

(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2007-503593

(P2007-503593A)

(43) 公表日 平成19年2月22日(2007.2.22)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 1/30 (2006.01)	G O 1 N 1/30	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/24 (2006.01)	C 1 2 Q 1/24	2 G O 5 2
G O 1 N 33/48 (2006.01)	G O 1 N 33/48 P	4 B O 6 3
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/543 5 9 7	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 47 頁)

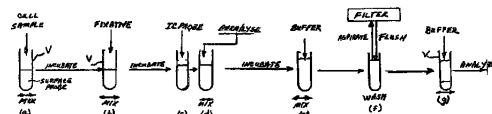
(21) 出願番号	特願2006-532463 (P2006-532463)	(71) 出願人	505275295
(86) (22) 出願日	平成16年4月26日 (2004. 4. 26)		ベックマン コールター, インコーポレイ
(85) 翻訳文提出日	平成18年1月13日 (2006. 1. 13)		ティド
(86) 国際出願番号	PCT/US2004/012761		アメリカ合衆国, カリフォルニア 9 2 8
(87) 国際公開番号	W02004/104164		3 4, フラートン, ノース ハーバー プ
(87) 国際公開日	平成16年12月2日 (2004. 12. 2)		ールバード 4 3 0 0, メール コード
(31) 優先権主張番号	10/437, 695		エー-4 2 -シー
(32) 優先日	平成15年5月14日 (2003. 5. 14)	(74) 代理人	100099759
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 青木 篤
		(74) 代理人	100077517
			弁理士 石田 敬
		(74) 代理人	100087871
			弁理士 福本 積
		(74) 代理人	100087413
			弁理士 古賀 哲次

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フローサイトメトリーを使用する細胞内抗原検出のための細胞サンプルを調製するための方法及び装置

(57) 【要約】

細胞内分析のための生物細胞サンプルを調製するための方法及び装置。本発明は、かかるサンプル調製のための常用の方法の多くの段階が除かれ、方法自体を自動化してそれに伴う利点に至るという認識に基づく。本発明の方法は、(a)細胞の固定化、(b)透過化及び(c)フローサイトメトリー技術により容易に検出可能であるプローブによる注目の細胞内分子の染色(又は標識)を含んで成り、全ては細胞洗浄段階(及び再懸濁)段階を伴わない。むしろ、単独の細胞洗浄段階は、これら3つの段階が行われた後に影響されている。好適に、当該洗浄段階は、注目の細胞を維持する一方で干渉物質をろ過して廃棄する半透過性の膜に、固定化、透過化及び染色した細胞サンプルを通過せしめることによって行われている。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内成分を検出するための生物細胞サンプルを調製するための方法であって、当該方法は：

(a)所定体積の生物細胞サンプルを反応容器中へと分注し、前記細胞サンプルは注目の所定の細胞内分子を含んで成る注目の所定の細胞を含み；

(b)前記注目の細胞内分子の検出に干渉する傾向がある細胞サンプルの干渉物質を除去するための介在する洗浄段階を何ら伴うことなく、前記注目の細胞を固定化し、前記注目の細胞を透過化し、そして前記注目の細胞内分子を染色し；そして

(c)当該細胞サンプルを段階(b)を行う後に洗浄して前記干渉物質の存在を最小化する、
段階を含んで成る方法。 10

【請求項 2】

前記洗浄段階を、染色された細胞内抗原又は注目の分子を含む注目の細胞を選択的に維持するように適合せしめられた半透膜により前記細胞サンプルをろ過することによって行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記半透膜は、細胞サンプルがその中へと引き込まれる中空繊維の形態である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記洗浄段階を遠心方法によって行う請求項 1 に記載の方法。 20

【請求項 5】

前記段階(b)が、前記反応容器内で前記注目の細胞上の表層抗原を染色する段階を更に含んで成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記表層抗原を染色する段階を前記固定化段階の前に行う、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記注目の細胞内分子を染色する段階を前記固定化段階の前に行う、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記注目の細胞内分子を染色する前記段階を前記固定化段階の後に行う、請求項 5 に記載の方法。 30

【請求項 9】

前記生物細胞サンプルが赤血球を含む全血を含んで成り、そしてここで段階(b)が当該赤血球を溶解せしめて実質的に当該生物細胞サンプルから当該赤血球を除去することを更に含んで成る方法。

【請求項 10】

前記生物細胞サンプルが、全血、精製した細胞系統、腫瘍細胞、組織及び骨髓からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞サンプルがタンパク質輸送阻害物質を含む、請求項 1 に記載の方法。 40

【請求項 12】

前記細胞内分子が、サイトカイン、チューブリンフィラメント、中間体フィラメント、デフェンシン、エフェクター、サイトケラチン、アクチン、B-細胞抗原レセプター複合体、増殖抗原、酵素、及びアポトーシスタンパク質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記染色段階を、前記注目の細胞内分子に対して特異的なフルオロクローム標識した抗体により行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分析をフローサイトメーター上で行う請求項 1 に記載の方法。 50

【請求項 15】

細胞内アッセイのための生物細胞サンプルを調製するための方法であって、当該方法は本質的に：

- (a) 所定の体積の生物細胞サンプルを反応容器中へと分注し、当該細胞サンプルは注目の所定の細胞内分子を含んで成る注目の所定の細胞を含み；
 - (b) 前記反応容器へ、前記生物細胞サンプル内の前記注目の細胞の細胞膜の完全性を維持するため且つ前記注目の細胞内の前記注目の細胞内分子の局在化を維持するために適合せしめられた所定の体積の固定化試薬を加え；
 - (c) 前記反応容器内の前記固定化試薬及び前記生物細胞サンプルをインキュベートして安定化した細胞サンプルを提供し；
 - (d) 前記反応容器へ、前記注目の細胞内の前記注目の細胞内分子に対して特異的である所定体積の少なくとも 1 種類の細胞内プローブを加え；
 - (e) 前記反応容器に、前記注目の細胞の前記細胞膜を透過化するように適合せしめられた所定の体積の透過化試薬を加え；
 - (f) 前記安定化した生物細胞サンプルと前記細胞内プローブ及び前記透過化試薬をインキュベートして前記注目の細胞の前記細胞膜を透過化できるようにして、そして前記細胞内プローブを前記注目の細胞内の細胞内分子結合させ、そしてそれにより標識し；
 - (g) 前記反応容器に、前記注目の細胞を希釈するため且つ前記細胞膜の更なる透過化を阻害するために適合せしめられた所定の体積の希釈剤を加え、それによって前記注目の細胞内の標識された細胞内分子を含む希釈されたサンプルを形成せしめ；
 - (h) 前記希釈したサンプルを洗浄して、前記注目の標識された細胞内分子の検出に干渉する傾向がある前記サンプルの粒子を除去し、それによって、注目の細胞内の標識された細胞内分子を含む洗浄されたサンプルを提供し；そして
 - (i) 前記洗浄したサンプルへ所定の体積の希釈剤を加えて、フローサイトメーターによる前記標識された細胞内分子の分析をするために適合せしめられた希釈剤中、再懸濁及びろ過されたサンプルを提供する、
- 段階から成る方法。

10

20

【請求項 16】

前記洗浄段階が、前記希釈されたサンプルを、半透膜であって、前記希釈剤、並びに当該希釈されたサンプル内の全ての未結合プローブが通過するように適合せしめられた半透膜へ通す段階を含んで成る、請求項 11 に記載の方法。

30

【請求項 17】

前記半透過膜が、細胞サンプルがその中へと引き込まれる中空繊維の形態である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記反応容器へ、前記注目の細胞の表層上の分子に対して特異的である所定の体積の細胞表層プローブを少なくとも 1 種類加える段階を更に含んで成る、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

生物細胞サンプル内の注目の細胞に含まれた細胞内分子の分析をするための前記細胞サンプルを調製するための自動化方法であって、当該方法は、オペレーターが関与せずに以下の段階：

40

- (a) 前記所定の体積の生物細胞サンプルを反応容器中へと分注し；
- (b) 前記反応容器に、前記注目の細胞の細胞膜の完全性を維持するため且つ前記注目の細胞内の細胞内分子の局在化を維持するために適合せしめられた所定の体積の固定化試薬を加え；
- (c) 前記固定化試薬及び前記生物細胞サンプルを所定の時間に渡りインキュベートして安定化した細胞サンプルを提供し；
- (d) 前記反応容器へ、前記注目の細胞内の前記注目の分子に対して特異的である所定の体積の細胞内プローブを少なくとも 1 種類加え；

