

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3540323号

(P3540323)

(45) 発行日 平成16年7月7日(2004.7.7)

(24) 登録日 平成16年4月2日(2004.4.2)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/48

B

GO 1 N 1/10

GO 1 N 1/10

B

請求項の数 7 (全 7 頁)

(21) 出願番号	特願平8-515146	(73) 特許権者	フェニックス・メディカル・リミテッド
(86) (22) 出願日	平成7年11月6日(1995.11.6)		イギリス国、ピーアール5・8エーティー
(65) 公表番号	特表平10-508695		、ランカシャー、プレストン、ワールトン
(43) 公表日	平成10年8月25日(1998.8.25)		・サミット・センター、オークショット・
(86) 国際出願番号	PCT/GB1995/002599		プレイス 4 1 5
(87) 国際公開番号	W01996/014578	(74) 代理人	弁理士 鈴江 武彦
(87) 国際公開日	平成8年5月17日(1996.5.17)	(74) 代理人	弁理士 村松 貞男
審査請求日	平成14年11月6日(2002.11.6)	(74) 代理人	弁理士 坪井 淳
(31) 優先権主張番号	9422504.2	(74) 代理人	弁理士 橋本 良郎
(32) 優先日	平成6年11月8日(1994.11.8)		
(33) 優先権主張国	英国 (GB)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 体液試験

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも1つの第1の室(2)、該第1の室或いは各第1の室及び少なくとも1つの該第1の室とそれぞれ協働する少なくとも1つの第二の室(3)を横切って広がる協働するフィルタ(4)を具備し、前記第一の室及び第二の室(2,4)の中の一の室或いは両室は該フィルタの1つの側或いは両側に配置された真空との接続を(7,8)を有し、そして各室の端部には端部キャップの形状をした取り外し可能な囲い手段(5,6)があることに特徴を有している、体液分離手段。

【請求項 2】

該フィルタ(4)は、該体液分離手段が任じられるべき使用に適するように予備処理されていることを特徴とする、請求項1に記載された体液分離手段。 10

【請求項 3】

白血球をトラップする膜フィルタが備えられたことを特徴とする、請求項2に記載された体液分離手段。

【請求項 4】

細胞分離のために、血液或いは血漿の通過を許しそして試験のために必要な細胞をトラップする特性を持ち、取り換え可能なフィルタ(4)が備えられたことを特徴とする、請求項2に記載された体液分離手段。

【請求項 5】

該室(2,3)、及び該囲い手段(5,6)の材料は、それらが容易に殺菌されることができる 20

材料であることを特徴とする、請求項 1 乃至 4 のいずれかに記載の体液分離手段。

【請求項 6】

請求項 1 に記載された体液分離手段を使用して体液を選択された成分に分離する方法であって、体液のサンプルをフィルタの 1 つの側に供し、フィルタの反対側に真空を供して体液をフィルタを通して第二の室の端部にある取り換え可能な囲い手段 (6) に吸引し、該フィルタの上にトラップされた指定成分を残し、該装置を逆さにするか或いは第 1 の室の端部にある取り換え可能な囲い手段 (5) を第 1 の室の端部から第二の室部の端へ再配置した後、該指定成分を該フィルタからさらに取り換え可能な囲い手段 (5) に解放する、ことを特徴とする体液を選択された成分に分離する方法。

【請求項 7】

該フィルタ (4) は、トラップされた成分の該フィルタへの付着を阻止するために予備処理されていることを特徴とする、請求項 6 に記載された方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は体液試験に関し、特に、血液を様々なその成分に分離して実施する様々な試験を可能にすること、及び骨髓、精子/精漿、尿、及び唾液のようなその他の体液の分離に関する。

血液学及び遺伝治療及び司法病理学のような関連領域の分野、並びに精子の受精能力の決定及び骨髓からの細胞の分離のような他の分野においては、これまで、複雑かつ高価な装置及び手順が関与し、特定の体液の成分を正確に分離するオペレータの相当な技量が必要とされている。これは、血液サンプルを注意深く調製する必要がある結果として、血液に

多くの可能性のある異常のうちの 1 種以上についての胎児 (foetus) の試験もしくはスクリーニングのような他の領域においては、これまで、主として、母親にとってしばしば不快なものである侵襲性の技法によって行われている。

