

(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2007-501407

(P2007-501407A)

(43) 公表日 平成19年1月25日(2007.1.25)

(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 Y	
GO 1 N 37/00 (2006.01)	GO 1 N 37/00 1 O 2	
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 2 1	
	GO 1 N 33/53 U	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 49 頁)

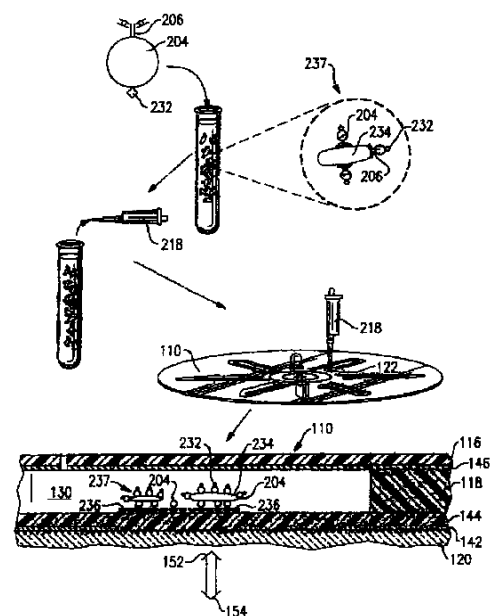
(21) 出願番号	特願2006-530721 (P2006-530721)	(71) 出願人	591177749
(86) (22) 出願日	平成16年3月2日(2004.3.2)		長岡実業株式会社
(85) 翻訳文提出日	平成17年11月7日(2005.11.7)		兵庫県西宮市西宮浜4丁目7番18号
(86) 国際出願番号	PCT/IB2004/002780	(71) 出願人	501074711
(87) 国際公開番号	W02004/106925		バースタイン テクノロジーズ, インコーポレイティド
(87) 国際公開日	平成16年12月9日(2004.12.9)		アメリカ合衆国 カルフォルニア 926
(31) 優先権主張番号	60/451,587		92 ミッション ビエジョ スイート
(32) 優先日	平成15年3月3日(2003.3.3)		H471 アリシア パークウェイ 23
(33) 優先権主張国	米国 (US)		O52
		(74) 代理人	100100549
			弁理士 川口 嘉之
		(74) 代理人	100090516
			弁理士 松倉 秀実

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 多様な細胞タイプの検出および定量に使用される方法および装置並びにこれを行うための光バイオディスクの使用

(57) 【要約】

白血球を含む分画細胞計数を実施する方法および装置、およびかかる細胞計数を行う光バイオディスクの使用。バイオディスクは、中心と外縁 (outer edge) を有する、実質的に円形の基板；基板に付随する活性層；中心と外縁の間に配置された標的領域；および抗体が標的領域の活性層上で固定化されるように、活性層に結合した、複数の捕捉抗体を含む。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

様々なタイプの細胞から所望の細胞タイプを検出および定量する方法であって、
第 1 の表面マーカを有する第 1 の細胞タイプおよび第 2 の表面マーカを有する第 2 の細胞タイプを含む、共通の表面マーカを有する、標的細胞を有する試験サンプルを用意し、
；

中心および外縁を有する実質的に円形の基板、該中心と該外縁の間に配置された標的領域、並びに、前記標的領域内の前記実質的に円形の基板に結合し、固定化された複数の捕捉抗体であって、前記標的細胞上の共通の表面マーカに対する親和性を有する複数の捕捉抗体を含む、バイオディスクを用意し、；

10

前記標的領域上に前記試験サンプルを保持させ；

前記試験サンプル中に存在する、前記第 1 および第 2 のタイプの細胞を含む前記標的細胞を、前記共通の表面マーカを通じて前記複数の捕捉抗体と結合させ；

非結合細胞を除去するために、前記標的領域を洗浄し、；

前記第 1 の表面マーカに対する特異的親和性を有する、シグナル抗体が結合したレポータ因子を用意し、；

前記標的領域上に前記レポータ因子を保持させ；

前記標的領域内の前記第 1 の細胞タイプ上の第 1 の表面マーカを、前記シグナル抗体と結合させ、それにより前記第 1 の細胞タイプをタグ付けし；

非結合レポータ因子を除去するために、標的領域を洗浄し；そして

20

前記標的領域上で電磁放射ビームを走査させ、それによりタグ付けされた第 1 の細胞タイプ細胞およびタグ付けされていない第 2 の細胞タイプ細胞の数を決定すること、
を含む、方法。

【請求項 2】

前記レポータ因子が、検出可能な物理的特性を有するビーズである、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記検出可能な物理的特性が、色、大きさ、質感、反射率、吸光度、質量、蛍光、リン光および磁気特性から成る群より選ばれる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

30

前記レポータ因子が酵素である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記標的領域上に、前記酵素と反応する酵素基質を保持し、それにより検出可能なシグナルを生成することをさらに含む、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記酵素は、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼから成る群より選ばれる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記酵素基質は、TMB（3，3'，5，5'，-テトラメチルベンジジン）、DAB（3，3'-ジアミノベンジジン）、ABTS（2，2'-アジノービス（3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸））、AEC（3-アミノ-9-エチルカルバゾール）、NBT（ニトロブルー-テトラゾリウム）、CN/DAB（4-クロロナフトール/3，3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩）および 4-CN（4-クロロ-1-ナフトール）から成る群より選ばれる、請求項 6 に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記検出可能なシグナルが、前記第 1 の細胞タイプに接着する沈殿である、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

サンプル中の様々なタイプの細胞を検出する光バイオディスクを作成する方法であって、
；

50

中心および外縁を有する基板を用意し；

前記基板に付随する情報層上に、前記ディスクの回転を制御するための、ディスクドライバアセンブリにより読み取り可能である情報をコードし、；

前記基板上の前記中心と前記外縁の間に、標的領域を形成し；

前記標的領域に活性層を設け；そして

該捕捉抗体の少なくとも一部が前記活性層に付着し、前記標的領域内に固定化されるように、前記標的領域内に、複数の捕捉抗体を保持することを含む、方法。

【請求項 10】

前記標的領域と流体連通している流体流路を形成することをさらに含む、請求項 9 に記載の方法。 10

【請求項 11】

前記複数の捕捉抗体は、前記様々なタイプの細胞の、共通の表面抗原に対する親和性を有する、請求項 10 に記載の方法。

【請求項 12】

流体流路と流体連通しているチャンバを形成することをさらに含む方法であって、該チャンバは注入ポートを有する、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 13】

請求項 12 に従って作成された光バイオディスクを用い、1 つ以上のタイプの細胞を検出および定量する方法であって、； 20

前記共通の表面抗原を有する様々なタイプの細胞を有する試験サンプルを、前記注入ポートを通して前記流体流路内に充填し、それにより前記試験サンプルを、前記標的領域内の前記複数の捕捉抗体と接触させ、；

前記標的領域内に前記様々なタイプの細胞を固定化するために、前記複数の捕捉抗体を前記共通の表面抗原と結合させ；

光バイオディスクを所定の速度および時間にて回転させ、非結合細胞を標的領域から除去し；

各抗体は群に固有なレポータ因子が付着しており、シグナル抗体の各群は、前記標的領域内の様々なタイプの細胞のうち 1 つの細胞タイプに対する親和性を有する、少なくとも 1 群のシグナル抗体を用意し； 30

前記シグナル抗体を、前記標的領域内の前記複数の捕捉抗体と接触させるために、前記少なくとも 1 群のシグナル抗体を、前記注入ポートを通して前記流体流路内に充填し、；

それぞれ対応する細胞タイプをタグ付けするために、前記少なくとも 1 群のシグナル抗体を、それぞれ対応する細胞タイプと結合させ、；

非結合シグナル抗体を除去するために、前記標的領域を洗浄し、；

前記標的領域上で電磁放射ビームを走査させ；そして

タグ付けされてない細胞および前記少なくとも 1 群のシグナル抗体によりタグ付けされた細胞の数を決定するために、前記標的領域からの帰還ビームを分析することを含む、方法。

【請求項 14】 40

様々なタイプの細胞を有する試験サンプル中の細胞タイプを検出するおよび定量する方法であって、；

中心および外縁を有する実質的に円形の基板、該中心と該外縁の間に配置された標的領域、前記標的領域内の前記実質的に円形の基板に結合し、固定化された様々なタイプの細胞のうち共通の抗原に対する親和性を有する、前記複数の捕捉抗体を含むバイオディスクを用意し；

前記標的領域上に前記試験サンプルを保持させ；

前記標的領域内に前記様々なタイプの細胞を固定化するために、前記複数の捕捉抗体を前記共通の抗原と結合させ、；

非結合細胞を除去するために、前記標的領域を洗浄し、； 50

各シグナル抗体は群に固有なレポータ因子が付着しており、シグナル抗体の各群は、前記標的領域内に固定された様々なタイプの細胞のうちの1細胞タイプに対する親和性を有する、少なくとも1群のシグナル抗体を用意し、；

前記少なくとも1群のシグナル抗体を、それぞれ対応する細胞タイプと結合させ、それにより前記それぞれ対応する細胞タイプをタグ付けし；

非結合シグナル抗体を除去するために、前記標的領域を洗浄し、；そして

タグ付けされてない細胞および前記少なくとも1群のシグナル抗体によりタグ付けされた細胞の数を決定するために、前記標的領域上で電磁放射ビームを走査させること、を含む、方法。

【請求項15】

10

サンプル中の様々な細胞タイプから細胞タイプを検出する光バイオディスクであって、；

中心および外縁を有する実質的に円形の基板；

前記基板に付随する活性層；

前記中心と前記外縁の間に配置された標的領域；および

前記活性層と結合し、前記標的領域内の前記活性層上に固定化された複数の捕捉抗体を有する、光バイオディスク。

【請求項16】

前記活性層は、ニトロセルロース、ポリスチレン、ポリカーボネート、ポリスチレン無水マレイン酸共重合体および金から成る群より選ばれる、請求項15に記載の光バイオディスク。

20

【請求項17】

前記基板はそこに付随するコードされた情報を含み、前記コードされた情報がディスクドライブアセンブリにより読み取り可能であり、それにより前記バイオディスクの回転を制御する、請求項16に記載の光バイオディスク。

【請求項18】

前記基板の表面に形成された反射層をさらに有する、請求項17に記載の光バイオディスク。

【請求項19】

前記標的領域と流体連通しているフロー流路および前記フロー流路と流体連通している入口部位をさらに有する、請求項18に記載の光バイオディスク。

30

【請求項20】

酵素をさらに有する光バイオディスクであって、前記酵素は、酵素基質にさらされたとき、入射電磁放射ビームにより検出可能なシグナルを生成する、請求項19に記載の光バイオディスク。

【請求項21】

前記複数の捕捉抗体が、細胞上の共通の表面マーカに対する親和性を有する、請求項19に記載の光バイオディスク。

【請求項22】

請求項21の光バイオディスクを用いる、所望の細胞タイプを区別および定量するための方法であって、；

40

共通の表面マーカを有する、所望の細胞タイプおよび非標的細胞タイプを含有するサンプルであって、前記非標的細胞タイプが固有な表面マーカを有するサンプルを用意し；

前記非標的細胞タイプ上の前記固有な表面マーカに対する親和性を有する抗体に付着したタグ付け因子を用意し；

前記タグ付け因子と前記サンプルを混合し；

前記タグ付け因子を、前記非標的細胞タイプ上の前記固有な表面マーカと結合させ、それにより前記非標的細胞タイプ上の前記共通の表面マーカをブロックし、前記非標的細胞タイプが前記標的領域内の前記複数の捕捉抗体と結合するのを防止し；

前記サンプルを前記標的領域内の前記捕捉抗体と接触させるために、前記サンプルを、

50

前記入口部位を通して前記フロー流路内に充填し、；

前記捕捉抗体を、前記所望の細胞タイプ上の前記共通の表面マーカと結合させ；

標的領域から非結合非標的細胞を除去するために、前記光バイオディスクを所定の速度および期間にて回転させ；および

前記標的領域内の前記目的細胞タイプの数を決断するために、前記標的領域上で電磁放射ビームを走査させること

を含む、方法。

【請求項 2 3】

前記サンプルが、リンパ球および単球を含む単核細胞である、請求項 2 2 に記載の方法。

10

【請求項 2 4】

前記共通の表面マーカが C D 4 抗原である、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

前記固有な表面マーカが C D 1 4 抗原である、請求項 2 4 に記載の方法。

【請求項 2 6】

請求項 1 2 に従って作成された光バイオディスクを用いる、様々な細胞タイプを同定および定量する方法であって、；

第 1 の表面マーカを有する第 1 の細胞タイプ、第 2 の表面マーカを有する第 2 の細胞タイプおよび第 3 の表面マーカを有する第 3 の細胞タイプを含む、共通の表面抗原を有する様々な細胞タイプを含有するサンプルを用意し；

20

前記サンプルを前記標的領域内の前記複数の捕捉抗体と接触させるために、前記サンプルを、前記注入ポートを通して前記フロー流路内に充填し、；

前記標的領域内の前記様々な細胞タイプを固定化するために、前記複数の捕捉抗体を、前記共通の表面抗原と結合させ、；

標的領域から非結合細胞を除去するために、前記光バイオディスクを所定の速度および時間にて回転させ、；

前記第 1 の表面マーカに対する親和性を有する第 1 のシグナル抗体が付着した第 1 のレポータ因子、前記第 2 の表面マーカに対する親和性を有する第 2 のシグナル抗体が結合した第 2 のレポータ因子および第 3 の表面マーカに対する親和性を有する第 3 のシグナル抗体が結合した第 3 のレポータ因子を含む、種々のタイプのレポータ因子を含有する標識溶液を用意し；

30

前記レポータ因子を前記標的領域内に固定化された前記細胞と接触させるために、前記標識溶液を、前記注入ポートを通して前記フロー流路内に充填し、；

前記第 1 の細胞タイプを前記第 1 のレポータ因子で標識するために、前記第 1 のシグナル抗体を、前記標的領域内の前記第 1 の細胞タイプ上の前記第 1 の表面マーカと結合させ、；

前記第 2 の細胞タイプを前記第 2 のレポータ因子で標識するために、前記第 2 のシグナル抗体を、前記標的領域内の前記第 2 の細胞タイプ上の前記第 2 の表面マーカと結合させ、；

前記第 3 の細胞タイプを前記第 3 のレポータ因子で標識するために、前記第 3 のシグナル抗体を、前記標的領域内の前記第 3 の細胞タイプ上の前記第 3 の表面マーカと結合させ、；

40

標的領域から非結合レポータ因子を除去するために、前記光バイオディスクを所定の速度および時間にて回転させ；そして

前記標的領域上で電磁放射ビームを走査させ、前記第 1 のレポータ因子でタグ付けされた細胞の数、前記第 2 のレポータ因子でタグ付けされた細胞の数および前記第 3 のレポータ因子でタグ付けされた細胞の数を決断すること、

を含む、方法。

【請求項 2 7】

前記サンプルが単核細胞である、請求項 2 6 に記載の方法。

50

【請求項 28】

前記共通の表面抗原が C D 4 5 抗原である、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

前記複数の捕捉抗体が抗 C D 4 5 抗体である、請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

前記第 1 の細胞タイプがリンパ球である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

前記第 1 の細胞タイプ上の前記第 1 の表面マーカが、C D 3 抗原、C D 1 9 抗原および C D 5 6 抗原から成る群より選ばれる、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

前記第 1 のシグナル抗体が、抗 C D 3 抗体、抗 C D 1 9 抗体および抗 C D 5 6 抗体から成る群より選ばれる、請求項 31 に記載の方法。

【請求項 33】

前記第 2 の細胞タイプが単球である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 34】

前記第 2 の細胞タイプ上の前記第 2 の表面マーカが、C D 1 4 抗原である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

前記第 2 のシグナル抗体が抗 C D 1 4 抗体である、請求項 34 に記載の方法。

【請求項 36】

前記第 3 の細胞タイプが好酸球である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 37】

前記第 3 の細胞タイプ上の第 3 の表面マーカが、C D 1 1 6 抗原である、請求項 36 に記載の方法。

【請求項 38】

前記第 3 のシグナル抗体が抗 C D 1 1 6 抗体である、請求項 37 に記載の方法。

【請求項 39】

試験サンプルから標的細胞を検出および定量する方法であって、：

中心および外縁を有する実質的に円形の基板、前記基板に付随する活性層、前記中心と前記外縁の間に配置された標的領域を含み、前記標的細胞に対する親和性を有し、少なくとも 1 つの捕捉抗体が前記標的領域内の前記活性層に結合し、固定化した、バイオディスクを用意し；

前記標的領域上に前記試験サンプルを保持させ；

前記試験サンプル中に存在する標的細胞を、前記捕捉抗体と結合させ；

非結合細胞を除去するために、前記標的領域を洗浄し、；

結合因子と結合する親和因子を有する、複数のシグナル抗体を用意し；

標的細胞をタグ付けするために、前記シグナル抗体を、前記シグナル抗体により認識される抗原を有する標的細胞と結合させ、；

非結合シグナル抗体を除去するために、前記標的領域を洗浄し、；

各レポータ因子が 1 つ以上の結合因子を有する、複数のレポータ因子を用意し；

前記レポータ因子を、前記標的領域内の標的細胞と結合したシグナル抗体と結合させ；

非結合レポータ因子を除去するために、前記標的領域を洗浄し、；そして

タグ付けされた細胞およびタグ付けされてない細胞の数を決定するために、前記標的領域上で電磁放射ビームを走査させ、そして帰還ビームを分析することを含む、方法。

【請求項 40】

前記レポータ因子が、光ディスク読み取り装置を用いて検出可能な物理的特性を有するビーズである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

前記物理的特性が、色、大きさ、質感、反射率、吸光度、質量、蛍光、リン光および磁

10

20

30

40

50

気特性から成る群より選ばれる、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

前記レポータ因子が酵素である、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 43】

前記標的領域上に、前記酵素と反応し、それにより検出可能なシグナルを生成する酵素基質を保持することをさらに含む、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

前記親和因子がビオチンである、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 45】

前記酵素が、前記親和因子と結合する結合因子と接合される、請求項 42 に記載の方法 10

【請求項 46】

前記結合因子が、ストレプトアビジンおよびニュートラアビジンから成る群より選ばれる、請求項 45 に記載の方法。

【請求項 47】

前記酵素が、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼおよびアルカリホスファターゼから成る群より選ばれる、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 48】

