

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号
特開2019-152604
 (P2019-152604A)

(43) 公開日 **令和1年9月12日(2019.9.12)**

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 H O 4 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	
GO 1 N 33/536 (2006.01)	GO 1 N 33/536 D	
CO 7 K 19/00 (2006.01)	CO 7 K 19/00 Z N A	
CO 7 K 14/46 (2006.01)	CO 7 K 14/46	

審査請求 未請求 請求項の数 37 O L (全 98 頁)

(21) 出願番号	特願2018-39602 (P2018-39602)	(71) 出願人	518076779 株式会社CeSPIA 東京都千代田区大手町2-1-1 大手町野村ビル18階
(22) 出願日	平成30年3月6日 (2018.3.6)	(74) 代理人	100106297 弁理士 伊藤 克博
		(74) 代理人	100130845 弁理士 渡邊 伸一
		(72) 発明者	谷村 幸宏 愛知県名古屋市瑞穂区岳見町1-31-2-201
		(72) 発明者	廣明 洋子 愛知県名古屋市昭和区神村町1-57-6
		(72) 発明者	藤吉 好則 京都府宇治市宇治塔川115番地の31 最終頁に続く

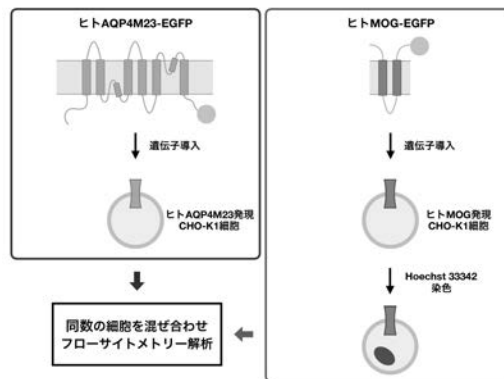
(54) 【発明の名称】 Cell-based assay法に基づいたハイスループット抗体検出方法

(57) 【要約】

【課題】多発性硬化症、視神経脊髄炎スペクトラム疾患、および抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患を含む、疾患の診断に有用な情報を提供する抗体のハイスループットな検出方法を提供すること。

【解決手段】CBA法において複数の蛍光標識とフローサイトメトリーを用いることで、抗AQP4抗体と抗MOG抗体などの複数の抗体を同時に検出することができる。CBA法に基づいたフローサイトメトリーを用いることで簡便、効率的、高感度に、かつ低コストで、試料中に含まれる抗体をハイスループットに検出する。また、生細胞を使用し正確な抗原タンパク質三次元立体構造を維持することにより検出感度が大幅に向上した。さらに、一度の測定において複数種類の抗体を同時に検出することができ、一度の測定において定量性のある膨大なデータを取得することができる。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

被検者に由来する試料中における $2mn$ 種の抗体を同時に検出または測定する方法であつて、

m は 1 以上の整数であり、

n は 1 以上の整数であり、

第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

該第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程

、
該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに
該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程
を含む、方法。

10

【請求項 2】

第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又は IRES 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の mRNA から翻訳される、請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

第 1 から第 mn の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は IRES 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の mRNA から翻訳され、第 $mn+1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質がそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は IRES 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の mRNA から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、請求項 1 または 2 記載の方法。

20

【請求項 4】

第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 1 細胞グループとし、同様に、第 $n+1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第 2 細胞グループ、第 $(m-1)n+1$ から第 mn の抗原タンパク質を発現する細胞を第 m 細胞グループ、第 $(2m-1)n+1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第 $2m$ 細胞グループとし、第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞が n 種類ずつ $2m$ のグループに分けられており、

第 1 細胞グループから第 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 $m+1$ 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能である、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 5】

第 1 細胞グループから第 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 $m+1$ 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能である、請求項 4 記載の方法。

40

【請求項 6】

第 1 細胞グループに属する第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第 2 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループのそれぞれに属する n 種類の細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能である、請求項 4 または 5 記載の方法。

【請求項 7】

50

前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 8】

前記第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される 2 ~ 2 m n - 1 種の細胞のみを使用することを特徴とする、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 9】

前記 m 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、請求項 4 ~ 8 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 10】

前記 n 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、請求項 6 ~ 9 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 11】

第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質であり、第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質のうち少なくとも一つが A Q P 4、M O G、N M D A 受容体、L G I 1、C A S P R 2、A M P A 受容体、グリシン受容体、G A B A_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、L D L 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および k v 1 . 4 から成る群より選択される、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 12】

被検者に由来する試料中における複数の抗体を同時に検出または測定する方法であって

20

、
第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞であって、m は 1 以上の整数であり、n は 1 以上の整数であり、第 1 から第 m n の抗原タンパク質はそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 m n + 1 から第 2 m n の抗原タンパク質はそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、

第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 1 細胞グループとし、同様に、第 n + 1 から第 2 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 2 細胞グループ、第 (m - 1) n + 1 から第 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 m 細胞グループ、第 (2 m - 1) n + 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 2 m 細胞グループとし、第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞が n 種類ずつ 2 m のグループに分けられており、

30

第 1 細胞グループから第 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されているか又は第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 m + 1 細胞グループから第 2 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されているか又は第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、

40

第 1 細胞グループに属する第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第 2 細胞グループから第 2 m 細胞グループのそれぞれに属する n 種類の細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能である細胞のうち、2 以上を調製する工程、

該 2 以上の細胞を含む 2 以上の細胞懸濁液を調製する工程、

該 2 以上の細胞懸濁液の各々に対して被検者に由来する 1 種類の試料が加えられるように、該 2 以上の細胞懸濁液に 2 以上の試料を加える工程、

50

該 2 以上の細胞懸濁液を 1 つの容器中で混合し、蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに

該混合した細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む、方法。

【請求項 13】

第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質である、請求項 12 記載の方法。

【請求項 14】

第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質が同一のタンパク質を含む、請求項 12 記載の方法。

【請求項 15】

第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質のうち少なくとも一つが、AQP4、MOG、NMDA 受容体、LGI1、CASPR2、AMPA 受容体、グリシン受容体、GABA_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および kv1.4 から成る群より選択される、請求項 12 ~ 14 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 16】

前記第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される 2 ~ 2 m n - 1 種の細胞のみを使用することを特徴とする、請求項 12 ~ 15 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 17】

前記 m 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、請求項 12 ~ 16 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 18】

前記 n 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、請求項 12 ~ 17 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 19】

1 以上の被検者に由来する 2 m n 個の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法であって、

m は 1 以上の整数であり、

n は 1 以上の整数であり、

第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞をそれぞれ別個の容器中に調製する工程、

1 以上の被検者に由来する第 1 から第 2 m n の試料を、第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞にそれぞれ加えてインキュベートする工程、

被検者に由来する試料を加えた第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を 1 つの容器中で混合して細胞懸濁液を得る工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む、方法。

【請求項 20】

第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又は IRES 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の mRNA から翻訳される、請求項 19 記載の方法。

【請求項 21】

第 1 から第 m n の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は IRES 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の mRNA から翻訳され、第 m n + 1 から第 2 m n の抗原タンパク質がそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は IRES 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の mRNA から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、請求項 19 または 20 記載の方法。

【請求項 22】

10

20

30

40

50

第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 1 細胞グループとし、同様に、第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第 2 細胞グループ、第 $(m - 1)n + 1$ から第 mn の抗原タンパク質を発現する細胞を第 m 細胞グループ、第 $(2m - 1)n + 1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第 $2m$ 細胞グループとし、第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞が n 種類ずつ $2m$ のグループに分けられており、

第 1 細胞グループから第 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 $m + 1$ 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能である、請求項 19 ~ 21 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 23】

第 1 細胞グループから第 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 $m + 1$ 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能である、請求項 22 記載の方法。

【請求項 24】

第 1 細胞グループに属する第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第 2 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループのそれぞれに属する n 種類の細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能である、請求項 22 または 23 記載の方法。

20

【請求項 25】

前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、請求項 19 ~ 24 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 26】

第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質が同じタンパク質である、請求項 19 ~ 25 のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項 27】

第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質が異なるタンパク質を含む、請求項 19 ~ 25 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 28】

前記第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される $2 \sim 2mn - 1$ 種の細胞のみを使用し、 $2 \sim 2mn - 1$ 種類の試料中における抗体を同時に検出または測定することを特徴とする、請求項 19 ~ 27 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 29】

前記 m 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、請求項 22 ~ 28 のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項 30】

前記 n 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、請求項 24 ~ 29 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 31】

第 1 から第 $2mn$ の抗原タンパク質のうち少なくとも一つが、AQP4、MOG、NMDA 受容体、LGI1、CASPR2、AMPA 受容体、グリシン受容体、GABA_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および kv1.4

50

から成る群より選択される、請求項 19 ~ 30 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 32】

第 1 から第 2 m n の試料が全て異なる試料である、請求項 19 ~ 31 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 33】

第 1 から第 2 m n の試料が同一の試料を含む、請求項 19 ~ 31 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 34】

被検者に由来する試料が血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から成る群より選択される、請求項 1 ~ 33 のいずれか一項記載の方法。

10

【請求項 35】

前記蛍光タンパク質が、Sirius、EBFP、ECFP、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana、KusabiraOrange、mOrange、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed、mRaspberry、mPlum、PS-CFP、Dendra2、Kaede、EosFP、およびKikumeGRから成る群より選択される、請求項 2 ~ 18、20 ~ 34 のいずれか一項記載の方法。

【請求項 36】

前記蛍光色素もしくは蛍光タンパク質がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、Dye Cycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択される、請求項 4 ~ 18、22 ~ 35 のいずれか一項記載の方法。

20

30

40

50

【請求項 37】

前記二次抗体がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択されるいずれかで標識されている、請求項7～18、25～36のいずれか一項記載の方法。

10

20

30

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、試料中に含まれる抗体をcell-based assay法に基づきハイスループットに検出する方法に関する。より詳細には、自己免疫疾患に関連する自己抗体、例えば視神経脊髄炎スペクトラム疾患(NMOSD)および抗MOG抗体関連疾患/MOG抗体疾患に関連する自己抗体を含む、複数の抗体を同時に、または個々の抗体を複数の試料について同時に検出する方法に関し、特に、アクアポリン-4(AQP4)およびミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質(MOG)に対する抗体を検出する方法に関する。また、本発明は、これらの抗体の検出に基づく、疾患の診断方法にも関する。

40

【背景技術】

【0002】

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は、オリゴデンドロサイトによって髄鞘が形成される脳・脊髄・視神経などの中枢神経系に生じる慢性炎症性脱髄疾患であり、時間的・空間的に病変が多発することを特徴とする。ここで、脱髄とは髄鞘が後天的に破壊される形態変化を指す。通常、詳細な病歴聴取や経時的な神経学的診察により時間的・空間

50

的な病変の多発性が証明され、他の疾患を十分に除外することで診断が確定される。

【0003】

一方、主として視神経と脊髄に由来する症候を呈する患者の中には、視神経脊髄炎スペクトラム疾患 (neuromyelitis optica spectrum disorders: NMOSD) の病態を有する患者が含まれている。典型的な視神経脊髄炎 (NMO) は、重度の視神経炎と横断性脊髄炎を特徴とする炎症性中枢神経疾患である。2004年にNMOに特異なIgG (NMO-IgG) が発見され、さらにアストロサイトの足突起に高密度に発現する水チャネルタンパク質であるアクアポリン-4 (aquaporin-4: AQP4) がその標的抗原であることが報告された (特許文献1、非特許文献1)。典型的なNMOに加えて、視神経炎 (再発性あるいは両眼性) や3椎体以上の長い脊髄炎のみの症例も、視神経脊髄炎関連疾患 (NMOSD) として同じ範疇の疾患として捉えられている。抗AQP4抗体はNMO/NMOSDにおける血液中バイオマーカーとして確立しており、特異的診断価値が認められている。このため、抗AQP4抗体検査は、NMO/NMOSDの診断と治療方針の決定にとって極めて重要な検査となる。

10

【0004】

抗MOG抗体関連疾患/MOG抗体疾患は、近年新しい疾患概念として認識されつつある中枢神経系の炎症性脱髄疾患である。MOG (ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質; myelin oligodendrocyte glycoprotein) はミエリン鞘を構成する成分の一つであり、抗MOG抗体はこのMOGを認識する自己抗体である。抗MOG抗体が認められる患者の中には、抗AQP4抗体陰性NMO/NMOSDや再発性視神経炎、急性散在性脳脊髄炎の病態を有する患者が含まれている。本願では、抗MOG抗体陽性の脱髄疾患を広く捉えて抗MOG抗体関連疾患/MOG抗体疾患と記載する。抗MOG抗体関連疾患/MOG抗体疾患は、MSならびに抗AQP4抗体陽性NMO/NMOSDと異なる疾患群であることが報告されている (非特許文献2)。

20

【0005】

これらの状況をふまえ、脱髄性疾患患者に対する多発性硬化症の診断においては、視神経脊髄炎関連疾患などを鑑別する必要があるため、抗体検査を実施することが推奨されている。

【先行技術文献】

【特許文献】

30

【0006】

【特許文献1】国際公開パンフレットWO2005/051178

【非特許文献】

【0007】

【非特許文献1】Lennon et al., JEM, Vol.202, No.4, August 15, 2005, 473-477.

【非特許文献2】Kaneko et al., J Neurol Neurosurg Psychiatry, Vol.87, No.11, November, 2016, 1257-1259

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0008】

40

本発明は、多発性硬化症、視神経脊髄炎スペクトラム疾患、および抗MOG抗体関連疾患/MOG抗体疾患を含む、疾患の診断に有用な情報を提供する抗体のハイスループットな検出方法を提供することを目的の一つとする。また、本発明の目的には、抗体の検出をより簡便かつ高感度に行う手法を提供することも含まれる。

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、Cell-based assay法 (CBA法) に基づいたフローサイトメトリーを用いることで簡便、効率的、高感度に、かつ低コストで、試料中に含まれる抗体をハイスループットに検出することを可能とする手法を開発した。本発明により、検体処理の簡便化を実現すると共に、検体処理からデータ取得までにかかる時間を大幅に削減することに成

50

功した。また、生細胞を使用し精確な抗原タンパク質三次元立体構造を維持することによる検出感度の大幅な向上に成功した。また、一度の測定において複数種類の抗体を同時に検出することに成功し、一度の測定において定量性のある膨大なデータを取得することに成功した。本発明者らが開発した手法により、例えば抗 A Q P 4 抗体、抗 M O G 抗体、抗 N M D A 抗体、抗 L G I 1 抗体、抗 C A S P R 2 抗体、抗 A M P A 受容体抗体、抗グリシン受容体抗体、抗 G A B A_B 受容体抗体、抗ニコチン性アセチルコリン受容体抗体、抗筋特異的受容体型チロシンキナーゼ抗体、抗 L D L 受容体関連タンパク質 4 抗体、抗リアノジン受容体抗体、抗ジヒドロピリジン受容体抗体および抗 k v 1 . 4 抗体などの複数の抗体を単一の試料から同時に高感度に検出することができる。また、本発明者らが開発した手法により、複数の試料に含まれる抗体の検出を同時に行うことが可能となる。本発明の手法の態様には、以下が包含される：

10

【 0 0 1 0 】

A : 1 2 種類 の 抗体 の 同時 検出 方法

[態様 A 1] 被検者に由来する試料中における第 1 から第 1 2 の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

第 1 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 3 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 4 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 5 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 6 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 7 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 8 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 9 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 1 0 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 1 1 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

該第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、

該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程

20

30

を含む、方法。

[態様 A 2] 第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又はパイシストロニック (I R E S) 発現ベクター (I R E S : Internal Ribosome Entry Site) を用いて蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳される、態様 A 1 記載の方法。

[態様 A 3] 第 1 から第 6 の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 7 から第 1 2 の抗原タンパク質がそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、態様 A 1 または A 2 記載の方法。

40

[態様 A 4] 第 4 から第 6 の抗原タンパク質を発現する細胞および第 1 0 から第 1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質で標識されている、態様 A 1 ~ A 3 のいずれか記載の方法。

[態様 A 5] 第 4 から第 6 の抗原タンパク質を発現する細胞および第 1 0 から第 1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されている、態様 A 1 ~ A 4 のいずれか記載の方法。

[態様 A 6] 第 2、第 5、第 8 および第 1 1 の抗原タンパク質を発現する細胞が第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第 3、第 6、第 9 および第 1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質で

50

強く標識されており、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とが区別可能である、態様 A 1 ~ A 5 のいずれか記載の方法。

[態様 A 7] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様 A 1 ~ A 6 のいずれか記載の方法。

[態様 A 8] 被検者に由来する試料が血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から成る群より選択される、態様 A 1 ~ A 7 のいずれか記載の方法。

[態様 A 9] 第 1 から第 12 の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質であり、それぞれ A Q P 4、M O G、N M D A 受容体、L G I 1、C A S P R 2、A M P A 受容体、グリシン受容体、G A B A_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、L D L 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および k v 1 . 4 から成る群より選択される、態様 A 1 ~ A 8 のいずれか記載の方法。

[態様 A 10] 前記蛍光タンパク質が、Sirius、EBFP、ECFP、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana、KusabiraOrange、mOrange、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed、mRaspberry、mPlum、PS-CFP、Dendra2、Kaede、EosFP、およびKikumeGRから成る群より選択される、態様 A 2 ~ A 9 のいずれか記載の方法。

[態様 A 11] 前記蛍光色素もしくは蛍光タンパク質がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択

10

20

30

40

50

される、態様 A 4 ~ A 10 のいずれか記載の方法。

[態様 A 1 2] 前記二次抗体がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DR 10
AQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 332 20
58、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO 30
-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択されるいずれかで標識されている、態様 A 7 ~ A 11 のいずれか記載の方法。

[態様 A 1 3] 前記第 1 から第 12 の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される 2 ~ 11 種の細胞のみを使用することを特徴とする、態様 A 1 ~ A 12 のいずれか記載の方法。

[態様 A 1 4] 被検者に由来する試料中における複数の抗体を同時に検出または測定する方法であって、第 1 から第 12 の抗原タンパク質を発現する細胞であって、第 1 から第 12 の抗原タンパク質のそれぞれは蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第 1 から第 6 の抗原タンパク質はそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第 7 から第 12 の抗原タンパク質はそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、第 4 から第 6 の抗原タンパク質を発現する細胞および第 10 から第 12 の抗原タンパク質を発現する細胞は、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質で標識されているか又は第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されており、そして、第 2、第 5、第 8 および第 11 の抗原タンパク質を発現する細胞は第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第 3、第 6、第 9 および第 12 の抗原タンパク質を発現する細胞は第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質で強く標識されており、弱く標識された細胞と 40
50

強く標識された細胞とが区別可能である細胞のうち、2以上を調製する工程、該2以上の細胞を含む2以上の細胞懸濁液を調製する工程、該2以上の細胞懸濁液の各々に対して被検者に由来する1種類の試料が加えられるように、該2以上の細胞懸濁液に2以上の試料を加える工程、該2以上の細胞懸濁液を1つの容器中で混合し、蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに該混合した細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む、方法。

[態様 A 1 5] 第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質である、態様 A 1 4 記載の方法。

[態様 A 1 6] 第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質が同一のタンパク質を含む、態様 A 1 4 記載の方法。

[態様 A 1 7] 第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質が、A Q P 4、M O G、N M D A 受容体、L G I 1、C A S P R 2、A M P A 受容体、グリシン受容体、G A B A_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、L D L 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および k v 1 . 4 から成る群より選択される、態様 A 1 4 ~ A 1 6 のいずれか記載の方法。

[態様 A 1 8] 前記第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される 2 ~ 1 1 種の細胞のみを使用することを特徴とする、態様 A 1 4 ~ A 1 7 のいずれか記載の方法。

【 0 0 1 1 】

B : 4 種類の抗体の同時検出方法

[態様 B 1] 被検者に由来する試料中における第 1 の抗体、第 2 の抗体、第 3 の抗体、および第 4 の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

第 1 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 3 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 4 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

該第 1 から第 4 の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、

該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程

を含む、方法。

[態様 B 2] 第 1 から第 4 の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又は第 1 から第 4 の抗原タンパク質のそれぞれが I R E S 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳される、態様 B 1 記載の方法。

[態様 B 3] 第 1 および第 2 の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は第 1 および第 2 の抗原タンパク質がそれぞれ I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 3 および第 4 の抗原タンパク質がそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は第 3 および第 4 の抗原タンパク質がそれぞれ I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、態様 B 1 または B 2 記載の方法。

[態様 B 4] 第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞および第 4 の抗原タンパク質を発現する細胞が第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質で標識されている、態様 B 1 ~ B 3 のいずれか記載の方法。

[態様 B 5] 第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞および第 4 の抗原タンパク質を発現する細胞が第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されている、態様 B 1 ~ B 4 のいずれか記載の方法。

[態様 B 6] 第 1 から第 4 の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は第 1 から第 4 の抗原タンパク質がそれぞれ I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が第 1 の蛍光色素もしくは第 2 の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第 3 の抗原タン

10

20

30

40

50

パク質を発現する細胞が第1の蛍光色素もしくは第2の蛍光タンパク質で強く標識されており、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とが区別可能であり、第4の抗原タンパク質を発現する細胞が第2の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されている、態様B1またはB2記載の方法。

[態様B7] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様B1～B6のいずれか記載の方法。

[態様B8] 被検者に由来する試料が血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から成る群より選択される、態様B1～B7のいずれか記載の方法。

[態様B9] 第1から第4の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質であり、それぞれAQP4、MOG、NMDA受容体、LGI1、CASPR2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABA_B受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、およびkv1.4から成る群より選択される、態様B1～B8のいずれか記載の方法。

[態様B10] 前記蛍光タンパク質が、Sirius、EBFP、ECFP、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana、KusabiraOrange、mOrange、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed、mRaspberry、mPlum、PS-CFP、Dendra2、Kaede、EosFP、およびKikumeGRから成る群より選択される、態様B2～B9のいずれか記載の方法。

[態様B11] 前記蛍光色素もしくは蛍光タンパク質がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、

10

20

30

40

50

TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択される、態様 B 4 ~ B 10 のいずれか記載の方法。

[態様 B 1 2] 前記二次抗体がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、Midoriishi Cyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択されるいずれかで標識されている、態様 B 7 ~ B 11 のいずれか記載の方法。

[態様 B 1 3] 前記第 1 から第 4 の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される 2 ~ 3 種の細胞のみを使用することを特徴とする、態様 B 1 ~ B 1 2 のいずれか記載の方法。

【 0 0 1 2 】

C : 2 種類の抗体の同時検出方法

[態様 C 1] 被検者に由来する試料中における第 1 の抗体および第 2 の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

第 1 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

該第 1 および第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、

該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程

を含む、方法。

[態様 C 2] 第 1 および第 2 の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又は第 1 および第 2 の抗原タンパク質のそれぞれが I R E S 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳される、態様 C 1 記載の方法。

[態様 C 3] 第 1 の抗原タンパク質が第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は第 1 の

10

20

30

40

50

抗原タンパク質が I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 2 の抗原タンパク質が第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は第 2 の抗原タンパク質が I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とが同一の蛍光タンパク質である、態様 C 1 または C 2 記載の方法。

[態様 C 4] 第 1 の抗原タンパク質が第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は第 1 の抗原タンパク質が I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 2 の抗原タンパク質が第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は第 2 の抗原タンパク質が I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、態様 C 1 または C 2 記載の方法。

[態様 C 5] 第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質で標識されている、態様 C 1 ~ C 4 のいずれか記載の方法。

[態様 C 6] 第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体で標識されている、態様 C 1 ~ C 5 のいずれか記載の方法。

[態様 C 7] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様 C 1 ~ C 6 のいずれか記載の方法。

[態様 C 8] 被検者に由来する試料が血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から成る群より選択される、態様 C 1 ~ C 7 のいずれか記載の方法。

[態様 C 9] 第 1 および第 2 の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質であり、それぞれ A Q P 4、M O G、N M D A 受容体、L G I 1、C A S P R 2、A M P A 受容体、グリシン受容体、G A B A_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、L D L 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および k v 1 . 4 から成る群より選択される、態様 C 1 ~ C 8 のいずれか記載の方法。

[態様 C 1 0] 前記蛍光タンパク質が、Sirius、EBFP、ECFP、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana、KusabiraOrange、mOrange、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed、mRaspberry、mPlum、PS-CFP、Dendra2、Kaede、EosFP、およびKikumeGRから成る群より選択される、態様 C 2 ~ C 9 のいずれか記載の方法。

[態様 C 1 1] 前記蛍光色素もしくは蛍光タンパク質がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP 2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、

10

20

30

40

50

KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択される、態様 C 5 ~ C 10 のいずれか記載の方法。

10

[態様 C 12] 前記二次抗体がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択されるいずれかで標識されている、態様 C 7 ~ C 11 のいずれか記載の方法。

20

30

40

【 0 0 1 3 】

D : 抗 A Q P 4 抗体および抗 M O G 抗体の同時検出方法

[態様 D 1] 被検者に由来する試料中における抗 A Q P 4 抗体および抗 M O G 抗体を同時に検出または測定する方法であって、

A Q P 4 タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

50

M O G タンパク質を発現する細胞を調製する工程、
 該 A Q P 4 タンパク質を発現する細胞と該 M O G タンパク質を発現する細胞とを含む細胞懸濁液を調製する工程、
 該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに
 該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程
 を含む、方法。

[態様 D 2] A Q P 4 タンパク質が蛍光タンパク質と融合している、態様 D 1 記載の方法。

[態様 D 3] M O G タンパク質が蛍光タンパク質と融合している、態様 D 1 または D 2 記載の方法。

[態様 D 4] A Q P 4 タンパク質が融合している蛍光タンパク質と M O G タンパク質が融合している蛍光タンパク質とが同一である、態様 D 3 記載の方法。

[態様 D 5] A Q P 4 タンパク質を発現する細胞および M O G タンパク質を発現する細胞のいずれか一方または両方が蛍光色素もしくは蛍光タンパク質で標識されている、態様 D 4 記載の方法。

[態様 D 6] A Q P 4 タンパク質を発現する細胞および M O G タンパク質を発現する細胞のいずれか一方または両方が蛍光色素もしくは蛍光タンパク質の接合した抗体で標識されている、態様 D 4 または D 5 記載の方法。

