

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2013-531259
(P2013-531259A)

(43) 公表日 平成25年8月1日(2013.8.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 5	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 K	
	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
	GO 1 N 33/543 5 2 1	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 53 頁)

(21) 出願番号 特願2013-520156 (P2013-520156)
 (86) (22) 出願日 平成23年7月21日 (2011.7.21)
 (85) 翻訳文提出日 平成25年3月1日 (2013.3.1)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/062560
 (87) 国際公開番号 W02012/010666
 (87) 国際公開日 平成24年1月26日 (2012.1.26)
 (31) 優先権主張番号 1055973
 (32) 優先日 平成22年7月21日 (2010.7.21)
 (33) 優先権主張国 フランス (FR)
 (31) 優先権主張番号 61/409,393
 (32) 優先日 平成22年11月2日 (2010.11.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 506371224
 ディアガスト
 D I A G A S T
 フランス国ルー、アブニュ、ユージェーヌ
 、アピネ、ユラサンテ、パルク、2 5 1
 (74) 代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74) 代理人 100102118
 弁理士 春名 雅夫
 (74) 代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74) 代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74) 代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 赤血球の血液型判定および表現型判定における抗体／抗原複合体の実証のための磁氣的免疫診断法およびキット

(57) 【要約】

本発明は、抗体／抗原複合体の血液型および表現型の判定のための磁気による免疫診断法に関する。そのような方法は、抗体または抗原、好ましくはある血液型の抗抗原抗体または抗原の検出および／または同定を伴う。これらの方法は、赤血球を認識して特異的に磁化することのできる抗体抗グリコホリンAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を伴う。本発明はまた、そのような方法を実施するためのキットも含む。

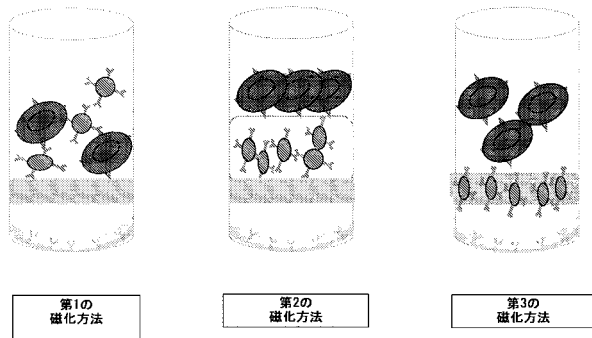
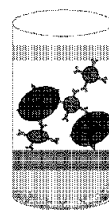


FIGURE 10



1st magnetization method

FIGURE 11



2nd magnetization method

FIGURE 12



3rd magnetization method

【特許請求の範囲】**【請求項1】**

以下のいくつかの段階で構成される、溶液中に存在する血液型または表現型の抗抗原抗体 (anti-antigen antibody) を、赤血球によって保有される血液型または表現型の抗原と反応させることによって形成される特異的複合体の実証のための方法であって、該赤血球が磁性粒子と結合しており、反応が、開いた上部および密封された基部を有する反応器内で起こり、反応器の直径が、少なくとも基部に近接した領域では傾斜壁を形成するように小さくなっており、傾斜壁が、抗免疫グロブリンで、または該形成された複合体の抗体と結合しうる他の任意の化合物で、少なくとも部分的にコーティングされている、方法：

(a) 赤血球を担持する磁性粒子懸濁液を、血液型または表現型由来の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に：

反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性溶液で満たす段階；

(b) 反応器に含まれる粘性溶液の上で、該抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液を、赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させる段階；

(c) 赤血球を担持する磁性粒子と、溶液中に含まれる可能性がある血液型または表現型の抗抗原抗体との複合体の形成のために、および、赤血球が含む血液型または表現型の該抗原を特異的に認識するために必要な所定の時間にわたって反応器をインキュベーションする段階；

(d) 磁性粒子が反応器の底面および/または傾斜壁の方へ引き寄せられるように、該反応器に対して磁場を印加し、かつ反応器を攪拌する段階；ならびに

(e) 該抗免疫グロブリンでまたは抗体と結合しうる他の任意の化合物でコーティングされた反応器の底面および/または反応器の傾斜壁で得られた画像を、肉眼でおよび/または他の任意の適した読み取りシステムで読み取る段階であって、この得られた画像によって、ヒト血液型または表現型の特異的な抗体/抗原複合体の形成の有無を実証することが可能になり、該赤血球を担持する磁性粒子が、抗グリコホリンA (抗GPA) 抗体で予めコーティングされた磁性粒子であること、および該赤血球が抗体/抗原型の相互作用によって該磁性粒子と結合していることを特徴とする、段階。

【請求項2】

赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に、赤血球を担持する磁性粒子の該懸濁液が、1を上回りかつ前記粘性溶液の密度を下回る密度を有する希釈液中で懸濁状態であることを特徴とする、請求項1記載の方法。

【請求項3】

段階(a)および(b)が以下であることを特徴とする、請求項2記載の方法：

(a) 赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、ヒト血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に：

(i) 反応器の外で、赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を調製する段階、

(ii) 反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性溶液で満たし、続いて該希釈液で満たす段階；

(b) 段階(a)(i)で調製された赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、該抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液と、希釈液の上で接触させる段階。

【請求項4】

段階(a)および(b)が以下であることを特徴とする、請求項2記載の方法：

(a) 赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、ヒト血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に：

反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性溶液で満たし、続いて該希釈液で、続いて、抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液で、続いて赤血球懸濁液で満たす段階；

(b) 反応器内で、該抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液を、形成されたかまたは形成中の赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させる段階。

【請求項5】

段階(a)および(b)が以下であることを特徴とする、請求項2記載の方法：

(a) 赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、ヒト血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に：

(i) 前記反応器の外で、抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を調製する段階であって、該磁性粒子が該希釈液中で懸濁状態である、段階、または、既に調製されたそのような懸濁液を入手する段階、

(ii) 反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性溶液で満たし、続いて、段階(a)(i)で調製された該希釈液中の抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液で、続いて赤血球懸濁液で満たす段階；

(b) 反応器内で、該抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液を、形成されたかまたは形成中の赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させる段階。

【請求項6】

以下を特徴とする、請求項5記載の方法：

段階(a)(i)の最後に、希釈液中で懸濁状態である赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を形成させるために、反応器の外で、該磁性粒子を該希釈液中に懸濁状態で含む前記懸濁液を赤血球懸濁液と接触させること；および

段階(a)(ii)で、反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性溶液で満たし、続いて、該希釈液中で懸濁状態である赤血球を担持する磁性粒子の該懸濁液で満たすこと；

(b) 反応器内で、該抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液を、赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させること。

【請求項7】

ラボラトリーオートメーションによる分配の自動化の一部としての好ましい自動化された態様において、段階(a)および(b)が以下であることを特徴とする、請求項5記載の方法：

(a) 赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、ヒト血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に：

(i) 前記反応器の外で、抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を調製する段階であって、該磁性粒子が前記希釈液中で懸濁状態である段階、または、既に調製されたそのような懸濁液を入手する段階、

(ii) 反応器を、赤血球の懸濁液で満たし、続いて、段階(a)(i)で調製された該希釈液中の抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液で満たし、続いて、攪拌後に必要な場合、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように、前記粘性物質で満たす段階であって、該粘性物質が反応器の底面に注入される、段階；

(b) 反応器内で、該抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液を、形成されたかまたは形成中の赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させる段階。

【請求項8】

段階(d)で、前記反応器に対する磁場の印加および反応器の攪拌を同時に実施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】

段階(d)で、磁場の印加および攪拌を2.5分間~10分間の期間、好ましくは5分間~6分間の期間にわたって同時に実施することを特徴とする、請求項1~8のいずれか一項記載の方法。

【請求項10】

段階(d)において、磁場の印加が、反応器の外側下方に配置された磁石によって、磁性粒子が反応器の底面の方へ引き寄せられるように実施されることを特徴とする、請求項1~9のいずれか一項記載の方法。

【請求項11】

段階(d)において、前記磁石が、10,000ガウス~14,000ガウスの範囲の規模の永久磁

10

20

30

40

50

石であることを特徴とする、請求項10記載の方法。

【請求項12】

段階(d)において、攪拌が回転攪拌機によって実施されることを特徴とする、請求項1~11のいずれか一項記載の方法。

【請求項13】

段階(d)において、攪拌が250rpm~750rpmの範囲の速度で、好ましくは600rpmで実施されることを特徴とする、請求項12記載の方法。

【請求項14】

段階(c)において、20~40の温度、好ましくは37±1の温度で、インキュベーションの持続時間が、10分間~30分間の範囲であることを特徴とする、請求項1~13のい

10

【請求項15】

磁性粒子が100nm~3,0μm、好ましくは200nm~1,5μmの直径を有することを特徴とする、請求項1~14のいずれか一項記載の方法。

【請求項16】

前記磁性粒子が、強磁性化合物を重量比で少なくとも40%含むことを特徴とする、請求項1~15のいずれか一項記載の方法。

【請求項17】

前記粘性物質が1を上回る密度を有することを特徴とする、請求項1~16のいずれか一項記載の方法。

20

【請求項18】

前記粘性物質がゲルから選択される、好ましくは、30%±10%のPVP(ポリビニルピロリドン)、PVP-40もしくはPVP-60の中から、またはさらにアルブミン溶液中またはさらにはゼラチン中の、20nm~300nmのさまざまなビーズ直径を有するデキストランSephadex(商標)またはSepharose(商標)、好ましくはsuperfine G-100(商標)またはSepharose(商標)4Bもしくは6Bに由来するゲルから選択されることを特徴とする、請求項1~17のいずれか一項記載の方法。

【請求項19】

段階(b)において、赤血球懸濁液が粘性溶液の後および前記希釈液の後に積み重ねられる場合、前記抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液を、該赤血球懸濁液より前に積み重ねることができることを特徴とする、請求項1~18のいずれか一項記載の方法。

30

【請求項20】

前記希釈液が、前記粘性溶液の密度を上回りかつ前記抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液の密度を上回る密度を有することを特徴とする、請求項1~19のいずれか一項記載の方法。

【請求項21】

反応器が丸底またはV字底のマイクロプレート穴であることを特徴とする、請求項1~20のいずれか一項記載の方法。

【請求項22】

抗体溶液が、血液型または表現型の抗原に対して特異的に指向する抗体の存在を実証しようとするヒト血漿試料またはヒト血清試料であり、かつ抗免疫グロブリンがヒト抗免疫グロブリン(HAG)であることを特徴とする、請求項1~21のいずれか一項記載の方法。

40

【請求項23】

磁性ビーズによって保有される赤血球がO型の赤血球である段階を含むことを特徴とする、ヒト血漿または血清における不規則抗体検査(IAT)のための、請求項1~22のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】

以下の段階を含む、血液型判定および/または表現型判定のための方法：

(a) 抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を調製する段階であって、該磁性粒子が希釈液中で懸濁状態である、段階、または、既に調製されたそのような懸濁液を入手す

50

る段階、

(b) (i) 抗GPAでコーティングされた該磁性粒子の懸濁液を、血液型および/または表現型を判定することが望まれる赤血球の懸濁液と接触させる段階、

(ii) 反応器内で、段階(b)において形成されたかまたは形成中の赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、既知の特異性を有する抗体を含む血清検査薬と接触させる段階、

(iii) かき混ぜまたは攪拌する段階、

(c) 赤血球を担持する磁性粒子と血清検査薬との複合体の形成のために必要な所定の期間にわたって反応器をインキュベーションする段階；

(d) 磁性粒子が反応器の底面および/または傾斜壁の方へ引き寄せられるように、該反応器に対する磁場を印加する段階および反応器を攪拌する段階；ならびに

(e) 反応器の底面および/または反応器の傾斜壁で得られた画像を、肉眼でおよび/または他の任意の適切な読み取りシステムで読み取る段階であって、この得られた画像によって、ヒト血液型または表現型の特異的な抗体/抗原複合体の形成の有無を実証することが可能になる、段階。

【請求項25】

段階(d)において、磁性粒子が反応器の底面の方へ引き寄せられるように、攪拌段階とともに、反応器に対する磁場が印加され；かつ

段階(e)において、反応器の底面で得られたかまたはそうでない凝集反応を肉眼でおよび/または他の任意の適切な読み取りシステムで読み取り、この特異的凝集により、ヒト血液型または表現型の特異的な抗体/抗原複合体の形成の存在が実証される、

請求項24記載の血液型判定および/または表現型判定のための方法。

【請求項26】

段階(b) (ii)において、前記血清検査薬が溶液状態であるかまたは乾燥形態であることを特徴とする、請求項24~25のいずれか一項記載の血液型判定および/または表現型判定のための方法。

【請求項27】

磁性粒子が100nm~3,0 μ m、好ましくは200nm~1,5 μ mの直径を有することを特徴とする、請求項24~26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】

磁性粒子が強磁性化合物を重量比で少なくとも40%含むことを特徴とする、請求項24~27のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】

段階(d)において、磁場の印加が、反応器の外側下方に配置された磁石によって、磁性粒子が反応器の底面の方へ引き寄せられるように実施されることを特徴とする、請求項24~28のいずれか一項記載の方法。

【請求項30】

段階(d)において、磁石が、10,000ガウス~14,000ガウスの範囲の規模の永久磁石であることを特徴とする、請求項24~29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】

段階(b) (iii)および/または(d)において、攪拌が回転攪拌機によって実施されることを特徴とする、請求項24~30のいずれか一項記載の方法。

【請求項32】

段階(d)において、前記反応器に対する磁場の印加および反応器の攪拌が同時に実施されることを特徴とする、請求項24~31のいずれか一項記載の方法。

【請求項33】

段階(b) (iii)において、かき混ぜ(または攪拌)の適用が、5秒間~3分間の期間、好ましくは1分間~2分間の期間にわたって実施されることを特徴とする、請求項24~32のいずれか一項記載の方法。

【請求項34】

段階(b) (iii)において、攪拌が、10秒間の間に1000rpm~1200rpmの範囲の速度、好

10

20

30

40

50

ましくは1200rpmで実施されることを特徴とする、請求項24～33のいずれか一項記載の方法。

【請求項35】

段階(d)において、攪拌が、500rpm～800rpm、好ましくは650rpm～750rpmの範囲の速度、好ましくは700rpmで実施されることを特徴とする、請求項24または25記載の方法。

【請求項36】

段階(c)において、より好ましくは温度20～40℃、好ましくは室温または37℃で、インキュベーションの持続時間が、2分間～30分間、好ましくは8～20分間の範囲にわたることを特徴とする、請求項24～35のいずれか一項記載の方法。

【請求項37】

段階(d)において、より好ましくは20～40℃の温度、好ましくは室温で、磁化の持続時間が、2分30秒間～7分間の範囲、好ましくは5分間であることを特徴とする、請求項24～36のいずれか一項記載の方法。

【請求項38】

段階(d)の後および(e)の前に、凝集していない赤血球を懸濁させるために一連のかき混ぜをより高速で実行し(800～1000rpmで1分間～2分30秒間)、その後任意で、存在する場合、分散した小さな凝集物を集合させるための新たな攪拌段階(「再収集段階」)をより低い速度(350～550rpm、1分間～2分間)で実行することを特徴とする、請求項24～37のいずれか一項記載の方法。

【請求項39】

血清検査薬がIgG型である場合に、抗IgG-免疫グロブリン溶液をIgG抗体血清検査薬の濃縮溶液と混合することによって、凝集した試薬を予備的に完成させることを特徴とする、請求項24～38のいずれか一項記載の方法。

【請求項40】

ヒト血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液が、既知の血液型/表現型特異性を有する抗体を含む血清検査薬である、血液型判定および/または表現型判定のための、請求項1～21のいずれか一項記載の方法。

【請求項41】

反応器が丸底またはV字底のマイクロプレート穴であることを特徴とする、請求項24～40のいずれか一項記載の方法。

【請求項42】

赤血球を保有する磁性粒子の懸濁液における赤血球濃度が0.2%～2.5%、好ましくは0.5%～1.5%、好ましくは1%±0.3%であることを特徴とする、請求項24～41のいずれか一項記載の方法。

【請求項43】

磁性粒子の濃度が0.001～0.007%であることを特徴とする、請求項24～42のいずれか一項記載の方法。

【請求項44】

磁性粒子の濃度が0.007%±0.001%であることを特徴とする、請求項24～42のいずれか一項記載の方法。

【請求項45】

抗GPA抗体が好ましくはマウスまたはヒト起源である哺乳動物抗体であり、赤血球によって保有されるヒトグリコホリンAを特異的に認識することができ、好ましくはシアロ糖タンパク質グリコホリンAに、好ましくはその膜外ドメインに指向することを特徴とする、請求項24～44のいずれか一項記載の方法。

【請求項46】

抗GPA抗体が、シアロ糖タンパク質グリコホリンAの細胞外部分由来のエピトープに指向するモノクローナル抗体であり、該エピトープがM抗原またはN抗原を部分的に担持するかまたは全く担持せず、とりわけ該エピトープがグリコホリンA(成熟鎖)のN末端の1～5アミノ酸の断片を含まないことを特徴とする、請求項45記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項47】

抗GPA抗体を、 $5\mu\text{g}/\text{mg} \sim 25\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子、好ましくは $20\mu\text{g}/\text{mg} \pm 3\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子の濃度で磁性粒子に連結させることを特徴とする、請求項24～46のいずれか一項記載の方法。

【請求項48】

抗GPA抗体を、 $1\mu\text{g}/\text{mg} \sim 5\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子、好ましくは $2.5\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子の濃度で磁性粒子に連結させることを特徴とする、請求項24～46のいずれか一項記載の方法。

【請求項49】

磁性粒子の懸濁液が、非イオン性界面活性剤、好ましくはsynperonic(商標)PE/F68、Tween(商標)(20、40または80)を、 $0.1\% \sim 1\%$ (w/v)、好ましくは $0.25\% \sim 0.75\%$ (m/v)または $0.5\% \pm 0.15\%$ の濃度で含む懸濁液であることを特徴とする、請求項24～48のいずれか一項記載の方法。 10

【請求項50】

磁性粒子の懸濁液が、非イオン性界面活性剤、好ましくはsynperonic(商標)PE/F68、Tween(商標)(20、40または80)を、 $0.5\% \sim 10\%$ 、好ましくは $5\% \pm 0.15\%$ (w/v)の濃度で含む懸濁液であることを特徴とする、請求項24～48のいずれか一項記載の方法。

【請求項51】

溶液中に存在する血液型もしくは表現型の抗抗原抗体と、赤血球によって保有される血液型もしくは表現型の抗原との反応によって形成される特異的複合体を実証するための、とりわけIATのための、または交差適合検査もしくは直接Coombs検査を実施するための、または血液型判定および/もしくは表現型判定のためのキットであって、以下を含むことを特徴とする、キット： 20

抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を含む試薬。

【請求項52】

抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液が、請求項1～50のいずれか一項記載の方法に定義された通りであって、特に請求項1～50のいずれか一項記載の方法に定義された通りの希釈液中にある、特に、好ましくは多糖性である親水性ポリマーを、好ましくはFicoll(商標)、とりわけFicoll(商標)400を、 $1\% \sim 2.5\%$ (w/v)、好ましくは $2\% \pm 0.3\%$ の濃度で含む溶液である希釈液中にある、請求項48記載のキット。

【請求項53】

溶液中に存在する血液型もしくは表現型の抗抗原抗体と、赤血球によって保有される血液型もしくは表現型の抗原との反応によって形成される特異的複合体を実証するための、とりわけIATもしくは交差適合検査を実施するための、または血液型判定もしくは表現型判定のためのキットであって、以下を含むことを特徴とする、キット： 30

