

(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2011-530077

(P2011-530077A)

(43) 公表日 平成23年12月15日(2011.12.15)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53	K
GO 1 N 33/553 (2006.01)	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/553	
	GO 1 N 33/543	5 O 1 A

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2011-521563 (P2011-521563)	(71) 出願人	511030909
(86) (22) 出願日	平成21年8月4日(2009.8.4)		シンメッド リサーチ ゲーエムベーハー
(85) 翻訳文提出日	平成23年4月1日(2011.4.1)		オーストリア アー-1110 ウィーン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2009/060106		、シンメリンガー ハウプトシュトラッセ
(87) 国際公開番号	W02010/015633		24
(87) 国際公開日	平成22年2月11日(2010.2.11)	(74) 代理人	110000729
(31) 優先権主張番号	102008036185.2		特許業務法人 ユニラス国際特許事務所
(32) 優先日	平成20年8月4日(2008.8.4)	(72) 発明者	ブローゼック、ヴォルフガング
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		オーストリア アー-1140 ウィーン
			、ハディクガッセ 170/2/5

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 組織から循環系に再循環させられる血中マクロファージによって組織から細胞内に吸収される分子マーカーを特徴づける、具体的には定量化する、ための方法

(57) 【要約】

【課題】 組織から循環系に再循環させられる血中マクロファージによって組織から細胞内に吸収される分子マーカーを特徴づける、特に定量化するための方法を提供する。

【解決手段】 本発明は、組織から循環系に再循環させられる血中マクロファージによって組織から細胞内に吸収される分子マーカーを特徴づける、特に定量化するための方法であって、下記の工程：全血の凝固および/または凝集を阻害する薬剤の全血への適用；全血からの血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の選択および/または濃縮および/または分離；選択された血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の穿孔および/または溶解、必要な場合には、事前に行われるそれらの透過性化の後で行う；血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の事前に行われた穿孔および/または溶解の後、非血中マクロファージマーカー、すなわち、組織から生じる分子マーカーの定性的および定量的な測定、が行われる方法、および本方法を行うための装置に関連する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

組織から循環系に再循環させられる血中マクロファージによって組織から細胞内に吸収される分子マーカーを特徴づける、特に定量化するための方法であって、下記の工程：

- ・全血の凝固および/または凝集を阻害する薬剤を全血に適用する工程；
 - ・全血からの血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の選択および/または濃縮および/または分離を行う工程；
 - ・選択された血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の穿孔および/または溶解を、必要な場合には、事前に行われる必要に応じた選択された血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の透過性化の後で行う工程；
 - ・貪食された非血中マクロファージマーカー、すなわち、組織から生じる分子マーカーに由来する貪食された非血中マクロファージマーカーの定性的および定量的な測定を、血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の事前に行われた穿孔および/または溶解の後で行う工程
- によって特徴づけられる方法。

10

【請求項 2】

前記血中マクロファージの前記選択および/または濃縮および/または分離が、表面マーカー CD 16 に対する抗体を使用する正の選択によって行われることにおいて特徴づけられる、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

好ましくは、表面マーカー CD 16 に対する抗体を使用する前記正の選択の後で、または、場合によってはその前に、表面マーカー CD 14 に対する抗体を使用する正の選択が行われることにおいて特徴づけられる、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

表面マーカー CD 5 6 および/または表面マーカー CD 5 7 および/または表面マーカー CD 16 1 を有する細胞を除くための負の選択が、CD 5 6 および/または表面マーカー CD 5 7 および/または表面マーカー CD 16 1 に対する抗体を使用して行われることにおいて特徴づけられる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 5】

正の選択または負の選択が、好ましくは可逆的に結合され得る磁気ビーズを使用して行われることにおいて特徴づけられる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 6】

正の選択または負の選択が、ELISA プレートに結合される抗体を使用して行われることにおいて特徴づけられる、前記請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 7】

単核白血球集団の定量的測定が ELISA プレートで行われ、好ましくは、ELISA プレートのリーダーによる乳酸デヒドロゲナーゼ活性の測定によって行われ、特に好ましくは、分子マーカー、特に、非血中マクロファージ抗原の定性的および定量的な測定が行われる同じ ELISA プレートで行われることにおいて特徴づけられる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 8】

組織から生じる貪食された非血中マクロファージ分子マーカーの現在量の定量的測定の実施が ELISA プレートのリーダーおよび/または化学発光測定デバイスによって行われることにおいて特徴づけられる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 9】

前記分子マーカーとして、特に、組織マーカーおよび/または血清学的マーカーとして、

- ・異常な DNA メチル化；
- ・AFP (α - 1 - フェトプロテイン) ；
- ・AHCY (S - アデノシルホモシステインヒドロラーゼ) ；

50

- ・ A M Y 2 (膵臓アミラーゼ) ;
 - ・ C A 1 5 - 3 (異名 : M U C 1 、 E M A 、 C D 2 2 7) ;
 - ・ C A 1 9 - 9 ;
 - ・ C A 5 0 ;
 - ・ C A 7 2 - 4 (異名 : T A G 7 2) ;
 - ・ C A 1 2 5 (異名 : M U C 1 6) ;
 - ・カルシトニン ;
 - ・カルプロテクチン ;
 - ・ C C S A - 2 (結腸ガン特異的抗原 - 2) ;
 - ・ C C S P - 2 (結腸ガン分泌タンパク質 - 2) ;
 - ・ C E A (ガン胎児性抗原) ;
 - ・ C Y P 2 4 A 1 ;
 - ・サイトケラチン (C K) 8 およびそのフラグメント ;
 - ・ C K 1 8 およびそのフラグメント ;
 - ・ C K 1 9 およびそのフラグメント ;
 - ・ C R P (C 反応性タンパク質) ;
 - ・シスタチン B ;
 - ・ D D H (ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ) ;
 - ・ D K K - 1 (D i k k o p f - 1) ;
 - ・ G P 7 3 (ゴルジタンパク質 - 7 3) (異名 : G O L P H 2) ;
 - ・ H E 4 (ヒト精巣上体タンパク質 4) ;
 - ・ H E R 2 / n e u ;
 - ・ H S P (熱ショックタンパク質) - 2 7 ;
 - ・ M a c - 2 B P (M a c - 2 結合タンパク質) ;
 - ・マンマグロビン A ;
 - ・マンマグロビン B ;
 - ・ M I A (メラノーマ阻害活性) ;
 - ・ M n S O D (マンガンスーパーオキシドディスムターゼ) ;
 - ・ P A R K 7 (異名 : D J - 1) ;
 - ・ P r o G R P (プロガストリン放出ペプチド) ;
 - ・ N S E (ニューロン特異的エノラーゼ) ;
 - ・汎サイトケラチン ;
 - ・ P r o - M M P (プロマトリックスメタロプロテイナーゼ) - 7 ;
 - ・ P S A (前立腺特異的抗原) ;
 - ・ S 1 0 0 A 8 ;
 - ・ S 1 0 0 A 9 ;
 - ・ S - 1 0 0 ;
 - ・ S C C A 1 (扁平上皮ガン抗原 1) ;
 - ・ S C C A 2 (扁平上皮ガン抗原 2) ;
 - ・チログロブリン ;
 - ・ U H R F 1 (P H D ドメインおよびリングフィンガードメインを有する / 含有するユビキチン様 1) ;
 - ・ U R G 4 (アップレギュレーションされた遺伝子 4) ; および
 - ・ Y K L - 4 0 (異名 : C H I 3 - L 1)
- が使用され、また、同様に組合せでも使用されることにおいて特徴づけられる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 0】

ヘパリンまたは別の好適な抗凝固剤が、凝固および / または凝集に対する薬剤として使用されることにおいて特徴づけられる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 1】

10

20

30

40

50

前記マクロファージまたは前記マクロファージ含有白血球集団の前記穿孔または溶解がサポニン処理またはトリトン溶液による処理によって行われることにおいて特徴づけられる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 2】

非血中マクロファージ抗原を測定するために、ビオチン、HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）、AP（アルカリホスファターゼ）または発光性色素と必要な場合にはコンジュゲート化される抗体、特に、免疫グロブリンクラス（IgG）の抗体、および、FabフラグメントもしくはF(ab)₂フラグメント、および/または、アブタマーが、特に下記の抗体：

- ・抗マウスIgG（ポリクローナル）； 10
- ・抗ウサギIgG（ポリクローナル）；
- ・抗ヤギIgG（ポリクローナル）；
- ・抗ラットIgG（ポリクローナル）；
- ・抗口バIgG（ポリクローナル）；
- ・抗AFP（クローンAFP-01）；
- ・抗AFP（クローンAFP-11）；
- ・抗AFP（クローン4A3）；
- ・抗AFP（クローン5H7）；
- ・抗AFP（クローンM803209）；
- ・抗AFP（クローンM0151611）； 20
- ・抗AFP（クローンM0151608）；
- ・抗AFP（ポリクローナル）；
- ・抗AHCY（クローン1E11-1A7）；
- ・抗AHCY（クローン2F11-1D10）；
- ・抗AHCY（クローン4H2）；
- ・抗AHCY（クローンM1）；
- ・抗AHCY（クローンM2）；
- ・抗AHCY（ポリクローナル）；
- ・抗AMY2（クローン6A9/1）；
- ・抗AMY2（クローン501）； 30
- ・抗AMY2（クローン503）；
- ・抗AMY2（クローン10-102.5）；
- ・抗AMY2（ポリクローナル）；
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンM2C5）；
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンM9E7）；
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンM4H2）；
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンM8C9）；
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンM10G4）；
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンM10H6）；
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンM3A106）； 40
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンC595（NCRC48））；
- ・抗CA15-3/MUC1（クローンE29）；
- ・抗CA15-3/MUC1（ポリクローナル）；
- ・抗CA19-9（クローン121SLE）；
- ・抗CA19-9（ポリクローナル）；
- ・抗CA50（クローンM991149）；
- ・抗CA50（クローン93）；
- ・抗CA50（ポリクローナル）；
- ・抗CA72-4/TAG72（クローンSPM148）；
- ・抗CA72-4/TAG72（ポリクローナル）； 50

- ・抗 C A 1 2 5 / M U C 1 6 (クロ ー ン 2 F 1) ;
- ・抗 C A 1 2 5 / M U C 1 6 (クロ ー ン 1 0 G 1 2) ;
- ・抗 C A 1 2 5 / M U C 1 6 (クロ ー ン X 7 5) ;
- ・抗 C A 1 2 5 / M U C 1 6 (クロ ー ン X 3 2 5) ;
- ・抗 C A 1 2 5 / M U C 1 6 (ポリクローナル) ;
- ・抗カルシトニン (クロ ー ン S P 1 7) ;
- ・抗カルシトニン (クロ ー ン 1 3 B 9) ;
- ・抗カルシトニン (クロ ー ン 1 3 f 2) ;
- ・抗カルシトニン (クロ ー ン 2 4 B 2) ;
- ・抗カルシトニン (ポリクローナル) ;
- ・抗カルプロテクチン (クロ ー ン 2 7 E 1 0) ;
- ・抗カルプロテクチン (ポリクローナル) ;
- ・抗 C C S A - 2 (ポリクローナル) ;
- ・抗 C C S P - 2 (ポリクローナル) ;
- ・抗 C E A (クロ ー ン C o l - 1) ;
- ・抗 C E A (クロ ー ン 1 C 7) ;
- ・抗 C E A (クロ ー ン 1 C 1 0) ;
- ・抗 C E A (クロ ー ン 1 C 1 1) ;
- ・抗 C E A (ポリクローナル) ;
- ・抗 C Y P 2 4 A 1 (クロ ー ン 1 E 1) ;
- ・抗 C Y P 2 4 A 1 (クロ ー ン 1 F 8) ;
- ・抗 C Y P 2 4 A 1 (ポリクローナル) ;
- ・抗 C K 8 (クロ ー ン 2 4) ;
- ・抗 C K 8 (クロ ー ン L P 3 K) ;
- ・抗 C K 8 (ポリクローナル) ;
- ・抗 C K 1 8 (クロ ー ン D C - 1 0) ;
- ・抗 C K 1 8 (クロ ー ン D A - 7) ;
- ・抗 C K 1 8 (クロ ー ン L D K 1 8) ;
- ・抗 C K 1 8 (ポリクローナル) ;
- ・抗 C K 1 9 (クロ ー ン A 5 3 - B / A 2) ;
- ・抗 C K 1 9 (クロ ー ン B A 1 7) ;
- ・抗 C K 1 9 (クロ ー ン 2 3 6 - 1 1 2 2 1) ;
- ・抗 C K 1 9 (ポリクローナル) ;
- ・抗 C R P (クロ ー ン 2 3 2 0 0 7) ;
- ・抗 C R P (クロ ー ン 2 3 2 0 2 4) ;
- ・抗 C R P (クロ ー ン C 2) ;
- ・抗 C R P (クロ ー ン C 4) ;
- ・抗 C R P (クロ ー ン C 5) ;
- ・抗 C R P (クロ ー ン C 6) ;
- ・抗 C R P (クロ ー ン C 7) ;
- ・抗 C R P (ポリクローナル) ;
- ・抗シスタチン B (クロ ー ン 2 F 1) ;
- ・抗シスタチン B (クロ ー ン 8 k 2 7 5) ;
- ・抗シスタチン B (クロ ー ン B - 0 2) ;
- ・抗シスタチン B (クロ ー ン R J M W - 2 E 7) ;
- ・抗シスタチン B (ポリクローナル) ;
- ・抗 D D H (クロ ー ン T 1 0 1) ;
- ・抗 D D H (ポリクローナル) ;
- ・抗 D K K - 1 (クロ ー ン 1 4 1 1 3 5) ;
- ・抗 D K K - 1 (ポリクローナル) ;