[態様 D 7] A Q P 4 タンパク質が融合している蛍光タンパク質と M O G タンパク質が融合している蛍光タンパク質とが異なるものである、態様 D 3 記載の方法。

[態様 D 8] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様 D 1 ~ D 7 のいずれか記載の方法。

[態様 D 9] 被検者に由来する試料が血清、血漿、全血、および脳脊髄液から成る群より選択される、態様 D 1 ~ D 8 のいずれか記載の方法。

[態様 D 1 0] A Q P 4 タンパク質が融合している蛍光タンパク質が E G F P である、態様 D 2 ~ D 9 のいずれか記載の方法。

[態様 D 1 1] M O G タンパク質が融合している蛍光タンパク質が E G F P である、態様 D 3 ~ D 9 のいずれか記載の方法。

[態様 D 1 2] A Q P 4 タンパク質を発現する細胞および M O G タンパク質を発現する細胞のいずれか一方が Hoechst 33342 で標識されている、態様 D 5 ~ D 1 1 のいずれか記載の方法。

[態様 D 1 3] 前記二次抗体が Alexa Fluor 647 で標識されている、態様 D 8 ~ D 1 2 のいずれか記載の方法。

【 0 0 1 4 】

E : 4 n 種類の抗体の同時検出方法

[態様 E 1] 被検者に由来する試料中における 4 n 種の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

n は 1 以上の整数であり、

第 1 から第 4 n の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、
 該第 1 から第 4 n の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、
 該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに
 該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程
 を含み、

第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能であり、

同様に、第 n + 1 から第 2 n の抗原タンパク質を発現する細胞、第 2 n + 1 から第 3 n の抗原タンパク質を発現する細胞、第 3 n + 1 から第 4 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識

10

20

30

40

50

されており、各段階の強度で標識された第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $2n + 1$ から第 $3n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能である、方法。

[態様 E 2] 第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳される、態様 E 1 記載の方法。

[態様 E 3] 第 1 から第 $2n$ の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 $2n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質がそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、態様 E 1 または E 2 記載の方法。

[態様 E 4] 第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞および第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質で標識されている、態様 E 1 ~ E 3 のいずれか記載の方法。

[態様 E 5] 第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞および第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されている、態様 E 1 ~ E 4 のいずれか記載の方法。

[態様 E 6] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様 E 1 ~ E 5 のいずれか記載の方法。

[態様 E 7] 前記第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される $2 \sim 4n - 1$ 種の細胞のみを使用することを特徴とする、態様 E 1 ~ E 6 のいずれか記載の方法。

[態様 E 8] 前記 n 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様 E 1 ~ E 7 のいずれか記載の方法。

[態様 E 9] 被検者に由来する試料中における複数の抗体を同時に検出または測定する方法であって、第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞であって、 n は 1 以上の整数であり、第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質のそれぞれは蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 から第 $2n$ の抗原タンパク質はそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 $2n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質はそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞および第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞は、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質で標識されているか又は第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されており、そして、第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞は第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $2n + 1$ から第 $3n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $2n + 1$ から第 $3n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能である細胞のうち、2 以上を調製する工程、該 2 以上の細胞を含む 2 以上の細胞懸濁液を調製する工程、該 2 以上の細胞懸濁液の各々に対して被検者に由来する 1 種類の試料が加えられるように、該 2 以上の細胞懸濁液に 2 以

10

20

30

40

50

上の試料を加える工程、該2以上の細胞懸濁液を1つの容器中で混合し、蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに該混合した細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む、方法。

[態様 E 1 0] 第1から第4 n の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質である、態様 E 9 記載の方法。

[態様 E 1 1] 第1から第4 n の抗原タンパク質が同一のタンパク質を含む、態様 E 9 記載の方法。

[態様 E 1 2] 前記第1から第4 n の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される2 ~ 4 n - 1 種の細胞のみを使用することを特徴とする、態様 E 9 ~ E 1 1 のいずれか記載の方法。

[態様 E 1 3] 前記 n 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様 E 9 ~ E 1 2 のいずれか記載の方法。

【 0 0 1 5 】

F : 1 2 種類の試料中の抗体の同時検出方法

[態様 F 1] 1 以上の被検者に由来する1 2 種類の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法であって、

第1から第1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞をそれぞれ別個の容器中に調製する工程、

1 以上の被検者に由来する第1から第1 2 の試料を、第1から第1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞にそれぞれ加えてインキュベートする工程、

被検者に由来する試料を加えた第1から第1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞を1つの容器中で混合して細胞懸濁液を得る工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む、方法。

[態様 F 2] 第1から第1 2 の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳される、態様 F 1 記載の方法。

[態様 F 3] 第1から第6の抗原タンパク質がそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第7から第1 2 の抗原タンパク質がそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、態様 F 1 または F 2 記載の方法。

[態様 F 4] 第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第1 0 から第1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されている、態様 F 1 ~ F 3 のいずれか記載の方法。

[態様 F 5] 第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第1 0 から第1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されている、態様 F 1 ~ F 4 のいずれか記載の方法。

[態様 F 6] 第2、第5、第8および第1 1 の抗原タンパク質を発現する細胞が第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第3、第6、第9および第1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞が第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で強く標識されており、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とが区別可能である、態様 F 1 ~ F 5 のいずれか記載の方法。

[態様 F 7] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様 F 1 ~ F 6 のいずれか記載の方法。

[態様 F 8] 被検者に由来する試料が血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から成る群より選択される、態様 F 1 ~ F 7 のいずれか記載の方法。

[態様 F 9] 第1から第1 2 の抗原タンパク質が同じタンパク質である、態様 F 1 ~ F 8

10

20

30

40

50

のいずれか記載の方法。

[態様 F 1 0] 第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質が異なるタンパク質を含む、態様 F 1 ~ F 8 のいずれか記載の方法。

[態様 F 1 1] 前記蛍光タンパク質が、Sirius、EBFP、ECFP、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana、KusabiraOrange、mOrange、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed、mRaspberry、mPlum、PS-CFP、Dendra2、Kaede、EosFP、およびKikumeGRから成る群より選択される、態様 F 2 ~ F 1 0 のいずれか記載の方法。

10

[態様 F 1 2] 前記蛍光色素もしくは蛍光タンパク質がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択される、態様 F 4 ~ F 1 1 のいずれか記載の方法。

20

30

40

[態様 F 1 3] 前記二次抗体がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DR

50

AQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、Midoriishi Cyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択されるいずれかで標識されている、態様 F 7 ~ F 1 2 のいずれか記載の方法。

10

20

30

40

50

[態様 F 1 4] 前記第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される 2 ~ 1 1 種の細胞のみを使用し、2 ~ 1 1 種類の試料中における抗体を同時に検出または測定することを特徴とする、態様 F 1 ~ F 1 3 のいずれか記載の方法。

[態様 F 1 5] 第 1 から第 1 2 の抗原タンパク質が、AQP4、MOG、NMDA 受容体、LGI1、CASPR2、AMPA 受容体、グリシン受容体、GABA_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および kv1.4 から成る群より選択される、態様 F 1 ~ F 1 4 のいずれか記載の方法。

[態様 F 1 6] 第 1 から第 1 2 の試料が全て異なる試料である、態様 F 1 ~ F 1 5 のいずれか記載の方法。

[態様 F 1 7] 第 1 から第 1 2 の試料が同一の試料を含む、態様 F 1 ~ F 1 5 のいずれか記載の方法。

【 0 0 1 6 】

G : 4 n 種類の試料中の抗体の同時検出方法

[態様 G 1] 1 以上の被検者に由来する 4 n 個の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法であって、

n は 1 以上の整数であり、

第 1 から第 4 n の抗原タンパク質を発現する細胞をそれぞれ別個の容器中に調製する工程、

1 以上の被検者に由来する第 1 から第 4 n の試料を、第 1 から第 4 n の抗原タンパク質を発現する細胞にそれぞれ加えてインキュベートする工程、

被検者に由来する試料を加えた第 1 から第 4 n の抗原タンパク質を発現する細胞を 1 つの容器中で混合して細胞懸濁液を得る工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含み、

第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能であり、

同様に、第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $2n + 1$ から第 $3n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $2n + 1$ から第 $3n$ の抗原タンパク質を発現する細胞、第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能である、
方法。

[態様 G 2] 第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳される、態様 G 1 記載の方法。

[態様 G 3] 第 1 から第 $2n$ の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 $2n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質がそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、態様 G 1 または G 2 記載の方法。

[態様 G 4] 第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞および第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質で標識されている、態様 G 1 ~ G 3 のいずれか記載の方法。

[態様 G 5] 第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞および第 $3n + 1$ から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されている、態様 G 1 ~ G 4 のいずれか記載の方法。

[態様 G 6] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様 G 1 ~ G 5 のいずれか記載の方法。

[態様 G 7] 第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質が同じタンパク質である、態様 G 1 ~ G 6 のいずれか記載の方法。

[態様 G 8] 第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質が異なるタンパク質を含む、態様 G 1 ~ G 6 のいずれか記載の方法。

[態様 G 9] 前記第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される $2 \sim 4n - 1$ 種の細胞のみを使用し、 $2 \sim 4n - 1$ 種類の試料中における抗体を同時に検出または測定することを特徴とする、態様 G 1 ~ G 8 のいずれか記載の方法。

[態様 G 10] 前記 n 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様 G 1 ~ G 9 のいずれか記載の方法。

[態様 G 11] 第 1 から第 $4n$ の抗原タンパク質のうち少なくとも一つが、A Q P 4、M O G、N M D A 受容体、L G I 1、C A S P R 2、A M P A 受容体、グリシン受容体、G A B A_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、L D L 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および $k v 1 . 4$ から成る群より選択される、態様 G 1 ~ G 10 のいずれか記載の方法。

[態様 G 12] 第 1 から第 $4n$ の試料が全て異なる試料である、態様 G 1 ~ G 11 のいずれか記載の方法。

[態様 G 13] 第 1 から第 $4n$ の試料が同一の試料を含む、態様 G 1 ~ G 11 のいずれか記載の方法。

【 0 0 1 7 】

H : 2 m n 種類の抗体の同時検出方法

[態様 H 1] 被検者に由来する試料中における $2 m n$ 種の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

m は 1 以上の整数であり、

n は 1 以上の整数であり、

第 1 から第 $2 m n$ の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

10

20

30

40

50

該第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程

、
該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに
該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程
を含む、方法。

[態様 H 2] 第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳される、態様 H 1 記載の方法。

[態様 H 3] 第 1 から第 m n の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 m n + 1 から第 2 m n の抗原タンパク質がそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、態様 H 1 または H 2 記載の方法。

[態様 H 4] 第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 1 細胞グループとし、同様に、第 n + 1 から第 2 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 2 細胞グループ、第 (m - 1) n + 1 から第 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 m 細胞グループ、第 (2 m - 1) n + 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 2 m 細胞グループとし、第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞が n 種類ずつ 2 m のグループに分けられており、

第 1 細胞グループから第 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 m + 1 細胞グループから第 2 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能である、態様 H 1 ~ H 3 のいずれか記載の方法。

[態様 H 5] 第 1 細胞グループから第 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 m + 1 細胞グループから第 2 m 細胞グループが、第 1 の蛍光色素もしくは第 3 の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能である、態様 H 4 記載の方法。

[態様 H 6] 第 1 細胞グループに属する第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第 2 細胞グループから第 2 m 細胞グループのそれぞれに属する n 種類の細胞が、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能である、態様 H 4 または H 5 記載の方法。

[態様 H 7] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様 H 1 ~ H 6 のいずれか記載の方法。

[態様 H 8] 前記第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される 2 ~ 2 m n - 1 種の細胞のみを使用することを特徴とする、態様 H 1 ~ H 7 のいずれか記載の方法。

[態様 H 9] 前記 m 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様 H 4 ~ H 8 のいずれか記載の方法。

[態様 H 1 0] 前記 n 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様 H 6 ~ H 9 のいずれか記載の方法。

[態様 H 1 1] 被検者に由来する試料が血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から成る群より選択される、態様 H 1 ~ H 1 0 のいずれか記載の方法。

10

20

30

40

50

[態様 H 1 2] 第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質であり、第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質のうち少なくとも一つが A Q P 4、M O G、N M D A 受容体、L G I 1、C A S P R 2、A M P A 受容体、グリシン受容体、G A B A_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、L D L 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および k v 1 . 4 から成る群より選択される、態様 H 1 ~ H 1 1 のいずれか記載の方法。

[態様 H 1 3] 前記蛍光タンパク質が、Sirius、EBFP、ECFP、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana、KusabiraOrange、mOrange、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed、mRaspberry、mPlum、PS-CFP、Dendra2、Kaede、EosFP、およびKikumeGRから成る群より選択される、態様 H 2 ~ H 1 2 のいずれか記載の方法。

[態様 H 1 4] 前記蛍光色素もしくは蛍光タンパク質がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択される、態様 H 4 ~ H 1 3 のいずれか記載の方法。

[態様 H 1 5] 前記二次抗体がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV

10

20

30

40

50

570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DR AQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、Midoriishi Cyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択されるいずれかで標識されている、態様H7～H14のいずれか記載の方法。

10

20

30

40

50

[態様H16] 被検者に由来する試料中における複数の抗体を同時に検出または測定する方法であって、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞であって、mは1以上の整数であり、nは1以上の整数であり、第1から第mnの抗原タンパク質はそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第mn+1から第2mnの抗原タンパク質はそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞を第1細胞グループとし、同様に、第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞を第2細胞グループ、第(m-1)n+1から第mnの抗原タンパク質を発現する細胞を第m細胞グループ、第(2m-1)n+1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞を第2m細胞グループとし、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞がn種類ずつ2mのグループに分けられており、第1細胞グループから第m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によりm段階の強度でそれぞれ標識されているか又は第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体によりm段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第m+1細胞グループから第2m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によりm段階の強度でそれぞれ標識されているか又は第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体によりm段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、第1細胞グループに属する第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第2細胞グループから第2m細胞グループのそれぞれに属するn種類の細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそ

れぞれ区別可能である細胞のうち、2以上を調製する工程、該2以上の細胞を含む2以上の細胞懸濁液を調製する工程、該2以上の細胞懸濁液の各々に対して被検者に由来する1種類の試料が加えられるように、該2以上の細胞懸濁液に2以上の試料を加える工程、該2以上の細胞懸濁液を1つの容器中で混合し、蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに該混合した細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む、方法。

[態様 H 1 7] 第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質がそれぞれ互いに異なるタンパク質である、態様 H 1 6 記載の方法。

[態様 H 1 8] 第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質が同一のタンパク質を含む、態様 H 1 6 記載の方法。

[態様 H 1 9] 第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質のうち少なくとも一つが、A Q P 4、M O G、N M D A 受容体、L G I 1、C A S P R 2、A M P A 受容体、グリシン受容体、G A B A_B 受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、L D L 受容体関連タンパク質 4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および k v 1 . 4 から成る群より選択される、態様 H 1 6 ~ H 1 8 のいずれか記載の方法。

[態様 H 2 0] 前記第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞より選択される 2 ~ 2 m n - 1 種の細胞のみを使用することを特徴とする、態様 H 1 6 ~ H 1 9 のいずれか記載の方法。

[態様 H 2 1] 前記 m 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様 H 1 6 ~ H 2 0 のいずれか記載の方法。

[態様 H 2 2] 前記 n 段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様 H 1 6 ~ H 2 1 のいずれか記載の方法。

【 0 0 1 8 】

I : 2 m n 種類の試料中の抗体の同時検出方法

[態様 I 1] 1 以上の被検者に由来する 2 m n 個の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法であって、

m は 1 以上の整数であり、

n は 1 以上の整数であり、

第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞をそれぞれ別個の容器中に調製する工程、

1 以上の被検者に由来する第 1 から第 2 m n の試料を、第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞にそれぞれ加えてインキュベートする工程、

被検者に由来する試料を加えた第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を 1 つの容器中で混合して細胞懸濁液を得る工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む、方法。

[態様 I 2] 第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳される、態様 I 1 記載の方法。

[態様 I 3] 第 1 から第 m n の抗原タンパク質がそれぞれ第 1 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 1 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 m n + 1 から第 2 m n の抗原タンパク質がそれぞれ第 2 の蛍光タンパク質と融合しているか又は I R E S 発現ベクターを用いて第 2 の蛍光タンパク質と同一の m R N A から翻訳され、第 1 の蛍光タンパク質と第 2 の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である、態様 I 1 または I 2 記載の方法。

[態様 I 4] 第 1 から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 1 細胞グループとし、同様に、第 n + 1 から第 2 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 2 細胞グループ、第 (m - 1) n + 1 から第 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 m 細胞グループ、第 (2 m - 1) n + 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞を第 2 m 細胞グループとし、第 1 から第 2 m n の抗原タンパク質を発現する細胞が n 種類ずつ 2 m のグループに分けら

10

20

30

40

50

れており、

第1細胞グループから第m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によりm段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第m+1細胞グループから第2m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によりm段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能である、態様I1~I3のいずれか記載の方法。

[態様I5] 第1細胞グループから第m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体によりm段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第m+1細胞グループから第2m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体によりm段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能である、態様I4記載の方法。

[態様I6] 第1細胞グループに属する第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第2細胞グループから第2m細胞グループのそれぞれに属するn種類の細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能である、態様I4またはI5記載の方法。

[態様I7] 前記細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を含む、態様I1~I6のいずれか記載の方法。

[態様I8] 第1から第2mnの抗原タンパク質が同じタンパク質である、態様I1~I7のいずれか記載の方法。

[態様I9] 第1から第2mnの抗原タンパク質が異なるタンパク質を含む、態様I1~I7のいずれか記載の方法。

[態様I10] 前記第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞より選択される2~2mn-1種の細胞のみを使用し、2~2mn-1種類の試料中における抗体を同時に検出または測定することを特徴とする、態様I1~I9のいずれか記載の方法。

[態様I11] 前記m段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様I4~I10のいずれか記載の方法。

[態様I12] 前記n段階の強度で標識された細胞に、非標識の細胞が含まれる、態様I6~I11のいずれか記載の方法。

[態様I13] 被検者に由来する試料が血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から成る群より選択される、態様I1~I12のいずれか記載の方法。

[態様I14] 前記蛍光タンパク質が、Sirius、EBFP、ECFP、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana、KusabiraOrange、mOrange、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed、mRaspberry、mPlum、PS-CFP、Dendra2、Kaede、EosFP、およびKikumeGRから成る群より選択される、態様I2~I13のいずれか記載の方法。

[態様I15] 前記蛍光色素もしくは蛍光タンパク質がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、C

10

20

30

40

50

F647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択される、態様 I 4 ~ I 14 のいずれか記載の方法。

[態様 I 16] 前記二次抗体がAcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho

10

20

30

40

50

、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択されるいずれかで標識されている、態様I 7 ~ I 15のいずれか記載の方法。

〔態様I 17〕第1から第2 m nの抗原タンパク質のうち少なくとも一つが、AQP4、MOG、NMDA受容体、LGI1、CASPR2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABA_B受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、およびkv1.4から成る群より選択される、態様I 1 ~ I 16のいずれか記載の方法。

〔態様I 18〕第1から第2 m nの試料が全て異なる試料である、態様I 1 ~ I 17のいずれか記載の方法。

〔態様I 19〕第1から第2 m nの試料が同一の試料を含む、態様I 1 ~ I 17のいずれか記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】被検者に由来する試料中における抗AQP4抗体および抗MOG抗体の同時検出の際に使用する細胞サンプルの作製手順を例示した図である。

【図2】図1で作製した細胞サンプルを用いて行う、フローサイトメトリー解析の方法を示した図である。

【図3-1】視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。横軸を前方散乱光(Forward Scatter: FSC)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: SSC)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。

【図3-2】視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図3-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。

【図3-3】視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図3-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。

【図3-4】視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図3-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図3-3と図3-4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。

【図3-5】視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図3-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。

【図3-6】視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図3-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図3-7】視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図3-5のP5ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団

10

20

30

40

50

が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在する(本データでは、図3-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうちの30.4%の細胞が存在する)ことから、本血清は抗AQP4抗体陽性であると判断した。

【図3-8】視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図3-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図3-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうち僅かに0.35%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗MOG抗体陰性であると判断した。

10

【図4-1】視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。横軸を前方散乱光(Forward Scatter: FSC)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: SSC)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。

【図4-2】視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図4-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。

20

【図4-3】視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図4-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。

【図4-4】視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図4-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図4-3と図4-4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。

【図4-5】視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図4-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。

30

【図4-6】視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図4-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図4-7】視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図4-5のP5ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在する(本データでは、図4-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうちの28.3%の細胞が存在する)ことから、本血清は抗AQP4抗体陽性であると判断した。

40

【図4-8】視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陽性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図4-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在

50

する（本データでは、図4-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうちの14.0%の細胞が存在する）ことから、本血清は抗MOG抗体陽性であると判断した。

【図5-1】視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。横軸を前方散乱光（Forward Scatter：FSC）、縦軸を側方散乱光（Side Scatter：SSC）としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。

【図5-2】視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。図5-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。

【図5-3】視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。図5-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。

【図5-4】視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。図5-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図5-3と図5-4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。

【図5-5】視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。図5-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。

【図5-6】視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。図5-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図5-7】視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。図5-5のP5ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない（本データでは、図5-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.12%の細胞しか存在しない）ことから、本血清は抗AQP4抗体陰性であると判断した。

【図5-8】視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。図5-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在する（本データでは、図5-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうちの3.50%の細胞が存在する）ことから、本血清は抗MOG抗体弱陽性であると判断した。

【図6-1】多発性硬化症患者（23歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図である。横軸を前方散乱光（Forward Scatter：FSC）、縦軸を側方散乱光（Side Scatter：SSC）としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。

【図6-2】多発性硬化症患者（23歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4

10

20

30

40

50

抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図6 - 1のP 1ゲート内に含まれる死細胞を7 - A A D染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP 2ゲートを作成した図である。

【図6 - 3】多発性硬化症患者(23歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図6 - 2のP 2ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 3ゲートを作成した図である。

【図6 - 4】多発性硬化症患者(23歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図6 - 3のP 3ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 4ゲートを作成した図である。図6 - 3と図6 - 4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。

【図6 - 5】多発性硬化症患者(23歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図6 - 4のP 4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とS S Cで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP 5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP 6ゲートを作成した図である。

【図6 - 6】多発性硬化症患者(23歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図6 - 5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図6 - 7】多発性硬化症患者(23歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図6 - 5のP 5ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗A Q P 4抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ 2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図6 - 5のP 5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.26%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗A Q P 4抗体陰性であると判断した。

【図6 - 8】多発性硬化症患者(23歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図6 - 5のP 6ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗M O G抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ 2領域に細胞集団が存在する(本データでは、図6 - 5のP 6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうちの20.1%の細胞が存在する)ことから、本血清は抗M O G抗体陽性であると判断した。

【図7 - 1】多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。横軸を前方散乱光(Forward Scatter: F S C)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: S S C)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。

【図7 - 2】多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図7 - 1のP 1ゲート内に含まれる死細胞を7 - A A D染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP 2ゲートを作成した図である。

【図7 - 3】多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図7 - 2のP 2ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 3ゲートを作成した図である。

【図7 - 4】多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図7 -

10

20

30

40

50

3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図7-3と図7-4によって、細胞集団に含まれるダブルットを除去した。

【図7-5】多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図7-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。

【図7-6】多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図7-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図7-7】多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図7-5のP5ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図7-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.44%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗AQP4抗体陰性であると判断した。

【図7-8】多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図7-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図7-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうち僅かに0.24%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗MOG抗体陰性であると判断した。

【図8-1】視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。横軸を前方散乱光(Forward Scatter: FSC)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: SSC)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。

【図8-2】視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図8-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。

【図8-3】視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図8-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。

【図8-4】視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図8-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図8-3と図8-4によって、細胞集団に含まれるダブルットを除去した。

【図8-5】視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリー解析の図である。図8-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。

【図8-6】視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体

10

20

30

40

50

陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図8 - 5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図8 - 7】視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図8 - 5のP 5ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗A Q P 4抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ 2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図8 - 5のP 5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.26%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗A Q P 4抗体陰性であると判断した。

10

【図8 - 8】視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図8 - 5のP 6ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗M O G抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ 2領域に細胞集団が存在する(本データでは、図8 - 5のP 6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうちの21.4%の細胞が存在する)ことから、本血清は抗M O G抗体陽性であると判断した。

【図9 - 1】再発性急性散在性脳脊髄炎患者(15歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。横軸を前方散乱光(Forward Scatter: F S C)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: S S C)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。

20

【図9 - 2】再発性急性散在性脳脊髄炎患者(15歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図9 - 1のP 1ゲート内に含まれる死細胞を7 - A A D染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP 2ゲートを作成した図である。

【図9 - 3】再発性急性散在性脳脊髄炎患者(15歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図9 - 2のP 2ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 3ゲートを作成した図である。

30

【図9 - 4】再発性急性散在性脳脊髄炎患者(15歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図9 - 3のP 3ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 4ゲートを作成した図である。図9 - 3と図9 - 4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。

【図9 - 5】再発性急性散在性脳脊髄炎患者(15歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図9 - 4のP 4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とS S Cで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP 5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP 6ゲートを作成した図である。

40

【図9 - 6】再発性急性散在性脳脊髄炎患者(15歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図9 - 5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図9 - 7】再発性急性散在性脳脊髄炎患者(15歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陰性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ－解析の図である。図9 - 5のP 5ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗A Q P 4抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ 2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図9 - 5のP 5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅

50

かに0.40%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗AQP4抗体陰性であると判断した。

【図9-8】再発性急性散在性脳脊髄炎患者(15歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。図9-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在する(本データでは、図9-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうちの6.40%の細胞が存在する)ことから、本血清は抗MOG抗体陽性であると判断した。

【図10-1】健常者(24歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。横軸を前方散乱光(Forward Scatter: FSC)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: SSC)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。5000細胞の測定を行った。

【図10-2】健常者(24歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。図10-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。

【図10-3】健常者(24歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。図10-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。

【図10-4】健常者(24歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。図10-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図10-3と図10-4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。

【図10-5】健常者(24歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。図10-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。

【図10-6】健常者(24歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。図10-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図10-7】健常者(24歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。図10-5のP5ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図10-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.076%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗AQP4抗体陰性であると判断した。

