28434

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of Item 1 of first sheet)

This international report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claim Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
The claims are incomplete and do not define what subject matter is being claimed.
2. Claim Nos.: 14 and 15
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claim Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of Item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

No protest accompanied the payment of additional search fees.

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード(参考)
G 0 1 N 21/78	G 0 1 N 21/78	C
G 0 1 N 33/543	G 0 1 N 33/543	5 2 1
G 0 1 N 33/569	G 0 1 N 33/569	B
	G 0 1 N 33/569	G

(81) 指定国 AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, N O, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW

(特許庁注：以下のものは登録商標)

ポラロイド

P O L A R O I D

(72) 発明者 ストラウス ドン

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ケンブリッジ バッキンガム ストリート 19

Fターム(参考) 2G054 AA08 BB08 BB13 CA20 CB02 CB03 CE02 EA01 EA03 FA19
 GA04 GB02 GB10
 4B063 QA01 QA18 QQ02 QQ03 QQ04 QQ05 QQ10 QQ15 QQ16 QQ17
 QQ18 QQ19 QQ20 QR32 QR35 QR38 QR48 QR56 QS32 QS36
 QS39 QX01 QX02

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2005518553A5	公开(公告)日	2006-01-05
申请号	JP2003572353	申请日	2002-09-06
[标]申请(专利权)人(译)	基因组PROFILING SYST		
申请(专利权)人(译)	基因组分析系统公司		
[标]发明人	ストラウスドン		
发明人	ストラウス ドン		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/06 C12Q1/68 C12Q1/70 G01N21/76 G01N21/78 G01N33/543 G01N33/569		
CPC分类号	C12Q1/06 B82Y5/00 B82Y10/00 B82Y20/00 C12Q1/04 C12Q1/18 G01N15/1429 G01N15/1475 G01N21/6428 G01N33/5005 G01N33/5008 G01N33/56916 G01N33/56938 G01N33/56966 G01N33/56983 G01N33/58 G01N33/582 G01N2015/1486 G01N2015/1488 G01N2021/6439 G01N2021/6471 G01N2333/195 G01N2333/245 G01N2333/31 G01N2333/32 G01N2333/33		
FI分类号	G01N33/53.Y C12Q1/06 C12Q1/68.A C12Q1/70 G01N21/76 G01N21/78.C G01N33/543.521 G01N33/569.B G01N33/569.G		
F-TERM分类号	2G054/AA08 2G054/BB08 2G054/BB13 2G054/CA20 2G054/CB02 2G054/CB03 2G054/CE02 2G054/EA01 2G054/EA03 2G054/FA19 2G054/GA04 2G054/GB02 2G054/GB10 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QQ03 4B063/QQ04 4B063/QQ05 4B063/QQ10 4B063/QQ15 4B063/QQ16 4B063/QQ17 4B063/QQ18 4B063/QQ19 4B063/QQ20 4B063/QR32 4B063/QR35 4B063/QR38 4B063/QR48 4B063/QR56 4B063/QS32 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/317658 2001-09-06 US		
其他公开文献	JP2005518553A		

摘要(译)

本发明通过使用大面积成像检测源自原位细胞分裂的微观集落来提供活细胞的有效、快速和灵敏的计数。基于本发明的微生物计数测试解决了临床和工业微生物学中的重要问题 - 使用传统方法进行检测所需的时间，同时保持了基于微生物培养的传统方法的关键优点。本发明的实施方案包括用于检测细胞微集落而不标记试剂的非破坏性无菌方法。这些方法允许产生纯培养物，其可用于微生物鉴定和抗微生物抗性的测定。