(a) 請求項1～50のいずれか一項記載の方法に定義された通りの希釈液中の、特に、好ましくは多糖性である親水性ポリマー、好ましくはFicoll(商標)、とりわけFicoll(商標)400を、 $1\% \sim 2.5\%$ (w/v)、好ましくは $2\% \pm 0.3\%$ の濃度で含む溶液である希釈液中の、抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を含む、試薬、

(b) 必要な場合、開いた上部および密封された基部を有し、その直径が、少なくとも基部に近接した領域では、基部へと下方に伸びる傾斜壁を形成するように小さくしており、該傾斜壁が、抗免疫グロブリンで、または該形成された複合体の抗体と結合しうる他の任意の化合物で、少なくとも部分的にコーティングされている、反応器または反応器セット、 40

(c) 必要な場合、粘性溶液を含む容器、または必要な場合、請求項1～47のいずれか一項記載の方法に定義された粘性物質で部分的に満たされた各反応器；ならびに

(d) 必要な場合、回転攪拌機と連結された1つまたは複数の反応器の外側下方に配置可能である、少なくとも1つの磁石または磁石セット。

【請求項54】

既知の表現型を有する検査用赤血球の懸濁液を含み、該赤血球に対して懸濁液の前記磁性粒子が連結し得、好ましくは赤血球懸濁液がO型に由来し、かつ $0.2\% \sim 2.5\%$ 、好まし 50

くは0,5%~1,5%、好ましくは1%±0,3%の濃度を有することを特徴とする、IATのための、請求項51~53のいずれか一項記載のキット。

【請求項55】

既知の特異性を有する血清検査薬を、溶液状態でまたは乾燥形態でさらに含むことを特徴とする、血液型判定または表現型判定のための、請求項48~50のいずれか一項記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体/抗原複合体の実証のための磁気的免疫診断法に関する。そのような方法は、抗体または抗原、好ましくはある血液型の抗抗原抗体 (anti-antigen antibody) または抗原の調査および/または同定を伴う。本方法は、赤血球を認識して特異的に磁化することのできる抗体抗グリコホリンAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を実現する。本発明はまた、そのような方法の1つを実施するための装置およびキットも含む。

10

【背景技術】

【0002】

今日では、輸血は、ドナー血液から得られた濃縮赤血球調製物 (血球濃縮液 (globular concentrate)) の静脈内注射で構成される。

【0003】

輸血の主たるリスクは、抗体およびその赤血球抗原がレシピエント (輸血を受ける人) の体内で引き合わされる可能性があることである。赤血球膜抗原、とりわけ血液型 (または血液型系) 抗原は、赤血球 (red cell) または赤血球 (red blood cell) とも呼ばれる赤血球 (erythrocyte) の表面に認められ、免疫系によって認識されて免疫応答および溶血を誘発することができる。そのような免疫学的反応の帰結は、臨床徴候を全く伴わない効果のない輸血から、軽微な臨床反応 (不安、悪寒戦慄)、重篤な臨床反応 (ショック、ヘモグロビン尿症、腎不全)、または死に至る劇的な臨床反応 (ショック、汎発性血管内溶血) までの範囲にわたる。

20

【0004】

ドナー赤血球は、レシピエントがドナーの赤血球抗原に対する流血中抗体を有していなければ、レシピエントの血液と適合性があると言われる。ヒトではこれまでに、血液型を構成する赤血球膜抗原のすべての抗原変異体において、20種を上回る赤血球抗原系が同定されている: A、BもしくはH抗原によるABO式血液型、D、EもしくはeおよびCもしくはc抗原によるRhesus式血液型、Kもしくはk抗原によるKell式血液型、Duffy式血液型 (Fya、Fyb)、Kidd式血液型 (Jka、Jkb)、MNS式血液型、または、Lutheran式血液型、Lewis式血液型などのように、実際に検査される頻度の低い他の血液型系も存在する。同じ赤血球抗原の組み合わせを有する個体は、同じ赤血球血液型に属する。いくつかの抗原系を用いると、血液型はさらに複雑かつ非常に多数になる。

30

【0005】

例えば自己免疫疾患の場合のような病的状態を除き、個体の血清は、赤血球抗原に対する2種類の抗体を含みうる:

40

a / ABO式血液型の抗原に指向する、いわゆる規則抗体 (例えば、B型の個体における抗A抗体)。これらはIgM型の免疫グロブリンであり、インビトロで赤血球を凝集させることができる。この現象は、Beth-Vincent検査およびSimonin検査 (それぞれ、おもて検査 (forward grouping test) およびうら検査 (reverse grouping test)) を用いて、個体のABO血液型を判定するために用いられている。Beth-Vincent検査はどの抗原が赤血球によって保有されているか (抗原表現型) を判定することを可能にし、Simonin検査は補足的検査を行うこと、言い換えれば、個体の血清中において循環している抗A抗体および/または抗B抗体を検出することを可能にする。Beth-Vincent検査では、個体の赤血球を検査用血清または検査用抗体と接触させる。それらはそれぞれ、ABO式血液型の1つの抗原に指向する厳密な特異性を有する。それ故、これは検査用血清との赤血球凝集検査である。うら検

50

査とも呼ばれるSimonin検査では、後者の流血中抗体を含む個体の血清または血漿を、検査用赤血球と接触させる。これらはそれぞれ、ABO式血液型の1つの特定の抗原グループに属する。それ故、これは検査用赤血球との血清凝集検査である。

【0006】

b / 血漿の血清中にそれが存在することが必須でなく、かつ非ABO式血液型の抗原に指向する、いわゆる不規則（または免疫）抗体。これらはIgGアイソタイプ抗体であることが最も一般的であり、外来赤血球が抗原刺激を誘導した場合に出現する。これは例えば、輸血時の1つまたは複数の抗原による免疫後、またはさらには、妊娠時、とりわけ出生時の、母親の血液型とは異なる胎児赤血球抗原に対する母体免疫反応の場合がそうである。

【0007】

これらの不規則抗体のスクリーニングは、不規則性凝集素検査（IAT）と呼ばれる。この検査は、個体の血液における、さまざまな赤血球抗原に指向するIgGの有無を検出するために用いられる。このために、本検査は、その抗原が既知である検査用赤血球上のこれらの抗体の結合を実証することを狙いとする。この方法は多くの種類の赤血球に対して同時に行われ、その結果の比較により、存在するIgGの特異性を同定することが可能になる。

10

【0008】

rhesus Dのような最も免疫原性の高い抗原はリスクがさらに高いが、他のrhesus式血液型の抗原（E>c>e>C）、Kell式血液型の抗原（K）、Duffy式血液型の抗原（Fy a、Fy b）、Kidd式血液型の抗原（Jka、Jkb）などについても同様である。

20

【0009】

適切な血液型を適切な時に得ることは不可能と考えられ、特にある種の抗原の組み合わせは極めて稀であるため、実際には、輸血を実施する際にこれらのすべての抗原を考慮に入れることはできない。標準的な輸血では、ABO血液型 + rhesus D系（Rh+またはRh-）のみを考慮に入れる。不規則性凝集素のリスクがある状況では、他のいくつかの血液型、とりわけrhesus C系およびE系ならびにKell系、時には他の血液型も考慮に入れる。したがって、リスクのあるこれらの状況では、これらの不規則性凝集素の存在および発生リスクを考慮に入れて、ドナーの血液型とレシピエントの血液型との適合性を確保することが重要である。

【0010】

したがって、不規則性抗赤血球抗体を有するかまたはリスクのある状況にあるレシピエント患者、例えば複数回の輸血を受けているが抗赤血球不規則抗体を有していない患者、および妊娠女性などでは、ドナーの赤血球が、レシピエントの抗体が指向する、または出現する可能性のある抗原を有しないように輸血される赤血球濃厚液ユニットを選択することが重要である。

30

【0011】

この適合性検査はこれらの患者では義務的なものであり、すべてのレシピエントにおいて、レシピエント血清または血漿の存在下でのドナーの赤血球との直接的な適合性検査により、赤血球濃厚液の投与の前に予防的に用いられる。IATに用いられる手法では、凝集反応および/または溶解反応が認められない必要がある。

40

【0012】

臨床的な輸血実務において、赤血球の表面にある血液型抗原の調査および同定（対応する規則抗体の存在も調査されるABO式血液型を除く）に対応する赤血球表現型判定は、レシピエントおよびドナーの両方にかかわる。

【0013】

レシピエントおよびドナーに関して、適合性のある赤血球濃厚液をリスク状況に応じてレシピエントに提供するために、赤血球表現型判定には3つのレベルが存在する：

ABO血液型（またはABO血液型）および標準的なrhesus（抗原Dの有無）の判定、Kellおよびrhesus表現型（抗原C、E、c、eおよびKの有無）の判定、ならびに拡張された（またはより大きい）表現型（Duffy式血液型（FyaおよびFyb）、Kidd式血

50

液型（JkaおよびJkb）およびMNS式血液型（抗原Sおよびs）の抗原の有無）の判定、レシピエントの血清に認められるリスクおよび/または不規則抗体の種類によっては他の抗原を調査することもできる。

【0014】

表現型判定のために通常用いられる手法は、一般に、適切な抗体を含む検査用血清を用いる、調べようとする抗原の有無に関するスクリーニングで構成される。好ましくは、これらの検査用血清中に含まれるこれらの抗体は自然下で凝集性であり（IgMまたはIgA）、それにより、これらの後者が血清中に存在する抗体に対応する抗原を保有する場合に、表現型を判定しようとする赤血球の完全または部分的な凝集を得ることができる。しかしながら、（IgG型の）非凝集性の検査用抗体を用いることも可能であり、その場合には、抗免疫グロブリンによって凝集が誘発され、遠心分離段階および得られた残留物の再懸濁後に可視性になる（間接Coombs法として知られる）。また、非凝着性（non-agglutinant）検査用抗体を用いることも可能であり、その場合には、赤血球に結合したこれらの検査用抗体が、固相に結合した抗免疫グロブリンによって可視化される（免疫接着法）。結果は裸眼で、または適切な装置によって読み取られる。

10

【0015】

ABOについては規則抗体であり、またはIATについては不規則抗体である、検査しようとする患者血清または血漿の試料における血液型抗抗原抗体の調査または同定のためには、患者の血漿または血清を、いくつかの血液型系（ABO式、Rhesus式、Kell式、Duffy式、Kidd式、MNS式、その他）に対する抗原性が既知である赤血球（erythrocyte）（赤血球（red blood cell）または検査用赤血球）と接触させる。

20

【0016】

IATの場合には、存在する可能性のある抗体が非凝着性である可能性がより高いことから、用いられる手法は、抗免疫グロブリンを用いる凝集による間接Coombs法であるか、または抗免疫グロブリンでコーティングされた固相に対する免疫接着による。

【0017】

IATに関して、第1の段階は赤血球パネルの使用を伴い、これはスクリーニング（輸血において重要な抗原の最大数を含むように選択された、異なる血液型からの2つまたは3つの赤血球）と呼ばれ、不規則抗体の有無を検出すること（同定することではない）を可能にする。スクリーニングが陽性である場合には、存在する不規則抗体の特異性の同定を赤血球パネルによって行い、これは同定用赤血球と呼ばれ、公知の血液型系の大多数における10～15種、またはさらには20種の、異なる表現型判定がなされた赤血球を含む。

30

【0018】

適合性検査（交差適合検査とも呼ばれる）の場合には、輸血しうる血液バッグに由来するドナー赤血球を、患者の血清または血漿と接触させる。通常、1回の遠心分離段階を行って、患者の血清中においてドナー赤血球と反応性のある抗体の存在に起因する凝集について観察する（ABO不適合性、またはIgMもしくはIgA型の不規則抗体）。この第1の段階が陰性であるならば、続いて、抗免疫グロブリンを用いて不規則抗体の検索を行う（間接Coombs法）。

【0019】

輸血の分野において表現型判定またはIATに用いられる手法には数多くの変法がある。これらの手法は、乳白色プレート上、チューブ内もしくはマイクロプレートウェル中、もしくはゲルカラム中で手作業で行ってもよく、または、そのプログラムが実行する手法に適している、試料および試薬を分注する自動装置、振盪機、インキュベーター、遠心分離機ならびに自動リーダーによって完全に自動化されてもよい。

40

【0020】

用いられる手法には、血液型の抗抗原抗体または血液型の抗原の存在が、透明な小型濾過カラム（Sephadex（登録商標）ゲルまたはマイクロビーズ）を用いた遠心分離後の赤血球の凝集の実証に基づき、カラムの上端の開口部がインキュベーションチャンバーとして働き、カラムに関して選択されたカットオフ閾値により、遠心分離後の凝集した赤血球が

50

カラムを通過することが妨げられる手法が含まれる（特に特許EP 0 194 212号（特許文献1）または特許EP 0 755 719号（特許文献2）を参照）。

【0021】

本発明者らはまた、表現型判定またはIATが、遠心分離およびそれに続くゲルまたは液体からなる分離障壁を用いた免疫接着後の、抗体で感作された赤血球の実証に基づく手法であって、遠心分離中に赤血球のみがこの障壁を通過するようにゲルまたは液体の密度が選択され、感作された赤血球を捕捉して特徴的な画像を与えるために下部領域が抗免疫グロブリンでコーティングされている反応容器を用いる手法も挙げることができる（EP 0 058 780号（特許文献3）、WO 98/02752号（特許文献4））。

【0022】

表現型判定またはIATのために用いられる手法の変法の中で、本発明者らは、試料における細胞と結合しうる分析物を磁性粒子を用いて調査するために一般に開発されているものも挙げることができ、これは特に、IATまたは表現型判定のための、抗グロブリン法（凝集による間接Coombs法または固相に対する免疫接着）といった凝集に基づく手法に必要とされる処理である遠心分離を省くことを目的とする。これはまた、IATに関して、その後の段階に用いられる抗免疫グロブリンを認識しうる非特異的抗体を排除する目的で、感作された赤血球を洗浄することが必要な場合もそうである。

【0023】

遠心分離の段階は、完全に自動化されるべき方法において、とりわけ遠心分離機の費用および煩雑さ、それらの取り扱いなどが原因で、実施することが事実上常に困難である。

【0024】

磁性粒子は、リガンド-受容体型または抗体-抗原型の複合体の検出のために長年にわたって用いられている。本発明者らは、以下の特許文献に記載された方法を挙げることができる：WO 92/17781号（特許文献5）、EP 0 426 170号（特許文献6）、EP 0 351 857号（特許文献7）、EP 0 528 708号（特許文献8）またはEP 0 230 768号（特許文献9）。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0025】

【特許文献1】特許EP 0 194 212号

【特許文献2】特許EP 0 755 719号

【特許文献3】EP 0 058 780号

【特許文献4】WO 98/02752号

【特許文献5】WO 92/17781号

【特許文献6】EP 0 426 170号

【特許文献7】EP 0 351 857号

【特許文献8】EP 0 528 708号

【特許文献9】EP 0 230 768号

【発明の概要】

【0026】

したがって、他の抗原に指向する抗体を含む複合的な反応混合物における所与の抗原を特異的に指向する抗体の存在の検出のために利用しうる迅速かつ簡単な方法であって、洗浄段階も遠心分離段階も伴わない方法を利用しうることは有用であると考えられる。とりわけIATのためおよび表現型判定のための、遠心分離段階を伴わず、かつ洗浄段階も伴わないそのような方法は、完全に自動化されているマイクロプレートなどの実用的かつ利用可能な支持体上で用いるという利点を与える。

【0027】

これがまさしく本発明の目的である。

【0028】

本発明は、それが、赤血球抗原に対して特異的な抗体を連結させた磁性ビーズを通じての赤血球の特異的磁化と、マイクロプレートのウェルの底面にコーティングされた抗免疫

10

20

30

40

50

グロブリンを用いる、洗浄段階を伴わない検査方法とを組み合わせるという点で、特許WO 2007/051844号の改良からなる。これはいわゆる免疫付着法である。

【0029】

本方法は、赤血球に結合していない遊離抗体に対する障壁フィルターとしての役を果たす粘性溶液と、赤血球抗原に対して特異的な抗体を連結させた磁性ビーズを含むフィルター障壁上に積み重ねた希釈液とを併用する。

【0030】

その一方で、本発明はまた、直接凝集法による、血液型判定検査および表現型判定検査におけるドナーまたは患者の赤血球の磁化も可能にする。これらの場合に、赤血球の磁化は、凝集を強化する遠心分離段階に取って代わる。

【0031】

いかなる場合でも、赤血球と患者またはドナーの血清とのインキュベーションの際、または血清検査の際（血液型判定または表現型判定の場合）に、細胞は特異的抗体によって磁化されると考えられる。この磁化は、あらゆる溶液または緩衝液に由来するあらゆる赤血球を磁化することができ、かつ磁化の際に血清中に存在するすべての攪乱要素を排除することができる。

【0032】

本発明の原理は、赤血球を特異的に磁化して、磁場の影響下でそれらを移動させ、そのようにして免疫血液学の検査を実行するために必要なすべての段階を遂行しうることである。

【0033】

本発明は赤血球の特異的磁化の方法に関し、また、血液型判定の検査、Simonin検査を含む表現型判定、IATにおける抗体検出検査、ドナーとレシピエントとの適合性検査、および直接抗グロブリン検査のためのキットにおけるそれらの使用にも関する。

【0034】

赤血球の特異的磁化は、赤血球の膜上で発現される血液型抗原に対するモノクローナルまたはポリクローナル特異的抗体を用いた、赤血球に対する磁性粒子の結合で構成される。血液型抗原に対するこの特異的抗体自体は、官能化された磁性粒子に対して共有結合により固定される。

【0035】

抗体を連結させた磁性ビーズによって認識される標的化抗原の選択を、ヒト赤血球の表面上で高発現される膜貫通型タンパク質に対して行った。この膜貫通型タンパク質は民族的差異を全く伴わずに発現され、ヒト血漿中に可溶性形態では存在しない。このようにして、標的化抗原として選択された膜貫通型タンパク質はグリコホリンAである。

【0036】

グリコホリンA (GPA) は、最も豊富に存在する赤血球シアロ糖タンパク質であり、すべての民族集団のすべての赤血球上に存在する。この糖タンパク質の可溶性形態はヒト血漿中に存在する。赤血球1つ当たりのグリコホリンAのコピー数は 1×10^6 と推定されている。

【0037】

GPAは131アミノ酸のポリペプチド鎖（成熟鎖）からなり、以下の3つのドメインとして組織化される：72アミノ酸の細胞外N末端ドメイン、23アミノ酸の疎水性膜貫通ドメイン、および36アミノ酸のC末端細胞質ドメイン。

【0038】

この糖タンパク質の細胞外ドメインはセリン残基およびトレオニン残基を高い割合で含み、約15個のOグリカンおよび単一のN-グリカンによって高度にグリコシル化されている。

【0039】

グリコホリンAはMNS式血液型のM抗原およびN抗原を保有することが知られている。これらの2つの抗原には、ポリペプチド鎖における2つのアミノ酸の変化を招くヌクレオチド多型による違いがある：1つ目はポリペプチド鎖の1位、2つ目は5位にある。これは、ポリペ

10

20

30

40

50

ブチド鎖の1位におけるセリンおよび5位のグリシンの両方の存在により、M抗原に関して陽性である個体を生じさせる。一方、N抗原を発現する個体は、ポリペプチド鎖の1位にアミノ酸ロイシン、5位にグルタミン酸を呈すると考えられる。

【0040】

これらの2つの抗原は、関心対象のタンパク質のN末端付近に位置する。このため、用いられるモノクローナル抗体は、その認識エピトープをシアロ糖タンパク質の細胞外部分に、しかも2つの抗原MおよびNから一定の距離に有しなければならない。