【図10-8】健常者(24歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図である。図10-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図10-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうち僅かに0.061%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗MOG抗体陰性であると判断した。

10

20

30

40

50

【図11-1】第1の抗原タンパク質を発現する細胞、第2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けたフローサイトメトリ解析の図である。本データでは第1の蛍光色素としてHoechst 33342を使用した。同様の手法を用いることで、3種類の細胞、具体的には第3n-2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3n-1の抗原タンパク質を発現する細胞、第3nの抗原タンパク質を発現する細胞(nは2以上の整数)に対して、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けることができる。横軸を前方散乱光(Forward Scatter: FSC)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: SSC)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。

10

【図11-2】第1の抗原タンパク質を発現する細胞、第2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けたフローサイトメトリ解析の図である。本データでは第1の蛍光色素としてHoechst 33342を使用した。同様の手法を用いることで、3種類の細胞、具体的には第3n-2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3n-1の抗原タンパク質を発現する細胞、第3nの抗原タンパク質を発現する細胞(nは2以上の整数)に対して、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けることができる。図11-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。

20

【図11-3】第1の抗原タンパク質を発現する細胞、第2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けたフローサイトメトリ解析の図である。本データでは第1の蛍光色素としてHoechst 33342を使用した。同様の手法を用いることで、3種類の細胞、具体的には第3n-2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3n-1の抗原タンパク質を発現する細胞、第3nの抗原タンパク質を発現する細胞(nは2以上の整数)に対して、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けることができる。図11-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。

30

【図11-4】第1の抗原タンパク質を発現する細胞、第2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けたフローサイトメトリ解析の図である。本データでは第1の蛍光色素としてHoechst 33342を使用した。同様の手法を用いることで、3種類の細胞、具体的には第3n-2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3n-1の抗原タンパク質を発現する細胞、第3nの抗原タンパク質を発現する細胞(nは2以上の整数)に対して、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けることができる。図11-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図11-3と図11-4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。

40

【図11-5】第1の抗原タンパク質を発現する細胞、第2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けたフローサイトメトリ解析の図である。本データでは第1の蛍光色素としてHoechst 33342を使用した。同様の手法を用いることで、3種類の細胞、具体的には第3n-2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3n-1の抗原タンパク質を発現する細胞、第3nの抗原タンパク質を発現する細胞(nは2以上の整数)に対して、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けることができる。図11-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342弱陽性細胞群に対してP6ゲートを、Hoechst 33342強陽性細胞群に対してP7ゲートを作成した図である。

50

【図11-6】第1の抗原タンパク質を発現する細胞、第2の抗原タンパク質を発現する

細胞、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けたフローサイトメトリー解析の図である。本データでは第1の蛍光色素としてHoechst 33342を使用した。同様の手法を用いることで、3種類の細胞、具体的には第3n-2の抗原タンパク質を発現する細胞、第3n-1の抗原タンパク質を発現する細胞、第3nの抗原タンパク質を発現する細胞(nは2以上の整数)に対して、第1の蛍光色素染色により、陰性群、弱陽性群、強陽性群の3群に分けることができる。図11-5のHoechst 33342陰性細胞群、弱陽性細胞群ならびに強陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。

【図12】ヒトAQP4M23 cDNA配列を示す図である。図中に示される配列は、ストップコドン(下線)を含んでいるが、使用する発現ベクターの種類によっては、ストップコドン(TGA)を削った配列を用いてもよい。

【図13】ヒトMOGアイソフォーム1前駆体のcDNA配列を示す図である。図中に示される配列は、ストップコドン(下線)を含んでいるが、使用する発現ベクターの種類によっては、ストップコドン(TGA)を削った配列を用いてもよい。

【発明を実施するための形態】

【0020】

上述のとおり、本発明者らは、Cell-based assay法(CBA法)に基づいたフローサイトメトリーを用いることで簡便、効率的、高感度に、かつ低コストで、試料中に含まれる抗体をハイスループットに検出することを可能とする手法を開発した。本発明により、検体処理の簡便化を実現すると共に、検体処理からデータ取得までにかかる時間を大幅に削減することに成功した。また、生細胞を使用し正確な抗原タンパク質三次元立体構造を維持することによる検出感度の大幅な向上に成功した。また、一度の測定において複数種類の抗体を同時に検出することに成功し、一度の測定において定量性のある膨大なデータを取得することに成功した。本発明者らが開発した手法により、抗AQP4抗体、抗MOG抗体、抗NMDA抗体、抗LGI1抗体、抗CASPR2抗体、抗AMPA受容体抗体、抗グリシン受容体抗体、抗GABA_B受容体抗体、抗ニコチン性アセチルコリン受容体抗体、抗筋特異的受容体型チロシンキナーゼ抗体、抗LDL受容体関連タンパク質4抗体、抗リアノジン受容体抗体、抗ジヒドロピリジン受容体抗体および抗kv1.4抗体などの複数の抗体を単一の試料から同時に高感度に検出することができる。また、本発明者らが開発した手法により、複数の試料に含まれる抗体の検出を同時に行うことが可能となる。

【0021】

多発性硬化症(MS)

多発性硬化症(multiple sclerosis: MS)は、上述のとおり、オリゴデンドロサイトによって髄鞘が形成される脳・脊髄・視神経などの中枢神経系に生じる慢性炎症性脱髄疾患であり、時間的・空間的に病変が多発するのが特徴である。ここで、脱髄とは髄鞘が後天的に破壊される形態変化を指す。通常、詳細な病歴聴取や経時的な神経学的診察により時間的・空間的な病変の多発性を証明し、他の疾患を十分に除外することで診断を確定させる必要がある。このため、厚生労働省によるMSの指定難病診断基準と、その基盤となるMcDonald診断基準(2010年版)では、鑑別診断を行うことの重要性が説かれている。MSとの鑑別診断が必要な疾患は、視神経脊髄炎(neuromyelitis optica: NMO)、急性散在性脳脊髄炎、頸椎症性脊髄症、脊髄空洞症、脊髄小脳変性症、神経ベーチェット病、神経サルコイドーシス、ミトコンドリア脳筋症、進行性多巣性白質脳症などが挙げられる。視神経脊髄炎を鑑別するためには、視神経脊髄炎に特異的なIgG(抗AQP4抗体[NMO-IgGとしても知られる])を測定する血液検査が必須である。

【0022】

視神経脊髄炎スペクトラム疾患(NMOSD)

視神経脊髄炎(neuromyelitis optica: NMO)は、重度の視神経炎と横断性脊髄炎を特徴とする炎症性中枢神経疾患である。最近までNMOは多発性硬化症(MS)との関連が議論されてきたが、2004年にNMOに特異的なIgG(NMO-IgG)が発見され

10

20

30

40

50

、さらにアストロサイトの足突起に高密度に発現する水チャネルタンパク質であるアクアポリン - 4 (A Q P 4) がその標的抗原であることが報告された。

【 0 0 2 3 】

アクアポリン (A Q P) は細胞膜に存在する水チャネルであり、M I P (major intrinsic proteins) ファミリーに属する膜内在タンパク質の一種である。アクアポリンはファミリーを形成しており、そのファミリーは2つのサブファミリー、アクアポリンとアクアグリセロポリンに大別される。アクアポリンサブファミリーは水分子のみを選択的に透過する水チャネルから構成される。これに対し、アクアグリセロポリンサブファミリーに属する水チャネルは、水分子の他にグリセロールや尿素等の水溶性小分子を通す性質を持っている。現在、哺乳類では A Q P 0 から A Q P 1 2 までの 1 3 種類のアイソフォームが同定されている。

10

【 0 0 2 4 】

A Q P 4 はアクアポリンサブファミリーに属する水チャネルである。ホモ四量体を形成して機能しており、脳に優勢的に発現している。脳の中でも特に、血管を取り巻くアストロサイトの足突起や、視床下部のラメラ構造状のグリア細胞、上皮細胞などに顕著に発現していることが明らかとなっている。また、A Q P 4 はアストロサイトのマーカータンパク質の一つである。ヒトと齧歯類では A Q P 4 のアミノ酸配列はほんの僅かに異なっている。A Q P 4 には 2 種類のアイソフォーム、A Q P 4 M 1 と A Q P 4 M 2 3 が存在する。A Q P 4 M 2 3 は結晶性アレイと呼ばれる格子状のアレイ構造を形成することができるが、A Q P 4 M 1 は結晶性アレイを形成することができず、脳内の結晶性アレイのサイズはこの 2 種類のアイソフォームの発現比率によって制御されている。

20

【 0 0 2 5 】

N M O はアストロサイトが主に破壊される疾患である点が、M S との大きな相違点である。血液脳関門のアストロサイトの足突起に豊富に存在している A Q P 4 に対する循環自己抗体が、補体や細胞を介してアストロサイトの傷害とそれに引き続く神経の炎症や脱髄を引き起こす。N M O は、M S のようなオリゴデンドロサイトを中心とした中枢神経の炎症性脱髄疾患とは異なり、A Q P 4 を標的抗原とした自己免疫性アストロサイトパチーというべきものと考えられる。

【 0 0 2 6 】

典型的な N M O の診断基準としては、2 0 0 6 年に発表された Wingerchuk らの基準が広く用いられてきた。

30

(1) 視神経炎

(2) 急性脊髄炎、および

(3) 以下の 3 項目のうち 2 項目以上を満たすこと

- 3 椎体以上の連続性の脊髄病変
- P a t y の脳 M R I 基準を満たさない
- N M O - I g G (抗 A Q P 4 抗体) 陽性

【 0 0 2 7 】

その後、典型的な N M O に加えて、視神経炎 (再発性あるいは両眼性) や 3 椎体以上の長い脊髄炎のみの症例も、視神経脊髄炎スペクトラム疾患 (N M O spectrum disorders : N M O S D) として、同じ範疇の疾患として捉えられるようになったが、N M O および N M O S D の基準のいずれも満たさないものの、血清抗 A Q P 4 抗体が陽性である病態も存在し、その治療反応性は N M O / N M O S D と同等であることが指摘され、近年では抗 A Q P 4 抗体が陽性である病態を広義の N M O S D と捉えることが一般的となっている。

40

【 0 0 2 8 】

いずれにせよ、抗 A Q P 4 抗体検査が、典型的な N M O を含む N M O S D の診断と治療方針の決定において極めて重要な検査であることに変わりはない。血清中の抗 A Q P 4 抗体の有無を調べることにより M S との鑑別診断を行うことができる。M S と N M O / N M O S D の鑑別診断が重要であるのは、その治療方法が異なるためである。M S の病態修飾薬のいくつかは N M O / N M O S D を増悪させる可能性が指摘されており、他方、一般に

50

MSでは効果に乏しい免疫抑制剤がNMO/NMOSDでは有効となることが多い。

【0029】

抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患

上述のとおり、抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患は、MSならびに抗AQP4抗体陽性NMO/NMOSDと異なる疾患群であることが報告されている。MOG（ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質）はミエリン鞘を構成する成分の一つであり、抗MOG抗体はこのMOGを認識する自己抗体である。

【0030】

ミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパク質（MOG）は、中枢神経系の神経の髄鞘形成において重要であると考えられる糖タンパク質であり、ヒトでは、このタンパク質はMOG遺伝子によってコードされている。MOGの主要な分子機能はまだ分かっていないが、ミエリン鞘の構造形成に必要な「接着分子」として働いていると推測されている。ヒトのMOGのcDNAコード領域は、ラット、マウスおよびウシに対する相関性が高く、高度に保存されていることが示されている。ヒトMOG遺伝子のmRNAには、選択的スプライシングにより、少なくとも9個のアイソフォームが存在している。

10

【0031】

抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患の臨床所見は、MSおよび抗AQP4抗体陽性NMO/NMOSDのいずれとも異なる場合と酷似している場合があるため、臨床所見だけの判断が難しいことも多い。しかし、抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患は、抗AQP4抗体陽性NMO/NMOSDと比較すると、視神経炎が多い、両眼同時の視神経炎が多い、若い患者が多い、男性が多い、下部脊髄炎が多い、单相性で再発が無い例が多い、軽症例が多くステロイドで改善が良好であることが多いなどの傾向があることが分かってきている。またMSと比較しても臨床所見が酷似している場合もあるため、抗MOG抗体検査も、MSとの鑑別診断を行う上で極めて重要な検査となりうる。脱髄性疾患患者の臨床所見から疾患がMSであると考え、MSに対して効果のあるフィンゴリモドを投与したが効果が無く、血清中の抗MOG抗体を調べることで抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患である（フィンゴリモドは抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患には効果がなく、神経症状を憎悪させる可能性がある）と判明した臨床例もあることから、脱髄性疾患患者診断における抗MOG抗体検査は、極めて重要な検査となりうる。脱髄性疾患患者に対する多発性硬化症の診断においては、視神経脊髄炎関連疾患や抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患などを鑑別する必要があるため、抗体検査を実施することが推奨されている。

20

30

【0032】

その他の抗体

MSの鑑別診断を行う上では、上記の抗AQP4抗体と抗MOG抗体に加えて、抗核抗体、リウマチ因子、甲状腺関連自己抗体（抗TSH受容体抗体、抗サイログロブリン抗体、抗ペルオキシダーゼ抗体）、抗SS-A抗体、抗SS-B抗体、抗アセチルコリン受容体抗体などを検出することも有用となりうる。また、自己免疫性脳炎の診断を行う上で、抗NMDA抗体、抗LGI1抗体、抗CASPR2抗体、抗AMPA受容体抗体、抗グリシン受容体抗体、抗GABA_B受容体抗体などを検出することも有用となりうる。また、重症筋無力症の診断を行う上で、抗ニコチン性アセチルコリン受容体抗体、抗筋特異的受容体型チロシンキナーゼ抗体、抗LDL受容体関連タンパク質4抗体、抗リアノジン受容体抗体、抗ジヒドロピリジン受容体抗体、抗kv1.4抗体などを検出することも有用となりうる。

40

【0033】

抗体検出方法

生物学的試料中における抗体の検出には、様々な免疫学的検査法が用いられうる。代表的な例としては、免疫組織化学、抗原タンパク質を発現させたヒト胎児腎（HEK）293細胞あるいはその他の細胞を基質とした免疫細胞化学あるいはフローサイトメトリー、単離した抗原タンパク質あるいは細胞・組織抽出液を基質とした放射性免疫沈降法あるいは

50

は蛍光免疫沈降法、ウエスタンブロッティング、酵素結合免疫測定法（E L I S A）などが挙げられる。

【0034】

抗AQP4抗体を検出するにあたって最も感度の高い測定方法は、AQP4を細胞に発現させ被検者血清と反応させるCBA（cell-based assay）法であり、この細胞をスライドガラス上に固定して行う間接免疫蛍光法（非特異的結合が問題になる）、組換えAQP4を用いたE L I S A法、マウス脳組織切片を用いた間接免疫蛍光法などはCBA法に比べると感度が低い。また、CBA法以外のこれらの測定方法では偽陰性例や偽陽性例が生じることがあるため、CBA法での測定が推奨されている。

【0035】

感度の高い抗AQP4抗体検査法としては、例えば、ヒトAQP4M23を細胞に発現させて被検者血清と反応させ、被検者IgGがAQP4の細胞外領域に結合していることを間接蛍光抗体法やフローサイトメトリーによって確認するCBA（cell-based assay）法が挙げられる。本発明者らは、本願において詳細に述べているように、フローサイトメトリーを用いたCBA法により非常に高感度かつ定量性のあるデータを得ることができる検査方法を実現することに成功した。

【0036】

CBA（cell-based assay）法

CBA法による試料に含まれる抗体の検出方法とは、任意の細胞に目的の抗原タンパク質の遺伝子を導入後、試料と反応させ、目的の抗体を認識する標識二次抗体を用いて標識シグナルを検出する方法を指す。

【0037】

CBA法に使用する細胞には、例えば、チャイニーズハムスター卵巢由来のCHO-K1細胞を用いることができるが、これに限定はされない。例えば、HEK293細胞、HEK293T細胞、CHO細胞、COS1細胞、COS7細胞、HeLa細胞、Jurkat細胞、L細胞、MDCk細胞、PC12細胞、Sf9細胞などを利用してよい。また、これらの細胞に任意のタンパク質を安定発現させた細胞株（例えばCHO-ICAM-1細胞）を利用してよい。また、株化された培養細胞で、目的の抗原タンパク質を内在的に発現している細胞を使用することもできる。例えば、目的の抗原タンパク質がAQP4の場合、H4細胞やU-87MG細胞などを利用してよい。また、組織から採取した細胞で、目的の抗原タンパク質（例えばAQP4やMOG）を発現している細胞を使用することもできる。例えば、脳のグリア細胞の一種であるアストロサイトにはAQP4が高発現していることが知られている。ヒトAQP4とラットAQP4、あるいはヒトAQP4とマウスAQP4の配列は殆どが同じであるため、脳から単離したヒトアストロサイトやラットアストロサイト、マウスアストロサイトを用いて測定することも可能である。AQP4を発現している器官として、脳の他に胃、腎臓、筋肉なども挙げられる。また、脳のグリア細胞の一種であるオリゴデンドロサイトにMOGが発現していることがわかっている。ヒトMOG、ラットMOG、マウスMOGは配列が殆ど同じであるため、これらの脳組織由来のオリゴデンドロサイトも測定に用いることができる。CBA法に使用する細胞は、Hoechst 33342などを用いて蛍光標識しておいてもよい。Hoechst 33342などを用いて蛍光標識する際には、染色の度合いを調整することで、区別可能な複数種の細胞を調製することができる。例えば、Hoechst 33342で処理をしていない細胞、Hoechst 33342を最終濃度0.1 μg/mLとなるように加えて37 °Cで20分間インキュベートした細胞、そして最終濃度5 μg/mLとなるように加えて37 °Cで20分間インキュベートした細胞を用意することにより、Hoechst 33342の蛍光強度で区別可能な3種類の細胞を用意することができる。インキュベートの際に加える最終濃度や反応時間などを調整することにより、条件を細分化し、区別可能な細胞の種類を増やすことも可能である。このような細胞の染色に使用される蛍光色素はHoechst 33342に限定はされない。また、複数の蛍光色素を併用してもよく、染色の対象は、核、細胞膜、細胞質、細胞小器官、脂質、および糖鎖などを含む、細胞を構成する任意の構造単位であってもよい。また、使用する細胞の

10

20

30

40

50

細胞膜に恒常的に発現しているタンパク質に対する抗体を使用して蛍光標識してもよい。C B A法に使用する細胞には、目的の抗原タンパク質、例えば、A Q P 4とM O Gのうち、いずれか一つを導入することができる。場合によっては、C B A法に使用する細胞には、A Q P 4とM O Gの両方を導入してもよい。抗原タンパク質を導入していない細胞は、ネガティブコントロールとして使用することができる。C B A法に使用する細胞には、A Q P 4とM O G以外の他の抗原タンパク質が導入されていてもよく、また複数種類の細胞（例えばC H O - K 1細胞とH E K 2 9 3細胞）を併用してもよい。

【0038】

C B A法に使用する細胞には、1回膜貫通型タンパク質、2回膜貫通型タンパク質、3回膜貫通型タンパク質、4回膜貫通型タンパク質、5回膜貫通型タンパク質、6回膜貫通型タンパク質、7回膜貫通型タンパク質、8回膜貫通型タンパク質、9回膜貫通型タンパク質、10回膜貫通型タンパク質、11回膜貫通型タンパク質、12回膜貫通型タンパク質、13回膜貫通型タンパク質、14回膜貫通型タンパク質、15回膜貫通型タンパク質、16回膜貫通型タンパク質、17回膜貫通型タンパク質、18回膜貫通型タンパク質、19回膜貫通型タンパク質、20回膜貫通型タンパク質、21回膜貫通型タンパク質、22回膜貫通型タンパク質、23回膜貫通型タンパク質、24回膜貫通型タンパク質、25回膜貫通型タンパク質、26回膜貫通型タンパク質、27回膜貫通型タンパク質、28回膜貫通型タンパク質、29回膜貫通型タンパク質、または30回膜貫通型タンパク質などを含む、細胞膜に存在するタンパク質を抗原タンパク質として導入することができる。よって、本発明に係る方法の実施態様には、試料中に含まれる、1回膜貫通型タンパク質、2回膜貫通型タンパク質、3回膜貫通型タンパク質、4回膜貫通型タンパク質、5回膜貫通型タンパク質、6回膜貫通型タンパク質、7回膜貫通型タンパク質、8回膜貫通型タンパク質、9回膜貫通型タンパク質、10回膜貫通型タンパク質、11回膜貫通型タンパク質、12回膜貫通型タンパク質、13回膜貫通型タンパク質、14回膜貫通型タンパク質、15回膜貫通型タンパク質、16回膜貫通型タンパク質、17回膜貫通型タンパク質、18回膜貫通型タンパク質、19回膜貫通型タンパク質、20回膜貫通型タンパク質、21回膜貫通型タンパク質、22回膜貫通型タンパク質、23回膜貫通型タンパク質、24回膜貫通型タンパク質、25回膜貫通型タンパク質、26回膜貫通型タンパク質、27回膜貫通型タンパク質、28回膜貫通型タンパク質、29回膜貫通型タンパク質、30回膜貫通型タンパク質などを含む、細胞膜に存在するタンパク質を認識する個々の抗体（例えば自己抗体）を独立に検出する方法であって、単一試料におけるこれらの任意の複数の抗体（例えば12種類の抗体）の有無を同時測定によって解析を行うことができる方法が含まれる。

【0039】

上記の細胞膜に存在するタンパク質には、Gタンパク質共役型受容体、イオンチャネル型受容体、電位依存性イオンチャネル、機械刺激感受性チャネル、一過性受容器電位チャネル、陽イオンチャネル、陰イオンチャネル、サイトカイン受容体、増殖因子受容体、酵素共役型受容体、A P Cスーパーファミリー、A B C輸送体スーパーファミリー、単純拡散型輸送体、受動輸送型輸送体、能動輸送型輸送体、リン脂質輸送体、A T P駆動型ポンプ、A T P合成酵素、免疫グロブリンスーパーファミリー、細胞接着分子、C D抗原、脂質アンカー型タンパク質、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型タンパク質、水チャネル、糖タンパク質、低密度リポタンパク質受容体、スカベンジャー受容体、ギャップ結合チャネル、F c受容体、T o l l様受容体、細胞死受容体、トランスフェリン受容体、トランスロカーゼ、電位依存性ホスファターゼ、小胞輸送タンパク質、核膜孔複合体、内在性膜タンパク質、表在性膜タンパク質などが含まれる。測定に使用する任意の細胞に対して発現させるタンパク質は上記のいずれかのファミリーに属する任意のタイプであってよく（例えば水チャネルの場合はA Q P 1でもよいし、A Q P 4でもよいし、A Q P 10でもよい）、目的の膜タンパク質に2種類以上のアイソフォームが存在する場合、任意のタイプを選択することができ（例えばA Q P 4の場合、A Q P 4 M 1でもA Q P 4 M 2 3でもよい）、目的の膜タンパク質が多量体で構成される際は任意のサブユニットをホ

モならびにヘテロで選択することができる（例えばグリシン受容体の場合、1サブユニットのホモ5量体でもよく、3サブユニットのホモ5量体でもよく、1サブユニットとサブユニットのヘテロ5量体でもよい）。

【0040】

具体的な同時測定の一例として、単一試料中に、抗NMDA受容体抗体、抗LGI1抗体、抗CASPR2抗体、抗AMPA受容体抗体、抗グリシン受容体抗体、抗GABA_B受容体抗体が含まれているかどうかを同時測定によって解析することができる。この測定は被検者が、自己免疫性脳炎、モルヴァン症候群、アイザックス症候群、小脳失調、錐体外路症状、ミオクロヌス、神経性筋強直、末梢神経障害、自律神経障害、てんかん、認知症などの臨床型・神経症候を呈する際に適用することができる。

10

【0041】

抗NMDA受容体抗体が認識するNMDA受容体、抗AMPA受容体抗体が認識するAMPA受容体、抗グリシン受容体抗体が認識するグリシン受容体は上記のイオンチャンネル型受容体に分類される。抗LGI1抗体が認識するLGI1 (leucine-rich glioma-inactivated protein-1)、抗CASPR2抗体が認識するCASPR2 (contactin-associated protein-2)は電位依存性カリウムチャンネル (voltage-gated potassium channel: VGKC)と細胞膜上で複合体を形成している。抗GABA_B受容体抗体が認識するGABA_B受容体は上記のGタンパク質共役型受容体に分類される。

【0042】

また別の一例として、単一試料中に、抗ニコチン性アセチルコリン受容体抗体、抗筋特異的受容体型チロシンキナーゼ抗体、抗LDL受容体関連タンパク質4抗体、抗リアノジン受容体抗体、抗ジヒドロピリジン受容体抗体、抗kv1.4抗体が含まれているかどうかを同時測定によって解析することができる。この測定は被検者が、重症筋無力症の症候を呈する際に適応することができる。

20

【0043】

抗ニコチン性アセチルコリン受容体抗体が認識するニコチン性アセチルコリン受容体、抗リアノジン受容体抗体が認識するリアノジン受容体は、上記のイオンチャンネル型受容体に分類される。抗筋特異的受容体型チロシンキナーゼ抗体が認識する筋特異的受容体型チロシンキナーゼは、上記のサイトカイン受容体に分類される。抗LDL受容体関連タンパク質4抗体が認識するLDL受容体関連タンパク質4は、上記の低比重リポタンパク質受容体に分類される。抗ジヒドロピリジン受容体抗体が認識するジヒドロピリジン受容体は、L型Ca²⁺チャンネルであり、上記の電位依存性イオンチャンネルに分類される。抗kv1.4抗体が認識するkv1.4は、上記の電位依存性イオンチャンネルに分類される。

30

【0044】

さらにまた別の一例として、単一検体に、抗AQP4抗体ならびに抗MOG抗体が含まれているかどうかを同時測定によって解析することができる。この測定は被検者が、視神経炎、視覚障害、脊髄炎、脳脊髄炎、脳幹脳炎などの臨床型・神経症候を呈する際に適応することができる。抗AQP4抗体が認識するAQP4は上記の水チャンネルに分類される。抗MOG抗体が認識するMOGは上記の糖タンパク質に分類される。

