

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表2002 - 543426

(P2002 - 543426A)

(43)公表日 平成14年12月17日(2002.12.17)

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコード [*] (参考)
G 0 1 N 33/53		G 0 1 N 33/53	Y 4 B 0 2 9 K 4 B 0 6 3
C 1 2 M 1/34		C 1 2 M 1/34	B
C 1 2 Q 1/02		C 1 2 Q 1/02	
G 0 1 N 33/543	501	G 0 1 N 33/543	501 F
審査請求 未請求 予備審査請求 (全 43数) 最終頁に続く			

(21)出願番号 特願2000 - 615809(P2000 - 615809)

(86)(22)出願日 平成12年5月3日(2000.5.3)

(85)翻訳文提出日 平成13年11月5日(2001.11.5)

(86)国際出願番号 PCT/US00/12127

(87)国際公開番号 W000/67021

(87)国際公開日 平成12年11月9日(2000.11.9)

(31)優先権主張番号 60/132,395

(32)優先日 平成11年5月4日(1999.5.4)

(33)優先権主張国 米国(US)

(71)出願人 パンコフスキー, ダン, エー.
アメリカ合衆国 テネシー州 37205, ナッ
シュビル, プレスリン ロード 6030

(72)発明者 パンコフスキー, ダン, エー.
アメリカ合衆国 テネシー州 37205, ナッ
シュビル, プレスリン ロード 6030

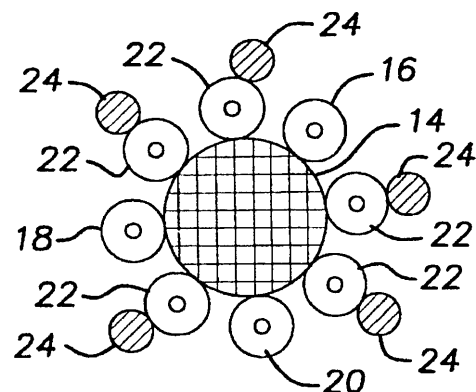
(74)代理人 弁理士 園田 吉隆 (外 1 名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 細胞の単一パラメータ及び複数パラメーター表現型解析のための生成物と方法

(57)【要約】

細胞の単一パラメータ及び複数パラメータ特徴付けの方法、特に細胞の免疫表現型解析法が提供される。本方法は特定のタイプの細胞に結合するように適合化された抗体被覆マイクロスフィアを好ましくは使用する。一又は複数の被覆マイクロスフィアの集合が細胞懸濁物に同時に又は連続して添加され、それらが結合するように適合化されている細胞に結合する。細胞は一又は複数のマイクロスフィアに結合しうる。複合体は好ましくは染色され、ついで検査されて、細胞、好ましくはマイクロスフィアに結合する細胞を特徴付ける。該方法を実施するためのキットと装置もまた提供される。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 液体媒質中に懸濁させた細胞の懸濁物を提供し、該細胞は第一の細胞を含み、
b) 上記懸濁物に実質的に同一の第一のビーズの群を添加し、該第一のビーズの各々は結合物質で被覆されるか、各第一のビーズが第一の細胞に結合するように適合化されるように磁力を持ち、
c) 上記第一のビーズが上記第一の細胞に結合することを可能にするのに効果的な時間の間、上記懸濁物中の上記第一のビーズをインキュベートして、第一のビーズと第一の細胞の複合体を生成させ、各第一のビーズと第一の細胞の複合体は第一のビーズと第一の細胞を含み、
d) 上記懸濁物から上記第一のビーズと第一の細胞の複合体を濾過により分離し、
e) 分離された上記第一のビーズと第一の細胞の複合体を検査し、上記第一の細胞を特徴付ける、
工程を含んでなる細胞を特徴付ける方法。

【請求項2】 a) 懸濁物への第一のビーズの添加の前に、上記第一の細胞を透過化处理し、反応性生物マーカーが上記第一の細胞又は上記第一の細胞内に結合するように反応生成物マーカーに結合する常磁性ミクロスフィアと共に上記第一の細胞をインキュベートする工程を更に具備し、各第一のビーズが磁気を帯びている請求項1に記載の方法。

【請求項3】 各常磁性ミクロスフィアが直径1ミクロン未満であり、各第一のビーズが直径3ミクロンを越える請求項2に記載の方法。

【請求項4】 上記反応性生物マーカーが、抗ミエロペルオキシダーゼ抗体、抗末端デオキシチジルトランスフェラーゼ抗体、特異的RNAプローブ、及び特異的DNAプローブからなる群から選択される請求項2に記載の方法。

【請求項5】 上記細胞懸濁物が第二の細胞を含み、上記第二の細胞及び第一の細胞がオーバーラップしない群にあり、同時の単一パラメータ解析を含み、
1) 上記濾過工程の前に、実質的に同一の第二のビーズの群を上記懸濁物に添加し、上記第二のビーズの各々が、各第二のビーズが第二の細胞に結合するように

適合化されるように結合物質で被覆されるか磁気を帯び、

2) 上記第二のビーズが上記第二の細胞に結合することを可能にするのに効果的な時間の間、上記懸濁物中の上記第二のビーズをインキュベートして第二のビーズ-第二の細胞の複合体を生成させ、

3) 上記懸濁物から上記第二のビーズと第二の細胞の複合体と上記第一のビーズと第一の細胞の複合体を濾過により同時に分離する、

工程を更に含んでなる請求項1に記載の方法。

【請求項6】 上記細胞懸濁物が第一の細胞のサブセットである第二の細胞を含み、複数パラメータ解析を含み、

1) 上記濾過工程の前に、実質的に同一の第二のビーズの群を、上記第一のビーズと第一の細胞を含む懸濁物に添加し、上記第二のビーズの各々が、各第二のビーズが第二の細胞に結合するように適合化されるように結合物質で被覆されるか磁性を帯び、

2) 上記第二のビーズが上記第二の細胞に結合することを可能にするのに効果的な時間の間、上記懸濁物中の上記第二のビーズをインキュベートして、第一のビーズ-第二の細胞-第二のビーズの複合体を生成させ、各第一のビーズ-第二の細胞-第二のビーズの複合体が第一のビーズ、第二の細胞及び第二のビーズを含み、

3) 上記懸濁物から上記第一のビーズ-第二の細胞-第二のビーズの複合体を濾過により分離する、

工程を更に含んでなる請求項1に記載の方法。

【請求項7】 第三の細胞が上記第一の細胞のサブセットであり、上記第三の細胞が上記第二の細胞のサブセットであるか上記第二の細胞とは異なり、

1) (a) 上記第一のビーズ、上記第一の細胞、上記第二の細胞、及び上記第二のビーズを含む懸濁物又は (b) 上記第一のビーズと上記第一の細胞を含むが上記第二のビーズを含まない懸濁物に、実質的に同一の第三のビーズの群を添加し、上記第三のビーズの各々が、各第三のビーズが第三の細胞に結合するように適合化されるように結合物質で被覆されるか磁性を帯び、

2) 上記第三のビーズが上記第三の細胞に結合することを可能にするのに効果的

な時間の間、それらが添加された懸濁物中で上記第三のビーズをインキュベートして第一のビーズ-第三の細胞-第三のビーズの複合体を生成させ、各第一のビーズ-第三の細胞-第三のビーズの複合体が第一のビーズ、第三の細胞及び第三のビーズを含み、

3) 上記第三のビーズが添加された上記懸濁物を濾過して、形成されたビーズ-細胞複合体を分離する、

工程を更に含んでなる請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】 上記第一のビーズと上記第二のビーズがサイズ又は色で視覚的に識別可能である請求項 6 に記載の方法。

【請求項 9】 上記第二のビーズと上記第三のビーズがサイズ又は色で視覚的に識別可能である請求項 7 に記載の方法。

【請求項 10】 上記第二のビーズが抗カッパ抗体で被覆され、上記第三のビーズが抗ラムダ抗体で被覆される請求項 7 に記載の方法。

【請求項 11】 上記第一のビーズと上記第二のビーズがサイズ又は色で視覚的に識別可能である請求項 5 に記載の方法。

【請求項 12】 上記濾過により分離されたビーズ-細胞複合体をガラススライドに移送する工程を更に具備する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】 可視化又は特徴付けを補助するためにビーズ-細胞複合体の細胞を染色する工程を更に具備する請求項 12 に記載の方法。

【請求項 14】 上記結合物質が特異的な細胞表面タンパク質に対する抗体、レセプター又は他の細胞表面分子に結合する小分子、アビジン及びビオチンからなる群から選択される請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】 上記結合物質が抗体を含む請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】 上記濾過が、実質的な量の未結合ビーズを通過させるが実質的な量の結合ビーズを捕捉するのに効果的な孔径を有するフィルターを使用してなされる請求項 1 に記載の方法。

【請求項 17】 上記第一のビーズが少なくとも 3 ミクロンの直径を有する請求項 1 に記載の方法。

【請求項 18】 上記第一のビーズが 5 - 20 ミクロンの直径を有するポリ

スチレンミクロスフィアである請求項1に記載の方法。

【請求項19】 上記複合体を上記濾過によりフィルター上に捕捉し、上記フィルター上のビーズ数を定量し、各ビーズに結合した細胞の平均数を推定する工程を更に含んでなる請求項1に記載の方法。

【請求項20】 フィルター上のビーズ数が光散乱、反射率、蛍光、及び静電場変化からなる群から選択される方法を使用して定量される請求項19に記載の方法。

【請求項21】 上記第一の細胞の表面に弱く発現された抗原のシグナルを増幅させて、上記第一のビーズの結合を容易にする工程を更に具備する請求項1に記載の方法。

【請求項22】 上記第一のビーズ-第一の細胞の複合体の形成が標的細胞集団を単離するのに効果的であり、更に一般的な免疫組織化学法を使用して第二のパラメータを検出する工程を更に具備する、請求項1に記載の方法。

【請求項23】 a) 液体媒質中の細胞懸濁物を提供し、
b) 実質的に同一の被覆された第一のビーズの群を上記懸濁物に添加し、上記第一のビーズの各々が、各第一のビーズが予め選択されたタイプの細胞に結合するように結合物質で被覆され、
c) 上記第一のビーズが上記予め選択されたタイプの細胞に結合するのに効果的な時間の間、上記懸濁物中の上記第一のビーズの群をインキュベートして、ビーズ-細胞複合体を生成し、
d) 上記懸濁物を濾過して、形成した任意のビーズ-細胞複合体をフィルターに捕捉し、
e) 上記懸濁物中の細胞を特徴付けるために濾過工程の結果物を検査する、
工程を具備する細胞を特徴付ける方法。