10

20

30

40

50

- ・抗 G P 7 3 / G O L P H 2 (クロ ー ン Y A - 1 4) ;
- ・抗 G P 7 3 / G O L P H 2 (クロ ー ン 5 B 1 0) ;
- ・抗 G P 7 3 / G O L P H 2 (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 H E 4 (クロ ー ン C - 1 2) ;
- ・抗 H E 4 (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 H E R 2 / n e u (クロ ー ン 1 0 C 7) ;
- ・抗 H E R 2 / n e u (クロ ー ン 1 9 1 9 2 4) ;
- ・抗 H E R 2 / n e u (クロ ー ン N 3 / D 1 0) ;
- ・抗 H E R 2 / n e u (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 H S P - 2 7 (クロ ー ン G 3 . 1) ;
- ・抗 H S P - 2 7 (クロ ー ン A F 5 E 5) ;
- ・抗 H S P - 2 7 (クロ ー ン F - 4) ;
- ・抗 H S P - 2 7 (クロ ー ン 2 A 5) ;
- ・抗 H S P - 2 7 (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 M a c - 2 B P (クロ ー ン S P - 2) ;
- ・抗 M a c - 2 B P (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 マン マグロ ビン A (クロ ー ン 1 G 8 D 6 、 異 名 : 2 E 7 G 9) ;
- ・抗 マン マグロ ビン A (クロ ー ン 3 0 4 - 1 A 5) ;
- ・抗 マン マグロ ビン A (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 マン マグロ ビン B (クロ ー ン E - 1 7) ;
- ・抗 マン マグロ ビン B (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 M I A (クロ ー ン 3 A 6) ;
- ・抗 M I A (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 M M P - 7 (クロ ー ン 6 A 4) ;
- ・抗 M M P - 7 (クロ ー ン 1 7 6 - 5 F 1 2) ;
- ・抗 M M P - 7 (クロ ー ン 1 4 1 - 7 B 2) ;
- ・抗 M M P - 7 (クロ ー ン 3 7 7 3 1 3) ;
- ・抗 M M P - 7 (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 M n S O D (クロ ー ン 1 A E) ;
- ・抗 M n S O D (クロ ー ン 2 A 1) ;
- ・抗 M n S O D (クロ ー ン 4 F 1 0) ;
- ・抗 M n S O D (クロ ー ン 2 3 G 5) ;
- ・抗 M n S O D (クロ ー ン 3 7 C T 1 2 7 . 5 . 1 1 . 6) ;
- ・抗 M n S O D (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 P A R K 7 / D J - 1 (クロ ー ン 1 B 1 1) ;
- ・抗 P A R K 7 / D J - 1 (クロ ー ン 1 D 7) ;
- ・抗 P A R K 7 / D J - 1 (クロ ー ン 6 A 6 5) ;
- ・抗 P A R K 7 / D J - 1 (クロ ー ン 3 0 5 5) ;
- ・抗 P A R K 7 / D J - 1 (クロ ー ン A - 9) ;
- ・抗 P A R K 7 / D J - 1 (クロ ー ン D - 4) ;
- ・抗 P A R K 7 / D J - 1 (クロ ー ン E 2) ;
- ・抗 P A R K 7 / D J - 1 (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 p r o G R P (クロ ー ン p G R P 5) ;
- ・抗 p r o G R P (クロ ー ン E 1 4 6) ;
- ・抗 p r o G R P (クロ ー ン E 1 7 2) ;
- ・抗 G R P (クロ ー ン 7 6 - E 6) ;
- ・抗 p r o G R P (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 G R P (ポリ クロ ー ナル) ;
- ・抗 N S E (クロ ー ン 1 C 1) ;
- ・抗 N S E (クロ ー ン 5 A 4) ;

10

20

30

40

50

- ・抗NSE (クローン5E2) ;
- ・抗NSE (クローン5G10) ;
- ・抗NSE (ポリクローナル) ;
- ・抗汎サイトケラチン (クローン7H8C4) ;
- ・抗汎サイトケラチン (クローンB311.1) ;
- ・抗汎サイトケラチン (クローンC11) ;
- ・抗汎サイトケラチン (クローンD-12) ;
- ・抗汎サイトケラチン (ポリクローナル) ;
- ・抗PSA (クローンER-PR8) ;
- ・抗PSA (クローン181823) ;
- ・抗PSA (ポリクローナル) ;
- ・抗S100A8 (クローン1B3) ;
- ・抗S100A8 (クローン2C5/4) ;
- ・抗S100A8 (クローン2H2) ;
- ・抗S100A8 (クローン2Q396A) ;
- ・抗S100A8 (クローン6A614) ;
- ・抗S100A8 (クローン8L627) ;
- ・抗S100A8 (クローン8-5C2) ;
- ・抗S100A8 (クローンCF-145) ;
- ・抗S100A8 (クローンMRP8 7C12/4) ;
- ・抗S100A8 (クローンS13.67) ;
- ・抗S100A8 (ポリクローナル) ;
- ・抗S100A9 (クローン1C10) ;
- ・抗S100A9 (クローン2Q396B) ;
- ・抗S100A9 (クローン4G9) ;
- ・抗S100A9 (クローンNO.19) ;
- ・抗S100A9 (クローンNO.134) ;
- ・抗S100A9 (クローンS32.2) ;
- ・抗S100A9 (クローンS36.48) ;
- ・抗S100A9 (ポリクローナル) ;
- ・抗S-100 (クローンSB6) ;
- ・抗S-100 (クローンSH-B1) ;
- ・抗S-100 (クローンSH-B4) ;
- ・抗S-100 (ポリクローナル) ;
- ・抗SCCA1 (クローン8H11) ;
- ・抗SCCA1 (ポリクローナル) ;
- ・抗SCCA2 (クローン10C12) ;
- ・抗SCCA2 (ポリクローナル) ;
- ・抗SCCA1/2 (クローンB-9) ;
- ・抗SCCA1/2 (ポリクローナル) ;
- ・抗チログロブリン (クローン5E6) ;
- ・抗チログロブリン (クローン5F9) ;
- ・抗チログロブリン (クローン5G4) ;
- ・抗チログロブリン (クローン11A16) ;
- ・抗チログロブリン (クローンPB2) ;
- ・抗チログロブリン (クローンPB3) ;
- ・抗チログロブリン (ポリクローナル) ;
- ・抗UHRF1 (クローン1RC1C-10) ;
- ・抗UHRF1 (クローン3A11) ;
- ・抗UHRF1 (ポリクローナル) ;

10

20

30

40

50

- ・抗 U R G 4 (ポリクローナル) ;
- ・抗 Y K L - 4 0 / C H I 3 - L 1 (クローン 2 0 1 1) ;
- ・抗 Y K L - 4 0 / C H I 3 - L 1 (クローン 3 2 1 8 0 6) ;
- ・抗 Y K L - 4 0 / C H I 3 - L 1 (ポリクローナル)

から選択されることにおいて特徴づけられる、前記請求項のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

血液の単核白血球、特に、血中マクロファージを単離および特徴づけるためのアセンブリーであって、下記のデバイス：

- ・全血の凝固および/または凝集を阻害する薬剤を加えるためのデバイス；
 - ・全血からの単核白血球、特に、血中マクロファージの予備選択および濃縮を密度勾配遠心分離によって行うためのデバイス；
 - ・ C D 1 4 ⁺ 細胞の選択および濃縮を、磁気ビーズまたは E l i s a プレートに必要な場合には可逆的に結合される、 C D 1 4 に対する抗体によって行うためのデバイス；
 - ・ C D 1 6 ⁺ 細胞の選択および濃縮を、磁気ビーズまたは E l i s a プレートに必要な場合には可逆的に結合される、 C D 1 6 に対する抗体によって行うためのデバイス；
 - ・単核白血球集団、特に、血中マクロファージの穿孔および/または溶解をサポニン溶液またはトリトン溶液によって行うためのデバイス；
 - ・単核白血球集団、特に、血中マクロファージの定量的測定を、 L D H (乳酸デヒドロゲナーゼ) の活性を、 E l i s a プレートで、すなわち、分子マーカーの定性的および定量的な測定が行われる同じ E l i s a プレートで求めるためのアッセイを使用して行うためのデバイス；
 - ・血液の単核白血球、特に、マクロファージの事前に行われる穿孔または溶解の後における、血中マクロファージによって貪食された分子内分子マーカーの定性的および定量的な測定を E l i s a プレートリーダーおよび/または化学発光測定デバイスによって行うためのデバイス
- を含むアセンブリー。

【請求項 1 4】

細胞表面マーカー C D 5 6 または細胞表面マーカー C D 5 7 または細胞表面マーカー C D 1 6 1 を有する N K 細胞 (ナチュラルキラー細胞) を、磁気ビーズに結合される、 C D 5 6 または C D 5 7 または C D 1 6 1 に対する抗体を使用して単核白血球、特に、 C D 1 6 ⁺ 白血球の集団から除くためのデバイス

によって特徴づけられる、請求項 1 3 に記載のアセンブリー。

【請求項 1 5】

細胞溶解前に細胞内で貪食された分子マーカーに対する抗体を細胞内で結合させるために、好ましくは血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の選択および/または濃縮および/または分離の前に、場合によってはその後に、単核白血球を溶解前に固定処理および透過性化するためのデバイスによって特徴づけられる、前記請求項 1 3 または 1 4 のいずれか一項に記載のアセンブリー。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、請求項 1 の前文に従う、血液の単核白血球 (特に、血中マクロファージ) の貪食された細胞内分子マーカーを特徴づける (具体的に定量化する) ための方法、ならびに、請求項 1 3 の前文に従う、本方法を行うための分析アセンブリーに関連する。

【背景技術】

【0002】

全血において、 C D 1 4 および C D 1 6 (F c R I I I) の両方のタンパク質をその表面に発現する細胞が検出可能である。 C D 1 4 は細胞表面タンパク質であり、このタンパク質は典型的には単球およびマクロファージによって発現される。細胞表面タンパク質

10

20

30

40

50

CD16は、IgG抗体の定常(Fc)領域が細胞に結合することを可能にしており、CD16は、2つのイソ型で、すなわち、NK細胞、マクロファージおよびいわゆる活性化単球の表面におけるCD16a(FcRIIA)として、また、好中性顆粒球におけるCD16b(FcRIIB)として存在する。

【0003】

古典的学説によれば、組織におけるマクロファージ、および、血液のいわゆる「活性化単球」のみが、それぞれCD14およびCD16の両方を発現する。以前の学説では、血液のCD14/CD16陽性(CD14⁺CD16⁺)細胞が「活性化単球」と単に見なされたが、この「活性化単球」は、例えば、炎症、感染または腫瘍の場所において、組織の中に(未だ)遊走していない(Ziegler-Heitbrock, L., 2007、CD14⁺CD16⁺血中単球：感染および炎症におけるその役割、J. Leukocyte Biol. 81, 584~592)。

10

【0004】

しかしながら、近年の様々な知見により、活性化単球が、循環系において組織から再循環させられるマクロファージであって、例えば、炎症場所または腫瘍場所に起源を有するものであるが、組織の一部(例えば、上皮タンパク質)をその細胞内食胞に含むマクロファージであることが示唆される(Herwig, R., Horninger, W., Rehder, P. 他、2005、PSA陽性の循環マクロファージの前立腺ガン検出能、Prostate, 62, 290~298; Leers, M. P. G., Nap, M., Herwig, R. 他、2008、前立腺ガンを検出するための可能な標的としての循環しているPSA含有マクロファージ：末梢血サンプルに対する3色/5パラメーターのフローサイトメトリー研究、Am. J. Clin. Pathol., 129, 649~656)。

20

【0005】

生来的なCD14陽性かつCD16陰性(CD14⁺CD16⁻)単球集団とは対照的に、これらの細胞は、組織の十分に分化したマクロファージの形態学的特徴を有しており、それらによって封入される(貪食された)分子が単球において見出されない(Leers, M. P. G., Nap, M., Herwig, R. 他、2008、前立腺ガンを検出するための可能な標的としての循環しているPSA含有マクロファージ：末梢血サンプルに対する3色/5パラメーターのフローサイトメトリー研究、Am. J. Clin. Pathol., 129, 649~656)。

30

【0006】

系統的には、血液のCD14⁺CD16⁺細胞を分析的に検出し単離し、濃縮するために、例えば、CD16⁺細胞を、CD14⁺細胞のすべてからなる部分集団として見なし、かつ、CD14⁺細胞を、CD16⁺細胞のすべてからなるサブセットとして見なすことが考えられ得る。

【0007】

その上、活性化単球および血中マクロファージはそれぞれ、CD14の部分的に弱い発現を有すること(Ziegler-Heitbrock, L., 2007、CD14⁺CD16⁺血中単球：感染および炎症におけるその役割、J. Leukocyte Biol., 81, 584~592)、または、CD14の完全な喪失を受けること(BazilおよびStrominger, 1991、刺激されたヒト単球におけるCD14の下方調節機構の解明、J. Immunol., 147, 1567~1574)が知られている。

40

【0008】

例えば、マーカータンパク質PSA(前立腺特異的抗原)をその食胞において細胞内に含有する血中マクロファージのフローサイトメトリーによる検出(この場合、このマーカーは以降、imPSA(細胞内マクロファージPSA)として示される)は、前立腺疾患の病期を極めて特異的かつ高感度な様式で明らかにすることができ、その点で、血液の血清におけるPSAの古典的検出よりも優れている(Herwig, R., Mittere

50

gger, D., Djavan, B. 他、2008、細胞内マクロファージ前立腺特異的抗原 (PSA) による前立腺ガンの検出：従来の血清総 PSA よりも特異的かつ高感度なマーカー、Eur. J. Clin. Invest., 38, 430~437)。

【0009】

フローサイトメトリーによる細胞の特徴づけの基礎は、検出対象の標的分子(「抗原」)に蛍光色素標識された抗体により標識を付けることである。分析のために、懸濁されている細胞が、流体力学的集束によって、好適な波長の集束レーザービームを通過させられる。それにより、蛍光色素が励起されて、エネルギーを光子の形で放射し、この光子が検出器によって記録される。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0010】

【非特許文献1】Ziegler-Heitbrock, L., 2007、CD14 + CD16 + 血中単球：感染および炎症におけるその役割、J. Leukocyte Biol. 81, 584~592

【非特許文献2】Herwig, R., Horninger, W., Rehder, P. 他、2005、PSA陽性の循環マクロファージの前立腺ガン検出能、Prostate, 62, 290~298

【非特許文献3】Leers, M. P. G., Nap, M., Herwig, R. 他、2008、前立腺ガンを検出するための可能な標的としての循環しているPSA含有マクロファージ：末梢血サンプルに対する3色/5パラメーターのフローサイトメトリー研究、Am. J. Clin. Pathol., 129, 649~656

【非特許文献4】BazilおよびStrominger, 1991、刺激されたヒト単球におけるCD14の下方調節機構の解明、J. Immunol., 147, 1567~1574