50

(e)前記反応容器へ、前記注目の細胞の前記透過化される細胞膜に適合せしめられた所定の体積の透過化試薬を加え；

(f)前記安定化した生物細胞サンプルと前記細胞内プローブ及び前記透過化試薬を所定の時間に渡りインキュベートして前記細胞膜を透過化し、そして前記細胞内プローブを前記注目の細胞内の細胞内分子と結合させ、そしてそれにより標識し；

(g)前記反応容器へ、注目の細胞を希釈するため且つ前記細胞膜の更なる透過化を阻害するために適合せしめられた所定の体積の希釈剤を加え、それによって注目の細胞内の前記標識された細胞内分子を含む希釈されたサンプルを形成せしめ；

(h)前記希釈したサンプルを前記希釈剤を加える所定の時間内にろ過して、当該前記注目の細胞内分子を、段階(a)～(g)を行った結果として前記細胞サンプル中に含まれた未結合プローブ及び他の干渉物質から分離し、それによって、注目の前記細胞内の標識された細胞内分子を含むろ過されたサンプルを提供し；そして

(i)前記ろ過したサンプルへ、所定の体積の希釈剤を加えて、前記細胞内分子の分析をするために適合せしめられた希釈及びろ過されたサンプルを提供する段階、を行う自動化した装置によって行われる方法。

【請求項20】

前記生物細胞サンプルが赤血球及び白血球を含んで成り、そしてここで前記自動化方法は更に、前記ろ過段階前に前記生物細胞サンプル中の当該赤血球を溶解する段階を更に含んで成る、請求項19に記載の方法。

【請求項21】

前記反応容器へ、前記注目の細胞に対して特異的である所定の体積の標識した細胞表層プローブを加える段階を更に含んで成り、当該標識した表層プローブを段階(b)の前に反応容器へ加える、請求項19に記載の方法。

【請求項22】

前記反応容器へ、前記注目の細胞に対して特異的である所定の体積の標識した細胞表層プローブを加える段階を更に含んで成り、当該標識した表層プローブを段階(b)の前に反応容器に加える、請求項19に記載の方法。

【請求項23】

フローサイトメーター装置による細胞内アッセイのための生物細胞サンプルを自動的に調製するための自動化装置システムであって、当該システムは：

a)分注/インキュベート要素であって、所定体積の試薬物質をかかえる物質の供給源から、細胞サンプルが入っている複数の反応容器の各々に分注し、そして当該反応容器中の細胞サンプル及び試薬物質の混合物を所定の温度及び所定の時間に渡りインキュベートして処理された細胞サンプルを提供するように選択的に操作可能な要素であって、ここで所定の注目の細胞内の所定の細胞内分子は当該フローサイトメーターによる検出のために標識されており；

b)細胞洗浄要素であって、そこに存在する処理された細胞サンプル内の注目の細胞を注目の細胞内分子のフローサイトメトリ検出を損う傾向があるだろう干渉物質及び破片から分離するために選択的に操作可能な要素；

c)反応容器輸送要素であって、反応容器の前記分注/インキュベート要素から当該細胞洗浄要素への輸送を行うために選択的に操作可能な要素；並びに

d)要素a)～c)の操作を同調させるためのロジック及びコントロール手段、を含んで成る自動化装置システム。

【請求項24】

細胞洗浄要素が、細胞破片及び他の干渉物質を通過しうるが注目の細胞を通過しない半透過性の壁を有する管状メンバーを含んで成る、請求項23に記載の装置システム。

【請求項25】

前記細胞洗浄要素が、前記細胞サンプルを、干渉物質を伴い、前記反応容器から引き出して前記管状メンバー中へと入れる真空源を伴う分注装置を含んで成り、ここで前記注目の細胞は、当該真空源により提供された力の下で当該管状メンバーに捕捉され、その一方

10

20

30

40

50

で、干渉物質は半透過性の壁を通過する、請求項 2 3 に記載の装置システム。

【請求項 2 6】

前記細胞洗浄要素が、希釈要素であって、前記管状メンバー中で捕捉された細胞を最初又は他の反応容器に同時に進めるため、そして当該捕捉した細胞をバッファー中で次の分析のために再懸濁するための希釈要素を含んで成る、請求項 2 3 に記載の装置システム。

【請求項 2 7】

前記分注/インキュベート要素及び前記細胞洗浄要素が共通のハウジング内部に入れている、請求項 2 3 に記載の装置システム。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

10

【0 0 0 1】

発明の背景

発明の分野

本発明は、フローサイトメトリー技術を使用する細胞内アッセイのための、細胞サンプル、例えば、ヒト血液サンプルを調製するための方法及び装置における改良に関連する。

【0 0 0 2】

従来技術の検討

蛍光フローサイトメトリーを使用する細胞表層免疫表現型検査は、多くの様々な細胞型を含有する細胞サンプル中の注目の細胞を識別及び計測するための比較的慣用の方法になってきている。典型的に、注目の細胞の外部表層上の抗原に対して特異的である細胞表層プローブの例えば、フルオロクローム標識モノクローナル抗体(MAB)又は他の適切な標識がされたりガンドは、後の検出のためにかかる細胞を選択的に標識又は「染色」するために使用されている。フローサイトメーターを操作し、サンプル中の個々の細胞に、フルオロクローム標識を励起するために特異的に適合された放射線を伴い、放射線照射することによって、染色された細胞を検出する。蛍光標識及びそれらが結合した細胞は、放射線照射された場合、放射線照射された細胞の物理学的及び光学的な特性によって特定されるあるパターンにおいて入射光を散乱する。フローサイトメーター内の適切な光検出器が散乱した放射線及び蛍光を検出し、そしてそれらそれぞれの出力シグナルが使用され、異なる細胞型を、それらの相対光散乱及び蛍光サインに基づき識別する。

20

【0 0 0 3】

細胞表層免疫表現型検査のためのサンプルを調製するための方法は、比較的単純である。基本的に、細胞表層プローブは、細胞サンプルと混合され、そして生じる混合物は、プローブを注目の細胞に対して結合させるために十分な時間に渡りインキュベートされている。この後、もし細胞サンプルが全血サンプルであれば、標識された細胞サンプルは、赤血球を除去するために溶解させられて良い。任意に、標識された細胞サンプルは、干渉体の例えば、未結合プローブ、細胞断片及び注目の細胞の検出に干渉しうる他の破片を除去するために溶解されて良い。かかる細胞調製が往々にして手動で行われている一方で、自動化細胞調製装置が、サンプル調製方法を促すために商業上入手可能である。これらの装置は、それらが、多くの潜在的な人的エラー及びそれらが行うサンプル調製段階による他のばらつきをとり除く点において有利であり、それにより、一層再現性のある結果がもたらされる。かかる自動化された装置としては、例えば、様々な分注装置が挙げられ、それは、正確な量のサンプル及び試薬物質(例えば、細胞表層マーカー)を、物質と一緒に混合される(振動又はボルテックス混合によって)1もしくは複数の反応容器もしくは管へと分注するために適切なプログラムがなされたマイクロプロセッサのコントロール下で作動する。かかる装置の1つには、Beckman Coulter, Inc., Miami, FLによって生産販売されているPrep Plus2 Sample Prep装置が挙げられる。細胞表層免疫表現型検査のためのサンプル調製法を促す他の単独型の装置とはしては、全血サンプルを溶解するために作動するものの例えば、Beckman Coulterによって販売されたPrep Sample Prepワークステーションラインが挙げられ、そして実際には、サンプル内の注目の細胞の検出に逆効果となる細胞の破片を除去するためにサンプルを洗浄するものが挙げられる。かかるサンプル洗浄装

30

40

50

置してはBeckman Coulter, Incによって市販されている様々な遠心装置、並びにCell Prep Cell Washerが挙げられる。後者の装置は、2002年9月5日に刊行されたBurshteynら、米国特許No.2002/0123154 A1に詳細が記載されているように、多孔質(即ち、半透過性)中空繊維膜を使用してそれに存在する細胞サンプルをろ過するために作動する。