【請求項24】 上記濾過工程の前に、上記第一のビーズとは異なる実質的に同一な被覆された第二のビーズの群を上記懸濁物に添加する工程を更に具備し、上記第二のビーズの各々が、各第二のビーズが正常細胞に結合するように結合物質で被覆され、上記予め選択された細胞のタイプが正常細胞である、請求項23に記載の方法。

【請求項25】 上記工程が脊髄形成異常疾患の形成異常細胞を特徴付けるように構成された請求項24に記載の方法。

【請求項26】 実質的に同一の第一のビーズの少なくとも一つの群を具備するキットであって、上記第一のビーズの各々が、各第一のビーズが第一の細胞に結合するように結合物質で被覆されるか磁気を帯び、第一の細胞を含む懸濁物に対する単一パラメータ又は複数パラメータ解析を実施するために上記第一のビーズを如何に使用するかについて技師に指示を与えるのに効果的な一群の指示を更に具備するキット。

【請求項27】 上記第一のビーズが上記第一の細胞と複合体を形成するときに上記第一のビーズを捕捉するように構成されたフィルターを更に具備する請求項26に記載のキット。

【請求項28】 細胞の懸濁物に対して単一パラメータ又は複数パラメータ解析を実施する装置において、試料ローダーと複数の反応チャンバーと濾過チャンバーを具備する装置。

【発明の詳細な説明】**【0001】**

この発明は、1999年5月4日出願された米国仮出願番号60/132395号の優先権を主張する。上記仮出願番号第60/132395号の内容はその全体を出典明示によりここに取り込む。

【0002】**(発明の分野)**

本発明は、一般に細胞の表現型解析及び免疫表現型解析に関し、より詳細には、細胞の単一パラメーター及び複数パラメーター表現型解析及び免疫表現型解析に関する。

【0003】**(発明の背景)**

細胞及び腫瘍、特に造血腫瘍の免疫表現型解析は、しばしば癌患者の臨床評価にとって非常に重要である。しかし、今日利用できる方法、特にフローサイトメトリーは費用がかかり、生検時に高度の注意を必要とする。大抵は、癌の診断前でも、大切な組織を、予想される免疫表現型解析のために取り出さなければならない。もし組織が取り出されず、癌が存在している場合には、腫瘍の正確なサブタイプ決定（及び適切な治療プロトコルの指定）は事後には行うことができない。深慮を必要としない方法、例えばパラフィンブロックの免疫染色は、感度がずっと低く、これらの染色を頻繁に実施しない研究室ではうまく機能しない。フローサイトメトリーは、造血細胞タイプの免疫表現型解析に対して現在受け入れられている「最も基準になる検査法」である。しかし、該方法にはいくつかの問題がある。これらの研究室を設置し維持する費用がおそらくは最も深刻な問題である。一般に大きな病院、研究機関、又は企業関連の研究室がフローサイトメトリー研究室を設置できる唯一の機関である。これらの研究室は、しばしばそのサービスに対して割増し料金を請求し、研究室への検体の運搬は、些細な問題ではない。フローサイトメトリーは生細胞を必要とするので、検体は無菌条件下で扱われなければならない。技術の無い研究室では、新鮮な試料が準備され、試験のために無菌条件下でフローサイトメトリー研究室へ輸送しなければならない。温

度変化、荒い取り扱い、細菌汚染、又は輸送の遅延のような制御できない要因によって試料が分析に適さなくなるかもしれない。また、フローサイトメトリーは特別な訓練をした技師を必要とし、彼らの時間はしばしばその技術のみに捧げられなければならない、その方法の費用を更に増大させる。分析中に統計的に意味のある結果を得るためには、比較的多量の細胞が分析されなければならない。また、赤血球は分析前に試料から取り除かれなければならない。これは、血液や骨髄の試料中の赤血球数が他の細胞タイプよりかなり多いためであり、剪断数だけが装置の感度のある検出器に打ち克つ。従って、試料調製方法はフィコール-ハイパック分離と、それに続く複数の洗浄と、それに続く残った赤血球を溶解する溶解工程を必要とする。この方法は、実質的にはほとんどの分析から巨核球を排除し、しばしばデリケートな（特に大細胞型リンパ腫及びホジキン病のような比較的一般的な腫瘍由来の）悪性細胞を破壊する。フローサイトメトリーの大なる感度と複雑さがその欠点となるのは、こういう状況にある。

【0004】

しかし、上述の問題にもかかわらず、フローサイトメトリーは、非常に正確にかつかなりの感度で、悪性細胞の存在を同定し、悪性細胞の種類を特徴付けることができる。フローサイトメトリーの提供する情報がないと、症状が誤診されることも多く患者にとって破滅的な結末となることもある。これは、光学顕微鏡のみによるスライドの検査がかなり難しい細針吸引液と呼ばれるバイオプシーのタイプの場合には特にしかりである。

平均的な病院の病理学者や外来又は遠隔地の全ての医師に非常に役立つものは、より安価で直ぐに入手できる材料を使用して、試料の同種の単一パラメーター又は複数パラメーター解析を可能にする装置又はキットである。これによって、特殊化された研究室とフローサイトメトリー技術自体にだけ専念する技師の必要性がなくなり、よく訓練された臨床検査師であれば誰でも同種の分析を利用できるようになる。更に、生細胞の必要が無くなれば、細胞は適切な固定液により保存することができ、免疫表現型解析データの利用性を広げる。

ここ20年で、血液細胞によってその細胞膜上に発現される分子（細胞表面抗原と呼ばれる）の同定と特徴付けにおいて非常に大きな発展があった。理解して

いるところではこの発展は、生細胞の表面上のこれらの分子の高速で高感度の同定を可能にする技術の改良に伴うものである。しかし、これら細胞表面抗原の圧倒的大多数は一つのタイプの細胞に特有なものではない。細胞型を同定するための診断マーカーが単一であるのは希な場合に過ぎない。それどころか、ほとんどの細胞集団は同時に複数のパラメーターを分析することにより特徴付けされなければならない。

【0005】

抗体は、単一の特定分子（抗原と呼ばれる）に結合する性質を有する体の免疫系により産生されるタンパク質である。抗原抗体複合体は、抗体がその各抗原に結合するときに形成される。通常、これらの複合体は、ついで体から感染症を取り除くための免疫系により除去される。しかし、免疫系は、独特の抗体をつくる実質的に無限の能力を有し、これは、かなり小量で存在するにしても、特定の物質を同定するように作られうる。現在では、抗体はまさに何百もの異なる抗原に対して商業的に産生されている。更に、抗体はマーカー分子、例えば蛍光分子、染料、又は抗原抗体複合体の存在の同定を比較的簡単なものにする他の物質を用いて容易にタギングすることができる。このよく知られた生化学反応は、フローサイトメトリーと呼ばれる方法を開発するのに使用されてきた。フローサイトメトリーでは、無傷の細胞が細胞表面の特異的マーカーと結合する抗体を用いて処理される。そして、抗体は、蛍光分子で標識され、ついで細胞懸濁物が、存在する他の細胞に対する蛍光細胞の数を計数する光検出器を用いた光線を通過して流れる。この技術は、患者の血液及び組織試料中の悪性細胞集団の同定に極めて有効であることが分かっている。

【0006】

フローサイトメトリーでは、細胞懸濁物は蛍光分子（蛍光色素）で標識された抗体で処理され、洗浄され、装置に配される。細胞懸濁物は、緩衝液を使用して、細胞が一行になってフロー検出器を通過するように「焦点を当て」られる。それぞれの細胞がフロー検出器を通るとき、レーザー光の光線が細胞を通過する。ある量の光は細胞を通過し（前方光散乱と呼ばれる）、ある量は角度を成して屈折される（側方散乱と呼ばれる）。前方散乱は、細胞の大きさと共に増加し、側

方散乱は細胞の内部の複雑さ（大部分は細胞質内の顆粒）で増加する。よって、丁度これら2つの計測値を用いることで、個々の細胞タイプが大まかに分類される。しかし、細胞表面に付着する抗体により放出される蛍光を適切なカラーフィルターを使用することにより特異的に検出することのできる光検出器もある。現在の技術水準の装置は、4つまでの異なる色の検出器（4色フローサイトメトリーと呼ばれる）を有しているので、4つまでの異なる抗体を同じ管に加えることができる。個々の患者からの試料は、通常、それぞれに複数の抗体が入った複数の試験管に分割される。従って、データ分析はかなり複雑で、それぞれの試験管からの複数のプロットを同時に表示することのできるコンピューターを必要とする。これは複数パラメーター分析と呼ばれる。この複数パラメーターの同時分析は、先ず細胞集団を電子的に単離し、ついで特徴付けることが必要である。従って、現在のフローサイトメトリー分析器は、同時に6つまでのパラメーター（前方散乱、側方散乱、及び4種の抗体）を分析するが、3つのパラメーターは細胞タイプの電子的単離（前方散乱、側方散乱、CD45染色強度）に使用されなければならない。血液試料中に存在する細胞のおおまかな分類は当該分野で既知であり、骨髓性細胞、単球、リンパ球、巨核球、及び赤血球が挙げられる。換言すれば、これら3つのパラメーターは、ヒトの目がとても楽に行うこと：細胞の大まかな分類を同定し又は特徴付けすることを大まかに模倣するために使用されなければならない。実際、研究室は、非常に適度な正確さと精度をもって血液試料中に存在する異なる細胞タイプを同定し又は特徴付けることのできる2年の訓練（血液学の領域にあるもののみ）をした技師を一般に雇用する。更なる訓練により、彼らは、骨髓吸引液試料中の細胞タイプを正しく計測することもできる。よって、仮にヒトの目が細胞表面抗原も同定する手段を備えているとすれば、この目的のためのフローサイトメトリーは必要ないであろう。更に、フローサイトメトリーでの分析に利用できる残り3つのパラメーターの内、2つだけが任意の一つのプロットに表示される。但し、三次元のプロットを表示することが出来る新しいソフトウェアは存在する。三次元プロットは利便性を加え、限られた状況で適用可能であるが、大抵の場合、2つのパラメーター分析でかなり十分である。フローサイトメトリーに代わろうとする方法は、少なくとも2つの細胞表面マ-

カーを同時に特徴付けできるものでなければならないので、この最後の点は重要である。

【0007】

フローサイトメトリーによる細胞集団の分析は、些細なプロセスではなく、上に概略を述べたように高度に訓練を受けた員を必要とする。単一パラメーターと複数パラメーター分析の両方が実施されうる。データが単一マーカーの蛍光と細胞数とのヒストグラムプロットとして分析される場合、一つのパラメーター分析が実施されている。そして、シングルゲートの細胞集団の2つのそのようなヒストグラムを分析することは、同時単一パラメーター分析と呼ばれる。同時単一パラメーター分析の例は、B細胞マーカーCD20と軽鎖カッパーの両方の細胞表面発現を同定するためのそのようなプロットの使用を含む。抗体の各セットの結合の分析は、他のものと独立している。複数パラメーター解析では、二つの抗体の結合は関連しており独立ではない。分析法は、蛍光1に対しての蛍光2のような単一のヒストグラムで同時にもたらされる両方の抗体の結合を必要とする。標的細胞集団の特徴付けは、この蛍光1に対しての蛍光2のプロットを分析し、これらの抗体のそれぞれの結合特性を併せて分析することにより最もうまく行われる。これは単一細胞集団として2つの重複する細胞集団を間違えて分析する誤りの可能性を減少させる。