【非特許文献5】Herwig, R., Mitteregger, D., Djavan, B. 他、2008、細胞内マクロファージ前立腺特異的抗原 (PSA) による前立腺ガンの検出：従来の血清総 PSA よりも特異的かつ高感度なマーカー、Eur. J. Clin. Invest., 38, 430~437

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0011】

しかしながら、この方法の欠点が、結合した抗体の量を定量化することができないことにあり、従って、検出された抗原の量に関する情報がないことにある。さらなる欠点が、フローサイトメーターの運用により生じる装置経費および財政的経費が少なくないことである。

【0012】

本発明の目的は、組織に由来するその貪食された分子マーカーなどの血液、特に血中マクロファージの特徴づけを、特に細胞数あたりの質量単位で表すことによって定量化できることにより、改善、単純化された安価な方法のほか、分析アセンブリーを具体的に述べることにある。

【課題を解決するための手段】

【0013】

本発明によれば、この目的が、請求項1による方法によって、同様にまた、請求項13による装置によって解決される。

【0014】

具体的には、その目的は、組織から循環系に再循環させられる血中マクロファージによって組織から細胞内に吸収される分子マーカーを特徴づける(具体的には定量化する)ための方法であって、下記の工程：

・全血の凝固および/または凝集を阻害する薬剤を全血に適用する工程；

10

20

30

40

50

・全血からの血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の選択および/または濃縮および/または分離を行う工程；
・選択された血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の透過性化および/または穿孔および/または溶解を行う工程；
・非血中マクロファージマーカー、すなわち、組織から生じる分子マーカーに由来する非血中マクロファージマーカーの定性的および定量的な測定を、血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の事前に行われた穿孔および/または溶解の後で行う工程
が行われる方法によって解決される。

【0015】

本発明の主たる検討事項が、分子マーカー（例えば、上皮タンパク質）を循環系の貪食された単核細胞において、すなわち、血中マクロファージにおいて検出することであり、この場合、本発明による方法に基づいて、直接的かつ特異的に、同様にまた、定量的に検出できることが好ましい。

【0016】

従って、血中マクロファージにおける分子マーカーの検出を可能にするために、全血からの血中マクロファージの選択および/または濃縮および/または分離を最初に行うことが本発明に従って提供される（以降、用語「活性化単球」および用語「マクロファージ」は、「血中マクロファージ」と同一であると解釈すること）。さらに、本発明の範囲内で処理され、かつ、検出対象であるマーカーおよびマーカーフラグメントのすべてがそれぞれ、組織におけるマクロファージによって吸収される少なくとも部分的に貪食された分子であって、血中マクロファージにおいて細胞内で検出される分子であることが指摘される。

【0017】

本発明の好ましい実施形態によれば、前記血中マクロファージの前記選択および/または濃縮および/または分離が、表面マーカーCD16に対する抗体を使用する正の選択によって行われる

【0018】

従って、本発明によれば、すべてのCD16発現細胞の検討が、確実にすべての活性化単球/マクロファージを検出するために行われる。

【0019】

必要であれば、本発明によれば、好ましくは、表面マーカーCD16に対する抗体を使用する前記正の選択の後で、または、代替的にはその前にも、表面マーカーCD14に対する抗体を使用する正の選択が行われる。表面マーカーCD16に対する抗体を使用する正のCD16⁺選択を正のCD14⁺選択の前に事前に行うことにより、未分化単球のCD14⁺集団（これは、CD16⁺集団に関して多く存在し、CD16表面マーカーを有しておらず、かつ、組織から循環系に再循環させられる血中マクロファージによって組織から細胞内に吸収される分子マーカーを特徴づける（具体的には定量化する）ための本発明による方法の主題ではない）が第1の工程において既に除かれるという本発明による利点が提供される。

【0020】

この方法に関しては、CD14⁺CD16⁺細胞のみを確実に選択することが好ましい（この場合、正のCD14⁺選択の後における正のCD16⁺選択もまた本発明に従って可能であることが述べられる）。

【0021】

細胞表面タンパク質CD16を有する他の細胞集団（特に、NK細胞）が、後に実施する細胞内の食胞に含有され、組織から生じる分子マーカーの分析における妨げと見なされるならば、CD16⁺単核細胞下でNK細胞のみによって発現される表面タンパク質CD56または表面タンパク質CD57または表面タンパク質CD161に基づく、負の選択をその後で行うことができる。

10

20

30

40

50

【0022】

この理由のため、本発明によれば、表面マーカーCD56および/または表面マーカーCD57および/または表面マーカーCD161を有する細胞を除くための負の選択が、CD56および/または表面マーカーCD57および/または表面マーカーCD161に対する抗体を使用して行われる。そのような負の選択を別個の選択工程として行うことができ、または、さらなる好都合な実施形態に従って、代わりに、下記において例示的に説明されるように、CD16⁺細胞の正の選択と同時に行うことができる。

【0023】

さらに、本発明によれば、それぞれ選択された細胞を極めて簡便な様式で好適な磁石によって分離するために、正の選択または負の選択が、好ましくは可逆的に結合され得る磁気ビーズを使用して行われることが提供される。

10

【0024】

代わりに、あるいは、事前に行われる選択工程または続いて行われる選択工程において、本発明によれば、一方ではサンプル処理量を増大させるために、また、他方では、ある容器から別の容器への被試験液体の不必要な移送、および、それに伴う被試験細胞の実質的な喪失を本発明の好都合な様式で避けるために、正の選択または負の選択が、ELISAプレートに結合される抗体を使用して行われる。

【0025】

さらに、本発明による、さらに好ましい実施形態によると、単核白血球集団の定量的測定がELISAプレートで行われ、好ましくは、ELISAプレートリーダーによる乳酸デヒドロゲナーゼ活性の測定によって行われ、特に好ましくは、分子マーカー（特に、非血中マクロファージ抗原）の定性的および定量的な測定が行われる同じELISAプレートで行われる。

20

【0026】

さらに、組織から生じる非血中マクロファージ分子マーカーの現在量の定量的測定の実施がELISAプレートリーダーおよび/または化学発光測定デバイスによって行われる。その中で、本発明によれば、分子マーカーとして、特に、組織マーカーおよび/または血清学的マーカーとして、異常なDNAメチル化、AFP（ α -1-フェトプロテイン）、AHCY（S-アデノシルホモシステインヒドロラーゼ）、AMY2（膵臓アミラーゼ）、CA15-3（異名：MUC1、EMA、CD227）、CA19-9、CA50、CA72-4（異名：TAG72）、CA125（異名：MUC16）、カルシトニン、カルプロテクチン、CCSA-2（結腸ガン特異的抗原-2）、CCSP-2（結腸ガン分泌タンパク質-2）、CEA（ガン胎児性抗原）、CYP24A1、サイトケラチン（CK）8およびそのフラグメント、CK18およびそのフラグメント、CK19およびそのフラグメント、CRP（C反応性タンパク質）、シスタチンB、DDH（ジヒドロジオールデヒドロゲナーゼ）、DKK-1（Dickkopf-1）、GP73（ゴルジタンパク質-73）（異名：GOLPH2）、HE4（ヒト精巣上体タンパク質4）、HER2/neu、HSP（熱ショックタンパク質）-27、Mac-2BP（Mac-2結合タンパク質）、マンマグロビンA、マンマグロビンB、MIA（メラノーマ阻害活性）、MnSOD（マンガンスーパーオキシドディスムターゼ）、PARK7（異名：DJ-1）、ProGRP（プロガストリン放出ペプチド）、NSE（ニューロン特異的エノラーゼ）、汎サイトケラチン、Pro-MMP（プロマトリックスメタロプロテイナーゼ）-7、PSA（前立腺特異的抗原）、S100A8、S100A9、S-100、SCCA1（扁平上皮ガン抗原1）、SCCA2（扁平上皮ガン抗原2）、チログロブリン、UHRF1（PHDドメインおよびリングフィンガードメインを有する/含有するユビキチン様1）、URG4（アップレギュレーションされた遺伝子4）、並びにYKL-40（異名：CHI3-L1）が使用され、また、同様に組合せでも使用される。

30

40

【0027】

本発明によれば、その方法を行う目的で、全血が始めに、凝固および/または凝集に対する薬剤、例えばヘパリンまたは別の好適な抗凝固剤（例えばクエン酸塩溶液）と混合さ

50

れる。

【 0 0 2 8 】

本発明によれば、前記マクロファージまたは前記マクロファージ含有白血球集団の穿孔または溶解がサポニン処理またはトリトン溶液による処理によってさらに行われる。

【 0 0 2 9 】

さらに、本発明によれば、非血中マクロファージ抗原を測定するために、ビオチン、H R P (西洋ワサビペルオキシダーゼ)、A P (アルカリホスファターゼ)または発光性色素と必要な場合にはコンジュゲート化される抗体(特に、免疫グロブリンクラス(I g G)の抗体)、および、F a bフラグメントもしくはF (a b)₂フラグメント、および/または、アプタマーが、特に下記の抗体:抗マウスI g G (ポリクローナル)、抗ウサギI g G (ポリクローナル)、抗ヤギI g G (ポリクローナル)、抗ラットI g G (ポリクローナル)、抗ロバI g G (ポリクローナル)、抗A F P (クローンA F P - 0 1)、抗A F P (クローンA F P - 1 1)、抗A F P (クローン4 A 3)、抗A F P (クローン5 H 7)、抗A F P (クローンM 8 0 3 2 0 9)、抗A F P (クローンM 0 1 5 1 6 1 1)、抗A F P (クローンM 0 1 5 1 6 0 8)、抗A F P (ポリクローナル)、抗A H C Y (クローン1 E 1 1 - 1 A 7)、抗A H C Y (クローン2 F 1 1 - 1 D 1 0)、抗A H C Y (クローン4 H 2)、抗A H C Y (クローンM 1)、抗A H C Y (クローンM 2)、抗A H C Y (ポリクローナル)、抗A M Y 2 (クローン6 A 9 / 1)、抗A M Y 2 (クローン5 0 1)、抗A M Y 2 (クローン5 0 3)、抗A M Y 2 (クローン1 0 - 1 0 2 . 5)、抗A M Y 2 (ポリクローナル)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンM 2 C 5)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンM 9 E 7)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンM 4 H 2)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンM 8 C 9)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンM 1 0 G 4)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンM 1 0 H 6)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンM 3 A 1 0 6)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンC 5 9 5 (N C R C 4 8))、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (クローンE 2 9)、抗C A 1 5 - 3 / M U C 1 (ポリクローナル)、抗C A 1 9 - 9 (クローン1 2 1 S L E)、抗C A 1 9 - 9 (ポリクローナル)、抗C A 5 0 (クローンM 9 9 1 1 4 9)、抗C A 5 0 (クローン9 3)、抗C A 5 0 (ポリクローナル)、抗C A 7 2 - 4 / T A G 7 2 (クローンS P M 1 4 8)、抗C A 7 2 - 4 / T A G 7 2 (ポリクローナル)、抗C A 1 2 5 / M U C 1 6 (クローン2 F 1)、抗C A 1 2 5 / M U C 1 6 (クローン1 0 G 1 2)、抗C A 1 2 5 / M U C 1 6 (クローンX 7 5)、抗C A 1 2 5 / M U C 1 6 (クローンX 3 2 5)、抗C A 1 2 5 / M U C 1 6 (ポリクローナル)、抗カルシトニン(クローンS P 1 7)、抗カルシトニン(クローン1 3 B 9)、抗カルシトニン(クローン1 3 f 2)、抗カルシトニン(クローン2 4 B 2)、抗カルシトニン(ポリクローナル)、抗カルプロテクチン(クローン2 7 E 1 0)、抗カルプロテクチン(ポリクローナル)、抗C C S A - 2 (ポリクローナル)、抗C C S P - 2 (ポリクローナル)、抗C E A (クローンC o l - 1)、抗C E A (クローン1 C 7)、抗C E A (クローン1 C 1 0)、抗C E A (クローン1 C 1 1)、抗C E A (ポリクローナル)、抗C Y P 2 4 A 1 (クローン1 E 1)、抗C Y P 2 4 A 1 (クローン1 F 8)、抗C Y P 2 4 A 1 (ポリクローナル)、抗C K 8 (クローン2 4)、抗C K 8 (クローンL P 3 K)、抗C K 8 (ポリクローナル)、抗C K 1 8 (クローンD C - 1 0)、抗C K 1 8 (クローンD A - 7)、抗C K 1 8 (クローンL D K 1 8)、抗C K 1 8 (ポリクローナル)、抗C K 1 9 (クローンA 5 3 - B / A 2)、抗C K 1 9 (クローンB A 1 7)、抗C K 1 9 (クローン2 3 6 - 1 1 2 2 1)、抗C K 1 9 (ポリクローナル)、抗C R P (クローン2 3 2 0 0 7)、抗C R P (クローン2 3 2 0 2 4)、抗C R P (クローンC 2)、抗C R P (クローンC 4)、抗C R P (クローンC 5)、抗C R P (クローンC 6)、抗C R P (クローンC 7)、抗C R P (ポリクローナル)、抗シスタチンB (クローン2 F 1)、抗シスタチンB (クローン8 k 2 7 5)、抗シスタチンB (クローンB - 0 2)、抗シスタチンB (クローンR J M W - 2 E 7)、抗シスタチンB (ポリクローナル)、抗D D H (クローンT 1 0 1)、抗D D H (ポリクローナル)、抗D K K - 1 (クローン1 4 1 1 3 5)、抗D K K - 1 (ポリクローナル)