前記酵素基質は、TMB (3, 3', 5, 5', -テトラメチルベンジジン)、DAB (3, 3'-ジアミノベンジジン)、ABTS (2, 2'-アジノービス (3-エチルベンズチアゾリン-6-スルホン酸))、AEC (3-アミノ-9-エチルカルバゾール)、NBT (ニトロブルーテトラゾリウム)、CN/DAB (4-クロロナフトール/3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩) および 4-CN (4-クロロ-1-ナフトール) から成る群より選ばれる、請求項 43 に記載の方法。 20

【請求項 49】

前記検出可能なシグナルが、標的細胞に接着する沈殿である、請求項 48 に記載の方法。

【請求項 50】

前記標的細胞が、白血球細胞、腫瘍細胞、細菌、ウィルス、単細胞生物、組織由来の細胞および器官由来の細胞から成る群より選ばれる、請求項 39 に記載の方法。 30

【請求項 51】

標的細胞を検出および定量する方法であって、：

中心および外縁を有する実質的に円形の基板、中心と外縁の間に配置された標的領域および、前記基板の前記標的領域内に結合し、固定化された前記親和因子を含む、バイオディスクを用意し；

表面マーカを有する、前記標的細胞を含有するサンプルを用意し；

前記表面マーカに対する親和性を有する捕捉抗体および前記親和因子に対する親和性を有する結合因子が付着している、レポータ因子を前記サンプルと混合し；

前記レポータ因子で前記標的細胞をタグ付けするために、前記捕捉抗体を、前記標的細胞上の前期表面マーカと結合させ、； 40

前記標的領域上に、前記タグ付けされた細胞を有する前記サンプルを保持させ；

前記標的領域内の前記標的細胞を固定化するために、前記レポータ因子に付着した前記結合因子を、前記親和因子と結合させ、；

非結合細胞を除去するために、前記標的領域を洗浄し、；そして

前記レポータ因子でタグ付けされた細胞の数を決定するために、前記標的領域上で電磁放射ビームを走査させること

を含む、方法。

【請求項 52】

前記標的細胞が、白血球細胞、腫瘍細胞、細菌、ウィルス、単細胞生物、組織由来の細胞および器官由来の細胞から成る群より選ばれる、請求項 51 に記載の方法。 50

【請求項 5 3】

前記親和因子がビオチンである、請求項 5 2 に記載の方法。

【請求項 5 4】

前記結合因子が、ストレプトアビジンおよびニュートラアビジンから成る群より選ばれる、請求項 5 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

〔発明の分野〕

本発明は、包括的には細胞検定、特に光バイオディスクにより実施される細胞検定に関する。より具体的には、本発明は、白血球を含む分画細胞計数を実施する方法および装置並びにかかる細胞計数を行うための光ディスクの使用に関するが、本発明は、実施の最良の形態に記載される本明細書中の特定の実施形態に制限されない。

【0002】

〔関連出願の相互参照〕

本願は、2003年3月3日付けで出願された米国仮出願第60/451,587号（参照により本明細書中に完全に援用される）の利点を主張するものである。

【背景技術】

【0003】

〔関連技術の考察〕

多数の研究および診断場面において、細胞の混合物から特異的な細胞を単離して、分析することが必要とされている。特に、原因が、血液、髄液、骨髄、腫瘍ホモジェネート、リンパ系組織などの可能性がある場合には、必要とされる。

【0004】

血球計数は、診断、処置、および患者の健康を判断するための追跡調査の期間中に使用される。全血球計数（CBC（complete blood count））は、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均赤血球ヘモグロビン、平均赤血球ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積、血小板計数、および白血球計数を含む試験の集合体である。血球計数は、1立方mmの全血あたりの赤血球および白血球を数えあげることである。

【0005】

白血球計数（WBC（white blood cell count）、白血球）は、血液の標準サンプルの白血球の総数である。正常な健康人では、通常、WBC計数は、1マイクロリットル（ μ l）あたり4,000～10,800個の細胞である。例えば運動、ストレス、および病気といった要因により、これらの値は影響を受ける可能性がある。WBCが高いということは、感染症、白血病、又は組織の損傷を示すことがある。WBC計数が1マイクロリットルあたり1,000細胞未満になると、感染症の危険が増加する。

【0006】

分画白血球計数試験（leukocyte differential testing）は、白血球計数自体から得ることができる情報を以上の情報を収集するのに不可欠である。分画白血球計数は、疑わしい新たな感染症又は熱（CBCが正常な場合であっても）、異常に関連した疾患の疑い、異常な白血球計数、疑いのある白血病、および例えば好酸球増加症、単球増加症、又は好塩基球増加症といった他の異常を見極めるのに使用される。重度の白血球減少症がある場合（例えば薬物治療の副次的なものとして）には、白血球又は分画白血球計数の試験が、繰り返し実行されることがある。処置の間、例えば化学治療又は放射線治療の間、その処置が、癌細胞に加えて健康な血球を欠乏させているかどうかを判断するのに、血球計数は非常に重要である。

【0007】

分画白血球計数は、コンピュータ化された細胞計数計測装置によって求めることができる。このような装置は、5つの主要な白血球のタイプの総計数および割合を求める。正常な個人では、大多数の好中球（50～60%）、それに次ぐリンパ球（20～40%）、

次いで単球（2～9%）が、わずかな好酸球（1～4%）および好塩基球（0.5%～2%）と共に存在する。

【0008】

リンパ球のカテゴリ内では、さらなるリンパ球およびさらなる細胞のサブタイプが存在する。例えば、リンパ球は、大きくは、T細胞（胸腺由来リンパ球）およびB細胞（ファブリキウス嚢リンパ球（bursal-equivalent lymphocyte））に分けることができ、それぞれ主として細胞媒介性免疫および体液性免疫を担っている。白血球内の群を分類するのに、形態学的特徴が使用されてきたが、形態だけでは、リンパ球のサブタイプの多くの機能を区別するのに不十分であることが分かってきた。様々な機能を有するリンパ球を区別するために、ロゼット（rosetting）による分析、免疫蛍光顕微鏡検査による分析、酵素組
織化学による分析、および最近のモノクローナル抗体による分析を含む技法が開発された。T細胞は、表面上の2つの糖タンパク質（CD4およびCD8）を含む表面マーカの存在により識別される（CD4+T細胞およびCD8+T細胞）。CD4+ヘルパーT細胞は、抗体媒介性免疫にかかわる。CD4+ヘルパーT細胞は、B細胞により提示される抗体と結合する。その結果、抗原性物質に対する抗原を分泌する、形質細胞のクローンが発生する。T細胞は、細胞媒介性免疫にも不可欠である。CD4+細胞は、貪食マクロファージおよび樹状細胞のような抗原提示細胞（APCs）により提示される抗原と結合する。次にT細胞は、その場所に他の細胞をひきつけるリンフォカインを放出する。結果として炎症、すなわち抗原物質を囲み破壊しようとする、細胞および分子の集積が起こる。

10

【0009】

CD8+、すなわち細胞障害性／サプレッサータイプ細胞は、結合した細胞を破壊する分子を分泌する。標的細胞がウィルスに感染した場合、他の細胞に感染することができる新規なウィルス群が放出される前に通常その細胞は破壊されるため、この機能は非常に有用である。

20

【0010】

〔HIVおよびエイズ〕

ヒト免疫不全ウイルスは、CD4+T細胞に対する高い親和性を有するレトロウィルスであり、したがって、CD4+T細胞は、このウィルスの有力な標的である。後天性免疫不全症候群（AIDS）は、免疫におけるCD4+T細胞の重要性の鮮明で悲劇的な実例を提供する。ヒト免疫不全ウイルス（HIV）は、CD4分子に結合し、CD4+T細胞
に侵入および感染する。この病気が進行すると、CD4+T細胞の数は、その正常な範囲である1マイクロリットル（ μ l）あたり約1,000個よりも少なくなる。1つの説明は、患者のCD8+T細胞が感染したCD4+細胞を絶え間なく破壊しようとするこ
とであり得る。

30

【0011】

CD4+T細胞の数が1マイクロリットルあたり400個よりも少なくなると、免疫応答を高める患者の能力が劇的に低下する。患者は、身体に侵入する病原体だけではなく、通常は我々に危害を加えることなく我々の組織に存在する微生物、特に細菌に過敏になる。最終的には、患者は、カンジダ症、サイトメガロウィルス、単純ヘルペスウィルス、ニューモシスティス・カリニ肺炎、トキソプラズマ症、結核その他のような日和見感染症で
死亡する。

40

【0012】

CD4+およびCD8+T細胞の数およびCD4+／CD8+T細胞比の推定は、免疫低下症のヒト患者における免疫健康を評価するのに有用である。例えば、エイズを有する個人は、免疫におけるCD4+T細胞の重要性を示す。この病気が進行するに従って、CD4+T細胞の数は、正常範囲である約1,000細胞／ μ lを下回る。患者のCD8+T細胞が感染CD4+T細胞を破壊するに従って、非感染CD4+細胞はアポトーシスを被る。したがって、CD4+とCD8+T細胞の比は、病気の進行に対する診断マーカを提供する。米国公衆衛生局は、全ての感染者において、3～6月ごとにCD4+レベルをモニターすることを推奨している（米国においては、毎年40,000,000試験が6
50

00の試験研究所で行われている)。

【0013】

CD4およびCD8に加えて、リンパ球のサブタイプの識別に使用できる他の多くの細胞表面抗原(例えば、CD3、CD16、CD19、CD45、およびCD56)が存在する。抗体技法によってこれらの細胞表面抗原を検出することにより、診断病理学には新しい局面が加えられ、様々な技法を、ヘマトリンパ球(hematolymphoid)疾患(例えば、AIDS、白血病、およびリンパ腫)の免疫表現型(immunophenotype)の研究に利用することができる。例えば放射性免疫測定法(RIA)、酵素免疫測定法(EIA)、蛍光免疫測定法(FIA)といった従来のマイクロ免疫検定法(microimmuno-assay)は、対応した分析物(analyte)の存否を検出するために、同位体、酵素、又は蛍光物質をそれぞれ使用する。

10

【0014】

[白血病免疫表現型]

白血病における表面マーカーは、診断および予後目的のため、腫瘍系統(lineage)を同定するのを助ける。総合的白血病表現型の検査は、病歴および形態の再検討に始まり、各症例に関して一団のマーカーが選ばれる。ほとんどの場合、系統はT細胞、B細胞又はミエロイドと同定され得、診断(すなわち鑑別診断)がされ得る。

【0015】

白血病表現型検査の狙いは、腫瘍過程における細胞タイプの同定である。この表現型同定は、白血病又はリンパ腫の分類の手助けとして、細胞系統および成熟レベルの概要を示す。さらに、この表現型同定は、細胞集団が正常か異常かの同定および病気の緩和、発達および再発をモニターするため、試料中の予め特徴付けられた細胞集団の検出を支援する。

20

【0016】

白血病免疫表現型検査は、血液又は骨髓標本で行われるが、他の体液又は組織で試験されてもよい。RBC溶解方法又は密度勾配単離(例えば、フィコール・ハイパック)を用いて得られた白血球が使用され得る。可能であれば、総白血球計数および分画を処理前にを行い、細胞濃度をそれに従って調節する。

【0017】

[リンパ腫免疫表現検定]

リンパ腫における表面マーカーは、診断および予後目的のため、腫瘍系統を同定するのを助ける。総合的白血病/リンパ腫表現型の検査は、病歴および形態の再検討に始まり、各場合に関して一団のマーカーが選ばれる。ほとんどの場合、系統はT細胞、B細胞又はミエロイドと同定され得、診断(すなわち分画診断)がされ得る。

30

【0018】

リンパ腫表現型検査の狙いは、腫瘍過程における細胞タイプの同定である。この表現型同定は、リンパ腫の分類の手助けとして、細胞系統および成熟レベルの概要をしめす。さらに、この表現型同定は、細胞集団が正常か異常かの同定および病気の緩和、発達および再発をモニターするため、試料中の予め特徴付けられた細胞集団の検出を支援する。

40

【0019】

全血球計数(白血球計数を含む)を行う。血球計数は、治療に対する病気の反応の重要な指標である。これらの計数はまた、薬剤治療又は放射線療法の効果を知るために重要である。白血球計数は、通常血液中で約4,000~11,000/cm³である。総WBC計数が11,000細胞/mm³を超える場合、身体の感染に対する普通の反応である、白血球増加症と見なされる。血液計数は、薬剤が作用しているかを決定するのを助ける。伝統的には、細胞計数は、FACSスキャナのような高価な電子カウンタにより行われ、試験を行うには技術的専門知識が必要とされた。各細胞タイプのパターンは、リンパ腫が存在するか否かおよびリンパ腫のタイプを示唆する。

【0020】

[モノクローナル抗体パネル]

50

いくつかの場合では単色免疫蛍光が適切であるにもかかわらず、多くの実験室では多色免疫蛍光を使用する。決まって含まれる抗体は、CD 2、CD 3、CD 5、CD 10、CD 11c、CD 14、CD 19、CD 20、CD 22、CD 23、CD 25、CD 45、CD 103、FMC 7、重鎖、 κ および λ である。臨床的又は形態的特徴が「T」又は「NK」リンパ球障害を示す時は、以下の付加的な抗体組み合わせも行われる：CD 3 / CD 4 / CD 8、CD 7 / CD 5 / HLA-DR、CD 25 / CD 2 / CD 3、CD 16 / CD 56 / CD 19、CD 57 / CD 8 / CD 3、TCR α - β / δ - γ / CD 3。

【0021】

抗体技法によって細胞関連抗原を検出できることにより、診断病理学には新しい局面が加えられた。様々な技法を、ヘマトリンパ球疾患の免疫表現型の研究に利用することができる。しかし、様々な癌に加え、後天性免疫不全症候群およびT細胞白血病等のウイルスによる病気を含み、数々の病気を広く検出する方法において、抗体抗原反応を利用した免疫検定法のさらなる開発が必要とされる。当業者には明確であるように、現発明の検定法および光バイオディスクシステムは、かかる免疫検定を行うのに用いられてもよい。

【0022】

放射性免疫測定法（RIA）、酵素免疫測定法（EIA）、蛍光免疫測定法（FIA）のような従来のマイクロ免疫検定法は、同位体、酵素、又は蛍光物質と特異的にそれぞれ反応する、対応した抗体又は抗原の存否を検出するために、当該同位体、酵素、又は蛍光物質をそれぞれ使用する。しかしながら、上記の方法には限界および欠点がある。RIAは、特別な設備、予備対策、半減期の制限、および種々の他の要因を必要とする。着色又は発光により標識を測定する際に酵素又は蛍光物質を用いる方法は、過剰な未結合且つ未反応の試薬を除去するために幾つかの洗浄工程を必要とすることに加えて、比色又は蛍光反応を検出するために高精度で複雑な機器を必要とする。さらに、細胞（特にリンパ球および癌細胞）および同様の試料を検出する上記の方法の適用には、高性能な調製、検出、および分析の技術の改良が必要である。

【0023】

細胞表面抗原に特異的な蛍光抗体の使用に関して開発された強力な手段は、蛍光活性化細胞分類（FACS）の技法である。これは、非常に信頼性が高く、高速且つ高精度の方法である。フローサイトメトリは、自動化されたおよび定量的な、最も実用的な方法である。フローサイトメトリ分析のためのサンプルの主要な要件は、サンプルが単分散性の懸濁液中にあり、所望の細胞が蛍光マーカで標識されることである。しかし、これは非常に高価な試験であり、システム全体が、臨床分析実験室および高価な機器において、訓練された技術者により扱われる必要がある。モノクローナル抗体は、多数の細胞を客観的に定量するフローサイトメトリにおいて、別々のプローブとして用いられる。

【0024】

さらに、フローサイトメトリの基礎的な欠点は、一度分析された細胞を、繰り返し分析又はさらなる調査（例えば希少細胞（rare event cell）の顕微鏡検査）に用いることができなくなることである。フローサイトメトリに関する利点および欠点を有する多くの代替的技術が開発されたが、全て、それぞれに特異的な問題へと導いた。

【0025】

表面マーカー分析は非常に有用な実験手段であり、特に、白血病、リンパ腫、および免疫不全症の研究において非常に有用である。抗体ベースのマイクロアレイ技術は、確かに、特に臨床診断における、血液サンプルおよび組織サンプルを含む、サンプル中の特異的抗原の識別に関する最新技術である。ほとんどの診断試験は、限られたサンプル集団（癌、白血病、リンパ腫、甲状腺疾患など）のみの判定を必要とする。したがって、1回の試験において臨床的に関連するすべてのパラメータを同時に測定するにあたり、技術の小型化によりごく少量の血液サンプルしか必要でないこと、および実験室職員の時間および費用が節約されることは、その費用効率、労働効率、および簡単さにより、病院の実験室およびポイントオブケア設備にとって極めて魅力的である可能性が高い。

【0026】

従来技術のシステムおよび細胞計数方法に対する代替として、本発明者等は、細胞（特に、血液およびCSFのような他の体液に感染する寄生生物および病原体を含む、血球）の分析、検出および定量をする簡便且つ安価なシステムを開発した。様々な血球、寄生生物および病原体を同定するため、関連する情報並びにシグナル処理方法およびソフトウェアが開発された。

【0027】

従来の方法およびシステムと比較して、本発明者等は、簡便、小型、超高感度および安価な、細胞分析をするシステムを開発した。このシステムは、情報およびシグナル処理方法およびソフトウェアに加えて、光バイオディスク、関連検出アセンブリを使用する。

【発明の開示】

10

【0028】

〔発明の概要〕

マイクロテクノロジーは、特に細胞タイプ、寄生生物、病原体および他の生物学的物質を同定する診療的診断において、大変重要である。本発明は、光バイオディスク上で全血球中の分画白血球計数を行うために、マイクロテクノロジーを用いる。さらに、本発明は、血球の画像化、分画白血球計数を行うことおよび関連した処理方法およびソフトウェアを対象とする。

【0029】

本試験および検定は、2通りで行われ得る。第一の方法は、光バイオディスク上に位置する特殊なチャンネル中の血球の光学的画像化の原理に基づく。約7 μ lの全血が、ディスク上の特殊に設計されたチャンネル内に注入される。これらの様々な白血球サブタイプを同定し且つ白血球分画計数を生じる細胞認識ソフトウェアで、画像を分析する。第二の方法は、特異的な細胞に対する細胞特異的抗体を用いた特異的細胞捕捉に基づく。この特定の場合では、抗体はリンパ球（CD4、CD2、CD19）、単球（CD14）、好酸球（CD15）等を対象とする。これらの白血球サブタイプ特異的抗体は、フローチャンバを含むバイオディスク内の固相表面に、集合／接着する。