【0008】

最後に、DNA倍数性分析の限られた例外をもって、固形腫瘍及び非血液腫瘍の特徴付けはフローサイトメトリーに全く限られている。細胞懸濁物を開発するための良く改良されたプロトコールはないことが多い。また、腫瘍細胞はデリケートで、プロセッシング後に生存していないかもしれない。また、ビメンチン又は平滑筋アクチンのような固形腫瘍に使用される多くのマーカーは、細胞質内抗原であり、フローサイトメトリーによりアッセイするのが困難である。また、これらの他の腫瘍に対して利用できる殆どのマーカーは腫瘍に対する特異的なマーカーではなく、利用できる試料の背景に存在する細胞を含む多くの正常細胞が、同じマーカーに対して強い陽性を示しうる。従って、特定の形態学的相関関係のないこれらの種の試料の判定は、どんなによく見ても危険である。

【0009】

本発明の目的は、細胞集団の単一パラメーター及び他パラメーター分析のより安価で、より利用しやすい方法を提供することである。この分析は、細胞表面マーカーのみに限らず、任意には、細胞表面上の活性なレセプター部位、細胞表面タンパク質の喪失、細胞内タンパク質、及び細胞内核酸配列を同定することを含む。本発明の特徴の一つは、標的細胞集団が、分析のための細胞の形態学的特性を保持することにより分析されることである。また、特定の試料量に関して特定の細胞数を得る事象を計数することもできる。フローサイトメトリーの多くの準備工程のため、絶対的な細胞数を得るのは可能ではなく、細胞のパーセントのみが分析される。

【0010】

(発明の概要)

a) 液体媒質中に懸濁させた細胞の懸濁物を提供し、該細胞は第一の細胞を含み、b) 上記懸濁物に実質的に同一の第一のビーズの群を添加し、該第一のビーズの各々は結合物質で被覆されるか、各第一のビーズが第一の細胞に結合するように適合化されるように磁力を持ち、c) 上記第一のビーズが上記第一の細胞に結合することを可能にするのに効果的な時間の間、上記懸濁物中の上記第一のビーズをインキュベートして、第一のビーズと第一の細胞の複合体を生成させ、各第一のビーズと第一の細胞の複合体は第一のビーズと第一の細胞を含み、d) 上記懸濁物から上記第一のビーズと第一の細胞の複合体を濾過により分離し、e) 上記第一のビーズと第一の細胞の複合体を検査し、上記第一の細胞を特徴付ける、工程を含んでなる細胞を特徴付ける方法が提供される。少なくとも一群の実質的に同一の第一のビーズを含み、各第一のビーズの各々が第一の細胞に結合するように適合化されるキットがまた提供され、該キットは第一の細胞を含む懸濁物に対して単一パラメータ又は複数パラメータ解析を実施するために如何にして上記第一のビーズを使用するかについて技術者に指示するのに効果的な一群の指示を更に含む。細胞懸濁物について単一パラメータ又は複数パラメータ解析を実施する装置が提供される。該装置はサンプルローダーと複数の反応チャンバーと濾過チャンバーを具備する。

【0011】

(発明の好適な実施態様の詳細な記載)

ここで使用されるところでは、例えば5 - 25のような好適な範囲が与えられる場合、これは好ましくは少なくとも5を意味し、別個にかつ独立して、好ましくは25以下を意味する。ここでの細胞は好ましくはヒト細胞である。第一群の細胞が第二群の細胞のメンバーを含まず、第二の細胞群が第一の細胞群のメンバーを含まない場合には、二つの群がオーバーラップしない。「視覚的に識別可能な」とは光学顕微鏡によって視覚的に識別可能であることを含む。定量は、その数を推定又は数え上げあるいは計数することを含む。表現型解析は免疫表現型解析及び遺伝子型解析を含む。

【0012】

本発明はビーズを使用する。ここで使用される場合、ビーズとは小粒子又は支持体表面、好ましくはミクロスフィア、より好ましくはプラスチックミクロスフィア、より好ましくはポリスチレンミクロスフィア(ラテックスビーズもしくはスフィアあるいはミクロスフィアと呼ばれる)を意味し、結合物質で被覆されており、又は磁性であることが好ましい。請求の範囲において使用されているところでは、「第一のビーズ」は結合物質で被覆されたか又は磁性であるビーズを含む。ビーズは適切な溶液中に懸濁されうる任意の固体支持体表面又は粒子でありうる。好適なビーズはインディアナ州フィッシャーのBangs Laboratoriesからのポリスチレンミクロスフィアとして入手可能である。ビーズのサイズは好ましくは直径5ミクロン、好ましくは5.5 - 10.3ミクロンより大きく、好ましさは劣るが少なくとも5.5又は10又は12ミクロン、好ましくは12、15、20又は30ミクロン以下の直径であり、5ミクロン未満、例えば少なくとも1、2又は3ミクロンの直径は好ましさが更に劣る。5.5及び10.3ミクロンビーズが好ましい。ビーズはまた有色でもよく、例えば赤又は青、好ましさは劣るが緑、紫、オレンジ色、褐色、黄色、又は任意の他の色でもよい。ビーズは好ましくは結合物質、例えば抗体又は免疫応答性タンパク質、あるいは細胞とビーズを互いに接触するか又は付着するか、もしくは互いに結合するように細胞表面に結合又は相互作用する任意の分子で被覆されているもの；あるいは、ビーズ

は帯電相互作用又は磁氣的相互作用を通して細胞表面に接触し又は結合することができるものがよい。つまり、これらの概念の全ては「結合している」又は「結合する」という用語によって網羅されている。一つのビーズが細胞に結合するとき、ビーズ-細胞複合体を形成する。本発明では、細胞-ビーズ相互作用は適切な寸法の細孔を含むフィルターの通過を阻害する十分に大きな複合体を形成する。フィルターは好ましくは未結合細胞及びビーズが細孔を通過するが結合した細胞-ビーズは通過しないようにサイズが決められ選択される。これらの複合体はついでガラススライドまで移送され、複合体を常套的な顕微鏡観察によって可視できるように様々な染色剤で染色される。複合体と細胞が検査され、細胞が特徴付けられる。ビーズ表面を被覆するために使用されうる結合物質又は反応物質の例は、限定されるものではないが、特異的細胞表面タンパク質に対する抗体、レセプター又は他の細胞表面分子を結合する分子、例えばIL-2又はGM-CSF、アビジン、ビオチンを含み、又は細胞と他の手段によって相互作用しうるビーズが懸濁物中に被覆されないで残りうる。使用できる抗体は当該分野で知られているものである。かかる多くの抗体が民間会社、例えばカリフォルニア州南サンフランシスコのZymed社及びカリフォルニア州カーピンテリアのDako社から入手できる。

【0013】

金、フェリチン、ポリアクリルアミド、又はポリスチレンを含む様々な物質からビーズ又はミクロスフィアを製造することができる。後者は、ビーズが任意のサイズの仕様に正確に調製することができ、分子リンカーアームと反応性結合物質の双方に均一に結合されうるので、好適な物質の一つである。ポリスチレンミクロスフィア（「ラテックスミクロスフィア」としても知られている）はここに出典明示により取り込む当該分野で知られている方法によって調製することができる。使用することができる結合物質は、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、抗体「カクテル」混合物、抗体断片（例えばFc部分又はFab又はFab'断片で一価又は二価の何れかの形態）、特異的細胞表面レセプターに結合する小分子、共有結合リンカー及び非共有結合リンカー、及び静電気又は磁気又は常磁性吸引力を使用する間接的付着などである。

【0014】

先行技術は米国特許第5554505号；第5348859号；第5340719号；第5231005号；第5260192号；第5338689号；第5256532号；及び第5501949号を含み、その全体の内容がここに出典明示により取り込まれる。これらの特許は細胞の同定のためにある種のマイクロスフィア又はビーズを使用することを検討している。分析のために液体媒質中での細胞懸濁物を如何にして提供するかは当該分野で知られている。

【0015】

本発明の好適な実施態様の第二の特徴は、超顕微鏡的常磁性マイクロスフィアの細胞溶解又は更なるインキュベーション工程による、細胞懸濁物の更なる操作をしないで適切なフィルターを使用して細胞を濃縮することである。本発明において使用されるフィルターは当該分野で知られている任意のものでできるが、例えばマサチューセッツ州ボックスボロウのCytec社の婦人科用のフィルターである。フィルターは未結合ビーズ及び未結合細胞の全て又は殆ど又はかなりの量が通過するようにビーズより大きな孔径を有しているものが好ましいが、細胞に結合したビーズの全て又は殆ど又はかなりの量がフィルターに捕捉されるほどのなるべく小さい孔径のものが良く、例えば孔径がビーズサイズよりも約1、2、3、4、5、6、8、10又は12ミクロン大きいものである。好適なフィルター孔径は10 - 15、好ましが劣るものは7 - 20、7 - 30又は7 - 40ミクロン孔径である。あるいは、フィルター孔径は少なくとも15又は20ミクロンがよい。フィルターは好ましくは固体支持体、例えば懸濁物の抜き出しが可能な管の端部に設けられる。

【0016】

細胞懸濁物は、好ましくは、末梢血試料、骨髓吸引液、細針吸引液、リンパ節生検、又は体部位検体から調製される。ここに記載した方法では、単一パラメータ、同時単一パラメータ、及び真の複数パラメータ解析が可能であり、フローサイトメトリーにより可能な解析の高度性レベルに匹敵する。任意にはサイズ、色又は両方によって容易に互いに視覚で識別できるビーズが、細胞懸濁物に同時に又は連続して添加できる。標的細胞集団による陽性結合の結果、未結合細胞又は