【0004】

細胞表層免疫表現型検査のための細胞サンプル調製方法の様々な部分を自動的に行うように適合された多くの単独型のサンプル調製システムに加えて、フローサイトメーター自体の環境内で、必要となる全てのサンプル調製段階の全てを自動的に行うように動作するいくつかのフローサイトメーターがある。例えば、Abbott Laboratoriesによって製作されたCell DyneT(登録商標) "4000 Blood Analyzer及びToa Electronicsによって作製されたR-1000が挙げられる。これらの装置はどちらも、測定装置内で調製された細胞サンプルに対する血液学且つ蛍光フローサイトメトリー結果を供す。後者の装置において、網状赤血球を含有する細胞サンプルは、当該細胞サンプルを、網状赤血球により選択的に吸着されてかかる膜に含まれているRNAによって取り込まれる蛍光染色剤を混合することによってフローサイトメトリー分析のために調製されている。これらの装置のどちらにおいても細胞サンプルは、分析のために当該サンプルが光学フローセルを通過する前に洗浄されることがない。

10

【0005】

細胞サンプルの調製は、細胞表層免疫表現型検査の場合、比較的単純な事項としてみなされており、従って、それはある程度の自動化を許すことができ、そして従って、細胞内アッセイのために細胞サンプルを調製するための方法は、非常に一層複雑である。当然、かかるアッセイは、細胞内にアクセスし、注目の細胞内抗原又は分子の例えば、サイトカイン、ケモカイン、デフェンシン、エフェクター分子などが同定のために標識されるようにする必要がある。細胞内抗原及び分子をフローサイトメーター上で同定するために標識に使用されるプローブは通常、比較的巨大なサイズであり、通常、リガンド/フルオロクローム結合体の形態にあり、サンプル調製法は、これらのプローブを細胞内に通過して入れるために細胞膜において対応する巨大な開口部を生じさせる透過化段階を含まなければならない。(上記の型の網状赤血球アッセイは、細胞内抗原の網状赤血球内RNAが、網状赤血球を同定するために標識される細胞内アッセイとして認識されて良く、このアッセイのための細胞サンプルの調製には、細胞膜の孔を通過するRNAを標識するために比較的小さな蛍光色素分子を使用し、それによって細胞内のRNAに対してアクセスするために任意の特別な前処理(例えば、透過化)が必要とされないことに留意されたい。)

20

30

【0006】

細胞内アッセイのためのサンプル調製方法は、細胞膜を透過化にする必要があることに加えて、透過化の間に膜の完全性を維持し且つ当該透過化の後に細胞から細胞内物質が拡散放出することを防ぐために、細胞膜及び細胞の内容物が、透過化段階前に「固定化されている」ことも必要となる。この固定化段階は、従って、それらはおよそ細胞内に入るプローブに対して一層容易にアクセス可能であるように、注目の細胞内抗原の局在化を防ぐ働きをもする。この固定化段階は(a)プローブが細胞膜に入るのを防ぐ、(b)プローブが注目の細胞内抗原に対するアクセス性を獲得するのを防ぐ、又は(c)抗原がプローブによって認識不可能である程度に抗原のコンフォメーションを変更するように働きえないことが理解されるだろう。

40

【0007】

細胞内サンプル調製方法に対する更に複雑な因子とは、注目の抗原が検出されるバックグラウンドレベルが上昇するように働きうる干渉物質又は汚染物質が実質上無いサンプルを最終的に生産することが必要である。多くの細胞内抗原は、細胞内に非常に低量で存在し、従って検出のために、対応する低い量の、実質上干渉物がないバックグラウンドレベルが必要であることと解されるだろう。更に、注目の細胞内抗原は時々、分析サンプルを含んで成る細胞中で低い%で発見され、従って、「レアな事象」とみなされうる。従って、サンプル中の全ての汚染物質のレベルをコントロールすることは、かかるアッセイの精度及

50

び再現性のために重要である。細胞内アッセイのための調製物中の注目の細胞を固定化及び透過化する両方が必要となることにより、本明細書中に記載のように、当該サンプル調製方法には、注目の細胞内抗原の検出を損なわせる前記干渉物質を除去するための多数の洗浄段階が通常必要となる。

【0008】

今日まで、常用の細胞内サンプル調製方法に関連した上記各洗浄段階は、遠心を伴い行われている。サンプル容器にバッファー溶液を加えてその体積を高めることにより、サンプルは、注目の細胞の濃縮ペレットを生産するために比較的高い力(例えば、300~500g)で回転沈降される。干渉物質等を含む残りの上清の部分は、次いで慎重に注ぎ出され、そして残りの上清はサンプルを再懸濁させるために使用される。次いで、厳密なボルテックス混合が、ペレットの個々の細胞を分散させるために必要である。細胞を洗浄する方法は、反応容器内で可溶性成分から注目の細胞を物理的に分離することにおいて非常に有効であると考えられている一方で、遠心に伴う明らかな欠点はいくつかある。例えば、遠心方法から生じる全ての上清を除去することは、サンプル中の細胞の総数における有意なロスをもたらしえ、又は所定の細胞型を選択的にロスすることにつながりうる。そしてまた、遠心装置はそれ自体、往々にして比較的かさばり、そしてそれをしつらえるのに研究室に有意なスペースが必要となる。更に、透過化された細胞を遠心によって干渉物質から分離する場合、更なる問題がある。例えば、透過化された細胞が透過化法の結果、一層浮力が増すことが知られており;更に、細胞が粘着性を有するようになり且つ一緒に塊となる傾向があることも知られている。このような浮力の増加により、所望のペレット化を達成するためにより高いg力が必要となり且つより長い時間が必要となる。g力が増加すれば、透過化した膜がより粘着性になり個々の細胞を再懸濁させることが一層困難にさえもなる。更に悪いことに、g力が増加したことにより細胞膜が破壊され、そして細胞全体が失われるだろう。

【0009】

上記の議論から理解されるように、細胞内アッセイのための細胞サンプルを調製するための常用の方法は、比較的複雑でありそして、その複雑さゆえ、様々な方法において慣用的に手動で行われている。図1を参考にすれば、典型的な常用の方法は、以下のようにまとめられて良い:最初に、所定体積の細胞表層マーカー(例えば、適切に標識されたモノクローナル抗体)が反応容器中で所定体積の細胞サンプル(例えば、全血サンプル)に加えられる。この表層マーカーは、フローサイトメトリーによって、細胞内抗原又は分子がアッセイされる細胞を同定することを目的とされている。血液サンプルと細胞表層マーカーを穏やかに混合して当該混合物を更に所定の時間及び所定の温度(例えば、室温)に渡りインキュベートした後、所定の体積の細胞固定化試薬(例えば、ホルムアルデヒド溶液)を加える。固定化剤と血液サンプルを混合すること(それは固定化剤を容器中に所定の速度で入れるかあるいは、固定化剤とサンプルを、当該固定化剤を非常にゆっくりとした速度で加えた後に、ボルテックスにかけることにより達成される)により、生じる混合物を再度インキュベートする。上記のように、インキュベーション時間及び固定化強度は、所望の程度の固定化を達成するために重要である。この後、固定化したサンプルをサンプルの干渉物質を取り除くために遠心により洗浄する。遠心(洗浄)のためのサンプルを調製するために、過剰(例えば、20倍)のバッファー溶液(例えば、リン酸バッファー塩類溶液)を加える。このバッファーは、固定化剤の固定化作用を止め、干渉する試薬を希釈し、そしてサンプル体積を遠心のために適したレベルに増加させる効果を有する。次いで、このサンプルを、遠心に移し、ここでそれを回転沈降して、そして干渉物質を含有する液体上清によって網羅された細胞の比較的濃縮されたペレットが生産される。反应用器を遠心から取り外して慎重(注目の細胞のロスを避けるために)に上清の大部分を除去することにより、残りの物質を厳密なボルテックス混合に委ね、好適には適切な混合装置上で行い、ペレットの細胞を分散及び再度懸濁させる。次いで、細胞内プローブ(例えば、フルオロクローム標識を伴うMAB)を加え、しかる後に所定体積の透過化/溶解試薬(例えば、サポニン)又はその逆を加える。穏やかな混合段階後、プローブ及び透過化/溶解試薬を、所定の時間に渡

り固定化されたサンプル細胞とインキュベートし、そして他の比較的多体積のバッファを、透過化及び溶解作用を止め、干渉試薬を希釈してサンプルの体積を遠心に適したレベルに増加させるために加える。サンプルを再度遠心して、上清を取り除いて更なる体積のバッファを加えてサンプルをボルテックス混合することによってペレット化した細胞を再懸濁させることにより、細胞サンプルは、分析のためにフローサイトメーターに移動させられる準備が整う。