10

20

30

40

50

)、抗GP73/GOLPH2(クローンYA-14)、抗GP73/GOLPH2(ク
 ローン5B10)、抗GP73/GOLPH2(ポリクローナル)、抗HE4(クローン
 C-12)、抗HE4(ポリクローナル)、抗HER2/neu(クローン10C7)、
 抗HER2/neu(クローン191924)、抗HER2/neu(クローンN3/D
 10)、抗HER2/neu(ポリクローナル)、抗HSP-27(クローンG3.1)
 、抗HSP-27(クローンAF5E5)、抗HSP-27(クローンF-4)、抗HS
 P-27(クローン2A5)、抗HSP-27(ポリクローナル)、抗Mac-2BP(ク
 ローンSP-2)、抗Mac-2BP(ポリクローナル)、抗マンマグロビンA(ク
 ローン1G8D6、異名:2E7G9)、抗マンマグロビンA(クローン304-1A5)
 、抗マンマグロビンA(ポリクローナル)、抗マンマグロビンB(クローンE-17)、
 抗マンマグロビンB(ポリクローナル)、抗MIA(クローン3A6)、抗MIA(ポリ
 クローナル)、抗MMP-7(クローン6A4)、抗MMP-7(クローン176-5F
 12)、抗MMP-7(クローン141-7B2)、抗MMP-7(クローン37731
 3)、抗MMP-7(ポリクローナル)、抗MnSOD(クローン1AE)、抗MnSO
 D(クローン2A1)、抗MnSOD(クローン4F10)、抗MnSOD(クローン2
 3G5)、抗MnSOD(クローン37CT127.5.11.6)、抗MnSOD(ポ
 リクローナル)、抗PARK7/DJ-1(クローン1B11)、抗PARK7/DJ-
 1(クローン1D7)、抗PARK7/DJ-1(クローン6A65)、抗PARK7/
 DJ-1(クローン3055)、抗PARK7/DJ-1(クローンA-9)、抗PAR
 K7/DJ-1(クローンD-4)、抗PARK7/DJ-1(クローンE2)、抗PA
 RK7/DJ-1(ポリクローナル)、抗proGRP(クローンpGRP5)、抗pr
 oGRP(クローンE146)、抗proGRP(クローンE172)、抗GRP(ク
 ローン76-E6)、抗proGRP(ポリクローナル)、抗GRP(ポリクローナル)、
 抗NSE(クローン1C1)、抗NSE(クローン5A4)、抗NSE(クローン5E2
)、抗NSE(クローン5G10)、抗NSE(ポリクローナル)、抗汎サイトケラチン
 (クローン7H8C4)、抗汎サイトケラチン(クローンB311.1)、抗汎サイトケ
 ラチン(クローンC11)、抗汎サイトケラチン(クローンD-12)、抗汎サイトケラ
 チン(ポリクローナル)、抗PSA(クローンER-PR8)、抗PSA(クローン18
 1823)、抗PSA(ポリクローナル)、抗S100A8(クローン1B3)、抗S1
 00A8(クローン2C5/4)、抗S100A8(クローン2H2)、抗S100A8
 (クローン2Q396A)、抗S100A8(クローン6A614)、抗S100A8(ク
 ローン8L627)、抗S100A8(クローン8-5C2)、抗S100A8(ク
 ローンCF-145)、抗S100A8(クローンMRP8 7C12/4)、抗S100
 A8(クローンS13.67)、抗S100A8(ポリクローナル)、抗S100A9(ク
 ローン1C10)、抗S100A9(クローン2Q396B)、抗S100A9(ク
 ローン4G9)、抗S100A9(クローンNO.19)、抗S100A9(クローンNO
 .134)、抗S100A9(クローンS32.2)、抗S100A9(クローンS36
 .48)、抗S100A9(ポリクローナル)、抗S-100(クローンSB6)、抗
 S-100(クローンSH-B1)、抗S-100(クローンSH-B4)、抗S-
 100(ポリクローナル)、抗SCCA1(クローン8H11)、抗SCCA1(ポリ
 クローナル)、抗SCCA2(クローン10C12)、抗SCCA2(ポリクローナル)
 、抗SCCA1/2(クローンB-9)、抗SCCA1/2(ポリクローナル)、抗チロ
 グロブリン(クローン5E6)、抗チログロブリン(クローン5F9)、抗チログロブリン
 (クローン5G4)、抗チログロブリン(クローン11A16)、抗チログロブリン(ク
 ローンPB2)、抗チログロブリン(クローンPB3)、抗チログロブリン(ポリク
 ローナル)、抗UHRF1(クローン1RC1C-10)、抗UHRF1(クローン3A1
 1)、抗UHRF1(ポリクローナル)、抗URG4(ポリクローナル)、抗YKL-4
 0/CHI3-L1(クローン2011)、抗YKL-40/CHI3-L1(クローン
 321806)、抗YKL-40/CHI3-L1(ポリクローナル)から選択される。
 【0030】

10

20

30

40

50

従って、まとめると、最初に、単核細胞のすべてが、CD16陽性の好中性顆粒球をそれにより除く密度勾配遠心分離によって取り出されると述べるができる。表面タンパク質CD14を有する細胞、または、表面タンパク質CD16を有する細胞のどちらかの正の選択および濃縮がそれに続く。代替として、表面タンパク質CD56または表面タンパク質CD57または表面タンパク質CD161を有する細胞の負の選択を代わりに行うことができる。

【0031】

本発明によれば、表面タンパク質CD14および表面タンパク質CD16を有する単核細胞の正の選択および濃縮と、表面タンパク質CD56または表面タンパク質CD57または表面タンパク質CD161を有する単核細胞の負の選択との両方が、表面タンパク質のCD14またはCD16またはCD56またはCD57またはCD161に対する、磁気ビーズに結合された抗体を用いて行われる。

10

【0032】

CD14⁺細胞に対する正の選択、または、負の選択の場合には、磁気ビーズに結合されるか、または、Eliisaプレートに被覆されるかのどちらかである、細胞表面タンパク質CD16に対する抗体を使用する細胞の正の選択によって特徴づけられるさらなる分離工程が続く。最初のCD16⁺細胞に対する正の選択の場合には、磁気ビーズに結合されるか、または、Eliisaプレートに被覆されるかのどちらかである抗体を用いたCD14⁺細胞に対する細胞のさらなる正の選択が続くか、あるいは、細胞表面タンパク質CD56または細胞表面タンパク質CD57または細胞表面タンパク質CD161に対する磁気抗体を使用する、CD56⁺またはCD57⁺またはCD161⁺のNK細胞に対する負の選択が続く。代替として、CD16⁺細胞に対する正の選択と、CD56⁺またはCD57⁺またはCD161⁺のNK細胞に対する負の選択とを1つの方法工程において同時に行うことができる。CD16⁺細胞に対する正の選択では、その代替として、さらなる選択工程を省略することができる。

20

【0033】

さらに連続して、分離および単離されたばかりの単核白血球が、穿孔溶液および/または細胞溶解試薬による処理によって破壊される。1つの方法変法によれば、事前に、すなわち、細胞の溶解直前または密度勾配遠心分離の直後のどちらかで、抗体(1つまたは複数)を、細胞の透過性化とともに、検出対象の分子マーカに加えることができる。従って、細胞溶解後の工程の1つにおいて、細胞に含有される分子マーカの定量化が可能である。

30

【0034】

さらに、付着した細胞数を求めるという目的のために、溶解物における酵素(乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH))の活性がEliisaプレートで求められる。この場合、存在する単核白血球の量を標準物により計算することができる。指示薬基質を加えることによって、酵素活性によって誘導される着色反応をEliisaリーダーによって読み取ることができ、従って、定量化することができる。

【0035】

最後に、それぞれの分子マーカに対して特異的に向けられる抗体(1つまたは複数)によって、および/または、それぞれの分子抗体(1つまたは複数)に対する抗体(1つまたは複数)によって、好ましくは、細胞の定量化が、LDH活性を測定することによって達成されている同じEliisaプレートにおいて、酵素着色反応または化学発光シグナルが、試験されたマーカの量に比例して誘導される。Eliisaプレートリーダーまたは化学発光検出器によって、それぞれの分子マーカを標準物により定量化することができる。結果の最終的な表示が、「細胞数あたりの細胞内分子マーカに基づく量または質量の単位」として行われる。

40

【0036】

本発明による目的がさらに、本発明の方法を請求項13に従って行うための分析アセンブリーによって解決される。

50

【 0 0 3 7 】

本発明によれば、上記方法を行うための分析アセンブリーは、下記のデバイス：

- ・全血の凝固および/または凝集を阻害する薬剤を加えるためのデバイス（例えば、ヘパリン、クエン酸塩溶液、または別の好適な抗凝固剤）；
- ・全血サンプルにおける全単核白血球（特に、血中マクロファージ）の予備選択または選択および濃縮を密度勾配遠心分離によって行うためのデバイス；
- ・CD14⁺細胞の選択および濃縮を、磁気ビーズまたはE l i s aプレートに必要な場合には可逆的に結合される、CD14に対する抗体を用いて行うためのデバイス；
- ・CD16⁺細胞の選択および濃縮を、磁気ビーズまたはE l i s aプレートに必要な場合には可逆的に結合される、CD16に対する抗体を用いて行うためのデバイス；
- ・必要な場合には、細胞表面マーカーCD56または細胞表面マーカーCD57または細胞表面マーカーCD161を有するNK細胞を、磁気ビーズに結合される、CD56またはCD57またはCD161に対する抗体を使用して単核白血球の集団から除くためのデバイス；
- ・単核白血球集団の穿孔および/または溶解を行うためのデバイス；
- ・単核白血球集団の定量的測定を、E l i s aプレートで、（例えば乳酸デヒドロゲナーゼの測定を、E l i s aプレートで、）すなわち、分子マーカーの定性的および定量的な測定が行われる同じE l i s aプレートで行うためのデバイス；
- ・事前に行われる血液細胞の穿孔または溶解の後における、血中マクロファージによって貪食された分子内分子マーカーの定性的および定量的な測定を（E l i s aプレートリーダー、化学発光測定デバイスなどによって）行うためのデバイス、を含む。

10

20

【 0 0 3 8 】

さらに、本発明によれば、細胞溶解前に細胞内で貪食された分子マーカーに対する抗体を細胞内で結合させることを有利に行うために、好ましくは血中マクロファージまたは血中マクロファージ含有白血球集団の選択および/または濃縮および/または分離の前に、場合によってはその後、単核白血球を溶解前に固定処理および透過性化するためのデバイスが提供され得る。

【 発明を実施するための形態 】

【 0 0 3 9 】

下記において、本発明がいくつかの実施形態としてより詳細に説明される：

30

【 実施例 1 】

【 0 0 4 0 】

第1の実施形態：

磁気ビーズを用いたCD14⁺単球の正の選択；CD14⁺CD16⁺集団の正の選択、細胞数測定、および、E l i s aプレートでの分子マーカー（ここではi m P S A）の定量。

【 0 0 4 1 】

本実施形態が6mlの全血により開始される。この場合、6mlの全血が、ポリエステルゲルおよび0.1Mクエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離（例えば、1800xg、20分間）によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

40

【 0 0 4 2 】

単離された細胞が、血小板を除くために、0.1%のBSA（ウシ血清アルブミン）および2mMのEDTA（エチレンジアミン四酢酸）をさらに含有し得るPBS（リン酸塩緩衝化生理的食塩水）溶液（pH7.4）により2回洗浄される。

【 0 0 4 3 】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液（pH7.4）に懸濁される。アリコートを採取し、2 ~ 8 で貯蔵することができる。懸濁物が、細胞表面抗原CD14に対する抗体を直接にその表面に有する適量の磁気ビーズ（例え

50

ば、250 μ lにおいて 10^8 個のビーズ)と混合される。その代替として、懸濁物を、振とうまたは揺動とともに2 ~ 8 で10分間、細胞表面抗原CD14に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の10 μ gとインキュベーションすることができ、その後、懸濁物は遠心分離され(350 x g、8分間)、上清を廃棄した後、細胞が、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない0.5 mlのPBS溶液(pH 7.4)に再懸濁される。ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、300 μ lにおいて 10^8 個のビーズ)が加えられる。

【0044】

単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2 ~ 8 で20分間、振とうまたは揺動された後、磁気ビーズに結合したばかりの細胞が、好適な磁石を用いて分離され、この場合、上清が廃棄される。ビーズが、0.1%のBSAを含有するPBS溶液(pH 7.4)により数回洗浄される。細胞表面抗原CD14に対する抗体をその表面に有する磁気ビーズを使用するとき、ビーズは、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない0.5 mlのPBS溶液(pH 7.4)に懸濁される。その代替として、細胞表面抗原CD14に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体と、ストレプトアビジンをその表面に有する磁気ビーズとを使用するとき、ビーズは、修飾ビオチンを含有する細胞放出緩衝液に再懸濁することができる。懸濁物が室温で10分間振とうまたは揺動され、その後、ビーズおよび上清の磁気分離が行われる。上清が除去され、遠心分離され(350 x g、8分間)、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない0.5 mlのPBS溶液(pH 7.4)に懸濁される。

【0045】

均質化された懸濁物の規定量(最大で100 μ l)が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、細胞表面抗原CD16に対するマウス抗体(例えば、クローン3G8の5 μ g/ml)と、PSAに対するマウス抗体(例えば、クローンER-PR8の1 μ g/ml)との両方で被覆され、そして、(例えば、5%のFCS(ウシ胎児血清)溶液により)ブロッキング処理されている。懸濁物の希釈系列を作製することができる。懸濁物のアリコートは2 ~ 8 で保たなければならない。プレートが(例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより)密封され、室温で1時間インキュベーションされるか、または、2 ~ 8 で冷蔵庫において一晩インキュベーションされる。

【0046】

プレートが、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しないPBS溶液(pH 7.4)により5回洗浄される。続いて、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する50 μ lの細胞溶解液がそれぞれのウエルにピペット注入される。加えて、全単核白血球の保存された懸濁物のアリコート、または、すべての細胞が抗原CD14をその表面に有するビーズのアリコートが、任意の数のウエルに、例えば、それぞれ2つのウエルにピペット注入され、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する50 μ l不足量の細胞溶解液と混合される。さらに、組換えPSAの希釈系列(例えば、50 μ g/ml ~ 2 ng/mlの間)が標準物として調製され、標準物の各濃度の50 μ lがそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。次に、プレートは2 ~ 8 に5分間置かれ、続いて、超音波浴において5分間処理される(プレートの底だけが水浴に浸かるだけであり、水面のわずかに下側に置かれたケージが支持体として役立つ)。

【0047】

プレートを密封し、室温(1時間)または2 ~ 8 (一晩)でインキュベーションした後、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列(例えば、1/2500の希釈度から開始する)が標準物として調製され、標準物の各濃度の50 μ lが

それぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。続いて、50 μ lのLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50 μ lの停止液(1MのCH₃COOH)と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492nmにおいてElisaプレートリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

【0048】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、PSAに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、PBSにおける0.5 μ g/mlの濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

10

【0049】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)とコンジュゲート化された二次抗体(例えば、マウスまたはウサギの二次抗体)が、例えば、PBS溶液(pH7.4)における2 μ g/mlの濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