【0045】

したがって、本発明に係るいくつかの態様は、上記のタンパク質に対する抗体の検出または測定の結果を指標とする、上記の疾患の診断方法に関する。また、本発明に係るいくつかの態様は、そのような診断結果に基づき、治療様式を決定することを含む、疾患の治療方法にも関する。

40

【0046】

抗原タンパク質の遺伝子導入には、例えば、pEGFP-N3などの発現ベクターを用いることができるが、これに限定はされない。細胞へのトランスフェクションに利用可能なベクターは、当業者には様々なものが知られている。また、ベクターをトランスフェクトする際には、Lipofectamine 3000などのトランスフェクション試薬を用いることができる。様々なトランスフェクション試薬（例えば、FuGENE HDなど）が当業者には公知である。ベク

50

ターに組み込む A Q P 4 遺伝子（例えば、A Q P 4 M 2 3 遺伝子）や M O G 遺伝子などの配列は、当業者であれば GenBank などのデータベースから容易に入手できる。抗原タンパク質の細胞への遺伝子導入の際には、例えば、ウイルスベクター、プラスミド、リボソーム、ゲノム編集などの技術を利用してよい。導入する抗原タンパク質は、必ずしも全長を含むものでなくともよく、断片であってもよい。また、導入する抗原タンパク質は、欠失、挿入、置換などの変異を含むものであってもよく、また、複数の任意の抗原タンパク質を組み合わせたキメラタンパク質であってもよい。さらに、導入する抗原タンパク質には、E G F P などの蛍光タンパク質を融合させておくことができる。種々の蛍光タンパク質（例えば、Sirius、EBFP、ECFP、mTurquoise、TagCFP、AmCyan、mTFP1、MidoriishiCyan、CFP、TurboGFP、AcGFP、TagGFP、Azami-Green、ZsGreen、EmGFP、EGFP、GFP2、HyPer、TagYFP、EYFP、Venus、YFP、PhiYFP、PhiYFP-m、TurboYFP、ZsYellow、mBanana、KusabiraOrange、mOrange、TurboRFP、DsRed-Express、DsRed2、TagRFP、DsRed-Monomer、AsRed2、mStrawberry、TurboFP602、mRFP1、JRed、KillerRed、mCherry、HcRed、KeimaRed、mRaspberry、mPlum、PS-CFP、Dendra2、Kaede、EosFP、KikumeGRなど）が当業者には公知であり、利用可能である。蛍光タンパク質は、好ましくは、抗原タンパク質（例えば、A Q P 4、M O G）の C 末端領域に融合させることができるが、これに限定はされない。pEGFP-N3 を用いた場合には、抗原タンパク質の C 末端に E G F P が融合される。蛍光タンパク質は、抗原タンパク質の N 末端領域やループ部分などに融合するように設計してもよい。

10

【0047】

抗原タンパク質の遺伝子導入には、I R E S 発現ベクターを用いてもよい。I R E S（Internal Ribosome Entry Site：配列内リボソーム進入部位）は、タンパク質合成のプロセスの一部として、キャップ非依存的な翻訳の開始を可能とする R N A 配列要素である。I R E S 含有パイシストロン性ベクターは、2つのタンパク質を同じ R N A 転写物から個別に同時発現させることを可能とする。I R E S 発現ベクターを用いて抗原タンパク質と蛍光タンパク質とを発現させた場合、蛍光タンパク質の検出される細胞では、ほぼ 100% 目的の抗原タンパク質も発現している。市販の I R E S 発現ベクターとしては、例えば、クロンテック社の Living Colors pIRES2 Vector などがある。本発明の方法においては、pEGFP-N3 等の蛍光タンパク質融合発現ベクターと I R E S 発現ベクターとを組み合わせることもできる。

20

【0048】

抗原タンパク質の発現は、一過性発現であってもよく、また安定発現であってもよい。抗原タンパク質を発現するように改変した細胞と、被検者由来の試料とを反応させる際には、例えば、 10^5 cells / 100 μ L の細胞懸濁液に対して 10 μ L の被検者血清を加え、4 で 15 分間のインキュベーションを行う。細胞の量、試料の量、温度、時間は、当業者であれば必要に応じて適宜調整することができる。本発明の方法によれば、複数アッセイの同時処理が可能であるため、サンプルの作製や測定に必要とされる時間や試料の量は従来の C B A 法に比べて大幅に削減される。被検者由来の試料としては、血清のほかに、全血、血漿、脳脊髄液、涙、唾液、尿なども利用されうる。被検者は、哺乳動物、特にヒト、例えば、脱髄性疾患の症状を呈しているヒトである。

30

【0049】

二次抗体は、被検者由来の試料中に含まれる自己抗体を認識する。二次抗体の標識としては、例えば、蛍光標識を用いることができる。二次抗体は、典型的には抗ヒト I g G 抗体であるが、抗ヒト I g M 抗体、抗ヒト I g A 抗体、抗ヒト I g E 抗体、抗ヒト I g D 抗体なども使用されうる。二次抗体として有用な蛍光色素で標識された抗ヒト I g G 抗体は、多くの製品が市販されており、容易に入手できる。蛍光標識された細胞試料は、フローサイトメーターを用いて検出することができる。蛍光標識は例えば、Alexa Fluor 647 でありうるが、これに限定はされない。

40

【0050】

本発明の方法において、蛍光標識は例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Flu

50

or 555, Alexa Fluor 568, Alexa Fluor 594, Alexa Fluor 633, Alexa Fluor 647, Alexa Fluor 660, Alexa Fluor 680, Alexa Fluor 700, Alexa Fluor 750, Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、および7-AADから成る群より選択されるものが使用されうる。本発明においては、単一のレーザーにより励起される複数の蛍光標識（例えば、EGFPとPE-Cy7）を組み合わせて使用してもよい。

10

20

30

【0051】

フローサイトメトリー

フローサイトメトリー解析は、CBA法によって被検者由来試料および二次抗体と反応させた細胞に対して、例えば、ベクトン・ディッキンソン社製FACS Aria IIを用いて行うことができる。本発明の方法によれば、例えば3種類の波長のレーザー（例えば、488nm青レーザー、640nm赤レーザー、355nmUVレーザー）を用いて2種類以上の抗体を分析することができ、また、4種類の波長のレーザー（例えば、青、赤、黄、およびUV）を用いて4種類以上（例えば、12種類、18種類、24種類）の抗体を分析することができる。例えば、EGFPとPE-Cy7は青レーザーにより、Alexa Fluor 647は赤レーザーにより、mCherryは黄レーザーにより、Hoechst 33342はUVレーザーにより、それぞれ励起される。使用するレーザーは、例えば、UVレーザーの代わりに紫レーザーを、黄レーザーの代わりに黄緑レーザーを選択してもよい。また、使用するレーザーの組み合わせは任意でよい。測定したフローサイトメトリーデータの解析には、例えば、FlowJoを使用することができる。フローサイトメトリーデータの解析により、被検者由来試料中の抗体を検出および/または測定することができる。

40

【0052】

検出および測定

本発明の方法によれば、被検者に由来する試料中における複数の抗体、例えば、2種類、4種類、6種類、8種類、12種類、16種類、18種類、24種類、またはそれ以上の種類の抗体を同時に検出または測定する方法が提供される。また、本発明の方法によれ

50

ば、1以上の被検者に由来する複数の試料中、例えば、2種類、4種類、6種類、8種類、12種類、16種類、18種類、24種類、またはそれ以上の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法が提供される。フローサイトメーターを用いることで、複数種の抗体の検出および/または測定、あるいは複数の試料中における抗体の検出および/または測定を簡便かつ精確に同時に行うことができる。

【0053】

(12種類の抗体の同時検出)

本発明の一つの態様としては、被検者に由来する試料中における12種類の抗体を同時に検出または測定する方法が提供される。フローサイトメーターを用いることで、12種類の抗体の検出および/または測定を簡便かつ精確に同時に行うことができる。一つの態様において、本方法は、第1の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第2の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第4の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第5の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第6の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第7の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第8の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第9の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第10の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第11の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第12の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、該第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。

10

20

【0054】

いくつかの態様において、本発明の方法では、第1から第12の抗原タンパク質は蛍光タンパク質と融合していてもよい。抗原タンパク質と融合した蛍光タンパク質はそれぞれ同一または異なるものでありうる。例えば、第1から第6の抗原タンパク質が第1の蛍光タンパク質と融合しており、第7から第12の抗原タンパク質が第2の蛍光タンパク質と融合している場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。

30

【0055】

いくつかの態様において、本発明の方法では、第1から第12の抗原タンパク質はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳されてもよい。抗原タンパク質と同一のmRNAから翻訳される蛍光タンパク質はそれぞれ同一または異なるものでありうる。例えば、第1から第6の抗原タンパク質がそれぞれIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第7から第12の抗原タンパク質がそれぞれIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳される場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、本発明の方法では、例えば、第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第10から第12の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されていてもよい。また、例えば、第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第10から第12の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されていてもよい。蛍光色素/蛍光タンパク質としては、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cas

40

50

cade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PSS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどを使用することができる。

10

20

30

40

50

【 0 0 5 6 】

いくつかの態様において、本発明の方法では、例えば、第2、第5、第8および第11の抗原タンパク質を発現する細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第3、第6、第9および第12の抗原タンパク質を発現する細胞が第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で強く標識されていてもよい。ここで、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とは、例えばフローサイトメーター上で区別可能である。蛍光色素/蛍光タンパク質としては、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、

oise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF 594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどを使用することができる。

10

【0057】

なお、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質と同様に、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によって細胞を3段階（陰性、弱陽性、強陽性）に標識することにより、18種類の細胞を調製し、18種類の抗体について同時に評価することも可能である。また、4段階の標識と組み合わせることにより、16種類、24種類、32種類の抗体の同時評価も可能となる。

【0058】

さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。よって、本発明の態様の一つには、被検者に由来する試料中における第1から第12の抗体を同時に検出または測定する方法であって、第1の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第2の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第4の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第5の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第6の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第7の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第8の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第9の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第10の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第11の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第12の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、該第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含み、ここで、第1から第12の抗原タンパク質のそれぞれは蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1から第6の抗原タンパク質はそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第7から第12の抗原タンパク質はそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第10から第12の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されているか又は第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されており、そして第2、第5、第8および第11の抗原タンパク質を発現する細胞は第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第3、第6、第9および第12の抗原タンパク質を発現する細胞は第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で強く標識されており、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とが区別可能である、方法が含まれる。なお、上記二次抗体は、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395

20

30

40

50

、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565 NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575 V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどで標識されていてもよい。

【 0 0 5 9 】

いくつかの態様において、被検者に由来する試料は血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から選択されてもよい。上記第1から第12の抗原タンパク質は、それぞれ異なるタンパク質であってよく、AQP4、MOG、NMDA受容体、LG11、CASPR2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABA_B受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、およびkv1.4から選択されるタンパク質が含まれていてもよい。

【 0 0 6 0 】

上記第1の蛍光タンパク質はEGFPであってもよい。上記第2の蛍光タンパク質はmCherryであってもよい。上記第1の蛍光色素は、EGFPと同じ波長のレーザーで励起することが可能なPE-Cy7であってもよい。上記第2の蛍光色素はHoechst 33342であってもよい。上記二次抗体はAlexa Fluor 647で標識されていてもよい。

【 0 0 6 1 】

第1の蛍光タンパク質と第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質は、同じ波長のレーザーで励起されるものを使用することができる。同様に、第2の蛍光タンパク質と第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質は、同じ波長のレーザーで励起されるものを使用することもできる。本発明において使用される他の蛍光標識についても同様に、単一のレーザーにより複数の標識が励起されるものを組み合わせて使用することができる。

【 0 0 6 2 】

いくつかの態様においては、12未満の種類の抗体の同時検出を行ってもよい。前記第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞のうち、例えば、2~11種の細胞のみを調製して使用することもできる。

【 0 0 6 3 】

また、いくつかの態様において、本発明の方法は、被検者に由来する試料中における複

数の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞であって、第1から第12の抗原タンパク質のそれぞれは蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1から第6の抗原タンパク質はそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第7から第12の抗原タンパク質はそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第10から第12の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されているか又は第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されており、そして、第2、第5、第8および第11の抗原タンパク質を発現する細胞は第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第3、第6、第9および第12の抗原タンパク質を発現する細胞は第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で強く標識されており、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とが区別可能である細胞のうち、2以上を調製する工程、

該2以上の細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、

該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、

該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程

を含む、方法に関する。これにより、例えば2~11種の抗体の検査を同時に行うことができる。

【0064】

また、このような2以上の細胞を含む細胞懸濁液を複数調製し、各々の細胞懸濁液に対して被検者に由来する試料が1種類加えられるように、複数の細胞懸濁液に複数の被検者に由来する試料を加えることにより、複数の試料中の複数の抗体を分析することができる。例えば、3例の被検者に由来する試料を4種類の抗体について、あるいは4例の被検者に由来する試料を3種類の抗体について、同時に検査することができる。

【0065】

(4種類の抗体の同時検出)

本発明の別の態様としては、被検者に由来する試料中における第1の抗体、第2の抗体、第3の抗体、および第4の抗体を同時に検出または測定する方法が提供される。フローサイトメーターを用いることで、4種類の抗体の検出および/または測定を簡便かつ正確に同時に行うことができる。一つの態様において、本方法は、第1の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第2の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第3の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第4の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、該第1から第4の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。なお、二次抗体は、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer

、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどで標識されていてもよい。

10

20

【 0 0 6 6 】

いくつかの態様において、本発明の方法では、第1から第4の抗原タンパク質はそれぞれ蛍光タンパク質と融合していてもよい。抗原タンパク質と融合した蛍光タンパク質はそれぞれ同一または異なるものでありうる。例えば、第1および第2の抗原タンパク質が第1の蛍光タンパク質と融合しており、第3および第4の抗原タンパク質が第2の蛍光タンパク質と融合している場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、本発明の方法では、第1から第4の抗原タンパク質がIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳されてもよい。抗原タンパク質と同一のmRNAから翻訳される蛍光タンパク質はそれぞれ同一または異なるものでありうる。例えば、第1および第2の抗原タンパク質がそれぞれIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第3および第4の抗原タンパク質がそれぞれIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳される場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。第2の抗原タンパク質を発現する細胞および第4の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されていてもよい。また、第2の抗原タンパク質を発現する細胞および第4の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されていてもよい。蛍光色素/蛍光タンパク質としては、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633

30

40

50

、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS 620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hyper、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、Zs Yellow、7-AADなどを使用することができる。

10

【0067】

20

いくつかの態様においては、第1から第4の抗原タンパク質がそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又は第1から第4の抗原タンパク質がそれぞれIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第2の抗原タンパク質を発現する細胞が第1の蛍光色素もしくは第2の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第3の抗原タンパク質を発現する細胞が第1の蛍光色素もしくは第2の蛍光タンパク質で強く標識されており、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とが(例えばフローサイトメーターにより)区別可能であり、第4の抗原タンパク質を発現する細胞が第2の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質により(例えば、第2の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により)標識されていてもよい。このように標識した細胞を用いることで、4種類の抗体を検出することも可能である。

30

【0068】

いくつかの態様において、被検者に由来する試料は血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から選択されてもよい。上記第1から第4の抗原タンパク質は、それぞれ例えばAQP4、MOG、NMDA受容体、LGI1、CASPR2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABA_B受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、およびkv1.4から選択されうる。

【0069】

上記第1の蛍光タンパク質はEGFPであってもよい。上記第2の蛍光タンパク質はmCherryであってもよい。上記第1の蛍光色素はHoechst 33342であってもよい。上記二次抗体はAlexa Fluor 647で標識されていてもよい。

40

【0070】

いくつかの態様においては、4未満の種類の抗体の同時検出を行ってもよい。前記第1から第4の抗原タンパク質を発現する細胞のうち、例えば、3種の細胞のみを調製して使用することもできる。

【0071】

(2種類の抗体の同時検出)

本発明の別の態様としては、被検者に由来する試料中における第1の抗体および第2の抗体を同時に検出または測定する方法が含まれる。フローサイトメーターを用いることで、2種類の抗体の検出および/または測定を簡便かつ精確に同時に行うことができる。一

50

つの態様において、本方法は、第1の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第2の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、該第1および第2の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。なお、二次抗体は、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、Hyper、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNA RF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどで標識されていてもよい。

【 0 0 7 2 】

いくつかの態様において、第1および第2の抗原タンパク質は、それぞれ蛍光タンパク質と融合していてもよい。抗原タンパク質と融合した蛍光タンパク質はそれぞれ同一または異なるものでありうる。例えば、第1の抗原タンパク質が第1の蛍光タンパク質と融合しており、第2の抗原タンパク質が第2の蛍光タンパク質と融合している場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは同一の蛍光タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、本発明の方法では、第1および第2の抗原タンパク質がIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳されてもよい。抗原タンパク質と同一のmRNAから翻訳される蛍光タンパク質はそれぞれ同一または異なるものでありうる。例えば、第1の抗原タンパク質がIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第2の抗原タンパク質がIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳される場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは同一の蛍光タンパク質であってもよい。また、第2の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識され

10

20

30

40

50

ていてもよい。また、第2の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されていてもよい。蛍光色素/蛍光タンパク質としては、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどを使用することができる。

10

20

30

【0073】

第1の抗原タンパク質が第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第2の抗原タンパク質が第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳される場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。

【0074】

いくつかの態様において、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。被検者に由来する試料は、血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から選択されてもよい。第1および第2の抗原タンパク質は、それぞれ例えばAQP4、MOG、NMDA受容体、LGI1、CASPR2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABA_B受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、およびkv1.4から選択されうる。

40

【0075】

上記第1の蛍光タンパク質はEGFPであってもよい。上記第2の蛍光タンパク質はmCherryであってもよい。上記第1の蛍光色素がHoechst 33342であってもよい。上記二次抗

50

体はAlexa Fluor 647で標識されていてもよい。

【0076】

(4n種類の抗体の同時検出)

本発明の別の態様としては、被検者に由来する試料中における第1から第4nの抗体を同時に検出または測定する方法が含まれる。ここでnは1以上の整数であり、好ましくは1、2、3、4、5を含む10以下の整数である。フローサイトメーターを用いることで、4n種類の抗体の検出および/または測定を簡便かつ精確に同時に行うことができる。

【0077】

一つの態様において、本方法は、第1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、該第1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。なお、二次抗体を標識する蛍光タンパク質および蛍光色素の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。

10

【0078】

いくつかの態様において、第1から第4nの抗原タンパク質のそれぞれは、蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳されてもよい。例えば、第1から第2nの抗原タンパク質は、それぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第2n+1から第4nの抗原タンパク質は、それぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞および第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されていてもよい。第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞および第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されていてもよい。第1から第4の蛍光タンパク質および第1から第2の蛍光色素の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。

20

30

【0079】

いくつかの態様において、第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞、第2n+1から第3nの抗原タンパク質を発現する細胞、第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞、第2n+1から第3nの抗原タンパク質を発現する細胞、第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能である。例えば、蛍光色素で標識していない細胞、蛍光色素で弱く標識した細胞、蛍光色素で強く標識した細胞といった3段階の強度で標識した細胞を調製することができる。本発明の文脈において、n段階の強度で細胞を標識することには、細胞を標識しないことも含まれる。

40

【0080】

いくつかの態様においては、4n未満の種類の抗体の同時検出を行ってもよい。前記第1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞のうち、例えば、2~4n-1種の細胞のみを調製して使用することもできる。

【0081】

また、いくつかの態様において、本発明の方法は、被検者に由来する試料中における複数の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

50

第1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞であって、第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質により非標識を含んでいてもよいn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞、第2n+1から第3nの抗原タンパク質を発現する細胞、第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質により非標識を含んでいてもよいn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞、第2n+1から第3nの抗原タンパク質を発現する細胞、第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能であり、第1から第4nの抗原タンパク質のそれぞれが蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞および第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞が、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されているか又は第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されている細胞のうち、2以上を調製する工程、

10

該2以上の細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、

該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、

該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程

20

を含む、方法に関する。これにより、例えば、2~4n-1種の抗体の検査を同時に行うことができる。

【0082】

また、このような2以上の細胞を含む細胞懸濁液を複数調製し、各々の細胞懸濁液に対して被検者に由来する試料が1種類加えられるように、複数の細胞懸濁液に複数の被検者に由来する試料を加えることにより、複数の試料中の複数の抗体を分析することができる。例えば、3例の被検者に由来する試料を4種類の抗体について、あるいは4例の被検者に由来する試料を3種類の抗体について、同時に検査することができる。

【0083】

(2mn種類の抗体の同時検出)

30

上述した4n種類の抗体の同時検出において、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質による標識をm段階に分けることにより、2mn種類の抗体の同時検出を行うことができる。よって、本発明の別の態様としては、被検者に由来する試料中における2mn種類の抗体を同時に検出または測定する方法が含まれる。ここでmおよびnは1以上の整数であり、好ましくは1、2、3、4、5を含む10以下の整数である。フローサイトメーターを用いることで、2mn種類の抗体の検出および/または測定を簡便かつ精確に同時に行うことができる。2mnは例えば、2、4、6、8、12、16、18、24、32などの値を取り得る。被検者に由来する試料としては、例えば、血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、尿などを使用することができる。検出対象の抗体が結合する抗原タンパク質としては、例えば、AQP4、MOG、NMDA受容体、LGI1、CASPR2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABA_B受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、kv1.4などを使用することができる。

40

【0084】

一つの態様において、本方法は、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、該第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。なお、二次抗体を標識する蛍光タンパク質および蛍光色素

50

の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。第1から第2mnの抗原タンパク質は、それぞれ互いに異なるタンパク質でありうる。

【0085】

いくつかの態様において、第1から第2mnの抗原タンパク質のそれぞれは、蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳される。また、いくつかの態様において、第1から第mnの抗原タンパク質はそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第mn+1から第2mnの抗原タンパク質がそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である。

10

【0086】

いくつかの態様においては、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞のうち、第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞を第1細胞グループとし、同様に、第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞を第2細胞グループ、第(m-1)n+1から第mnの抗原タンパク質を発現する細胞を第m細胞グループ、第(2m-1)n+1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞を第2m細胞グループとして、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞がn種類ずつ2mのグループに分けられ、第1細胞グループから第m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によりm段階の強度でそれぞれ標識され、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能とされており、同様に、第m+1細胞グループから第2m細胞グループは、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によりm段階の強度でそれぞれ標識され、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能とされうる。第1細胞グループから第m細胞グループは、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体によりm段階の強度でそれぞれ標識されて、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能とされ、同様に、第m+1細胞グループから第2m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体によりm段階の強度でそれぞれ標識されて、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能とされてもよい。

20

【0087】

いくつかの態様においては、上記の第1細胞グループに属する第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能とされ、同様に、第2細胞グループから第2m細胞グループのそれぞれに属するn種類の細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されて、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能とされうる。

30

【0088】

別の言い方をすれば、いくつかの態様において、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞は、まず、第1から第mnの細胞からなるグループと、第mn+1から第2mnの細胞からなるグループとに分けられる。この2群の区別は、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質の判別によりなされうる。次に、第1から第mnの細胞からなるグループは、n個の細胞からなるm個の群に分けられる。これらm個の群は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質により各群ごとにm段階の異なる強度でそれぞれ標識されることにより、それぞれ区別されうる。また、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の蛍光強度によりそれぞれ区別されるm個の群にそれぞれ含まれるn個の細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の異なる強度でそれぞれ標識されることにより、それぞれ区別されうる。同様に、第mn+1から第2mnの細胞からなるグループについても、n個の細胞からなるm個の群に分けられる。これらm個の群は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質により各群ごとにm段階の異なる強度でそれぞれ標識されることにより、それぞれ区別されうる。また、第1の蛍光色素もしくは

40

50

は第3の蛍光タンパク質の蛍光強度によりそれぞれ区別される m 個の群にそれぞれ含まれる n 個の細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質により n 段階の異なる強度でそれぞれ標識されることにより、それぞれ区別される。このようにして、蛍光標識に基づきそれぞれ区別可能な $2mn$ 種類の細胞が調製される。よって、本発明の一つの態様は、蛍光標識に基づきそれぞれ区別可能な $2mn$ 種類の細胞の調製方法にも関する。

【0089】

上記のように、細胞の標識には抗体を用いてもよい。第1から第4の蛍光タンパク質および第1から第2の蛍光色素の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。なお、例えば、蛍光色素で標識していない細胞、蛍光色素で弱く標識した細胞、蛍光色素で強く標識した細胞といった3段階の強度で標識した細胞を調製することができる。本発明の文脈において、 m 段階あるいは n 段階の強度で細胞を標識することには、細胞を標識しないことも含まれる。

10

【0090】

例えば、 $m = 3$ 、 $n = 3$ の場合、18種類の細胞を調製し、18種類の抗体を同時に評価することができる。 $m = 4$ 、 $n = 3$ の場合、24種類の細胞を調製し、24種類の抗体を同時に評価することができる。

【0091】

本発明の一つの態様は、よって、被検者に由来する試料中における $2mn$ 種の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

m は1以上の整数であり、

n は1以上の整数であり、

第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、

該第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程

20

、
該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、

該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程

を含み、

ここで、第1から第 mn の抗原タンパク質がそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一の $mRNA$ から翻訳され、第 $mn + 1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質がそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一の $mRNA$ から翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、

30

第1から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第1細胞グループとし、同様に、第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第2細胞グループ、第 $(m - 1)n + 1$ から第 mn の抗原タンパク質を発現する細胞を第 m 細胞グループ、第 $(2m - 1)n + 1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第 $2m$ 細胞グループとし、第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞が n 種類ずつ $2m$ のグループに分けられており、

第1細胞グループから第 m 細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質または第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 $m + 1$ 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質または第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、

40

第1細胞グループに属する第1から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第2細胞グループから第 $2m$ 細胞グループのそれぞれに属する n 種類の細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の

50

蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能である、方法に関する。

【0092】

いくつかの態様においては、 $2mn$ 未満の種類の抗体の同時検出を行ってもよい。前記第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞のうち、例えば、 $2 \sim 2mn - 1$ 種の細胞のみを調製して使用することもできる。よって、本発明のいくつかの態様は、被検者に由来する試料中における $2mn$ 以下の抗体を同時に検出または測定する方法に関する。

【0093】

また、いくつかの態様において、本発明の方法は、被検者に由来する試料中における複数の抗体を同時に検出または測定する方法であって、

第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞であって、第1から第 mn の抗原タンパク質はそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第 $mn + 1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質はそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、