研究スタッフの中の新参者の適応性の範囲内にある案内手順を備える、体液を様々なその成分に分離することを可能にする、非常に簡単かつ比較的低コストの装置を提供することが本発明の目的である。

本発明の第 1 の面によると、体液分離手段は少なくとも 1 つの第 1 の室 (chamber)、該第 1 の室若しくは各第 1 の室を横切って広がる協働フィルタ、それぞれ該少なくとも 1 つの第 1 の室と協働する少なくとも 1 つの第 2 の室とを具備し、該第 1 及び第 2 の室のうち

の 1 つもしくは両者は真空中に連通する。

本発明の第 2 の面によると、体液分離手段は室、該室を横切って広がるフィルタ、該室の各端部の取り外し可能な囲い、及び該フィルタの側面の一方もしくは両方に位置する該室を真空中に連通するための連通手段を具備する。

本発明の第 3 の面によると、体液分離手段は 2 つ以上の収集室を備えて形成される第 1 プレート、対応する数の廃棄物収容室を備える第 2 プレート、該廃棄物収容室の各々についての真空への連通、各収集室と協働廃棄物収容室との間のフィルタ手段、及び各廃棄物収容室を真空と連通させる真空室を形成する第 3 プレートとを具備する。

本発明の第 2 の面に関して、取り外し可能な囲い手段は、単に、室の端部に嵌まり、かつ密封咬合するキャップであってもよく、その室の反対の端部に嵌まる第 2 のキャップが提

供されてもよい。

本発明の第 3 の面に関して、第 1 プレート、第 2 プレート、及び第 3 プレートは、好ましくは、第 1 プレートと第 2 プレートとの間にトラップ (trap) されているフィルターと密封咬合の状態で分離可能に固定されている。

本発明のあらゆる面における本発明のそれぞれの使用に関する限りにおいて、室の一端を横切って広がり、室をまたぎ、もしくは第 1 プレートと第 2 プレートとの間にトラップされているフィルターは、試験しようとする体液に適するように選択され、必要である場合には、それを試験しようとする体液での使用に適するようにする方法で予備処理される。例えば、構成の一形態としては、白血球捕捉膜フィルタが与えられていることが好ましい。細胞分離の場合、例えば母親の血液細胞の通過と例えば胎児の血液細胞の捕獲とを許容

10

20

30

40

50

するという特徴を有する交換可能なフィルターが与えられる。精子試験の場合、このフィルターは精子を捕捉しつつ精漿の通過を可能にする。同様に、骨髓に関しては、血漿の通過を許容しながらも骨髓細胞の捕捉に適するようにフィルターが選択される。

室及び各端部キャップの材料並びに各プレートの材料は、これらの室及びキャップ（１つもしくは複数）及びプレートが、例えばガンマ線照射、によって殺菌可能であるようなものであってもよい。フィルターは、好ましくは、体液分離手段に１回だけ使用して、それから処分される、比較的廉価なプラスチック材料で形成される使い捨て部品である。

本発明の第４の面によると、体液を選択された成分に分離する方法は、体液サンプルをフィルターの一方の側に適用し、このフィルターの反対の側に真空を適用して、フィルターを通して体液を吸引させて指定成分をフィルター上に捕獲したままにし、かつこの指定成分をその場で、もしくはフィルターを取り除いた後に、フィルターから解放することを包含する。