【0050】

ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄された後、TMB(テトラメチルベンジジン)を含有する100 μ lの基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、50 μ lの停止液(例えば、1MのH₂SO₄)がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が450nmの波長においてElisaプレートリーダーで測定され、570nmにおける吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるimPSAの量に比例している。

20

【0051】

結果の表示が、例えば、pg(imPSA)/細胞数(CD14⁺CD16⁺細胞、または、代わりに、CD14⁺細胞、または、代わりに、単核白血球)として行われる。

30

【実施例2】

【0052】

第2の実施形態：

磁気ビーズを用いたCD16⁺単球の正の選択；CD14⁺CD16⁺集団の正の選択、細胞数測定、および、Elisaプレートでの分子マーカー(ここではimPSA)の定量。

【0053】

本実施形態が6mlの全血により開始される。この場合、6mlの全血が、ポリエステルゲルおよび0.1Mクエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離(例えば、1800xg、20分間)によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

40

【0054】

単離された細胞が、血小板を除くために、0.1%のBSA(ウシ血清アルブミン)および2mMのEDTA(エチレンジアミン四酢酸)をさらに含有し得るPBS(リン酸塩緩衝化生理的食塩水)溶液(pH7.4)により2回洗浄される。

【0055】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液(pH7.4)に懸濁される。アリコートを取り、2~8で貯蔵することができる。懸濁物が、細胞表面抗原CD16に対する抗体を直接にその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、250 μ lにおいて10⁸個のビーズ)と混合される。その代替として、懸濁物を、振

50

とうまたは揺動とともに 2 ~ 8 で 10 分間、細胞表面抗原 CD 16 に対する、修飾 DS B - X ビオチンとコンジュゲート化された抗体の 10 μ g とインキュベーションすることができ、その後、懸濁物は遠心分離され (350 x g、8 分間)、上清を捨てた後、細胞が、0.1% の BSA および 2 mM の EDTA を含有するが、Ca²⁺ イオンまたは Mg²⁺ イオンを全く含有しない 0.5 ml の PBS 溶液 (pH 7.4) に再懸濁される。ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ (例えば、300 μ l において 10⁸ 個のビーズ) が加えられる。

【0056】

単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2 ~ 8 で 20 分間、振とうまたは揺動された後、磁気ビーズに結合したばかりの細胞が、好適な磁石を用いて分離され、この場合、上清が廃棄される。ビーズが、0.1% の BSA を含有する PBS 溶液 (pH 7.4) により数回洗浄される。細胞表面抗原 CD 16 に対する抗体をその表面に有する磁気ビーズを使用するとき、ビーズは、0.1% の BSA および 2 mM の EDTA を含有するが、Ca²⁺ イオンまたは Mg²⁺ イオンを全く含有しない 0.5 ml の PBS 溶液 (pH 7.4) に懸濁される。その代替として、細胞表面抗原 CD 16 に対する、修飾 DS B - X ビオチンとコンジュゲート化された抗体と、ストレプトアビジンをその表面に有する磁気ビーズとを使用するとき、ビーズは、修飾ビオチンを含有する細胞放出緩衝液に再懸濁することができる。懸濁物が室温で 10 分間振とうまたは揺動され、その後、ビーズおよび上清の磁気分離が行われる。上清が除去され、遠心分離され (350 x g、8 分間)、0.1% の BSA および 2 mM の EDTA を含有するが、Ca²⁺ イオンまたは Mg²⁺ イオンを全く含有しない 0.5 ml の PBS 溶液 (pH 7.4) に懸濁される。

【0057】

均質化された懸濁物の規定量 (最大で 100 μ l) が 96 ウェルの Maxi - Sorp プレートにウェルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、細胞表面抗原 CD 14 に対するマウス抗体 (例えば、クローン M P 9 の 5 μ g / ml) と、PSA に対するマウス抗体 (例えば、クローン ER - PR 8 の 1 μ g / ml) との両方で被覆され、そして、(例えば、5% の FCS (ウシ胎児血清) 溶液により) ブロッキング処理されている。懸濁物の希釈系列を作製することができる。懸濁物のアリコートは 2 ~ 8 で保たなければならない。プレートが (例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより) 密封され、室温で 1 時間インキュベーションされるか、または、2 ~ 8 で冷蔵庫において一晩インキュベーションされる。

【0058】

プレートが、0.1% の BSA および 2 mM の EDTA を含有するが、Ca²⁺ イオンまたは Mg²⁺ イオンを全く含有しない PBS 溶液 (pH 7.4) により 5 回洗浄される。続いて、1% のトリトンおよび 1 mM の PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド) を含有する 50 μ l の細胞溶解液がそれぞれのウェルにピペット注入される。加えて、全単核白血球の保存された懸濁物のアリコート、または、すべての細胞が抗原 CD 16 をその表面に有するビーズのアリコートが、任意の数のウェルに、例えば、それぞれ 2 つのウェルにピペット注入され、1% のトリトンおよび 1 mM の PMSF (フェニルメチルスルホニルフルオリド) を含有する 50 μ l 不足量の細胞溶解液と混合される。さらに、組換え PSA の希釈系列 (例えば、50 pg / ml ~ 2 ng / ml の間) が標準物として調製され、標準物の各濃度の 50 μ l がそれぞれの少なくとも 2 つの未使用ウェルにピペット注入される。次に、プレートは 2 ~ 8 に 5 分間置かれ、続いて、超音波浴において 5 分間処理される (プレートの底だけが水浴に浸かるだけであり、水面のわずかに下側に置かれたケージが支持体として役立つ)。

【0059】

プレートを密封し、室温 (1 時間) または 2 ~ 8 (一晩) でインキュベーションした後、細胞溶解液における校正された LDH 陽性コントロールの希釈系列 (例えば、1 / 2500 の希釈度から開始する) が標準物として調製され、標準物の各濃度の 50 μ l がそれぞれの少なくとも 2 つの未使用ウェルにピペット注入される。続いて、50 μ l の L

DH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50 μ lの停止液(1MのCH₃COOH)と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492nmにおいてEliSaプレートリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

【0060】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、PSAに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、PBSにおける0.5 μ g/mlの濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

10

【0061】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)とコンジュゲート化された二次抗体(例えば、マウスまたはウサギの二次抗体)が、例えば、PBS溶液(pH7.4)における2 μ g/mlの濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

【0062】

ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄された後、TMB(テトラメチルベンジジン)を含有する100 μ lの基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、50 μ lの停止液(例えば、1MのH₂SO₄)がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が450nmの波長においてEliSaプレートリーダーで測定され、570nmにおける吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるimPSAの量に比例している。

20

【0063】

結果の表示が、例えば、pg(imPSA)/細胞数(CD14⁺CD16⁺細胞、または、代わりに、CD16⁺細胞、または、代わりに、単核白血球)として行われる。

【実施例3】

【0064】

第3の実施形態：

磁気ビーズの助けを借りた、最初にCD14⁺単球、続いてCD14⁺CD16⁺集団の両方の正の選択；細胞数測定、および、EliSaプレートでの分子マーカー(ここではimPSA)の定量。

30

【0065】

本実施形態が6mlの全血により開始される。この場合、6mlの全血が、ポリエステルゲルおよび0.1Mクエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離(例えば、1800 \times g、20分間)によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

【0066】

単離された細胞が、血小板を除去するために、0.1%のBSA(ウシ血清アルブミン)および2mMのEDTA(エチレンジアミン四酢酸)をさらに含有し得るPBS(リン酸塩緩衝化生理的食塩水)溶液(pH7.4)により2回洗浄される。

40

【0067】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液(pH7.4)に懸濁される。アリコートを採取し、1%のトリトンおよび1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解し、2~8で貯蔵することができる。懸濁物が、振とうまたは揺動とともに2~8で10分間、細胞表面抗原CD14に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化され

50

た抗体の10 µgとインキュベーションされる。

【0068】

細胞が遠心分離され(350 x g、8分間)、上清を廃棄した後、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5 mlのPBS溶液(pH 7.4)に再懸濁される。ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、300 µlにおいて10⁸個のビーズ)が加えられる。

【0069】

その後、単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2 ~ 8 で20分間、振とうまたは揺動される。その場合、ストレプトアビジンにより標識されたビーズが、DSB-Xピオチンとコンジュゲート化された抗体に結合し、これにより、ビーズが、細胞表面抗原CD14を有する細胞に結合する。

10

【0070】

好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離がその後続き、この場合、上清が廃棄される。ビーズが、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しないPBS溶液(pH 7.4)により数回洗浄され、続いて、修飾ピオチンを含有する細胞放出緩衝液に再懸濁される。懸濁物が室温で10分間振とうまたは揺動され、その後、ビーズおよび上清の磁気分離が行われる。上清が除去され、遠心分離され(350 x g、8分間)、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5 mlのPBS溶液(pH 7.4)に懸濁される。懸濁物のアリコートが取り出され、遠心分離され、ペレットが、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、2 ~ 8 で保たれる。

20

【0071】

次に、細胞懸濁物が、細胞表面抗原CD16に対する抗体をその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、100 µlにおいて4 x 10⁷個のビーズ)と混合され、2 ~ 8 で20分間振とうまたは揺動される。好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離が続き、この場合、上清が廃棄される。細胞を有するビーズが、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しないPBS溶液(pH 7.4)により数回洗浄される。その後で、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液が加えられる。溶解物が、少なくとも5分間、2 ~ 8 に置かれる。

30

【0072】

次に、細胞溶解物のすべてが超音波浴において5分間処理され、好適な磁石が、対応する溶解物からビーズを除くために使用され、溶解物が再度遠心分離される(14000 x g、10分間)。規定量の上清(最大で100 µl)が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、PSAに対するマウス抗体(例えば、クローンER-PR8の1 µg/ml)で被覆され、そして、(例えば、5%のFCS(ウシ胎児血清)溶液により)ブロッキング処理されている。組換えPSAの希釈系列(例えば、50 pg/ml ~ 2 ng/mlの間)がPSA標準物として調製され、標準物の各濃度の規定量がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。さらに、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列(例えば、1/2500の希釈度から開始する)が細胞数の標準物として調製され、標準物の各濃度の50 µlがそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。プレートが(例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより)密封され、室温で1時間インキュベーションされる。

40

【0073】

続いて、50 µlのLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30

50

分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50 μ lの停止液(1 MのCH₃COOH)と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492 nmにおいてElisaプレートリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、細胞数の標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

【0074】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、PSAに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、PBS溶液(pH 7.4)における0.5 μ g/mlの濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

10

【0075】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)とコンジュゲート化された二次抗体(例えば、マウスまたはウサギの二次抗体)が、例えば、PBS溶液(pH 7.4)における2 μ g/mlの濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

【0076】

ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄された後、TMB(テトラメチルベンジジン)を含有する100 μ lの基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、50 μ lの停止液(例えば、1 MのH₂SO₄)がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が450 nmの波長においてElisaプレートリーダーで測定され、570 nmにおける吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるi m P S Aの量に比例している。

20

【0077】

結果の表示が、例えば、pg(i m P S A)/細胞数(CD14⁺CD16⁺細胞、または、代わりに、CD14⁺細胞、または、代わりに、単核白血球)として行われる。

【実施例4】

【0078】

第4の実施形態：

30

磁気ビーズを用いた、最初にCD16⁺集団、続いてCD14⁺CD16⁺集団の両方の正の選択；細胞数測定、および、Elisaプレートでの分子マーカー(ここではi m P S A)の定量。

【0079】

本実施形態が6 mlの全血により開始される。この場合、6 mlの全血が、ポリエステルゲルおよび0.1 Mクエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離(例えば、1800 x g、20分間)によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

【0080】

単離された細胞が、血小板を除去するために、0.1%のBSA(ウシ血清アルブミン)および2 mMのEDTA(エチレンジアミン四酢酸)をさらに含有し得るPBS(リン酸塩緩衝化生理的食塩水)溶液(pH 7.4)により2回洗浄される。

40

【0081】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5 mlのPBS溶液(pH 7.4)に懸濁される。アリコートを採取し、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解し、2~8で貯蔵することができる。懸濁物が、振とうまたは揺動とともに2~8で10分間、細胞表面抗原CD16に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の5 μ gとインキュベーションされる。

50

【0082】

細胞が遠心分離され(350 x g、8分間)、上清を廃棄した後、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5 mlのPBS溶液(pH 7.4)に再懸濁される。ストレプトアビジンとその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、50 μlにおいて2 x 10⁷個のビーズ)が加えられる。

【0083】

その後、単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2 ~ 8 で20分間、振とうまたは揺動される。その場合、ストレプトアビジンにより標識されたビーズが、DSB-Xピオチンとコンジュゲート化された抗体に結合し、これにより、ビーズが、細胞表面抗原CD16を有する細胞に結合する。

10

【0084】

好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離がその後続き、この場合、上清が廃棄される。ビーズが、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しないPBS溶液(pH 7.4)により数回洗浄され、続いて、修飾ピオチンを含有する細胞放出緩衝液に再懸濁される。懸濁物が室温で10分間振とうまたは揺動され、その後、ビーズおよび上清の磁気分離が行われる。上清が除去され、遠心分離され(350 x g、8分間)、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5 mlのPBS溶液(pH 7.4)に懸濁される。懸濁物の規定量が懸濁物から取り出され、遠心分離され、ペレットが、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、2 ~ 8 で保たれる。

20

【0085】

次に、細胞懸濁物が、細胞表面抗原CD14に対する抗体をその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、50 μlにおいて2 x 10⁷個のビーズ)と混合され、2 ~ 8 で20分間振とうまたは揺動される。好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離が続き、この場合、上清が廃棄される。細胞を有するビーズが、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しないPBS溶液(pH 7.4)により数回洗浄される。その後で、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液が加えられる。溶解物が、少なくとも5分間、2 ~ 8 に置かれる。

30

【0086】

次に、細胞溶解物のすべてが超音波浴において5分間処理され、好適な磁石が、対応する溶解物からビーズを除去するために使用され、溶解物が再度遠心分離される(1400 x g、10分間)。規定量の上清(最大で100 μl)が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、PSAに対するマウス抗体(例えば、クローンER-PR8の1 μg/ml)で被覆され、そして、(例えば、5%のFCS(ウシ胎児血清)溶液により)ブロッキング処理されている。組換えPSAの希釈系列(例えば、50 pg/ml ~ 2 ng/mlの間)がPSA標準物として調製され、標準物の各濃度の規定量がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。さらに、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列(例えば、1/2500の希釈度から開始する)が細胞数の標準物として調製され、標準物の各濃度の50 μlがそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。プレートが(例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより)密封され、室温で1時間インキュベーションされる。