第1から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第1細胞グループとし、同様に、第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第2細胞グループ、第 $(m - 1)n + 1$ から第 mn の抗原タンパク質を発現する細胞を第 m 細胞グループ、第 $(2m - 1)n + 1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第 $2m$ 細胞グループとし、第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞が n 種類ずつ $2m$ のグループに分けられており、

第1細胞グループから第 m 細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されているか又は第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 $m + 1$ 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質により m 段階の強度でそれぞれ標識されているか又は第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、

第1細胞グループに属する第1から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第2細胞グループから第 $2m$ 細胞グループのそれぞれに属する n 種類の細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質により n 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能である細胞のうち、2以上を調製する工程、

を含む、方法に関する。なお、 m および n は1以上の整数であり、好ましくは1、2、3、4、5を含む10以下の整数である。また、本方法は、2以上の細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程、および細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含むものでありうる。

【0094】

これにより、例えば、 $2 \sim 2mn - 1$ 種の抗体の検査を同時に行うことができる。また、 $2 \sim mn$ 例の被検者に由来する試料中における $2 \sim mn$ 種類の抗体を同時に検出または測定することもできる。第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質はそれぞれ互いに異なるタンパク質であってもよい。第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質のうち少なくとも一つは、AQP4、MOG、NMDA受容体、LGI1、CASPR2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABAB受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、および $kv1.4$ から選択されうる。

【0095】

10

20

30

40

50

上記のように、細胞の標識には抗体を用いてもよい。第1から第4の蛍光タンパク質および第1から第2の蛍光色素の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。なお、例えば、蛍光色素で標識していない細胞、蛍光色素で弱く標識した細胞、蛍光色素で強く標識した細胞といった3段階の強度で標識した細胞を調製することができる。本発明の文脈において、m段階あるいはn段階の強度で細胞を標識することには、細胞を標識しないことも含まれる。

【0096】

このような2以上の細胞を含む細胞懸濁液を複数調製し、各々の細胞懸濁液に対して被検者に由来する試料が1種類加えられるように、複数の細胞懸濁液に複数の被検者に由来する試料を加えることにより、複数の試料中の複数の抗体を分析することができる。例えば、3例の被検者に由来する試料を4種類の抗体について、あるいは4例の被検者に由来する試料を3種類の抗体について、同時に検査することができる。

10

【0097】

(12種類の試料中の抗体の同時検出)

本発明の一つの態様としては、1以上の被検者に由来する12種類の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法が提供される。フローサイトメーターを用いることで、12種類の試料中における目的の抗体の検出および/または測定を簡便かつ精確に同時に行うことができる。一つの態様において、本方法は、第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞を個別の容器中において調製する工程、1以上の被検者に由来する第1から第12の試料を、第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞にそれぞれ加えてインキュベートする工程、被検者に由来する試料を加えた第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞を1つの容器中で混合して細胞懸濁液を得る工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む。ここで、試料を細胞に加えてインキュベートする際には、あらかじめ複数の細胞(例えば第1の抗原タンパク質を発現する細胞と第2の抗原タンパク質を発現する細胞)を混合しておき、それに複数の試料(例えば第1の試料と第2の試料。ここで、第1の試料と第2の試料は同じものであってもよい)を加えてインキュベートしてもよい。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。なお、二次抗体は、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、Dye Cycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5

20

30

40

50

、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどで標識されていてもよい。

【 0 0 9 8 】

いくつかの態様において、本発明の方法では、第1から第12の抗原タンパク質は蛍光タンパク質と融合していてもよい。抗原タンパク質と融合した蛍光タンパク質はそれぞれ同一または異なるものでありうる。例えば、第1から第6の抗原タンパク質が第1の蛍光タンパク質と融合しており、第7から第12の抗原タンパク質が第2の蛍光タンパク質と融合している場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、本発明の方法では、第1から第12の抗原タンパク質はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳されてもよい。抗原タンパク質と同一のmRNAから翻訳される蛍光タンパク質はそれぞれ同一または異なるものでありうる。例えば、第1から第6の抗原タンパク質がそれぞれIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第7から第12の抗原タンパク質がそれぞれIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳される場合、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。いくつかの態様において、本発明の方法では、例えば、第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第10から第12の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されていてもよい。また、例えば、第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第10から第12の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されていてもよい。蛍光色素/蛍光タンパク質としては、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin

10

20

30

40

50

、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどを使用することができる。

【 0 0 9 9 】

いくつかの態様において、本発明の方法では、例えば、第 2、第 5、第 8 および第 11 の抗原タンパク質を発現する細胞は、第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第 3、第 6、第 9 および第 12 の抗原タンパク質を発現する細胞が第 2 の蛍光色素もしくは第 4 の蛍光タンパク質で強く標識されていてもよい。ここで、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とは、例えばフローサイトメーター上で区別可能である。蛍光色素 / 蛍光タンパク質としては、例えば、AcGFP、Alexa Fluor 350、Alexa Fluor 405、Alexa Fluor 430、Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 500、Alexa Fluor 532、Alexa Fluor 555、Alexa Fluor 568、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 633、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 660、Alexa Fluor 680、Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、Alexa Fluor 790、AmCyan、APC-Cy5.5、APC-Cy7、APC-eFluor 780、APC-H7、APC-R700、APC、AsRed2、Azami-Green、BB515、BB700、BUV395、BUV496、BUV563、BUV661、BUV737、BUV805、BV421、BV480、BV510、BV570、BV605、BV650、BV711、BV750、BV785、BV786、Calcein pH 9、Calcein AM、Calcein Violet AM、Cascade Blue、Cascade Yellow、CF488A、CF555、CF647、CF660、CF680、CF750、CF770、CFP、CFSE、EosFP、Cy3、Cy5、Cy7、Cytophase Violet、DAPI、Dendra2、DRAQ5、DRAQ7、DsRed、DsRed2、DsRed-Express、DsRed-Monomer、dTomato、DyeCycle Green、DyeCycle Orange、DyeCycle Ruby、DyeCycle Violet、DyLight 405、DyLight 488、DyLight 549、DyLight 633、DyLight 649、DyLight 680、EBFP、ECFP、eFluor 405、eFluor 450、eFluor 565NC、eFluor 585NC、eFluor 605NC、eFluor 625NC、eFluor 650NC、eFluor 700NC、EGFP、Emerald 300、EmGFP、EYFP、FITC、Flash Phalloidin Green 488、Flash Phalloidin Red 594、Flash Phalloidin NIR 647、FVS440UV、FVS450、FVS510、FVS520、FVS570、FVS575V、FVS620、FVS660、FVS700、FVS780、GFP、GFP2、HcRed、Hoechst 33258、Hoechst 33342、HyPer、JRed、Kaede、KeimaRed、KikumeGR、KillerRed、KusabiraOrange、Lucifer Yellow、Magnesium Green、Marina Blue、mBanana、mCherry、MidoriishiCyan、MitoSpy Green FM、MitoSpy Orange CMTMRos、MitoSpy Red CMXRos、MitoTracker Green、MitoTracker Orange、MitoTracker Red、MitoTracker Deep Red、mOrange、mPlum、mRaspberry、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTFP1、mTurquoise、Na-Green、Nile Red、Oregon Green、Pacific Blue、Pacific Orange、PE、PE-CF594、PE-Cy5、PE-Cy5.5、PE-Cy7、PE-Texas Red、PerCP、PerCP-Cy5.5、PerCP-eFluor 710、PhiYFP、PhiYFP-m、Phycocyanin、PicoGreen、PI、PS-CFP、Qdot 525、Qdot 545、Qdot 565、Qdot 585、Qdot 605、Qdot 625、Qdot 655、Qdot 705、Qdot 800、Rho 110、Rho 123、Rhodamine Red、Riboflavin、Sirius、SNARF-1 (pH6)、SNARF-1 (pH9)、SYBR Green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、SYTOX Red、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagYFP、Texas Red、TMRho、TO-PRO-1、TO-PRO-3、TOTO-1、TOTO-3、TurboFP602、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、V450、V500、Venus、Via-Probe Green、Via-Probe Red、YFP、YO-PRO-1、YO-PRO-3、YOYO-1、YOYO-3、ZsGreen、ZsYellow、7-AADなどを使用することができる。

【 0 1 0 0 】

さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。よって、本発明の態様の一つには、被検者に由来する試料中における第 1 から第 12 の抗体を同時に検出または測定する方法であって、第 1 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第 2 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第 3 の抗原タンパク質を発現する細胞を調製す

10

20

30

40

50

る工程、第4の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第5の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第6の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第7の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第8の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第9の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第10の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第11の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、第12の抗原タンパク質を発現する細胞を調製する工程、該第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞を含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含み、ここで、第1から第12の抗原タンパク質のそれぞれは蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1から第6の抗原タンパク質はそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第7から第12の抗原タンパク質はそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第10から第12の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されており、そして第2、第5、第8および第11の抗原タンパク質を発現する細胞は第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で弱く標識されており、第3、第6、第9および第12の抗原タンパク質を発現する細胞は第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質で強く標識されており、弱く標識された細胞と強く標識された細胞とが区別可能である、方法が含まれる。第4から第6の抗原タンパク質を発現する細胞および第10から第12の抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体で標識されていてもよい。

【0101】

いくつかの態様において、被検者に由来する試料は血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、および尿から選択されてもよい。上記第1から第12の抗原タンパク質は、すべて同じタンパク質であってよく、AQP4、MOG、NMDA受容体、LG1、CASP2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABA_B受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、およびkv1.4から選択されるタンパク質でありうる。上記第1から第12の抗原タンパク質は、必ずしもすべて同じタンパク質である必要はなく、異なる抗原タンパク質を含んでいてもよい。例えば4例の被検者に由来する試料中に含まれる3種の自己抗体の有無を検出できるように、第1から第12の抗原タンパク質を選択することもできる。このような場合は、各自己抗体に対応する3種の細胞を混合した後に各被検者に由来する試料を加えてインキュベートし、それらをさらに1つの容器中に加えて細胞懸濁液を得ることもできる。

【0102】

上記第1の蛍光タンパク質はEGFPであってもよい。上記第2の蛍光タンパク質はmCherryであってもよい。上記第1の蛍光色素は、EGFPと同じ波長のレーザーで励起することが可能なPE-Cy7であってもよい。上記第2の蛍光色素はHoechst 33342であってもよい。上記二次抗体はAlexa Fluor 647で標識されていてもよい。

【0103】

第1の蛍光タンパク質と第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質は、同じ波長のレーザーで励起されるものを使用することができる。同様に、第2の蛍光タンパク質と第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質は、同じ波長のレーザーで励起されるものを使用することもできる。本発明において使用される他の蛍光標識についても同様に、単一のレーザーにより複数の標識が励起されるものを組み合わせて使用することができる。

【0104】

なお、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質と同様に、第1の蛍光色素もしくは

は第3の蛍光タンパク質によって細胞を3段階（陰性、弱陽性、強陽性）に標識することにより、18種類の細胞を調製し、18種類の試料について同時に評価することも可能である。また、4段階の標識と組み合わせることにより、16種類、24種類、32種類の試料の同時評価も可能となる。

【0105】

いくつかの態様においては、12未満の種類の試料中における抗体の同時検出または同時測定を行ってもよい。前記第1から第12の抗原タンパク質を発現する細胞のうち、例えば、2～11種の細胞のみを調製して使用し、2～11種類の試料中における抗体を同時に検出または測定することもできる。また、このような2以上の細胞を含む細胞懸濁液を複数調製し、複数の被検者に由来する試料と反応させることにより、複数の試料中の複数の抗体を分析することができる。例えば、3例の被検者に由来する試料を4種類の抗体について、あるいは4例の被検者に由来する試料を3種類の抗体について、同時に検査することができる。

10

【0106】

（4n種類の試料中の抗体の同時検出）

本発明の別の態様としては、1以上の被検者に由来する4n個の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法が含まれる。ここでnは1以上の整数であり、好ましくは1、2、3、4、5を含む10以下の整数である。フローサイトメーターを用いることで、4n個の試料中における抗体の検出および/または測定を簡便かつ正確に同時に行うことができる。

20

【0107】

一つの態様において、本方法は、第1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞をそれぞれ別個の容器中に調製する工程、1以上の被検者に由来する第1から第4nの試料を、第1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞にそれぞれ加えてインキュベートする工程、被検者に由来する試料を加えた第1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞を1つの容器中で混合して細胞懸濁液を得る工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む。一つの態様において、第1から第4nの抗原タンパク質は同じタンパク質でありうる。また、一つの態様において、第1から第4nの抗原タンパク質は、必ずしもすべて同じタンパク質である必要はなく、異なる抗原タンパク質を含んでいてもよい。試料を細胞に加えてインキュベートする際には、あらかじめ複数の細胞（例えば第1の抗原タンパク質を発現する細胞と第2の抗原タンパク質を発現する細胞）を混合しておき、それに複数の試料（例えば第1の試料と第2の試料。ここで、第1の試料と第2の試料は同じものであってもよい）を加えてインキュベートしてもよい。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。なお、二次抗体を標識する蛍光タンパク質および蛍光色素の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。

30

【0108】

いくつかの態様において、第1から第4nの抗原タンパク質のそれぞれは、蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳されてもよい。例えば、第1から第2nの抗原タンパク質は、それぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第2n+1から第4nの抗原タンパク質は、それぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であってもよい。第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞および第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質で標識されていてもよい。第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞および第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により標識されていても

40

50

よい。第1から第4の蛍光タンパク質および第1から第2の蛍光色素の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。

【0109】

いくつかの態様において、第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞、第2n+1から第3nの抗原タンパク質を発現する細胞、第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞、第2n+1から第3nの抗原タンパク質を発現する細胞、第3n+1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞がそれぞれ区別可能である。例えば、蛍光色素で標識していない細胞、蛍光色素で弱く標識した細胞、蛍光色素で強く標識した細胞といった3段階の強度で標識した細胞を調製することができる。本発明の文脈において、n段階の強度で細胞を標識することには、細胞を標識しないことも含まれる。

10

【0110】

いくつかの態様においては、4n未満の種類の試料中における抗体の同時検出または同時測定を行ってもよい。前記第1から第4nの抗原タンパク質を発現する細胞のうち、例えば、2~4n-1種の細胞のみを調製して使用し、2~4n-1種類の試料中における抗体を同時に検出または測定することもできる。また、このような2以上の細胞を含む細胞懸濁液を複数調製し、複数の被検者に由来する試料と反応させることにより、複数の試料中の複数の抗体を分析することができる。例えば、8例の被検者に由来する試料を2種類の抗体について、あるいは4例の被検者に由来する試料を4種類の抗体について、同時に検査することができる。

20

【0111】

(2mn種類の試料中の抗体の同時検出)

上述した4n種類の試料の同時分析において、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質による標識をm段階に分けることにより、2mn種類の試料の同時分析を行うことができる。よって、本発明の別の態様としては、1以上の被検者に由来する2mn個の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法が含まれる。ここでmおよびnは1以上の整数であり、好ましくは1、2、3、4、5を含む10以下の整数である。フローサイトメーターを用いることで、2mn個の試料中に含まれる抗体の検出および/または測定を簡便かつ精確に同時に行うことができる。2mnは例えば、2、4、6、8、12、16、18、24、32などの値を取り得る。被検者に由来する試料としては、例えば、血清、血漿、全血、脳脊髄液、涙、唾液、尿などを使用することができる。検出対象の抗体が結合する抗原タンパク質としては、例えば、AQP4、MOG、NMDA受容体、LGI1、CASPR2、AMPA受容体、グリシン受容体、GABA_B受容体、ニコチン性アセチルコリン受容体、筋特異的受容体型チロシンキナーゼ、LDL受容体関連タンパク質4、リアノジン受容体、ジヒドロピリジン受容体、kv1.4などを使用することができる。

30

40

【0112】

一つの態様において、本方法は、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞をそれぞれ別個の容器中に調製する工程、1以上の被検者に由来する第1から第2mnの試料を、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞にそれぞれ加えてインキュベートする工程、被検者に由来する試料を加えた第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞を1つの容器中で混合して細胞懸濁液を得る工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含む。ここで、試料を細胞に加えてインキュベートする際には、あらかじめ複数の細胞(例えば第1の抗原タンパク質を発現する細胞と第2の抗原タンパク質を発現する細胞)を混合しておき、それに複数の試料(例えば第1の試料と第2の試料。ここで、第1の試料と第2の試料は同じものであってもよい)を加

50

えてインキュベートしてもよい。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。なお、二次抗体を標識する蛍光タンパク質および蛍光色素の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。第1から第2mnの抗原タンパク質は、同じタンパク質であっても、異なるタンパク質を含んでいてもよい。

【0113】

いくつかの態様において、第1から第2mnの抗原タンパク質のそれぞれは、蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳される。また、いくつかの態様において、第1から第mnの抗原タンパク質はそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第mn+1から第2mnの抗原タンパク質がそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質である。

10

【0114】

いくつかの態様においては、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞のうち、第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞を第1細胞グループとし、同様に、第n+1から第2nの抗原タンパク質を発現する細胞を第2細胞グループ、第(m-1)n+1から第mnの抗原タンパク質を発現する細胞を第m細胞グループ、第(2m-1)n+1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞を第2m細胞グループとして、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞がn種類ずつ2mのグループに分けられ、第1細胞グループから第m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によりm段階の強度でそれぞれ標識され、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能とされており、同様に、第m+1細胞グループから第2m細胞グループは、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質によりm段階の強度でそれぞれ標識され、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能とされうる。第1細胞グループから第m細胞グループは、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体によりm段階の強度でそれぞれ標識されて、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能とされ、同様に、第m+1細胞グループから第2m細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体によりm段階の強度でそれぞれ標識されて、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能とされてもよい。

20

30

【0115】

いくつかの態様においては、上記の第1細胞グループに属する第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能とされ、同様に、第2細胞グループから第2m細胞グループのそれぞれに属するn種類の細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されて、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能とされうる。

【0116】

別の言い方をすれば、いくつかの態様において、第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞は、まず、第1から第mnの細胞からなるグループと、第mn+1から第2mnの細胞からなるグループとに分けられる。この2群の区別は、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質の判別によりなされうる。次に、第1から第mnの細胞からなるグループは、n個の細胞からなるm個の群に分けられる。これらm個の群は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質により各群ごとにm段階の異なる強度でそれぞれ標識されることにより、それぞれ区別されうる。また、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の蛍光強度によりそれぞれ区別されるm個の群にそれぞれ含まれるn個の細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の異なる強度でそれぞれ標識されることにより、それぞれ区別されうる。同様に、第mn+1から第2mnの細胞が

40

50

らなるグループについても、 n 個の細胞からなる m 個の群に分けられる。これら m 個の群は、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質により各群ごとに m 段階の異なる強度でそれぞれ標識されることにより、それぞれ区別されうる。また、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の蛍光強度によりそれぞれ区別される m 個の群にそれぞれ含まれる n 個の細胞は、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質により n 段階の異なる強度でそれぞれ標識されることにより、それぞれ区別されうる。このようにして、蛍光標識に基づきそれぞれ区別可能な $2mn$ 種類の細胞が調製されうる。よって、本発明の一つの態様は、蛍光標識に基づきそれぞれ区別可能な $2mn$ 種類の細胞の調製方法にも関する。

【0117】

上記のように、細胞の標識には抗体を用いてもよい。第1から第4の蛍光タンパク質および第1から第2の蛍光色素の性質は、本発明に係る他の態様に関して記載したものと同様である。なお、例えば、蛍光色素で標識していない細胞、蛍光色素で弱く標識した細胞、蛍光色素で強く標識した細胞といった3段階の強度で標識した細胞を調製することができる。本発明の文脈において、 m 段階あるいは n 段階の強度で細胞を標識することには、細胞を標識しないことも含まれる。

10

【0118】

例えば、 $m = 3$ 、 $n = 3$ の場合、18種類の細胞を調製し、18個の試料を同時に評価することができる。 $m = 4$ 、 $n = 3$ の場合、24種類の細胞を調製し、24個の試料を同時に評価することができる。

【0119】

本発明の態様の一つは、よって、1以上の被検者に由来する $2mn$ 個の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法であって、

20

m は1以上の整数であり、

n は1以上の整数であり、

第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞をそれぞれ別個の容器中に調製する工程、

1以上の被検者に由来する第1から第 $2mn$ の試料を、第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞にそれぞれ加えてインキュベートする工程、

被検者に由来する試料を加えた第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を1つの容器中で混合して細胞懸濁液を得る工程、

30

該細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程、ならびに

該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程

を含み、

ここで、第1から第 mn の抗原タンパク質がそれぞれ第1の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第1の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第 $mn + 1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質がそれぞれ第2の蛍光タンパク質と融合しているか又はIRES発現ベクターを用いて第2の蛍光タンパク質と同一のmRNAから翻訳され、第1の蛍光タンパク質と第2の蛍光タンパク質とは異なる蛍光タンパク質であり、

第1から第 n の抗原タンパク質を発現する細胞を第1細胞グループとし、同様に、第 $n + 1$ から第 $2n$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第2細胞グループ、第 $(m - 1)n + 1$ から第 mn の抗原タンパク質を発現する細胞を第 m 細胞グループ、第 $(2m - 1)n + 1$ から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞を第 $2m$ 細胞グループとし、第1から第 $2mn$ の抗原タンパク質を発現する細胞が n 種類ずつ $2m$ のグループに分けられており、

40

第1細胞グループから第 m 細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質または第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞グループがそれぞれ区別可能であり、同様に、第 $m + 1$ 細胞グループから第 $2m$ 細胞グループが、第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質または第1の蛍光色素もしくは第3の蛍光タンパク質の接合した抗体により m 段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細

50

胞グループがそれぞれ区別可能であり、

第1細胞グループに属する第1から第nの抗原タンパク質を発現する細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能であり、同様に、第2細胞グループから第2m細胞グループのそれぞれに属するn種類の細胞が、第2の蛍光色素もしくは第4の蛍光タンパク質によりn段階の強度でそれぞれ標識されており、各段階の強度で標識された細胞がそれぞれ区別可能である、方法に関する。

【0120】

いくつかの態様においては、2mn未満の種類の試料中における抗体の同時検出または同時測定を行ってもよい。前記第1から第2mnの抗原タンパク質を発現する細胞のうち、例えば、2~2mn-1種の細胞のみを調製して使用し、2~2mn-1種類の試料中における抗体を同時に検出または測定することもできる。また、このような2以上の細胞を含む細胞懸濁液を複数調製し、複数の被検者に由来する試料と反応させることにより、複数の試料中の複数の抗体を分析することができる。例えば、8例の被検者に由来する試料を2種類の抗体について、あるいは4例の被検者に由来する試料を4種類の抗体について、同時に検査することができる。よって、本発明のいくつかの態様は、1以上の被検者に由来する2mn以下の試料中における抗体を同時に検出または測定する方法に関する。

10

【0121】

診断

本発明の方法によれば、被検者に由来する試料中における複数の抗体を同時に検出または測定することにより、疾患の診断に有用な指標を得ることができる。

20

【0122】

例えば、被検者の血清中における抗AQP4抗体の存在は、被検者におけるNMO/NMOSDの存在を指し示しうる。したがって、本発明の方法の態様の一つは、被検者に由来する試料中における抗AQP4抗体および抗MOG抗体を同時に検出または測定する方法であって、AQP4タンパク質（例えばAQP4M23タンパク質）を発現する細胞を調製する工程、MOGタンパク質を発現する細胞を調製する工程、該AQP4タンパク質を発現する細胞と該MOGタンパク質を発現する細胞とを含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含み、試料中における抗AQP4抗体の存在が被検者におけるNMO/NMOSDの存在を指し示す、方法に関する。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。

30

【0123】

また、例えば、被検者の血清中における抗MOG抗体の存在は、被検者における抗MOG抗体関連疾患/MOG抗体疾患の存在を指し示しうる。したがって、本発明の方法の態様の一つは、被検者に由来する試料中における抗AQP4抗体および抗MOG抗体を同時に検出または測定する方法であって、AQP4タンパク質を発現する細胞を調製する工程、MOGタンパク質を発現する細胞を調製する工程、該AQP4タンパク質を発現する細胞と該MOGタンパク質を発現する細胞とを含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含み、試料中における抗MOG抗体の存在が被検者における抗MOG抗体関連疾患/MOG抗体疾患の存在を指し示す、方法に関する。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。

40

【0124】

また、例えば、被検者、特に脱髄性疾患患者の血清中における抗AQP4抗体および抗MOG抗体の不在は、被検者におけるMSの存在を指し示しうる。したがって、本発明の方法の態様の一つは、被検者に由来する試料中における抗AQP4抗体および抗MOG抗体を同時に検出または測定する方法であって、AQP4タンパク質を発現する細胞を調製

50

する工程、M O Gタンパク質を発現する細胞を調製する工程、該A Q P 4タンパク質を発現する細胞と該M O Gタンパク質を発現する細胞とを含む細胞懸濁液を調製する工程、該細胞懸濁液に被検者に由来する試料を加える工程、ならびに該細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程を含み、試料中における抗A Q P 4抗体および抗M O G抗体の不在が被検者におけるM Sの存在を指し示す、方法に関する。さらに、細胞懸濁液中の細胞をフローサイトメーターで分析する工程の前に、細胞懸濁液に蛍光標識した二次抗体を加える工程を行うことができる。

【0125】

同様にして、例えば本願に記載のA Q P 4、M O G以外のタンパク質を利用して、本願に記載の他の疾患の診断に有用な指標を得ることもできる。

10

【0126】

以下に、実施例を示して本発明を具体的に説明するが、これらにより本発明は何ら制限を受けるものではない。

【実施例】

【0127】

<例1：細胞培養と一過性発現の方法>

CHO-K1細胞の培養は、10%ウシ胎児血清、100units/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシンを含むHam's F-12K培地を用いて、37℃、5%CO₂濃度の環境で行った。hAQP4M23 cDNA (配列番号：1)ならびにhMOG isoform alpha1 precursor cDNA (配列番号：2)を、発現ベクターpEGFP-N3のマルチクローニングサイトに挿入したプラスミドを作製した。細胞を播種した翌日、Lipofectamine 3000を用いてトランスフェクションを行い、48時間後にフローサイトメーター測定を行った(図1参照)。