20

【0030】

細胞タイプの同定および定量の特異性を増大するために、捕捉された細胞は、微粒子又は所望の細胞タイプ若しくは不要な細胞若しくは汚染細胞を対象とする特異的抗体で被覆されたビーズによりタグ付けされ、ビーズ細胞複合体を形成してもよい。この方法は、捕捉領域における、特異的標的細胞と汚染細胞の区別を可能にする。細胞の同定におけるビーズの使用に関するさらなる詳細を、図18～図24と共に以下に検討する。

30

【0031】

バイオディスクドライブアセンブリは、ディスクの回転、ディスク上に記憶された任意の符号化情報の読み出しおよび処理、並びにバイオディスクのフローチャンバの細胞捕捉領域の分析に使用される。バイオディスクドライブには、バイオディスクを回転させるモータと、ディスクの回転速度を制御するコントローラと、ディスクからの帰還信号（return signal）を処理するプロセッサと、処理されたシグナルを分析する分析装置とが設けられる。回転速度は、可変であり、回転の速さと時間の双方に応じて厳密に回転速度を制御することができる。また、バイオディスクは、フローチャンバおよび標的領域の試験物質が、ドライブの読み取りビームによって呼びかけ（interrogated）を受け、分析装置によって分析される前又はその後において、当該バイオディスクに情報を書き込むことに利用することもできる。バイオディスクは、ディスクの回転を制御する符号化情報と、行われる細胞免疫型検定の型に特有の情報の処理を提供する符号化情報と、その結果をバイオドライブに関連したモニタに表示する符号化情報とを含むことができる。

40

【0032】

全体として分画細胞計数プロトコルは、また特に分画白血球計数プロトコルは、CDフォーマット、CD-Rフォーマット、DVDフォーマット又はDVD-Rフォーマット、これらのフォーマットの変改版およびそれらの代替物に対して開発される。ドライブの読み取りビーム又は呼びかけビーム（interrogation beam）は、分析サンプル内の様々な細

50

胞を検出し、分画細胞計数ソフトウェアにより分析を受けることができる画像を生成する。

【0033】

これらの単調で根気のいる細胞計数検定を行うには、微視的方法又は高機能な細胞計数器が不可欠である。本方法は、光バイオディスクおよび関連するアセンブリを使用する。様々な細胞タイプの光画像および分析チャンバ内で結合されていない（free）ビーズ-細胞複合体、又は、特異的抗体方法によって捕捉されたそれらの光画像が、細胞認識ソフトウェアプログラムによって生成され分析され、この細胞認識ソフトウェアプログラムは、血液又は他の体液内の様々な細胞要素をそれらの光散乱特性により識別する。本方法は、分析の前に、細胞染色、RBC削除、又は他の根気のいるプロトコルといったサンプルの処理をなんら要しないようにできる。これらの方法は、以下に図面と共に詳細に述べる、上部検出器、底部検出器、イベント計数器、若しくは細胞計数器を使用する光ディスク読み取り装置を用いる微視的分析又は細胞検出を含む。

10

【0034】

本発明の分画細胞計数法の正確度および精密度をさらに増大するために、種々の細胞集団をタグ付け又は標識してもよい。これらのタグは、例えばミクロスフェア、蛍光標識抗体および酵素結合抗体を含んでよい。サンプルおよび／又はレポータ分子のタグ付け又は標識を伴う他の態様に関するさらなる詳細は、例えば、本発明の譲渡人に譲渡されて同時係属中である、2002年4月11日付けで出願された「Multi-Parameter Assays Including Analysis Discs and Methods Relating Thereto」と題する米国出願番号10/121,281号（参照により本明細書中に完全に援用される）中に開示されている。

20

【0035】

本発明又はその様々な態様は、以下の同一の譲受人に譲渡された同時係属中の特許出願に開示されるディスク、検定、およびシステムにおいて容易に実施されるか、それに適応されることができる。1999年8月23日付けで出願された「Methods and Apparatus for Analyzing Operational and Non-operational Data Acquired from Optical Discs」と題する米国特許出願第09/378,878号、1999年8月23日付けで出願された「Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers」と題する米国仮特許出願第60/150,288号、1999年10月26日付けで出願された「Trackable Optical Discs with Concurrently Readable Analyte Material」と題する米国特許出願第09/421,870号、2000年8月21日付けで出願された「Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers」と題する米国特許出願第09/643,106号、2001年11月15日付けで出願された「Optical Biodiscs with Reflective Layers」と題する米国特許出願第09/999,274号、2001年11月16日付けで出願された「Methods and Apparatus for Detecting and Quantifying Lymphocytes with Optical Biodiscs」と題する米国特許出願第09/988,728号、2001年11月19日付けで出願された「Methods and Apparatus for Blood Typing with Optical Bio-discs」と題する米国特許出願第09/988,850号、2001年11月20日付けで出願された「Apparatus and Methods for Separating Agglutinants and Disperse Particles」と題する米国特許出願第09/989,684号、2001年11月27日付けで出願された「Dual Bead Assays Including Optical Biodiscs and Methods Relating Thereto」と題する米国特許出願第09/997,741号、2001年11月30日付けで出願された「Apparatus and Methods for Separating Components of Particulate Suspension」と題する米国特許出願第09/997,895号、2001年12月7日付けで出願された「Optical Discs for Measuring Analytes」と題する米国特許出願第10/005,313号、2001年12月10日付けで出願された「Methods for Detecting Analytes Using Optical Discs and Optical Disc Readers」と題する米国特許出願第10/006,371号、2001年12月10日付けで出願された「Multiple Data Layer Optical Discs for Detecting Analytes」と題する米国特許出願第10/006,

30

40

50

620号、2001年12月10日付けで出願された「Optical Disc Assemblies for Performing Assays」と題する米国特許出願第10/006,619号、2001年12月14日付けで出願された「Detection System For Disk-Based Laboratory and Improved Optical Bio-Disc Including Same」と題する米国特許出願第10/020,140号、2001年12月21日付けで出願された「Surface Assembly for Immobilizing DNA Capture Probes and Bead-Based Assay Including Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto」と題する米国特許出願第10/035,836号、2002年1月4日付けで出願された「Dual Bead Assays Including Covalent Linkages for Improved Specificity and Related Optical Analysis Discs」と題する米国特許出願第10/038,297号、2002年1月10日付けで出願された「Optical Disc Analysis System Including Related Methods for Biological and Medical Imaging」と題する米国特許出願第10/043,688号、2002年1月14日付けで出願された「Optical Disc Analysis System Including Related Signal Processing Methods and Software」と題する米国仮特許出願第60/348,767号、2002年2月26日付けで出願された「Methods for DNA Conjugation Onto Solid Phase Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems」と題する米国特許出願第10/086,941号、2002年2月28日付けで出願された「Methods for Decreasing Non-Specific Binding of Beads in Dual Bead Assays Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems」と題する米国特許出願第10/087,549号および2002年3月14日付けで出願された「Dual Bead Assays Using Cleavable Spacers and/or Ligation to Improve Specificity and Sensitivity Including Related Methods and Apparatus」と題する米国特許出願第10/099,256号。

【0036】

これら全ての出願は、参照により本明細書中に完全に援用される。したがってこれらは、本明細書中でその全体が繰り返されるのと同様に、本発明を支持する背景および関連開示を提供する。

【0037】

本発明のさらに別の目的は、当該目的に寄与する別の特徴および当該目的から生じる利点と共に、以下の本発明の好ましい実施形態の説明から明らかになる。この好ましい実施形態は、添付図面に示される。添付図面では、全体を通して、同じ参照番号は同じ構成要素を示す。

【発明を実施するための最良の形態】

【0038】

[発明の説明]

本発明は、ディスクドライブシステム、光バイオディスク、細胞検定および定量検定を対象とする。より具体的には、本発明は、例えば白血球を含む、細胞定量のための生物学的サンプル中にある様々な細胞集団を分画する方法およびかかる細胞定量を行うための光ディスクの使用に関するが、本発明は、実施の最良の形態に記載される本明細書中の特定の実施形態に制限されない。本発明の各態様は、さらに詳細に以下に検討される。

【0039】

ドライブシステムおよび関連したディスク

図1は、本明細書で開示される分画細胞計数を行うために実施される本発明による光バイオディスク110の斜視図である。本光バイオディスク110は、光ディスクドライブ112および表示モニタ114と共に示される。

【0040】

図2は、光バイオディスク110の一実施形態の主要な構造上の要素の分解斜視図である。図2は、本発明で使用する事ができる反射領域の光バイオディスク110（以下「反射型ディスク」という）の例である。主要な構造上の要素には、キャップ部116、接着部材118および基板120が含まれる。キャップ部116は、1つ以上の注入ポート122および1つ以上の排出ポート124を備える。キャップ部116は、ポリカーボネ

ートから形成することができ、図2の斜視図から見られるように、その底部は、反射面146（図4により良好に図示される）で被覆されることが好ましい。好ましい形態では、トリガマーキング126は反射層142（図4により好適に図示される）の表面に含まれる。トリガマーキング126には、バイオディスクの3つの層すべての透明窓、不透明区域、又は反射区域若しくは半反射区域が含まれ得る。これらの透明窓、不透明区域、又は反射区域若しくは半反射区域は、情報により符号化される。この情報は、図10に示すように、プロセッサ166にデータを送信し、次に、図6および図10に示すように、呼びかけビーム又は入射ビーム152の操作機能とやり取りを行う。図2に示す第2の要素は、流体回路128、すなわちU字型流路が形成された接着部材118である。この流体回路128は、膜に刻印するか、又は、膜を切り取ってプラスチック薄膜を除去し、図示するような形状を形成することにより形成される。流体回路128のそれぞれは、フロー流路130および帰還流路132を備える。図2に示す流体回路128の幾つかは、混合チャンバ134を備える。2つの異なる型の混合チャンバ134が示されている。第1のものは、フロー流路130に対して対称的に形成される対称混合チャンバ136である。第2のものは、オフセット混合チャンバ138である。このオフセット混合チャンバ138は、図示するように、フロー流路130の一方の側に形成される。図2に示す第3の要素は、標的領域又は捕捉領域140を備えた基板120である。基板120は、ポリカーボネート製であることが好ましく、図4に示すように、その最上部には反射層142が保持されている。標的領域140は、図示した形状、あるいは、任意の所望の形状に反射層142を除去することにより形成される。あるいは、標的領域140は、反射層142を施す前に標的領域140区域をマスクすることを含むマスク技法によって形成することもできる。反射層142は、例えばアルミニウム又は金といった金属から形成することができる。

【0041】

図3は、図2に示す光バイオディスク110の平面図であり、ディスク内に位置する流体回路128、標的領域140、およびトリガマーキング126が見えるように、キャップ部上の反射層142が、透明で示されたキャップ部116上に示されている。

【0042】

図4は、本発明の一実施形態による反射領域型の光バイオディスク110の拡大斜視図である。この図は、光バイオディスク110の様々な層の一部を含み、この一部は、それぞれの主要な層、基板、コーティング、又は膜の部分断面図を示すために切り取られている。図4は、反射層142で被覆された基板120を示す。反射層142上には、活性層144が施される。好ましい実施形態では、活性層144は、ポリスチレンから形成することができる。あるいは、ポリカーボネート、金、活性ガラス（activated glass）、変性ガラス（modified glass）、又は変性ポリスチレン、例えばポリスチレン無水マレイン酸共重合体（polystyrene-co-maleic anhydride）を使用することができる。さらに、ヒドロゲルを使用することができる。あるいは、別にこの実施形態に示すように、活性層144上には、プラスチック接着部材118を施す。プラスチック接着部材118の露出部分は、切り取られたか、又は、刻印されたU字型を示し、このU字型が流体回路128を生成する。本バイオディスクのこの反射領域の実施形態の最後の主要な構造上の層は、キャップ部116である。キャップ部116は、その底部に反射面146を備える。反射面146は、アルミニウム又は金といった金属から作成することができる。

【0043】

図5は、本発明による透過型の光バイオディスク110の主要な構造上の要素の分解斜視図である。この透過型の光バイオディスク110の主要な構造上の要素も、同様に、キャップ部116、接着部材118および基板120の層を備える。キャップ部116は、1つ以上の注入ポート122および1つ以上の排出ポート124を備える。キャップ部116は、ポリカーボネート層から形成することができる。図6および図9に最もよく示すように、オプションのトリガマーキング126を、薄い半反射層143の表面に備えることができる。トリガマーキング126には、バイオディスクの3つの層すべての透明窓、

不透明区域、又は反射区域若しくは半反射区域が含まれ得る。これらの透明窓、不透明区域、又は反射区域若しくは半反射区域は、情報により符号化される。この情報は、図10に示すように、プロセッサ166にデータを送信し、次に、図6および図10に示すように、呼びかけビーム152の操作機能とやり取りを行う。

【0044】

図5に示す第2の要素は、流体回路128、すなわちU字型流路が形成された接着部材118である。この流体回路128は、膜に刻印するか、又は、膜を切り取ってプラスチック薄膜を除去し、図示するような形状を形成することにより形成される。流体回路128のそれぞれは、フロー流路130および帰還流路132を備える。図5に示す流体回路128の幾つかは、混合チャンバ134を備える。2つの異なる型の混合チャンバ134が示されている。第1のものは、フロー流路130に対して対称的に形成される対称混合チャンバ136である。第2のものは、オフセット混合チャンバ138である。このオフセット混合チャンバ138は、図示するように、フロー流路130の一方の側に形成される。

10

【0045】

図5に示す第3の要素は、標的領域又は捕捉領域140を備えることができる基板120である。基板120は、ポリカーボネート製であることが好ましく、図6に示すように、その最上部には薄い半反射層143が保持されている。図5および図6に示すディスク110の基板120に関連した半反射層143は、図2、図3、および図4に示す反射型ディスク110の基板120上の反射層142よりもかなり薄くなっている。この薄い半反射層143により、呼びかけビーム152の一部は、図12に示すように、透過型ディスクの構造上の層を透過することができる。薄い半反射層143は、例えばアルミニウム又は金といった金属から形成することができる。

20

【0046】

図6は、図5に示す光バイオディスク110の透過型の実施形態の基板120および半反射層143の拡大斜視図である。薄い半反射層143は、例えばアルミニウム又は金といった金属から作成することができる。好ましい実施形態では、図5および図6に示す透過型ディスクの薄い半反射層143は、約100~300 Åの厚さであり、400 Åを超えない。この薄い半反射層143により、入射ビーム又は呼びかけビーム152の一部は、半反射層143を貫通して、通過することが可能になり、それによって、図10に示す上部検出器158によって検出される。一方、その光の一部が反射されて、すなわち入射経路に沿って戻される。以下に示すように、表1は、金の薄膜の厚さに対する反射特性および透過特性を示している。金の薄膜層は、800 Åよりも厚くなると、完全反射となる。一方、光が金の薄膜を透過する閾値不透明度は、約400 Åである。

30

【0047】

【表 1】

表 1

Au 薄膜の反射及び透過（絶対値）			
厚さ (オングストローム)	厚さ (nm)	反射率	透過率
0	0	0.0505	0.9495
50	5	0.1683	0.7709
100	10	0.3981	0.5169
150	15	0.5873	0.3264
200	20	0.7142	0.2057
250	25	0.7959	0.1314
300	30	0.8488	0.0851
350	35	0.8836	0.0557
400	40	0.9067	0.0368
450	45	0.9222	0.0244
500	50	0.9328	0.0163
550	55	0.9399	0.0109
600	60	0.9448	0.0073
650	65	0.9482	0.0049
700	70	0.9505	0.0033
750	75	0.9520	0.0022
800	80	0.9531	0.0015

10

20

【0048】

表 1 に加えて、図 7 は、金の厚さに基づく薄い半反射層 143 の反射特性および透過特性の逆の関係のグラフ表示を提供する。図 7 に示すグラフで使用される反射値および透過値は、絶対値である。

【0049】

図 8 は、図 5 および図 6 に示す透過型光バイオディスク 110 の平面図である。透明なキャップ部 116 は、ディスク内に位置する流体流路、トリガマーキング 126、および標的領域 140 を見せている。

30

【0050】

図 9 は、本発明の透過型ディスクの実施形態による光バイオディスク 110 の拡大斜視図である。このディスク 110 は、その様々な層の一部が、それぞれの主要な層、基板、コーティング、又は膜の部分断面図を示すために切り取られて示されている。図 9 は、透明なキャップ部 116 と、基板 120 上の薄い半反射層 143 と、トリガマーキング 126 とを有する透過型ディスクフォーマットを示している。トリガマーキング 126 は、キャップの上部に配置された不透明材を備える。あるいは、トリガマーキング 126 は、ディスクの薄い反射層 143 にエッチングされた透明な非反射窓、又は、図 10 に示すトリガ検出器 160 から到来するシグナルを吸収する、すなわち反射しない任意のマークによって形成することができる。また、図 9 は、図示した形状、あるいは、任意の所望の形状で、指定した区域をマーキングすることにより形成される標的領域 140 も示している。標的領域 140 を示すマーキングは、基板 120 上の薄い半反射層 143 又は（ディスクの下）基板 120 の底部に作成することができる。あるいは、標的領域 140 は、標的領域 140 を除く薄い半反射層 143 全体をマスクすることを含むマスク技法によって形成することもできる。この実施形態では、標的領域 140 は、薄い半反射層 143 上のシルクスクリーンインクによって作成することができる。活性層 144 は、薄い半反射層 143 上に施される。好ましい実施形態では、活性層 144 は、2% のポリスチレンからなる 40～200 μm の厚さの層である。あるいは、ポリカーボネート、金、活性ガラス、変性ガラス、又は変性ポリスチレン、例えばポリスチレン無水マレイン酸共重合体を使用することができる。さらに、ヒドロゲルを使用することができる。この実施形態に示すよ

40

50

うに、活性層 144 上には、プラスチック接着部材 118 が施される。プラスチック接着部材 118 の露出部分は、切り取られたか、又は、刻印された U 字型を示し、この U 字型が流体回路 128 を生成する。本バイオディスク 110 のこの透過型の実施形態の最後の主要な構造上の層は、透明なキャップ部 116 である。このキャップ部 116 は、注入ポート 122 および排出ポート 124 を備える。

【0051】

図 10 は、光コンポーネント 148 と、入射ビーム又は呼びかけビーム 152 を生成する光源 150 と、帰還ビーム 154 と、透過ビーム 156 とを示すブロック斜視図である。図 4 に示す反射バイオディスクの場合、帰還ビーム 154 は、光バイオディスク 110 のキャップ部 116 の反射面 146 から反射される。本光バイオディスク 110 のこの反射型の実施形態では、帰還ビーム 154 は、底部検出器 157 によって検出され、シグナル要素が存在する場合には分析される。他方、透過バイオディスクフォーマットでは、透過ビーム 156 が、上部検出器 158 によって検出され、シグナル要素が存在する場合には分析も行われる。透過型の実施形態では、上部検出器 158 として、光検出器を使用することができる。