【0041】

完全ヒトGPAタンパク質のアミノ酸配列（一文字コード）
 (GenBankアクセッション番号AAA88051)
 mygkiifvll lsaivsisas sttgvamhts tsssvtkysi ssqndthkr dtyaatprah
 evseivrvt yppeetger vqlahhfsep eitliifgvm agvigtilli sygirrikk

spsdvkplps pdtdvplssv eienpetsdq

【0042】

断片AA 1-19はシグナルペプチド配列に対応し、断片20-150（131アミノ酸長、太字）は成熟鎖に対応する。

【0043】

好ましい態様において、磁性ビーズを連結させるために選択される、グリコホリンAに指向するモノクローナル抗体（抗GPA）は、IgGアイソタイプのマウス免疫グロブリンである。この抗体は、A1ヒト赤血球によるマウスの免疫処置後に生じた。これはグリコホリンAのアミノ酸38~44（上記に特定したような成熟鎖またはその天然変異体）に指向することが好ましい。

【0044】

このモノクローナル抗体は、かくして、超常磁性ビーズと共有結合によって連結される。そのため、磁性ビーズと結びつけたモノクローナル抗体抗GPAは赤血球の表面上の抗原を認識することができ、続いて細胞が抗GPAを通じて磁化される。

【0045】

抗赤血球抗体が連結された磁性粒子によって感作されたこれらの赤血球は、血液抗原（血液型および表現型）をそれらの表面に有するのみならず、磁場によっても引き寄せられる。続いてそれらを、免疫学的分析検査において抗原-抗体複合体のための反応性支持体および移動性ベクターとして用いると考えられる（図1）。

【0046】

強磁性粒子によって患者の赤血球の磁化を可能にする他の方法も既知である。

【0047】

WO 2005/121805号特許は、赤血球磁化のための極めて小型の強磁性粒子の使用、ならびに血液型判定検査および表現型判定検査における、および不規則抗体の検出（IAT検査）のためのそれらの使用を記載している。赤血球磁化は、赤血球と強磁性粒子との直接接触によって非特異的な様式で行われた。そのような方法は、患者の赤血球を磁場の影響下で移動させることを可能にする。

【0048】

また、特許文献EP 0 230 768号は、磁場の存在下におけるポリカチオン性およびポリアニオン性化合物による、試料中に含まれる物質と結合しうる磁性粒子の共凝集法を記載している。詳細には、この文献は赤血球を含む全血の試料における血漿の分離を記載しており、この方法は、磁石の上に配置された容器への、全血試料、およびサクシニル化ウシ血清アルブミンでコーティングされた強磁性流体（ferrofluide）（FeCl₂/FeCl₃）の逐次添加を伴い、このようにして得られた赤血球粒子の凝集物が続いて磁石に引き寄せられることにより、清澄化された血漿をデカンテーションによって収集することが可能になる。

【0049】

WO 02/46758号特許は、赤血球表面と粒子との間に多数の非特異的かつ低強度の相互作用

10

20

30

40

50

用が生じるようにウシ血清アルブミンによって事前に活性化された磁性粒子による赤血球磁化のための方法を記載している。

【0050】

赤血球を磁化するために磁性ビーズまたは修飾された強磁性流体を用いるこれらの手法は、遠心分離段階を省くことが可能である。しかしながら、それらには、磁性粒子と赤血球との間の非特異的相互作用だけでなく、これらの磁性粒子と生体液中に存在する要素すべてとの間の非特異的相互作用も実現されるという欠点がある。磁性粒子と赤血球との間のそのような非特異的相互作用は、磁性粒子と赤血球との接触が存在する場合には、存在する他の任意の要素によって、とりわけ検査しようとする患者由来の血漿要素によって修飾される可能性がある。

10

【0051】

本発明は、赤血球の表面上に存在する抗原の特異的認識によって、磁性ビーズがこれらの赤血球上に特異的に結合するという利点を有する。本方法は、磁化反応の際に媒質中に存在するタンパク質および/または糖質性要素によって妨害されずに、任意の条件下で赤血球を磁化することができる。

【0052】

共有結合性または特異的相互作用によって磁性粒子をマーカーに結合させる多くの磁化方法が既知である。

【0053】

現在、極めて多数の診断システムが、官能化された磁性粒子の使用に基づいている。それらは、生体媒質中に存在する抗体の調査のため、または宿主による免疫応答を誘導する抗原構造の調査のためのいずれかに用いられる。

20

【0054】

これは例えば、ELISAシステムの場合がそうである。そのようなシステムでは、官能化された磁性ビーズを抗原または抗体と実際に連結させて、血漿中の分析物検出のための反応性支持体として用いる。磁性支持体は、遠心分離段階を省いて洗浄段階を実施することを可能にする。

【0055】

あるいは、抗体を連結させたビーズを利用して、ヒト血液の試料におけるCD4抗原を発現する細胞集団を選別する；適切な抗体によって、強磁氣的粒子をCD4陽性細胞の表面上に特異的に結合させることも可能である。続いて全血を磁場に供して、磁性粒子と相互作用する細胞の集団を単離する。

30

【0056】

本発明については、磁化された赤血球 (magnetized erythrocyte) (磁化された赤血球 (magnetized red blood cell) と呼ばれる) を、不規則抗体の検出 (IAT) のための支持体として、交差適合検査のため、または直接抗グロブリン検査 (DAT) のために用いる。この磁化処理は赤血球の表面上に存在する抗原を遮蔽することもなく、赤血球抗原に指向する不規則抗体の検出と干渉することもないことに留意する必要がある。

【0057】

本発明は、特別な様式で、しかもそのような特異的ビーズを反応性媒質中で直接用いて、赤血球を磁化することで構成される。

40

【0058】

例えば、不規則抗体の検出のための検査については、いくつかのアプローチを用いて、抗グリコホリンA (抗GPA) を連結させたビーズによってこの検査を実施することができる。

【0059】

したがって、第1の態様において、本発明の目的は、赤血球の磁化のための方法であり、それは以下の段階からなる：

(a) 抗体抗GPAを、磁性粒子の表面上に連結させる段階、および

(b) 段階(a)で得られた抗GPAでコーティングされた磁性粒子を、赤血球と接触させる

50

段階。

【0060】

好ましくは、抗体の連結は、受動吸着によって、共有結合性連結によって、またはイオン性水素結合によって、または連結型リガンド/受容体（例えば、アビジン-ストレプトアビジン）によって行われ、これは用いる磁性粒子の性質および官能化に準じる。

【0061】

磁性粒子を伴う、捕捉のため、または細胞選別のための免疫診断手法は、多くの刊行物の主題となっており、当業者には周知である。

【0062】

これらの手法の中で、本発明者らは、磁性粒子の官能化を用いることで、適切な条件下および適した試薬の下で、粒子と共有結合性に接ぎ合わせようとする抗原と反応しうる表面上の反応性基、最も一般的なものを挙げるならばとりわけ酸性基、アミン基、エポキシ基またはアルデヒド基を得ることを可能にするものを挙げるができる。

10

【0063】

本発明者らはまた、とりわけ、抗原およびこの受動吸着を行わせようとする条件に応じて正または負に荷電したビーズを取得することを可能にする妥当な処理によって、粒子と結合させる必要のある抗原の受動吸着を利用する手法も挙げるができる。

【0064】

さらに好ましくは、抗GPA抗体は哺乳動物抗体、好ましくはマウスまたはヒト起源のものであり、かつ赤血球によって発現されるグリコホリンAを特異的に認識し、好ましくはシアロ糖タンパク質グリコホリンAに、さらに好ましくはその膜外ドメインに指向するものである。

20

【0065】

さらにより好ましくは、モノクローナル抗体抗GPAはシアロ糖タンパク質グリコホリンAの細胞外部分由来のエピトープを対象とし、前記エピトープはM抗原またはN抗原の一部も全体も担持せず、とりわけ前記エピトープはグリコホリンAのN末端部分から1~5個のアミノ酸の断片を含まない。

【0066】

好ましくは、本発明による前記の赤血球磁化方法は、それが、段階(b)で得られた《磁化された》赤血球の懸濁液を、下記の方法で定義されるような非イオン性界面活性剤を含む希釈液で希釈する段階をさらに含むことを特徴とし、前記希釈液は好ましくは、同じく以下で定義されるような親水性ポリマーを含む低イオン強度の希釈液である。

30

【0067】

1つの好ましい態様において、本発明は、以下のいくつかの段階で構成される、溶液中に存在し血液型または表現型に起因する抗抗原抗体を、血液型または表現型に由来し赤血球によって発現される抗原と反応させることによって形成される特異的複合体の実証のための方法であって、該赤血球が磁性粒子と結合しており、該反応が、開いた上部および密封された基部を有する反応器内で起こり、反応器の直径が、少なくとも基部に近接した領域ではそれが傾斜壁を形成するように小さくなっており、傾斜壁が、抗免疫グロブリンで、または該形成された複合体の抗体と結合しうる他の任意の化合物で、少なくとも部分的にコーティングされている、方法である：

40

(a) 赤血球を担持する磁性粒子懸濁液を、血液型または表現型由来の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に：

反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性溶液で満たす段階；

(b) 前記抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液を、前記抗原を保有するかまたは保有する可能性がある磁性粒子懸濁液と、反応器に含まれる粘性溶液の上の箇所接触させる段階、

(c) 赤血球を担持する磁性粒子と、溶液中に含まれる可能性がある血液型または表現型の抗抗原抗体との複合体形成のために、および、赤血球が含む血液型または表現型の前記抗原を特異的に認識するために必要な所定の時間にわたる反応器をインキュベーションす

50

る段階；

(d) 磁性粒子が反応器の底面および／または傾斜壁の方へ引き寄せられるような、前記反応器に対する磁場の印加およびこの反応器の攪拌；ならびに

(e) 前記抗免疫グロブリンでまたは抗体と結合しうる他の任意の化合物でコーティングされた反応器の底面および／または反応器の傾斜壁で得られた画像を、肉眼でおよび／または他の任意の適した読み取りシステムで読み取る段階であって、得られた画像が血液型または表現型の特異的な抗体／抗抗原複合体の有無を実証することを可能にし、前記赤血球を担持する磁性粒子が、抗グリコホリンA（抗GPA）抗体によって予めコーティングされた磁性粒子であることを特徴とし、さらに前記赤血球が抗体／抗原相互作用によって前記磁性粒子と結合していることも特徴とする、段階。

10

【0068】

一般に、特異的複合体である抗体／抗原の抗体は、天然のIgG、IgM、IgAもしくはIgE、または抗体の他の任意のクラスに由来しうる。

【0069】

「前記形成された複合体の抗体と結合しうる抗免疫グロブリン」という用語は、本明細書において、IgG、IgM、IgAもしくはIgE（抗免疫グロブリン全体）または抗体のある特定の 카테고리 のいずれかである任意の抗体、特にヒトのものを認識して結合しうるポリクローナル性またはモノクローナル性の抗免疫グロブリン、とりわけ特異的抗IgG抗体のことを指す。そのような抗免疫グロブリン、特にヒトのものは当業者に周知であって多くの供給元から入手可能であり、それ故、本明細書において詳細な説明を、特にそれらの製造方法に関して行うことはない。

20

【0070】

さらに好ましくは、この抗体がIgG型のものである場合には、抗IgG、とりわけヒト抗IgG（ヒト起源の抗体に指向する）が好ましい抗免疫グロブリンである。

【0071】

さらに好ましくは、この抗体がIgGまたはIgM型のものである場合には、抗IgGおよび抗IgMの組み合わせ；とりわけヒト起源のものが好ましい。

【0072】

「前記形成された複合体の抗体と結合しうる他の任意の化合物」という用語は、特に、抗体の認識および特異的結合のための、当業者に周知のプロテインA型化合物またはプロテインG型化合物のことを指す。

30

【0073】

1つの好ましい態様において、本発明は、赤血球を磁化するために用いられる方法が上記の本発明による赤血球の磁化方法であることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0074】

1つの好ましい態様において、本発明は、赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に、前記赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液が、1を上回りかつ前記粘性溶液の密度を下回る密度を有する希釈液中で懸濁状態であることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0075】

1つの等しく好ましい態様において、本発明による前記方法は、前記段階（a）および（b）が以下であることを特徴とする：

（a）赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液と接触させる前に：

（i）前記反応器の外で、赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を調製する段階、

（ii）反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性物質で満たし、続いて前記希釈液で満たす段階；

（b）段階（a）（i）の際に調製された赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、前記抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液と、希釈液の上で接触させる段階。

【0076】

40

50

もう1つの好ましい態様において、本発明による前記方法は、前記段階(a)および(b)が以下であることを特徴とする：

(a) 赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性のある溶液と接触させる前に：

反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性物質で満たし、続いて前記希釈液で、続いて、抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液で、続いて赤血球懸濁液で満たす段階；

(b) 反応器内で、前記抗体を含むかまたは含む可能性のある溶液を、形成されたかまたは形成中の赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させる段階。

【0077】

もう1つの好ましい態様において、本発明による前記方法は、前記段階(a)および(b)が以下であることを特徴とする：

(a) 赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、血液型または表現型の抗抗原抗体を含む可能性のある溶液と接触させる前に：

(i) 前記反応器の外で、抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を調製する段階であって、前記磁性粒子が前記希釈液中で懸濁状態である、段階、または、既に調製されたそのような懸濁液を入手する段階、

(ii) 反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性物質で満たし、続いて、段階(a)(i)で調製された前記希釈液中の抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液で、続いて赤血球の懸濁液で満たす段階；

(b) 反応器内で、前記抗体を含むかまたは含む可能性のある溶液を、形成されたかまたは形成中の赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させる段階。

【0078】

この後者の好ましい態様において、本発明による前記方法は、以下を特徴とする：

(a) 段階(a)(i)の最後に、前記希釈液中で懸濁状態である赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を形成させるために、反応器の外で、磁性粒子を前記希釈液中に懸濁状態を含む前記懸濁液を赤血球懸濁液と接触させること；および

段階(a)(ii)で、反応器を、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように粘性物質で満たし、続いて、前記希釈液中で懸濁状態である赤血球を担持する磁性粒子の前記懸濁液で満たすこと；

(b) 反応器内で、前記抗体を含むかまたは含む可能性のある溶液を、赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させること。

【0079】

もう1つの特に好ましい態様において、本発明は、自動化状況、すなわちラボトリーオートメーションによる試薬の分注の状況において、前記段階(a)および(b)が以下であることを特徴とする、本発明による方法を含む：

(a) 赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、血液型または表現型の抗抗原抗体を含むかまたは含む可能性のある溶液と接触させる前に：

(i) 前記反応器の外で、抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を調製する段階であって、前記磁性粒子が前記希釈液中で懸濁状態である段階、または、既に調製されたそのような懸濁液を入手する段階、

(ii) 反応器を、赤血球の懸濁液で満たし、続いて、段階(a)(i)で調製された前記希釈液中の抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液で満たし、続いて、攪拌後に必要な場合、反応器の傾斜壁の少なくとも一部を覆うように、前記粘性物質で満たす段階であって、前記粘性物質が反応器の底面に注入される、段階；

(b) 反応器内で、前記抗体を含むかまたは含む可能性のある溶液を、形成されたかまたは形成中の赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液と接触させる段階。

【0080】

好ましい態様において、本発明は、段階(d)で、前記反応器に対する磁場の印加および反応器の攪拌を同時に実施することを特徴とする、本発明による方法を含む(これらの

10

20

30

40

50

異なる段階を遂行する装置の一例としては、図1Aおよび1Bを参照)。

【0081】

好ましい態様において、本発明は、段階(d)において、前記反応器に対する磁場の印加および反応器の攪拌を同時に実施することを特徴とする、本発明による方法を含む(これらの異なる段階を遂行することを可能にする装置の一例として、図1Aおよび1Bを参照)。

【0082】

「同時に」という用語は、本明細書において、攪拌または磁場の印加のみが行われる時間が20秒間を超えないことを指す。

【0083】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)において、磁場の印加および攪拌を2.5分間~10分間の期間、好ましくは5分間~6分間の期間にわたって同時に実施することを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0084】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)において、磁場の印加が、反応器の外に配置された磁石によって、磁性粒子が反応器の底面の方へ引き寄せられるように引き起こされる、本発明による方法を含む。

【0085】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)において攪拌が回転攪拌からなることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0086】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)において攪拌が250~750rpm、好ましくは600rpmで実施されることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0087】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、段階(c)において、インキュベーション期間が、20 ~ 40 の温度、好ましくは 37 ± 1 の温度で10分間~30分間であることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0088】

特に好ましい態様において、本発明は、段階(d)において、反応器のかき混ぜが磁場の存在下で行われることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0089】

段階(d)において、磁場印加の段階および反応器攪拌の段階は、段階の一方またはもう一方から始めて、しかしながら磁場の印加および攪拌が少なくとも所定の時間にわたって同時に実施される様式で行うことができる。

【0090】

明らかに、本発明による方法には、磁場の印加が本方法の段階(d)において反応器の攪拌の前に実施され、磁場のみの印加(攪拌を伴わない)が最大で2分間、好ましくは1分30秒間、1分間または30秒間の期間を超えない、本発明による方法の変法も含まれる。これは攪拌が磁場の印加の前に実施される場合もそうであり、その際に攪拌のみの期間は最大で2分間、好ましくは最大で1分30秒間、1分間または30秒間の持続時間を超えない。

【0091】

本発明は、段階(d)において、磁場の印加が、反応器の外側下方に配置された磁石によって、磁性粒子が反応器の基部の方へ、好ましくは反応器の縦軸に沿って引き寄せられるように実施される、本発明による方法を含む。

【0092】

本発明の方法の好ましい態様において、段階(d)における前記磁石は、8000~16000ガウス、好ましくは10000~14000ガウス、さらにより好ましくは11500~12500ガウスの範囲の規模の永久磁石であり、12000ガウスの規模が最も好ましい。

【0093】

好ましい態様において、本発明は、段階(d)において攪拌が回転攪拌機によって実施

10

20

30

40

50

される、本発明による方法を含む。

【0094】

「回転攪拌機」という用語は、本明細書において特に、一体化された反応器、または96穴マイクロプレートの場合には反応器セットを有する、回転プラットフォームのことを指す（図1Aおよび1Bを参照）。

【0095】

ある特定の攪拌様式では、本発明は、段階（d）において、攪拌が、反応器がその最大幅の箇所では7mmの直径を有する場合に直径1.0mm~2.5mm、好ましくは1.25~2.25mm、直径1.5mm~2mmの比率となる軌道を有する回転攪拌からなり、2mmが好ましい軌道直径である、本発明による方法を含む。

10

【0096】

「比率」という用語は、例えば、最大幅区域の直径が7mmの2倍または半分である場合に、上述した回転軌道の対応する直径が2倍または2分の1になることを意味する。

【0097】

「回転型攪拌の軌道」という用語は、攪拌処理の過程における反応器の最下点（反応器の縦中心軸の最下点）によって描かれる円の直径のことを指す。

【0098】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階（d）において、攪拌が250~750rpm、好ましくは400~600rpmの速度で実施される、本発明による方法を含む。

【0099】

1つの特定の態様において、各反応器の間に配置された磁石は、攪拌プラットフォームの一部を形作る（図1Aおよび1Bも参照）。

20

【0100】

後者の場合に、反応器の下方に配置された磁石の縦中心軸は、攪拌中に、反応器の縦中心軸によって形成される軌道をたどる。

【0101】

1つの特定の態様において、各反応器の下方に配置された磁石は、攪拌プラットフォームに固定されていない。この場合には、反応器の下方に配置された磁石の縦中心軸は動かず、攪拌中に、反応器の縦中心軸によって形成される軌道をたどらない。

【0102】

本発明は、段階（c）において、インキュベーションの持続時間が10分間~30分間、好ましくは15~25分間である、本発明による方法を含む。

30

【0103】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階（c）において、インキュベーションが10~40、好ましくは25~40、30~40、好ましくは37前後（37±1）の温度で実施される、本発明による方法を含む。