20

【0128】

<例2：フローサイトメーター解析>

ヒトM O Gを発現させたCHO-K1細胞に最終濃度5μg/mLとなるようにHoechst 33342を加え、37℃で20分間のインキュベーションを行った。ヒトA Q P 4 M 2 3を発現させたCHO-K1細胞ならびにHoechst 33342染色を行ったヒトM O Gを発現させたCHO-K1細胞を回収し、それぞれの細胞懸濁液が1.0×10⁶cells/mLとなるように調整した。その後、2種類の細胞懸濁液を等量混ぜ、4℃で2時間のインキュベーションを行った。細胞懸濁液として、3%ウシ胎児血清、2mM EDTAを含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を用いた。

30

【0129】

10⁵cells/100μLの細胞懸濁液に対して10μLの患者血清を加え、4℃で15分間のインキュベーションを行った。その後、細胞懸濁液を用いて遠心洗浄を2回を行い、二次抗体を加えた。二次抗体はAlexa Fluor 647標識抗ヒトIgG抗体を用い、抗体反応濃度は1:500を採用した。4℃で30分間のインキュベーションを行った後、2回の遠心洗浄を行い、488nm青レーザー、640nm赤レーザー、355nmUVレーザーを搭載したベクトン・ディッキンソン社製FACSriaIIを用いて測定した。

40

【0130】

死細胞ならびにダブレットを除いたCHO-K1細胞画分をHoechst 33342青色蛍光強度と側方散乱光で展開し、Hoechst 33342陽性細胞群とHoechst 33342陰性細胞群に対するゲートを設定した。死細胞の染色には7-AADを用いた。Hoechst 33342陽性細胞群とHoechst 33342陰性細胞群をそれぞれEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開し、測定サンプルに含まれるEGFP陽性かつAlexa Fluor 647陽性細胞の割合を算出した。測定したフローサイトメーターデータの解析にはFlowJoを使用した(図2参照)。

【0131】

<例3：患者試料の分析>

視神経脊髄炎関連疾患患者(58歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗

50

体陽性かつ抗M O G抗体陰性)を示したフローサイトメトリ-解析の図を図3 - 1から3 - 8に示す。図3 - 1は、横軸を前方散乱光(Forward Scatter : F S C)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter : S S C)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 1ゲートを作成した図である。5 0 0 0 0細胞の測定を行った。図3 - 2は、図3 - 1のP 1ゲート内に含まれる死細胞を7 - A A D染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP 2ゲートを作成した図である。図3 - 3は、図3 - 2のP 2ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 3ゲートを作成した図である。図3 - 4は、図3 - 3のP 3ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 4ゲートを作成した図である。図3 - 3と図3 - 4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。図3 - 5は、図3 - 4のP 4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とS S Cで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP 5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP 6ゲートを作成した図である。図3 - 6は、図3 - 5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。図3 - 7は、図3 - 5のP 5ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗A Q P 4抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ 2領域に細胞集団が存在する(本データでは、図3 - 5のP 5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち30.4%の細胞が存在する)ことから、本血清は抗A Q P 4抗体陽性であると判断した。図3 - 8は、図3 - 5のP 6ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗M O G抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ 2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図3 - 5のP 6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうち僅かに0.35%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗M O G抗体陰性であると判断した。

【0132】

<例4：患者試料の分析>

視神経脊髄炎関連疾患患者(44歳女性)から採取した血清の検査結果(抗A Q P 4抗体陽性かつ抗M O G抗体陽性)を示したフローサイトメトリ-解析の図を図4 - 1から4 - 8に示す。図4 - 1は、横軸を前方散乱光(Forward Scatter : F S C)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter : S S C)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 1ゲートを作成した図である。5 0 0 0 0細胞の測定を行った。図4 - 2は、図4 - 1のP 1ゲート内に含まれる死細胞を7 - A A D染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP 2ゲートを作成した図である。図4 - 3は、図4 - 2のP 2ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 3ゲートを作成した図である。図4 - 4は、図4 - 3のP 3ゲートをF S CのH e i g h tとW i d t hパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP 4ゲートを作成した図である。図4 - 3と図4 - 4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。図4 - 5は、図4 - 4のP 4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とS S Cで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP 5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP 6ゲートを作成した図である。図4 - 6は、図4 - 5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。図4 - 7は、図4 - 5のP 5ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗A Q P 4抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ 2領域に細胞集団が存在する(本データでは、図4 - 5のP 5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち28.3%の細胞が存在する)ことから、本血清は抗A Q P 4抗体陽性であると判断した。図4 - 8は、図4 - 5のP 6ゲートをE G F P蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗M O G抗体が含まれている場合、Q 2領域に細胞集団が存在

10

20

30

40

50

するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在する（本データでは、図4-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうちの14.0%の細胞が存在する）ことから、本血清は抗MOG抗体陽性であると判断した。

【0133】

<例5：患者試料の分析>

視神経脊髄炎関連疾患患者（57歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体弱陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図を図5-1から図5-8に示す。図5-1は、横軸を前方散乱光（Forward Scatter：FSC）、縦軸を側方散乱光（Side Scatter：SSC）としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。図5-2は、図5-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。図5-3は、図5-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。図5-4は、図5-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図5-3と図5-4によって、細胞集団に含まれるダブルットを除去した。図5-5は、図5-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。図5-6は、図5-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。図5-7は、図5-5のP5ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない（本データでは、図5-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.12%の細胞しか存在しない）ことから、本血清は抗AQP4抗体陰性であると判断した。図5-8は、図5-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在する（本データでは、図5-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうちの3.50%の細胞が存在する）ことから、本血清は抗MOG抗体弱陽性であると判断した。

【0134】

<例6：患者試料の分析>

多発性硬化症患者（23歳女性）から採取した血清の検査結果（抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図を図6-1から図6-8に示す。図6-1は、横軸を前方散乱光（Forward Scatter：FSC）、縦軸を側方散乱光（Side Scatter：SSC）としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。図6-2は、図6-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。図6-3は、図6-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。図6-4は、図6-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図6-3と図6-4によって、細胞集団に含まれるダブルットを除去した。図6-5は、図6-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。図6-6は、図6-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。図6-7は、図6-5のP5ゲ

ートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図6-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.26%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗AQP4抗体陰性であると判断した。図6-8は、図6-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在する(本データでは、図6-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうちの20.1%の細胞が存在する)ことから、本血清は抗MOG抗体陽性であると判断した。

10

【0135】

<例7:患者試料の分析>

多発性硬化症患者(50歳女性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陰性)を示したフローサイトメトリ解析の図を図7-1から図7-8に示す。図7-1は、横軸を前方散乱光(Forward Scatter: FSC)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: SSC)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。図7-2は、図7-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。図7-3は、図7-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。図7-4は、図7-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図7-3と図7-4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。図7-5は、図7-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。図7-6は、図7-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。図7-7は、図7-5のP5ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図7-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.44%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗AQP4抗体陰性であると判断した。図7-8は、図7-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図7-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうち僅かに0.24%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗MOG抗体陰性であると判断した。

20

30

【0136】

<例8:患者試料の分析>

視神経炎患者(78歳男性)から採取した血清の検査結果(抗AQP4抗体陰性かつ抗MOG抗体陽性)を示したフローサイトメトリ解析の図を図8-1から図8-8に示す。図8-1は、横軸を前方散乱光(Forward Scatter: FSC)、縦軸を側方散乱光(Side Scatter: SSC)としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP1ゲートを作成した図である。50000細胞の測定を行った。図8-2は、図8-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。図8-3は、図8-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。図8-4は、図8-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対する

40

50

P 4 ゲートを作成した図である。図 8 - 3 と図 8 - 4 によって、細胞集団に含まれるダブルレットを除去した。図 8 - 5 は、図 8 - 4 の P 4 ゲートを Hoechst 33342 青色蛍光強度と SSC で展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342 陰性細胞群に対して P 5 ゲートを、Hoechst 33342 陽性細胞群に対して P 6 ゲートを作成した図である。図 8 - 6 は、図 8 - 5 の Hoechst 33342 陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342 青色蛍光強度を横軸とした 1 次元ヒストグラムで示した図である。図 8 - 7 は、図 8 - 5 の P 5 ゲートを EGF P 蛍光強度と Alexa Fluor 647 蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗 AQP 4 抗体が含まれている場合、Q 2 領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびに Q 2 領域に細胞集団が存在しない（本データでは、図 8 - 5 の P 5 ゲート Hoechst 33342 陰性細胞群のうち僅かに 0.26% の細胞しか存在しない）ことから、本血清は抗 AQP 4 抗体陰性であると判断した。図 8 - 8 は、図 8 - 5 の P 6 ゲートを EGF P 蛍光強度と Alexa Fluor 647 蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗 MOG 抗体が含まれている場合、Q 2 領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびに Q 2 領域に細胞集団が存在する（本データでは、図 8 - 5 の P 6 ゲート Hoechst 33342 陽性細胞群のうちの 21.4% の細胞が存在する）ことから、本血清は抗 MOG 抗体陽性であると判断した。

10

【0137】

< 例 9 : 患者試料の分析 >

再発性急性散在性脳脊髄炎患者（15 歳女性）から採取した血清の検査結果（抗 AQP 4 抗体陰性かつ抗 MOG 抗体陽性）を示したフローサイトメトリー解析の図を図 9 - 1 から図 9 - 8 に示す。図 9 - 1 は、横軸を前方散乱光（Forward Scatter : FSC）、縦軸を側方散乱光（Side Scatter : SSC）としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対する P 1 ゲートを作成した図である。50000 細胞の測定を行った。図 9 - 2 は、図 9 - 1 の P 1 ゲート内に含まれる死細胞を 7 -AAD 染色試薬を用いて除去し、生細胞に対する P 2 ゲートを作成した図である。図 9 - 3 は、図 9 - 2 の P 2 ゲートを FSC の Height と Width パラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対する P 3 ゲートを作成した図である。図 9 - 4 は、図 9 - 3 の P 3 ゲートを FSC の Height と Width パラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対する P 4 ゲートを作成した図である。図 9 - 3 と図 9 - 4 によって、細胞集団に含まれるダブルレットを除去した。図 9 - 5 は、図 9 - 4 の P 4 ゲートを Hoechst 33342 青色蛍光強度と SSC で展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342 陰性細胞群に対して P 5 ゲートを、Hoechst 33342 陽性細胞群に対して P 6 ゲートを作成した図である。図 9 - 6 は、図 9 - 5 の Hoechst 33342 陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342 青色蛍光強度を横軸とした 1 次元ヒストグラムで示した図である。図 9 - 7 は、図 9 - 5 の P 5 ゲートを EGF P 蛍光強度と Alexa Fluor 647 蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗 AQP 4 抗体が含まれている場合、Q 2 領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびに Q 2 領域に細胞集団が存在しない（本データでは、図 9 - 5 の P 5 ゲート Hoechst 33342 陰性細胞群のうち僅かに 0.40% の細胞しか存在しない）ことから、本血清は抗 AQP 4 抗体陰性であると判断した。図 9 - 8 は、図 9 - 5 の P 6 ゲートを EGF P 蛍光強度と Alexa Fluor 647 蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗 MOG 抗体が含まれている場合、Q 2 領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびに Q 2 領域に細胞集団が存在する（本データでは、図 9 - 5 の P 6 ゲート Hoechst 33342 陽性細胞群のうちの 6.40% の細胞が存在する）ことから、本血清は抗 MOG 抗体陽性であると判断した。

20

30

40

【0138】

< 例 10 : 患者試料の分析 >

健常者（24 歳女性）から採取した血清の検査結果（抗 AQP 4 抗体陰性かつ抗 MOG 抗体陰性）を示したフローサイトメトリー解析の図を図 10 - 1 から図 10 - 8 に示す。図 10 - 1 は、横軸を前方散乱光（Forward Scatter : FSC）、縦軸を側方散乱光（Side Scatter : SSC）としたドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対する P 1 ゲー

50

トを作成した図である。50000細胞の測定を行った。図10-2は、図10-1のP1ゲート内に含まれる死細胞を7-AAD染色試薬を用いて除去し、生細胞に対するP2ゲートを作成した図である。図10-3は、図10-2のP2ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP3ゲートを作成した図である。図10-4は、図10-3のP3ゲートをFSCのHeightとWidthパラメーターで展開したドットプロットを作成し、目的の細胞集団に対するP4ゲートを作成した図である。図10-3と図10-4によって、細胞集団に含まれるダブレットを除去した。図10-5は、図10-4のP4ゲートをHoechst 33342青色蛍光強度とSSCで展開したドットプロットを作成し、Hoechst 33342陰性細胞群に対してP5ゲートを、Hoechst 33342陽性細胞群に対してP6ゲートを作成した図である。図10-6は、図10-5のHoechst 33342陰性細胞群ならびに陽性細胞群を、Hoechst 33342青色蛍光強度を横軸とした1次元ヒストグラムで示した図である。図10-7は、図10-5のP5ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗AQP4抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図10-5のP5ゲートHoechst 33342陰性細胞群のうち僅かに0.076%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗AQP4抗体陰性であると判断した。図10-8は、図10-5のP6ゲートをEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開した等高線プロットである。検査血清に抗MOG抗体が含まれている場合、Q2領域に細胞集団が存在するプロットとなる。本等高線プロットの形状、ならびにQ2領域に細胞集団が存在しない(本データでは、図10-5のP6ゲートHoechst 33342陽性細胞群のうち僅かに0.061%の細胞しか存在しない)ことから、本血清は抗MOG抗体陰性であると判断した。

10

20

【0139】

<例11：複数試料の分析に利用可能な細胞の調製>

複数個の試料(例えば、6種類、12種類、24種類)を同時にアッセイするのに使用可能な細胞の調製を行った。例えば、6種類の試料を同時に分析するためには、以下の6種類の細胞を調製することができる：

1. 第1の抗原タンパク質と第1の蛍光タンパク質(例えばEGFP)の融合タンパク質を発現し、第1の蛍光色素(例えばHoechst 33342)陰性である第1の細胞；
2. 第1の抗原タンパク質と第1の蛍光タンパク質(例えばEGFP)の融合タンパク質を発現し、第1の蛍光色素(例えばHoechst 33342)弱陽性である第2の細胞；
3. 第1の抗原タンパク質と第1の蛍光タンパク質(例えばEGFP)の融合タンパク質を発現し、第1の蛍光色素(例えばHoechst 33342)強陽性である第3の細胞；
4. 第1の抗原タンパク質と第2の蛍光タンパク質(例えばmCherry)の融合タンパク質を発現し、第1の蛍光色素(例えばHoechst 33342)陰性である第4の細胞；
5. 第1の抗原タンパク質と第2の蛍光タンパク質(例えばmCherry)の融合タンパク質を発現し、第1の蛍光色素(例えばHoechst 33342)弱陽性である第5の細胞；
6. 第1の抗原タンパク質と第2の蛍光タンパク質(例えばmCherry)の融合タンパク質を発現し、第1の蛍光色素(例えばHoechst 33342)強陽性である第6の細胞。

30

40

【0140】

ここで、第1、第2、第3の細胞はそれぞれ、第1の蛍光色素による染色が3段階(陰性、弱陽性、強陽性)に調節されている。第4、第5、第6の細胞もそれぞれ、第1の蛍光色素による染色が3段階(陰性、弱陽性、強陽性)に調節されている。第4~第6の細胞は、第2の蛍光タンパク質の代わりに第1の蛍光タンパク質を使用し、細胞に恒常的に発現している膜タンパク質に対する第2の蛍光色素で標識された抗体を使用して標識を行うことにより、区別可能な細胞の数を12種類に増やすこともできる。さらに、第1の蛍光色素による染色のレベルをさらに細分化することにより、細胞の種類を例えば24種類に増やすこともできる。なお、本明細書の記載から明らかなように、融合タンパク質の代わり

50

に I R E S 系を用いて蛍光タンパク質を発現させてもよい。また、蛍光タンパク質融合発現ベクターと I R E S 発現ベクターを併用してもよい。その他、核を染色する色素とそれと同系色の細胞膜、細胞質、細胞小器官、脂質、および糖鎖などを含む、細胞を構成する任意の構造単位を染色する色素を併用することにより細胞を区別することもできる。また、複数種の細胞を併用することもできる。

【0141】

Hoechst 33342陰性の細胞、Hoechst 33342で弱く染色した細胞、およびHoechst 33342で強く染色した細胞を混合し、フローサイトメトリーで分析した結果を図11-1~11-6に示す。CHO-K1細胞を10%ウシ胎児血清、100units/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシンを含むHam's F-12K培地を用いて、37、5%CO₂濃度の環境下で、3枚の培養ディッシュ(培養ディッシュA、培養ディッシュB、培養ディッシュCとする)を用いて培養した。各ディッシュに対する処理は以下の通りであった：

培養ディッシュA：Hoechst 33342による染色を行わない；

培養ディッシュB：Hoechst 33342によって弱く染色を行う；

培養ディッシュC：Hoechst 33342によって強く染色を行う。

【0142】

細胞を播種した72時間後に、培養ディッシュBには最終濃度0.1μg/mLとなるように、培養ディッシュCには最終濃度5μg/mLとなるように、Hoechst 33342を加え、37で20分間のインキュベーションを行った。その後、3枚の培養ディッシュから細胞をそれぞれ回収し、各細胞懸濁液が1.0×10⁶cells/mLとなるように調整した。細胞懸濁液として、3%ウシ胎児血清、2mMEDTAを含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を用いた。3種類の細胞懸濁液を等量混ぜ、488nm青レーザー、640nm赤レーザー、355nmUVレーザーを搭載したベクトン・ディッキンソン社製FA CSArialIを用いて測定した。

【0143】

死細胞ならびにダブレットを除いたCHO-K1細胞画分をHoechst 33342青色蛍光強度と側方散乱光で展開し、Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群に対するゲートを設定した。死細胞の染色には7-AADを用いた。測定したフローサイトメトリーデータの解析にはFlowJoを使用した。図11-5のドットプロットおよび図11-6のヒストグラムから明らかなようにHoechst 33342による染色の度合いを調整することにより、アッセイに用いる細胞の種類を増やすことができる。

【0144】

<例12：12疾患自己抗体の同時測定>

1. 細胞培養と一過性発現の方法

CHO-K1細胞を10%ウシ胎児血清、100units/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシンを含むHam's F-12K培地を用いて、37、5%CO₂濃度の環境下で、12枚の培養ディッシュを用いて培養する。第1の抗原タンパク質をコードする遺伝子1、第2の抗原タンパク質をコードする遺伝子2、第3の抗原タンパク質をコードする遺伝子3、第4の抗原タンパク質をコードする遺伝子4、第5の抗原タンパク質をコードする遺伝子5、第6の抗原タンパク質をコードする遺伝子6をそれぞれ発現ベクターpEGFP-N3のマルチクローニングサイトに挿入した6種類のプラスミドを作製する。第7の抗原タンパク質をコードする遺伝子7、第8の抗原タンパク質をコードする遺伝子8、第9の抗原タンパク質をコードする遺伝子9、第10の抗原タンパク質をコードする遺伝子10、第11の抗原タンパク質をコードする遺伝子11、第12の抗原タンパク質をコードする遺伝子12をそれぞれ発現ベクターpMSCV-IRES-mCherryFPのマルチクローニングサイトに挿入した6種類のプラスミドを作製する。細胞を播種した翌日、12枚の培養ディッシュに対して12種類のプラスミドを1種類ずつ、Lipofectamine 3000を用いてトランスフェクションを行い、48時間後にフ

ローサイトメトリー測定を行う。

【0145】

2. フローサイトメトリー解析

第2の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第5の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第8の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第11の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞にそれぞれ最終濃度 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにHoechst 33342を加える。第3の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第6の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第9の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第12の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞に最終濃度 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるようにHoechst 33342を加える。37 で20分間のインキュベーションを行う。第1の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第2の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第3の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第4の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第5の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第6の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第7の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第8の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第9の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第10の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第11の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞、第12の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞を回収し、それぞれの細胞懸濁液が $1.0 \times 10^6 \text{ cells}/\text{mL}$ となるように調整後、4 で1時間30分のインキュベーションを行う。

10

20

【0146】

その後、第4の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第5の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第6の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第10の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第11の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第12の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液に、CHO-K1細胞に恒常的に発現している膜タンパク質に対する抗体を加え、4 で30分間のインキュベーションを行う。ここで、抗体はPE-Cy7によって標識されているものを使用する。第1の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第2の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第3の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第7の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第8の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液、第9の抗原タンパク質を発現させたCHO-K1細胞懸濁液には何も加えず、引き続き4 で30分間のインキュベーションを行う。細胞懸濁液として、3%ウシ胎児血清、2 mM EDTAを含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を用いる。

30

【0147】

12種類全ての細胞懸濁液からそれぞれ $50 \mu\text{L}$ ずつ取り、 $600 \mu\text{L}$ の細胞懸濁液を作製した後、 $60 \mu\text{L}$ の患者血清を加え、4 で15分間のインキュベーションを行う。その後、細胞懸濁液を用いて遠心洗浄を2回を行い、二次抗体を加える。二次抗体はAlexa Fluor 647標識抗ヒトIgG抗体を用い、抗体反応濃度は1:500を採用する。4 で30分間のインキュベーションを行った後、2回の遠心洗浄を行い、488 nm青レーザー、640 nm赤レーザー、561 nm黄緑レーザー、355 nm UVレーザーを搭載したベクトン・ディッキンソン社製FACSriaIIを用いて測定する。

40

【0148】

死細胞ならびにダブレットを除いたCHO-K1細胞画分をPE-Cy7蛍光強度と側方散乱光で展開し、PE-Cy7陰性細胞群とPE-Cy7陽性細胞群に対するゲートを設定する。死細胞の染色には7-AADを用いる。PE-Cy7陰性細胞群をHoechst 33342青色蛍光強度と側方散乱光で展開し、Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群に対するゲートを設定する。Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群をそれぞれEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開し、測定サンプルに含まれるEGFP陽性かつAle

50

xa Fluor 647陽性細胞の割合を算出する。

【0149】

PE-Cy7陽性細胞群をHoechst 33342青色蛍光強度と側方散乱光で展開し、Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群に対するゲートを設定する。Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群をそれぞれEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開し、測定サンプルに含まれるEGFP陽性かつAlexa Fluor 647陽性細胞の割合を算出する。測定したフローサイトメトリーデータの解析にはFlowJoを使用する。

【0150】

<例13：12検体の同時測定>

1. 細胞培養と一過性発現の方法

CHO-K1細胞を10%ウシ胎児血清、100units/mLペニシリン、100μg/mLストレプトマイシンを含むHam's F-12K培地を用いて、37℃、5%CO₂濃度の環境下で、12枚の培養ディッシュ(培養ディッシュ1、培養ディッシュ2、培養ディッシュ3、培養ディッシュ4、培養ディッシュ5、培養ディッシュ6、培養ディッシュ7、培養ディッシュ8、培養ディッシュ9、培養ディッシュ10、培養ディッシュ11、培養ディッシュ12とする)を用いて培養する。hAQP4M23 cDNA(配列番号: 1)を、発現ベクターpEGFP-N3のマルチクローニングサイトに挿入したプラスミドを作製する。細胞を播種した翌日、培養ディッシュ1、培養ディッシュ2、培養ディッシュ3、培養ディッシュ4、培養ディッシュ5、培養ディッシュ6に対してLipofectamine 3000を用いてトランスフェクションを行う。また、hAQP4M23 cDNA(配列番号: 1)を、発現ベクターpMSCV-IRES-mCherry FPのマルチクローニングサイトに挿入したプラスミドを作製する。細胞を播種した翌日、培養ディッシュ7、培養ディッシュ8、培養ディッシュ9、培養ディッシュ10、培養ディッシュ11、培養ディッシュ12に対してLipofectamine 3000を用いてトランスフェクションを行う。トランスフェクションから48時間後にフローサイトメトリー測定を行う。

【0151】

2. フローサイトメトリー解析

培養ディッシュ2、培養ディッシュ5、培養ディッシュ8、培養ディッシュ11に最終濃度0.1μg/mLとなるようにHoechst 33342を加え、培養ディッシュ3、培養ディッシュ6、培養ディッシュ9、培養ディッシュ12に最終濃度5μg/mLとなるようにHoechst 33342を加え、37℃で20分間のインキュベーションを行う。培養ディッシュ1のCHO-K1細胞、培養ディッシュ2のCHO-K1細胞、培養ディッシュ3のCHO-K1細胞、培養ディッシュ4のCHO-K1細胞、培養ディッシュ5のCHO-K1細胞、培養ディッシュ6のCHO-K1細胞、培養ディッシュ7のCHO-K1細胞、培養ディッシュ8のCHO-K1細胞、培養ディッシュ9のCHO-K1細胞、培養ディッシュ10のCHO-K1細胞、培養ディッシュ11のCHO-K1細胞、培養ディッシュ12のCHO-K1細胞を回収し、それぞれの細胞懸濁液が1.0×10⁶cells/mLとなるように調整後、4℃で1時間30分のインキュベーションを行う。

【0152】

その後、培養ディッシュ4のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液4とする)、培養ディッシュ5のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液5とする)、培養ディッシュ6のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液6とする)、培養ディッシュ10のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液10とする)、培養ディッシュ11のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液11とする)、培養ディッシュ12のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液12とする)に、CHO-K1細胞に恒常的に発現している膜タンパク質に対する抗体を加え、4℃で30分間のインキュベーションを行う。抗体はPE-Cy7によって標識されているものを使用する。培養ディッシュ1のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液1とする)、培養ディッシュ2のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液2とする)、培養

10

20

30

40

50

ディッシュ3のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液3とする)、培養ディッシュ7のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液7とする)、培養ディッシュ8のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液8とする)、培養ディッシュ9のCHO-K1細胞懸濁液(CHO-K1細胞懸濁液9とする)には何も加えず、引き続き4で30分間のインキュベーションを行う。細胞懸濁液として、3%ウシ胎児血清、2mM EDTAを含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を用いる。