10

【0052】

また、図 10 は、ディスク上のトリガマーキング 126 とトリガ検出器 160 とを含むハードウェアトリガメカニズムも示している。このハードウェアトリガメカニズムは、反射バイオディスク（図 4）および透過バイオディスク（図 9）の双方で使用される。トリガメカニズムにより、プロセッサ 166 は、呼びかけビーム 152 がそれぞれの標的領域 140 にある場合にのみデータを収集することが可能になる。さらに、透過バイオディスクシステムでは、ソフトウェアトリガも使用することができる。このソフトウェアトリガは、呼びかけビーム 152 が、それぞれの標的領域 140 の端部に当たるとすぐに、底部検出器を使用して、プロセッサ 166 にシグナルを送り、データを収集する。さらに、図 10 は、駆動モータ 162 と、光バイオディスク 110 の回転を制御するコントローラ 164 とを示している。また、図 10 は、別の場合に実施されるプロセッサ 166 および分析装置 168 を示しており、これらは、帰還ビーム 154 と、透過型光バイオディスクに関連した透過ビーム 156 とを処理する。

20

【0053】

図 11 は、本発明による光バイオディスク 110 の反射型ディスクの実施形態の部分断面図である。図 11 は、基板 120 および反射層 142 を示している。上述したように、反射層 142 は、例えば、アルミニウム、金、又は他の適切な反射材といった材料から作成することができる。この実施形態では、基板 120 の上面は滑らかになっている。また、図 11 は、反射層 142 上に施される活性層 144 も示している。また、図 11 に示すように、標的領域 140 は、所望の場所の反射層 142 の区域又は一部を除去することによるか、あるいは、反射層 142 を施す前に所望の区域をマスクすることにより形成される。図 11 にさらに示すように、プラスチック接着部材 118 が活性層 144 上に施される。また、図 11 は、キャップ部 116、および、当該キャップ部 116 に関連した反射面 146 も示している。したがって、キャップ部 116 が、所望の切り取り形状を備えたプラスチック接着部材 118 に貼付されると、それによって、フロー流路 130 が形成される。図 11 に示す矢印により図示するように、入射ビーム 152 の経路は、最初、ディスク 110 の下から基板 120 の方向に向けられている。次いで、この入射ビームは、反射層 142 の近くの一点にフォーカスする。このフォーカスは、反射層 142 が存在しない場所では、標的領域 140 で起こるので、入射は、活性層 144 を通ってフロー流路 130 内に入る経路に沿って進み続ける。その後、入射ビーム 152 は、上方に進み続けてフロー流路を横切り、最終的には反射面 146 に入射する。この時点で、入射ビーム 152 は、入射経路に沿って戻され、すなわち反射されて帰還し、それによって帰還ビーム 154 を形成する。

30

40

【0054】

図 12 は、本発明によるバイオディスク 110 の透過型の実施形態の部分断面図である

50

。図12は、透明キャップ部116と、基板120上の薄い半反射層143とを有する透過型ディスクフォーマットを示している。また、図12は、薄い半反射層143上に施された活性層144も示している。好ましい実施形態では、この透過型ディスクは、約100～300オングストロームの厚さの例えばアルミニウム又は金といった金属から作成された薄い半反射層143を有し、400オングストロームを越えることはない。この薄い半反射層143により、図10に示す光源150からの入射ビーム又は呼びかけビーム152の一部は、ディスクを貫通して上方に通過することが可能になり、上部検出器158によって検出される。一方、光の一部は、反射され、入射ビームと同じ経路に沿って逆方向に戻る。この配置では、帰還ビーム又は反射ビーム154は、半反射層143から反射される。したがって、このようにして、帰還ビーム154はフロー流路130に入ることはない。反射光又は帰還ビーム154は、図13および図14と共に、より詳細に説明するように、半反射層143内又は半反射層143上に形成される事前に記録された情報トラック上の入射ビーム152を追跡するために使用することができる。図12に示すディスクの実施形態では、画定された標的領域140が存在してもよいし、存在しなくてもよい。標的領域140は、基板120上の薄い半反射層143上に作成される直接マーキングによって生成することができる。これらのマーキングは、シルクスクリーニング又は任意の同等の方法を使用して形成することができる。標的領域を画定するのに物理的な印が使用されない実施形態では、フロー流路130は、実際には、検査特徴 (investigational feature) の検査が行われる限られた標的領域として使用されてもよい。

【0055】

図13は、本発明によるバイオディスク110の反射型ディスクの実施形態のトラックを横切った断面図である。この図は、ディスクの半径およびフロー流路に沿って縦方向に描かれている。図13は、基板120および反射層142を含む。この実施形態では、基板120は一連の溝170を備える。これらの溝170は、ディスクの中心近くから外側端部に向かって伸びる螺旋形状である。溝170は、呼びかけビーム152がディスクの螺旋溝170に沿って追従できるように実施される。この型の溝170は、「ウォブル溝」として知られている。波状の、又は、波打つ側壁を有する底部は、溝170を形成する一方、高くなった、又は、立ち上がった部分は、隣接する溝170を螺旋状に分離する。この実施形態で溝170上に施された反射層142は、図示するように、性質上等角である。また、図13は、反射層142上に施された活性層144も示している。図13に示すように、標的領域140は、所望の場所の反射層142の区域又は一部を除去することによるか、あるいは、反射層142を施す前に所望の区域をマスクすることにより形成される。図13にさらに示すように、プラスチック接着部材118が活性層144上に施される。また、図13は、キャップ部116および当該キャップ部116に関連した反射面146も示している。したがって、キャップ部116が、所望の切り取り形状を備えたプラスチック接着部材118に貼付されると、それによって、フロー流路130が形成される。

【0056】

図14は、図12に示す本発明によるバイオディスク110の透過型ディスクの実施形態のトラックを横切った断面図である。この図は、ディスクの半径およびフロー流路に沿って縦方向に描かれている。図14は、基板120および薄い半反射層143を示している。この薄い半反射層143により、光源150からの入射ビーム又は呼びかけビーム152は、ディスクを貫通して通過することが可能になり、上部検出器158によって検出される。一方、光の一部が反射され、帰還ビーム154の形で戻る。薄い半反射層143の厚さは、ディスク読み取り装置がその追跡能力を維持するのに必要とされる反射光の最小量によって決定される。この実施形態の基板120は、図13で論考した基板と同様に、一連の溝170を備える。この実施形態の溝170も、ディスクの中心近くから外側端部に向かって伸びる螺旋形状であることが好ましい。溝170は、呼びかけビーム152がこの螺旋に沿って追従できるように実施される。また、図14は、薄い半反射層143上に施された活性層144も示している。図14にさらに示すように、プラスチック接着

部材 118 が、活性層 144 上に施される。また、図 14 は、反射面 146 を有さないキャップ部 116 も示している。したがって、キャップ部が、所望の切り取り形状を備えたプラスチック接着部材 118 に貼付されると、それによって、フロー流路 130 が形成され、入射ビーム 152 の一部は、ほぼ反射されることなく、フロー流路 130 を通過することができる。

【0057】

図 15 は、反射型ディスクの全層と、反射型ディスクの最初の反射特性とを示す図 11 と同様の図である。図 16 は、透過型ディスクの全層と、透過型ディスクの最初の屈折特性とを示す図 12 と同様の図である。これらの切断面は、溝 170 に沿って切断されたものである。図 15 および図 16 には、溝 170 は見えない。図 15 および図 16 は、これらの実施形態の溝 170 に垂直に位置する狭いフロー流路 130 が存在することを示している。図 13、図 14、図 15、および図 16 は、それぞれの反射型ディスクおよび透過型ディスクの全層を示している。これらの図では、入射ビーム 152 が、最初に、基板 120 と相互作用することが示されている。基板 120 は、入射ビームの経路を図示するように変更して、反射層 142 又は薄い半反射層 143 上でビーム 152 のフォーカスを提供する屈折特性を有する。

【0058】

全血液からの所望の細胞の単離

図 17 は、上記で説明した光バイオディスクシステムを用いた、クラスタ分化 (CD: cluster marker) マーカ検定のための血液サンプルの調整分析を示す、画像的フローチャートである。工程 1 において、血液 (4~8 ml) を直接 4 又は 8 ml の Becton Dickinson CPT Vacutainer (商標) に回収し、EDTA、クエン酸デキストロース (ACD) 又はヘパリンのような抗凝血剤を加える。本発明の別の実施形態における相当する工程では、抗凝血剤中の 3 ml の血液を、Histopaque 1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, MO) のような分離勾配 176 を含有するチューブ 172 中にかぶせる。いかなる場合でも、回収から 2 時間以内で血液サンプル 174 を使用することが好ましい。分離勾配 176 とそこにかぶさった血液サンプル 174 を含有するチューブ 172 を、水平ロータおよび回転バケツを有するバイオハザード遠心分器中で、1,500~1,800 RCF (2,800 rpm) 室温で 25 分間遠心分離する。遠心分離後、単球細胞 (MNC) 分画 180 上約 2 mm の血漿を残して、血漿層 178 を除去する (工程 2)。MNC 層 180 を回収し、リン酸緩衝液 (PBS) で洗浄する。細胞を 300 RCF (1,200 rpm) で 10 分間、室温で遠心分離によりペレットにし、残っていた血小板を除去する。上清を除去し、チューブを軽く叩くことにより、MNC ペレット 180 を PBS 中に再懸濁する。最終ペレット 180 を再懸濁し (工程 3)、バイオディスク 110 のフロー流路 130 の厚さに応じて、10,000~30,000 細胞/ μ l の細胞計数になるまで PBS で希釈する。代替的には、不要な細胞の凝集および沈殿を生じる生理活性試薬を用いて、全血液から T-リンパ球を単離してもよい。生理活性試薬の非限定的な例は、PrepaCyt (BioE, St. Paul, MN) である。PrepaCyt は、顆粒球、血小板、単球、B 細胞 (80% まで)、ナチュラルキラー (NK) 細胞 (80% まで) を選択的に除去することで、全血液から T-リンパ球を単離することを可能にする。光ディスクベースの細胞検定において用いられる、T-リンパ球を単離する方法に伴う他の態様に関連するさらなる詳細は、2002 年 5 月 22 日付けで出願された「Method for Isolation of Lymphocytes for Use in Differential Cell Counting and Use of Optical Bio-disc for Performing Same」と題する米国仮出願第 60/382,327 号 (本明細書中に完全に援用される) において開示されている。

【0059】

細胞の区別、検出および定量

1 種の抗体で被覆された表面を用いた細胞捕捉は、特定のマーカを有する (ほとんど) すべての細胞を捕捉する。特異的な細胞タイプ、例えばヘルパー T 細胞を捕捉することを目的とすると、1 つのマーカを用いるだけでは不十分なことがある。多重マーカを用いる

10

20

30

40

50

フローサイトメトリのような技術では、すべての選択されたマーカを有する細胞のみ計数する。従ってヘルパーT細胞と単球細胞（両者はCD4抗体を運搬する）は、CD3（CD4細胞についてのみ）又はCD19（単球細胞についてのみ）のような2次マーカによって識別される。このことは、単球も一緒に捕捉するのを避けられないため、1つの抗体による表面捕捉方法において特有の問題を生じる。

【0060】

2次細胞集団が、表面を被覆された抗体に結合するのを避けることは困難であるが、2次抗体に結合するシグナル因子で印をつけることにより、それらを識別することが可能である。例えば、このシグナル因子は、所定の波長で光を吸収するビーズ又は色素である。所定の波長は、光ディスク読み取り装置112の入射ビーム152又はその近辺であることが好ましい。従って、両方の細胞集団はバイオディスクの表面で捕捉されるが、細胞は図10と共に上記する測定システムによって識別できるであろう。

【0061】

一例として、CD4抗体をディスク110の表面に保持する。CD4抗体は、通常CD4+単球の副集団とCD4+ヘルパーT細胞の両方を捕捉する。しかしながら、サンプルの調製中に、CD19抗体で被覆されたIR吸収ビーズが導入され、単球はCD19+であるがヘルパーT細胞はCD19+ではないため、単球がこれらのビーズで被覆されることになる。これには2つの効果がある。1つ目は、立体障害のため、単球がCD4捕捉領域に結合する可能性が減少する。2つ目は、ディスクの捕捉区域上に結合する残存単球は、IRレーザビームに対してCD4+ヘルパーT細胞よりも暗いので、単球とヘルパーT細胞との識別を可能にする。

【0062】

詳細には、ハードウェア計数（閾値を用いるS曲線認識(S-curve recognition)に基づく）を用いた本発明のバイオディスクシステムによって計数が行われた場合は、単球の吸収はS曲線振幅を閾値より低くするのに十分な結果となる。同様に、単球がIR色素によって識別された場合は、単球は暗くなり別々に計数することができる。ハードウェア計数ソフトウェアとS曲線認識に関するさらなる詳細は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中であり、且つ関連する、それぞれ2002年2月13日、2002年4月11日および2002年9月4日付けで出願された、全て「Bio-Disc and Bio-Drive Analyser System Including Methods Relating Thereto」と題する米国仮出願第60/356,982号、米国仮出願第60/372,007号および米国仮出願第60/408,227号に開示されている。これらの出願は、本明細書中でその全体が繰り返されるのと同様にその内容のすべてが、参照により本明細書に援用される。

【0063】

二重マーカを、同定可能な対象若しくは物質を細胞表面上に付着させる又は上記したように細胞表面を被覆して結合の可能性を減少させるのに用いられ得る方法は、細胞検定システムの多くのタイプで用いることができる。例えば、CD8抗体はNK細胞を捕捉するが、これは（この場合は非特異的に）CD56によって印を付けられ得る。又、顆粒球は特異的に印を付けられ得、CD45抗体で被覆された捕捉又は標的領域140上の白血球と識別できる。色素は関連する細胞のみを覆うのに使う必要はない。色素はまた、核のような細胞の内部構造中に非特異的に吸収され得る。このような細胞は、既知の濃度でサンプル中に固定若しくは予め混合することによって安定化している場合は、捕捉領域上でキャリブレーション因子として用いることができる。

【0064】

基本的に、多重マーカも使用できる。例えば、あるシグナル因子は、細胞上のマーカに結合する特異的な抗体上の色素であってよい。第2のシグナル因子は、別のマーカに結合する別の特異的な抗体上の微粒子又はビーズであってよい。第2のマーカが存在すると、ビーズは細胞に結合して、細胞が捕捉領域にある捕捉因子に結合するのを防ぐ。第1のマーカしかない場合、細胞は結合するが細胞上のシングルマーカと識別できる。

【0065】

陽性同定もまた可能である。例えば、I R ビーズが付着した細胞又は I R 色素を用いて染色された細胞は、他の細胞に比べて暗くなり、本発明の光ディスク読み取り装置を用いて画像化する場合は直接計数できる。例えば、リアルタイム細胞計数に使用されるスプリット検出器配置では、差異シグナル (A - B) よりも合計シグナル (A + B) を用いる方が暗い細胞を検出できる。実時間細胞計数および S 曲線認識に使用されるスプリット検出器配置に関する詳細は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2002 年 10 月 24 日付けで出願された「Segmented Area Detector for Biodrive and Methods Relating Thereto」と題する米国出願第 10 / 279, 677 号に開示されている。この出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。様々な細胞タイプを含有するサンプルから、1 つ以上の細胞を同定する多重マーカの使用に関するさらなる詳細を以下に検討する。 10

【0066】

標的細胞を区別且つ単離する微粒子の使用

上記光ディスクシステムを用いた画像分析による白血球サブセットの免疫表現型分類と定量は、細胞区別の精度を上げるために 2 次ゲート又はパラメータを必要とすることがある。本発明は、官能化された表面を有する若しくは有さない、種々の物理的特性を有する微粒子又はビーズのようなレポータ因子又はシグナル因子の使用に関する。これらは標的細胞又は不要な細胞に特異的に結合する少なくとも 1 つの抗体と接合して、光ディスク読み取り装置に検出され得るビーズ-細胞複合体を形成する。シグナル抗体はレポータ又はシグナル因子とクロスリンカーによって接合する。クロスリンカーは、受容体-リガンド相互反応又は結合因子-親和因子相互反応を含む。結合因子は、例えばストレプトアビジン又はニュートラアビジンである。親和因子は、例えばビオチンである。代替的に、当業者は、修飾されて官能化された表面を有するビーズは、共有結合的にビーズ表面上のシグナル抗体と接合し且つ所望の細胞へのビーズ又はレポータ因子の堅固な固定を促進するのに用いられえることについて既知である。大きさ、色、質感 (Texture)、反射率、吸光度、質量、蛍光、リン光および／又は磁気特性など種々の物理的特性を有するビーズを用いて、標的細胞を単離および／又は区別することがまた可能である。このプロセスは、図 20A および図 20B と共に以下に検討する、少なくとも 1 つのタイプのレポータ因子又は細胞表面に付着したビーズである独特な特徴によって、標的細胞の識別をより容易にする。 20 30

【0067】

2 つ以上の特異的な細胞タイプが、他のサブセットや細胞タイプ (例えば、CD4 抗原を細胞膜上に有する T 細胞や単球、CD3 抗原を細胞膜上に有する全ての成熟 T 細胞および CD45 抗原を細胞膜上に有する全ての白血球) と共に、細胞膜上で同一の抗原エピトープを共有すると、不正確が生じる。この結果、タグ又は標識を用いずに、抗 CD4 又は抗 CD45 のような共通の捕捉抗原を用いて細胞タイプを区別すること並びに細胞の形態および大きさを測る可能性が困難になる。

【0068】

以下に述べるように、ビーズを、細胞を標識するレポータ因子として用いることによって、例えば、抗 CD4 抗原捕捉因子を用いて捕捉した標的 CD4 + T 細胞を、不要な CD4 + 単球から区別することができる。これは、単球上で、CD4 エピトープ以外の抗原エピトープを標識又はタグ付けすることによって達成される。例えば、単球は、単球に対して特異的である CD14 抗体に結合するビーズでタグ付けされる。一旦単球が抗 CD14 ビーズでタグ付けされると、CD14 表面抗原 (以下図 23 に述べる) に結合した 1 つ以上のビーズを有する CD4 + 単球と、表面に CD14 抗原が存在しないためビーズを有さない CD4 + T 細胞とを識別する光ディスクシステムを用いた画像分析が実行される。このようにして、図 18 に描くように、MNC 又は血液サンプル中の CD4 T 細胞と単球の区別を可能にする。 40