【0010】

上記のことから、フローサイトメトリーによる細胞内アッセイのための細胞サンプルを調製するための常用の方法は、多くのエラーを受けて再現性がないことが理解されるだろう。この比較的複雑且つ長い方法を行うためのプロトコールがどんなに正確であっても、携わる人間に対する要求が、生産されたサンプルにおける非常なる変化をもたらす。同じ技術者から日々、又は技術者間で生じる、サンプル及び試薬を、吸引、混合並びに分散させるタイミング又は技術の変化は、無意味なデータ、特に相対的な珍しさ又はアッセイされる事象の不明確さをもたらさう。更に、各多回遠心(洗浄)段階の間の細胞をロスすること及び細胞を傷害することに関する潜在性は、本サンプル調製方法に対して明らかな欠点である。明らかに、より簡単な方法、より段階が少ないもの、及びそれ自体完全に自動化されているものに対する要請がある。

10

【発明の開示】

【0011】

発明の概要

20

上記の観点において、本発明の目的は、細胞サンプルをフローサイトメーターによる細胞内アッセイのための細胞サンプルを調製するための新規且つ改良された方法であって、前述の従来技術より複雑さが非常に少ない方法、並びにそれ自体自動化しやすく且つかかる自動化において固有の様々な利点を供することである。

【0012】

本発明の他の目的は、細胞サンプル内の注目の細胞が含む細胞内分子の分析するための完全に自動化された手段又は装置系を提供することである。

【0013】

本発明の1つの観点によれば、細胞内アッセイのための生物細胞サンプルを調製するための新規且つ改良された方法が供されている。多回細胞洗浄(即ち、遠心)段階(各段階は、遠心装置へ及び遠心装置からのサンプルの移動並びにサンプル調製方法の次の段階を進めることができるようにするために、細胞サンプルを再懸濁させるその後のボルテックス混合必要とする)を必要とする上記従来技術の方法とは異なり、本発明の方法は、全ての試料及び試薬分注段階が同反応容器内で行われた後に、方法の非常に最後の段階で行われる、単一の洗浄段階のみを使用する。本発明によれば、細胞を固定化し、透過化し、溶解させ(もし所望されれば)、細胞表層を染色し(もし必要ならば)、そして細胞内抗原を染色する段階が、必ずしもこのような順番ではないが、同反応容器内で更なる介在段階を伴わずに行われる。細胞サンプルが固定化され、透過化/溶解され、そして注目の細胞内抗原又は分子を標識するために染色された後にはじめて、細胞サンプルは最後に、注目の細胞内分子の検出を妨げる干渉物質(例えば、細胞片及び結合しなかったプローブ)を除去するために洗浄される。好適に、かかる細胞洗浄段階は、遠心によるよりもむしろ過技術によって達成される。結果として、本発明のサンプル調製方法は、容易に自動化されて良い。

30

40

【0014】

好適な実施態様によれば、細胞内分析のための細胞サンプルを調製するための方法は：

a) 反応容器中で、所定体積の生物細胞サンプルと所定体積の安定化剤を混合し、ここにかかる試薬は、少なくとも生物細胞サンプル内の注目の所定の細胞の細胞膜の完全性を高め且つかかる注目の細胞内の所定の注目の細胞内分子の局在化を維持するように適合されており；

b) 当該生物細胞サンプルと当該安定化剤を、安定化した細胞サンプルを提供するために

50

所定の時間に渡りインキュベートし；

c)当該安定化した細胞サンプルに、注目の細胞内の注目の細胞内分子に対して特異的である所定体積の細胞内プローブを少なくとも1種加え；

d)当該安定化した細胞サンプル及びプローブを、注目の細胞の細胞膜を透過化するために適合された所定体積の透過化試薬と混合し；

e)所定の時間に渡り当該安定化した生物細胞サンプルと細胞内プローブ及び透過化試薬をインキュベートして注目の細胞の細胞膜を透過化せしめ且つ細胞内プローブが注目の細胞内分子と結合してそれによって当該分子が標識されるようにし；

f)当該反応容器へ、そこにある注目の細胞を希釈するため且つ細胞膜の透過化する速度を下げるために適合せしめられた所定体積の希釈剤を加え、それによって注目の細胞内の標識された細胞内分子を含有する希釈されたサンプルを形成せしめ；そして 10

g)当該希釈されたサンプルを、a)～h)の段階を行う際にサンプル中で生産された可能性のあるかかるサンプルの干渉物質を除去するために洗浄する、段階を含んで成る。

【0015】

好適に、前記洗浄段階は、希釈されたサンプルを反応容器から取り出され、そしてそれを半透膜(希釈試薬、並びに希釈されたサンプル内の全ての未結合プローブ及び他の干渉物質が通過するように適合せしめられており、しかも注目の細胞が当該膜を通過するのを防ぐ)を介してろ過され、それにより注目の細胞内の標識された細胞内分子を含むろ過されたサンプルが提供される。好適に、次いで、ろ過されたサンプルはバッファー溶液中の同反応液に戻され、それによって、標識された細胞内分子を含む細胞の分析のために適合せしめられた希釈され且つろ過されたサンプルが提供される。 20

【0016】

細胞内アッセイのための細胞サンプルを調製するための従来記載された従来技術の方法と比較して、本発明の方法は、非常に少ない段階を行うことによって、そして最も重要なことには、方法の最後の段階で1回の洗浄段階のみが必要となるだけで、調製された細胞サンプルを提供することが明らかであろう。本明細書中に記載のように、細胞が、好適なろ過方法を使用することで洗浄されている場合、注目の細胞は、従来技術の遠心段階において並びに遠心によって形成されたペレットに由来する細胞を再懸濁させるために使用されるボルテックス混合において、往々にして生じるような、注目の細胞がダメージを受けること又は選択的にロスすることが少ない。 30

【0017】

本発明の第2の観点によれば、自動化された装置システムは、本発明の全体細胞サンプル調製法を自動的に行うために提供されている。第1の好適な実施態様において、かかる装置システムは:a)選択的に操作可能な独立分注(pipetting)/インキュベート要素であって、所定の体積の試薬物質をかかる物質の供給源から細胞サンプルが入っている複数の反応容器へ分注するため、そして細胞サンプルと試薬物質の混合物を反応容器中で(ここで注目の所定の細胞内の所定の細胞内分子はフローサイトメーターによる検出のために標識される)処理された細胞サンプルを提供する所定の温度で且つ所定の時間に渡りインキュベートする要素;b)選択的に操作可能な単独独立洗浄要素であって、そこに存在する処理された細胞サンプル内の所定の細胞を、注目の細胞内分子のフローサイトメーター検出を損なう傾向があるだろう干渉物質及び破片から分離するための要素;c)選択的に作動可能な反応容器輸送要素であって、反応容器を前記分注/インキュベート要素から細胞洗浄要素への輸送を行うための要素;及びd)要素a)～c)の動作を調和させるためのロジック及びコントロール手段を含んで成る。好適な実施態様によれば、細胞洗浄器は、細胞の破片及び他の干渉物質は通過するが注目の細胞が通過しない半透過性壁を有する管状メンバーを含んで成る。当該細胞洗浄器は、更に、分注装置であって、干渉物質を含む細胞サンプルを反応容器から排出せしめ、そして前記管状メンバーへと入れ、それにより注目の細胞が当該管状メンバー中に捕捉され且つ干渉物質がその半透過性壁を当該分注装置のバキューム力の下で通過させる分注装置を含んで成る。細胞洗浄装置は、更に、管状メンバー中に 40 50

捕捉された細胞を同時に最初又は他の反応容器へと進め、そして当該捕捉された細胞をその後の分析のためにバッファー中で懸濁させるための希釈要素を含む。第2の好適な実施多様によれば、自動化した装置システムの上記要素は、一つのプラットフォーム装置中で一体化されている。

【0018】

本発明の自動化装置は、人間が全く関わらずに本発明の全体サンプル調製方法を繰り返す且つ正確に行うように適合されていることにより、複数のサンプルを提供し、ここでi)変動係数(CV)は、同数のサンプルを生産するための労働集約型従来技術の方法よりも有意に低くii)結果には非常に再現性がある。