40

【0087】

続いて、50 μlのLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50 μl

50

の停止液（1 Mの CH_3COOH ）と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492 nmにおいてE l i s aプレートリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、細胞数の標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

【0088】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のT w e e n - 20を含有するP B S溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、P S Aに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、P B S溶液（p H 7.4）における0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

【0089】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のT w e e n - 20を含有するP B S溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素H R P（西洋ワサビペルオキシダーゼ）とコンジュゲート化された二次抗体（例えば、マウスまたはウサギの二次抗体）が、例えば、P B S溶液（p H 7.4）における2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

【0090】

ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のT w e e n - 20を含有するP B S溶液により5回洗浄された後、T M B（テトラメチルベンジジン）を含有する100 μl の基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、50 μl の停止液（例えば、1 Mの H_2SO_4 ）がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が450 nmの波長においてE l i s aプレートリーダーで測定され、570 nmにおける吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるi m P S Aの量に比例している。

【0091】

結果の表示が、例えば、p g（i m P S A）/細胞数（C D 14⁺ C D 16⁺細胞、または、代わりに、C D 16⁺細胞、または、代わりに、単核白血球）として行われる。

【実施例5】

【0092】

第5の実施形態：

磁気ビーズを用いたC D 16⁺集団の正の選択；細胞数測定、および、E l i s aプレートでの分子マーカー（ここではi m P S A）の定量。

【0093】

本実施形態が6 mlの全血により開始される。この場合、6 mlの全血が、ポリエステルゲルおよび0.1 Mクエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離（例えば、1800 x g、20分間）によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

【0094】

単離された細胞が、血小板を除去するために、0.1%のB S A（ウシ血清アルブミン）および2 mMのE D T A（エチレンジアミン四酢酸）をさらに含有し得るP B S（リン酸塩緩衝化生理的食塩水）溶液（p H 7.4）により2回洗浄される。

【0095】

単離された単核白血球が、0.1%のB S Aおよび2 mMのE D T Aを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない0.5 mlのP B S溶液（p H 7.4）に懸濁される。アリコートを採取し、1%のトリトンおよび1 mMのP M S F（フェニルメチルスルホニルフルオリド）を含有する規定量の細胞溶解液において溶解し、2～8で貯蔵することができる。懸濁物が、細胞表面抗原C D 16に対する抗体をその表面に有する適量の磁気ビーズ（例えば、50 μl において 2×10^7 個のビーズ）と混合される。代替として、細胞表面抗原C D 16に対する、修飾D S B - X ビオチンとコンジュゲート化された抗体の5 μg を、振とうまたは揺動とともに2～8で10分間インキュベーションすることができ、その時、ストレプトアビジンをその表面に有する適量の

10

20

30

40

50

磁気ビーズ（例えば、 $50\ \mu\text{l}$ における 2×10^7 個のビーズ）の添加が続く。

【0096】

その後、単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2 ~ 8 で20分間、振とうまたは揺動される。その場合、抗体に結合されたビーズ、または、ストレプトアビジンにより標識されたビーズが、抗原CD16をその表面に有する細胞に、または、DSB-Xピオチンとコンジュゲート化された抗体に結合し、これにより、ビーズが、表面抗原CD16を有する細胞に結合する。

【0097】

好適な磁石の助けを借りた、磁気ビーズに結合した細胞の分離がその後続き、この場合、上清が廃棄される。ビーズが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しないPBS溶液（pH7.4）により数回洗浄され、続いて、1%のトリトンおよび1mMのPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、2 ~ 8 で保たれる。

10

【0098】

次に、細胞溶解物のすべてが超音波浴において5分間処理され、好適な磁石が、対応する溶解物からビーズを除去するために使用され、溶解物がもう一度遠心分離される（ $14000 \times g$ 、10分間）。規定量の上清（最大で $100\ \mu\text{l}$ ）が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、PSAに対するマウス抗体（例えば、クローンER-PR8の $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）で被覆され、そして、（例えば、5%のFCS（ウシ胎児血清）溶液により）ブロッキング処理されている。組換えPSAの希釈系列（例えば、 $50\ \text{pg}/\text{ml} \sim 2\ \text{ng}/\text{ml}$ の間）がPSA標準物として調製され、標準物の各濃度の規定量がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。さらに、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列（例えば、 $1/2500$ の希釈度から開始する）が細胞数の標準物として調製され、標準物の各濃度の $50\ \mu\text{l}$ がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。プレートが（例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより）密封され、室温で1時間インキュベーションされる。

20

【0099】

続いて、 $50\ \mu\text{l}$ のLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ $50\ \mu\text{l}$ の停止液（1Mの CH_3COOH ）と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492nmにおいてEliSaプレートリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、細胞数の標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

30

【0100】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、PSAに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、PBS溶液（pH7.4）における $0.5\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

40

【0101】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）とコンジュゲート化された二次抗体（例えば、マウスまたはウサギの二次抗体）が、例えば、PBS溶液（pH7.4）における $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

【0102】

ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄された後、TMB（テトラメチルベンジジン）を含有する $100\ \mu$

50

1の基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、50 μ lの停止液(例えば、1MのH₂SO₄)がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が450nmの波長においてEliSaプレートリーダーで測定され、570nmにおける吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるimPSSAの量に比例している。

【0103】

結果の表示が、例えば、pg(imPSSA)/細胞数(CD16⁺細胞、または、代わりに、単核白血球)として行われる。

【実施例6】

【0104】

第6の実施形態：

磁気ビーズを用いた、CD16⁺集団の正の選択、続いてCD16⁺CD56⁻集団またはCD16⁺CD57⁻集団またはCD16⁺CD161⁻集団の負の選択；細胞数測定、および、EliSaプレートでの分子マーカー(ここではimPSSA)の定量。

【0105】

本実施形態が6mlの全血により開始される。この場合、6mlの全血が、ポリエステルゲルおよび0.1Mクエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離(例えば、1800xg、20分間)によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

【0106】

単離された細胞が、血小板を除去するために、0.1%のBSA(ウシ血清アルブミン)および2mMのEDTA(エチレンジアミン四酢酸)をさらに含有し得るPBS(リン酸塩緩衝化生理的食塩水)溶液(pH7.4)により2回洗浄される。

【0107】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液(pH7.4)に懸濁される。アリコートを採取し、1%のトリトンおよび1mMのPMSEF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解し、2~8で貯蔵することができる。懸濁物が、細胞表面抗原CD16に対する抗体をその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、50 μ lにおいて2 \times 10⁷個のビーズ)と混合される。代替として、細胞表面抗原CD16に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の5 μ gを、振とうまたは揺動とともに2~8で10分間インキュベーションすることができ、その時、ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、50 μ lにおける2 \times 10⁷個のビーズ)の添加が続く。

【0108】

その後、単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2~8で20分間、振とうまたは揺動される。その場合、抗体に結合されたビーズ、または、ストレプトアビジンにより標識されたビーズが、抗原CD16をその表面に有する細胞に、または、DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体に結合し、これにより、ビーズが、表面抗原CD16を有する細胞に結合する。

【0109】

好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離がその後続き、この場合、上清が廃棄される。ビーズが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しないPBS溶液(pH7.4)により数回洗浄され、続いて、修飾ビオチンを含有する細胞放出緩衝液に再懸濁される。懸濁物が室温で10分間振とうまたは揺動され、その後、ビーズおよび上清の磁気分離が行われる。上清が除去され、遠心分離され(350xg、8分間)、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液(pH7.4)に懸濁される。懸濁物の規定量が懸濁物から取り出され、遠心分離され、ペレットが、1%のトリトンおよび1mMのPMSEF(フェニルメチ

10

20

30

40

50

ルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、2 ~ 8 で保たれる。

【0110】

次に、細胞懸濁物が、細胞表面抗原CD56または細胞表面抗原CD57または細胞表面抗原CD161に対する抗体をその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、50 μ lにおいて 2×10^7 個のビーズ)と混合される。代替として、細胞表面抗原CD56または細胞表面抗原CD57または細胞表面抗原CD161に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の5 μ gを、振とうまたは揺動とともに2 ~ 8 で10分間インキュベーションすることができ、その時、ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、50 μ lにおける 2×10^7 個のビーズ)の添加が続く。

10

【0111】

2 ~ 8 での20分間の振とうまたは揺動の後、好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離が続く。この場合、上清が残される。細胞を有するビーズが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しないPBS溶液(pH7.4)により数回洗浄される。洗浄液が上清に加えられ、同様に残され、ビーズが廃棄される。上清溶液が遠心分離され(350 \times g、8分間)、1%のトリトンおよび1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液が細胞ペレットに加えられる。溶解物が、少なくとも5分間、2 ~ 8 に置かれる。

20

【0112】

次に、細胞溶解物のすべてが超音波浴において5分間処理され、再度遠心分離される(14000 \times g、10分間)。規定量の上清(最大で100 μ l)が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、PSAに対するマウス抗体(例えば、クローンER-PR8の1 μ g/ml)で被覆され、そして、(例えば、5%のFCS(ウシ胎児血清)溶液により)ブロッキング処理されている。組換えPSAの希釈系列(例えば、50pg/ml~2ng/mlの間)がPSA標準物として調製され、標準物の各濃度の規定量がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。さらに、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列(例えば、1/2500の希釈度から開始する)が細胞数の標準物として調製され、標準物の各濃度の50 μ lがそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。プレートが(例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより)密封され、室温で1時間インキュベーションされる。

30

【0113】

続いて、50 μ lのLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50 μ lの停止液(1Mの CH_3COOH)と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492nmにおいてEliSaプレートリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、細胞数の標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

40

【0114】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、PSAに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、PBS溶液(pH7.4)における0.5 μ g/mlの濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

【0115】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)とコンジュゲート化された二次抗体(例えば、マウスまたはウサギの二次抗

50

体)が、例えば、PBS溶液(pH7.4)における $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

【0116】

ウエルのすべてが再び、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄された後、TMB(テトラメチルベンジジン)を含有する $100\mu\text{l}$ の基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、 $50\mu\text{l}$ の停止液(例えば、1Mの H_2SO_4)がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が 450nm の波長においてElisaプレートリーダーで測定され、 570nm における吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるimPSAの量に比例している。

10

【0117】

結果の表示が、例えば、 $\text{pg}(\text{imPSA})/\text{細胞数}(\text{CD}16^+\text{CD}56^- \text{細胞または}\text{CD}16^+\text{CD}57^- \text{細胞または}\text{CD}16^+\text{CD}161^- \text{細胞、あるいは、代わりに、}\text{CD}16^+、\text{あるいは、代わりに、単核白血球})$ として行われる。

【実施例7】

【0118】

第7の実施形態：

磁気ビーズを用いた、 $\text{CD}56^-$ 集団または $\text{CD}57^-$ 集団または $\text{CD}161^-$ 集団の負の選択、続いて $\text{CD}16^+\text{CD}56^-$ 集団または $\text{CD}16^+\text{CD}57^-$ 集団または $\text{CD}16^+\text{CD}161^-$ 集団の正の選択；細胞数測定、および、Elisaプレートでの分子マーカー(ここではimPSA)の定量。

20

【0119】

本実施形態が 6ml の全血により開始される。この場合、 6ml の全血が、ポリエステルゲルおよび 0.1M クエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離(例えば、 $1800\times\text{g}$ 、20分間)によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

【0120】

単離された細胞が、血小板を除去するために、0.1%のBSA(ウシ血清アルブミン)および 2mM のEDTA(エチレンジアミン四酢酸)をさらに含有し得るPBS(リン酸塩緩衝化生理的食塩水)溶液(pH7.4)により2回洗浄される。

30

【0121】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび 2mM のEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない 0.5ml のPBS溶液(pH7.4)に懸濁される。アリコートを採取し、1%のトリトンおよび 1mM のPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解し、2~8で貯蔵することができる。懸濁物が、細胞表面抗原 $\text{CD}56$ または細胞表面抗原 $\text{CD}57$ または細胞表面抗原 $\text{CD}161$ に対する抗体をその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、 $50\mu\text{l}$ において 2×10^7 個のビーズ)と混合される。代替として、細胞表面抗原 $\text{CD}56$ または細胞表面抗原 $\text{CD}57$ または細胞表面抗原 $\text{CD}161$ に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の $5\mu\text{g}$ を、振とうまたは揺動とともに2~8で10分間インキュベーションすることができ、その時、ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、 $50\mu\text{l}$ における 2×10^7 個のビーズ)の添加が続く。

40

【0122】

その後、単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2~8で20分間、振とうまたは揺動される。その場合、抗体に結合されたビーズ、または、ストレプトアビジンにより標識されたビーズが、抗原 $\text{CD}56$ または抗原 $\text{CD}57$ または抗原 $\text{CD}161$ をその表面に有する細胞に、または、DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体に結合し、これにより、ビーズが、細胞表面抗原 $\text{CD}56$ または細胞表面抗原 $\text{CD}57$ または細胞表面抗原 $\text{CD}161$ を有する細胞に結合する。

50

【0123】

好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離がその後につき、この場合、上清が残される。ビーズが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しないPBS溶液(pH7.4)により数回洗浄される。洗浄液が上清に加えられ、同様に残され、ビーズが廃棄される。上清溶液が遠心分離され(350×g、8分間)、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液(pH7.4)に懸濁される。懸濁物の規定量が懸濁物から取り出され、遠心分離され、ペレットが、1%のトリトンおよび1mMのPMSE(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、2 ~ 8 で保たれる。

10

【0124】

次に、細胞懸濁物が、細胞表面抗原CD16に対する抗体をその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、50μlにおいて 2×10^7 個のビーズ)と混合される。代替として、細胞表面抗原CD16に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の5μgを、振とうまたは揺動とともに2 ~ 8 で10分間インキュベーションすることができ、そのとき、ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、50μlにおける 2×10^7 個のビーズ)の添加が続く。

【0125】

2 ~ 8 での20分間の振とうまたは揺動の後、好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離が続く、この場合、上清が廃棄される。細胞を有するビーズが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しないPBS溶液(pH7.4)により数回洗浄され、続いて、1%のトリトンおよび1mMのPMSE(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、少なくとも5分間、2 ~ 8 に置かれる。