【0069】

引き続いて、共に表面に CD4 抗原を有するリンパ球 200 および単球 202 を図 18 50

に図示する。単球はまた表面にCD14抗原を有するが、リンパ球は有さない。従って単球は、シグナル抗体206（この場合、抗CD14抗体）が付着したビーズ204でリンパ球をタグ付けすることによって区別できる。ビーズは、ディスク読み取り装置112の呼びかけビーム152（図10）によって検出できる程度に十分大きく、タグ付けされる細胞よりは小さいことが好ましい。ビーズの好ましい大きさは、直径約0.5～5μmである。従ってレポータ複合体208は、図示するようにCD4+リンパ球200およびCD4+単球202を含有する細胞懸濁液中に存在すると、単球202のみに結合する。これらのCD4+細胞を、抗CD4捕捉抗体が付着した捕捉点140で捕捉し、光ディスク読み取り装置112（図1）を用いて分析すると、細胞は以下図23Aと図23Bと共に述べるシグネチャトレース(signature trace)の結果、区別できる。

10

【0070】

次に、血液サンプルから不要な細胞を単離又は除去するビーズの使い方を描いた、本発明の実施形態を図19に図示する。不要な又は汚染細胞は、ビーズを用いて不要な細胞の表面上の抗原をブロックし、これらのブロックされた細胞がディスク上の捕捉プローブに結合するのを防ぐことによって除去される。図19に示す実施例では、CD4+細胞、CD8+細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞を含む様々なタイプの細胞212を含有するサンプル210は分析に付される。細胞212の全ては表面にCD3マーカを有する。CD4+およびCD8+細胞は所望の標的細胞216であり、一方NK細胞214は不要な細胞である。共通の抗体、抗CD3は、標的細胞を捕捉するために用いられる。NK細胞は表面にCD56抗原を含有するが、サンプル中の他の細胞は含有しない。示すように、抗原で被覆されたビーズ208をサンプル210と一緒に混合する。ビーズ208は抗CD56抗体で被覆される。ビーズ208は次に、ロゼットを形成する（rosetting）又はNK細胞を取り囲む、NK細胞214の表面上のCD56抗原に結合する。CD4+、CD8+およびロゼット形成NK細胞214を含有する検定溶液を、次に、描かれているようにバイオディスク110の流体チャンバ130の中に充填する。CD4+およびCD8+標的細胞216は、次にディスクの表面上で抗CD3捕捉因子217と結合する。NK細胞214の表面上のビーズは、NK細胞上でCD3抗原エピトープをブロックすることによって、NK細胞214が抗CD3捕捉抗体217に結合するのを防ぐ。非結合NK細胞を次に図示するように、洗浄又は遠心分離によって除去する。続いて捕捉細胞を、標的領域を通して捕捉細胞と相互反応する入射ビーム152（図10）を走査し、且つサンプル中の標的細胞の相対量を決定する帰還ビーム154を分析する光ディスクシステムを使用することによって分析する。代替的には、透過型光ディスクを使用する場合には、透過ビーム156（図10）を捕捉細胞の数を決定するために分析することができる。図19に図示する光ディスクは、図2～図9と共に上記されたフロー経路130、キャップ部位116、反射表面156、接着部材118、活性層144、反射層142および基板120等のディスク構成要素を含む。上述したように、透過型光バイオディスク（図8および図9）は、反射層146が除去されて層142が半反射的になると入射ビーム152がディスクを通過し、図10、図12および図16と共に上記するように上部検出器158を用いた透過ビーム156の検出と分析を可能にすることに使用する。

20

30

【0071】

図19と共に上記する方法および方法に対する代替の実施形態では、より大きい、より重いおよび／又は磁性のビーズが不要な細胞に付着する。標的細胞は例えばCD4+T細胞であり、不要な細胞はCD4+単球である。本実施例で用いられる捕捉抗体は、抗CD4抗原であり得る。両方の細胞タイプは細胞表面にCD4抗原を有し、単球は固有のCD14表面マーカを有するため、抗CD14抗体で被覆された、同じ大きさの非磁気ビーズよりはるかに大きい質量を有する磁気ビーズを用いて、単球をサンプルから除去する。大きい質量のため、不要な細胞を遠心分離により容易に除去できる。サンプルをディスクに充填する前又は後に、ビーズをサンプル溶液と混合してよい。ビーズを次に単球の表面CD14抗原に結合させる。磁気粒子は比較的重いので、バイオディスクドライブ112を用いた遠心分離により又は磁気分離装置若しくは磁気光学式ディスクシステムと併せてビ

40

50

ーズの磁気特性を利用することにより、所望の細胞から単球を分けることができる。磁気光学式ディスクシステムに関わる他の態様に関連するさらなる詳細は、例えば、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2002年3月14日付けで出願された「Dual Bead Assays Using Cleavable Spacers and/or Ligation to Improve Specificity and Sensitivity Including Related Methods and Apparatus」と題する米国出願第10/099,256号、2002年3月14日付けで出願された「Use of Restriction Enzymes and Other Chemical Methods to Decrease Non-Specific Binding in Dual Bead Assays and Related Bio-Discs, Methods, and System Apparatus for Detecting Medical Targets」と題する米国出願第10/099,266号および2002年11月27日付けで出願された「Magneto-Optical Bio-Discs and Systems Including Related Methods」と題する米国出願第10/307,263号に開示されている。これらのすべての出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

10

【0072】

次に図20Aと図20Bでは、図19と共に述べる、本発明の代替の実施形態における非限定的な実施例を示す。この実施形態では、種々の物理特性を有するビーズを、1つ以上の標的又は捕捉領域で共通の表面マーカによって捕捉された様々な細胞タイプを同定するのに用いる。図20Aに示すように、所望の細胞216を含有するサンプル210を、ピペット218を用いてバイオディスク110の中に充填する。本実施形態において、白血球は、ディスクの表面で抗CD45捕捉抗体によって捕捉される所望の細胞である。捕捉抗体217は、共通のCD45白血球表面抗原に結合する。次に図20Bを参照すると、ビーズ220の種々の群を、ピペット218を用いてディスク110の中に充填する。ビーズの各群は、好ましくはディスク読み取り装置112を用いて識別できる異なる物理的特性と、そこに付着した異なる抗体を有する。ビーズの各群に付着した抗体は、所望の細胞上の特異的抗原に親和性を有する。例えば、透過型ビーズ221の群は、白血球224をタグ付けする、CD3、CD19又はCD56のうちのどれかに対する抗体を有し、不透過型ビーズ223の群は、単球222をタグ付けする、ビーズに付着したCD14に対する抗体を有し、半透過型ビーズ225の群は、好酸球226をタグ付けする、CD116に対する抗体を有する。ビーズをそれぞれの標的に十分な時間結合させた後、非結合ビーズ227を遠心分離又は洗浄によって除去する。種々の細胞タイプを、光ディスク読み取り装置を用いて、細胞に結合したビーズの物理的特性に基づいて定量する。図示するように、この実施例では透過型ディスクを使用するため、ビーズ-細胞複合体を光ディスクシステム（図10）を用いて以下に述べる操作を通して分析する。すなわち操作とは、標的領域を通過してビーズ-細胞複合体と相互反応する入射ビーム152（図10）を走査し、光検出器を用いて透過ビーム156を検出し、検出したビームを分析してサンプル中のそれぞれの標的細胞タイプの相対量を決定することである。上記の通り反射型ディスクもまたこの分析に使用してよい。

20

30

【0073】

代替的に、1つ以上のビーズの群又はレポータは、同じ細胞タイプの異なる表面抗原に結合できる。次に、この細胞タイプは、1種類以上のレポータが結合しているかしていないかを定めることで、他の細胞タイプと識別し定量することができる。多重のパラメータが、単独の細胞タイプとして同定するのに用いられるため、検定に特異性を寄与する。光ディスクを用いた様々な細胞タイプの検出と定量の方法に関する他の態様に関する詳細は、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2002年5月24日付けで出願された「Methods and Apparatus for Use in Detection and Quantitation of Cell Populations and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same」と題する米国仮出願第60/382,944号に開示されている。この出願は、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

40

【0074】

微粒子又はビーズは、組織並びにウイルスおよび細菌等の微生物からの細胞を標識又はタグ付けするのに用いられ、同定、区別および定量を容易にする。少なくとも1つ以上の

50

ビオチン 232 を有する捕捉ビーズ 204 と、そこに接合した捕捉抗体 206 とでタグ付けされる E. coli 234 の例を図 21 に示す。抗体 206 は E. coli の抗原に特異的な親和性を有する。図示するように、ビーズが E. coli を含有するサンプルと一緒に混合されると、ビーズ-細菌複合体 237 が形成する。複合体 237 と非結合ビーズ 204 は、ストレプトアビジン 236 を用いてディスクの捕捉領域上に捕捉される。次に、上記のように、ディスクをビーズ-細菌複合体の有無と量について分析する。

【0075】

次の図 22 は、不要な細胞上の抗原に親和性を示す抗体を有するビーズを用いて、不要な細胞をタグ付けするイラストである。標的細胞はこのようにタグ付けされず、上記のように光ディスクバイオシステムを用いて単離又は定量される。

10

【0076】

図 23A は、本発明による光バイオディスクのトラック A-E の近傍に位置するビーズ-細胞複合体中で共に結合した、1 ミクロンのレポータビーズと 5 ミクロンの細胞のグラフ表示である。

【0077】

本発明による光ドライブから検出されたシグナルを利用して、図 23A 中のビーズと細胞から発生した、トラック A-E からの一連のシグネチャトレースを図 23B に図示する。これらの図は検出された透過ビーム 156 を表している。示すように、1 ミクロンのレポータビーズ 190 のシグネチャは、5 ミクロンの細胞 192 とのシグネチャと十分に異なるので、ビーズ-細胞複合体を単独の細胞の中から検出し見分けることができる。帰還ビームがビーズ又は細胞を通過するときに検出されるトレースシグナルの十分な偏向を、イベントとする。レポータおよび細胞からのイベントの相対的な近接は、ビーズ-細胞複合体の有無を表す。示すように、レポータおよび細胞のトレースはお互いがすぐ隣にあり、それらが複合体になっていることを表している。

20

【0078】

代替的に、細胞懸濁液中の様々な細胞タイプを同定および定量するために、他の検出方法が用いられ得る。例えば、レポータビーズは蛍光性又はリン光性であり得る。このようなレポータの検出は、蛍光又はリン光型光ディスク読み取り装置で実行できる。他のシグナル検出方法は、例えば、本発明の譲受人に譲渡されて同時係属中である、2001 年 11 月 9 日付けで出願された「Disc Drive System and Methods for Use with Bio-Discs」と題する米国出願第 10/008,156 号（参照により明確に援用される）、2001 年 2 月 20 日付けで出願された米国仮出願第 60/270,095 号および 2001 年 5 月 18 日付けで出願された米国仮出願第 60/292,108 号並びに 2002 年 1 月 10 日付けで出願された上記参照の「Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging」と題する米国出願第 10/043,688 号に開示されている。

30

【0079】

図 24 は非付着ビーズ 238、単独細胞 240 およびビーズ-細胞複合体 242 を示す顕微鏡写真である。この実験で使われたビーズは、抗 CD2 抗体で被覆された 4.5 μm の磁気ビーズであった。示すように、CD2 抗原を有する細胞はこのように、ビーズ-細胞複合体を形成するビーズによって標識又はタグ付けされ、非 CD2+ 細胞は単独のままである。この実験に関する詳細を実施例 8 と共に以下に述べる。

40

【0080】

不溶性酵素産物を用いた標的細胞の区別

次に参照する図 25A と 25B は、酵素反応で生じた検出可能な沈殿物を用いて不要な細胞を標的細胞から区別する、本発明中の方法における別の実施形態を図示したイラスト表示である。流体回路 130 内の標的領域 140 の拡大図を図 25 に図示する。本開示に関わる当業者には明らかであるように、反射又は透過型ディスクのどちらも分析に用いることができる。図 25A および図 25B に描かれている実施例では、CD4 抗体 244 を光バイオディスク 110 上の標的又は捕捉領域 140 に保持させる（工程 1）。次の工程

50

、工程 2 では、単核細胞（MNC）を含有するサンプルを標的領域の中に導入する。CD 4 表面抗原を有する細胞は、次に標的領域上の CD 4 捕捉抗体 2 4 4 に結合する。これらの細胞は、CD 4 + T 細胞および単球を含む。図 1 9 ~ 図 2 1 と共に上記するように、続いて非結合細胞を標的領域から洗い流すかスピンする。非結合細胞を除去した後、CD 1 4 抗体 2 4 6（レポータ因子）に接合した酵素 2 4 8 を含有する溶液を、工程 3 に示すように標的領域に導入する。単球のみが CD 1 4 抗原を含有するため、抗体と接合した酵素は、図示するように標的領域に結合した単球にのみ結合する。標的領域を続いて非結合酵素又はレポータ因子を除去するために洗浄し、工程 4 で標的領域に酵素基質を導入する。一旦基質が酵素と接触すると、酵素 - 基質反応 2 5 0 が起こって、工程 5 に示す検出可能な産物 2 5 2 を産生する。検出可能な産物 2 5 2 は好ましくは、工程 6 に図示するように、細胞表面で沈殿物 2 5 4 を形成する不溶性産物である。電磁気放射線 2 5 6 の呼びかけ信号を続いて標的領域を通過して走査し、帰還ビーム又は透過ビーム（使用するディスクのタイプに応じる）を、沈殿物で標識された細胞の有無について分析する。標識又はタグ付けされたおよび標識されていない又はタグ付けされていない（untagged）細胞を次に定量する。その結果、図 2 5 B に示すように、CD 4 + T 細胞および単球の特異的な検出、分類および定量が可能である。この実施形態で使用され得る酵素は、これらに限定されないが、ホースラディッシュ・ペルオキシダーゼ（HRP）およびアルカリホスファターゼ（AP）を挙げることができる。これらの酵素と併せて用いられる基質は、例えば、TMB（3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン）、DAB（3, 3'-ジアミノベンジジン）、ABTS（2, 2'-アジノービス（3-エチルベンゾチアゾリン-6-スルホン酸））、AEC（3-アミノ-9-エチルカルバゾール）、NBT（ニトロブルー-テトラゾリウム）、CN/DAB（4-クロロナフトール/3, 3'-ジアミノベンジジン四塩酸塩）、（4-CN）4-クロロ-1-ナフトールおよび光ディスク読み取り装置で検出できる産物を生じる反応を酵素に触媒させる他の適合する基質から成る群より選ばれる。

【0081】

〔実験の詳細〕

本発明を図面を参照して詳細に説明してきたが、本発明の一定の例およびさらなる例示を以下に提供する。

【実施例】

【0082】

<実施例 1>

【0083】

図 1 7 は、サンプルの調製、バイオディスクの使用、および結果の提供を示す画像的フローチャートを示す。個々の処理工程の時間分、回転速度や他の詳細等の、以下の実施例の詳細は、図 1 7 を参照した上記のものより詳細である。それにも関わらず、本実施例の基本的な工程は上記のものと類似である。

【0084】

A. 基板調製および化学保持を含むディスク製造

この実施例において、反射型ディスク又は透過型ディスク基板 1 2 0（それぞれ、図 2 および図 5）を、エアガンを用いて清浄にしてすべての塵粒を除去する。このディスクを、スピンコータを用いてイソプロパノールで 2 回洗い流す。2 % ポリスチレンをディスク上にスピンコートし、全体を極めて厚くコーティングする。

【0085】

その後、化学保持を行う。一実施形態は、以下の 3 工程の保持プロトコルを含む：ストレプトアビジンを 3 0 分間培養；ビオチン化した第 1 の抗体を 6 0 分間培養；および第 2 の捕捉抗体を 3 0 分間培養。第 1 の抗体は、第 2 の種（例えば、マウス）のイムノグロブリンのタイプ（例えば、IgG、IgE、IgM）に対して、第 1 の種（例えば、羊）において作成することができる。第 2 の捕捉抗体は、特異的な細胞表面抗原（例えば、CD 4、CD 8）に対して、第 2 の種において作成される。これらの工程は、恒湿チャンバ中

において室温で、保持の間の洗浄および乾燥工程を用いて行われる。

【0086】

リン酸緩衝生理食塩水中の 1 mg/ml のストレプトアビジン $1\text{ }\mu\text{l}$ ずつを各窓上に積層し、30分間培養する。過剰のストレプトアビジンを蒸留水を用いて洗い流し、ディスクを乾燥させる。等容量のビオチン化抗マウス IgG (PBS中に $125\text{ }\mu\text{g/ml}$) および活性化デキストランアルデヒド ($200\text{ }\mu\text{g/ml}$) を混合する。デキストランアルデヒド (DCHO) - ビオチン化抗マウス IgG を、各捕捉窓中のストレプトアビジン上に積層し、冷蔵庫中で60分間又は一晚培養する。過剰の試薬を洗い流し、ディスクをスピン乾燥する。

【0087】

B. ディスクアセンブリ

流体流路を作製するU型又は「e-rad」流路等のスタンプアウト (stamped out) 部分を有する、例えば、25、50又は100ミクロン厚であり得る接着層 (図2および図5の流路層118)、および透明なキャップ116 (図5、上部検出器を用いた透過型ディスクとの使用のため) 又は捕捉領域全体にある反射層142を有するキャップ116 (図2、底部検出器を用いた反射型ディスクとの使用のため) を用いて、ディスクを組み立てる。

【0088】

一実施形態において、このディスクは、符号化情報層として300nmの金で被覆された、フォワード Wobble Set FDL21:13707又はFDL21:1270 CD-Rディスクである。反射型ディスク上には、既知のリソグラフィー技術によって、 $2\times 1\text{ mm}$ の大きさの楕円の観察窓が反射層からエッチングされている。透過型ディスクの幾つかのデザインにおいては、分かれた観察窓はエッチングされておらず、ディスク全体を使用可能である。この特殊な例においては、流路層は、Fraylock adhesive DBL201 Rev C 3M94661から形成される。カバーは、半径26mmで等距離にある、直径0.040インチの48個のサンプル注入口を有するクリアディスクである。CD4/CD8計数ソフトウェアを用いて、ソフトウェアを4倍速且つサンプル率2.67MHzで、データディスクを走査して読み取る。