【0104】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階（b）において、インキュベーションが30~40、好ましくは37の温度で実施される、本発明による方法を含む。

【0105】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、磁性粒子が100nm~3.0μm、好ましくは200nm~1.5μmの直径を有し、好ましくはトシル基、カルボキシル基、アミン基またはさらにはアルコール基によって官能化されていることを特徴とする、本発明による方法を含む。

40

【0106】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、前記磁性粒子が強磁性化合物を重量比で少なくとも40%、好ましくは40%~50%含む、本発明による方法を含む。

【0107】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階（a）で、その密度が、段階（d）において、磁性粒子に結合させた抗原と複合体を形成しない抗体の、抗免疫グロブリンまたは抗

50

体を認識しうる他の化合物でコーティングされた反応器の傾斜壁および底面の方への移動を妨げるものである粘性物質を用いて、反応器を粘性物質または均質ゲルで予備的に満たすことを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0108】

1つの好ましい態様において、本発明は、前記粘性溶液が1よりも高い密度を有する、本発明による方法を含む。

【0109】

より好ましくは、本発明の方法は、前記粘性溶液がゲルから選択される、好ましくは、30% ± 10%のPVP（ポリビニルピロリドン）、PVP-40もしくはPVP-60の中から、またはさらにアルブミン溶液中またはさらにはゼラチン中の、20nm ~ 300nmとさまざまなビーズ直径を有しうるデキストランSephadex（商標）またはSepharose（商標）、好ましくはsuper fine G-100（商標）またはSepharose（商標）4Bもしくは6Bに由来するゲルから選択されることを特徴とする。

10

【0110】

1つの好ましい態様において、本発明は、第1の段階において、ゲルがデキストランまたはアガロース（Sepharose（商標）（Pharmacia, Sweden）、すなわちSepharose（商標）4Bまたは6B）である、本発明による方法を含む。

【0111】

1つの等しく好ましい態様において、前記溶液はゲルタイプであり、このゲルは、ゲル溶液の密度を、好ましくはゲル溶液における最終濃度が5% ~ 15% w/v、好ましくは10% ± 2.5%となるまで高めるために、ウシ血清アルブミンの存在下で調製される。

20

【0112】

1つの好ましい態様において、本発明は、第1の段階において、粘性溶液またはゲルがSephadex（商標）、（Pharmacia, SwedenまたはSigma-Aldrich）、好ましくはG-10（商標）、G-25（商標）、G-50（商標）、G-75（商標）、G-100（商標）、G-150（商標）またはG-200（商標）であって、デキストランビーズの直径が20nm ~ 300nmの範囲であってよい、本発明による方法を含む。より好ましくは、Sephadex（商標）はsuperfine G-100（商標）である。

【0113】

さらにより好ましくは、ゲル濃度、特にSephadex（商標）またはSepharose（商標）のそれは、1.5% ~ 6%、好ましくは2% ~ 5%、2.5% ~ 4%である。w/v比で3% ± 0.5%の濃度が、とりわけSephadex（商標）、特にsuperfine G-100（商標）にとっては最も好ましい。

30

【0114】

1つの好ましい態様において、本発明は、第2の段階において、前記抗原を保有するかまたは保有する可能性がある赤血球の懸濁液を積み重ねる前に、抗グリコホリンAを連結させたビーズを含むかまたは含む可能性がある前記溶液を粘性溶液上に積み重ねる、本発明による方法を含む。

【0115】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、段階（b）において、赤血球の懸濁液が粘性溶液の後および前記希釈液の後に積み重ねられる場合、前記抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液を、該赤血球の懸濁液より前に積み重ねることができることを特徴とする、本発明による方法を含む。

40

【0116】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、希釈液が、粘性溶液の密度を下回り、かつ前記抗体を含むかまたは含む可能性がある溶液の密度を上回る密度を有することを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0117】

もう1つの好ましい態様において、本発明の方法は、希釈液が、親水性ポリマーを、その密度を血漿または血清のそれと前記粘性溶液のそれとの間の密度に調整することを可能

50

にする濃度で含む溶液であることを特徴とする。

【0118】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、前記希釈液が、親水性多糖ポリマー、好ましくはFicol(商標)、とりわけFicoll(商標)400を、1%~2.5%(w/v)、好ましくは2%±0.3%の濃度範囲で含む溶液であることを特徴とする。

【0119】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、反応器が丸底またはV字底のマイクロプレートであることを特徴とする。

【0120】

1つの好ましい態様において、本発明は、抗体溶液がヒト血漿試料または血清試料であり、血液型または表現型の抗原に対して特異的に指向する抗体の存在を検出することを目的とし、かつ抗免疫グロブリンがヒト抗免疫グロブリン(HAG)であることを特徴とする、本発明による方法を含む。

10

【0121】

1つの特に好ましい態様において、本発明の方法は、磁性ビーズによって保有される赤血球がO型赤血球である段階を含むことを特徴とする、血清または血漿の試料における不規則抗体(IAT)の検出および同定のための方法である。

【0122】

もう1つの局面において、本発明は、それが本発明の方法を含むこと、およびヒト血液型(human group)または表現型の抗抗原抗体を含む可能性がある溶液が、既知の血液型/表現型特異性を有する抗体を含む検査用血清であることを特徴とする、血液型判定および/または表現型判定のための方法を含む。

20

【0123】

本発明の1つの特定の局面において、直接凝集法の場合に、本発明は、利用可能な抗体があれば直ちに、赤血球の表面上に存在するすべての抗原の血液型判定および表現型判定の両方を可能にする。

【0124】

このようにして、以下の抗原：ABO式血液型由来のもの(A抗原、B抗原、同時に発現されるA抗原およびB抗原、H抗原)、Rhesus式血液型由来の抗原(D、C、c、E、e抗原またはCw)、Kell式血液型由来の抗原(Kまたはk)、Duffy式血液型由来の抗原(FyaおよびFyb)、Kidd式血液型由来の抗原(JkaおよびJkb)、MNS式血液型由来の抗原(M、N、Sおよびs)、あるいは、あまり一般的には調べられていないがやはり存在する他の抗原、例えばLewis式血液型、Lutheran式血液型などのものを、本発明によって同定することができる。

30

【0125】

血液型判定および/または表現型判定のために、本発明者らは、それが指向する赤血球上の抗原を認識して結合することができる、既知の特異性を有するモノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体もしくは組換え抗体を含む血清検査薬(serum test)を用いることができる。

【0126】

血液型の抗抗原検査用抗体は、マイクロプレート中で溶液状態であってもよく、または乾燥形態であってもよい。

40

【0127】

血清検査薬の中に存在する抗体がIgM型由来であるならば、実行される検査は、抗免疫グロブリンの使用を伴わない凝集反応であると考えられる(実施例9~11を参照)。

【0128】

この場合には、抗GPAを連結させた磁性ビーズを、表現型を判定しようとする赤血球とともにインキュベートし、同時に抗血清ともインキュベートする。

【0129】

血清検査薬がIgG型由来である別の場合には、関心対象のIgG抗赤血球で飽和させた抗免疫グロブリン抗IgGを含む試薬を実現することができる。この場合には、抗IgGが凝集性と

50

なって、凝集反応をもたらす可能性がある（実施例：液体形態にあるIgGおよび/またはIgM抗体による血液表現型判定を参照）。

【0130】

本発明はしたがって、以下の段階を含むことを特徴とする方法を対象とする：

(a) 抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を調製する段階であって、前記磁性粒子が希釈液中で懸濁状態である、段階、または、既に調製されたそのような懸濁液を入手する段階、

(b) (i) 抗GPAでコーティングされた前記磁性粒子の懸濁液を、血液型および/または表現型を判定することが望まれる赤血球の懸濁液と接触させる段階、

(ii) 反応器内で、段階(b)において形成されたかまたは形成中の赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液を、既知の特異性を有する抗体を含む血清検査薬と接触させる段階、

(iii) かき混ぜまたは攪拌する段階、

(c) 赤血球を担持する磁性粒子と血清検査薬との複合体の形成のために必要な所定の時間にわたって反応器をインキュベーションする段階；

(d) 磁性粒子が反応器の底面および/または傾斜壁の方へ引き寄せられるような、前記反応器に対する磁場を印加する段階および反応器を攪拌する段階；ならびに

(e) 反応器の底面および/または反応器の傾斜壁で得られた画像を、肉眼でおよび/または他の任意の適切な読み取りシステムで読み取る段階であって、この得られた画像により、ヒト血液型または表現型の特異的な抗体/抗原複合体の形成の有無を実証することが可能になる、段階。

【0131】

1つの好ましい態様において、本発明は、

段階(d)において、磁性粒子が反応器の底面の方へ引き寄せられるように、攪拌段階とともに、前記反応器に対する磁場が印加され；かつ

段階(e)において、反応器の底面で得られたかまたはそうでない凝集反応を肉眼でおよび/または他の任意の適切な読み取りシステムで読み取り、この特異的凝集により、ヒト血液型または表現型の特異的な抗体/抗原複合体の形成の存在が実証される、本発明による方法を含む。

【0132】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(b)(ii)において、前記血清検査薬が溶液状態であるかまたは乾燥形態である、本発明による方法を含む。

【0133】

1つの好ましい態様において、本発明は、磁性粒子が100nm~3,0 μ m、好ましくは200nm~1,5 μ mの直径を有する、本発明による方法を含む。

【0134】

1つの好ましい態様において、本発明は、前記磁性粒子が強磁性化合物を重量比で少なくとも40%含む、本発明による方法を含む。

【0135】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)において、磁場の印加が、反応器の外側下方に配置された磁石によって、磁性粒子が反応器の底面の方へ引き寄せられるように実施される、本発明による方法を含む。

【0136】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)における前記磁石が、10,000 Gauss~14,000 Gaussの範囲の規模の永久磁石である、本発明による方法を含む。

【0137】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(b)(iii)および/または(d)において、攪拌が回転攪拌機によって実施される、本発明による方法を含む。

【0138】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)において、前記反応器に対する磁場の印加および反応器の攪拌が同時に実施される、本発明による方法を含む。

【0139】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(b)(iii)において、かき混ぜ(または攪拌)の適用が、5秒間~3分間の期間、好ましくは1分間~2分間の期間にわたって実施される、本発明による方法を含む。

【0140】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(b)(iii)において、攪拌が、10秒間の間に1000rpm~1200rpmの範囲の速度、好ましくは1200rpmで実施される、本発明による方法を含む。

【0141】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)において、攪拌が、500rpm~800rpm、好ましくは650rpm~750rpmの範囲の速度、好ましくは700rpmで実施される、本発明による方法を含む。 10

【0142】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(c)において、インキュベーションの持続時間が、より好ましくは温度20~40、好ましくは室温または37で、2分間~30分間、好ましくは8~20分間の範囲にわたる、本発明による方法を含む。

【0143】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)において、磁化の持続時間が、より好ましくは20~40の温度、好ましくは室温で、2分30秒間~7分間の範囲、好ましくは5分間である、本発明による方法を含む。 20

【0144】

1つの好ましい態様において、本発明は、段階(d)の後および(e)の前に、凝集していない赤血球を懸濁させるために一連のかき混ぜをより高速で実行し(800~1000rpmで1分間~2分30秒間)、その後任意で、存在する場合、分散した小さな凝集物を集合させるための新たな攪拌段階(「再収集段階」)をより低速(350~550rpm、1分間~2分間)で実行する、本発明による方法を含む。

【0145】

1つの好ましい態様において、本発明は、血清検査薬がIgG型である場合に、抗IgG-免疫グロブリン溶液をIgG抗体血清検査薬の濃縮溶液と混合することによって、凝集した試薬を予備的に生成させる、本発明による方法を含む。 30

【0146】

1つの好ましい態様において、本発明による方法は、反応器が丸底またはV字底のマイクロプレート穴であることを特徴とする。

【0147】

1つの好ましい態様において、本発明による方法は、赤血球を保有する磁性粒子の懸濁液における赤血球濃度が0.2%~2.5%、好ましくは0.5%~1.5%、好ましくは1%±0.3%であることを特徴とする。

【0148】

1つの好ましい態様において、本発明による方法は、磁性粒子の濃度が0.001%~0.007%、好ましくは0.003%~0.005%であることを特徴とする。 40

【0149】

1つの好ましい態様において、本発明による方法は、抗GPA抗体が哺乳動物抗体、好ましくはマウスまたはヒト起源のものであり、赤血球によって保有されるヒトグリコホリンAを特異的に認識することができ、好ましくはシアロ糖タンパク質グリコホリンA、好ましくはその膜外ドメインに指向することを特徴とする。

【0150】

1つの好ましい態様において、本発明による方法は、抗GPA抗体がシアロ糖タンパク質グリコホリンAの細胞外部分由来のエピトープに指向するモノクローナル抗体であり、前記エピトープがM抗原またはN抗原を部分的に担持するかまたは全く担持せず、とりわけ前記エピトープがグリコホリンAのN末端の1~5アミノ酸の断片を含まないことを特徴とする。 50

【0151】

1つの好ましい態様において、本発明による方法は、抗GPA抗体を、 $5\mu\text{g}/\text{mg} \sim 25\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子、好ましくは $20\mu\text{g}/\text{mg} \pm 3\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子の濃度で磁性粒子に連結させることを特徴とする。

【0152】

1つの好ましい態様において、本発明は、検査の感度および特異性を向上させるためおよび/または高めるために、抗GPA抗体を、 $1\mu\text{g}/\text{mg} \sim 5\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子、好ましくは $2.5\mu\text{g}/\text{mg} \pm 0.5\mu\text{g}/\text{mg}$ 磁性粒子の濃度で磁性粒子に連結させる、本発明による方法を含む。

【0153】

1つの好ましい態様において、本発明による方法は、磁性粒子の懸濁液が、非イオン性界面活性剤、好ましくはsynperonic (商標) PE/F68、Tween (商標) (20、40または80) を、 $0.1\% \sim 1\% (w/v)$ 、好ましくは $0.25\% \sim 0.75\% (m/v)$ または $0.5\% \pm 0.15\%$ の濃度で含む懸濁液であることを特徴とする。

【0154】

本発明はまた、不規則抗体検出検査 (IAT) について説明したように、固相上での免疫付着の手法を用いることによって血液型判定および/または表現型判定を実施することも可能にし、この場合には、患者血清を、特異性が分かっている血清検査薬に置き換え、赤血球試料群を、血液型または表現型を判定しようとする患者またはドナーの赤血球に置き換える。

【0155】

用いる抗血清、すなわち抗D、抗Fya、抗Fyb、抗Jka、抗Jkb、抗S、抗s、または他の血液型抗原に対して特異的な他の抗血清に応じて、さまざまな血液型系由来の抗原の血液型判定または表現型判定を行うことができる。

【0156】

表現型判定を可能にする免疫付着法の原理は、ドナーまたは患者の赤血球を、抗GPAを連結させたビーズによって磁化した上で、それらを特に関心対象となる抗血清で感作させることにある。抗原の存在は、マイクロプレートのウェルの底面に結合させた抗免疫グロブリンによる、赤血球上に結合した抗血清の捕捉によって明らかになると考えられる。

【0157】

患者またはドナーの血液型判定および/または表現型判定は、EDTA型の抗凝固剤、クエン酸塩またはヘパリンの入ったチューブ上に収集された血液試料から行われる。

【0158】

抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む1mlの希釈液中に $10\mu\text{l}$ の濃厚赤血球を希釈することによって、チューブ内または丸底のプレートのウェル中に、 $1\% \sim 2\%$ 、好ましくは 1% の血球懸濁液を生じさせる。低イオン強度緩衝液=Liss Ficoll中に希釈した糖をベースとするポリマーで作られた希釈液におけるビーズの濃度は $0.002\% \sim 0.006\%$ とさまざまであってよく、 0.004% が好ましい。

【0159】

並行して、1つの特異的な抗IgG抗グロブリンで、または抗グロブリンの組み合わせ (抗IgGおよび抗IgM) でコーティングされた96穴丸底マイクロプレートのウェル中に、より高密度の粘性溶液またはゲルを積み重ねて、患者またはドナーの赤血球を含む反応媒質と抗血清との間に障壁を作り出すことができる。抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む溶液中に前もって希釈した 1% の血球懸濁液を、粘性障壁の上に積み重ねる。続いて、特に関心対象となる抗血清を血球懸濁液の上に添加する。

【0160】

マイクロプレートを続いて37℃で20分間インキュベートする。インキュベーション段階の間に、抗血清は、赤血球上に存在するかまたはそうでない、対応する抗原と結合する。抗血清による赤血球のこの感作相の間に、赤血球は、希釈液中に存在する、抗GPAを連結させた磁性ビーズによっても磁化される。各抗体は1つの抗原に対して特異的であり、第1

10

20

30

40

50

のものの結合は他のものの結合を妨げない。このため、赤血球抗原を担持するかまたはそうでない、患者またはドナー由来の赤血球を抗GPAビーズによって磁化するとともに、抗血清中に存在する抗体によって感作させることができると考えられる。インキュベーション段階の終了時に、マイクロプレートを、マイクロプレートのウェルの下にちょうど収まる磁気プレートを備えたマイクロプレート攪拌機の上に置く。かき混ぜおよび磁場の影響を受けて、抗血清の抗体を担持する、抗GPAによって磁化された赤血球は、粘性障壁中を移動して、ウェルの底面に固定された抗グロブリンと結合するが、それを担持しないものはそうではないと考えられる。陽性反応はウェルの底面での赤血球の薄膜の形成を招くと考えられ、一方、陰性反応はウェルの底面での輪郭が明確な赤血球ペレットの形成を招くと考えられる。

10

【0161】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、赤血球を担持する磁性粒子の懸濁液における赤血球濃度が0.2%~2.5%、好ましくは0.5%~1.5%、好ましくは1%~±0.3%であることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0162】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、赤血球を担持する磁性粒子の前記懸濁液における磁性粒子の濃度が0.02%~0.2%、好ましくは0.01%~0.009%、好ましくは0.004%±0.001%で構成されることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0163】

1つの好ましい態様において、本発明は、赤血球を担持する磁性粒子の前記懸濁液における磁性粒子の濃度が0,007%±0.001%であることを特徴とする、本発明による方法を含む。

20

【0164】

もう1つの特に好ましい態様において、本発明は、抗GPA抗体が好ましくはマウスまたはヒト起源である哺乳動物抗体であり、赤血球によって保有されるヒトグリコホリンAを特異的に認識することができ、好ましくはシアロ糖タンパク質グリコホリンAに、好ましくはその膜外ドメインに指向すること、さらに好ましくはシアロ糖タンパク質グリコホリンAの細胞外部分由来のエピトープに指向するモノクローナル抗体であり、前記エピトープがM抗原またはN抗原を部分的に担持するかまたは全く担持せず、とりわけ前記エピトープがグリコホリンA由来のN末端の1~5アミノ酸の断片を含まないことを特徴とする、本発明による方法を含む。

30

【0165】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、抗GPA抗体を、5µg/mg~25µg/mg磁性粒子の範囲の濃度、好ましくは20µg/mg磁性粒子の濃度で磁性粒子に連結させることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0166】

もう1つの特に好ましい態様において、本発明は、検査の感度および特異性を向上させるため、ならびに/または高めるために、抗GPA抗体を、1µg/mg~5µg/mg磁性粒子、好ましくは2.5µg/mg±0,5µg/mg磁性粒子の濃度で磁性粒子に連結させることを特徴とする、本発明による方法を含む。

40

【0167】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、前記磁性粒子の懸濁液が0.004%~0.002%(w/v)の濃度、より好ましくは0.007%±0.001%の濃度であることを特徴とする、本発明による方法を含む。抗GPA抗体の連結は、官能基を含む磁性ビーズに対して行われる。