【0019】

本発明及びその利点は、次の、好適な実施態様の詳細な説明からより良く理解されるだろうし、参照の文字が同様の部分を意味する添付の図面により参照がなされている。

【発明を実施するための最良の形態】

【0020】

好適な実施態様の詳細な説明

細胞をベースにした研究の重要な中心は、疾患プロセスを生じさせる又は予防することに関与する特異的な細胞を同定する目的で独特の細胞集団を特定することである。現在まで、多くの方法が、正常及び疾患状態における天然及び混乱細胞(perturbed cells)を比較するため、核酸、タンパク質、及び細胞機能のレベルでの違いを発見するために使用されてきた。この細胞内分子を検出及び定量する能力は、細胞の特性決定するための我々の能力を、そして細胞がどのようにしてその環境に応答するかという我々の知識を非常に拡大してくれた。DNAは、細胞分裂プロセスを測定するためそして増殖の速度を測定するために定量化されて良い。RNAは、遺伝子の機能をモニタリングするために測定されて良い。チューブリン、アクチン、及び中間体フィラメントは、細胞の形状、完全性、運動性、及び機能に関与する分子の例である。サイトカインは、上皮由来の内部細胞に存在し、それはまれに循環する腫瘍細胞を同定することにおいて有用である。細胞の外膜上で受けたシグナルを核内のDNAに伝達するプロセスであるシグナル伝達には、多数の分子が関連しそして細胞をその環境に応答させるために必要であり、そして細胞の全てのプロセス、例えば：増殖、活性化、死、又はエフェクターであることのために必要である。

【0021】

細胞は、他の細胞と連絡する又はある効果を発揮する分子を放出、又は分泌もする。例えば、サイトカインは、他の細胞と連絡を取るために免疫系の細胞によって分泌された小タンパク質の非常に重要な集団であり、そしてグランザイムBは、免疫系の細胞傷害性T細胞によって分泌されたキラーエフェクター細胞の例である。典型的に、分泌された分子は細胞内に検出可能な量で蓄積することは無く、従って、それらはELISA-型のアッセイ(酵素結合型免疫吸着アッセイ)を使用することで、細胞外的に測定される。これは、異種細胞集団内で特異的な細胞型を研究する際に許容できる方法ではない。従って、これらを細胞レベルで測定するためには、細胞内サイトカイン測定におけるように、分泌経路がin vitroでタンパク質輸送阻害物質(例えば、Brefeldin-A、Monensin、Secramine又はNocodazole)により遮断されていなければならない。

【0022】

FIG.1を参照に論じた本明細書の導入部で記したように、フローサイトメーターによる細胞内アッセイのための細胞サンプルを調製するための従来技術は、比較的長く、複雑且つ退屈な方法である。典型的に、それには14の上行性動作段階を行うことが必要であり、それは段階間での様々なインキュベーションを除外する。手動によって行われることにより、この方法により一貫して再現性のある結果を生み出すことはたとえ同じ研究室の技術者が同じ日に同じサンプル及び試薬を使用して行っても難しい。そしてまた、手動により比較的多量のサンプルを同時に処理することは難しい。更に、常用の方法は、正確に、そして許容されたプロトコルに従って行われた場合でも、個々の細胞及びそれらそれぞれの内容物に対して害を及ぼしうる段階(例えば、厳密な遠心及びボルテックス混合段

10

20

30

40

50

階)を含む。これらは全て不確定的に結果が生じることにつながる。より良く行う必要がある。

【0023】

ここで、本発明によれば、新規且つ改良された方法が、フローサイトメトリー技術により細胞内分析をするための細胞サンプルを調製するために提供されている。次の記載から明らかになるように、この方法は、上記従来の常用のサンプル調製法より必要とする段階は少ない。非常に重要なことに、本発明の方法は、均一な細胞サンプルを生産するために最も有害である多数の洗浄段階、典型的には遠心及びボルテックス混合段階を必要としない。むしろ、本発明の方法は、当該方法の最後において単一の洗浄段階のみを必要とする。細胞サンプルが固定化され、透過化され/溶解され、そして注目の細胞内抗原又は分子が標識のために染色された後においてのみ、細胞サンプルが最後に、注目の細胞内分子の検出を妨げる干渉物質(例えば、細胞破片及び結合しなかったプローブ)が除去される。

10

【0024】

FIG.2Aを参照すれば、本発明の好適な方法は、反応容器V中で、所定の体積の細胞サンプルと所定の体積の細胞表層マーカー又は「プローブ」を混合することによって、従来技術と同じ態様で始まる。細胞サンプルは、例えば、注目の細胞内分子又は抗原を含有する注目の所定の細胞(例えば、様々な白血球、血小板、赤血球など)を含んで成る全血を含んで成りうる;又は細胞サンプルはある細胞株でありうる、又は腫瘍細胞もしくは感染性抗原を含んで成りうる。細胞表層マーカーは典型的に、注目の細胞の表層上に運ばれた注目の所定の抗原に対して特異的であるフルオロクローム標識されたモノクローナル抗体を含んで成る。(注、この最初の段階は、当然、そのうちのわずかにいくつかが注目の細胞内分子を含む様々な異なる型の細胞を含有する細胞サンプル中の特異的な細胞を標識するためにはたらく。最初の細胞サンプルが、全細胞が注目の細胞内分子を含みうる細胞株からなる場合、細胞表層を標識するこの最初の段階は必要ない。)好適に、細胞サンプルは、細胞サンプルと細胞表層マーカーの混合をもたらし速度で導入され、これらの物質は、二頭矢印で示されているように、反応容器に対して適用される穏やかな振動又は渦巻き作用によって混合される。表層プローブを注目の細胞に対して結合可能にするのに十分なインキュベーション時間(例えば、15分)後、所定の体積の固定化剤が、図の段階(b)に示されているように、細胞サンプルに加えられている。上記のように、固定化剤は、次に続く透過化段階の間に細胞の完全性を維持するように設計されている。好適に、前記固定化剤は、従来技術において使用される型の常用のホルムアルデヒドベースの試薬であるが;従来技術とは対照的に、固定化剤の体積は比較的小さく、好適には、通常使用される体積の約25%のみある。固定化剤がその目的とされた機能を達成することを可能にする更なるインキュベーション期間に続いて、所定の体積の細胞内プローブ(例えば、フルオロクローム-標識したMAb)が、段階(c)に示すように、反応容器に加えられる。この添加には直後に、段階(d)に示すように、所定体積の透過化/溶解試薬の添加が続く。好適に、サポニンなどを含んで成りうる透過化/溶解試薬は、容器内容物(即ち、固定化され且つ表層標識された細胞サンプル、1又は複数の細胞内プローブ及び透過化/溶解試薬)の混合を起こすのに十分な流速で加えられる。次いで、容器内容物は、(1)注目の固定化された細胞が透過化され(2)赤血球が溶解し(細胞サンプルが全血サンプルであり且つRBCが注目の細胞内抗原を含む細胞ではないことを想定した場合)、そして(3)細胞内プローブが注目の細胞内分子と結合し、それによって注目の細胞内分子が標識されることを可能にする十分な時間に渡りインキュベートされる。この後、バッファーが、段階(e)に示されるように、透過化/溶解試薬の効果を阻害する十分な量において反応容器に加えられ、そして反応容器の内容物が洗浄段階、段階(f)細胞サンプルから干渉物質を除去し注目の細胞を維持する働きをする段階(f)に委ねられる。この洗浄段階は、従来技術の方法を参照することにより、上記常用の遠心洗浄段階であって良い一方で;しかしながら、一層好適に、当該洗浄段階は、細胞サンプル内の干渉物質及び溶解物質を通過させるように適合せしめる一方で、注目の細胞を捕捉するように適合せしめられた半透過性の膜を介して細胞サンプル溶液をろ過する段階を含んで成る。このろ過段階の後、捕足又はろ過された細胞は、同反応容器(又は異