20

【0126】

次に、細胞溶解物のすべてが超音波浴において5分間処理され、再度遠心分離される(14000×g、10分間)。規定量の上清(最大で100μl)が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、PSAに対するマウス抗体(例えば、クローンER-PR8の1μg/ml)で被覆され、そして、(例えば、5%のFCS(ウシ胎児血清)溶液により)ブロッキング処理されている。組換えPSAの希釈系列(例えば、50pg/ml~2ng/mlの間)がPSA標準物として調製され、標準物の各濃度の規定量がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。さらに、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列(例えば、1/2500の希釈度から開始する)が細胞数の標準物として調製され、標準物の各濃度の50μlがそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。プレートが(例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより)密封され、室温で1時間インキュベーションされる。

30

【0127】

続いて、50μlのLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50μlの停止液(1Mの CH_3COOH)と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492nmにおいてEliSaplateリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、細胞数の標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

40

【0128】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、PSAに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、PBS溶液(pH7.4)における0.5μg/mlの濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

50

【0129】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）とコンジュゲート化された二次抗体（例えば、マウスまたはウサギの二次抗体）が、例えば、PBS溶液（pH7.4）における $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

【0130】

ウエルのすべてが再び、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄された後、TMB（テトラメチルベンジジン）を含有する100 μl の基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、50 μl の停止液（例えば、1Mの H_2SO_4 ）がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が450nmの波長においてElisaプレートリーダーで測定され、570nmにおける吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるimPSAの量に比例している。

10

【0131】

結果の表示が、例えば、pg（imPSA）/細胞数（CD16⁺CD56⁻細胞またはCD16⁺CD57⁻細胞またはCD16⁺CD161⁻細胞、あるいは、代わりに、CD56⁻細胞またはCD57⁻細胞またはCD161⁻細胞、あるいは、代わりに、単核白血球）として行われる。

20

【実施例8】

【0132】

第8の実施形態：

磁気ビーズを用いた、CD56⁻集団またはCD57⁻集団またはCD161⁻集団の負の選択；CD16⁺CD56⁻集団またはCD16⁺CD57⁻集団またはCD16⁺CD161⁻集団の正の選択；細胞数測定、および、Elisaプレートでの分子マーカー（ここではimPSA）の定量。

【0133】

本実施形態が6mlの全血により開始される。この場合、6mlの全血が、ポリエステルゲルおよび0.1Mクエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離（例えば、1800xg、20分間）によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

30

【0134】

単離された細胞が、血小板を除去するために、0.1%のBSA（ウシ血清アルブミン）および2mMのEDTA（エチレンジアミン四酢酸）をさらに含有し得るPBS（リン酸塩緩衝化生理的食塩水）溶液（pH7.4）により2回洗浄される。

【0135】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液（pH7.4）に懸濁される。アリコートを採取し、1%のトリトンおよび1mMのPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）を含有する規定量の細胞溶解液において溶解し、2~8で貯蔵することができる。懸濁物が、表面抗原CD56または表面抗原CD57または表面抗原CD161に対する抗体をその表面に有する適量の磁気ビーズ（例えば、50 μl において 2×10^7 個のビーズ）と混合される。代替として、細胞表面抗原CD56または細胞表面抗原CD57または細胞表面抗原CD161に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の5 μg を、振とうまたは揺動とともに2~8で10分間インキュベーションすることができ、その時、ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ（例えば、50 μl における 2×10^7 個のビーズ）の添加が続く。

40

【0136】

その後、単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2~8で20分間、振とうまた

50

は揺動される。その場合、抗体に結合されたビーズ、または、ストレプトアビジンにより標識されたビーズが、抗原CD56または抗原CD57または抗原CD161をその表面に有する細胞に、または、DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体に結合し、これにより、ビーズが、細胞表面抗原CD56または細胞表面抗原CD57または細胞表面抗原CD161を有する細胞に結合する。

【0137】

好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離がその後につき、この場合、上清が残される。ビーズが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しないPBS溶液(pH7.4)により数回洗浄される。洗浄液が上清に加えられ、同様に残され、ビーズが廃棄される。上清溶液が遠心分離され(350xg、8分間)、ペレットが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液(pH7.4)に懸濁される。

10

【0138】

細胞懸濁物の規定量(最大で100 μ l)が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、細胞表面抗原CD16に対するマウス抗体(例えば、クローン3G8の5 μ g/ml)と、PSAに対するマウス抗体(例えば、クローンER-PR8の1 μ g/ml)との両方で被覆され、そして、(例えば、5%のFCS(ウシ胎児血清)溶液により)ブロッキング処理されている。懸濁物の希釈系列を調製することができる。残留した懸濁物は残しておく必要があるが、その際凍結させてはならない。

20

プレートが(例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより)密封され、室温で1時間インキュベーションされるか、または、2~8で冷蔵庫において一晚インキュベーションされる。

【0139】

プレートが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しないPBS溶液(pH7.4)により5回洗浄される。続いて、1%のトリトンおよび1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する50 μ lの細胞溶解液がそれぞれのウエルにピペット注入される。加えて、抗原CD56または抗原CD57または抗原CD161をその表面に有しないすべての細胞の保存された懸濁物の25 μ lが、任意の数のウエルに、例えば、それぞれ2つのウエルにピペット注入され、1%のトリトンおよび1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する同じ体積の細胞溶解液と混合される。さらに、組換えPSAの希釈系列(例えば、50pg/ml~2ng/mlの間)が標準物として調製され、標準物の各濃度の50 μ lがそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。次に、プレートが2~8に5分間置かれ、続いて、超音波浴において5分間処理される(プレートの底だけが水浴に浸かるだけであり、水面のわずかに下側に置かれたケージが支持体として役立つ)。

30

【0140】

プレートを密封し、室温(1時間)または2~8(一晚)でインキュベーションした後、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列(例えば、1/2500の希釈度から開始する)が標準物として調製され、標準物の各濃度の50 μ lがそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。続いて、50 μ lのLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50 μ lの停止液(1Mの CH_3COOH)と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492nmにおいてEliSaplateリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

40

【0141】

50

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、PSAに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、PBS溶液(pH7.4)における $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

【0142】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)とコンジュゲート化された二次抗体(例えば、マウスまたはウサギの二次抗体)が、例えば、PBS溶液(pH7.4)における $2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

10

【0143】

ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄された後、TMB(テトラメチルベンジジン)を含有する $100\mu\text{l}$ の基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、 $50\mu\text{l}$ の停止液(例えば、1Mの H_2SO_4)がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が 450nm の波長においてEliSaプレートリーダーで測定され、 570nm における吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるimPSAの量に比例している。

【0144】

結果の表示が、例えば、 $\text{pg}(\text{imPSA})/\text{細胞数}(\text{CD}16^+\text{CD}56^- \text{細胞または}\text{CD}16^+\text{CD}57^- \text{細胞または}\text{CD}16^+\text{CD}161^- \text{細胞、あるいは、代わりに、}\text{CD}56^- \text{細胞または}\text{CD}57^- \text{細胞または}\text{CD}161^- \text{細胞、あるいは、代わりに、単核白血球})$ として行われる。

20

【実施例9】

【0145】

第9の実施形態：

磁気ビーズを1回用いた $\text{CD}16^+\text{CD}56^-$ 集団または $\text{CD}16^+\text{CD}57^-$ 集団または $\text{CD}16^+\text{CD}161^-$ 集団の正の選択；細胞数測定、および、EliSaプレートでの分子マーカー(ここではimPSA)の定量。

【0146】

本実施形態が 6ml の全血により開始される。この場合、 6ml の全血が、ポリエステルゲルおよび 0.1M クエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離(例えば、 $1800\times g$ 、20分間)によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

30

【0147】

単離された細胞が、血小板を除くために、0.1%のBSA(ウシ血清アルブミン)および 2mM のEDTA(エチレンジアミン四酢酸)をさらに含有し得るPBS(リン酸塩緩衝化生理的食塩水)溶液(pH7.4)により2回洗浄される。

【0148】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび 2mM のEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しない 0.5ml のPBS溶液(pH7.4)に懸濁される。アリコートを採取し、1%のトリトンおよび 1mM のPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解し、 $2\sim 8^\circ\text{C}$ で貯蔵することができる。懸濁物が、細胞表面抗原CD16に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の $5\mu\text{g}$ 、および、細胞表面抗原CD56または細胞表面抗原CD57または細胞表面抗原CD161に対する、ビオチンとコンジュゲート化された抗体の同じ量($5\mu\text{g}$)と混合される。懸濁物が、振とうまたは揺動とともに $2\sim 8^\circ\text{C}$ で10分間インキュベーションされ、そのとき、ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ(例えば、 $50\mu\text{l}$ における 2×10^7 個のビーズ)の添加が続く。

40

50

【0149】

その後、単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2 ~ 8 で20分間、振とうまたは揺動される。その場合、ストレプトアビジンにより標識されたビーズが、ビオチンとコンジュゲート化された抗体に、同様にまた、DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体に結合し、これにより、ビーズが、表面抗原CD56または表面抗原CD57または表面抗原CD161を有する細胞に、あるいは、表面抗原CD16を有する細胞に結合する。

【0150】

好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離がその後につき、この場合、上清が廃棄される。ビーズが、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しないPBS溶液(pH7.4)により数回洗浄され、洗浄液が廃棄され、続いて、ビーズが、修飾ビオチンを含有する細胞放出緩衝液に再懸濁される。懸濁物が室温で10分間振とうまたは揺動され、その後、ビーズおよび上清の磁気分離が行われる。CD16⁺CD56⁻細胞またはCD16⁺CD57⁻細胞またはCD16⁺CD161⁻細胞のみを含有する上清が取り出され、遠心分離され(350xg、8分間)、ペレットが、1%のトリトンおよび1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、少なくとも5分間、2 ~ 8 に置かれる。

【0151】

次に、細胞溶解物のすべてが超音波浴において5分間処理され、再度遠心分離される(14000xg、10分間)。規定量の上清(最大で100μl)が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、PSAに対するマウス抗体(例えば、クローンER-PR8の1μg/ml)で被覆され、そして、(例えば、5%のFCS(ウシ胎児血清)溶液により)ブロッキング処理されている。組換えPSAの希釈系列(例えば、50pg/ml~2ng/mlの間)がPSA標準物として調製され、標準物の各濃度の規定量がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。さらに、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列(例えば、1/2500の希釈度から開始する)が細胞数の標準物として調製され、標準物の各濃度の50μlがそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。プレートが(例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより)密封され、室温で1時間インキュベーションされる。

【0152】

続いて、50μlのLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50μlの停止液(1MのCH₃COOH)と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492nmにおいてEliSaplateリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、細胞数の標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

【0153】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。その後すぐに、ウエルが、PSAに対するヤギのポリクローナル検出抗体と、例えば、PBS溶液(pH7.4)における0.5μg/mlの濃度で、室温で1時間インキュベーションされる。

【0154】

次に、ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。検出抗体に対する、酵素HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)とコンジュゲート化される二次抗体(例えば、マウスまたはウサギの二次抗体)が、例えば、PBS溶液(pH7.4)における2μg/mlの濃度で加えられる。この時の室温におけるインキュベーション時間も1時間である。

10

20

30

40

50

【0155】

ウエルのすべてが再度、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄された後、TMB(テトラメチルベンジジン)を含有する100 μ lの基質溶液がウエルあたり加えられる。インキュベーション時間が室温で15分であり、その後、50 μ lの停止液(例えば、1MのH₂SO₄)がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が450nmの波長においてElisaプレートリーダーで測定され、570nmにおける吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるimpSSAの量に比例している。

【0156】

結果の表示が、例えば、pg(impSSA)/細胞数(CD16⁺CD56⁻細胞またはCD16⁺CD57⁻細胞またはCD16⁺CD161⁻細胞、あるいは、代わりに、単核白血球)として行われる。

10

【実施例10】

【0157】

第10の実施形態:

第3、第4、第5、第6、第7および第9の実施形態において記載されるような、磁気ビーズを用いたCD14⁺CD16⁺細胞またはCD16⁺細胞またはCD16⁺CD56⁻細胞またはCD16⁺CD57⁻細胞またはCD16⁺CD161⁻細胞の単離;事前またはその後でのどちらであっても、細胞の透過性を伴う分子マーカー(ここではimpSSA)に対する抗体の添加;細胞数測定、および、Elisaプレートでの分子マーカー(ここではimpSSA)の定量。

20

【0158】

第9の実施形態に従ったCD16⁺CD56⁻集団またはCD16⁺CD57⁻集団またはCD16⁺CD161⁻集団の単離について記載される成績。

【0159】

本実施形態が6mlの全血により開始される。この場合、6mlの全血が、ポリエステルゲルおよび0.1Mクエン酸ナトリウム溶液を含有するチューブに採取される。血液の遠心分離(例えば、1800xg、20分間)によって、単核白血球のすべてがゲル上方に血小板と一緒に単離される。

【0160】

単離された細胞が、血小板を除去するために、0.1%のBSA(ウシ血清アルブミン)および2mMのEDTA(エチレンジアミン四酢酸)をさらに含有し得るPBS(リン酸塩緩衝化生理的食塩水)溶液(pH7.4)により2回洗浄される。

30

【0161】

単離された単核白血球が、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液(pH7.4)に懸濁され、細胞表面抗原CD16に対する、修飾DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体の5 μ g、および、細胞表面抗原CD56または細胞表面抗原CD57または細胞表面抗原CD161に対する、ビオチンとコンジュゲート化された抗体の同じ量(5 μ g)と混合される。懸濁物が、振とうまたは揺動とともに2~8で10分間インキュベーションされる。PBS溶液(pH7.4)による洗浄工程の後、細胞が0.5mlの固定処理試薬(例えば、1%ホルマリン溶液)に懸濁され、10分後にPBS溶液(pH7.4)により洗浄され、その後、100 μ lの透過性化媒体に入れられ、PSAに対する、酵素HRP(西洋ワサビペルオキシダーゼ)またはビオチンとコンジュゲート化されたマウス抗体(例えば、クローンER-PR8の1 μ g/ml)と約20分間インキュベーションされる。その後、細胞がPBS溶液(pH7.4)により洗浄され、0.1%のBSAおよび2mMのEDTAを含有するが、Ca²⁺イオンまたはMg²⁺イオンを全く含有しない0.5mlのPBS溶液(pH7.4)に懸濁される;アリコートを採用し、1%のトリトンおよび1mMのPMSF(フェニルメチルスルホニルフルオリド)を含有する規定量の細胞溶解液において溶解し、2~8で貯蔵することができる