ビーズの何れかより有意に大きい物理的サイズを持つビーズ-細胞複合体が生じる。これらの複合体はついでフィルターに複合体を残しながら未結合細胞及びビーズを通過させるのに十分なサイズの細孔を含む適切にサイズ分類されたフィルターを使用して容易に濃縮され、残りの溶液から分離することができる。該方法はまた逆に使用してもよく、そこでは異常な細胞集団は正常な細胞が強く結合するビーズに結合しない。この後者の方法の例は骨髓形成異常疾患(MDS)で見いだすことができ、これは、現在のところでは如何に高い信頼性があってもフローサイトメトリーでは診断できない。正常なヒトの骨髓性細胞はCD11b、CD13、CD15、CD16及びCD33のような表面マーカーを強く発現する。しかし、MDSでは、これらの細胞集団はこれらのマーカーの発現がない。しかし、正常な細胞でも、長期の保存又は不具合な検体の取り扱い、例えば検体輸送時に生じうる極端な温度で変質した場合、それらもまたこれらのマーカーの発現を失う。フローサイトメトリーはこれら二種の条件を区別できない。しかし、変質した細胞はMDSの形成異常細胞とは形態学的に容易に認識される。これらのマーカーに対する抗体被覆ビーズの結合の喪失は(フィルターを通過する細胞並びにフィルターに捕捉されたものからなるスライドで)容易に特定されうる。従って、この方法はMDSを診断するために最初に容易に利用できる方法であり、よって長期の臨床経過観察後の異常な細胞遺伝学又は持続する血液学的異常性を示す場合においてのみ診断可能なのである。MDS解析の例としては、周囲のスミアを見ることができる。細胞が変質している場合は新しい試料を入手する。細胞が変質していない場合は、抗CD13で被覆した大きなビーズと共に細胞懸濁物をインキュベートする。ついで、抗CD15で被覆した小ビーズを加え、反応させる。ついでフィルター(は小さい孔径であり、結合及び未結合細胞を捕捉するか、大きな孔径で結合細胞のみを捕捉することができ、その場合は、未結合細胞がフィルターを通過したものから収集される)。図3のように多くの複合体が生じ、未結合細胞が少ない結果の場合は、これは正常な細胞を示す。少ない結合細胞と多くの未結合細胞があれば、これはMDSを示唆する。未成熟細胞はまた弱い結合を示すが、これは形態学的に見ることができる。同じ手順がCD11bとCD16でも行われる。

【0017】

ガラススライドへの移送の前にフィルターに捕捉されたビーズを計数することもできる。例えば光散乱、反射率、蛍光、又は静電界変化のような方法を使用して、フィルターに捕捉されたビーズの数を計数することができる。各ビーズに結合した細胞の平均数を得ることができ、元の試料容積中の細胞数の推定値を得ることができる。

図1には、比率は異なるが、ポリスチレンミクロスフィアのようなビーズ2が示されており、抗体のような結合物質4がその上に被覆され、結合される。細胞表面マーカー8を有している標的細胞のような細胞6がまたある。結合物質4又は抗体は標的細胞6上の細胞表面マーカー8に結合する。図2はこのような種類の反応がガラススライド上に如何に現れるかを示している。つまり、一群の細胞又は標的細胞12はビーズ10に結合している。これがビーズへの細胞の単一パラメータ結合を示す。細胞へのビーズの比率は効果的な結果に対して適切に調節されなければならない。ビーズを結合する細胞の実際数は可変であり、単一の細胞からビーズ表面に集まる無数の細胞にわたる。

【0018】

図3には、8の細胞16、18、20、22に結合した結合物質で被覆された大きなビーズ14が示されている。小ビーズ又は異なる結合物質で被覆された異なる色のビーズ24は細胞22に結合し、細胞16、18、20には結合していない。これは標的細胞22の陽性の同定を提供する。これは複数パラメータ解析を示す。細胞22は細胞16、18、20、22のサブセットである。可変数のビーズ24が各細胞22に結合できる。ある場合には、ビーズ14に結合した各細胞は一又は複数のビーズ24に結合し、あるいはビーズ14に結合した各細胞は小ビーズに結合しない。異なった種類の細胞が、ある場合には形態学的に識別できる大きなビーズ14に結合しうることに留意されたい。好ましくは、大きなビーズ14が最初に細胞懸濁物に加えられ、複数の細胞がその表面に結合される。ついで、小さいビーズ24が加えられ、複合体の周囲に結合する。あるいは、小さいビーズ24が最初に加えたり、小さいビーズ24と大きなビーズ14を同時に加えることもできる。添加の順序は多くの部分がビーズと細胞の表面積と相

対濃度に依存する。例えば、標的細胞の表面積を完全に覆うか見えなくし、よって他のビーズがそれに接近することを防止するような濃度でビーズ14又は24を添加することは望まれない。好ましくは、ビーズを十分に被覆するために過剰な標的細胞がある。場合によっては、懸濁物は最初の複合体が形成された後に濾過して、最初の複合体を捕捉し第二のビーズが加えられる前にそれを再懸濁させることができる。このように、一群の複合体を、次のビーズの集合が加えられる前に濾過し再懸濁させることができる；これは、干渉をもたらしうる物質を除去することによって、より確かではっきりした結果を生じさせる。ビーズはサイズ又は色又は両方によって識別できる。複数パラメータ解析の更なるレベルを、例えば残りの細胞22には結合せず最初のサブセットの細胞22に結合し、よって上記最初の細胞22のサブセットに結合する異なったサイズ又は異なった色のビーズの他の集合を図3に加えることにより、実施することもまたできる。このようにして、次の又は更なるレベルの複数パラメータ解析を実施することができる。

【0019】

使用することができる非常に様々な入手可能なビーズがあり、選択されるものは特定の用途に依存する。複数パラメータ解析では、サイズか色によって容易に識別できるビーズが好ましい。例えば、それぞれ10ミクロン及び5ミクロンにサイズ分類された無色ビーズの二つの集合は、CD19のような抗パンB細胞抗原で被覆した10ミクロンビーズと抗カッパで被覆した5ミクロンビーズを使用して、B細胞の集団を単離するために使用することができる。フローサイトメトリーによっては容易には模倣することができない複数パラメータ解析がこの例の些細な変形によって利用可能である。無色の10ミクロンのビーズは抗CD19被覆ビーズを使用してB細胞を結合させるために使用される。5ミクロンの無色ビーズは抗カッパで被覆され、暗青色の5ミクロンビーズは抗ラムダで被覆される。同様に、芽細胞集団は抗CD34被覆の10ミクロンビーズと抗CD19被覆の無色5ミクロンビーズを使用して分析することができる。抗CD13で被覆された有色の5ミクロンビーズが芽細胞集団の迅速な特徴付けのために同時に添加される。

【0020】

好適な方法：

1) ストレプトアビジンで前もって被覆された実質的に同一のビーズ(インディアナ州フィシャーのBangs Laboratories)を商業的に購入する。リン酸緩衝食塩水のような任意の緩衝塩溶液又は商業的に入手可能な抗体希釈剤に少量を懸濁させる。ビーズをビオチン化ヤギ抗マウス抗体と共に30分インキュベートする(しかし、任意のビオチン化抗同種抗体を使用してもよい)。懸濁物を遠心分離し、上清を抜き取る。インキュベーションを2回繰り返してビーズの利用できる表面積をできるかぎり多く被覆するようにする。ついで同じ緩衝液を使用して3回ビーズを洗浄する。ついで懸濁物を1時間、特異的マウス抗ヒト抗体と共にインキュベートする(あるいは標的細胞集団に対して特異的な任意の非ビオチン標識抗同種抗体を使用してもよい)。懸濁物を再度3回洗浄し所望の濃度まで希釈する。得られた懸濁物は、使用まで4℃で冷蔵することができる。あるいは、ビオチン標識一次抗体を二次抗体を使用しないで使用してもよい。この方法によって製造されるビーズは実質的に同一である。

【0021】

2) ビーズは抗Fcレセプター抗体(インディアナ州フィシャーのBangs Laboratories)、例えばヤギ抗マウスIgGFcレセプター抗体で前もって被覆する。ついでこれらのビーズをビーズ上の抗Fcレセプター部位に自然に結合する抗体の溶液に懸濁させることができる。上で引用した例では、マウス抗ヒト抗体はビーズに結合し、上述したものと同様の適切な洗浄工程が続く。

【0022】

3) 例えば任意のタンパク質、ペプチド、又はヌクレオチド配列のような結合物質を他の科学的又は特異的結合方法によって結合させてもよい。例えば、ポリスチレンマイクロスフィアは製造後に硫酸塩表面基で「自然に」被覆されて残る。これらのリガンドを用いてタンパク質とペプチドをビーズの表面に直接結合させる。表面に被覆することができるこのような官能表面基の例は、限定されるものではないが、アルデヒド、脂肪族アミン、アミド、芳香族アミン、カルボン酸、クロロメチル、エポキシ、ヒドラジド、ヒドロキシル、スルホネート、及びトシ(

トルエンスルホニル)反応性リガンドを含む。ついで、これらは今度はペプチド、タンパク質、オリゴヌクレオチド、及び他の生化学リガンドを表面に結合させるために使用できる。これらのリガンド又は結合物質は今度はビーズの表面に細胞を結合させる細胞表面上に特異的部位を結合させるために使用される。例えば、ホルモンIL-2のような小分子を用いて、上記の方法の一つによって、細胞表面上にIL-2レセプター部位(CD25)を結合させるためにビーズを被覆する。これはT細胞、単球のような細胞、及び新生細胞、例えばヘアリー細胞白血球細胞を結合させるために使用されうる。

【0023】

他の方法：

超顕微鏡的常磁性ミクロスフィア(好ましくは1ミクロン未満の直径)を対象の任意の反応性生物マーカーに結合させる。使用される結合は上記の方法のいずれでもよい。ついで細胞を透過化处理し、様々な洗浄剤と1%のパラホルムアルデヒドのような弱い固定液を使用して固定する。あるいは、IntraStain(カリフォルニア州カーピンテリアのDako社)のような多くの商業的に入手できる透過化处理キットがこの目的に利用できる。反応性生物マーカー、例えば抗ミエロペルオキシダーゼ抗体、抗末端デオキシチジルトランスフェラーゼ抗体、又は特異的RNA又はDNAプローブをついで細胞懸濁物と共にインキュベートする。生物マーカーと常磁性粒子が細胞内に入り、例えばプローブが細胞内標的に結合する。ついで、細胞を洗浄しPBS又はRPMIのような適切な緩衝液に再懸濁させる。ついで、懸濁物を、例えば1から20又は3-15又は5-10又は10-20ミクロンのような容易に可視化されるサイズ又は色のミクロスフィア又は磁気ビーズと共にインキュベートする。磁気ビーズは細胞表面に結合するが、膜を通過することができず、濾過経路のような容易に捕捉される細胞-ビーズ複合体をつくる。

【0024】

一例では、骨髓懸濁物中の異常な芽を透過化处理し超顕微鏡的常磁性ミクロスフィアに結合した抗ミエロペルオキシダーゼ抗体と共にインキュベートすることができる。ついで、懸濁物を緩衝食塩水中で3回洗浄し、再懸濁させ、好ましく