20

30

40

50

なる容器)内に分注され、ここでそれら細胞は、ろ過された細胞がフィルターから流し出されるにつれ、段階(g)に示すように、細胞は、容器に加えられた所定体積の新鮮バッファ溶液中に再懸濁される。最も好適に、前記洗浄段階は、概略図を示すように、細胞サンプルを吸引して多孔質中空繊維(前記半透膜から生産された円筒状の壁を含んで成り、そして、溶かされ且つさもなければ、繊維外部に対して適用された真空力を介して繊維の円筒壁に対して適用された真空力により放射状に排出される干渉物質を引き込む)中へと入れることによって行われている。この後、希釈剤又はバッファは、繊維を流れて取り囲むようにされ、注目の捕捉された細胞が同時に当該繊維から分注され、そして待ちかまえている反応容器へと再懸濁される。このろ過及び分注法は上記の刊行された米国特許出願2002/0123154に最も良く記載されている。従って、この細胞洗浄技術によれば、バッファをろ過した細胞サンプルに加える段階、図2Aの段階(g)は、ろ過された細胞がフィルターから流し出された場合(即ち、段階(g)は、段階(f)の一部である。)に行われる。洗浄方法が何であれ、その細胞内標識及び、任意に、細胞表層標識を伴う細胞サンプルは、分析のためにフローサイトメーターに輸送される用意が整っている。

10

20

30

40

50

【0025】

図2Bにおいて、上記方法の変法が説明されている。ここで、表層及び細胞内プローブは、固定化剤の添加前に、細胞サンプルが入っている反応容器に加えられる。表層プローブが所定の細胞表層抗原と結合することが可能にする十分なインキュベーション時間後、固定化剤が細胞サンプルに加えられ、そして穏やかな混合の後、当該混合物は上記のようにインキュベートされている。次いで、適当な透過化試薬が加えられ、直後に、個別の溶解試薬、好適には塩化アンモニウムが加えられる。注目の細胞の透過化を可能にするインキュベーション時間の後、赤血球を溶解させること、及び細胞内プローブによって注目の細胞内抗原を標識化した後、細胞が最初及び一度、干渉物質を取り除くために細胞サンプルが洗浄される。バッファ中で洗浄した細胞を再懸濁させることにより、サンプルの分析のための容易が整う。

【0026】

上記の記載から、細胞内分析のための細胞サンプルを調製するための比較的簡単な方法が供されていることが理解されるだろう。各新たなサンプル調製方法は、動作段階が従来技術の段階の約半分である。最後の洗浄段階まで、全体方法は任意の介在する洗浄段階及び/又はボルテックス混合を含まない;即ち、固定化剤、細胞内プローブ、任意に溶解剤、及び透過化試薬が加えられ、その後、通常の洗浄及びボルテックス混合段階をその間に伴わない。この方法は、細胞内分析が全く予測されていなかった細胞サンプルを調製することにおいてまったくもって有用である。様々な試薬は、それぞれの効果の観点においてお互いに干渉し、フローサイトメトリ分析のために不適切であろうサンプルをもたらすことが想定された。これに対して、本発明の方法によって調製されたサンプルは、従来技術に従い最も慎重に調製されたサンプルと同じくらい有用であることが発見された。更に、下に説明するように、本発明の方法は、適切な変更が加えられた常用の装置の、例えば Beckman Coulter Prep Plus2分注装置及びCell Prep細胞洗浄装置を使用することで容易に自動化されて良い。そのように自動化された場合、複数の細胞は、変動係数(CV)が常用の手動方法によって達成されるよりも非常に向上して生産されて良い。本発明の細胞調製法の更なる利点とは、細胞表層プローブが、固定化方法(それは細胞表層抗原を破壊するかあるいはプローブとの結合効率を下げる)の前に表層抗原と結合することを可能にし、しかも同時に透過化方法後に存在する表層及び細胞内プローブを有する能力を維持する(従って、細胞表層に未だ発現されていないかあるいは発現が妨げられている、又は表層から細胞内区画に下方コントロールされている抗原が検出されるだろう)。

【0027】

上記本発明の方法は、従来技術の方法に対して、以下の例によって説明されており、この例において、様々な型の細胞サンプル(例えば、全血、抹消血液単球細胞(PMBC)、細胞株)が、様々な注目の細胞内分子(例えば、B細胞抗原レセプター複合体、サイトカイン、デフェンシン、サイトプラズム増殖抗原(CPA)、ビメンチン、チュブリン、サイトケラチ

ン、酵素(例えば、MPO)などを検出するフローサイトメトリー分析のために処理される。

【実施例】

【0028】

実施例1

細胞内分析のための細胞サンプルを調製する常用の方法

20 μ lの細胞表層プローブを手動で32本の異なる12 $\times$ 75試験管に分注した。細胞表層プローブはフルオロクローム-標識したモノクローナル抗体(フルオロセイオンイソチオシアネート(FITC)色素結合CD19)を含んで成った。この抗体は、ヒトB-細胞リンパ球上に存在するCD19表層抗原に対して特異的である。(特に断りがない限り、本明細書中で使用される実施例全ての試薬のように、細胞表層プローブは、Beckman Coulter, Inc.によって生産されており、そして全試薬は、パッケージに挿入する説明書に従って使用されている)。50 μ lのK3 EDTA全血(即ち、三カリウムエチレンジアミンテトラ酢酸、即ち抗凝集剤を含む全血)サンプルを、ヒト対象者から静脈穿刺によって獲得し、次いで手動により各試験管に分注し、そして各管の内容物を、当該管を穏やかに旋回させることによって混合した。この管の内容物を次いで室温で15分に渡りインキュベートし、そして光から保護し、そして100 μ lのパラホルムアルデヒド(PFA)を5.5%の濃度において迅速に各管中に分注した。管をその内容を混合するために旋回させた後、この管の内容物を15分に渡り室温で光から保護してインキュベートした。この後、4mlのリン酸干渉塩類溶液(PBS)を各管に対して、内容物を混合するために十分な力を伴い迅速に加えた。次いで、各管を手動で遠心へと輸送し、ここでは各管の内容物それぞれが、5分に渡り300gで作動するBeckman Coulter Model J6Bで遠心された。かかる遠心後、管を遠心から取り出し、そして生じる上清の大部分を各管から吸引した。次いで、管をボルテックスミキサー(Scientific Industries Vortex Genie Touch Mixer)上に置いて、遠心により生ずる小体積の残留上清及び細胞のペレットを、当該細胞を上清(バッファー)に再懸濁させるために十分に短時間ボルテックス混合に委ねた。この後、100 μ lのサポニン溶液、濃度0.7%の透過化/溶解試薬を各管に加え、そして光から保護し室温で5分に渡りインキュベートした。この後、20 μ lの細胞内プローブを各管に迅速に分注した。Beckman Coulterによって作製及び市販されそしてパッケージ挿入説明書に従い使用した細胞内プローブは、フィコエリトリン(PE)色素と結合したフルオロクローム-標識したモノクローナル抗体CD79aであった。この細胞内プローブを、注目の細胞分子(即ち、白血病の診断において重要な抗原である、B細胞抗原レセプター複体のCD79a細胞内抗原である)を標識するために各管に加えた。光から保護した室温で15分のインキュベーション期間後、4mlのリン酸緩衝塩類溶液(PBS)を各管に、含有物を混合する十分な力を伴い迅速に加え、そして各管のそれぞれの内容を再度、300gの遠心力を使用することで5分に渡り遠心に委ねた。上清の大部分を吸引した後、0.5%パラホルムアルデヒドを含むPBS 1 mlを各チューブへと分注して入れた。各管中のサンプルを、ペレット化した細胞を再懸濁させるのに十分な時間に渡り混合することにより、各管及び処方し細胞サンプルを、データ獲得及び分析のためにEXP0-ADCソフトウェア(Beckman Coulter, Incから入手可能である)を使用するBeckman Coulter EPICS (登録商標) XL/MCL4-色フローサイトメーターに渡した。この分析において、白血球のリンパ球集団をゲート化するために前方及び側方散乱光が使用され、そしてこの集団の、CD19及びCD79a-ポジティブが検出された(図3A、領域C2の散布図を参照のこと)。図3Bに示すように32の調製した各サンプルのかかる細胞の%は約8~10%であった。そしてまた図3Bは、二重CD19及びCD79aポジティブ細胞の各パラメーターのシグナル：ノイズ(S:N)比を示す。このシグナル：ノイズ比は、ポジティブ集団の平均蛍光強度(MFI)(例えば、y-軸は図3Aの領域C2における集団の平均を意味する)を、ネガティブ集団(例えば、y-軸は図3Aの領域C3における集団の平均を意味する)のMFIによって割ることで計算される。明らかであるように、CD19ポジティブ細胞のS:Nは比較的一定であり、その一方で、CD79a細胞内マーカーのS:Nはサンプルごとに非常に多彩である。