40

50

。ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ（例えば、 $50\ \mu\text{l}$ における 2×10^7 個のビーズ）の添加がその後続く。その代替として、固定処理試薬および透過性化媒体による細胞の処理をこのプロトコルのこの時点では省略することができ、ただし、この場合には、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、2 ~ 8 で貯蔵されるアリコートを取り出した後、細胞が直ちに、ストレプトアビジンをその表面に有する適量の磁気ビーズ（例えば、 $50\ \mu\text{l}$ における 2×10^7 個のビーズ）とインキュベーションされる。

【0162】

その後、単核白血球および磁気ビーズの懸濁物が、2 ~ 8 で20分間、振とうまたは揺動される。その場合、ストレプトアビジンにより標識されたビーズが、ビオチンとコンジュゲート化された抗体に、同様にまた、DSB-Xビオチンとコンジュゲート化された抗体に結合し、これにより、ビーズが、表面抗原CD56または表面抗原CD57または表面抗原CD161を有する細胞に、あるいは、表面抗原CD16を有する細胞に結合する。

【0163】

好適な磁石を用いた、磁気ビーズに結合した細胞の分離がその後続き、この場合、上清が廃棄される。ビーズが、0.1%のBSAおよび2 mMのEDTAを含有するが、 Ca^{2+} イオンまたは Mg^{2+} イオンを全く含有しないPBS溶液（pH 7.4）により数回洗浄され、洗浄液が廃棄され、続いて、ビーズが、修飾ビオチンを含有する細胞放出緩衝液に再懸濁される。懸濁物が室温で10分間振とうまたは揺動され、その後、ビーズおよび上清の磁気分離が行われる。CD16⁺CD56⁻細胞またはCD16⁺CD57⁻細胞またはCD16⁺CD161⁻細胞のみを含有する上清が取り出され、遠心分離される（ $350 \times g$ 、8分間）。上清を廃棄した後、細胞の透過性を伴う、imPSAに対する抗体の添加が既に行われたならば、ペレットが、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、少なくとも5分間、2 ~ 8 に置かれる。そうでなければ、ペレットが、上清を廃棄した後で0.5 mlの固定処理試薬（例えば、1%ホルマリン懸濁物）に懸濁され、10分後にPBS溶液（pH 7.4）により洗浄され、その後、 $100\ \mu\text{l}$ の透過性化媒体に入れられ、PSAに対する、酵素HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）またはビオチンとコンジュゲート化されたマウス抗体（例えば、クローンER-PR8の $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ ）と約20分間インキュベーションされる。その後、細胞がPBS溶液（pH 7.4）により洗浄され、1%のトリトンおよび1 mMのPMSF（フェニルメチルスルホニルフルオリド）を含有する規定量の細胞溶解液において溶解され、少なくとも5分間、2 ~ 8 に置かれる。

【0164】

次に、細胞溶解物のすべてが超音波浴において5分間処理され、再度遠心分離される（ $14000 \times g$ 、10分間）。規定量の上清（最大で $100\ \mu\text{l}$ ）が96ウエルのMaxi-Sorpプレートにウエルあたりピペット注入される。この場合、プレートは、（HRPとコンジュゲート化される、PSAに対する抗体が使用される場合には）マウス免疫グロブリンに対するポリクローナル抗体により、例えば、 $2\ \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で被覆されるか、あるいは、（ビオチンとコンジュゲート化される、PSAに対する抗体が使用される場合には）アビジンまたはストレプトアビジンにより被覆され、そして、（例えば、5%のFCS（ウシ胎児血清）溶液により）ブロック処理されている。酵素HRP（西洋ワサビペルオキシダーゼ）またはビオチンとコンジュゲート化されたマウス抗体クローンER-PR8の希釈系列が標準物として調製され、標準物の各濃度の規定量がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピペット注入される。これから、結合したimPSAの量に逆算することができる。さらに、細胞溶解液における校正されたLDH陽性コントロールの希釈系列（例えば、 $1/2500$ の希釈度から開始する）が細胞数の標準物として調製され、標準物の各濃度の $50\ \mu\text{l}$ がそれぞれの少なくとも2つの未使用ウエルにピ

10

20

30

40

50

ペット注入される。プレートが（例えば、クリングフィルムまたはアルミニウムホイルにより）密封され、室温で1時間インキュベーションされる。

【0165】

続いて、50 μ lのLDH基質溶液がプレートのそれぞれのインキュベーションされたウエルに加えられ、プレートがアルミニウムホイルにより遮光して密封され、室温で30分間放置される。その後、インキュベーションされたウエルのすべてがそれぞれ50 μ lの停止液（1MのCH₃COOH）と混合され、大きい気泡のすべてがニードルで穿刺され、すべてのウエルの光吸収が492nmにおいてElisaプレートリーダーで測定される。測定された吸収の強度が、細胞数の標準物に基づいて求めることができる細胞数に比例している。

10

【0166】

次に、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄され、そして、HRPとコンジュゲート化される、PSAに対する抗体が使用される場合には、TMB（テトラメチルベンジジン）を含有する100 μ lの基質溶液と混合される。ビオチンとコンジュゲート化される、PSAに対する抗体が使用される場合には事前に、HRPとコンジュゲート化される、マウス免疫グロブリンに対するポリクローナル抗体と、例えば、0.5 μ g/mlの濃度で、1時間インキュベーションされ、その後、ウエルのすべてが、0.05%または0.1%のTween-20を含有するPBS溶液により5回洗浄される。TMBを含有する基質溶液とのインキュベーション時間が室温で15分であり、その後、50 μ lの停止液（例えば、1MのH₂SO₄）がそれぞれのウエルにピペット注入される。最後に、ウエルの光吸収が450nmの波長においてElisaプレートリーダーで測定され、570nmにおける吸収が引かれる。測定された吸収の強度が、標準物に基づいて求めることができるimPSAの量に比例している。

20

【0167】

結果の表示が、例えば、pg(imPSA)/細胞数(CD16⁺CD56⁻細胞またはCD16⁺CD57⁻細胞またはCD16⁺CD161⁻細胞、あるいは、代わりに、単核白血球)として行われる。

【0168】

現時点では、上記実施形態のすべてが、imPSAの定量化を例示的に明らかにするものであり、これらはまた、明白なことではあるが、上記で述べられる他の分子マーカー（特に、請求項9において述べられる分子マーカー）のすべての特徴づけにも適用され得ること、そして、これらのマーカーの定量化が、imPSAの定量化と同様な様式で達成されることは言及されなければならない。さらに、それぞれの分子マーカーまたはそれぞれのそのエピトープを決定するために、これらのマーカーおよび/またはエピトープにそれぞれ関連する抗体が使用されることは指摘されなければならない。

30

【0169】

現時点では、上記で記載される部分のすべてはそれら自体が、また、各組合せにおいて、特に、図面において表される詳細は、本発明のために不可欠であるとして主張されることは指摘されなければならない。当業者は、本発明に対する改変を熟知している。

40

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/060106

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/50		
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, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS 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 2004/003548 A (FISCHER AG [LI]; HERWIG RALF [AT]) 8 January 2004 (2004-01-08) page 1 - page 5 claims 1-6	1-15
X	HERWIG R ET AL: "Prostatakarzinomscreening durch einen neuen Marker auf der Basis zirkulierender Blutmakrophagen?" UROLOGE, vol. 46, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 1066-1070, XP002544939 ISSN: 1433-0563 the whole document	1-15
----- -/-		
<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 *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *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 *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 *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 *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. *Z* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
9 September 2009		22/09/2009
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 Bayer, Martin

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2009/060106

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>JAPINK D ET AL: "T1118 CEA in Activated Macrophages: A New Prognostic or Diagnostic Factor for Early Detection of Local Recurrence of Colorectal Neoplasms?" GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, vol. 134, no. 4, 1 April 2008 (2008-04-01), pages A-487, XP023434076 ISSN: 0016-5085 [retrieved on 2008-04-01] the whole document</p> <p>-----</p>	1-15
Y	<p>HERWIG R ET AL: "Circulating blood macrophages of prostate cancer patients contain PSA in combination with structures of epithelial origin" JOURNAL OF UROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, vol. 169, no. 4 Supplement, 1 April 2003 (2003-04-01), page 52, XP009019758 ISSN: 0022-5347 the whole document</p> <p>-----</p>	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/EP2009/060106

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004003548 A	08-01-2004	AU 2003238193 A1	19-01-2004
		CA 2491221 A1	08-01-2004
		CN 1668922 A	14-09-2005
		EP 1516182 A1	23-03-2005
		JP 2005531785 T	20-10-2005
		US 2006094067 A1	04-05-2006

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/060106

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES INV. G01N33/50		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
B. RECHERCHIERTE GEBIETE		
Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole) G01N		
Recherchierte, aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen		
Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe) EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	
	Betr. Anspruch Nr.	
X	WO 2004/003548 A (FISCHER AG [LI]; HERWIG RALF [AT]) 8. Januar 2004 (2004-01-08) Seite 1 - Seite 5 Ansprüche 1-6	1-15
X	HERWIG R ET AL: "Prostatakarzinomscreening durch einen neuen Marker auf der Basis zirkulierender Blutmakrophagen?" UROLOGE, Bd. 46, Nr. 9, September 2007 (2007-09), Seiten 1066-1070, XP002544939 ISSN: 1433-0563 das ganze Dokument	1-15
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen		<input checked="" type="checkbox"/> Siehe Anhang Patentfamilie
* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :		* T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
* A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist		* X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
* E* Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist		* Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann nahelegend ist
* L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)		* Z* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist
* O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht		
* P* Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche	Absenddatum des internationalen Recherchenberichts	
9. September 2009	22/09/2009	
Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Bayer, Martin	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2009/060106

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	JAPINK D ET AL: "T1118 CEA in Activated Macrophages: A New Prognostic or Diagnostic Factor for Early Detection of Local Recurrence of Colorectal Neoplasms?" GASTROENTEROLOGY, ELSEVIER, PHILADELPHIA, PA, Bd. 134, Nr. 4, 1. April 2008 (2008-04-01), Seiten A-487, XP023434076 ISSN: 0016-5085 [gefunden am 2008-04-01] das ganze Dokument	1-15
Y	HERWIG R ET AL: "Circulating blood macrophages of prostate cancer patients contain PSA in combination with structures of epithelial origin" JOURNAL OF UROLOGY, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 169, Nr. 4 Supplement, 1. April 2003 (2003-04-01), Seite 52, XP009019758 ISSN: 0022-5347 das ganze Dokument	1-15

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2009/060106

Im Recherchenbericht angeführtes Patendokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 2004003548 A	08-01-2004	AU 2003238193 A1	19-01-2004
		CA 2491221 A1	08-01-2004
		CN 1668922 A	14-09-2005
		EP 1516182 A1	23-03-2005
		JP 2005531785 T	20-10-2005
		US 2006094067 A1	04-05-2006

フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, 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, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

专利名称(译)	一种表征，特异性量化分子标记物的方法，所述分子标记物通过从组织再循环到循环系统的血液巨噬细胞从组织吸收到细胞中		
公开(公告)号	JP2011530077A	公开(公告)日	2011-12-15
申请号	JP2011521563	申请日	2009-08-04
申请(专利权)人(译)	Shinmeddo研究股份有限公司		
[标]发明人	ブローゼックヴォルフガング		
发明人	ブローゼック、ヴォルフガング		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/553 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/5055		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/53.D G01N33/553 G01N33/543.501.A		
优先权	102008036185 2008-08-04 DE		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种表征，特别是用于定量分子标记物的方法，所述分子标记物通过从组织再循环到循环系统中的血液巨噬细胞从组织中被细胞吸收，其中进行以下步骤：施用药剂对于全血，所述药剂抑制全血的凝结和/或凝聚；从全血中选择和/或富集和/或分离含有血液巨噬细胞的血液巨噬细胞或白细胞群；任选地在其先前的透化后，对所选择的血液巨噬细胞或含有血液巨噬细胞的白细胞群进行穿孔和/或裂解；在预先穿孔和/或裂解含有血液巨噬细胞的血液巨噬细胞或白细胞群之后，定性和定量地测定非血液巨噬细胞标记物，即由组织产生的分子标记物，以及实施该方法的装置。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/EP2009/060106
1. INV. No. G01N33/53 ENERGY MATTER		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
2. FIELD OF INVENTION		
IPC Class. (according to the International Patent Classification system) G01N		
Documentation searched other than patent literature (to the extent that such documents are included in the database searched)		
EPO-Internal, MPI Data, BIOSIS, EMBASE, CHEM ABS Data		
3. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Referred to claim No.
X	WO 2004/093548 A (FISCHER AG [LI]: HERMIG RALF [AT]) 8 January 2004 (2004-01-08) Page 1 - Page 5 Claims 1-6	1-15
X	HERMIG R ET AL: "Protektakarzinomscreening durch einen neuen Marker auf der Basis zirkulierender Blutmakrophagen?" UROLISE Vol. 46, no. 9, September 2007 (2007-09), pages 1065-1070, XP002544939 ISSN: 1433-0563 the whole document	1-15
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are cited in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family areas.		
<p>4. SPECIAL CATEGORIES OF CITED DOCUMENTS:</p> <p>*A* document appearing in the national phase of the application to which this report is made</p> <p>*B* document published after the international filing date of priority date and for which the applicant has not claimed priority</p> <p>*C* document published in a language other than English</p> <p>*D* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*E* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*F* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*G* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*H* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*I* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*J* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*K* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*L* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*M* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*N* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*O* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*P* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*Q* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*R* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*S* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*T* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*U* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*V* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*W* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*X* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*Y* document which may have priority status or which is cited for information only</p> <p>*Z* document which may have priority status or which is cited for information only</p>		
Date of the most recent completion of the international search: 9 September 2009		Date of mailing of the international search report: 22/09/2009
Name and mailing address of the ISA/ the applicant's agent: Pat. & Trademark Dept. P.O. Box 1015 D-50833 Köln, Germany Tel. (+49) 221 463-3100 Fax (+49) 221 463-3101		Authorized officer: Bayer, Martin