は直径5 - 15ミクロンのサイズの大きな磁気ビーズと共にインキュベートして大きなビーズに結合した細胞をつくる。

他の例では、アビジン化ミクロスフィア及びビオチン化プローブのような方法を使用して特異的DNA配列（プローブ）を超顕微鏡的常磁性ミクロスフィアに結合させる。慢性骨髄性白血病を患う患者からの細胞を透過処理し、病気の診断に用いられる特異的b c r - a b l 転位置に結合するプローブと共にインキュベートする。ついで、懸濁物を洗浄し、直径5 - 15ミクロンの好適なサイズの大きな磁気ビーズと共にインキュベートして大きなビーズに結合した細胞をつくる。

【0025】

検出と解析

上記のようにして提供され又は得られた細胞-ビーズ複合体（ビーズに結合した細胞）をついで、未結合細胞及びビーズを通過させるのに十分なサイズの多孔率を持つ固体支持体フィルターを通過させる。懸濁物は、ガーゼのパッドのような多孔性の吸収性材料を使用するフィルターに流体を通過させるか、重力、吸引（真空の適用）、流体側への正圧を含む様々な許容できる方法を使用してフィルターに通過させる。使用できる様々な装置には、ピストン、シリンジ、又はフィルターに流体を通過させる負圧を生じさせる吸引法が含まれる。好適な実施態様では、10 - 15ミクロンの孔径を持つ単一の固体フィルターが使用される。細胞-ビーズ複合体をフィルター上に捕捉し、ついで層を、スライドに直接接触させ、穏やかな圧力を適用することによりガラススライドまで移送する。得られるスライド調製物を、ヘマトキシリン及びエオシン、パパニコラウ染色、又は任意のロマノウスキー染色のような様々な商業的に入手可能な染色を使用して染色することができる。好適な実施態様では、細胞はPBS、RPMIのような適合性のある緩衝液又は商業的に入手できる抗体希釈剤に懸濁させたままとし、得られたスライドをライト-ギームザ染色で染色する。あるいは、細胞をCytolyte（マサチューセッツ州ボックスボロウのCytoc社）のような商業的に入手できる固定液又はエタノール中に懸濁してもよい。ついで、得られたスライドをパパニコラウ又はヘマトキシリン及びエオシン染色で染色する。複合体を検査し、細胞を常

套的な光学顕微鏡検査により特徴付けする。

【0026】

本発明は形態学と関連させた単一パラメータ解析、同時の単一パラメータ解析又は複数パラメータ解析を実施するために使用できる。単一パラメータ解析では（図1と図2に示す）、単一のビーズタイプが液体媒質中の細胞懸濁物中に加えられ、濾過後にスライドに単一細胞集団が富んだスライドが得られる。これは、以下の実施例1に引用したような単球様Bリンパ球から単球を区別するような特定の特徴を細胞集団が有しているかどうかを決定するために単一スクリーンとして使用される。この構造では、細胞はビーズに結合し、解析のためにガラススライド上に可視できる。あるいは、B細胞集団を、それぞれが単一のビーズタイプ（抗カップ又は抗ラムダ）を含む二つの別個のスライド又はスライドウェルを使用することによってカップ又はラムダの発現のためにアッセイすることができる。この解析法の他の変形例は一つは抗カップと第二は抗ラムダの二つの異なるビーズタイプを細胞懸濁物に同時に添加するものである。これは、各ビーズタイプの結合が互いに独立しているが結果は一緒に分析されるので、同時の単一パラメータ解析の例である。単一ヒストグラムを得るために細胞数に対して蛍光が示されるときフローサイトメトリー解析において類似の状況が生じる。カップ及びラムダ解析では、モノクローナル集団を両方のヒストグラムの同時の分析と蛍光の単一のピークを探すことにより検出することができる。最後に、複数パラメータ解析を分析が一緒になされるように二つの異なった特徴の関連した検出により実施することができる。この場合、ビーズの一集合の結合が生じると、ビーズの第二の場合によっては更なる集合が続く（図3を参照）。解析は、標的細胞集団へのビーズの一を越える集合の同時結合を探す（以下の実施例2に示す）。

【0027】

本発明は強い結合が予想される場合に結合の異常な喪失を検出するために使用することができる。例えば、末梢血中の成熟顆粒球及び単球のような正常な骨髓球細胞は表面マーカーCD13、CD33、CD11b及びCD16を強く発現することが予想される。骨髓試料には、細胞が成熟するにつれてこれらのマーカーの発現を増強させる連続範囲がある。しかし、異常な成熟を示す細胞は、脊髄

異常形成に見られるように、これらのマーカーの発現の減少を示す。この現象は過去にDavis等により記載されており、適切なヒストグラムでの異常な発現パターンとしてフローサイトメトリーにおいて見ることができる。しかし、同様な発現の喪失は、正常細胞が死亡し、検体のまずい処理又は老化において生じるように変質するときに見られる。形態学的相関がフローサイトメトリーにより最適に満たないので、現象は診断用の有用性を、特に検体が長距離にわたって輸送されるときに、制限する。本発明では、細胞をガラススライド上で可視化してその生存度を確認することができる。正常な細胞はこれらのマーカーで被覆されたビーズに強く結合するが、脊髄異常形成を伴う細胞中のビーズの結合が減少する。不応性貧血及び環状鉄芽球を持つ不応性貧血のような低悪性度脊髄異常形成では、診断を確認するための客観的な診断基準はないことが多い。そのような場合の現在の技術水準は長期の経過観察と、エタノール毒性又はビタミンB12又は葉酸欠乏からの巨赤芽球性貧血のような他の可能な要素を排除することによる診断を必要とする。本発明の方法は非常に必要とされる確実な診断試験を提供する。

【0028】

補完的な検出方法はガラススライドへの細胞の移送の前に、フィルターを穏やかに洗浄し、白色光線か蛍光ビーズの励起波長に対応する特定の波長の光線を使用して走査する。事象数を電子的に計数し、ついで細胞をガラススライドに移して染色する。ついで、ミクロスフィア当たりの細胞の平均数を手動で得て、試料中の標的細胞の全数を（既知の容積の試料が使用されると仮定して）推定することができる。

【0029】

好適な応用：

1) 腫瘍及び他の特異的細胞集団の単一パラメータ解析。 既知の免疫表現型を持つ疑わしい腫瘍を、以下の実施例1及び3に概説したような単一マーカーの存在を確認するために分析することができる。これは細胞表現型に関する単一の問題が解決される必要がある場合において最も有用である。以下の実施例1では、異常細胞集団がB細胞由来であることを知ることは、これが悪性を示唆する（しかし証明はしない）ので、更なる研究を進めるための十分な情報である。以下の

実施例3では、リンパ系集団がT細胞期限であることを知ることは悪性浸潤物よりむしろ反応性浸潤物を患者が有していることを示唆している。このアッセイがこれらの希な場合の双方において臨床的に利用できるならば、実施例1における単純な研究の結果が追加の試験の更なる費用を正当なものとする。実施例3の結果はフローサイトメトリーを実施しないで髄膜炎の治療を進めることを正当化する。これらの種類の分析の他の応用は、例えば子宮頸ガンのMN/C A 9スクリーニング、(HMB-45のようなマーカーを使用する)メラノーマのような悪性浸潤物の特定の腫瘍タイプの同定、又はリンパ節及び骨髓の微小転移性疾患の同定のような他の種類の腫瘍において有用でありうる。また、単一パラメータ解析を遺伝子表現型及び遺伝子型解析に使用することができる。例えば、末梢血試料を透過化処理してb c r - a b l 転位置に対する特異的プローブで処理することができる。プローブは常磁性超顕微鏡的ミクロスフィアで抄紙機することができる。ついで、細胞を大きな磁気ビーズで処理して、慢性骨髓性白血病の診断結果となる転位置の存在を同定することができる。あるいは、同様な方法を、適切な抗体又はヌクレオチド配列を使用して、細胞内タンパク質又はRNA配列の存在を同定するために使用することができ、常磁性ミクロスフィアでまた標識した抗体を使用し例えば大きな表面磁気ビーズを使用して反応を検出して、細胞内タンパク質末端デオキシリボヌクレオチジルトランスフェラーゼ(TdT)の発現を同定することができる。最後に、CD64の発現の使用は臨床的に重要な急性炎症反応に対する迅速な診断試験として提案されている(Lab. Hematol. 1995; 1:3-12)。上記の理由から、フローサイトメトリーは費用がかかりすぎ、ありふれた条件に対するスクリーニング法として使用することは困難である。本発明の方法は、末梢顆粒球中でのCD64の発現のための迅速で安価な単一パラメータ解析を可能にする。

【0030】

2) 同時の単一パラメータ解析は互いに独立するマーカーの同時の分析がある。最も一般的には、これは、発現された表面免疫グロブリンによるカッパ又はラムダ軽鎖制限の何れかの発現を決定するためにB細胞リンパ系集団において使用される。これは、同時に分析される二つの別個のガラススライドにおいて使用され

る類似のビーズを使用して、又はサイズ、色、又は両方に基づいて容易に識別できる2つのビーズ集合を使用する単一スライドを使用することによってなすことができる。これはB細胞の単クローン性のための安価で迅速なスクリーニング法として極めて有用である。他の有用なタイプの同時単一パラメータ解析は、サイズ、色又は両方によって識別できる複数のビーズセットを含む単一スライド又は複数の別個のスライドの何れかを使用して細胞懸濁物が分析できる未知の由来の悪性腫瘍の場合にある。この例では、これらのビーズ集合にはCD45（リンパ球共通抗原）、HMB-45（メラノーマ）、及び一般的サイトケラチンマーカー（しばしば上皮細胞腫瘍に対するAE1及びAE3カクテル）をマーキングするビーズが典型的に含まれる。この種の分析の第三のタイプは、リンパ球集団を、この集団がB細胞、T細胞、他の細胞からなるかどうかを決定することであり、又はこれらのタイプの任意の組み合わせである。

【0031】

3) 本発明はまたマーカーの発現を他のマーカーと組み合わせて分析する複数パラメータ解析を含む。この種の解析の単純であるがよくある例を以下に実施例2に示す。実施例2では、B細胞を単離する抗CD20被覆ビーズによる陽性結合反応はカッパ又はラムダ軽鎖の発現に関連している。複数パラメータ解析法は、ある種の細胞集団を正しく同定するには複数のサブセットのマーカーの論理的な関係を必要とするので、分析法を増強する。急性白血病の場合がこの種の分析の有用な例となる。形態学的検査は異常な芽細胞を同定するための最善の方法の一つであるが、存在する芽細胞の種類を特徴付けない。形態学的分析を本発明と組み合わせると、次の典型的な種類の解析法をもたらす。抗CD34被覆ビーズを抗HLA-DR被覆ビーズと組み合わせて悪性細胞集団におけるこれらのマーカーの両方の発現を確認する。これらのマーカーの両方の陽性発現は急性白血病の診断を裏付ける。ついで、細胞を抗CD19及び抗CD2被覆ビーズと組み合わせて抗CD13及び抗CD33被覆ビーズで分析して、細胞が骨髓球由来か単球由来かを決定する。それらがCD13、CD33又は両方に結合する場合は、これは細胞の骨髓球性誘導を確認する。細胞をまた抗CD15、抗CD14、抗CD56、抗CD7及び抗CD4で分析して亜類型（骨髓球性、単球性、又は双方