【0168】

これらの官能基は、アミノ官能基(-NH₂)またはアルコール基(-OH)、カルボン酸基(-COOH)またはチシル基といったさまざまな種類に由来してよく、これらの官能基はすべて当業者に周知である。

【0169】

50

このようにして抗体と磁性ビーズとの間に成立する相互作用は、静電性、疎水性または共有結合の性質によるものでありうる。

【0170】

磁性ビーズ上での抗体の共有結合は、ビーズの表面にある官能基によって行われる。

【0171】

本発明の範囲における使用のために適した磁性マイクロビーズ（または粒子）の供給元には、特に、酸またはアミンによって官能化する直径100～500nm前後の磁性粒子、ならびにを行うことを可能にするプロトコールおよび試薬を供給しているAdemtech（33600 Pe ssac, France）が含まれる。

【0172】

これらの磁性粒子は50%以上が強磁性コア（酸化鉄など）からなり、このコアがポリスチレンでコーティングされている。他の企業には、あらゆる種類の官能化磁性ビーズを供給しているBioclone Inc.（San Diego, CA, U.S.A）も含まれる。加えて、特にストレプトアビジン、トシルまたはカルボン酸基によって活性化された磁性マイクロビーズを供給している、広範囲にわたるDynabeads（商標）を有するDynaL Biotech GmbH（Hamburg, Germany）もある。挙げることのできるもう1つの企業はMerck Chimie SAS（94126 Fontenay-sous-Bois, France）であり、これは、フェライトを最大で50%含むポリスチレンまたはジビニルベンゼンをベースとし、酸性基もしくはアミン基またはトシル基によって官能化することもでき、そうしないこともできる種々の粒子径（200nm～1,5μm）がある広範囲のEstapor（商標）磁性マイクロビーズを有する。これらの粒子は、強磁性化合物の存在下でスチレン重合を用いる方法によって調製される。

【0173】

最後に、本発明者らは、ストレプトアビジンまたはカルボン酸基もしくはトシル基によって官能化された1μm～3μmの種々のサイズの磁性粒子を提案しているJSR Micro社（Japan）を挙げるができる。JSRによる磁性ビーズは磁性物質でコーティングされたコア粒子で構成され、磁性物質を封入するためにそれがモノマーによって覆われている。提案されているこれらの粒子のうち、本発明者らが好ましいと考えるのは、鉄含量が約48%でカルボン酸官能基の割合がビーズ1mg当たり約15nmである、1μmサイズの疎水性ビーズである。これらのビーズは、物理的吸着によって、または化学的連結によって連結させることができる。

【0174】

好ましくは、本発明は、超常磁性ビーズ、好ましくはサイズが200nm～1.5μmであり、好ましくは疎水性であって、カルボン酸基またはトシル基によって官能化されている磁性粒子の使用を含む。

【0175】

磁性ビーズの鉄の平均割合は、カルボン酸ビーズに関しては約45%であり、トシルビーズに関しては約30%である。

【0176】

本記載において、ビーズまたは粒子は、「磁性粒子」を呼称することに関して同じ意味を有する。

【0177】

官能基に関する官能化の割合は多様であり、トシル型のビーズに関して官能基の数は40～80μeq/gビーズとさまざまであり、一方、カルボキシル基を有するビーズに関する官能基の数は20μeq/gビーズ～350μeq/gビーズとさまざまであってよい。

【0178】

本発明において、本発明者らは、サイズが200nm～300nmであって、強磁性化合物を少なくとも40%含み、かつカルボン酸官能基の数がビーズ1g当たり約130μeqであり、参照記号M1-030/40で販売されている、ESTAPOR（商標）による磁性ビーズを用いることを好む。または、同じ供給元を利用して、本発明者らは、40～80μeq/gビーズの範囲にわたるトシル官能基を含み、直径が約1.2μmで、参照記号R01-24で販売されているビーズである磁

10

20

30

40

50

性ビーズを用いることもできる。

【0179】

本発明にとって好ましいと考えられるもう1つの選択肢は、JSR Micro社による、直径が1 μ mで、17nmol / ビーズ1g (gramme od beads) の割合のカルボキシル基によって官能化された疎水性タイプからの、参照記号MB100で販売されている磁性ビーズの使用である。

【0180】

カルボン酸基によって官能化されたビーズについては、化学的連結よりも物理的吸着の方が好ましいと考えられる。

【0181】

ビーズを、グリコホリンAに対して特異的なIgG2aアイソタイプの精製マウスモノクローナル抗体と連結させる。

10

【0182】

官能化された磁性ビーズと連結させる抗グリコホリンA抗体の濃度は5 μ g / mgビーズ ~ 25 μ g / mgビーズとさまざまであってよく、20 μ g / mgビーズの濃度が好ましい。より好ましくは、検査の感度および特異性を向上させるため、ならびに / または高めるために、抗GPA抗体を1 μ g / mg ~ 5 μ g / mg磁性粒子、好ましくは2.5 μ g / mg \pm 0,5 μ g / mg磁性粒子の濃度で磁性粒子と連結させる。

【0183】

連結の終了時に、抗グリコホリンAを連結させたビーズを含む溶液は、0.1% (m/v) BSAとともにsynperonic (商標) PE/F68タイプのような非イオン性界面活性剤を含むPBS緩衝液からなる。synperonic (商標) PE/F68は、poloxamer synperonic (商標) F68とも呼ばれる非イオン性親水性界面活性剤であり、Sigma Aldrichから参照記号: 81 112として販売されている。3つのブロック (bloc) でできたこのポリマーは、ポリオキシプロピレンブロックでできた疎水性中心部が、ポリオキシエチレンの2つの親水性ブロックによって取り囲まれたものからなる。

20

【0184】

ナノ粒子または微粒子を用いる場合には、特にpH、イオン強度および温度の諸条件下で起こりうるこれらの磁性粒子の自発凝集を避けるために、界面活性剤を用いることが特に好ましい。ポロキサマーなどの非イオン性両親媒性高分子の吸着による粒子表面の変化が、溶液中の磁性粒子の非凝集に寄与することがとりわけ示されている。

30

【0185】

とりわけ、粒子をPBS (リン酸緩衝食塩水) などの高イオン強度の緩衝液中の溶液に入れると、ナノ / 微粒子はそのコロイド安定性を失って凝集する傾向がある。界面活性剤の添加は、このため、このコロイド安定性を確保すること、および高イオン強度の緩衝液中での粒子の凝集を回避することを可能にする。

【0186】

非イオン性界面活性剤にはTween (商標) 20、60および80、またはSynperonic (商標) PE/F68もしくはF127などのいくつかの種類がある。本発明において、本発明者らは、synperonic (商標) PE/F68を用いることを好む。

【0187】

種々の抗体を連結させたビーズのコロイド安定性に対する効率的な作用を確保するためには、synperonic (商標) の濃度が0.1%を上回り、かつ2.5%を下回らなければならず、後者はこの濃度の界面活性剤の存在下における細胞の生存可能点である。0.5% (m/v) が好ましい濃度である。

40

【0188】

もう1つの特に好ましい態様において、本発明は、前記磁性粒子の懸濁液が、好ましくは非イオン性であり、好ましくはsynperonic (商標) PE/F68などのポロキサマーから選択されるか、またはTween (商標) (20、40、60または80) から選択される界面活性剤を含む懸濁液であり、前記界面活性剤が0.1% ~ 1% (w/v)、好ましくは0.25% ~ 0.75% (w/v) または0,5% \pm 0,15%の濃度であることを特徴とする、本発明による方法を含む。

50

【0189】

連結させた上で、ビーズを続いて、PBS (0.3M) + 0.1% (w/v) のBSA + 0.5% (w/v) のsynperonic (商標) PE/F68を含む溶液中で1% (m/v) の濃度で、これを最終的な希釈液中での希釈まで貯蔵する。

【0190】

もう1つの特に好ましい態様において、本発明は、抗GPAを連結させた磁性粒子の安定性を向上させるため、および/または高めるために、非イオン性界面活性剤の濃度が0.5% ~ 10% (w/v) であり、好ましくは5% (w/v) であることを特徴とする、本発明による方法を含む。

【0191】

続いてビーズを、AHGの上の粘性溶液 (障壁濾過とも呼ばれ、またはゲルとも呼ばれる) 上に分配する最終的な希釈液中に、0.004%または好ましくは0.007%の濃度に希釈する。

【0192】

抗グリコホリンAを連結させたビーズが希釈されているこの最終的な希釈液は、密度が1を上回り、好ましくは低イオン強度の緩衝液 (または《LISS》もしくは《BFI》緩衝液) および親水性ポリマー、好ましくは親水性多糖、とりわけFicoll (商標) 400で構成される。低イオン強度の緩衝液中でのこの多糖の濃度は好ましくは2%である。低イオン強度の緩衝液は、それが抗体と赤血球との反応を助長し、かつ速度を高めるという点で、免疫血液学の当業者には周知である。

【0193】

この緩衝液は適宜、媒質にある特定の粘性を与えること、およびマイクロプレートの露出部の方への赤血球の進行速度を制御することを可能にする最終濃度1.5% ~ 6% (w/v) の血清アルブミン (BSA) の存在下で作製することができる。アルブミンを含む緩衝液を用いることの欠点は、泡が生じる傾向があることである。

【0194】

したがって、本発明者らは、泡を全く生じさせない化合物をその代わりに用いることを好む。本発明者らは、非常に容易に水和させることができ、溶液中で特に安定的な糖ポリマーであるFicoll (商標) 400を選んだ。これは、細胞分離の多くの生物学的プロトコールにそれが用いられていることから、その再現性が実証されている合成生成物である。このように、その密度には再現性がある；これは無色であり、水と自由に相互作用するその構造のために泡を形成しない。用いられる濃度は、3%のアルブミンで得られるものに等しい溶液密度を実現する。これは、進行する赤血球に対する必要かつ十分な緩衝物 (cushion) を対置する。2%のFicoll (商標) 400を含む希釈液の密度は、すなわち、1.013g/cm³に等しい。

【0195】

磁性粒子を含む希釈液に関する好ましい組成の例：

1リットルにつき：

Na₂HPO₄・2H₂O : 0.213g

NaH₂PO₄・2H₂O : 0.240g

NaCl : 1.788g

グリシン : 18.05g

アジ化ナトリウム : 0.9g

Ficoll 400 : 20g

浸透圧 : 310+/-20mOsm

pH : 6.75+/-0.1

【0196】

いくつかの用途において、とりわけそれが反応の感度または速度を向上させることを伴う場合には (しかし検査の非特異性の増加を伴わずに)、LISS緩衝液 (LISSは低イオン強度溶液 (Low Ionic Strength Solution) の略) とも呼ばれる低イオン強度緩衝液ISBを用

10

20

30

40

50

いることができる。

【0197】

当業者には、食塩液などの緩衝液が、とりわけIATまたは表現型判定の用途において、赤血球の溶解を妨げるために、細胞生物学、とりわけ免疫血液学の分野で一般的に用いられる緩衝液のことを指すことが公知であろう。そのような緩衝液または溶液は、例えば、得られる最終的な溶液が6.8~7.5の生理的pHにあり、緩衝液成分のモル濃度が、浸透圧の点で、0.9%のNaClタイプの溶液(0.15M NaClに近い)のモル濃度と同程度であるように調整される緩衝液であってよい。特に、本発明者らは、当業者に周知であるpH 7.0~7.4のPBSタイプのリン酸緩衝液を挙げることができるが、これには限定されない。

【0198】

そのため、ISB緩衝液またはLISS緩衝液の組成を本明細書には記載しないが、それはこれらの緩衝液は凝集反応を増強する能力に関して免疫血液学において周知であるためである。これらの緩衝液は、血液学用の試薬の供給元から入手可能である(例えば、本発明者らは以下の組成を有するLISS緩衝液を挙げることができるが、これには限定されない。16g/1グリシン、0.03M NaClおよび0.015Mリン酸、pH 6.7)。

【0199】

もう1つの好ましい態様において、本発明は、ドナーとレシピエントとの適合性検査を実行するために、または直接Coombs検査を実行するために実施される。

【0200】

もう1つの局面において、本発明は、以下を特徴とする、溶液中に存在する血液型または表現型の抗原抗体と、赤血球によって保有される血液型または表現型の抗原との反応によって形成される特異的複合体を実証するために、とりわけIATまたは適合性検査を実施するために、またはSimonin検査もしくはBeth-Vincent検査などの血液型判定、または表現型判定のために形成されるキットに関する：

(a) 好ましくは本発明による方法の1つに記載されたような、抗GPAでコーティングされた磁性粒子の懸濁液を含む試薬。

【0201】

1つの好ましい態様局面において、本発明は、それが以下をさらに含むことを特徴とする、本発明によるキットに関する：

(b) 開いた上部および密封された基部を有し、その直径が、少なくとも基部に近接した領域では、傾斜壁を形成するように小さくしており、該傾斜壁が、抗免疫グロブリンで、または前記形成された複合体の抗体と結合しうる他の任意の化合物で、少なくとも部分的にコーティングされている、反応器または反応器セット、

粘性溶液を含む容器、または必要な場合、本発明による方法の1つに定義された前記粘性物質で部分的に満たされた各反応器；ならびに

(c) または、必要な場合、希釈液を含む容器であって、前記希釈液が、好ましくは多糖性である親水性ポリマー、好ましくはFicoll(商標)、とりわけFicoll(商標)400を、1%~2.5%(w/v)、好ましくは2%±0.3%の濃度で含む溶液である、容器、

(d) または必要な場合、回転攪拌機と連結された反応器の外側下方に配置可能である、少なくとも1つの磁石または一群の磁石。

【0202】

もう1つの好ましい態様において、本発明の前記キットは、既知の表現型を有する検査用赤血球の懸濁液を含み、該赤血球に対して懸濁液の前記磁性粒子が連結し得、好ましくは赤血球懸濁液がO型のものであり、かつ0.2%~2.5%の範囲の、好ましくは0.5%~1.5%の範囲の、好ましくは1%±0.3%の濃度を有することを特徴とする。

【0203】

さらに好ましくは、本発明は、粘性物質、および必要であれば磁性粒子、または磁化された赤血球の懸濁液、または必要であれば磁石および回転攪拌機の特徴が、本発明による方法に定義された特徴を有することを特徴とし、これらの粘性溶液または他の化合物および要素に関して特定された好ましさも備えている、本発明によるキットにかかわる。

10

20

30

40

50

【0204】

1つの好ましい態様において、本発明によるキットは、それが、その赤血球に対して懸濁液の前記磁性粒子が連結されると考えられる既知の表現型を有する検査用赤血球の懸濁液を含み、好ましくは赤血球懸濁液がO型由来であり、かつ0.2%~2.5%の、好ましくは0.5%~1.5%の、好ましくは1%±0.3%の濃度を有することを特徴とする。

【0205】

1つの好ましい態様において、本発明によるキットは、血液型判定用または表現型判定用であり、既知の特異性を有する血清検査薬を溶液状態でまたは乾燥形態でさらに含むことを特徴とする。

【0206】

本説明において、赤血球 (erythrocyte)、赤血球 (red cell) および赤血球 (red blood cell) という語は、同じ血球の名前を挙げるために同じように用いられる。

【0207】

さらに好ましくは、本発明は、前記反応器が好ましくは丸底 (半球形) またはV字底を有するマイクロプレート穴であり、96穴からなるマイクロプレートが最も好ましいことを特徴とする、本発明によるキットに関する。

【0208】

添付の図面および以下の見出し、ならびに以下の実施例は、本発明を例示することを意図しており、その範囲を全く限定するものではない。

【図面の簡単な説明】

【0209】

【図1】図1Aおよび1Bは、マイクロプレートの下にある軟鉄プレートからなり、その軟鉄プレートに各磁石が、各マイクロプレート穴の下にスタック状に磁氣的に固定されている、攪拌プラットフォーム (Teleshake (商標)) の上面像 (図1A) および側面像 (図1B) の略図。(1) 磁石間に好適な間隔が得られるようにするプラスチック製スペーサー; (2) マイクロプレートをTeleshake上に押し込み固定することを可能にする要素; (3) マイクロプレートを押し込み固定することを可能にするTeleshakeの楔状部; (4) スタック状の磁石; (5) マイクロプレート; (6) プラスチック製スペーサー; (7) 上に磁石が磁氣的に固定されている軟鉄 (mild iron) プレート; (8) Teleshakeを磁石スタックの磁場から絶縁する厚紙プレート; (9) Teleshake回転トレイ。

【図2】図2Aおよび2Bは、穴の傾斜壁 (部分的に) および基部に抗免疫グロブリンをコーティングした後、かつ粘性溶液ならびにさまざまな溶液および試薬の添加前の、丸底 (またはU字型) の反応器の穴の略図 (図2A)。穴の傾斜壁 (部分的に) および基部に抗免疫グロブリンをコーティングした後、かつ粘性溶液および希釈液中で「磁化された」赤血球懸濁液の添加後、ならびに検査しようとする血漿または血清の添加後の、丸底 (またはU字型) 反応器の穴の略図 (数ある中の一例) (図2B)。

【図3】赤血球によって保有される抗原との陽性免疫接着反応 (抗免疫グロブリンでコーティングされた傾斜壁と接着する特異的複合体の形成) の画像を示している写真 (左の図)、および赤血球によって保有される抗原との陰性免疫接着反応 (特異的な複合体の形成がみられず) の画像を示している写真 (右の図)。

【図4】第3の方法を用いた不規則抗体検査 (IAT)。

【図5】不規則抗体検査によるCNRGS (French National Reference Centre for Blood Groups)、抗Dの滴定。

【図6】血液型O型のドナーで実施した交差適合検査 (適合性検査)。

【図7】血液型O型のドナーで実施した交差適合検査 (適合性検査)。

【図8】磁性ビーズ上への抗グリコホリンA (GPA) の連結。

【図9】磁性粒子上にコーティングした抗グリコホリンAによるヒト赤血球の磁化の原理。

【図10】不規則抗体検査における、抗GPAを連結させたビーズによる赤血球の磁化の3つの方法。

10

20

30

40

50

【図11】不規則抗体検査における、抗GPAを連結させたビーズによる赤血球の磁化の3つの方法。

【図12】不規則抗体検査における、抗GPAを連結させたビーズによる赤血球の磁化の3つの方法。

【図13】患者8人についての血液型判定（Simonin検査を含む）および表現型判定のための凝集法。

【図14】患者5人の拡張された表現型判定のための凝集法。

【図15】ドナー8人の拡張された表現型判定のための免疫付着法。

【図16】ドナー48人のWeak D表現型判定のための免疫付着法。

【図17】磁性ビーズに連結させる抗GPA濃度を低下させることによる、交差適合検査の感度および特異性の向上。比較試験。

【図18】抗GPAと連結させた磁性粒子の貯蔵時における、非イオン性界面活性剤の2つの濃度（0.5%対5%）間での安定性試験。

【実施例】

【0210】

実施例1：材料（MATERIEL）および方法

A) トシル活性化磁性ビーズに対する抗グリコホリンAの連結の例（図8参照）

ESTAPOR（商標）によるトシル活性化磁性粒子（参照記号：R01-24）に対する抗グリコホリンAの連結を、0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液 pH9.5またはwith 0.1Mリン酸緩衝液 pH 7.4のいずれかを用いて行うことができる。

【0211】

連結の前に、トシル活性化した磁性粒子を、選んだ連結用緩衝液中で磁石を用いて2回洗浄する。連結は、ビーズを連結用緩衝液（ホウ酸またはリン酸）中に再懸濁させること、および抗体をビーズ1mg当たり10 μ gの濃度で添加することによって行う。抗体の連結は3M硫酸アンモニウムの存在下で行う。