【0153】

10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液1に対して10 μLの検体者1の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液2に対して10 μLの検体者2の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液3に対して10 μLの検体者3の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液4に対して10 μLの検体者4の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液5に対して10 μLの検体者5の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液6に対して10 μLの検体者6の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液7に対して10 μLの検体者7の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液8に対して10 μLの検体者8の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液9に対して10 μLの検体者9の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液10に対して10 μLの検体者10の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液11に対して10 μLの検体者11の血清を加え、10⁵ cells / 100 μLのCHO-K1細胞懸濁液12に対して10 μLの検体者12の血清を加え、4で15分間のインキュベーションを行う。その後、12種類全ての細胞懸濁液からそれぞれ50 μLずつ取り、600 μLの細胞懸濁液を作製する。細胞懸濁液を用いて遠心洗浄を2回を行い、二次抗体を加える。二次抗体はAlexa Fluor 647標識抗ヒトIgG抗体を用い、抗体反応濃度は1:500を採用する。4で30分間のインキュベーションを行った後、2回の遠心洗浄を行い、488nm青レーザー、640nm赤レーザー、561nm黄緑レーザー、355nmUVレーザーを搭載したベクトン・ディッキンソン社製FACSriaIIを用いて測定する。

10

20

【0154】

死細胞ならびにダブレットを除いたCHO-K1細胞画分をPE-Cy7蛍光強度と側方散乱光で展開し、PE-Cy7陰性細胞群とPE-Cy7陽性細胞群に対するゲートを設定する。死細胞の染色には7-AADを用いる。PE-Cy7陰性細胞群をHoechst 33342青色蛍光強度と側方散乱光で展開し、Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群に対するゲートを設定する。Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群をそれぞれEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開し、測定サンプルに含まれるEGFP陽性かつAlexa Fluor 647陽性細胞の割合を算出する。

30

【0155】

PE-Cy7陽性細胞群をHoechst 33342青色蛍光強度と側方散乱光で展開し、Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群に対するゲートを設定する。Hoechst 33342陰性細胞群、Hoechst 33342弱陽性細胞群、Hoechst 33342強陽性細胞群をそれぞれEGFP蛍光強度とAlexa Fluor 647蛍光強度で展開し、測定サンプルに含まれるEGFP陽性かつAlexa Fluor 647陽性細胞の割合を算出する。測定したフローサイトメトリーデータの解析にはFlowJoを使用する。

40

【0156】

本明細書には、本発明の好ましい実施態様を示してあるが、そのような実施態様が単に例示の目的で提供されていることは、当業者には明らかであり、当業者であれば、本発明から逸脱することなく、様々な変形、変更、置換を加えることが可能であろう。本明細書に記載されている発明の様々な代替的实施形態が、本発明を実施する際に使用されることが理解されるべきである。また、本明細書中において参照している特許および特許出願

50

書類を含む、全ての刊行物に記載の内容は、その引用によって、本明細書中に明記された内容と同様に取り込まれていると解釈すべきである。

【産業上の利用可能性】

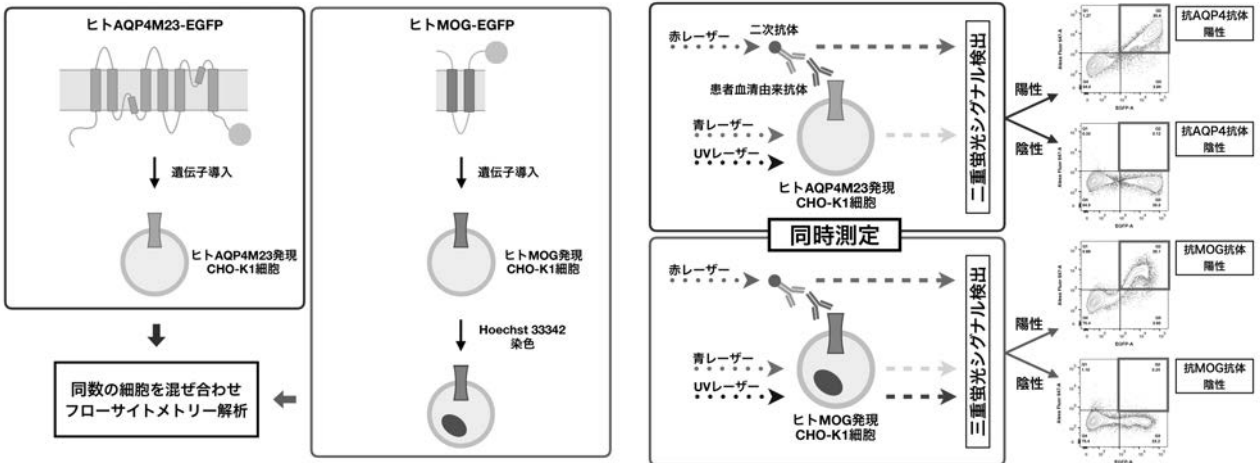
【0157】

本発明者らは、フローサイトメトリーを用いて簡便かつ高感度に抗体を検出することを可能とする手法を開発した。本発明者らが開発した手法により、抗AQP4抗体および抗MOG抗体などの複数の抗体を同時に高感度に検出することができる。例えば抗AQP4抗体と抗MOG抗体の検出は、多発性硬化症、視神経脊髄炎スペクトラム疾患、および抗MOG抗体関連疾患 / MOG抗体疾患の診断に有用な情報を提供しうる。また、本発明者らが開発した手法により、複数の試料中に含まれる抗体の分析を同時に行うことが可能となる。