【0029】

実施例2

B細胞リンパ球における細胞内CD79a抗原の検出のための全血サンプルを調製するための新規方法

上の例1に示すように、20 μ lのフルオロクローム標識した抗体(CD19-FITC)を、回転タイプの管ホルダーに配置された異なる12 $\times$ 75mmの試験管の各々に分注した。上記のように、抗体は、B-細胞リンパ球によって担持されたCD19表層抗原に対して特異的なモノクローナル抗体である。ヒト対象者から静脈穿刺によって獲得したK3 EDTA全血サンプル50 μ lを次いで手動により各試験管に分注し、そして各管の内容物を、当該管を穏やかに動揺することによって混合した。次いで、管の内容物を室温で15分に渡りインキュベートした。この後、25 μ lのパラホルムアルデヒドを(PFA)が5.5%濃度で、各管に分注された。管は、その内容物を混合するために穏やかに動揺された後、当該管は20分に渡りインキュベートされた。次いで、20 μ lの細胞内プローブ(フィコエリトリン(PE)色素と結合したCD79a)がこの6本の管のうち4本に加えられ、直後に濃度0.7%を有する100 μ lのサポニンが加えられた。管内容物が穏やかに混合された後、各管が45分に渡りインキュベートされた。残りの2つの管に、20 μ lの細胞内プローブ、即ちイソタイプPEが分注された。この第2プローブが使用されて、フローサイトメーター分析においてネガティブ細胞が流されてゲートアウトされた。この後、600 μ lのリン酸バッファー干渉溶液(PBS)が各管に加えられた。次いで、6本の管のうち3本(1本はイソタイププローブを含みそして2本はCD79aプローブを含む)を、5分に渡り300gの力で遠心するためにBeckman J6B遠心装置に渡した。遠心後、生じる上清が吸引されて1mlのPBS/PFAが加えられた。次いで、これら3本の管は、サンプルを再懸濁させてそれを分析のためにすぐ使えるようにするためにボルテックス混合に委ねられた。残りの3本の管は、Cell Prep細胞洗浄装置に委ねられ、ここでプロトコール2、特に、装置にプログラムされている細胞洗浄プロトコールに従い、処理された細胞サンプルが自動的にろ過(即ち、洗浄)される。このプロトコールによれば、管の内容物が最初に各管から吸引され、そして細胞サンプルがろ過する働きをする中空繊維中へと引き込まれる。本明細書中、先に記載したように、かかる中空繊維は、細胞サンプルから比較的小さな(注目の細胞に比べて)干渉物質粒子を除去するためのフィルターとして働く半透膜でできた円筒壁を含んで成る。かかるろ過は、真空力が繊維外部へと適用され、それによって比較的小さな干渉物質粒子が繊維の半透膜を通過して廃棄されることによって行われる。この一方で、注目の細胞は、繊維内に維持される。プロトコール2によれば、このろ過作用は、2度行われる、即ち、次いで、一度ろ過された粒子は、バッファー溶液を繊維に加えること及びその後真空力を数秒に渡り適用することによって繊維内で再懸濁される。この後、注目の細胞は、繊維を通じて1mlの等張バッファー溶液をポンピングすることによって流し出される。この2回ろ過された細胞は、それら本来の容器(試験管)に戻され、ここでそれらはフラッシング溶液中で再懸濁される。次いで、6本の各管は、データ獲得及び分析のためにRXPソフトウェア(Beckman Coulterから入手可能である)を使用するBeckman Coulter CytomicsFC500 フローサイトメーターに渡される。この分析の結果を図4A及び4Bに示している。図4Aにおいて、細胞サンプルは上記遠心方法による遠心によって洗浄され;図4Bにおいて、細胞サンプルは、記載の中空繊維ろ過スキームによって洗浄された。同じ血液サンプル及び試薬を使用することで、実施例1に記載の常用の手動方法を、細胞内分析のためのサンプルを調製するために使用した。サンプルを分析するために同じフローサイトメーターを使用し、そしてこの分析の結果を図4Cに示している。図4A~4Cの散布図から理解できるように、サンプル調製のために手動的に行われた3つの方法(2つは新規でありそして図2Aに説明されている本発明に従う、そして1つは図1に説明されている常用の方法に従う)は、非常に同程度の結果を提供する。

【0030】

実施例3

本発明のサンプル調製方法の半自動化

この例において、図2Aに描かれたサンプル調製法は、当該方法の全ての段階が、2つの自動化された装置によって行われているが、最後の洗浄段階を除いて全体的に調製されたサンプルの円盤を一つの装置から別の装置へと輸送する手動段階がある点において「半自

10

20

30

40

50

動的に」行われている。最初に、ヒトドナーからK3 EDTA Vacutainer 管中に回収された全血の75mm管をBeckman CoulterPrepPlus2 分注/インキュベート装置の標本カセット中に配置した。この装置は、吸引/分注プローブのXYZの位置をコントロールする（例えば、試薬又はサンプル容器中に浸し所定体積の液体を吸引し、そして細胞サンプルが調製される試験管へと移動し、そしてそこで所定体積の当該吸引した液体を分注する）プログラム可能なメカニズムを含んで成る。この装置は、一連の吸引の間に、吸引/分散プローブが所望に応じ洗浄される洗浄ステーションを含む。本発明のサンプル調製法を行うために必要な全ての試薬のオープン(又は貫通可能)トップを有するボトルが入っている試薬棚は適切に配置されている。これらの試薬としては、細胞表層プローブCD19FITC、細胞内プローブCD79aPE、パラホルムアルデヒド(PFA)固定化剤、透過化/溶解 試薬、サポニンの0.7%溶液、及び様々な等張バッファー溶液が挙げられる。10本の空12×75ポリプロピレン管が入っている32本の管回転型ホルダーを装置に配置した。10本の空管を回転台の位置1〜5に、そして28〜32に配置し、結果が回転台位置依存性ではないことを証明した。PrepPlus2装置のマイクロプロセッサを、装置が以下の段階を行うようにプログラムした:最初に、20 μ l(製造者が推奨する用量)の細胞表層プローブ(CD19FITC)が各10本の各試験管に分注された。次に、当該装置は、ヒト対象者から静脈穿刺して獲得した50 μ lのK3 EDTA全血サンプルを各試験管に分注された。血液を入れるこの分注力は、当該血液と細胞表層プローブを混合する働きをした。次いで、管内容物は当該装置中、室温で15分に渡りインキュベートされた。次に、25 μ lのホルムアルデヒド溶液が、各管に順番に分注され、そして室温で20分に渡りインキュベートされた。次いで、20 μ lの細胞内プローブ(CD79aPE)が各管に加えられ、直後に100 μ lのサポニン溶液が加えられた。次いで、10本の管が室温で45分に渡りインキュベートされた。この後、600 μ lのIsoFlow(登録商標)が各管に加えられた。次いで、管が入っている回転台を手動によりBeckman CoulterCellPrep 装置に渡し、その装置はその予めプログラムされたプロトコール2(上記)に従って、自動的に作動した。全10本の各管このような細胞洗浄法が行われ、データ獲得及び分析のために各管はBeckman Coulter's System II ソフトウェアを使用するEpics XL-MCLフローサイトメーターに渡された。結果を図5に示している。この分析において、前方及び側方散乱光が、白血球細胞のリンパ球集団をゲートするために使用され、そしてこの集団のCD19及びCD79a-ポジティブが検出された。図5に示すように、かかる細胞の各サンプル中での%は、10本の同型の管を通じて約11%のレベルで比較的一定であった。そしてまた、図5に示すことは、CD79aポジティブ細胞のシグナル：ノイズ比(S:N)である。