）を決定し予後情報を生み出す。特に興味深いことは急性前骨髄球性白血病（F A B 亜類型 M 3 ）の分析の成功である。フローサイトメトリーによるこの腫瘍タイプの分析は、誤差を伴っており、腫瘍が成熟異種形成細胞からなるので見逃されうる。本発明を用いれば、形態学的解析が前骨髄球細胞の過剰な数の存在を確認することができる。また、前骨髄球は通常は H L A - D R 陰性であり、疾患の診断結果となる染色体 1 5 及び 1 7 (t (1 5 ; 1 7)) のトランスロケーションに対してまた分析されうる。この種の分析は、細胞が単芽球に似ている疾患の微粒変異において特に有用である。単球性白血病はまた C D 3 6 のような更なる単球マーカーに対して分析できる。同様な種類の分析法が他の血液学的悪性腫瘍、他の腫瘍タイプ、及び他の特異的細胞集団に対して実施できる。また、該方法は反対に脊髄形成異常の診断試験法を提供するために使用できる。正常な骨髄性細胞は骨髄性マーカー C D 1 1 b、C D 1 3、C D 1 6 及び C D 3 3 に強く結合する。脊髄形成異常において見られる変化としては、フローサイトメトリーによるこれらのマーカーの発現の減少である。しかし、過剰な使用年齢において生じるような変質細胞、温度の極端性、又は検体の取り扱いの誤りの他の形態がまたこれらのマーカーの発現の低減を引き起こす。フローサイトメトリーとの形態学的相関は乏しいので、この分析形態は、フローサイトメトリーでは変質した正常細胞と異常形成細胞との信頼性のある識別が可能ではないので、有意には臨床的に受け入れられなかった。本発明の方法では、優れた形態学的相関があり、訓練を受けた観察者であれば変質した細胞を容易に認識できる。従って、正常細胞はこれらのマーカーに抗体被覆ビーズを激しく結合させ、形成異常細胞はさせないので、形成異常細胞から正常細胞を容易に区別することができる。

【 0 0 3 2 】

他の同様な応用は H e r 2 / n e u の過剰発現のような予後の因子を決定するために乳ガンの分析に使用することができる。現在の技術水準は視覚法による回りの乳房組織から実際の腫瘍を局在化する免疫組織化学を主に利用している。H e r 2 / n e u の細胞質膜の発現は 0 + 陽性（発現なし）から 4 + 陽性（最も強い可能な発現）として表されるスケールで視覚的に観察者によって推定される。H e r 2 / n e u の過剰発現のレベルを推定する客観的な定量法はない。あるい

は、Her2/neuの発現は蛍光の点で各遺伝子コピーを標識する蛍光インサイツハイブリダイゼーション(FISH)を使用してより客観的に推定することができる。各細胞中の遺伝子コピーの数は各細胞の核内の点を単に計数することにより推定することができる。しかし、細胞は容易には対比染色して観察できないので、混合した良性のものから悪性の乳房上皮細胞を又は乳房支持基質から間質性細胞でさえ識別することは困難である。従って、FISHによる分析は臨床場面ではあまり受け入れられない。より最近には、Her2/neuの発現はフローサイトメトリーにより実施することができるが、FISHのように、分析した細胞が悪性細胞か良性のものかどうかを評価する方法がない。本発明に記載されている複数パラメータ解析法を使用すれば、細胞懸濁物中の上皮細胞を抗サイトケラチン抗体で被覆した大きな(10ミクロン)ビーズを使用して間質細胞から区別することができる。上皮細胞のみがこのビーズに結合する。ついで、適切な抗Her2/neu抗体で被覆された小さな5ミクロンのビーズを混合物に加え、懸濁物を濾過する。Her2/neuの発現は幾つかの方法で客観的に分析することができる。一方法では、フィルター自体を分析して、蛍光(5ミクロンビーズが蛍光の場合)、静電気試験、又は他の様々な既知の計数法を使用してフィルター上に存在する5ミクロンビーズの量を測定することができる。他の方法では、懸濁物を濾過後にガラススライドに移し、スライドを染色する。良性の細胞を形態学的試験により悪性のものから区別し、悪性細胞に結合するビーズの平均数を推定することができる。これは観察者が手で実施するか電子的視覚分析法を使用する半自動的な方法で実施して、観察者が悪性であると特定した各細胞に結合したビーズの数を計数することができる。

【0033】

4) 弱く発現した抗原のシグナル増幅。フローサイトメトリーの主要な利点の一つは細胞の表面上の弱く発現した抗原を検出する能力である。多くの抗原がこの範疇に入り、ジアミノベンザジンのような標準的な比色検出法を使用する常套的な免疫染色のような他の手段を使用しては容易には検出できない。免疫染色におけるこの問題は触媒シグナル増幅キット(カリフォルニア州カーピンテリアのDako社)のような商業的に入手できるチラミドシグナル増幅のようなシグナル増幅

法を使用して部分的に解消されている。該方法では、一次抗体をペルオキシダーゼ酵素（通常は西洋わさびペルオキシダーゼ又はHRP）に結合させ、酸素フリーラジカルを生じさせる。チラミドの存在下では、チラミド分子自体がフリーラジカルになり、短い寿命の高反応性種である。それらは直ぐに近くの分子に結合し、一次抗体の接近した領域に固定される。チラミドは蛍光分子かペルオキシダーゼの何れかに結合したシグナル増幅が簡単に誘導される。この加えられたペルオキシダーゼを用いて更なるDABシグナルを生じさせ、よってシグナルが増幅される。このシグナル増幅法はまたここに記載された発明の方法に利用できる。一例では、一次抗体が製造者の指示に従ってビオチン化チラミドフリーラジカルを生成させるためにHRPに結合させられる。ついで、アビジン化ビーズは細胞表面の適切な部位に速やかにかつ自然に結合する。別の方法は、抗体がビーズの表面の何れかに結合したHRPのような過酸化物質フリーラジカルジェネレータをまた有する対象の抗体で被覆される常套的な光学顕微鏡検査によっては見えない超顕微鏡的ビーズを使用する。ビオチン化チラミドフリーラジカルを製造者の指示に従って産生させ、ついで細胞を洗浄（又は濾過）し、光学顕微鏡検査により容易に見えるアビジン化された大きなビーズ（典型的には5 - 20ミクロンサイズ範囲のビーズ）で処理する。このシグナル増幅法は希な抗原のみが細胞表面上に存在する場合、ビーズの弱い結合を大きく亢進等する。単一増幅はまた（1）カリフォルニア州カーピンテリアのDako社から入手できるデュアル標識Envisionポリマー系、又は（2）英国バーミンガムのThe Binding Site Company社から入手できるキットである鏡像補抗体法を使用して達成することができる。

【0034】

5) 複数パラメータ解析の他の方法は標的細胞集団を単離するために単一のビーズ集合を最初に使用することにより実施することができる。ついで、第二のパラメータは免疫蛍光のような常套的な又は一般的な免疫組織化学的方法、比色法、例えば過酸化還元DAB又はアルカリホスファターゼ法、又は免疫金法/銀亢進法を使用して検出できる。この第二の抗体検出システムは細胞懸濁液中かスライド作製後で染色前に適用することができる。方法と検出方法の選択は最終産物において望まれる染色と使用される特定の抗体に依存する。この方法はパラフィ

ン包埋組織切片において使用される固定とプロセッシングを迂回するので、これらのパラフィンにおいて使用できないCD10、CD2又はCD19のような抗体をここで使用することができる。

【0035】

次の実施例は、単一パラメータ及び複数パラメータ解析を含む本発明の様々な側面を更に例証する。

実施例 1

汎血球減少症と脾腫大を持つ30歳の男性が対象となった。周辺スメアの検査により汎血球減少症が確認された。また、単球様外観を持つ、平凡な細胞学的特徴を示した離散細胞が存在していた。これらの細胞の核は丸から楕円で、単一の中間核を有していた。多くの細胞質突起を示す豊富な青-灰色の細胞質があった。骨髓検査により同様な細胞が存在する低細胞性吸引液が明らかになった。異常細胞の小さいクラスターがコアのバイオプシー上に存在していた。周辺のスメアのパフィーコート試料を抗CD20被覆10ミクロン無色ガラスビーズに懸濁させて単球から異常細胞を識別した。懸濁物を適切なフィルターを通過させ、ついで細胞をガラススライドに移送して染色した。得られたスライド調製物の概略を図2に実証する。異常細胞集団の10ミクロンビーズへの正の結合は疑わしい発見であり、異常なB細胞集団を示唆した。骨髓吸引液について実施したフローサイトメトリーにより、ヘアリー細胞白血病の診断を確認するCD19、CD11c、CD103及びカッパ軽鎖を発現する単球様B細胞のモノクローナル集団が明らかになった。

【0036】

実施例 2

慢性リンパ性白血病(CLL)の既知の病歴を持つ68歳の男性が常套的な経過観察検査のための対象となった。臨床検査により、患者が87%のリンパ球を含む435500細胞/mlの末梢白血球数(正常範囲4300-11000細胞/ml)を有していることが明らかになった。末梢血スメアの形態学的検査により大きな形質転換細胞の有意な集団を持つ小リンパ球の異常な集団が主に明らかにされた。液体媒質中の細胞懸濁物を提供した。この試料を抗CD20皮膜1

0 ミクロンビーズ、抗カッパ被覆無色 5 ミクロンビーズ及び抗ラムダ被覆無色 5 ミクロンビーズを使用して二本の別個の試験管において分析した。手順では、同じ試料を 2 本の試験管の各々に入れた。各試験管に抗 CD 20 皮膜 10 ミクロンビーズを加えた。これらは強く B 細胞に結合した。ついで問題は B 細胞がカッパ、ラムダ又は両方の組み合わせかであった。従って、5 ミクロン抗カッパビーズを第一の試験管に加え、5 ミクロンの抗ラムダビーズを第 2 の試験管に加えた。ついで、濾過しガラススライドに配した後に結果を解析した。細胞は 10 ミクロンビーズに強く結合し、抗ラムダビーズへの結合は示さず抗カッパビーズへの離散した結合を示さなかった（すなわち、複合体当たり 1 - 2 の小ビーズを除いて図 3 のように）。これらの結果は、フローサイトメトリーによって分析したときこの腫瘍が CD 20 を強く発現するが弱い軽鎖制限を伴うので、CLL に典型的なものである。別の手順として、5 ミクロンの抗カッパビーズを赤くし 5 ミクロンの抗ラムダビーズを青にする。手順は上述したようになお 2 本の試験管においてであり、又はカッパ及びラムダビーズが第一の試験管に同時に加えられる。この後者の結果の解析は図 3 のような複合体を示し、周囲の回りのみ青く（モノクローナルラムダを示す）、周囲の回りのみ赤く（モノクローナルカッパを示す）、又は周囲の回りの赤と青の組み合わせ（ポリクローナル B 細胞を示す）を持つ。