10

例えば、本発明の第２の面が特に適する、血液のDNA内容物の分離を特に引き合いに出すと、全血液サンプルをフィルターの一方の側に適用し、このフィルターの反対の側に真空を適用して、それらを通して全血液サンプルを吸引して血液の血漿及び赤血球内容物を白血球内容物と分離し、白血球内容物をフィルターに捕獲したままにし、続いて、フィルターの同じ側に、フィルターの反対の側に適用される真空によってそれらを通して吸引される水もしくは、好ましくは、等張生理食塩水を適用してフィルターに捕獲されている白血球を溶解する。水／等張生理食塩水を適用する代わりとして、化学溶解剤もしくは適合する細胞洗浄剤を、血液の血漿及び赤血球内容物を白血球細胞内容物と分離し、白血球内容物をフィルターに捕獲したままにするのに用いることができる。溶解に続いて、例えば、このようにして廃棄物を収容する室の取り外し可能な端部キャップを取り外して廃棄し、室を逆さにし、フィルターの反対の側に等張生理食塩水を適用して白血球細胞の細胞内容物をフィルターから適切な容器内に洗い流して、この容器からDNA内容物を取り出すことができる。この適切な容器は、その室の他端の取り外し可能な端部キャップであってもよい。その代わりに、廃棄物を収容する端部キャップを取り除いた後、それをその室の反対の側の端部キャップで置き換え、等張生理食塩水をフィルターの同じ側に適用して白血球細胞の細胞内容物を清潔な端部キャップ内に洗い流し、そこからDNA内容物を取り出すことが可能である。さらに別の代替法として、特定の試験については、白血球内容物をフィルターに捕獲したままにし、様々な医学試験の試験ベースとして役立てることができる。白血球細胞を除去する環境下においては、取り引き上Pall LK4として知られる商業的に利用可能なフィルターを用いることが好ましい。細胞内容物を受ける端部キャップに、細胞のDNA内容物をフィルターより洗い出された他の細胞デブリ（debris）から単離する適切な膜が備えられ、通常の移転技術を用いてこの膜から解放することが可能な清澄DNAサンプルを提供することも好ましい。本発明は、DNA回収及び白血球試験へのその適用において、その装置及びその方法により、血液サンプルのいかなる調製の必要をも完全に回避し、非常に簡単かつ効率的な方法でDNA内容物を分離し、収集し、かつ蓄えることを可能にする。

20

30

全血液は、予備調製することなく室の開口端部を通してフィルターに単純に適用し、真空は、例えば比較的単純な実験用真空ポンプにより、もしくは、例えば標準医用シリンジ（注射器,syringe）により、反対の側に適用することができる。これは、白血球をフィルターに捕獲されたままにしつつ、赤血球細胞及び血漿をフィルターを通して吸引し、取り外し可能な端部キャップに集める。引き続いて真空、水、等張生理食塩水、又は化学溶解剤、もしくは適合する細胞洗浄剤を適用し、フィルターを通して吸引することにより、浸透性衝撃により白血球の化学的な溶解もしくは溶解が生じる。

40

ひとたび細胞内容物が蓄積されると、通常の技術によりDNA内容物を集めることができる。

例えば、胎児試験、精子計数、骨髓試験、尿及び唾液試験のような別の領域の試験においては、複数のサンプルを与えることが望ましく、これらには本発明の第３の面が特に適する。ここで、第２プレート上の各廃棄物収集室を覆う一群のフィルターの各々にサンプル

50

を適用し、続いて第1プレートを第2プレートに適用してフィルタをトラップし、この第1及び第2プレートを組み立てたものを第3真空形成プレートに適用する。

例えば、母親の血液から退治トロホプラスト(trophoblast)(未成熟血液細胞)をスクリーニング及び単離する場合、母親の血液細胞の通過及び胎児血液細胞の捕獲を可能にするフィルタ、例えばPaII J100もしくは類似膜が、血液サンプルを受けるために配置されたゲル被覆側部を備えて用いられる。このフィルタは、それをサンプル収集室と同様に非粘着性にするためにさらに被覆される。母親から採取された全血液サンプルは、それ以前に調製された被検体である必要はなく一群のフィルタの各々に適用することができる。真空室を介して廃棄物収集室に適用される真空により、胎児血液細胞をフィルタにご捕捉したままにしつつ、その血液の母親の血液細胞がフィルタを通して吸引されて廃棄物収集室に集められる。第2及び第3プレートを取り除き、廃棄物収集室中の廃棄物を廃棄し、第1プレートを逆さにする。ここで再び、胎児細胞をフィルタから、それらを試験のために取り除くことが可能な収集室中に解放することが好ましい。しかしながら、この胎児フィルターからデブリを取り除いて細胞をフィルタに捕捉したままにし、フィルタ上で細胞に対する試験を行うことも可能である。