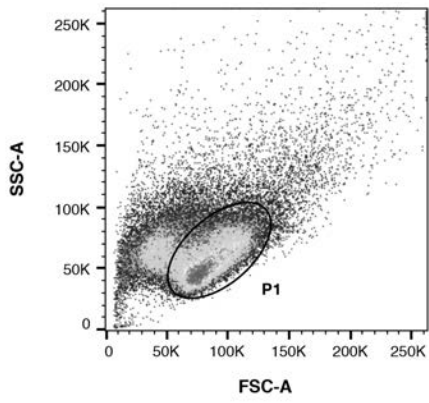
10

【図1】

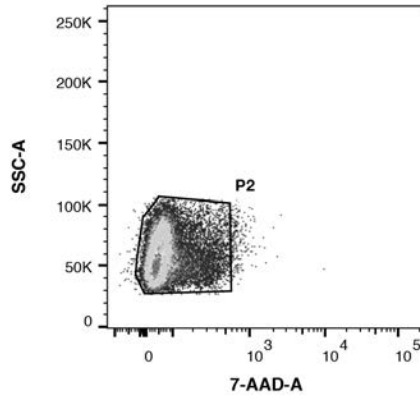
【図2】



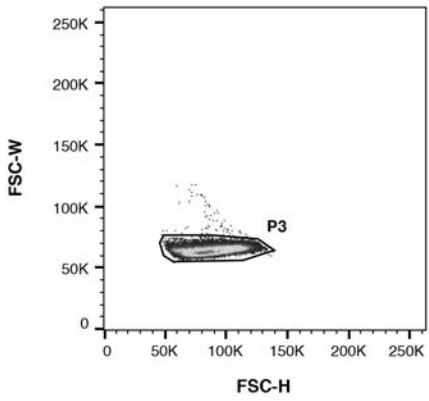
【 図 3 - 1 】



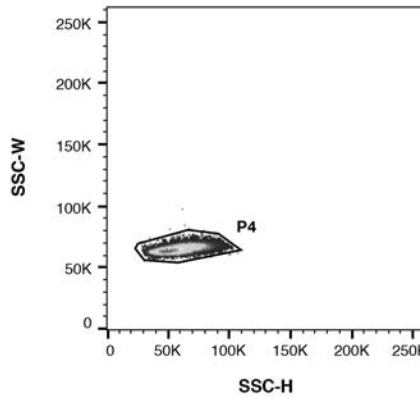
【 図 3 - 2 】



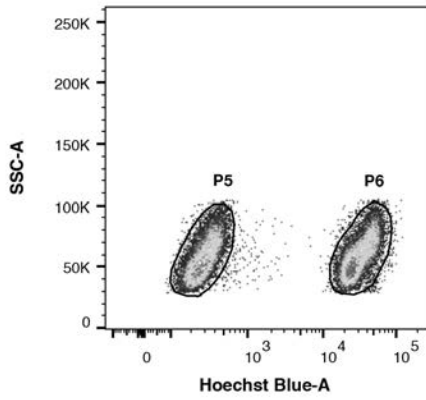
【 図 3 - 3 】



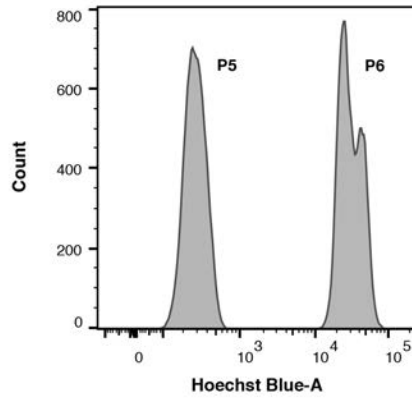
【 図 3 - 4 】



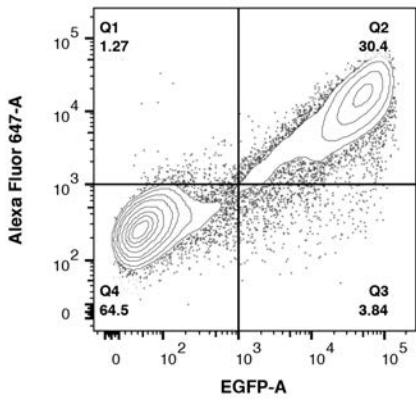
【 図 3 - 5 】



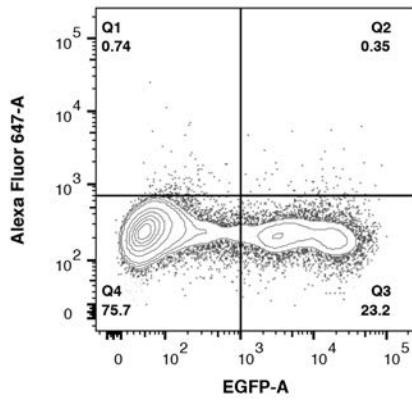
【 図 3 - 6 】



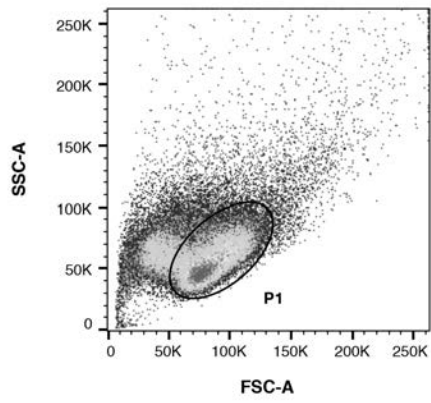
【 図 3 - 7 】



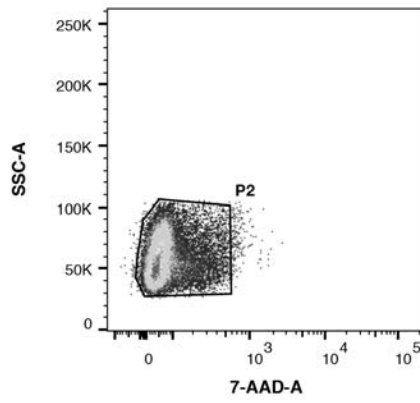
【 図 3 - 8 】



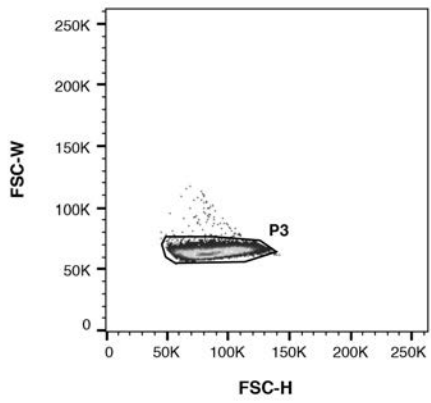
【 図 4 - 1 】



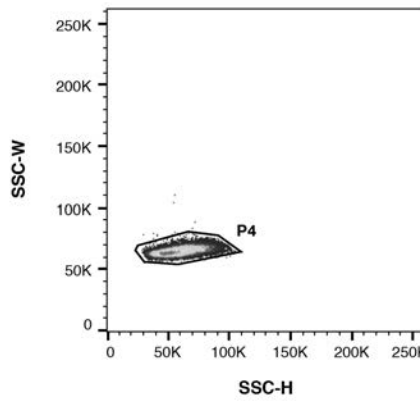
【 図 4 - 2 】



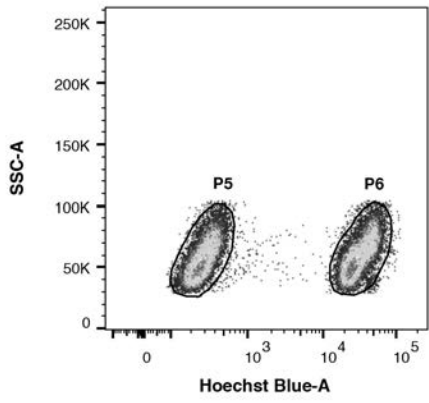
【 図 4 - 3 】



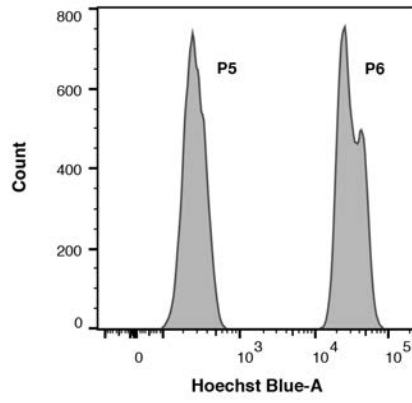
【 図 4 - 4 】



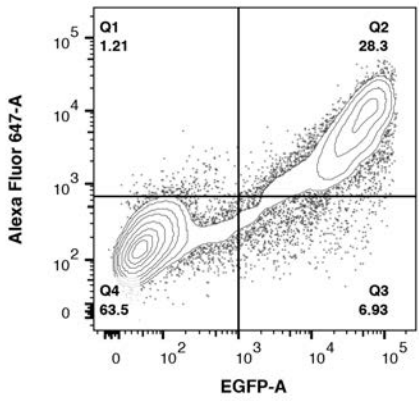
【 図 4 - 5 】



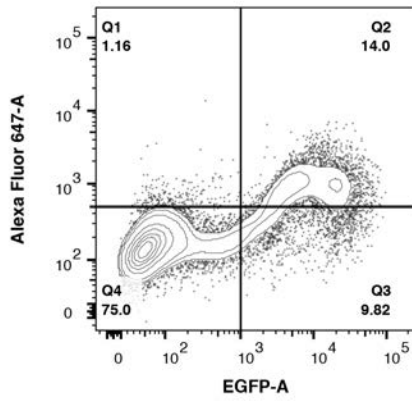
【 図 4 - 6 】



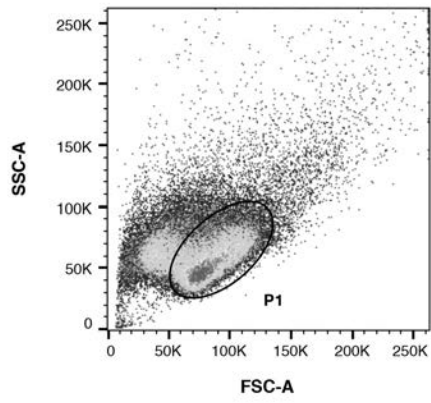
【 図 4 - 7 】



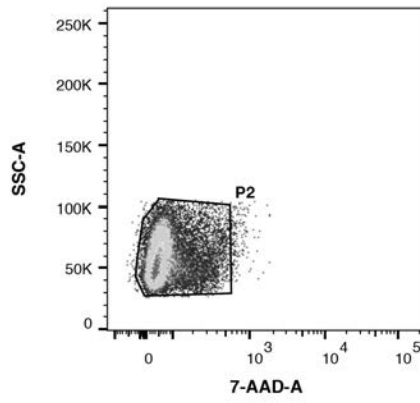
【 図 4 - 8 】



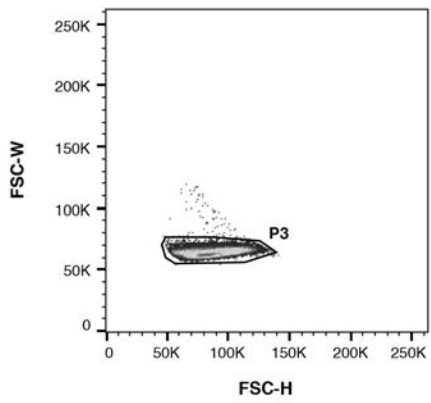
【 図 5 - 1 】



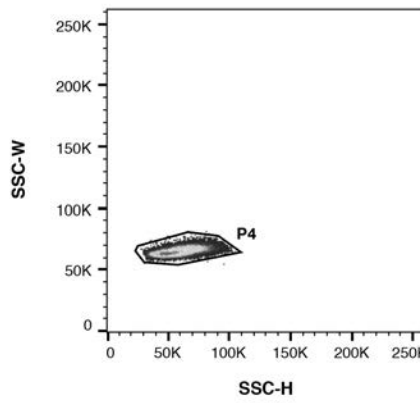
【 図 5 - 2 】



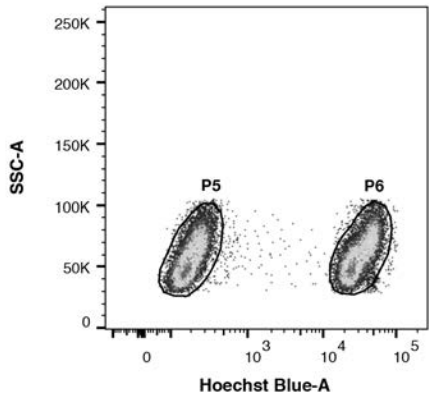
【 図 5 - 3 】



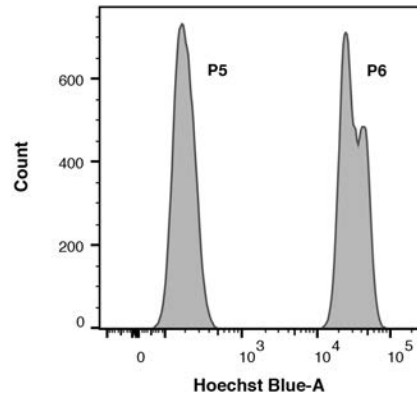
【 図 5 - 4 】



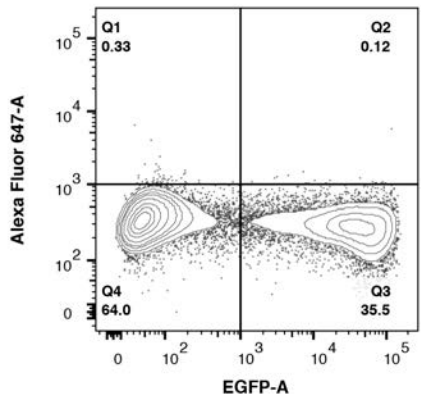
【 図 5 - 5 】



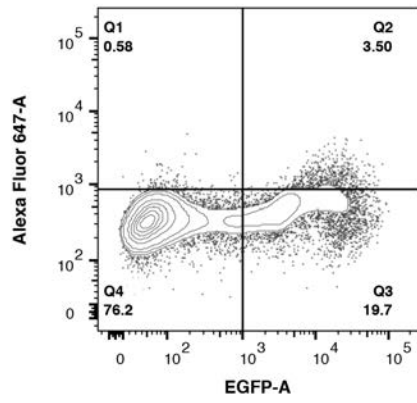
【 図 5 - 6 】



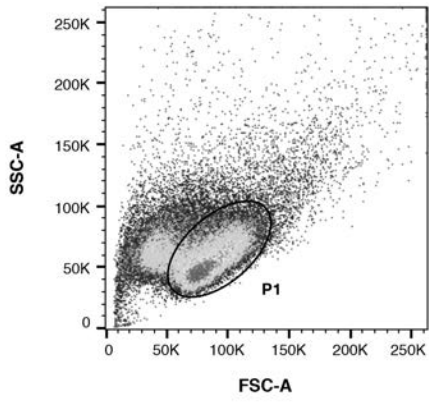
【 図 5 - 7 】



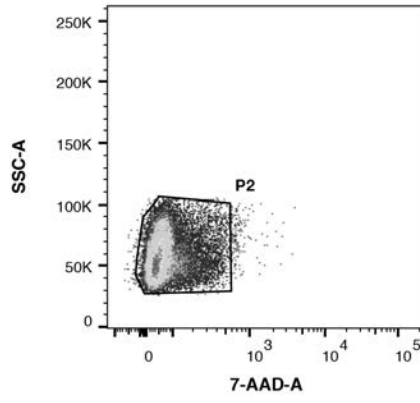
【 図 5 - 8 】



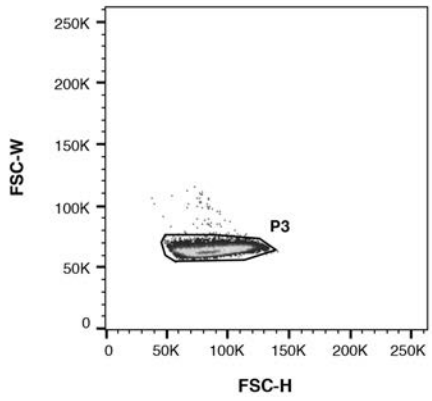
【 図 6 - 1 】



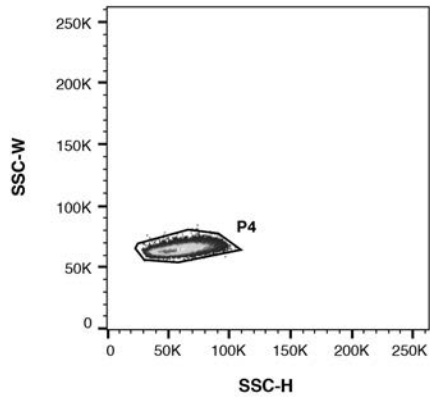
【 図 6 - 2 】



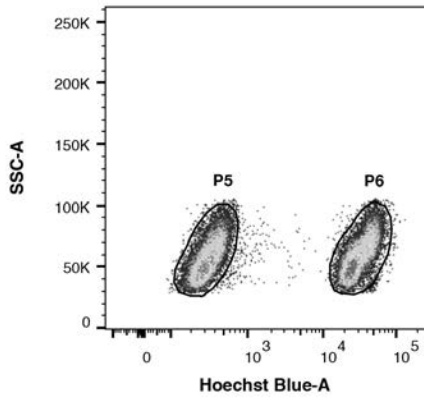
【 図 6 - 3 】



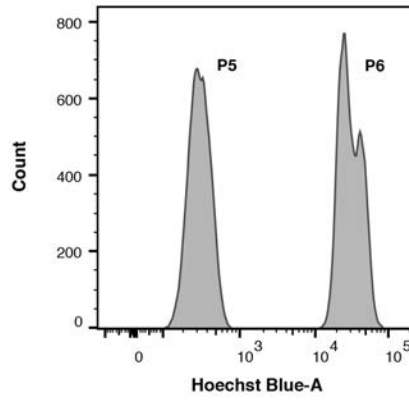
【 図 6 - 4 】



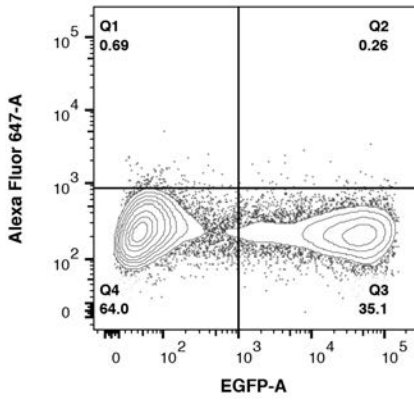
【 図 6 - 5 】



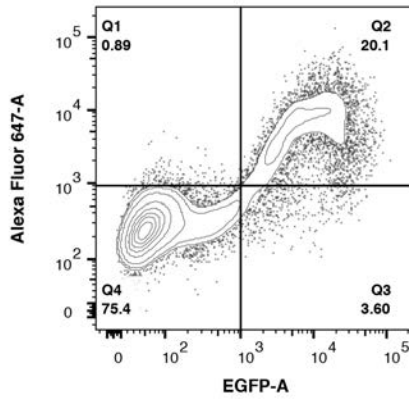
【 図 6 - 6 】



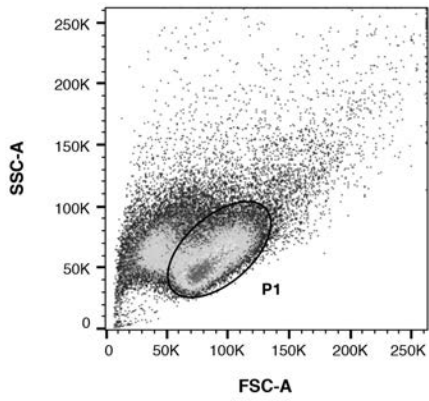
【 図 6 - 7 】



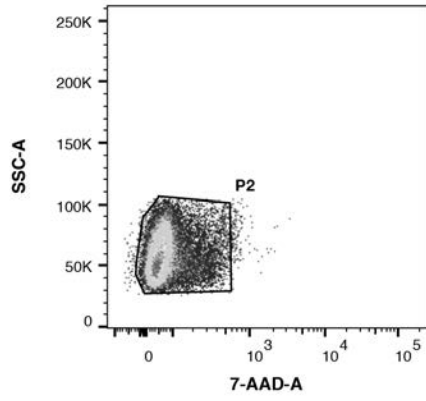
【 図 6 - 8 】



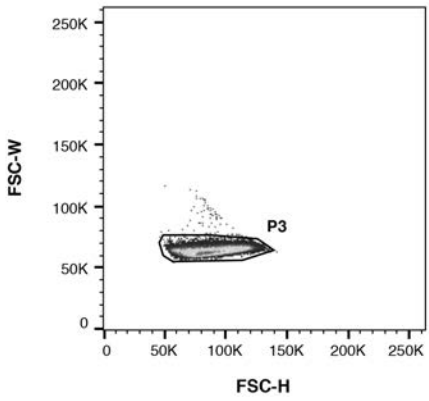
【 図 7 - 1 】



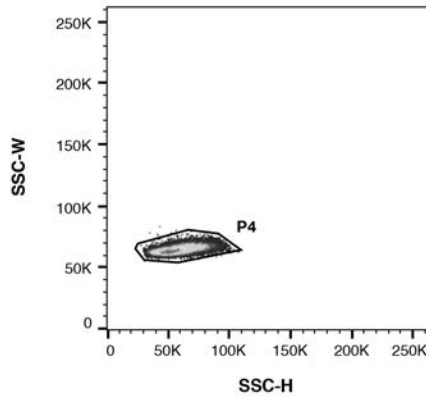
【 図 7 - 2 】



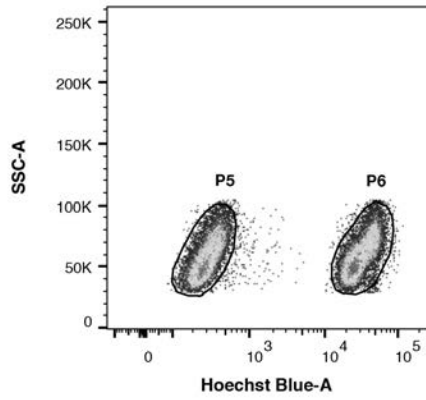
【 図 7 - 3 】



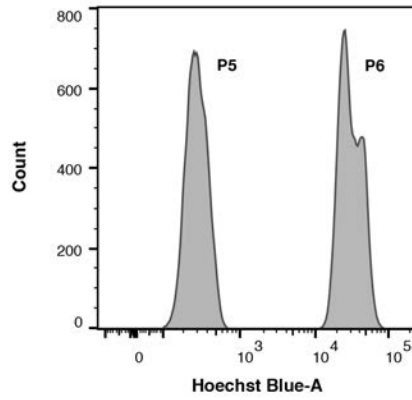
【 図 7 - 4 】



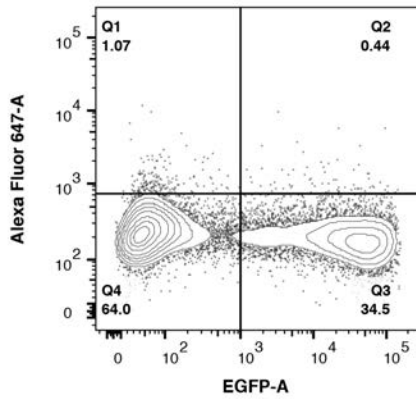
【 図 7 - 5 】



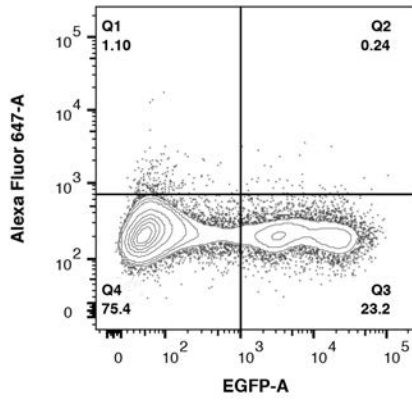
【 図 7 - 6 】



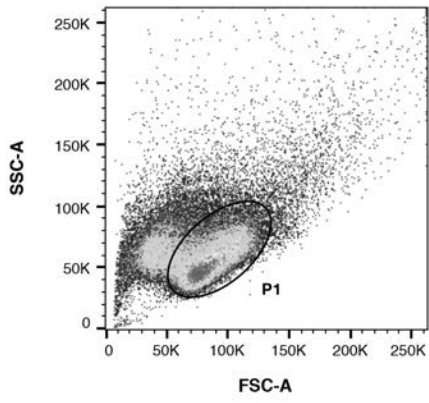
【 図 7 - 7 】



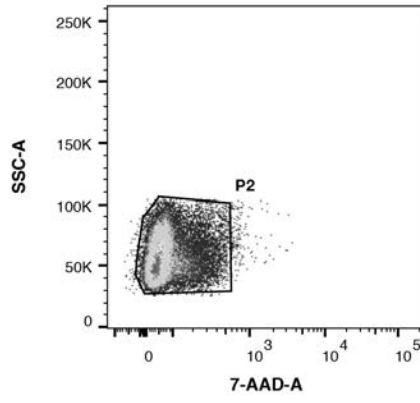
【 図 7 - 8 】



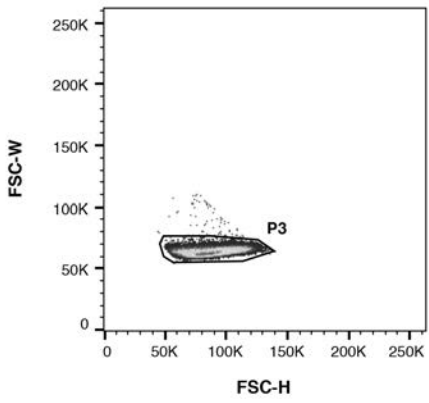
【 図 8 - 1 】



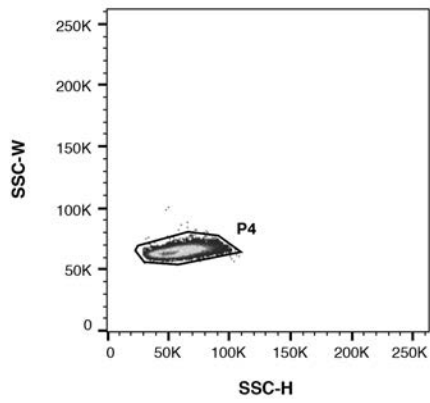
【 図 8 - 2 】



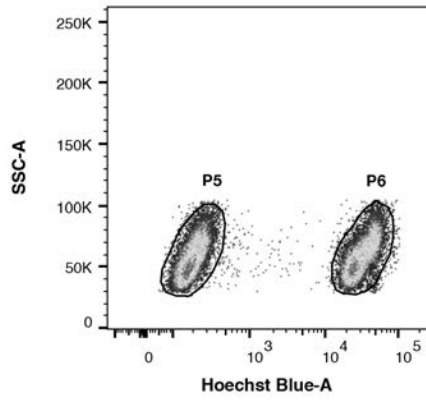
【 図 8 - 3 】



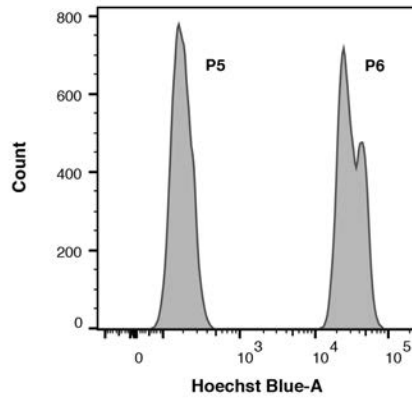
【 図 8 - 4 】



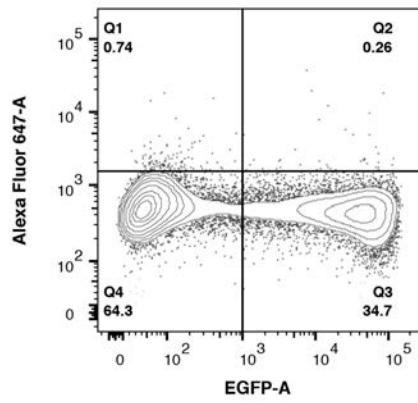
【 図 8 - 5 】



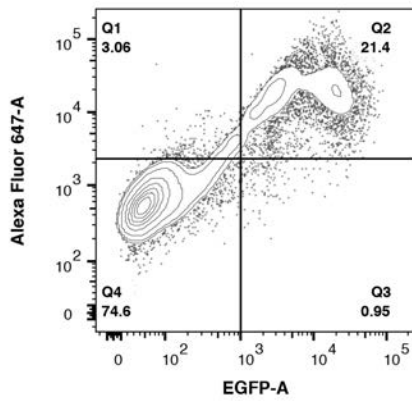
【 図 8 - 6 】



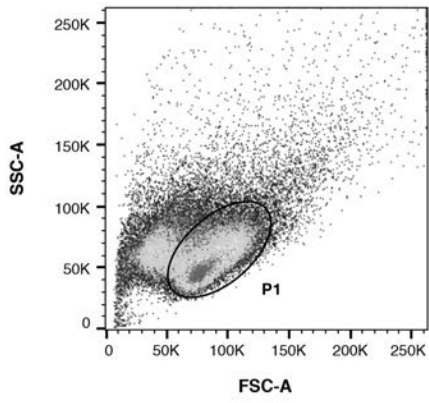
【 図 8 - 7 】



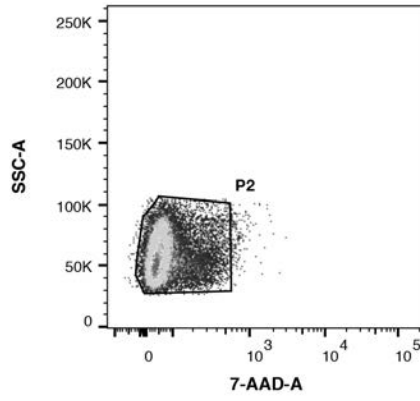
【 図 8 - 8 】



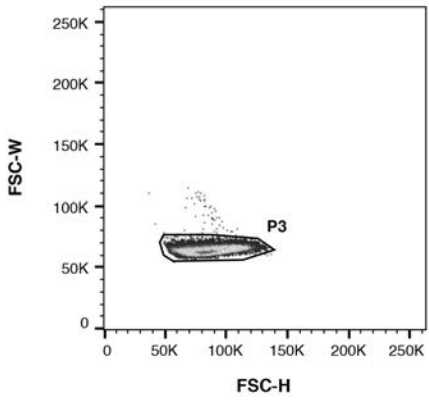
【 図 9 - 1 】



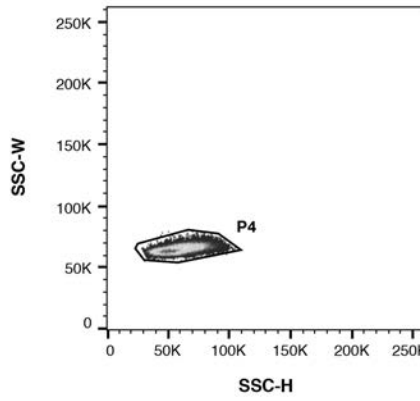
【 図 9 - 2 】



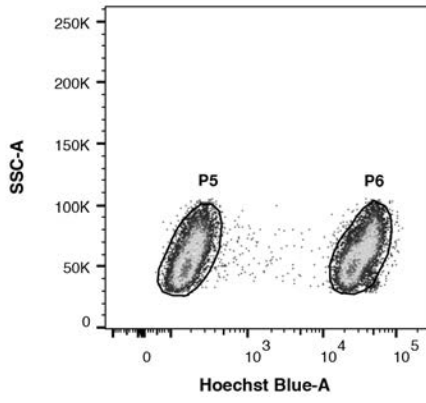
【 図 9 - 3 】



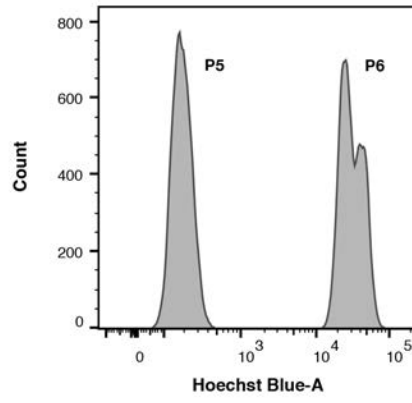
【 図 9 - 4 】



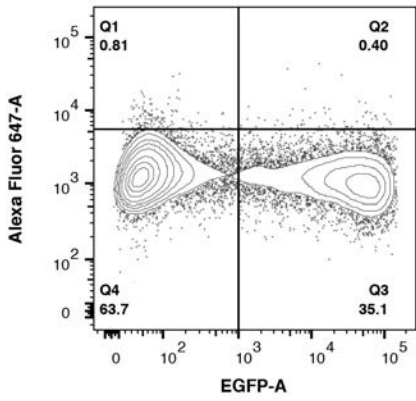
【 図 9 - 5 】



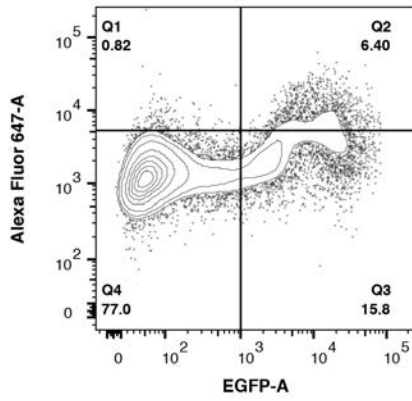
【 図 9 - 6 】



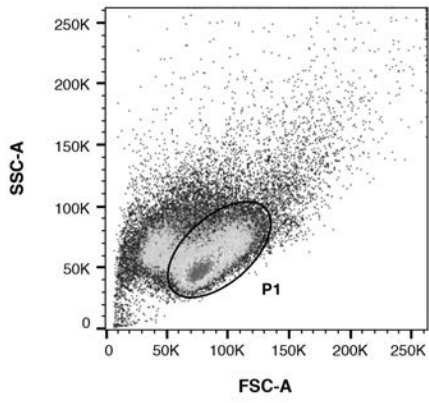
【 図 9 - 7 】



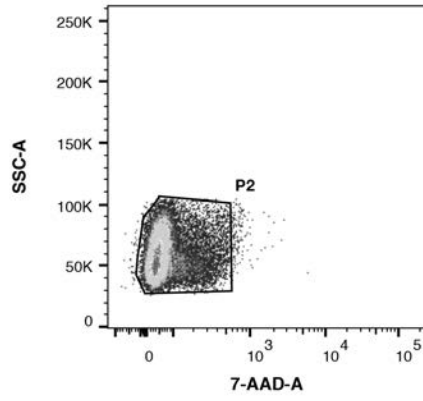
【 図 9 - 8 】



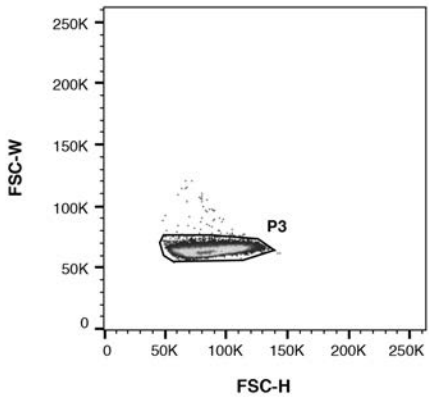
【 図 1 0 - 1 】



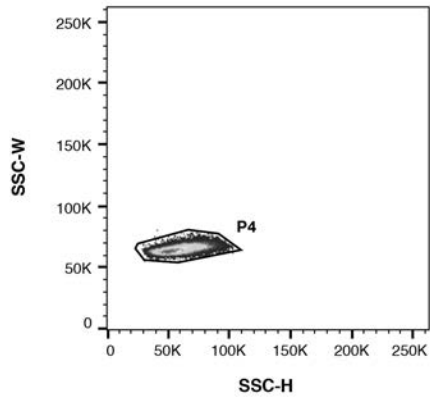
【 図 1 0 - 2 】



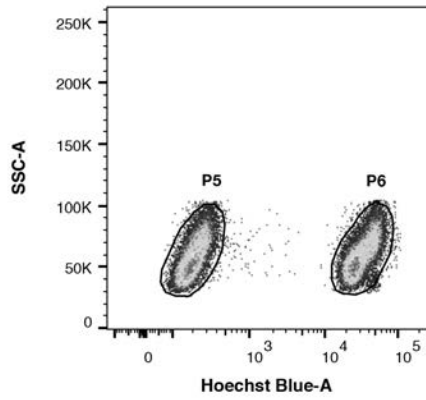
【 図 1 0 - 3 】



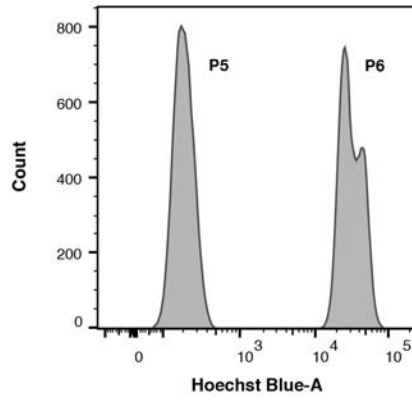
【 図 1 0 - 4 】



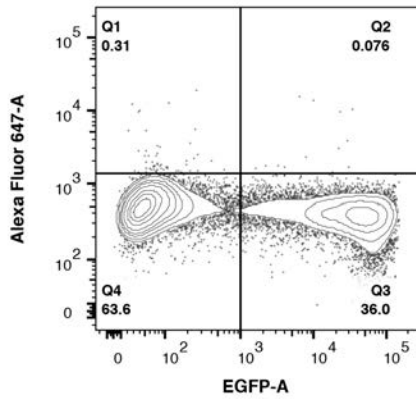
【 図 1 0 - 5 】



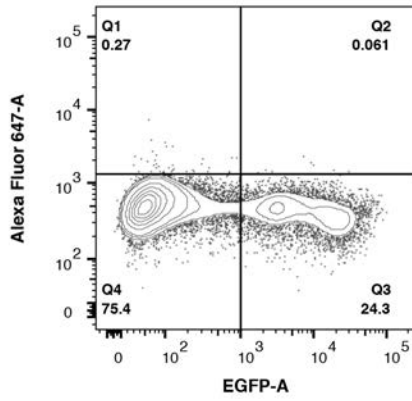
【 図 1 0 - 6 】



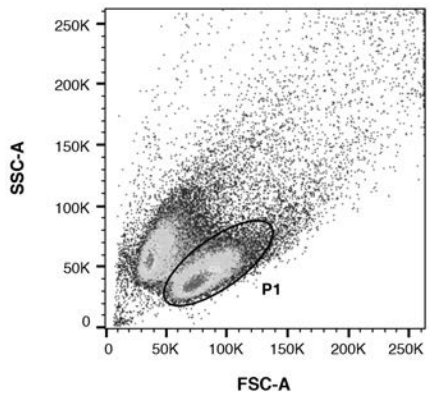
【 図 1 0 - 7 】



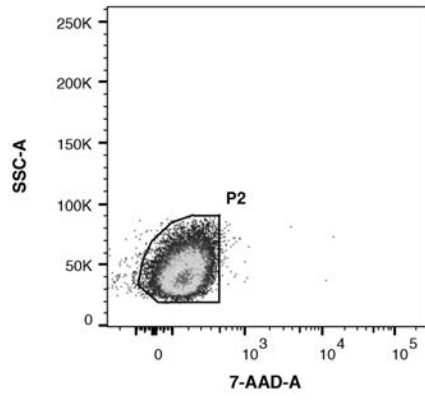
【 図 1 0 - 8 】



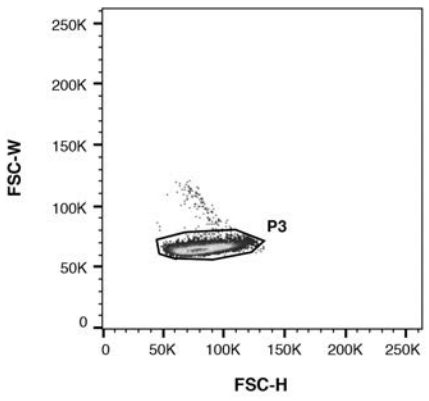
【 図 1 1 - 1 】



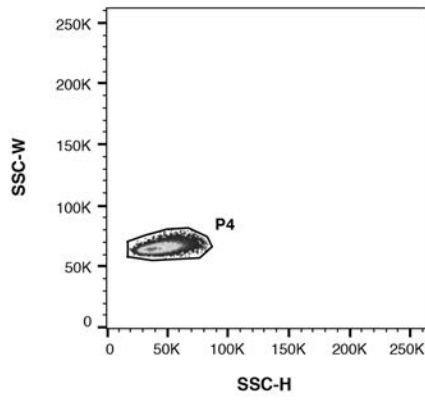
【 図 1 1 - 2 】



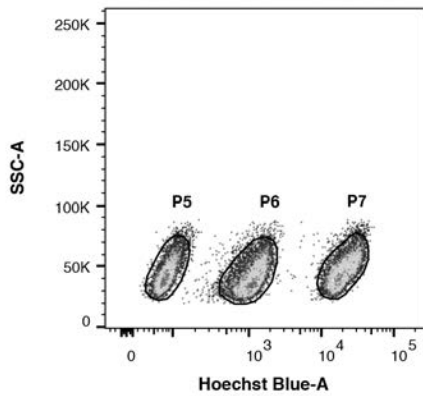
【 図 1 1 - 3 】



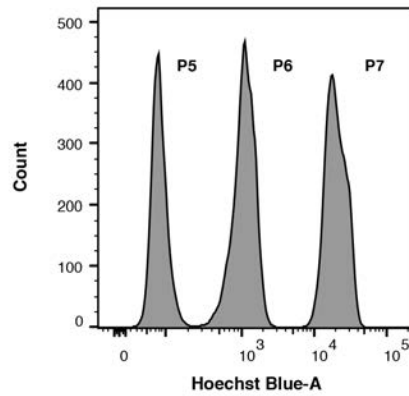
【 図 1 1 - 4 】



【 図 1 1 - 5 】



【 図 1 1 - 6 】



【 図 1 2 】

NCBI Reference Sequence : NM_004028
 CDS : 349 - 1254
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_004028

```

ATGGTGGCTTTCAAAGGGGTCGGACTCAAGCTTTCTGAAAGCAGTCACAGCGAAATTCCTGGCCA
TGCTTATTTTGTTCCTCAGCCTGGGATCCACCATCAACTGGGTGGAAACAGAAAACCTTTACC
GGTCGACATGGTTCTCATCTCCCTTTGCTTTGGACTCAGCATGCAACCATGGTCAGTGCCTTGGC
CATATCAGCGGTGGCCACATCAACCTTGCAGTGACTGTGGCCATGGTGTGCCACCGAAGATCAGCA
TCGCCAAGTCTCTCTTACATCGCAGCCCACTGCCCTGGCGCCATCATTTGGAGCAGGAATCCTTA
TCTGGTCACACCTCCAGTGTGGTGGGAGGCCITGGAGTCACCAATGGTTCAATGAAATCTTACCGCT
GGTCATCTCTCCCTGGTTGAGTTGAAATCACATTTCAAATGGTGGTTACTATCTTTGGCAGCTGTG
ATTCCAAACGGACTGATGTCAGTGGCTCAATAGCTTTAGCAATGGATTTTCTGTGCANTGGACA
TTTATTTGCAATCAATTAATCTGTTGCCAGCATGAATCCCGCCGATCCCTTTGGACCTGCAGTTATC
ATGGGAAATTCGCAAAACCATGGATATATTTGGCTGGGCCCATCATAGGAGCTCTCTGGCTGTG
GCCTTTATGAGTATGCTCTCTGTCCAGATGTTGAATTCAAACCTCGTTTAAAGAAGCTTCAGCAA
AGCTGCCAGCAAAACAAAGGAAGCTACATGGAGGTGGAGGACAACAGGAGTCAGGTAGAGACGGAT
GACCTGATTTCTAAACCTCCAGTGTTCATGTGATTTGACCTTGCACCGGGAGAGGAGAAGAAGCGGA
AAGACCAATCTGGAGAGGTATTGCTTCAGTATGA
  
```

【 図 1 3 】

NCBI Reference Sequence : NM_206809
 CDS : 230 - 973
https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_206809

```

ATGGCAAGCTTATCAAGACCCCTCTCTGCCAGCTGCCTCTGCTCCTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCC
AAGTGTCTCCAGCTATGCAGGCGAGTTCAGAGTGATAGSACCAAGACACCCATCCGGGCTCTGGT
CGGGGATGAAGTGGAAATGGCCATGTGCATATCTCCTGGGAAGACGCTACAGGCATGGAGTGGGG
TGTTACCGCCCCCTCTCTAGGGTGGTTCATCTCTACAGAAATGGCAAGGACCAAGATGGAGACC
AGGCACCTGAATATCGGGCCCGCAGAGCTCCTCAAAGATGCTATTGCTGAGGAAAGGTGACTCT
CAGGATCCGGAATGTAAGGTTCTCAGATGAAGGAGTTTACCTGCTTCTTCGGAGATCATCTTTAC
CAAGAGGAGGAGCAATGGAATTTGAAAGTAGAAGATCCTTTCTACTGGGTGAGCCCTGGAGTGTGG
TTCTCCTCGCGGTGCTGCTGCTCCTCCTGCAGATCACTGTTGGCCTCATCTTCTCTGCTGCA
GTACAGACTGAGAGGAAAACCTCGAGCAGAGATAGAGAATCCACCGGACTTTTGTATCCCACTTT
CTGAGGTTGCCCTGCTGGAAGATAACCTGTTTGAATTTGCGCGTCTTGGACCTTGGTTCCT
TGATCATCTGCTACAACCTGGCTACATCGAAGACTAGCAGGGCAATTCCTTGAAGAGCTACGAAATCC
CTTCCTGA
  
```

【配列表】

2019152604000001.app

フロントページの続き

Fターム(参考) 4H045 AA11 AA30 BA41 BA70 CA40 DA76 DA86 EA20 EA50 FA74

专利名称(译)	基于细胞分析法的高通量抗体检测方法		
公开(公告)号	JP2019152604A	公开(公告)日	2019-09-12
申请号	JP2018039602	申请日	2018-03-06
[标]发明人	藤吉好則		
发明人	谷村 幸宏 廣明 洋子 藤吉 好則		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 G01N33/536 C07K19/00 C07K14/46		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.597 G01N33/536.D C07K19/00.ZNA C07K14/46		
F-TERM分类号	4H045/AA11 4H045/AA30 4H045/BA41 4H045/BA70 4H045/CA40 4H045/DA76 4H045/DA86 4H045/EA20 4H045/EA50 4H045/FA74		
代理人(译)	伊藤 克博 渡边真一		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供一种抗体高通量检测方法，以提供对包括多发性硬化症，视神经脊髓炎谱系疾病和抗MOG抗体相关疾病/ MOG抗体疾病在内的疾病的诊断有用的信息。解决方案：多种抗体，例如通过使用多个荧光标记和CBA方法中的流式细胞术，可以同时检测抗AQP4抗体和抗MOG抗体的表达。通过使用基于CBA方法的流式细胞仪，可以高效率，高通量，简便，高效，廉价地检测标本中包含的抗体。而且，通过使用活细胞维持准确的抗原蛋白三维立体构型，检测灵敏度大大提高。此外，一次测量可同时检测多种抗体，一次测量可获取具有定量功能的大量数据。