25mgのトシル磁性粒子（すなわち10% w/vのビーズ250 μ l）を、0.1Mリン酸緩衝液 pH 7.4または0.1Mホウ酸ナトリウム緩衝液 pH 9.5中で、磁石を用いて2回洗浄する。

ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石から取り外して、ビーズを10 μ gの抗グリコホリンAとともに再懸濁させる。

250 μ lの3M硫酸アンモニウムをビーズの懸濁液に添加して、最終濃度1.5Mの硫酸アンモニウムとする。

ビーズをボルテックス処理によって十分に再懸濁させる

緩徐な傾斜回転を行いながら室温で24h～48hインキュベートする。

連結の終了時に、チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石から取り外して、0.3Mリン酸緩衝食塩水（PBS）を0.5% BSA（w/v）とともに含むブロッキング緩衝液中にビーズを再懸濁させる。

緩徐な傾斜回転を行いながら室温で24h～48hインキュベートする。

ブロッキング段階の終了時に、チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石から取り外して、0.3M PBSを0.1%（w/v）BSAおよび0.5%（w/v）のsynperonic（商標）PE/F68とともに含む保存溶液中にビーズを再懸濁させる。抗グリコホリンAを連結させたビーズの最終濃度を、保存緩衝液中に1%（w/v）とする。ビーズを使用時まで4で貯蔵する。

【0212】

B) ESTAPOR（商標）によるカルボン酸磁性ビーズに対する抗グリコホリンAの連結の例

ESTAPOR（商標）によるカルボン酸磁性ビーズ（参照記号：M1-030/40.）に対する抗GPAの好ましい連結方法は物理的吸着である。

10

20

30

40

50

【0213】

用いる抗GPAの濃度はビーズ1mg当たり $5\mu\text{g}$ ~ $25\mu\text{g}$ とさまざまであり、ビーズ1mg当たり $10\mu\text{g}$ の抗GPAが好ましい。

【0214】

カルボン酸磁性ビーズに対する抗GPAの連結は、以下の通りに実施する：

25mgのカルボン酸磁性粒子（すなわち、10% w/vのビーズ $250\mu\text{l}$ ）を、1mlの10mMリン酸緩衝液 pH6中で磁石を用いて2回洗浄する。

洗浄段階の終了時に、チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石から取り外して、1.5mlの20mMリン酸緩衝液 pH7.5を用いてビーズを再懸濁させる。

直ちに抗GPAをビーズ1mg当たり $10\mu\text{g}$ の濃度で添加する。

ボルテックス処理によって十分に混合する。

緩徐な傾斜かき混ぜを行いながら室温で2時間インキュベートする。

チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石の上に置いてビーズを20mMリン酸緩衝液 pH7.5で3回洗浄する。

洗浄段階の終了時に、0.3Mリン酸緩衝食塩水（PBS）を0.5% BSA（w/v）とともに含むブロッキング緩衝液中にビーズを再懸濁させる。

緩徐な傾斜かき混ぜを行いながら室温で2時間インキュベートする。

ブロッキング段階の終了時に、チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石から取り外して、0.3M PBSを0.1%（w/v）BSAおよび0.5%（w/v）のsynperonic（商標）PE/F68とともに含む保存溶液中にビーズを再懸濁させる。抗グリコホリンAを連結させたビーズの最終濃度を、保存緩衝液中に1%（w/v）とする。ビーズを使用時まで4℃で貯蔵する。

【0215】

C) JSR Microによるカルボン酸磁性ビーズに対する抗グリコホリンAの連結の例

JSR Microによるカルボン酸磁性ビーズ（参照記号：Magnosphere MB 100）に対する抗GPAの連結の好ましい方法は物理的吸着である。

【0216】

用いる抗GPAの濃度はビーズ1mg当たり $5\mu\text{g}$ ~ $25\mu\text{g}$ とさまざまであり、ビーズ1mg当たり $20\mu\text{g}$ の抗GPAが好ましい。

【0217】

5mgのカルボン酸磁性ビーズに対する抗GPAの連結は、以下の通りに実施する：

5mgのカルボン酸磁性粒子（すなわち、すなわち、10% w/vのビーズ $50\mu\text{l}$ ）を、 $200\mu\text{l}$ の50mM MES緩衝液（2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸）、pH6.2中で磁石を用いて2回洗浄する。

洗浄段階の終了時に、チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

直ちに抗GPAをビーズ1mg当たり $20\mu\text{g}$ の濃度で添加する。

ボルテックス処理によって十分に混合する。

緩徐な傾斜かき混ぜを行いながら室温で2時間インキュベートする。

チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石の上に置いてビーズを50mM MES緩衝液pH6.2で3回洗浄する。

洗浄段階の終了時に、0.3Mリン酸緩衝食塩水（PBS）を0.5% BSA（w/v）とともに含むブロッキング緩衝液中にビーズを再懸濁させる。

緩徐な傾斜かき混ぜを行いながら室温で2時間インキュベートする。

ブロッキング段階の終了時に、チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動し

て液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石から取り外して、0,3M PBSを0.1% (w/v) BSAおよび0.5% (w/v) の synperonic (商標) PE/F68とともに含む保存溶液中にビーズを再懸濁させる。抗グリコホリンAを連結させたビーズの最終濃度を、保存緩衝液中に1% (w/v) とする。ビーズを使用時まで4 で貯蔵する。

【0218】

D) 希釈液中での連結させたビーズの希釈

ビーズを抗GPAと連結させたところで、これらのものを希釈液LissおよびFicoll (商標) 2% (w/v) 中に直接希釈し、続いてそれを粘性溶液またはゲルの上に分配する。希釈液中のビーズの濃度は0,005% ~ 0.02% でさまざまであってよく、0.004% が好ましい。

10

【0219】

実施例2: 抗ヒト免疫グロブリン (AHG) による傾斜壁および穴の基部のコーティング

穴のために用いられるプラスチックの化学的および物理化学的性質により、任意の特異的複合体の抗体がヒト起源である場合に、前記複合体の抗体と特異的に結合しうるヒト抗免疫グロブリン (モノクローナルまたはポリクローナルHAGタイプ) の層で、後者を覆うことが可能である。

【0220】

さらに、このHAG組成物が、補体型血清タンパク質決定基に指向する抗体を含みうることも留意されたい。

【0221】

AHGでコーティングされない容器の内壁の表面は、固相またはELISA (酵素結合免疫吸着アッセイ) 型の手法における従来の飽和剤を用いて飽和させることができる。

20

【0222】

例えば、濃度1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のAHG溶液を、0.2M炭酸緩衝液 pH 9.6中に調製することができる。

【0223】

この溶液を、丸底Maxisorp NUNC U8型マイクロプレートの各穴に75 μl の容積で分配する。プレートを続いて4 で一晩インキュベートする。

【0224】

続いて穴を、プラスチック上に直接吸着されないタンパク質を排除するために、リン酸緩衝液 (PBS 2.5mM、pH 7.4) で洗浄する。

30

【0225】

続いて穴を、PBS緩衝液中の30g/lのアルブミン (albumen) 溶液で、1つの穴当たり100 μl の割合で処理する。

【0226】

室温での2時間のインキュベーション後に、穴を再びリン酸緩衝液中で洗浄する。

【0227】

実施例3:

第1の方法: 別個のウェルにおける抗GPA (抗グリコホリンA) を連結させた磁性ビーズによる赤血球の磁化

40

(磁化の一般原理については図9、方法1については図10を参照)

不規則抗体の検出は、パネルと呼ばれる、既知の表現型を有する赤血球を用いることからなる。1つのパネルは、細胞の3種の補完的表現型からなる。丸底の96ウェルのマイクロタイタープレートの3つのウェルの中に、抗GPAと連結させた5 μl のビーズを積み重ね、続いて、貯蔵用緩衝液中で1%に希釈した各赤血球パネル45 μl を添加する。2つの構成要素を混合した後に、赤血球を直ちに磁化して、以下の段階に用いるようにする。

【0228】

特異的抗ヒトグロブリン (抗IgG) または抗ヒトグロブリンの混合物 (抗IgGおよび抗IgM) でコーティングされた丸底96ウェルマイクロプレートの3つのウェルの中に、密度が1よりも高い粘性溶液またはゲルを入れて、細胞および血清検査薬を含む反応媒質と抗グロ

50

ブリンの間に障壁を作ることができる。

【0229】

障壁の上に密度が1よりも高い粘性希釈液を積み重ね、その上に抗GPAを介して磁化された細胞、ならびに検査しようとする患者またはドナーからの血清または血漿を積み重ねる。

【0230】

マイクロプレートを続いて37℃で20分間インキュベートする。このインキュベーションの間に、血清中に存在するかまたは存在しない赤血球抗体は、抗原を保有する磁化された赤血球と結合すると考えられる。インキュベーションの終了時に、マイクロプレートを、磁気プレートを備えた回転攪拌機の上に置く。同時に攪拌しながら磁場を印加する間に、抗赤血球抗体をその表面上に保有する磁化された赤血球は、粘性溶液の中を引き寄せられて、底面上にコーティングされたAHGと結合するが、それを保有しない赤血球はそうではないと考えられる。

10

【0231】

磁場の下での最終的な攪拌は、2つのシーケンスで構成される：第1の攪拌シーケンスは、磁化および感作された赤血球が抗グロブリンによって捕捉されることを可能にし、これは500rpmで2分30秒間～4分間、好ましくは500rpmで3分間持続させるが、一方、第2の攪拌シーケンスはペレットの形成による陰性反応を形作り、このシーケンスは600rpmで30秒間～2分間、好ましくは600rpmで1分間持続させる。

【0232】

陽性反応の場合には、患者またはドナーの血清（または血漿）によって感作された磁化された細胞は、AHGと結合して、ウェルの底面に赤血球の薄層を形成すると考えられる。

20

【0233】

陰性反応の場合には、患者またはドナーの血清（または血漿）によって感作された磁化された細胞は、続いて、ウェルの底面にペレットを形成すると考えられる（図3参照）。

【0234】

実施例4：

第2の方法：血清または血漿による感作時の、抗GPAを連結させた磁性ビーズによる赤血球の磁化

各要素の連続的積み重ね

30

（図11参照）

特異的抗ヒトグロブリン（抗IgG）または抗ヒトグロブリンの混合物（抗IgGおよび抗IgM）でコーティングされた丸底の96ウェルのマイクロタイタープレートの3つのウェルの間に、密度が1よりも高い粘性溶液またはゲルを積み重ねて、細胞および血清検査薬を含む反応媒質と抗グロブリンとの間に障壁を作ることができる。

【0235】

粘性障壁またはゲルの上に希釈液を積み重ね、続いて抗GPAを連結させた磁性ビーズを、続いて貯蔵用緩衝液中に1%に希釈した赤血球を積み重ね、最後に検査しようとする患者（またはドナー）血漿または血清を積み重ねる。

【0236】

マイクロプレートを続いて37℃で20分間インキュベートする。インキュベーションの間に、抗GPAを連結させた磁性ビーズは赤血球と結合すると考えられる；これは検査しようとする血清または血漿中に存在するかまたはそうでない不規則抗体に関して同じである。各抗体は1つの抗原に対して特異的であり、赤血球に対する1つのものの結合は他のものの結合を妨害しない。

40

【0237】

したがって、抗原を担持する赤血球は、患者の血漿中に存在するかまたはそうでない抗体によって磁化され、かつ感作されうると考えられる。

【0238】

インキュベーションの終了時に、マイクロプレートを、磁気プレートを備えた回転攪拌

50

機の上に置く。同時に攪拌しながら磁場を印加することにより、不規則抗体をその表面上に保有する赤血球は、粘性溶液の中を引き寄せられて、底面上にコーティングされたAHGと結合するが、それを保有しない赤血球はそうではないと考えられる。磁場の下での最終的な攪拌は、2つのシーケンスで構成される：第1の攪拌シーケンスは、磁化および感作された赤血球が抗グロブリンによって捕捉されることを可能にし、これは500rpmで2分30秒間～4分間、好ましくは500rpmで3分間持続させるが、一方、第2の攪拌シーケンスはペレットの形成による陰性反応を形作り、このシーケンスは600rpmで30秒間～2分間、好ましくは600rpmで1分間持続させる。

【0239】

前の例と同じように、陽性反応の場合には、患者またはドナーの血清（または血漿）によって感作された磁化された細胞は、AHGと結合して、ウェルの底面に赤血球の薄層を形成すると考えられる。陰性反応の場合には、患者またはドナーの血清（または血漿）によって感作された磁化された細胞は、続いて、ウェルの底面にペレットを形成すると考えられる。

10

【0240】

この方法では、磁化が特異的であり（抗GPA抗体を介する）、この後者の際には干渉が全く起こらず、そのため患者の血漿による赤血球感作が独立に起こるため、別個のウェルにおいて赤血球の磁化を実施する必要がない。

【0241】

実施例5：

20

第3の方法：血清または血漿による感作時の、抗GPAを連結させた磁性ビーズによる赤血球の磁化、希釈液中でのGPAを連結させた磁性ビーズの希釈（図12参照）。

他の2つのものよりも好ましいこの方法では、フィルター上に積み重ねる希釈液中にビーズを直接希釈する。このため、積み重ねの回数は限られ、抗グリコホリンAを連結させたビーズを含む希釈液は試薬とみなされる。

【0242】

前と同じく、特異的抗ヒトグロブリン（抗IgG）または抗ヒトグロブリンの混合物（抗IgGおよび抗IgM）でコーティングされた丸底の96ウェルのマイクロタイタープレートの3つのウェルの中に、密度が1よりも高い粘性溶液またはゲルを投入し、細胞および血清検査薬を含む反応媒質と抗グロブリンとの間に障壁を作ることができる。抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む希釈液を粘性障壁またはゲルの上に積み重ねる。続いて、貯蔵用緩衝液中に1%に希釈した赤血球を、磁性ビーズを含む希釈液の上に積み重ね、最後に検査しようとする患者（またはドナー）の血漿または血清を赤血球の上に積み重ねる。

30

【0243】

1つの好ましい態様において、赤血球は、密度が1よりも高い粘性障壁の上に積み重ねられる前に、抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む希釈液と既に混合されている。続いて、血漿または血清を添加して、赤血球-希釈液-磁性ビーズを混合させる。

【0244】

1つの自動化された態様においては、以下が好ましい：特異的抗ヒトグロブリン（抗IgG）または抗ヒトグロブリンの混合物（抗IgGおよび抗IgM）でコーティングされた丸底の96ウェルのマイクロタイタープレートの3つのウェルの中に、赤血球、および磁性ビーズを含む希釈液を積み重ねる。プレートを自動攪拌機の上に置くことによって、2つの構成要素を混合する。攪拌の終了時に、自動化装置のチップをウェルの底面に配置することによって、高密度の粘性障壁を混合赤血球-希釈液-磁性ビーズの下に注入する。その密度のために、粘性障壁は混合物の下に保たれ、それ故に非特異的抗体によるAHGの飽和が回避され、その一方で、細胞および磁性ビーズを含む希釈液によって形成される混合物は、粘性障壁の上により低密度に保たれる。

40

【0245】

これにより、密度の異なる2つの別個の相が得られる：第1のものは、AGH、および抗GPAを連結させた磁性ビーズを含み、赤血球と混合された希釈液の上にある、より高密度のゲ

50

ルである。続いて、検査しようとする患者の血漿を混合物の上に置く。

【0246】

マイクロプレートを続いて37℃で20分間インキュベートする。インキュベーションの間に、検査する血漿中に存在するかまたは存在しない不規則抗体は赤血球と結合すると考えられる。抗原を担持する赤血球は、患者の血漿中に存在するかまたはそうでない抗体によって磁化され、かつ感作されうると考えられる。各抗体は1つの抗原に対して特異的であり、赤血球に対する1つのものの結合は他のものの結合を妨害しない。

【0247】

インキュベーションの終了時に、マイクロプレートを、磁気プレートを備えた回転攪拌機の上に置く。同時に攪拌しながら磁場を印加することにより、不規則抗体を保有する赤血球は、粘性溶液の中を引き寄せられて、底面上にコーティングされたAHGと結合するが、それを保有しない赤血球はそうではないと考えられる。磁場の下での最終的な攪拌は、2つのシーケンスで構成される：第1の攪拌シーケンスは、磁化および感作された赤血球が抗グロブリンによって捕捉されることを可能にし、これは500rpmで2分30秒間～4分間、好ましくは500rpmで3分間持続させるが、一方、第2の攪拌シーケンスはペレットの形成による陰性反応を形作り、このシーケンスは600rpmで30秒間～2分間、好ましくは600rpmで1分間持続させる。

10

【0248】

前の例と同じように、陽性反応の場合には、患者またはドナーの血清（または血漿）によって感作された磁化された細胞は、AHGと結合して、ウェルの底面に赤血球の薄層を形成すると考えられる。陰性反応の場合には、患者またはドナーの血清（または血漿）によって感作された磁化された細胞は、続いて、ウェルの底面にペレットを形成すると考えられる。

20

【0249】

これらの磁化方法はすべて、ドナーとレシピエントとの適合性に関する検査などの他の検査に差し向けることができる。

【0250】

この場合には、輸血バッグからのドナー細胞を、抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む希釈液の上に乗せる前に、前もって低イオン強度緩衝液中に1%に希釈する。

【0251】

これは、不規則抗体によってインビボで感作された疑いのある患者、特に母子不適合性または自己免疫性溶血性疾患の場合に行われる直接coombs検査についても同じである。

30

【0252】

これらの場合には、インビボで感作された赤血球を、抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む希釈液の上に乗せる前に、前もって低イオン強度緩衝液中に1%に希釈する。

【0253】

実施例6：第3の方法を用いる不規則抗体の検出検査（図4参照）。

抗GPAを連結させたビーズを、希釈液（Liss Ficollとも呼ばれる）中に直接希釈し、Liss中の10%アルブミン溶液中にある3%のsuperfine Sephadex（商標）G-100型の粘性障壁またはゲル（Nanolys（商標）とも呼ばれる）の上にそれ自体を積み重ねる。細胞はO型患者の一次チューブから低イオン強度緩衝液中に1%に希釈したものが、またはO型のパネル赤血球から貯蔵用緩衝液中に1%に希釈したものとする。

40

【0254】

用いる抗血清（検査用血清）は患者に由来し、抗D+抗C+抗Eなどの不規則抗体を含む。この試料を種々の希釈度で検査する。

【0255】

結果の予想は、同じ細胞および同じ抗血清を用いて、すでに商業化されている手法に対して実施した。

【0256】

プロトコール：

50

ヒト抗グロブリン（抗IgG）がコーティングされた丸底の96ウェルのマイクロタイタープレート（ScreenLys（商標）とも呼ばれる）のウェル中に、50 μ lのNanolys（商標）を積み重ね、続いて抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む50 μ lのLiss Ficollを添加する。1%に希釈した15 μ lの赤血球を添加し、検査しようとする15 μ lの血清または血漿を最後に添加する。マイクロプレートをインキュベーター内に入れて37 $^{\circ}$ Cで20分間おき、続いてマイクロプレートを、マイクロプレートの各ウェルの下に丁度合う磁石のプレートを備えた攪拌機の上に乗せる。磁場の下での最終的な攪拌は2つのシーケンスで構成される：500rpmで3分間、その後600rpmで1分間。

【0257】

実施例7：不規則抗体の検出検査を用いた、CNRGS（French National Reference Centre for Blood Groups）による抗Dの滴定（図5参照）