10

その好ましい形態において、胎児トロホプラストを単離しスクリーニングする手順は、特別に調製された膜であって、胎児血液細胞をこのフィルタ内に捕捉したまま母親の血液細胞をこの膜を通過させることを可能にする膜を用いて胎児血液細胞を母親の血液サンプルから単離し、その後、この胎児血液細胞を溶解して指定された染色体に適合する科学的及び特異的抗体マーカーを添加することを包含し、このマーカーは短波長紫外光の下で蛍光を発してそれらの胎児細胞における異常を知らせる能力を有する。

20

例えば、ダウン症候群の例においては、21番染色体が2つである代わりに3つ存在することが示される。この21番染色体は、スクリーン上でUV光の下において3つの蛍光を発する点として現れる。

この非侵襲性スクリーニングは、妊娠第10週から実施可能であることが意図されている。この技術は、他のあらゆる遺伝的に継承される症候群、すなわち、ハンチントン舞蹈病(Huntingdon chorea)、腭嚢胞性線維症(cystic fibrosis)、及び脊椎披裂(spina bifida)に用いることができる。

添付の図面を参照して、例のみとして、本発明をさらに説明する。添付の図面においては、

30

図1は、本発明の第一の実施例、特にDNAハーベスティング(harvesting)のためのの実施例の透視図である。

図2は、本発明の第二の実施例、特に複数サンプル体液試験のための実施例の分解組み立て透視図である。

図3は、図2のIII-III線による、その組み立て状態での断面である。

図1において、特にDNAハーベスティングに適した体液試験手段は、上部及び下部セクター2,3を有する室1、及び中央に配置されたフィルタ4により形成されている。上部及び下部セクター2,3の各々には、取り外し可能な端部キャップ5,6がそれぞれ具備されており、各端部キャップは該室の各端部を密封している。各セクターは、該室セクター2,3のいずれか、又は両方を真空源に接続するための、各プラグ9,10により閉じられた接続7,8を有している。

40

はじめに、端部キャップ5が外され、全血液サンプルが、従前のシリンジのような方法で該室の、フィルタに4の上に導入される。該端部キャップ5が元に戻され、プラグ10が該室の下部セクター3上の接続8から外され、そして、接続8が真空源に接続される。この真空源は再び従前のシリンジの方法によることができ、フィルタの下真空により血液はフィルタを通して吸引される。該フィルタは、特に血液の白血球成分をその上にトラップ(trap)するよう選択される。フィルタを通して吸引された血液の該血漿及び赤血球成分は、端部キャップ6の中に沈積する。これに続いて、端部キャップ5が外され、水、等張生理(isotonic)食塩水、適当な化学溶解剤或いは適合する細胞洗浄剤がフィルタに加えられ、フィルタ下の真空によりフィルタを通して吸引される。該キャップ6が外され、そ

50

の中に收容されている廃棄物質が捨てられ、その容器は逆にされることが出来、該プラグ10が接続8上に戻され、該プラグ9が外され、接続7が真空に接続される。それから、水又は等張生理食塩水がフィルタの反対側に加えられ、白血球細胞の内容が洗浄され、キャップ5に集められる。これに続いて、該キャップ5が外され、DNA内容のハーベスティングが可能となる。これに代わるものとして、及び端部キャップ6を外すことに続いて、エド端部キャップ5がハシ部キャップの位置で容器に装着される。水、等張生理食塩水、化学溶剤或いは適合する細胞洗浄剤をフィルタの同じサイドに加え、接続8を通して真空を連続して加えることにより、端部キャップ中に白血球の細胞内容を洗い出す。

該キャップ5,6のどちらでも、白血球の細胞内容を集めるために使用することができ、フィルタ膜11がフィルタから洗浄された他の細胞の残骸から該細胞のDNA内容を分離するために提供されることが最も望ましい。膜11は、次に行われる分離したDNAの内容を取り除くために、端部キャップから外される。