【0037】

実施例 3

救急の頭痛と斜頸を患う 19 歳の男性が対象となった。患者の評価は、救急病理学者の液の評価が「芽細胞」の存在を除外することが要求された脳脊髄液の試料を得ることを含む。評価は小リンパ球の比較的均一な集団を示し、ウイルス性髄膜炎の診断が示唆された。患者の担当医は悪性腫瘍の可能性を完全に排除するためにフローサイトメトリーを要求した。過剰の液体が利用できるので、小さい試料を、上の実施例 2 に記載したものと本質的に同じ手順を使用して抗 CD 20 被覆 10 ミクロンビーズと抗カッパ及び抗ラムダ被覆 5 ミクロンビーズで処理して二本の別個の試験管に入れた。細胞の大部分は抗 CD 20、抗カッパ又は抗ラムダビーズの何れにも結合せず、これは、リンパ球集団が主に T 細胞からなって

いることが示唆された。二日後に実施されたフローサイトメトリー解析により、ウイルス性髄膜炎に一致する多型性B細胞と正常なT細胞サブセットを持つおよそ60%のT細胞と40%のB細胞が確認された。

【0038】

本発明の主たる利点は、細胞集団の解析が、あらゆる医師又は技師によるガラススライドの単純な検査により今は実施することができることである。この種の解析は特異的細胞表面マーカーを持つ細胞集団の任意のタイプについて広範な症状（リンパ腫が一例）において使用することができる。後天性免疫不全症候群を患う患者の細胞集団で可能であるように、急性白血病を患う患者からの悪性クロンを同様に（異なったタイプのマーカーを使用して）分析することができる。最後に、固形腫瘍に対する腫瘍マーカーが利用できるようになるので、この種の解析はまた同様に実施することができる。例えば、新しいMN/C A 9抗体は形成異常及び悪性子宮頸扁平細胞により特異的に発現されるように思われる。これらの細胞は多量の正常な細胞中に懸濁されうるので、それらは常套的な免疫組織化学によってさえ同定することが難しい。この解析方法はこれらの細胞を同定すると同時にそれらがより簡単に分析できるようにそれらの細胞学的調製物を富ませる。

【0039】

本発明はまた本発明を実施するためのキットを提供する。キットは上に記載した一又は複数のビーズの集合を含む。各ビーズの集合は好ましくは密封試験管のような容器に入れられる。同時の単一パラメータ又は複数パラメータ解析において、二つ又はそれ以上のビーズの集合が予め混合されることがあるが、典型的にはそれらは分離した状態に維持される。キットはまた好ましくは上述したような一又は複数の適切なフィルター及び好ましくは指示書のセットを含む。

【0040】

ここに記載された方法は自動化でき凝縮させることができる。この種の解析の実施のための半自動化装置25の例は図4に示す。試料を調製して細胞懸濁物をつくる。ついで、試料をマシン25の試料ローダー26に充填し、マシン25を所望の種類の解析（リンパ腫スクリーン、急性白血病解析、脊髄形成異常等々）

に対してプログラムする。適切な数の反応チャンバー28（例えば2、4、6、8、10又は12）と、各反応チャンバーに連続して又は同時に添加される予めプログラムされた数のビーズ集合（例えば1、2、3、4等々のビーズ集合）に試料を分ける。ビーズを細胞懸濁物中でインキュベートし、細胞に結合させ、ついで全ての反応チャンバーを各反応チャンバーが濾過される濾過チャンバー30まで移送する。得られたフィルター又は濾過された物質を、それらの全てがガラススライド32のような単一のガラススライドまで同時に移送するように配する。得られたスライドは一連のウェルを含んでおり、各ウェルは反応チャンバー試料に対応している。複数ウェルのスライドは染色し、ついで顕微鏡で走査することができる。各ウェルは複数パラメータ解析に対応可能で、それは数分で実施される。図5はそのような手順を使用する示唆されたリンパ腫パネルスライドの概略図である。図5は6のウェルを示しており、それぞれが複数パラメータ解析に対して示されたような3ビーズの集合を実施した。上方の左手のコーナーには「CD20 / カッパ / ラムダ」がある。これは、マシンがここに先に記載したCD20 / カッパ / ラムダ解析を実施するウェル示している。他の5つのウェルは公知の同様な解析を実施するための抗体情報を提供する。場合によっては、第4又は第5のビーズの集合を更なるレベルの解析のために添加できる。好ましくは、単一パラメータ又は複数パラメータインキュベーションと濾過が実施された後に、得られた複合体（図3におけるようなもの）を免疫組織化学又はインサイツハイブリダイゼーションによって染色し、ついで評価する。被覆ガラススライドが、接着性を増加させるために好ましい。好ましくは、スライドを染色し、カバーガラスをし、常套的な光学顕微鏡で検査し結合性を評価する。ビーズに結合した細胞を好ましくは評価し、特徴付けし、細胞型を明らかにする。

【0041】

本発明では、固定液又は組織培地に懸濁させた細胞を抗体被覆ビーズによって表現型解析することができ、適切な孔径のフィルターの使用によって周囲環境から単離することができる。他の細胞の集団からこのようにして分離されたこれら結合細胞はガラススライドに移送され、可視化のための様々な染色で染色できる。また、免疫表現型解析が望まれない場合には、例えば、サイトスピン、細胞ブ

ロックのような様々な方法を使用して常套的な細胞学的調製物、又はThinPrepを調製することができる。

単一パラメータ解析はカップ及びラムダ担持Bリンパ球の相対数を計数するような、対象細胞の表現型を決定するために使用することができる。他の応用はMNC A9陽性頸部上皮細胞の単離である。

ある種の細胞表面マーカーは、対象の細胞を最初に単離し、ついで表面に結合したビーズの平均数を数えることにより、半定量化することができる。

【0042】

この開示は例示のためのものであり、この開示に含まれる教唆の公平な範囲から逸脱しない限り、詳細を付加、変更又は削除することにより様々な変更を加えることができることは明らかである。従って、本発明は、次の請求の範囲が必然的にそのように限定される範囲を除いては、この開示の特定の詳細には限定されない。

【図面の簡単な説明】

【図1】 ビーズに結合した又はビーズに被覆された抗体に結合した細胞を示す概略図である。

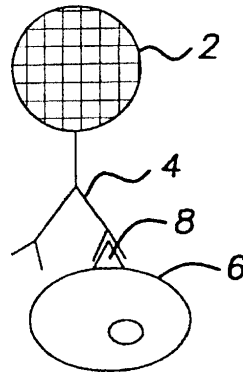
【図2】 ビーズに結合された多くの細胞を示す概略図である。

【図3】 中央のビーズに結合した多くの細胞、及び5つの細胞に結合した5つの小さなビーズを示す概略図である。

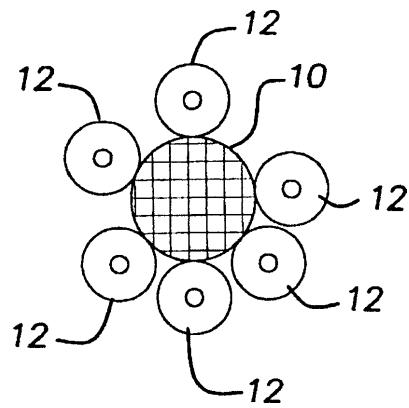
【図4】 本発明に係る表現型解析又は免疫表現型解析法を実施するための自動化装置の概略図である。

【図5】 図4の自動化装置での使用のための単一スライドの概略図である。

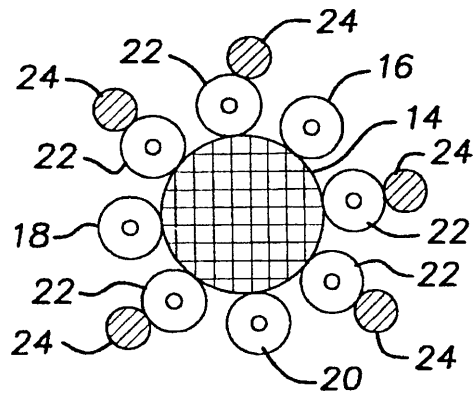
【図1】



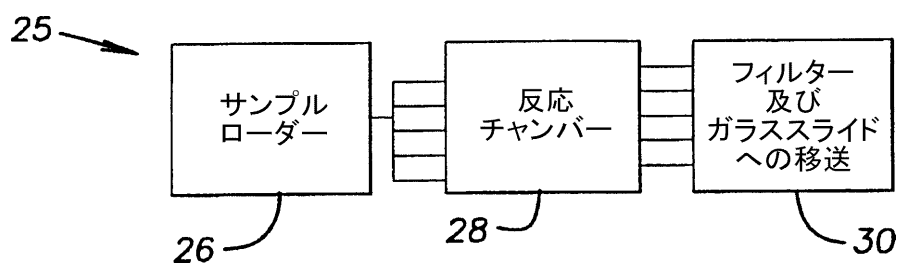
【図2】



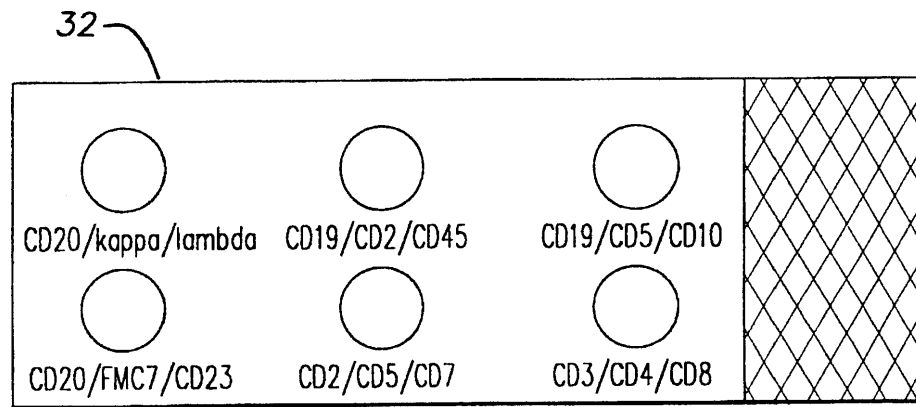
【図3】



【図4】



【図5】



【手続補正書】

【提出日】平成13年11月12日(2001.11.12)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 a) 液体媒質中に懸濁させた細胞の懸濁物を提供し、該細胞は第一の細胞を含み、
b) 上記懸濁物と一群の第一のビーズを接触させ、該第一のビーズの各々は結合物質で被覆されるか、磁性を有し、各第一のビーズが上記第一の細胞の少なくとも1つに結合するように適合化され、
c) 上記第一のビーズに上記第一の細胞を結合させるのに効果的な時間の間、上記懸濁物と共に上記第一のビーズをインキュベートして、第一ビーズ-第一細胞複合体を生成させ、各第一ビーズ-第一細胞複合体は第一のビーズと第一の細胞を含み、
d) 上記懸濁物から上記第一ビーズ-第一細胞複合体を濾過により分離し、
e) 上記分離した第一ビーズ-第一細胞複合体を検査し、上記第一の細胞を特徴付ける、
工程を含んでなる細胞を特徴付ける方法。