10

保存用緩衝液中に1%に希釈したO型赤血球パネルを用いて検査する抗血清としての、CNRGSによる抗D標準物質の希釈系列の使用。

【0258】

標準的抗Dのこの滴定は、記載された方法の検出閾値を実証することを可能にする。

【0259】

プロトコール：

Screenlys（商標）（ヒト抗グロブリン（抗IgG）でコーティングされたプレート）のウェル中に、50 μ lのNanolys（商標）を積み重ね、続いて抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む50 μ lのLiss FicollをNanolys（商標）に添加する。1%に希釈した15 μ lの赤血球を添加し、検査しようとする抗Dの15 μ lの各希釈物を最後に添加する。プレートを続いて37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、続いてマイクロプレートの各ウェルの下に丁度合う磁石のプレートを備えた攪拌機の上に乗せる。磁場の下での最終的な攪拌は2つのシーケンスで構成される：500rpmで3分間、その後600rpmで1分間。

20

【0260】

その結果は、不規則抗体の検出の検査が高感度であり、かつ1.25ng/mlまでの抗Dを検出しうることを示している。

【0261】

この磁化方法は、感度および特異性の点で、既に商業化されている方法と極めて同等である。

30

【0262】

実施例8：O型赤血球ドナーに対して行った交差適合検査（適合性検査）（図6および7参照）。

EDTAチューブ上に収集したドナーからのO型赤血球を、不規則性の抗赤血球抗体を含むかまたは含まない可能性がある患者からの血漿または血清に対して検査する。

【0263】

その結果は以下に提示されている。

【0264】

プロトコール：

一次チューブドナーから、10 μ lの濃厚赤血球を1mlの低イオン強度緩衝液中に希釈して、1%赤血球懸濁液を作る。

40

【0265】

Screenlys（商標）（ヒト抗グロブリン（抗IgG）でコーティングされたプレート）のウェル中に、50 μ lのNanolys（商標）を積み重ね、続いて抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む50 μ lのLiss FicollをNanolys（商標）に添加する。1%に希釈した15 μ lの赤血球を添加し、輸血しようとする患者の15 μ lの血漿または血清を最後に添加する。プレートを続いて37 $^{\circ}$ Cで20分間インキュベートし、続いてマイクロプレートの各ウェルの下に丁度合う磁石のプレートを備えた攪拌機の上に乗せる。磁場の下での最終的な攪拌は2つのシーケンスで構成される：500rpmで3分間、その後600rpmで1分間。

【0266】

50

赤血球に対して特異的な抗体を連結させた磁性ビーズを用いたこの磁化方法で得られた結果は、複数の異なる血液型系において、ドナーとレシピエントとの間の適合性を判定しうることを明らかに実証することができる。

【0267】

実施例9：Simonin検査、IgM型の凝集性抗体を用いる方法を含む血液型判定 / 表現型判定
A) 凝集法

検査を実施する前に、抗GPAを連結させた磁性ビーズを、0.1%のBSA (w/v) および0.5%の synperonic (商標) PE/F68を含むリン酸緩衝液0.3M中に希釈することによって、磁化用溶液を実現させる。抗GPAを連結させた磁性ビーズの濃度は0.001% ~ 0.004%までさまざまであってよく、好ましくは0.003%である。直接検査またはBeth-Vincent検査の場合には、ABO式血液型由来 (抗A、抗Bおよび抗AB)、Rhesus式血液型由来 (D、C、c、E、e) およびKell抗原由来の抗原に対して特異的なモノクローナル抗体を、96ウェルマイクロプレートの丸底ウェル中で乾燥させる。

10

【0268】

個体の赤血球上の関心対象の抗原に関する型判定の実行は、EDTA、クエン酸塩またはヘパリンなどの抗凝固剤の入ったチューブ上に収集された血液試料に対して実施される。

【0269】

1mlの低イオン強度緩衝液、特にLISS緩衝液中に10 μ lの濃厚赤血球を希釈することによって、チューブ内または丸底のプレートのウェル中に、0.5% ~ 1.2%、好ましくは1%の血球懸濁液を生じさせる。上述の乾燥させた抗血清を含む丸底の96ウェルマイクロプレートのウェル中に、10 μ lの磁化用溶液を積み重ね、それに対して1%血球懸濁液30 μ lを添加する。

20

【0270】

直接検査と同時に、未使用の隣接ウェルでSimonin検査を実施する：抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む10 μ lの磁化用溶液をこのように4つの未使用ウェル中に積み重ね、続いて、低イオン強度の貯蔵用緩衝液中に前もって1%に希釈した、A1、A2、BまたはO型といった既知の血液型を有する被験赤血球の15 μ lの懸濁液をビーズに添加し、最後に表現型を判定しようとする患者またはドナーの血漿25 μ lを添加する。

【0271】

マイクロプレートを自動マイクロプレート攪拌機の上に乗せることにより、これらの構成要素をホモジナイズする。かき混ぜ速度は500 ~ 800rpmの間でさまざまであってよく、好ましくは650 ~ 750rpm、好ましくは700rpmである。かき混ぜの持続時間は1分間 ~ 2分間の間でさまざまであってよく、好ましくは1分30秒間である。

30

【0272】

マイクロプレートを続いて室温で2分間 ~ 15分間、好ましくは10分間インキュベートする。

【0273】

各抗体は1つの抗原に対して特異的であり、赤血球に対する1つのものの結合は他のものの結合を妨害しない。したがって、抗原を担持する赤血球は、抗GPAによって磁化され、かつウェル中で乾燥させた抗血清によって感作されうると考えられる。

40

【0274】

インキュベーション段階の終了時に、マイクロプレートを、マイクロプレートの各ウェルに丁度合う96個の磁石を備えたプレートの上に乗せる。抗血清に対応する抗原が存在するならば、抗GPAによって感作および磁化された赤血球は、磁場の影響を受けてウェルの底面に引き寄せられて、ペレットを形成すると考えられる。磁化の持続時間は室温で3分間 ~ 7分間の間でさまざまであってよく、5分間が好ましい。

【0275】

続いてマイクロプレートを、非凝集性赤血球、すなわちスクリーニングした抗原に関して陰性であるRBCを懸濁させるために攪拌機の上に乗せる。一連のかき混ぜにより、非凝集性赤血球の再懸濁および赤血球凝集物の可視化が以下の通りに可能になる：第1に、か

50

なり強い攪拌により、磁化後に濃厚赤血球をウェルの底面から引き離す。この攪拌は800～1000rpmの範囲の速度で1分間～2分30秒間にわたって行い、好ましくは900rpmで1分45秒間行う。攪拌の終了時に、非凝集性赤血球は分散して均質な懸濁液を形成し、一方、スクリーニングした抗原を発現する赤血球は稠密な凝集物を形成する。

【0276】

しかしながら、よりわずかに発現される抗原の場合には、形成される凝集物は攪拌の終了時により小さく、かつより分散しており、分散した小さな凝集物のすべてを集成させ、そのようにして、完全な、輪郭が明確な凝集物をウェルの底面に形成させるための、いわゆる《再収集》攪拌を必要とする。このいわゆる《再収集》攪拌は低速で、すなわち30秒間から1分間にわたって350～550rpmで、好ましくは45秒間にわたって450rpmで行う。この《再収集》攪拌は、陰性赤血球に対しても強力な凝集物に対しても影響を及ぼさない。続いて、裸眼によって、またはカメラを装着した自動リーダーによって、マイクロプレートを読み取ることができる。

10

【0277】

陽性反応はウェルの底面での1つまたはいくつかの凝集物の存在を招くと考えられ、一方、陰性反応は赤血球の均質な懸濁液を招くと考えられる。

【0278】

実施例10：患者8人に対する、A1およびB型の検査用赤血球を用いるSimonin検査を含む、ABO血液型判定検査およびRh-K表現型判定検査を実施することを可能にするDUOLYS型のマイクロプレート。

20

A) 試薬：

乾燥させた血液型抗体を含むDuoLysマイクロプレート

抗GPAを連結させてリン酸緩衝液0.3M+0.1% BSA (w/v) + 0.5% synperonic (商標)

(w/v) PE/F68中に0.004%に希釈した磁性ビーズを含む磁化用溶液のボトル

貯蔵用緩衝液中に1%に希釈したA1型の検査用赤血球の懸濁液

貯蔵用緩衝液中に1%に希釈したB型の検査用赤血球の懸濁液

EDTAの抗凝固剤上に収集した、患者からの8件の血液試料

【0279】

B) プロトコール：各血液試料について

各ウェル1～12中に磁化用溶液10μlを積み重ねる

30

ウェル1～10中に：Liss中に生成させた1%血球懸濁液30μlを積み重ねる

カラム11中に：A1群の検査用赤血球懸濁液5μlを積み重ねる

カラム12中に：B群の検査用赤血球懸濁液5μlを積み重ねる

ウェル11および12中に：各患者からの血漿25μlを積み重ねる

700rpmで1分30秒間にわたるマイクロプレートのかき混ぜ

室温での10分間のマイクロプレートのインキュベーション

磁石プレート上での5分間にわたるマイクロプレートの磁化

かき混ぜ：900rpmで1分45秒間 + 450rpmで45秒間

裸眼による、およびカメラによる読み取り

【0280】

40

C) 結果 (図13参照)

赤血球に対して特異的な抗体を連結させた磁性ビーズを用いるこの磁化方法で得られた結果は、乾燥抗血清の場合に、うら検査 (Simonin検査) を含む、血液型およびRh-K表現型を判定しうることを明らかに実証することができる。

【0281】

実施例11：IgGおよび/またはIgM型の抗体を用いる方法である、凝集による血液表現型判定の手法

本発明はまた、液体形態でのIgGおよび/またはIgM検査による赤血球血液型判定/表現型判定を実施することも可能にする。抗血清がIgG型のものである場合には、検索する抗原の特異的抗IgG濃縮溶液で前もって飽和させた抗IgG抗免疫グロブリンから、《凝集性》

50

試薬を調製する。

【0282】

この液体《凝集性》試薬は、このため、他の任意の表現型判定試薬などの血液表現型判定の際に用いられる。

【0283】

検査の実現の前に、抗IgG抗免疫グロブリンを、IgG抗赤血球（RBC）抗体を含む非精製モノクローナル抗体濃厚液とともにインキュベートして凝集型の試薬を調製する。

【0284】

1mlの低イオン強度緩衝液、特にLISS緩衝液中に10 μ lの濃厚赤血球を希釈することによって、チューブ内または丸底のマイクロプレートのウェル中に、0.5%～1.2%、好ましくは1%の血球懸濁液を調製する。

10

【0285】

丸底の96ウェルマイクロプレートのウェル中に、10 μ lの磁化用溶液を積み重ね、それに対して1%血球懸濁液15 μ lを添加して、IgG型またはIgM型の抗RBC《凝集性》試薬25 μ lを添加する。

【0286】

マイクロプレートを自動マイクロプレート攪拌機の上に乗せることにより、これらの構成要素をホモジナイズする。かき混ぜ速度は1000～1200rpmの間でさまざまであってよく、好ましくは1200rpmである。かき混ぜの持続時間は5秒間～1分間の間でさまざまであってよく、好ましくは10秒間である。

20

【0287】

マイクロプレートを続いて37℃で10分間～30分間、好ましくは20分間インキュベートする。

【0288】

各抗体は1つの抗原に対して特異的であり、赤血球に対する1つのものの結合は他のものの結合を妨害しない。したがって、抗原を担持する赤血球は、抗GPAによって磁化され、かつウェルの底面に積み重ねられたIgM型またはIgG型の抗血清によって感作されうると考えられる。

【0289】

インキュベーション段階の終了時に、マイクロプレートを、マイクロプレートの各ウェルの下方に丁度適合する96個の一連の磁石を備えたプレートの上に乗せる。抗血清に対応する抗原が存在するならば、抗GPAによって感作および磁化された赤血球は、磁場の影響を受けてウェルの底面に引き寄せられて、凝集物を形成すると考えられる。磁化の持続時間は室温で5分間～15分間の間でさまざまであってよく、10分間が好ましい。

30

【0290】

続いてマイクロプレートを、非凝集性赤血球、すなわちスクリーニングした抗原に関して陰性であるものの再懸濁を可能にするために攪拌機の上に乗せる。一連のかき混ぜにより、非凝集性赤血球の再懸濁および赤血球凝集物の可視化が以下の通りに可能になる：第1に、かなり強い攪拌により、磁化後に濃厚赤血球をウェルの底面から引き離す。この攪拌は500～1000rpmの速度で1分間～2分30秒間にわたって行い、好ましくは700rpmで1分30秒間行う。攪拌の終了時に、非凝集性赤血球は分散して均質な懸濁液を形成し、一方、検索する抗原に対応する赤血球は稠密な凝集物を形成する。より弱く発現される抗原については、形成される凝集物は攪拌の終了時により小さく、かつより分散しており、分散した小さな凝集物のすべてを集成させ、そのようにして、完全な、輪郭が明確な凝集物をウェルの底面に形成させるための、いわゆる「再収集」攪拌を必要とする。このいわゆる再収集攪拌は低速で、すなわち30秒間から1分間にわたって350～550rpmで、好ましくは45秒間にわたって450rpmで行う。このいわゆる再収集攪拌は、陰性赤血球に対しても強力な凝集物に対しても影響を及ぼさない。続いて、裸眼によって、またはカメラを装着した自動リーダーによって、マイクロプレートを読み取ることができる。

40

【0291】

50

A) 試薬

抗GPAを連結させてPBS 0.3M+0.1% BSA (w/v) + 0.5% (w/v) synperonic PE/F68中に0.005%に希釈した磁性ビーズを含む磁化用溶液のボトル

抗Jkb抗体のポリクローナル溶液 (クローンP.143、IgM型) のボトル

抗S《凝集性》試薬のボトル: 1mlのAGH (濃度 = 1,8mg/ml) + 20mlの抗S (クローンP3S13JS123、IgG型) の濃縮溶液

抗s《凝集性》試薬のボトル: 1mlのAGH (濃度 = 1,8mg/ml) + 20mlの抗s抗体 (クローンP3YAN3、IgG型) の濃縮溶液

EDTAの抗凝固剤上に収集した、患者からの5件の血液試料

【0292】

10

B) プロトコール: 各血液試料について

丸底の96ウェルのマイクロプレートの3つのウェル中に、磁化用溶液10 μ lを積み重ねる3つの前記ウェル中への、Liss中に生成させた1%血球懸濁液15 μ lの添加

3つのウェルのそれぞれの中への、25 μ lの抗Jkb試薬、抗Sおよび抗sの添加

1200rpmで10秒間のマイクロプレートの攪拌

37 $^{\circ}$ Cでの20分間にわたるマイクロプレートのインキュベーション

磁石プレート上での10分間にわたるマイクロプレートの磁化

攪拌: 700rpmで1分30秒間 + 450rpmで45秒間

裸眼による、およびカメラによる読み取り。

【0293】

20

C) 結果: 図14参照

赤血球に対して特異的な抗体を連結させた磁性ビーズを用いるこの磁化方法で得られた結果は、複数の異なる血液型系において、ドナーまたは患者の拡張された表現型を判定しうることを明らかに実証することができる。

【0294】

実施例12: ドナー8人の拡張された表現型の判定: 免疫付着法を用いる抗Fya、抗Fyb、抗Jka、抗Jkb、抗Sおよび抗s抗血清の使用

A) 試薬:

抗GPAを連結させたビーズが希釈された、糖をベースとするポリマーおよび低イオン強度緩衝液で作られた希釈液。ビーズを含むこの希釈液の濃度は0,004%である。

抗Fyaヒトモノクローナル抗体 (クローンDGFYA02、IgG型)

抗Fybヒトポリクローナル抗体

抗Jkaヒトモノクローナル抗体 (クローンP3HT7、IgM型)

抗Jkbヒトモノクローナル抗体 (クローンP.143、IgM型)

抗Sヒトモノクローナル抗体 (クローンP3S13JS123、IgG型)

抗sヒトモノクローナル抗体 (クローンP3YAN3、IgG型)

陰性対照

Nanolys

EDTA型の抗凝固剤上に収集されたドナー8人の血液試料

【0295】

40

B) プロトコール: 各ドナーについて

検査の前に、抗GPAを連結させたビーズを希釈液 (Liss Ficollとも呼ばれる) 中に直接希釈する。

【0296】

ドナー8人からの赤血球を、抗GPAを連結させたビーズを含む希釈液中に1%に希釈する。種々の懸濁液をチューブ内または丸底の96ディープウェルマイクロプレートのウェル中に生成させる。

【0297】

IgGおよびIgMヒト抗グロブリンの混合物 (抗IgG) でコーティングされた丸底の96ウェルのマイクロタイタープレート (CrossLys (商標) と呼ばれる) の7つのウェル中に、5

50

0 μlの粘性障壁またはゲル（Nanolys（商標）とも呼ばれる）を積み重ねる。Nanolys（商標）の上に、ビーズを含む希釈液中にある1%血球懸濁液55 μlを積み重ねる。最後に、10 μlの各抗血清を、血球懸濁液の上に積み重ねる。続いて、マイクロプレートに37 °Cで20分間インキュベートする。インキュベーションの終了時に、マイクロプレートを、マイクロプレートの各ウェルの下に丁度合う磁石のプレートを備えた攪拌機の上に乗せる。同時に攪拌しながら磁場を印加することにより、不規則抗体を保有する赤血球は、粘性溶液の中を引き寄せられて、底面上にコーティングされたAHGと結合するが、それを保有しない赤血球はそうではないと考えられる。磁場の下での最終的な攪拌は、2つのシーケンスで構成される：第1の攪拌シーケンスは、磁化および感作された赤血球が抗グロブリンによって捕捉されることを可能にし、これは500rpmで3分間持続させるが、一方、第2の攪拌シーケンスはペレットの形成による陰性反応を形作ることを可能にし、このシーケンスを600rpmで1分間持続させる。

10

【0298】

陽性反応の場合には、抗血清によって感作された磁化された細胞は、AHGと結合して、ウェルの底面に赤血球の薄層を形成すると考えられる。陰性反応の場合には、抗血清によって感作された磁化された細胞は、続いて、ウェルの底面にペレットを形成すると考えられる。

【0299】

予想される結果を、同じ細胞および同じ抗血清を用いて、すでに商業化されている手法に対しても生成させた。

20

【0300】

C) 予想される結果：以下の表を参照

	Fya	Fyb	Jka	Jkb	S	s	対照
患者 #1	1	1	0	1	0	1	0
患者 #2	1	0	1	1	0	1	0
患者 #3	1	1	1	0	0	1	0
患者 #4	0	0	1	0	1	1	0
患者 #5	1	0	0	1	0	1	0
患者 #6	0	1	0	1	1	1	0
患者 #7	1	1	1	1	0	1	0
患者 #8	0	1	1	1	0	1	0

30

【0301】

得られた結果：図15参照

赤血球に対して特異的な抗体を連結させた磁性ビーズを用いるこの磁化方法で得られた結果は、種々の血液型系において、患者またはドナーの拡張された表現型を判定しうることを明らかに実証することができる。

40

【0302】

実施例13：Weak D抗原に関するドナー48人の表現型判定。免疫付着法を用いる2つの異なるクローン抗Dの混合物の使用（図4）

A) 試薬

抗GPAを連結させたビーズが希釈された、糖をベースとするポリマーおよび低イオン強度緩衝液で作られた希釈液。ビーズを含むこの希釈液の濃度は0.004%である。

抗Dの混合物（クローンESD1およびクローンP3X35）

Nanolys

EDTA型の抗凝固剤上に収集されたドナー48人の血液試料

50

【0303】

B) プロトコール：各ドナーについて

weak D検査のために、拡張された表現型判定に関するプロトコールを実施することができる。

【0304】

C) 予想される結果：以下の表を参照

	抗 D	抗 D	抗 D	抗 D	抗 D	抗 D
A	D-	D-	D+	D+	D-	Dw 型
B	Dw 1型	D-	D+	D+	D+	DMH
C	D-	D-	D+	D-	D+	D+
D	Dw 3型	D+	D+	D+	D+	D+
E	D-	D-	DAU	D+	D+	D+
F	D-	D-	D+	D-	D+	Dw 3型
G	D-	D+	D+	Dw 3型	D+	D+
H	Dw 3型	D-	D VII	D+	D+	D+