図2,3には、複数のサンプルを同時処理するための体液分離手段が示されている。実施例は同時的に6サンプルの処理を示しているが、いくつかのサンプルでも処理することが可能であることが理解されるべきである。この実施例において、6つの収集室13を形成している第一のプレート12、及び6つの協働する廃棄物収容室15を形成している第二のプレートが用意されている。各廃棄物収容室15は各廃棄物収容室を第三のプレート18中に形成された真空室17に接続するための接続ポート(port)16を有している。該第三のプレート18は真空源(図示していない)への接続19を有している。膜20は、真空室17の中に收容されている。このように、第三のプレート18上に配置された第二のプレート14、及び各廃棄物収容室を越えて配置された各フィルタ21をもって、体液のサンプルは各フィルタに加えられ、そして、第一のプレート12が第二プレート上に配置され、図3に示された組立体が用意される。19を通して室17へ適用された真空は各ポートを介して該廃棄物収集室に適用され、フィルタ上のサンプルの血漿/液体内容は、フィルタを通して廃棄物収容室15に吸引され、ポート16を通過して膜20上に収集される。第三のプレート18が外され、そして、膜20上の廃棄物質が捨てられ、第一及び第二のプレートがひっくり返され、第二のプレートがフィルタにアクセスし、フィルタ上にトラップされた該細胞或いは他の体液成分がサンプル収集室13に洗い出して、取り除かれる。

図2及び3に示されたような装置は、例えば母体血液から胎児のトロホブラストのスクリーニング及び単離に顕著に適しており、ゲル被覆されている適当な膜/フィルタが使用され、血液サンプルは該ゲル被覆された側に加えられ、そして、胎児のトロホブラストは他の物質に付着することが知られているが、各収集室と一緒に膜/フィルタはそれを非付着性(non-stick)にするためにさらに処理される。一度胎児のトロホブラストが単離されると、与えられた染色体に特有の遺伝子プローブ(probe)が該細胞に適用され、例えば、もしも染色体21が二つ(duplicate)の代わりに三つに現れるならば、染色体21はダウン症候群の診断を確たるものとする。インシトゥ(in situ)ハイブリッドゼーション(hybridisation)、インターフェイス(interphase)或いはメタフェイズ(metaphase)のいずれか、プローブにおける蛍光の技術は、全ての知られている遺伝子の無秩序を特定するために使用されることが出来る。インシトゥハイブリッドゼーションは、単純な顕微鏡或いは紫外線リーダーにより目に見えるようにされることが出来る。試験される染色体に特有のプローブが蛍光ドットとして見られることが出来るであろう(例えば、二つのドット...ダウンがネガティブ及び三つのドット...ダウンがポジティブ)。

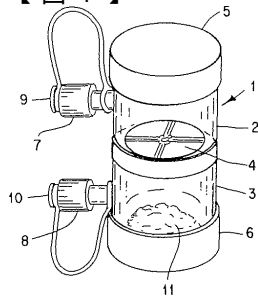
10

20

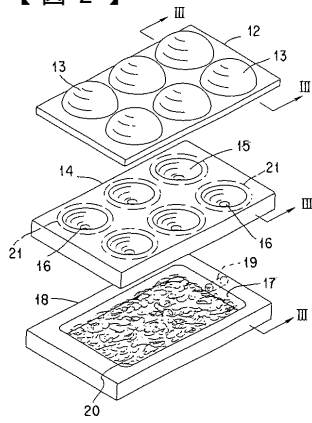
30

40

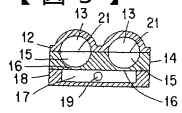
【 図 1 】



【 図 2 】



【 図 3 】



フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 白根 俊郎

(72)発明者 ロバートソン、パトリシア・メアリー・ベケット

イギリス国、シーエー１６・６ジェイアール、カンブリア、アップルパイ・イン・ウエストモーランド、ブランプトン、ブランプトン・ヒル(番地なし)、ザ・ハーマティジ、ピーク・メディカル・リサーチ

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特開平０５－０９３７２１（ＪＰ，Ａ）

特表平０６－５００４０３（ＪＰ，Ａ）

米国特許第０４９６６７５８（ＵＳ，Ａ）

欧州特許出願公開第００２９８５１３（ＥＰ，Ａ１）

特開平０５－０９３７２１（ＪＰ，Ａ）

特表平０６－５００４０３（ＪＰ，Ａ）

米国特許第０４９６６７５８（ＵＳ，Ａ）

欧州特許出願公開第００２９８５１３（ＥＰ，Ａ１）

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷，ＤＢ名)

G01N 33/48-33/98