【請求項2】 a) 懸濁物と第一のビーズを接触させる前に、上記第一の細胞を透過化处理し、反応性生物マーカーが上記第一の細胞又は上記第一の細胞内に結合するように反応性生物マーカーに結合する常磁性マイクロスフィアと共に上記第一の細胞をインキュベートする工程を更に具備し、各第一のビーズが磁性を有している請求項1に記載の方法。

【請求項3】 細胞の上記懸濁物が第二の細胞を含み、該第二の細胞及び第一の細胞がオーバーラップしない群にあり、同時単一パラメータ解析を含む方法であって、

1) 上記濾過工程の前に、一群の第二のビーズを上記懸濁物に添加し、上記第二のビーズの各々が結合物質で被覆されるか磁性を有し、各第二のビーズが第二の細胞に結合するように適合化され、

2) 上記第二のビーズを上記第二の細胞に結合させるのに効果的な時間の間、上記懸濁物と共に上記第二のビーズをインキュベートして、第二ビーズ-第二細胞複合体を生成させ、

3) 上記懸濁物から上記第二ビーズ-第二細胞複合体と上記第一ビーズ-第一細胞複合体を濾過により同時に分離する、

工程を更に含んでなる請求項1又は2の何れかに記載の方法。

【請求項4】 細胞の上記懸濁物が上記第一の細胞のサブセットである第二の細胞を含み、複数パラメータ解析を含む方法であって、

1) 上記濾過工程の前に、一群の第二のビーズを、上記第一のビーズと第一の細胞を含む懸濁物に添加し、上記第二のビーズの各々が結合物質で被覆されるか磁性を有し、各第二のビーズが第二の細胞に結合するように適合化され、

2) 上記第二のビーズを上記第二の細胞に結合させるのに効果的な時間の間、上記懸濁物と共に上記第二のビーズをインキュベートして、第一ビーズ-第二細胞-第二ビーズ複合体を生成させ、各第一ビーズ-第二細胞-第二ビーズ複合体が第一のビーズ、第二の細胞及び第二のビーズを含み、

3) 上記懸濁物から上記第一ビーズ-第二細胞-第二ビーズ複合体を濾過により分離する、

工程を更に含んでなる請求項1又は2の何れかに記載の方法。

【請求項5】 第三の細胞が上記第一の細胞のサブセットであり、該第三の細胞が上記第二の細胞のサブセットであるか上記第二の細胞とは異なり、

1) (a) 上記第一のビーズ、上記第一の細胞、上記第二の細胞、及び上記第二のビーズを含む懸濁物又は (b) 上記第一のビーズと上記第一の細胞を含むが上記第二のビーズを含まない懸濁物に、一群の第三のビーズを添加し、上記第三のビーズの各々が結合物質で被覆されるか磁性を有し、各第三のビーズが第三の細胞に結合するように適合化され、

2) 上記第三のビーズを上記第三の細胞に結合させるのに効果的な時間の間、そ

れらが添加された懸濁物と共に上記第三のビーズをインキュベートして、第一ビーズ-第三細胞-第三ビーズ複合体を生成させ、各第一ビーズ-第三細胞-第三ビーズ複合体が第一のビーズ、第三の細胞及び第三のビーズを含み、

3) 上記第三のビーズが添加された上記懸濁物を濾過して、形成されたビーズ-細胞複合体を分離する、

工程を更に含んでなる請求項4に記載の方法。

【請求項6】 上記第一のビーズと上記第二のビーズがサイズ又は色で視覚的に識別可能である請求項3ないし5の何れかに記載の方法。

【請求項7】 上記濾過により分離されたビーズ-細胞複合体をガラススライドに移送する工程を更に具備する請求項1ないし6の何れかに記載の方法。

【請求項8】 a) 液体媒質中の細胞懸濁物を提供し、
b) 一群の被覆された第一のビーズを上記懸濁物に添加し、上記第一のビーズの各々が、各第一のビーズが予め選択されたタイプの細胞に結合するように結合物質で被覆され、
c) 上記第一のビーズが上記予め選択されたタイプの細胞に結合するのに効果的な時間の間、上記懸濁物と共に一群の上記第一のビーズをインキュベートして、ビーズ-細胞複合体を生成し、
d) 上記懸濁物を濾過して、形成した任意のビーズ-細胞複合体をフィルターに捕捉し、
e) 上記懸濁物と共に細胞を特徴付けるために濾過工程の結果物を検査する、
工程を具備する細胞を特徴付ける方法。

【請求項9】 実質的に同一の第一のビーズの少なくとも一つの群を具備するキットであって、上記第一のビーズの各々が、各第一のビーズが第一の細胞に結合するように結合物質で被覆されるか磁性を有し、第一の細胞を含む懸濁物に対する単一パラメータ又は複数パラメータ解析を実施するために上記第一のビーズを如何に使用するかについて技師に指示を与えるのに効果的な指示一式であって、フィルターによる濾過により上記懸濁物から第1ビーズ-第1細胞複合体を分離する工程を含む指示を更に含んでなるキット。

【請求項10】 細胞の懸濁物に対して単一パラメータ又は複数パラメータ

解析を実施する装置において、試料ローダーと複数の反応チャンバーと濾過チャンバーを具備する装置。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/12127
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : Please See Extra Sheet. US CL : Please See Extra Sheet. According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : Please See Extra Sheet. 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 practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 4,659,678 A (FORREST et al.) 21.04.1987, 21 April 1987, see entire document.	1-4,23-28
Y	US 5,374,531 A (JENSEN et al.) 20.12.1994, 20 December 1994, see entire document.	1-22
Y	US 5095097 A (HERMENTIN et al.) 10.03.1992, 10 March 1992, see entire document.	1-22
Y,P	US 5,948,627 A (LEE et al.) 07.09.1999, 07 September 1999, see entire document.	1, 5-28
Y,P	US 5,981,180 A (CHANDLER et al.) 09.11.1999, 09 November 1999, see entire document.	1, 5-28
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents	*T* Inter 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	
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	*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	
E earlier document published on or after the international filing date	*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	
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)	*A* document member of the same patent family	
O document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
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 29 JULY 2000	Date of mailing of the international search report 30 AUG 2000	
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <i>Gailene R. Gabel</i> GAILENE R. GABEL Telephone No. (703) 308-0196	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US99/12127

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 016 552 A1 (WIDDER et al.) 01.10.80, 01 October 1980, see entire document.	1-22, 23-28

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US00/12127

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
IPC (7):

G01N 33/48, 33/53, 33/543, 33/546, 33/553, 33/563, 577; C12N 1/02; C12Q 1/68; C07K 37/02, 15/28

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:
US CL :

436/512, 513, 518, 523, 531, 536, 548; 435/6, 7.1, 7.2, 7.7, 7.24, 7.32, 7.71, 7.72, 7.91, 7.92, 973, 975; 530/391.5, 404, 405, 408, 409

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched
Classification System: U.S.

436/512, 513, 518, 523, 531, 536, 548; 435/6, 7.1, 7.2, 7.7, 7.24, 7.32, 7.71, 7.72, 7.91, 7.92, 973, 975; 530/391.5, 404, 405, 408, 409

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト [*] (参考)
G 0 1 N 33/543	5 9 7	G 0 1 N 33/543	5 9 7
33/546		33/546	
33/553		33/553	
(81)指定国 E P (A T , B E , C H , C Y , D E , D K , E S , F I , F R , G B , G R , I E , I T , L U , M C , N L , P T , S E) , O A (B F , B J , C F , C G , C I , C M , G A , G N , G W , M L , M R , N E , S N , T D , T G) , A P (G H , G M , K E , L S , M W , S D , S L , S Z , T Z , U G , Z W) , E A (A M , A Z , B Y , K G , K Z , M D , R U , T J , T M) , A E , A L , A M , A T , A U , A Z , B A , B B , B G , B R , B Y , C A , C H , C N , C R , C U , C Z , D E , D K , D M , E E , E S , F I , G B , G D , G E , G H , G M , H R , H U , I D , I L , I N , I S , J P , K E , K G , K P , K R , K Z , L C , L K , L R , L S , L T , L U , L V , M A , M D , M G , M K , M N , M W , M X , N O , N Z , P L , P T , R O , R U , S D , S E , S G , S I , S K , S L , T J , T M , T R , T T , T Z , U A , U G , U Z , V N , Y U , Z A , Z W			

专利名称(译)	用于细胞单参数和多参数表型分析的产品和方法		
公开(公告)号	JP2002543426A	公开(公告)日	2002-12-17
申请号	JP2000615809	申请日	2000-05-03
[标]申请(专利权)人(译)	潘科夫斯滑雪丹儿		
申请(专利权)人(译)	潘考夫斯滑雪，丹，呃.		
[标]发明人	パンコフスキーダンエー		
发明人	パンコフスキー,ダン,エー.		
IPC分类号	G01N33/53 C12M1/34 C12Q1/02 G01N33/543 G01N33/546 G01N33/553 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56966		
FI分类号	G01N33/53.Y G01N33/53.K C12M1/34.B C12Q1/02 G01N33/543.501.F G01N33/543.597 G01N33/546 G01N33/553		
F-TERM分类号	4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/CC04 4B029/CC13 4B029/FA03 4B029/FA04 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QQ02 4B063/QR48 4B063/QR82 4B063/QS12 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX01		
优先权	60/132395 1999-05-04 US		
其他公开文献	JP4590109B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

提供了用于细胞的单参数和多参数表征的方法，特别是细胞的免疫表型。该方法优选地使用适于结合至特定类型的细胞的抗体包被的微球。将一个或多个包被的微球的组件同时或顺序地添加到细胞悬液中，并结合到它们适于结合的细胞上。细胞可以结合一个或多个微球。优选对复合物进行染色，然后检查以表征细胞，优选与微球结合的细胞。还提供了用于执行该方法的套件和设备。