【0089】

C. ディスク漏れチェック

血液を分析しているため、ディスクの漏れをチェックし、in situでサンプルを有するディスクをスピンする間にチャンバ漏れがないことを初めに確認することが可能である。Stabil GuardおよびPBS-Tween等の遮断剤を、各流路に充填する。ブロックは少なくとも1時間である。ディスクを5,000rpmで5分間スピンさせて漏れ試験を行い、ディスクの安定性をチェックする。漏れをチェックした後、ディスクを真空チャンバに24時間入れる。24時間真空化後、ディスクを真空パウチに入れ、使用まで冷蔵庫中に保管する。

【0090】

D. サンプルの回収、調製およびディスクへの塗布

以下の項は、概して図17Aに示されるサンプル処理工程に関する。単核細胞 (MNC) を、例えばBecton Dickinson CPT Vacutainerを用いて、密度勾配遠心法により精製する。血液 (4~8ml) を、4又は8mlのEDTA含有CPT Vacutainer中に直接回収する。水平ローターおよび回転バケツを有するバイオハザード遠心機中で、 $1,500\sim 1,800\times g$ で25分間、室温で管を遠心分離する。血液は、回収の2時間以内に使用されることが好ましい。遠心分離後、MNC層上の約2mmの血漿は残し、単核細胞画分上の血漿を除去する。MNCを回収し、PBSで洗浄する。 $300\times g$ で10分間、室温で遠心分離することにより、細胞をペレット化する。上清を除去し、管を軽く叩くことによりMNCを含有するペレットをPBSに再懸濁する。 $300\times g$ で各10分間、室温でもう一度洗浄を行い、血小板を除去する。最終的なペレットを、 $10,000$ 細胞/ μl の細胞数に再懸濁する。 $18\text{ }\mu\text{l}$ 容量のM

10

20

30

40

50

NCを、1以上の分析チャンバ又は流路へ導入し、ディスクを固定して15分間室温で培養する。流路を密閉する。その後、ディスクドライブを用いて3,000rpmで3~4分間ディスクをスピンさせる。4倍速且つサンプル率2.67MHzでソフトウェアを用い、ディスクを走査して読み取ることが好ましい。

【0091】

血液サンプルを直ちに処理できない場合、CPT管を数回穏やかに反転させることによって最初の遠心分離後の単核細胞を血漿に再懸濁し、室温で24時間まで保管することができる。24時間以内に、上記のように血漿中の細胞を回収し、洗浄することができる。

【0092】

E. CD4/CD8検定フォーマット

この実施例における検定は、CD4+およびCD8+Tリンパ球集団の絶対数および血液サンプル中のCD4+/CD8+リンパ球の比を迅速に測定するための、一般的な均質固相細胞捕捉検定法である。この試験はCD-ROMに組み込まれた小さなチャンバ内で実施されるが、全血液から単離された単核細胞(MNC)7μl中の、捕捉領域上の特異的な抗体によって捕捉される、CD4+、CD8+、CD2+、CD3+およびCD45+細胞の数を測定する。この試験は、ディスク上の特異的な位置の局在細胞を捕捉するという原理に基づく。特定の血液細胞表面抗原に対するモノクローナル又はポリクローナル抗体に基づく捕捉化学物質を局在塗布することにより、幾つかの特異的な細胞捕捉領域をディスク上に作製する。チャンバをMNC血液(30,000細胞/μl)で溢れさせると、抗原CD4、CD8、CD2、CD3およびCD45を発現する細胞は、ディスク上の捕捉領域で捕捉される。また、画定された陰性対照領域もバーコードに組み込まれる。

【0093】

F. オンディスク分析

上記工程Dで調製されたMNC細胞(PBS中、18μl)をディスクチャンバに注入し、チャンバの注入ポートおよび排出ポートを密閉する。ディスクを15分間室温で培養した後、上部検出器を有する光学ドライブ中で780nmのレーザを用いて走査し、上記のように捕捉領域を画像化する。

【0094】

ソフトウェアをディスク上に符号化して、ドライブに以下の動作を自動的に行うように指示を与える：(a)1以上の段階でディスクを遠心分離し、過剰の非結合細胞をスピン除去する、(b)特異的な捕捉窓を画像化する、および(c)それぞれの捕捉領域中の特異的に捕捉された細胞を計数すること並びにCD4/CD8の比(又は比がプログラムされ、測定される)を得ることを含み、データを処理する。

【0095】

処理工程の間、ソフトウェアによってそれぞれの捕捉領域画像全体を読み込み、細胞に接近すると細胞に印を付ける。例えば、CD4+およびCD8+細胞の数の評価に続いて、ソフトウェアによってCD4+/CD8+細胞の比を算出し、全血液1μl当たりの、CD4+、CD8+、CD3+およびCD45+捕捉領域中の細胞の絶対数、およびCD4+/CD8+比の双方を示す。光学ドライブへディスクを挿入してから数および比を得るまでの全処理は、約12分かかる。

【0096】

G. 使用試薬

ストレプトアビジン(Sigma, cat. # S-4762)：脱イオン水を添加して5mg/ml溶液とし、等分して-30℃で保管する。使用の際は、最終濃度1mg/mlとなるようにTris緩衝液を添加する。

陽性対照：CD45(Sigma, Lot # 038H4892, cat # C7556)。2~8℃で保管する。

二次捕捉抗体：ビオチン化抗マウスIgG(ヒツジ由来、Vector laboratories, lot # L0602, Catalog # BA-9200)。保存溶液(1.5mg/ml)は蒸留水で作製される。使用b-IgG溶液：0.1MのPBS中に125μg/ml。2~8℃で保管する。長期保管の場合は-30℃で保持してもよい。

10

20

30

40

50

アルデヒド活性化デキストラン (Pierce, lot # 97111761, cat # 1856167)。保存溶液: PBS中に5mg/ml、2～8℃で保管する。

一次捕捉抗体: CD4 (DAKO, cat # M0716)、CD8 (DAKO, cat # M0707)、CD2 (DAKO, cat # M720)、CD45 (DAKO, cat # M0701)、CD14 (DAKO, cat # M825) およびCD3 (DAKO, cat # M7193)。2～8℃で保管する。

陰性対照: マウスIgG1 (DAKO, cat # X0931)。2～8℃で保管する。

リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)、pH7.4 (Life Technologies/GIBCO BRL, cat. # 10010-023) 又は等価物。室温で保管する。

イソプロピルアルコール、90～100%。

【0097】

10

H. RBC溶解プロトコル

塩化アンモニウム溶解緩衝液

1倍保存の塩化アンモニウム溶解緩衝液は、2～8℃で保管されるべきである。0.155Mの NH_4Cl 、10mMの KHCO_3 および0.1mMのEDTA二ナトリウムを含有する; pH7.3～7.4、2～8℃で保管する。使用前に室温に戻す。

【0098】

手順

1. 各100μlの血液に対して2mlの溶解緩衝液を添加する (この手順はバイオハザードフード中で行うのが好ましい)。

2. ボルテックスして室温で15分間培養する。

20

3. バイオハザードフード中の遠心機を用いて、500×gで5分間、室温で血液を遠心分離する。

4. 上清を除去し、PBS中の2%FCS又はFBSで細胞を洗浄する。細胞を遠心分離する。

5. WBCの全量を算出し、サンプル注入のためにWBCの最終濃度を10,000細胞/μlとする。

<実施例2>

【0099】

単核細胞分離手順

クエン酸ナトリウムを有するBecton and Dickinson Vacutainer CPT (BD catalog # 362760 (4mlの場合)、# 362761 (8mlの場合)) 細胞調製管を使用する。手順は、すべてのバイオハザード対策に従い、バイオハザードフード中で行う。工程:

1. 血液を、4又は8mlのEDTA含有CPT Vacutainer中に直接回収する。血液が既に抗凝固物質中にある場合、初めにEDTAをVacutainerへ添加した後、血液サンプル6～8mlをCPT管へ添加する。

2. 水平ローターおよび回転バケツを有するバイオハザード遠心機中で、1,500～1,800×g、25分間室温で管を遠心分離する。最も良い結果のためには、回収の2時間以内に血液を遠心分離すべきである。2時間より古い血液を遠心分離すると、MNC数が減少し、且つRBC汚染が増加し得る。

40

3. 遠心分離後、MNC層上の約2mmの血漿を残し、血漿を除去する。白色の単核層を回収し、15mlの円錐形遠心分離管へ移す。

4. MNC層へ10～15mlのPBSを添加し、遠心分離管を数回反転させることによって細胞を穏やかに混合する。

5. バイオハザード遠心機中で200×gで10分間、室温で遠心分離することによって細胞を洗浄する。

6. 上清を除去する。管を軽く叩くことによって細胞を再懸濁する。

7. 10mlのPBS中でもう一度洗浄する。200～300×gで10分間、室温で遠心分離して血小板を除去する。

8. 上清を除去して、50μlのPBSにペレットを再懸濁する。

50

9. サンプル中の細胞数を推定する。CBCを実施する、又は $2\mu\text{l}$ の細胞を $18\mu\text{l}$ のトリパンプルーに希釈し、穏やかに混合して細胞を血球計算器で計数する。分析のために、サンプルを最終細胞数 $10,000$ 細胞/ μl とする。

10. 細胞を直ちに処理することができない場合、最初の遠心分離(上記工程2)の後にCPT管を数回穏やかに反転させることによって、分離された血漿中へ単核細胞を再懸濁し、室温で24時間までの間保管する。24時間以内に血漿中の細胞を回収し、上記のような洗浄を続ける。

【0100】

$1\mu\text{l}$ 当たりの全細胞数 = 25m^2 中の細胞数 $\times$ (倍)100。

<実施例3>

【0101】

Histopaque-1077を用いた全血液からのMNCの単離

1ml のHistopaque-1077を 15ml の遠心分離管に入れ、 1ml の全血液をその上に穏やかに積層した。その後、 $400\times g$ で30分間、室温で遠心分離した。混合物をパスツールピペットで慎重に吸引し、不透明な界面を遠心分離した管へ移した。その後、 10ml のPBSを遠心分離管へ添加した。その後、溶液を $250\times g$ で10分間遠心分離した。上清をデカントし、細胞ペレットを 10.0ml のPBSに再懸濁し、 $250\times g$ で10分間スピンさせた。その後、ペレットを 10ml のPBSに再懸濁し、 $250\times g$ でスピンさせることによって、細胞をもう一度洗浄した。最終的な細胞ペレットを 0.5ml のPBSに再懸濁した。

<実施例4>

【0102】

Dyna1ビーズを用いたCD4+細胞の単離

A. 材料

1. 冷PBS/ 2% FBS、 $\text{pH}7.4$
2. PBS/ 0.5% BSA、 $\text{pH}7.4$
3. CD4陽性Dyna1単離キット
4. Dyna1MPC、Dyna1混合機、遠心機、ポリプロピレン管

【0103】

B. 手順

CBCを実施し、必要な細胞ごとのビーズの数を決定する($4\sim 10$ ビーズ/細胞)。 1ml の冷PBS/ 2% FBSを、所望量のビーズ(1×10^7 ビーズ/ $72\mu\text{l}$)に添加し、再懸濁する。管をDyna1MPC中に30秒間置き、上清をピペットで除去する。洗浄したビーズを最初の容量に再懸濁する。所望量のビーズを細胞に添加する。11に設定したDyna1混合機にて $2\sim 8^\circ\text{C}$ で20分間培養する。ロゼット形成細胞をDyna1MPC中で2分間単離する。上清をピペットで除去する。ロゼット形成細胞を $4\times$ PBS/ 2% FBSで洗浄する。ロゼットを $200\sim 400\mu\text{l}$ のPBS/ 2% FBSに再懸濁する。 $100\mu\text{l}$ 細胞懸濁液あたり $10\mu\text{l}$ のDetach-a-Beadを添加する。11に設定したDyna1混合機にて室温で60分間培養する。ビーズをDyna1MPC中で2分間単離する。上清を移して保存する。ビーズを $500\mu\text{l}$ のPBS/ 2% FBS中で2~3回洗浄し、細胞残渣を得る。回収した細胞を $400\mu\text{l}$ のPBS/ 0.5% BSAで洗浄する。

【0104】

CBCを実施し、単離した細胞濃度を求める。

<実施例5>

【0105】

ディスク調製および化学保持(ストレプトアビジンによる)

A. 基板調製および化学保持を含むディスク製造

この実施例では、透過型ディスク基板をエアガンで清浄にして塵を除去した。その後、このディスクをスピコートに載せ、イソプロパノールの一定流で2回洗い流した。次い

10

20

30

40

50

で、310 ml のトルエンおよび65 ml のイソプロパノールに溶解させた2%ポリスチレンを有するポリスチレン溶液を、ディスク上に均一にコーティングした。

【0106】

ストレプトアビジン保持のために、ストレプトアビジン保存溶液をPBS中に1 mg/mlとなるように希釈した。手動のピン保持を用いて、約1 µlのストレプトアビジンをディスク上のそれぞれの捕捉領域に保持させた。ディスクを恒湿チャンバ中で30分間培養した。その後、過剰の非結合ストレプトアビジンを脱イオン水で洗い流して捕捉領域から除去し、ディスクをスピン乾燥した。

【0107】

二次抗体保持のために、活性化デキストランアルデヒドの新たな溶液（PBS中に200 µg/ml）を、等容量のVector IgG（PBS中に125 µg/ml）と混合した。手動のピン保持を用いて、ディスク上のそれぞれの捕捉領域に、約1 µlのIgG+DCHO複合体を保持（ストレプトアビジン層の上に積層）した。ディスクを恒湿チャンバ中で60分間培養した。過剰の抗体は脱イオン水で洗い流して除去し、ディスクをスピン乾燥した。

【0108】

一次抗体のために、DAKO CD4を希釈してPBS中に50 µg/mlとし、DAKO CD8を希釈してPBS中に25 µg/mlとし、DAKO CD45を希釈してPBS中に145 µg/mlとした。手動のピンアプリーケーターを用いて、約1 µlの各一次抗体を、結合させた二次抗体の上に保持させた。その後、ディスクを恒湿チャンバ中で30分間培養した。捕捉領域をPBSで洗浄することにより過剰の非結合抗体を除去し、ディスクをスピン乾燥した。

【0109】

B. ディスクアセンブリ

使用したカバーディスクは、Frayslock接着流路層が取り付けられた透明のディスクであった。流体回路を作製する4つのU型流路を接着剤へ刻印した。カバーを透過型ディスク基板上に置いて、流体流路が捕捉領域全体にわたるようにした。次いで、ディスクを共に固定するために、ディスクプレスを8回通過させた。

【0110】

C. ディスク漏れチェック、ブロッキング

各流体流路にStable Guardを充填し、1時間培養した。培養の間、ディスクをスピニング中で5分間5,000 rpmでスピンさせた。スピン後、ディスク流路の漏れをチェックした。次いで、Stable Guardを流路から吸引し、ディスクを真空チャンバ中、真空下で一晩置いた。翌朝、ディスクを真空パウチに入れ、4℃で保管した。

<実施例6>

【0111】

光バイオディスクによるCD4/CD8の比とFACSによるCD4/CD8の比との比較

A. CPT管を用いた臨床血液サンプルの調製

3 mlの臨床EDTA血液サンプル（番号29、30、31、32、33、34および35）を、クエン酸ナトリウムを除去した個別のCPT管に添加した。管を1,500×gで室温にて、25分間遠心分離した。遠心分離後、0.5 cmの不透明MNC層内の上部血漿を吸引により除去した。残りの不透明MNC層を清浄な15 ml管に移し、12 mlのPBSをそれぞれの管に添加した。

【0112】

洗浄

続いて、細胞懸濁液を250×gで10分間遠心分離した。続いて、上清を吸引により除去し、細胞を14 mlのPBSに再懸濁した。懸濁液を、250×gで10分間、再び遠心分離した。上清を吸引により除去し、各細胞ペレットを200~175 µlのPBS

10

20

30

40

50

を用いて再懸濁した。各サンプルの細胞濃度を、血球計算機で細胞を計数することにより決定した。最終細胞濃度を各サンプルにつき30,000細胞/μlに調整した。

【0113】

B. 光バイオディスクによるCD4/CD8の比とFACSによるCD4/CD8の比との比較

ディスク（番号27a、27b、27c、27d、27e、27fおよび28）を、25μmの接着流路を用いて、実施例5と同様に調製した。

【0114】

各サンプルを、以下の表2に示すように対応する各ディスクに注入した。30分後、ディスクを3,000rpmで5分間遠心分離した。続いて、化学領域で捕捉された細胞の光顕微鏡写真を撮影し、細胞を計数した。各臨床サンプルに対して、FACS分析も行った。この実験の結果を以下の表2に示す。

【0115】

【表2】

表2

ディスク番号	サンプル番号	ディスク CD4/CD8	FACS CD4/CD8
27a	29	2.39	2.43
27b	30	1.47	1.67
27c	31	0.8	0.98
27d	32	1.84	2.16
27e	33	0.96	1.14
27f	34	1.59	1.49
28	35	1.03	1.04

<実施例7>

【0116】

ディスク調製および化学保持

この実施例では、透過型ディスク基板をエアガンで清浄にして塵を除去した。その後、このディスクをスピンコータに載せ、イソプロパノールの一定流で2回洗い流した。次いで、310mlのトルエンおよび65mlのイソプロパノールに溶解させた2%ポリスチレンを有するポリスチレン溶液を、ディスク上に均一にコーティングした。

【0117】

二次抗体保持のために、活性化デキストランアルデヒドの新たな溶液（PBS中に200μg/ml）を、等容量のVector IgG（PBS中に125μg/ml）と混合した。手動のピン保持を用いて、ディスク上のそれぞれの捕捉領域に、約1μlのIgG+DCHO複合体を保持した。ディスクを恒湿チャンバ中で60分間培養した。過剰の抗体は脱イオン水で洗い流して除去し、ディスクをスピン乾燥した。

【0118】

一次抗体のために、DAKO CD4を希釈してPBS中に50μg/mlとし、DAKO CD8を希釈してPBS中に25μg/mlとし、DAKO CD45を希釈してPBS中に145μg/mlとした。手動のピンアプリーケーターを用いて、約1μlの各一次抗体を、吸着させた二次抗体の上に保持させた。恒湿チャンバ中で30分間培養した。過剰の抗体をPBSで洗い流して除去し、ディスクをスピン乾燥した。

<実施例8>

【0119】

抗体被覆ビーズを用いた標的細胞と不要な細胞の区別

この実施例では、実施例3に上記するように透過型ディスクを調製した。

A. アンモニウム溶解緩衝液を用いた臨床サンプルの調製

20mlの1×塩化アンモニウム溶解緩衝液を、1mlのACD血液サンプルに添加し

た。サンプルをボルテックスし、室温で15分間培養した。次に、サンプルを500×gで室温にて5分間遠心分離した。上清を除去し、細胞をPBS中2%のFBS 3mlで洗浄した。洗浄した細胞を、500×gで5分間、遠心分離した。遠心分離後、上清を廃棄し、細胞をPBS中2%のBSA 1mlに再懸濁した。懸濁溶液中の最終細胞濃度は5, 500細胞/μlであった。