10

20

【0305】

D) 得られた結果：

赤血球に対して特異的な抗体を連結させた磁性ビーズを用いるこの磁化方法で得られた結果は、ドナーのweak D表現型を判定しうることを明らかに実証することができる。

30

【0306】

実施例14：磁性粒子に対して連結させる抗GPA濃度を低下させることによる検査の感度および特異性の向上

a) JSR Microによるカルボン酸磁性ビーズに対する抗グリコホリンAの連結

JSR Microによるカルボン酸磁性ビーズ（参照記号：Magnosphere MB100）に対する抗GPAの好ましい連結方法は物理的吸着である。

【0307】

検査の特異性および感度を高めるために、用いる抗GPAの濃度はビーズ1mg当たり2 μ g～5 μ gとさまざまであってよく、好ましくは抗GPAビーズ1mg当たり2.5 μ gである。

40

【0308】

5mgのカルボン酸磁性ビーズに対する抗GPAの連結は以下の通りに実施する：

5mgのカルボン酸磁性粒子（すなわち、10% w/vのビーズ50 μ l）を、200 μ lの50mM M ES緩衝液（2-(N-モルホリノ)エタンスルホン酸）、pH6.2中で磁石を用いて2回洗浄する。

洗浄段階の終了時に、チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

直ちに抗GPAをビーズ1mg当たり2.5 μ gの濃度で添加する。

ボルテックス処理によって十分に混合する。

緩徐な傾斜かき混ぜを行いながら室温で2時間、または4 で24時間インキュベートする

50

。

チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石の上に置いてビーズを50mM MES緩衝液 pH6.2で3回洗浄する。

洗浄段階の終了時に、0.3Mリン酸緩衝食塩水（PBS）を0.5% BSA（w/v）とともに含むブロッキング緩衝液中にビーズを再懸濁させる。

緩徐な傾斜かき混ぜを行いながら室温で2時間インキュベートする。

ブロッキング段階の終了時に、チューブを磁石の上に置き、ビーズが磁石の方に移動して液体が清澄化したところで、上清をピペットで注意深く除去する。

チューブを磁石から取り外して、0.3M PBSを0.1%（w/v）BSAおよび5%（w/v）のsynperonic（商標）PE/F68とともに含む保存溶液中にビーズを再懸濁させる。抗GPAを連結させたビーズの安定性を高めるためには、本発明者らは、高濃度のsynperonic（商標）PE/F68界面活性剤、例えば：5%（w/v）などを用いる貯蔵を好んだ。

【0309】

抗グリコホリンAを連結させたビーズの最終濃度は、保存緩衝液中で1%（w/v）である。ビーズを使用時まで4 で貯蔵する。

【0310】

B) 希釈液中での連結させたビーズの希釈

ビーズを抗GPAと連結させたところで、これらのものを希釈液LissおよびFicoll（商標）2%（w/v）中に直接希釈し、続いてそれを粘性溶液またはゲルの上に分配する。希釈液中のビーズの濃度は0.005%～0.02%でさまざまであってよく、0.007%±0.001%（w/v）が好ましい。

【0311】

実施例15：磁性粒子に対して連結させる抗GPA濃度を低下させることによって感度および特異性の増加を示すO型赤血球ドナーに対して行った交差適合検査（適合性検査）における比較試験（図17参照）

サグマンニトール（sagmannitol）血液バッグに保存したドナーからのO型赤血球を、不規則性の抗赤血球抗体を含むかもしくは含まない可能性がある患者からの血漿もしくは血清に対して、または既知の特異性を有する抗血清の複数の異なる希釈物に対して検査する

【0312】

この検査は、磁性ビーズと連結させて、最終的な希釈液中に0.007%で希釈した、2つの異なる抗GPA濃度間での比較試験で構成される。

【0313】

結果は以下に提示されている。

【0314】

プロトコール：

一次チューブドナーから、10μlの濃厚赤血球を1mlの低イオン強度緩衝液中に希釈して、1%赤血球懸濁液を作る。

【0315】

CrossLys（商標）（2種類のヒト抗グロブリン（抗IgGおよび抗IgM）でコーティングされたプレート）のウェル中に、50μlのNanolys（商標）を積み重ね、続いて抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む50μlのLiss FicollをNanolys（商標）に添加する。1%に希釈した15μlの赤血球を添加し、輸血しようとする患者の15μlの血漿または血清を最後に添加する。プレートを続いて37 で20分間インキュベートし、続いてマイクロプレートの各ウェルの下に丁度合う磁石のプレートを備えた攪拌機の上に乗せる。磁場の下での最終的な攪拌は2つのシーケンスで構成される：500rpmで3分間、その後600rpmで2分間。

【0316】

磁性粒子に対して連結させた抗GPAの2種類の濃度間での比較試験により、連結させる抗GPAの濃度が低い場合の陽性反応サイズの増大が示される。同時に陰性反応は、この濃度

が同じく低い場合（すなわち、 $2.5 \mu\text{g}/\text{mg}$ の磁性粒子）には、より特異的かつより弁別的である。

【0317】

実施例16：高濃度の非イオン性界面活性剤：synperonic（商標）PE/F68とともに貯蔵した場合の磁性粒子の安定性の増加を示す比較試験

O型赤血球ドナーに対する交差適合検査にて行った試験（図18参照）

サグマンニトール（sagmannitol）血液バッグに保存したドナーからのO型赤血球を、不規則性の抗赤血球抗体を含むかもしくは含まない可能性がある患者からの血漿もしくは血清に対して、または既知の特異性を有する抗血清の複数の異なる希釈物に対して検査する。

10

【0318】

この検査は、最終的な溶液中に希釈する前の、連結された磁性粒子の2つの異なる貯蔵条件間の比較試験で構成される。

【0319】

結果は以下に提示されている。

【0320】

プロトコール：

一次チューブドナーから、 $10 \mu\text{l}$ の濃厚赤血球を 1ml の低イオン強度緩衝液中に希釈して、1%赤血球懸濁液を作る。

【0321】

CrossLys（商標）（2種類のヒト抗グロブリン（抗IgGおよび抗IgM）でコーティングされたプレート）のウェル中に、 $50 \mu\text{l}$ のNanolys（商標）を積み重ね、続いて抗GPAを連結させた磁性ビーズを含む $50 \mu\text{l}$ のLiss FicolIをNanolys（商標）に添加する。1%に希釈した $15 \mu\text{l}$ の赤血球を添加し、輸血しようとする患者の $15 \mu\text{l}$ の血漿または血清を最後に添加する。プレートを続いて37℃で20分間インキュベートし、続いてマイクロプレートの各ウェルの下に丁度合う磁石のプレートを備えた攪拌機の上に乗せる。磁場の下での最終的な攪拌は2つのシーケンスで構成される：500rpmで3分間、その後600rpmで2分間。

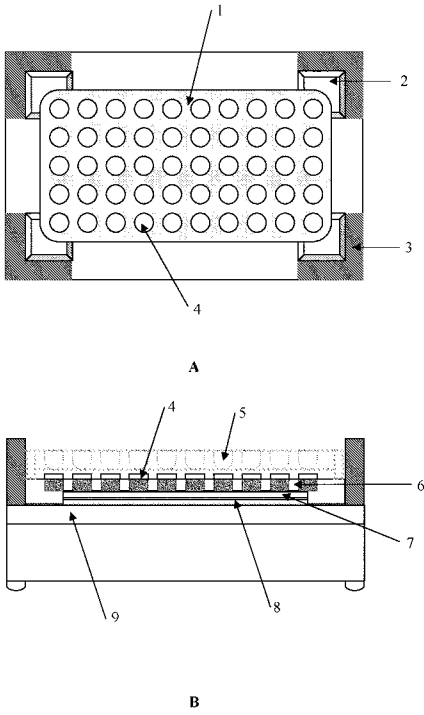
20

【0322】

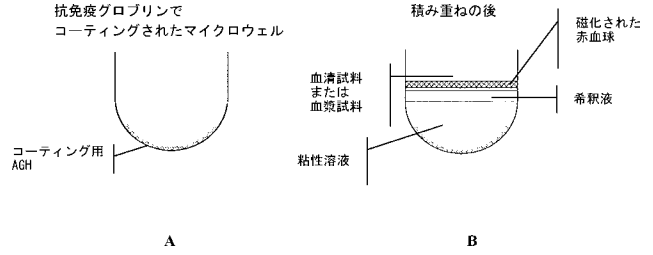
これらの2つの貯蔵条件間、すなわち0.5%または5%のsynperonic界面活性剤を用いた安定性試験により、最終的な溶液中でのそれらの希釈前に5%のsynperonicとともに貯蔵した場合にビーズのより優れた安定性が示される。5%のsynperonicとともに貯蔵したビーズの場合、37℃では、4℃で貯蔵した同じビーズと陽性反応および陰性反応が同程度であることが明らかに実証されている。一方、連結させたビーズを0.5%のみのsynperonicとともに貯蔵した場合には、37℃ですべての反応の劣化がみられる。

30

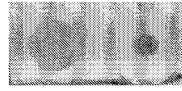
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



陽性反応 陰性反応

【 図 4 】

	抗 D,C,E 1/2	抗 D,C,E 1/4	抗 D,C,E 1/8	抗 D,C,E 1/16	抗 D,C,E 1/32	抗 D,C,E 1/64	抗 D,C,E 1/128	AB 血漿
予想される結果	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	陰性
0 RBCパネルで得られた結果								
0 RBC患者で得られた結果								

【 図 5 】

抗D	RBC O1 (R1R1)	RBC O2 (R2R2)	RBC O3 (rr)
抗D 20 ng/ml			
抗D 10 ng/ml			
抗D 5 ng/ml			
抗D 2,5 ng/ml			
抗D 1,25 ng/ml			
陰性			

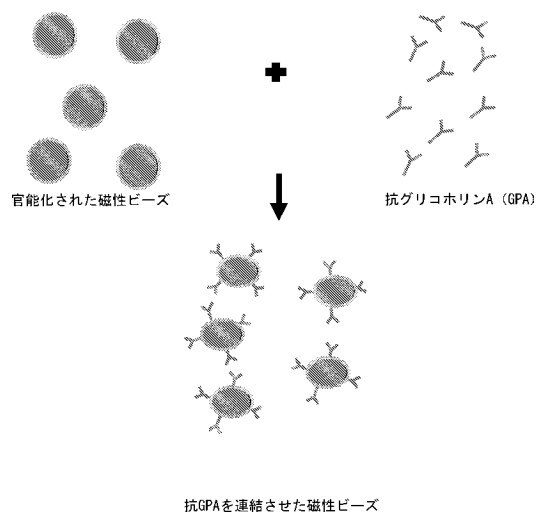
【 図 7 】

患者血漿または血清	RBC ドナー	予想される結果	得られた結果	適合性
患者# 1	O 1	陰性		適合
患者# 2	O 2	陰性		適合
患者# 3	O 3	陰性		適合
患者# 4	O 4	陰性		適合
患者# 5	O 5	陰性		適合
患者# 6	O 6	陰性		適合
患者# 7	O 7	陰性		適合
患者# 8	O 8	陰性		適合

【 図 6 】

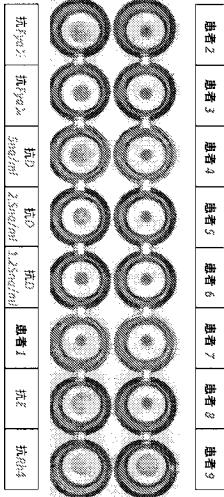
患者血漿または血清	RBC ドナー	予想される結果	得られた結果	適合性
抗D+C+E	O (DCee)	3+		不適合
	O (DCCee)	3+		不適合
抗K	O (DCee)	陰性		適合
	O (DCCee)	陰性		適合
抗E	O (DCee)	陰性		適合
	O (DCCee)	1+		不適合
抗Jka	O (DCee)	陰性		適合
	O (DCCee)	1+		不適合

【 図 8 】

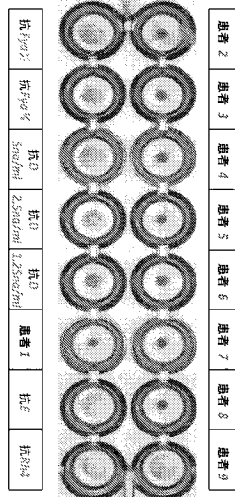


【 図 17 】

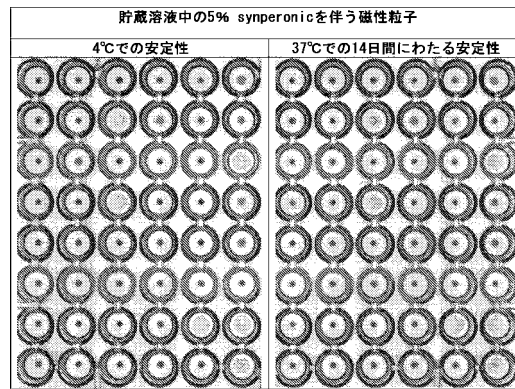
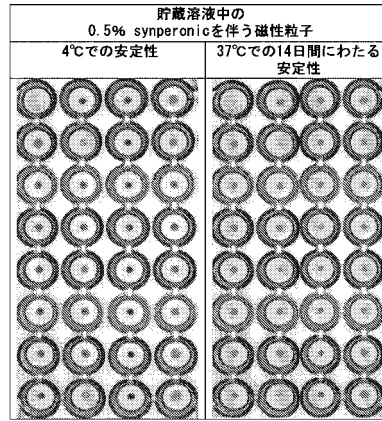
抗GPA (20 μ g/mg)



抗GPA (2.5 μ g/mg)



【 図 18 】



【 配列表 】

201353125900001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2011/062560

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/80 G01N33/543 G01N33/68 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 96/09409 A1 (MILTENYI BIOTECH INC [US]) 28 March 1996 (1996-03-28)	51-53
Y	the whole document page 12, line 27 - page 13, line 1	1-50,54, 55
Y	WO 2007/051844 A1 (DIAGAST [FR]; BARBREAU YVES [FR]; BOULET OLIVIER [FR]; BOULET ARNAUD [] 10 May 2007 (2007-05-10) cited in the application abstract page 23, lines 14-16 example 2 claims	1-50,54, 55
Y	WO 2007/092028 A2 (MEDICAL DISCOVERY PARTNERS LLC [US]; OLKEN SARAH K [US]; BOGEN STEVEN) 16 August 2007 (2007-08-16) the whole document	1-50,54, 55
	----- -/-- -----	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"E" earlier document but published on or after the international filing date		"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)		"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		"&" document member of the same patent family
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search	26 August 2011	Date of mailing of the international search report
		09/09/2011
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Stricker, J

1

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/EP2011/062560

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 00/73794 A2 (STEMCELL TECHNOLOGIES INC [CA]; THOMAS TERRY E [CA]; PETERS CARRIE [CA] 7 December 2000 (2000-12-07) the whole document page 7, line 32 - page 8, line 3 example 2</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-50,54, 55
Y	<p>BOUIX OLIVIER ET AL: "Erythrocyte-magnetized technology: an original and innovative method for blood group serology.", TRANSFUSION SEP 2008 LNKD- PUBMED:18522706, vol. 48, no. 9, September 2008 (2008-09), pages 1878-1885, XP000002657699, ISSN: 1537-2995 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-50,54, 55

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2011/062560

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of Item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:
- a. (means)
- on paper
- in electronic form
- b. (time)
- in the international application as filed
- together with the international application in electronic form
- subsequently to this Authority for the purpose of search
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2011/062560

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9609409	A1	28-03-1996	AU 691040 B2 07-05-1998
			AU 3593595 A 09-04-1996
			CA 2200294 A1 28-03-1996
			EP 0778899 A1 18-06-1997
			JP 10507632 T 28-07-1998

WO 2007051844	A1	10-05-2007	EP 1957978 A1 20-08-2008
			FR 2892820 A1 04-05-2007
			JP 2009515179 A 09-04-2009
			US 2009269776 A1 29-10-2009

WO 2007092028	A2	16-08-2007	AT 490462 T 15-12-2010
			EP 1871870 A2 02-01-2008
			US 2009081632 A1 26-03-2009

WO 0073794	A2	07-12-2000	AT 292282 T 15-04-2005
			AU 769903 B2 05-02-2004
			AU 4905900 A 18-12-2000
			CA 2375115 A1 07-12-2000
			CN 1367876 A 04-09-2002
			DE 60019111 D1 04-05-2005
			DE 60019111 T2 26-01-2006
			EP 1185867 A2 13-03-2002
			HK 1044819 A1 29-07-2005
			IL 146660 A 31-10-2007
			JP 4526749 B2 18-08-2010
			JP 2003501629 A 14-01-2003

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100148699

弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100128048

弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506

弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100130845

弁理士 渡邊 伸一

(74)代理人 100114340

弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100114889

弁理士 五十嵐 義弘

(74)代理人 100121072

弁理士 川本 和弥

(72)発明者 フォコニエ ロランス

フランス共和国 ヴィルヌーヴ ダスク リュ ド ラ コンコルド 1 8

(72)発明者 バルブレオ イブ

フランス共和国 ムヴォー リュ ネグリール 6 2

(72)発明者 プレ アルノー

フランス共和国 ドゥウロクール ルート ダラス 1 1 2

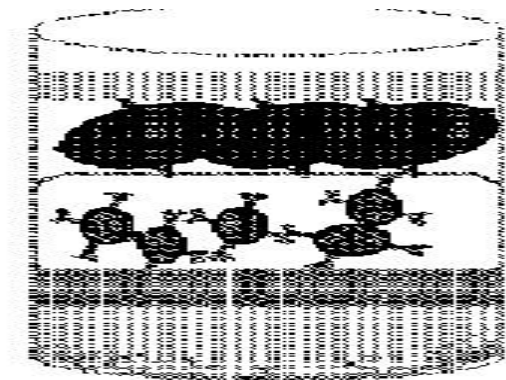
(72)発明者 ザコール マハ

フランス共和国 リール リュ サン ジャン バティスト デ ラ サール 6 9

专利名称(译)	磁性免疫诊断方法和试剂盒，用于证明血型测定和红细胞表型的抗体/抗原复合物		
公开(公告)号	JP2013531259A	公开(公告)日	2013-08-01
申请号	JP2013520156	申请日	2011-07-21
[标]申请(专利权)人(译)	鹿阵风 迪卡斯特公司		
申请(专利权)人(译)	鹿阵风		
[标]发明人	フォコニエロランス バルブレオイブ ブレアルノー ザコールマハ		
发明人	フォコニエ ロランス バルブレオ イブ ブレ アルノー ザコール マハ		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54326 G01N33/54393 G01N33/6854 G01N33/80 G01N33/5434 G01N33/68		
FI分类号	G01N33/543.585 G01N33/53.K G01N33/543.541.A G01N33/543.521		
代理人(译)	清水初衷 井上隆一 佐藤俊光 小林智彦 渡边真一 正人大关 五十嵐弘		
优先权	2010055973 2010-07-21 FR 61/409393 2010-11-02 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及用于确定抗体/抗原复合物的血型和表型的磁性免疫诊断方法。这样的方法包括检测和/或鉴定抗体或抗原，优选某种血型的抗抗原抗体或抗原。这些方法涉及涂覆有能够识别并特异性磁化红细胞的抗体抗糖蛋白A的磁性颗粒的悬浮液。本发明还包括用于执行此类方法的试剂盒。



2nd magnetization method