【0120】

B. 細胞のタグ付けおよび分析

Dynal Magnetic 抗CD2 [Dynabeads (登録商標) CD2 (Prod No. 111.02)] ビーズを、ビーズの保存溶液をPBS中0.1% BSAで3回洗浄することにより調製した。72μlのビーズ懸濁溶液を上記A節で調製した細胞と一緒に混合した。細胞/ビーズ懸濁溶液を続いて室温で20分間培養して、ビーズをサンプル中の不要なCD2+NK細胞と結合させた。培養後、懸濁溶液を上記で調製したディスク上に充填した。懸濁溶液を含有するディスクを続いて室温で15分間培養して、サンプル中のCD4+細胞(Tーリンパ球およびNK細胞)を、ディスク上の捕捉領域内で抗CD4+捕捉因子と結合させた。ディスクを続いて1,000rpmで5分間遠心分離し、非結合細胞を除去した。次に捕捉領域の顕微鏡写真を撮影した。これらの顕微鏡写真を図24に示した。図24に示すように、NK細胞242はビーズでタグ付けされているがTーリンパ球240はされておらず、NK細胞のみが表面上にCD2マーカを有するため、NK細胞242は捕捉領域内でTーリンパ球と識別できる。

【0121】

[概要の結び]

多くのディスク、検定およびシステムに容易に提供又は適応される、本発明又はその種々の態様は、以下の本発明の譲渡人に譲渡されて同時係属中である特許出願にも提供されている。すなわち、2002年3月14日付けで出願された「Use of Restriction Enzymes and Other Chemical Methods to Decrease Non-Specific Binding in Dual Bead Assays and Related Bio-Discs, Methods, and System Apparatus for Detecting Medical Targets」と題する米国出願第10/099,266号、2002年4月11日付けで出願された「Multi-Parameter Assays Including Analysis Discs and Methods Relating Thereto」と題する米国出願第10/121,281号、2002年5月16日付けで出願された「Variable Sampling Control for Rendering Pixelization of Analysis Results in a Bio-Disc Assembly and Apparatus Relating Thereto」と題する米国出願第10/150,575号、2002年5月16日付けで出願された「Surface Assembly For Immobilizing DNA Capture Probes in Genetic Assays Using Enzymatic Reactions to Generate Signals in Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto」と題する米国出願第10/150,702号、2002年7月12日付けで出願された「Optical Disc System and Related Detecting and Decoding Methods for Analysis of Microscopic Structures」と題する米国出願第10/194,418号、同じく2002年7月12日付けで出願された「Multi-Purpose Optical Analysis Disc for Conducting Assays and Various Reporting Agents for Use Therewith」と題する米国出願第10/194,396号、2002年7月19日付けで出願された「Transmissive Optical Disc Assemblies for Performing Physical Measurements and Methods Relating Thereto」と題する米国出願第10/199,973号、2002年7月22日付けで出願された「Optical Analysis Disc and Related Drive Assembly for Performing Interactive Centrifugation」と題する米国出願第10/201,591号、2002年7月24日付けで出願された「Method and Apparatus for Bonded Fluidic Circuit for Optical Bio-Disc」と題する米国出願第10/205,011号、同じく2002年7月24日付けで出願された「Magnetic Assisted Detection of Megnetic Beads Using Optical Disc Drives」と題する米国出願第10/205,005号、2002年8月29日付けで出願された「Methods for Qualitative and Quantitative Analysis of Cells and Related Optical Bio-Disc Systems」と題する米国出願第10/230,959号、2002年8月30日付けで出願された

「Capture Layer Assemblies for Cellular Assays Including Related Optical Analysis Discs and Methods」と題する米国出願第10/233,322号、2002年9月6日付けで出願された「Nuclear Morphology Based Identification and Quantification of White Blood Cell Types Using Optical Bio-Disc Systems」と題する米国出願第10/236,857号、2002年9月11日付けで出願された「Methods for Differential Cell Counts Including Related Apparatus and Software for Performing Same」と題する米国出願第10/241,512号、2002年10月24日付けで出願された「Segmented Area Detector for Biodrive and Methods Relating Thereto」と題する米国出願第10/279,677号、2002年11月13日付けで出願された「Optical Bio-Discs and Fluidic Circuits for Analysis of Cells and Methods Relating Thereto」10
と題する米国出願第10/293,214号、2002年11月15日付けで出願された「Methods and Apparatus for Blood Typing with Optical Bio-Discs」と題する米国出願第10/298,263号、2003年1月13日付けで出願された「Method and Apparatus for Visualizing Data」と題する米国出願第10/341,326号、2003年1月14日付けで出願された「Methods and Apparatus for Extracting Data From an Optical Analysis Disc」と題する米国出願第10/345,122号、2003年1月15日付けで出願された「Optical Discs Including Equi-Radial and/or Spiral Analysis Zones and Related Disc Drive Systems and Methods」と題する米国出願第10/347,155号、2003年1月17日付けで出願された「Bio-Safe Dispenser and Optical Analysis Disc Assembly」20
と題する米国出願第10/347,119号、2003年1月21日付けで出願された「Multi-Purpose Optical Analysis Disc for Conducting Assays and Related Methods for Attaching Capture Agents」と題する米国出願第10/348,049号、2003年1月21日付けで出願された「Processes for Manufacturing Optical Analysis Discs with Molded Microfluidic Structures and Discs Made According Thereto」と題する米国出願第10/348,196号、2003年1月23日付けで出願された「Methods for Triggering Through Disc Grooves and Related Optical Analysis Discs and System」と題する米国出願第10/351,604号、2003年1月23日付けで出願された「Bio-Safety Features for Optical Analysis Discs and Disc System Including Same」と題する米国出願第10/351,280号、2003年1月24日付けで出願された「Manufacturing Processes for Making Optical Analysis Discs Including Successive Patterning Operations and Optical Discs Thereby Manufactured」30
と題する米国出願第10/351,244号、2003年1月27日付けで出願された「Processes for Manufacturing Optical Analysis Discs with Molded Microfluidic Structures and Discs Made According Thereto」と題する米国出願第10/353,777号、2003年1月28日付けで出願された「Method and Apparatus for Logical Triggering」と題する米国出願第10/353,839号、2003年1月30日付けで出願された「Methods For Synthesis of Bio-Active Nanoparticles and Nanocapsules For Use in Optical Bio-Disc Assays and Disc Assembly Including Same」と題する米国出願第10/356,666号、2003年2月19日付けで出願された「Methods and an Apparatus for Multi-Use Mapping of an Optical Bio-Disc」40
と題する米国出願第10/370,272号および2003年1月19日付けで出願された「Fluidic Circuits for Sample Preparation Including Bio-Discs and Methods Relating Thereto」と題する米国仮出願第60/60/479,803号に提供されている。

【0122】

本明細書で言及したすべての特許、特許出願およびそれ以外の出版物は、本明細書でその全体が繰り返されるのと同様に、その内容のすべてが参照により本明細書に援用される。

【0123】

一定の好ましい実施形態を参照して、本発明を詳細に説明してきたが、本発明は、それらの正確な実施形態に限定されるものでないことが理解されるべきである。例えば、上記 50

の方法は血液細胞以外の標的を区別するのに用いることができる。他の標的には、これらに限定されないが、ウィルス、組織細胞、細菌、植物細胞および微生物を挙げることができる。逆に、本発明を実践する現在の最良の形態を説明する本開示を考慮すると、当業者には、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、多くの変更および変形が提示されるであろう。したがって、本発明の範囲は、上記説明ではなく、添付の特許請求の範囲によって示される。特許請求の範囲の意味するものおよび均等物の範囲内に入るすべての改変、変更、および変形は、特許請求の範囲の範囲内にあるとみなされる。

【図面の簡単な説明】

【0124】

【図1】本発明によるバイオディスクシステムのイラスト表示である。

10

【図2】本発明と共に利用される反射型バイオディスクの分解斜視図である。

【図3】図2に示すディスクの平面図である。

【図4】切り取り部分がディスクの様々な層を示す、図2に示すディスクの斜視図である。

【図5】本発明と共に使用される透過型バイオディスクの分解斜視図である。

【図6】切り取り部分がディスクの半反射層の機能的態様を示す、図5に示すディスクを表す斜視図である。

【図7】薄い金薄膜の厚さと透過との関係を示すグラフ表示である。

【図8】図5に示すディスクの平面図である。

【図9】切り取り部分が、図6に示す半反射層のタイプを含むディスクの様々な層を示す、図5に示すディスクの斜視図である。

20

【図10】図1のシステムをより詳細に示すブロック斜視図表示である。

【図11】図2、図3、および図4に示す反射型光バイオディスクに形成されたフロー流路を示す、当該反射型光バイオディスクの半径に対して垂直な部分断面図である。

【図12】図5、図8、および図9に示す透過型光バイオディスクに形成されたフロー流路および上部検出器を示す、当該透過型光バイオディスクの半径に対して垂直な部分断面図である。

【図13】図2、図3、および図4に示す反射型光バイオディスクに形成されたウォブル溝を示す当該反射型光バイオディスクの縦方向の部分断面図である。

【図14】図5、図8、および図9に示す透過型光バイオディスクに形成されたウォブル溝および上部検出器を示す当該透過型光バイオディスクの縦方向の部分断面図である。

30

【図15】反射型ディスクの全層と、反射型ディスクの最初の屈折特性とを示す図11と同様の図である。

【図16】透過型ディスクの全層と、透過型ディスクの最初の屈折特性とを示す図12と同様の図である。

【図17】本発明の方法を使用する血液サンプルの分析、および勾配細胞分離方法を使用する白血球細胞の単離を示す、イラストで表したフローチャートである。

【図18】ビーズによる、細胞の標識化のイラスト図 (pictorial illustration) である。

【図19】バイオディスク上で不要な細胞の結合を防止するためのビーズの使用を描く、本発明の実施形態のイラスト表示である。

40

【図20A】バイオディスク上に固定化された標的細胞を特異的にタグ付けする又は標識する様々なビーズを用いた、サンプル中の様々なタイプの細胞を同定する方法の工程を説明する、本発明の別の実施形態のグラフィック図を示す。

【図20B】バイオディスク上に固定化された標的細胞を特異的にタグ付けする又は標識する様々なビーズを用いた、サンプル中の様々なタイプの細胞を同定する方法の工程を説明する、本発明の別の実施形態のグラフィック図を示す。

【図21】光バイオディスクを用いた、当該微生物を捕捉する、且つその存在を検出するビーズの使用のイラスト表示である。

【図22】ビーズを用いた、不要な細胞のタグ付けのイラストである。

50

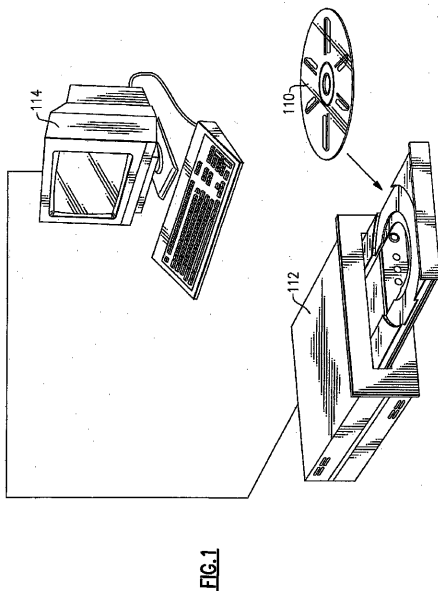
【図 2 3】 A は、本発明による光バイオディスクのトラックの近くに位置する、1 ミクロンレポータビーズと 5 ミクロン細胞が共に結合した複合体のグラフ表示である。 B は、本発明による光ドライブから検出されたシグナルを用いた、図 2 3 A の複合体に由来する一連のシグネチャトレース (signature trace) である。

【図 2 4】 非付着ビーズ、非標識細胞およびビーズー細胞複合体又は標識細胞の顕微鏡写真を示す。

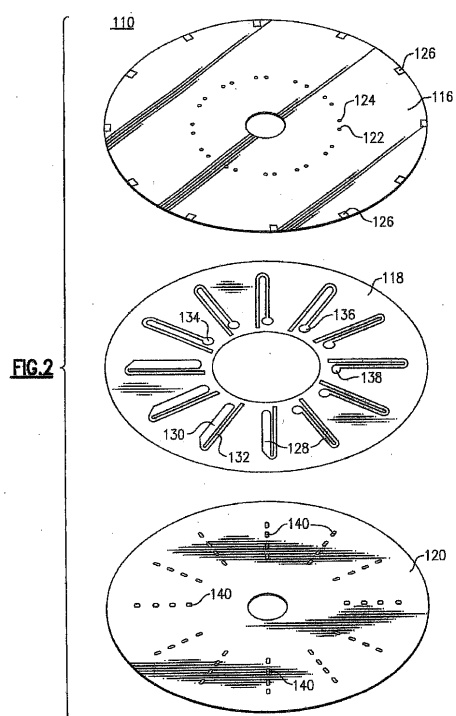
【図 2 5 A】 不必要な細胞を同定するために、酵素を用いて標的細胞から不要な細胞を分画する方法の工程を示す、本発明の別の実施形態のイラスト表示である。

【図 2 5 B】 不必要な細胞を同定するために、酵素を用いて標的細胞から不必要な細胞を分画する方法の工程を示す、本発明の別の実施形態のイラスト表示である。

【図 1】



【図 2】



【図 3】

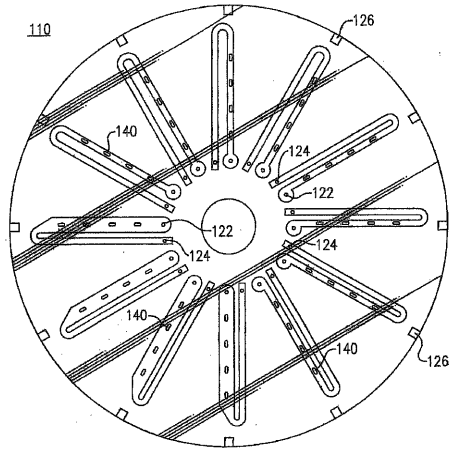


FIG. 3

【図 4】

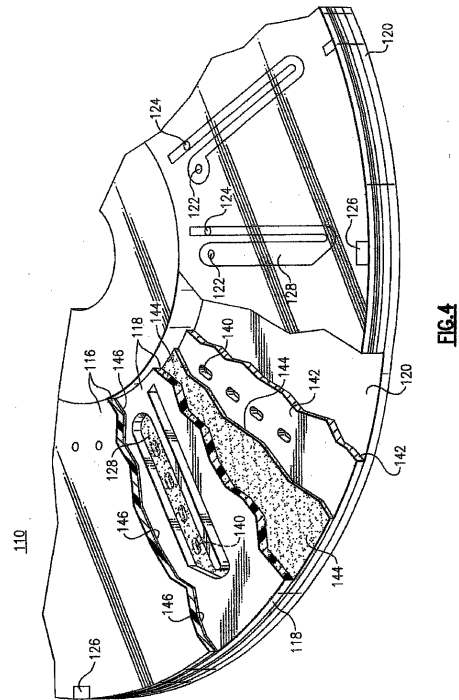


FIG. 4

【図 5】

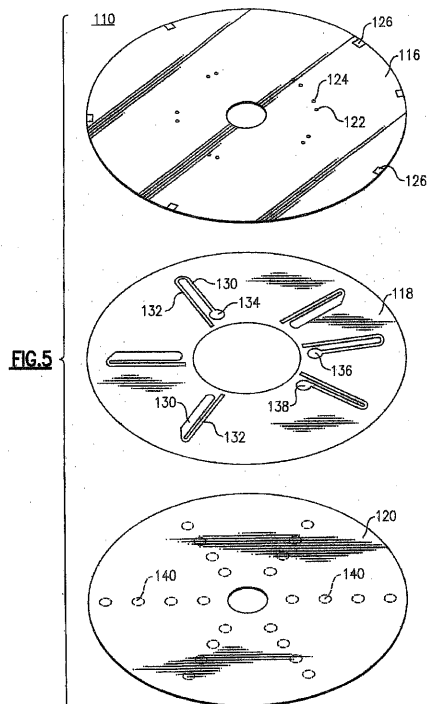


FIG. 5

【図 6】

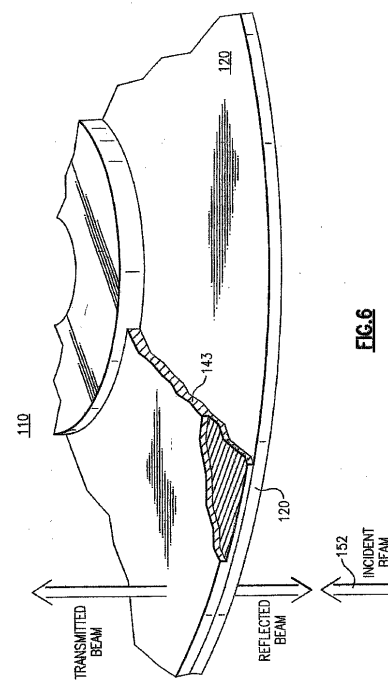
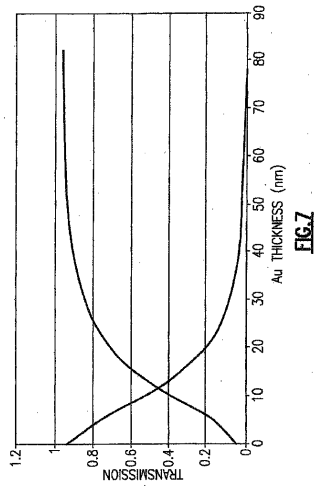
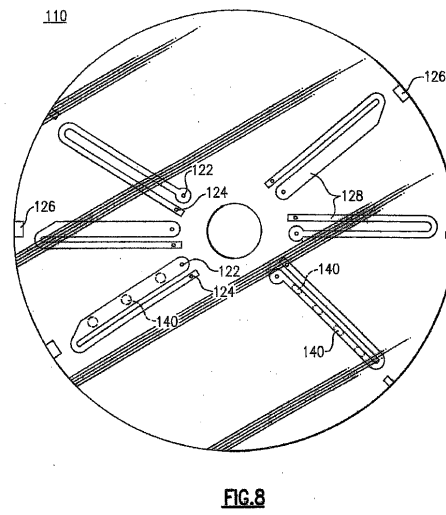


FIG. 6

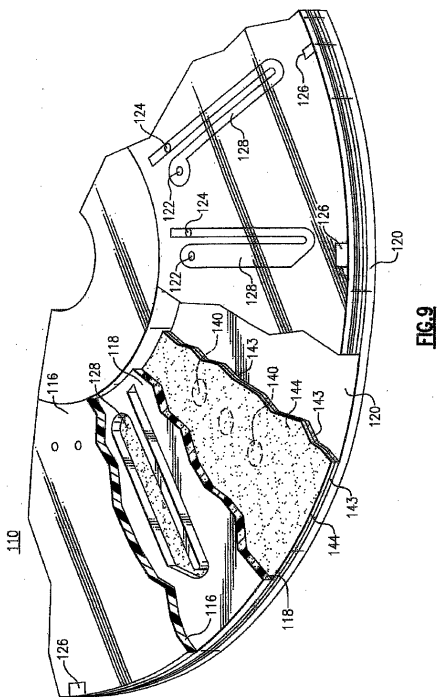
【図 7】



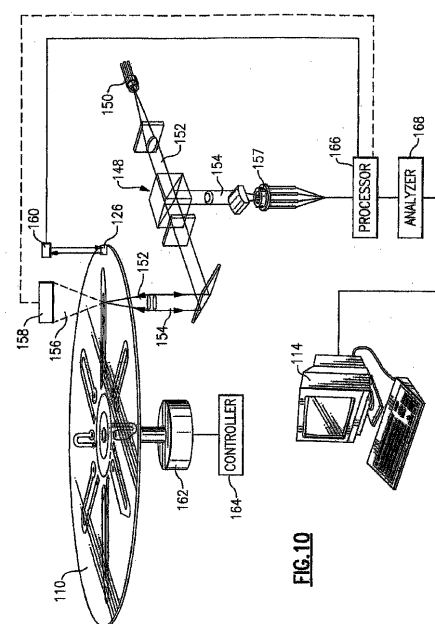
【図 8】



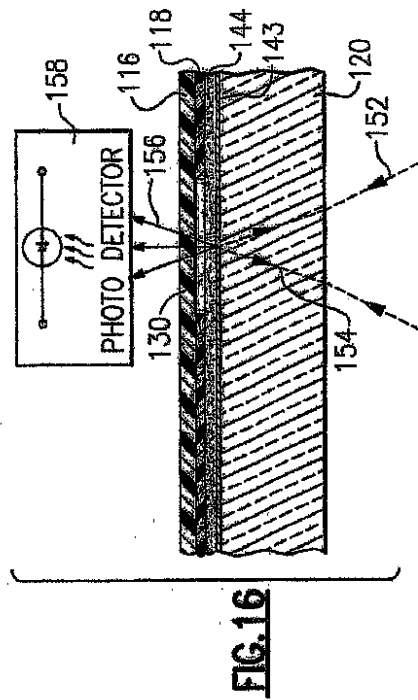
【図 9】



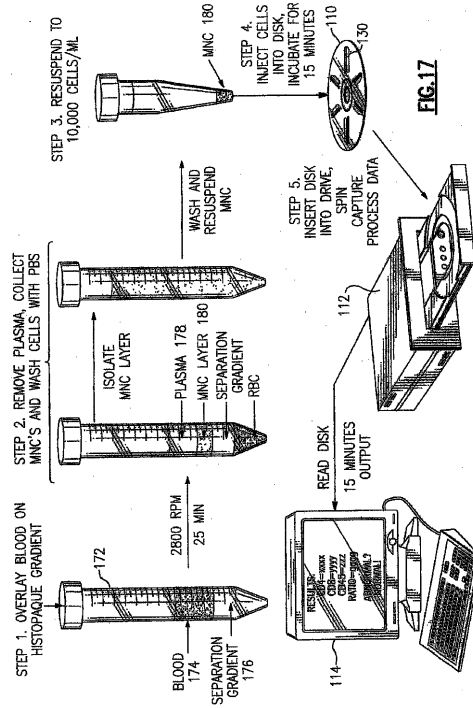
【図 10】



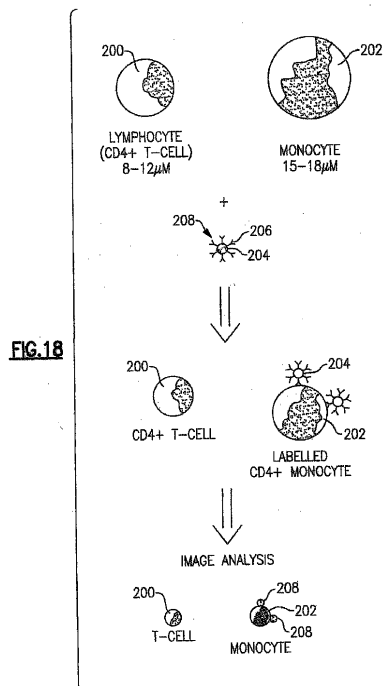
【図 16】



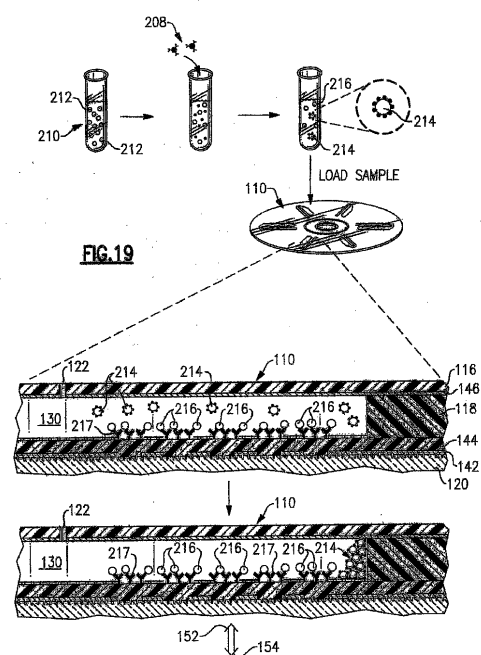
【図 17】



【図 18】



【図 19】



【図 20 A】

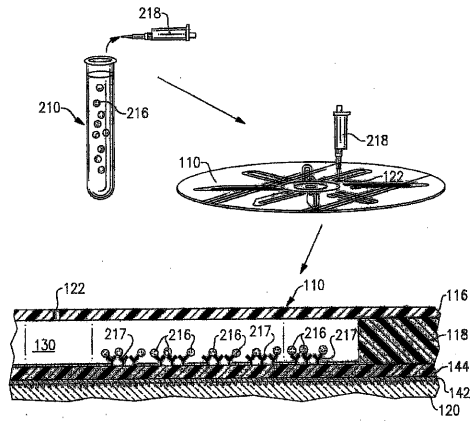


FIG. 20A

【図 20 B】

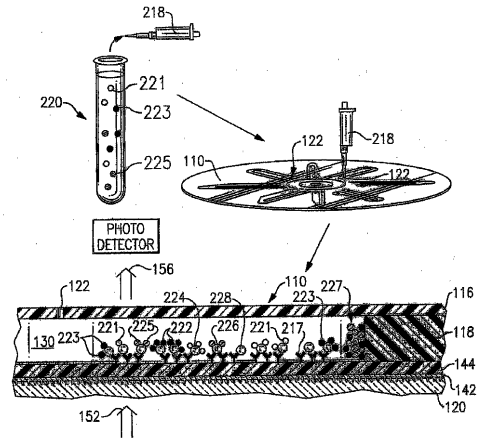


FIG. 20B

【図 21】

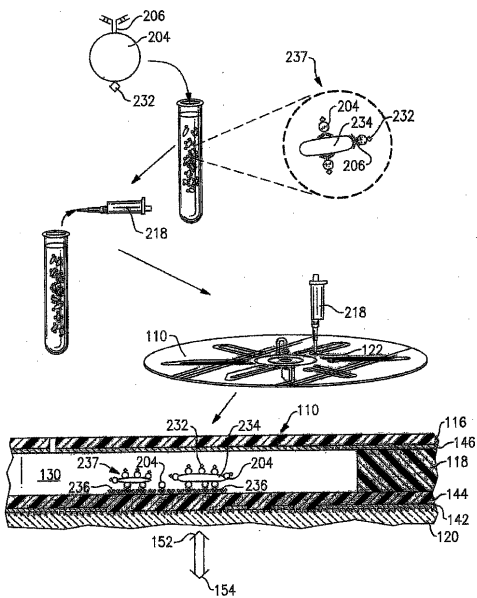


FIG. 21

【図 22】

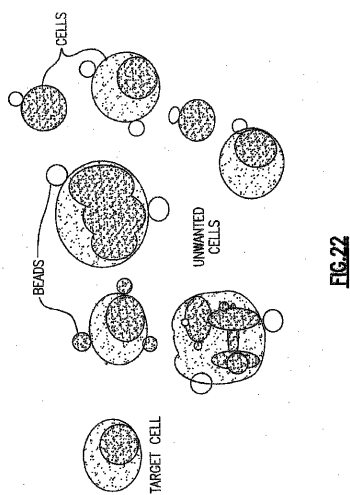


FIG. 22

【図 23 A】

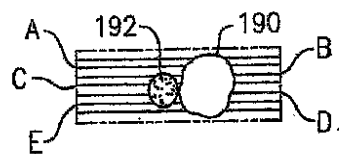


FIG. 23A

【図 2 3 B】

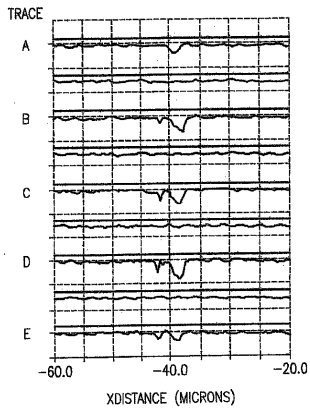
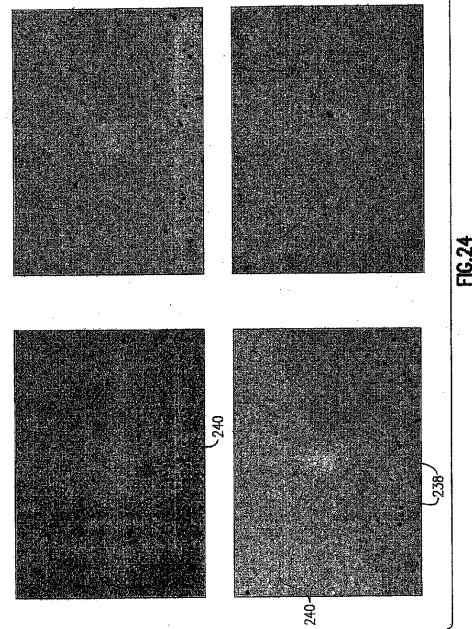


FIG.23B

【図 2 4】



【図 2 5 A】

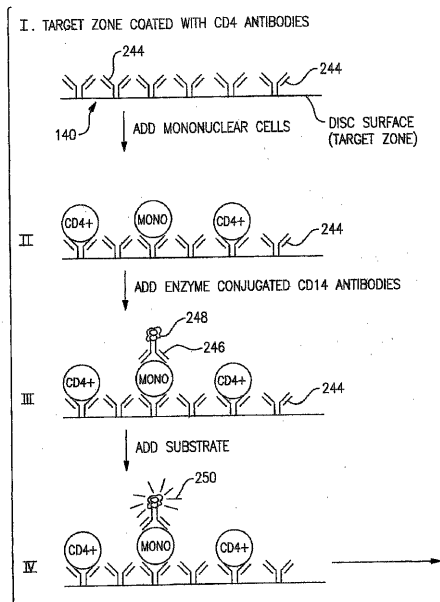


FIG.25A

【図 2 5 B】

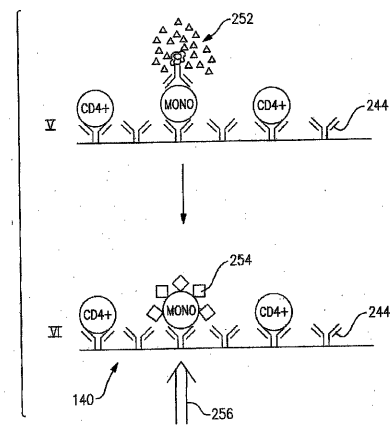


FIG.25B

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PC 32004/002780

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/569 G01N33/543 G01N35/00

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)

IPC 7 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, EMBASE, BIOSIS, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 311 492 A (SANOFI SA) 12 April 1989 (1989-04-12) the whole document in particular page 3, lines 45-57; page 5, lines 30-62; page 6, line 65 - page 7, line 5; Example 2 and 3.	1-8, 11-14, 21-38
Y	WO 03/006956 A (GLENCROSS DEBORAH KIM ; NAT HEALTH LAB SERVICE (ZA); UNIV WITWATERSRAN) 23 January 2003 (2003-01-23) the whole document in particular page 6, line 1 - page 7, line 3; Example 1.	1-8, 11-14, 21-38

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in 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.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 2004

Date of mailing of the international search report

14.04.05

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Thumb, W

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PC 2004/002780

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 02/44695 A (BURSTEIN TECHNOLOGIES INC) 6 June 2002 (2002-06-06) the whole document in particular page 5, lines 4-25; page 10, lines 1-15; page 11, line 27 - page 12, line 7; page 15, line - page 18, line 22; page 21, lines 6-27;	1-8, 11-14, 21-38
Y	US 2002/076804 A1 (KIEFFER-HIGGINS STEPHEN G ET AL) 20 June 2002 (2002-06-20) the whole document in particular Figure 2; paragraphs 38-39, 41, 48, 100, 174-176	1-8, 11-14, 21-38
Y	WO 00/05582 A (BURSTEIN LAB INC) 3 February 2000 (2000-02-03) the whole document in particular page 110-117.	1-8, 11-14, 21-38
A	US 2002/072078 A1 (LIU JIUAN ET AL) 13 June 2002 (2002-06-13) the whole document	1-8, 11-14, 21-38
A	US 5 348 859 A (COULTER WALLACE H ET AL) 20 September 1994 (1994-09-20) the whole document	1-8, 11-14, 21-38

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2004/002780

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this International application, as follows:

see additional sheet

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-8, 11-14, 21-38

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/IB2004 /002780

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. claims: 1-8,11-14,21-38

A bio-disc comprising a target zone having immobilised thereon capture antibodies, said antibodies binding to a surface marker common to different populations of cells (i.e. target and non-target cells). Methods for detecting subpopulations of cells in a sample using said bio-discs by tagging said subpopulations with antibodies specific for the target subpopulations.

2. claims: 9,10,15-20,39-50

A bio-disc having one or a plurality of capture antibodies immobilised in a target zone. The nature of the capture antibodies is not defined. Methods for detecting target cells in a sample using said bio-discs.

3. claims: 51-54

A method for detecting target cells, wherein capture antibodies are immobilised on a bio-disc using a pair of affinity binding agents. The capture antibody is incubated with the target cells prior to application of the sample to the bio-disc.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/ 004/002780

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0311492 A	12-04-1989	FR 2621128 A1	31-03-1989
		AT 103711 T	15-04-1994
		AU 2294888 A	06-04-1989
		CA 1340973 C	25-04-2000
		DE 3888779 D1	05-05-1994
		DE 3888779 T2	08-09-1994
		DK 550288 A	31-03-1989
		EP 0311492 A2	12-04-1989
		ES 2053785 T3	01-08-1994
		FI 884472 A ,B,	31-03-1989
		HK 1001570 A1	26-06-1998
		IE 63426 B1	19-04-1995
		IL 87882 A	14-01-1993
		JP 1121755 A	15-05-1989
		KR 126236 B1	24-12-1997
		NO 884327 A ,B,	31-03-1989
		PT 88615 A ,B	31-07-1989
		US 6461825 B1	08-10-2002
WO 03006956 A	23-01-2003	WO 03006956 A2	23-01-2003
		JP 2004533855 T	11-11-2004
		US 2004197768 A1	07-10-2004
WO 0244695 A	06-06-2002	AU 4160202 A	11-06-2002
		WO 0244695 A1	06-06-2002
		US 2003104486 A1	05-06-2003
		WO 02051537 A2	04-07-2002
		US 2002168652 A1	14-11-2002
		US 2003077598 A1	24-04-2003
US 2002076804 A1	20-06-2002	US 6319468 B1	20-11-2001
		US 6143247 A	07-11-2000
		US 2004142494 A1	22-07-2004
		AU 5895898 A	17-07-1998
		WO 9828623 A1	02-07-1998
WO 0005582 A	03-02-2000	US 6200755 B1	13-03-2001
		AU 5080699 A	14-02-2000
		CA 2338401 A1	03-02-2000
		EP 1097378 A2	09-05-2001
		HU 0103577 A2	28-01-2002
		JP 2002521666 T	16-07-2002
		WO 0005582 A2	03-02-2000
		US 2003054376 A1	20-03-2003
		US 6342349 B1	29-01-2002
		US 2002106661 A1	08-08-2002
US 2002072078 A1	13-06-2002	NONE	
US 5348859 A	20-09-1994	US 5340719 A	23-08-1994
		AU 2008992 A	30-12-1992
		BR 9206033 A	29-11-1994
		CN 1067118 A	16-12-1992
		EP 0585385 A1	09-03-1994
		IL 101826 A	31-01-1996
		JP 6507971 T	08-09-1994
		WO 9221027 A1	26-11-1992
		AU 652599 B2	01-09-1994

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT 04/002780

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5348859 A		AU 9091091 A	25-06-1992
		CA 2096502 A1	24-05-1992
		CN 1062212 A	24-06-1992
		EG 19765 A	29-02-1996
		EP 0558639 A1	08-09-1993
		HU 67053 A2	30-01-1995
		IL 100124 A	31-12-1995
		JP 6503171 T	07-04-1994
		MX 9102194 A1	30-06-1994
		NO 931763 A	15-06-1993
		WO 9209878 A1	11-06-1992
		US 5554505 A	10-09-1996
		ZA 9109253 A	24-05-1993

フロントページの続き

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

(74)代理人 100089244

弁理士 遠山 勉

(72)発明者 コームズ, ジェームズ ハワード

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 0 6 アーバイン サン レオン ビラ 1 7 5

(72)発明者 ゴードン, ジョン フランシス

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 0 6 アーバイン ニュー ジャージー 2 0

(72)発明者 ファン, ブリジット チャウ

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 1 2 アーバイン ストーンクリFFE アイル 1 7 1

(72)発明者 ウルシア, ジョゼフ ロビー イリンガン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 8 3 ウェストミンスター マリオン アヴェニュー
8 5 1 1