【0031】

実施例4

中空繊維ろ過と遠心洗浄段階を比較する新規サンプル調製法

この例において、細胞表層染色をオフライン(手動で)で行った;しかし、固定化、透過化及び細胞内(IC)染色の段階は、Beckman CoulterPrepPlus2装置において自動的に行った。製造者の推奨用量(20 μ l/試験)のフルオロクロム-標識した抗体(フルオレセインイソチオサイネート(FITC)色素と結合したCD19)を手動により6本の異なる12×75mm試験管の各々に分注した。この抗体は、B細胞上に存在するCD19表層抗原に特異的なモノクローナル抗体であった。次いで、ヒト対象者から静脈穿刺によって獲得したEDTA全血のサンプル50 μ lを手動により各試験管に入れ、そして各管の内容物が、当該管を穏やかに旋回させることによって混合された。次いで、管の内容物が室温で15分に渡り光から保護してインキュベートされた。次いで、この6本の試験管が回転型の管ホルダーに移され、次いでそれは、次に記載のように、分注及びインキュベーション段階に配置された(変更を加えたソフトウェアプロトコールに従って)。5.5%の濃度のパラホルムアルデヒド(PFA)25 μ lが各管に入れられ、そして20分に渡りインキュベートされた。次いで、20 μ lのイソタイプPEが2本の管に入れられ、そして20 μ lのCD79a-PEが残りの4本の管に分注された。(イソタイププローブを、いつも示すとは限らないが、非特異的タンパク質結合を検出するために使用し、そしてそれはポジティブ分析領域の下方閾値を測定するために使用されている)。各抗体の添加は、100 μ lのサポニンが添加された後に、0.7%の濃度で6本の管に対して行わ

れた。この管を、Beckman Coulterによって作製された600 μ lのIsoFlow（登録商標）、等張溶液の添加まで、PrepPlus2上でインキュベートされた。3本の管(1本は校正用イソタイププローブを含みそして2つは細胞内CD79aプローブを含む)が回転台から取り出されてBeckman J6B 遠心器に500gの力で5分に渡り配置された。上清の大部分が吸引してそして1mlのIsoFlowが加えられた。この管は旋回されて細胞が懸濁された。この回転台上の残りの3本の管はCellPrep細胞洗浄装置に移され、ここでは、順番に各管がプロトコール2に従ってろ過される。次いで、6個の各管はデータ獲得及び分析のために順番にRXPソフトウェア(実施例2に記してある)を使用するBeckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに渡された。かかる分析の結果を図6A~6Cにまとめている。図6Cのオーバーレイプロットは、図6B(図6Aに示されるようにゲート化されたCD19ポジティブリンパ球集団中でのCD79a発現を示す)に示されるのに類似する4つの異なるサンプル調製物からの4つのヒストグラムからなる。「遠心」とは、細胞サンプルが、一回洗浄段階が伝統的な遠心を使用することで行われたことを除いて図2Aに示されるように調製されたことを示す。「CellPrep」とは、サンプルが図2Aに示されるように調製されそしてCellPrep装置中で使用される中空繊維技術を使用することで行われたことを示す。「イソタイプ」とは、サンプルがCD19-FITC及びイソタイプ-PEで洗浄されていたことを意味する。「CD79a」とは、サンプルがCD19-FITC及びCD79a-PEで染色されたことを意味する。結論:本明細書中で行った中空繊維洗浄法は、EDTA全血調製物中に存在するCD19B細胞内部の細胞内CD79aの検出において、細胞洗浄の伝統的な遠心方法に匹敵する。

【0032】

実施例5

常用の手動の方法に対する本発明の半自動化サンプル調製法の再現性

ヘパリン化全血をヒト対象者の静脈穿刺によって獲得しそして500 μ lのかかる血液が、(刺激した)伝統的なリンパ球刺激因子(SEB及び共刺激抗体CD28)を伴う19本の標準的な15mlの各試験管に分注された。次いで、培養管は35℃にセットしたインキュベーターに90分に渡り置かれた。2.5 μ gを含む(サイトカイン分泌を予防するのに十分な量)5 μ lのBrefeldin-Aは各9個の各培養物に加えられた。管はインキュベーターに更なる16時間に渡り配置された。合計で17.5時間の培養時間の後、9個の培養物は単一の培養チューブに入れられ、そして穏やかに混合された。19個の細胞サンプルを実施例1に記載の常用の方法に従い、細胞内分析のために調製した。これには、製造者が推奨する投与量の2つのフルオロクローム-標識した抗体(1つの抗体は、Tヘルパーリンパ球の表層に存在するCD4抗原に特異的な、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)色素を結合したCD4であり;そしてもう一つの抗体は、最も活性化したリンパ球上に存在するCD69表層抗原に対して特異的な、フィコトリエン-シアニン5タンデム色素(PC5)に対して結合したCD69である)が伴った。使用した細胞内プローブは、製造者が推奨する用量20 μ lの、フィコエリトリン(PE)色素と結合した特異的細胞内サイトカインプローブインターフェロン- γ (IFN γ)色素であった。標本は、各管に加えた刺激した培養血液サンプル50 μ lであった。洗浄バッファーは、0.1%アジ化ナトリウムを含むPBS溶液であった。最終遠心及びボルテックス混合段階の後、各19個の管の各々を、データ獲得及び分析のために、例2に記載した、RXPソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに渡した。これらの分析の結果を図7Aに示している。

【0033】

30個の他の細胞サンプルを、図2Aに説明した方法を使用する細胞内分析のために調製した。一層詳細に、2.5mlの刺激した血液は、穿刺可能キャップを有する75mm管中に配置され、そしてその標本はPepPlus2分注装置上に配置された。上記表層分子のための2つのプローブが入っている2つのプローブ試薬ボトル、及び30本の空12 $\times$ 75染色用管が入っている回転型ホルダーがPrepPlus2装置に配置された。このPrepPlus2装置の標準的なソフトウェアに変更を加え、以下の分注段階を指令させた:10 μ lのCD69-PC5を各管に加えること、20 μ lのCD4-FITCを各管に加えること、そして最後に50 μ lの刺激した全血標本を各管に対して加えること。染色サンプルを回転台上に室温で15分に渡り配置した。通常、PrepPlus

2装置において通常使用される表層プローブが入っている標準試薬ラックを、細胞内プローブ試薬(上記)、5.5%パラホルムアルデヒド容器、及び0.7%サポニン溶液を含む変更が加えられた試薬ラックと置き換えられた。次いで、装置は、そのソフトウェアによって、本明細書中に記載の分注及びインキュベーション段階に向けられ(変更が加えられたソフトウェアプログラムに従い):25 μ lのパラホルムアルデヒド溶液が各管に順番分注されそして20分に渡りインキュベートされた。次いで、20 μ lの特異的細胞内サイトカインプローブ(IFNg)が各管に対して加えられ、その直後に100 μ lのサポニン溶液を加えられた。管は45分に渡りインキュベートされた。この後、600 μ lのIsoFlowバッファが各管に加えられた。次いで、回転台がCellPrep装置に移され、ここで各管が順番に、標準プロトコル2に従って、装置によって運ばれた、標準IsoFlow試薬でろ過された。次いで、30本の管は各々、データ獲得及び分析のために上記RXPソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに渡された。かかる分析の結果を図7Bに示している。図7A及び7Bに示す2次元分布図の各々において、CD4-ポジティブリンパ球は、IFNg-PE蛍光強度を示すX軸、及びCD69-PC5蛍光強度を示すY軸を伴い示されている。注目のCD4+CD69+IFNg+トリプルポジティブ集団が各散布図の第一象限に示されている。従来技術の手動方法によって生産された9つサンプルにおいて、比較的高い程度のばらつきがあることが理解されるだろう(図7A)。その一方で、図7Bに示される30の散布図において、この象限におけるトリプルポジティブ細胞の位置に非常に高い程度の一貫性があることが理解されるだろう。変動係数(CV)は図7Bにおける30の散布図から記録された平均値から計算され、そして図7Aの19散布図の記録された平均値を、下の表1Aに示している。測定した2つの値は、使用した3つのプローブに関してトリプルポジティブであったリンパ球のパーセンテージ(%) (第一象限の角)、及び注目の象限内の各散布図に示されるトリプルポジティブリンパ球に対するIFNg-PEプローブの平均蛍光強度(MFI)を意味する。本発明の半自動化方法は、細胞内サイトカイン及び表層抗原の同時検出のための常用の方法よりも非常に正確である(ほぼ2倍良い)ことを証明する。この新規方法が正確さを増したことに寄与する因子とは:試薬体積、混合及びインキュベーション時間の正確なコントロール;処理段階の数の減少、及び単一の、試料調製法の最後における比較的穏やかな細胞洗浄段階である。この新規方法の正確さは、下の表1Bにおいて常用の手動方法に匹敵する。これらの値は、19回の反復(常用の方法によって生み出された)及び30回の反復(新規方法によって生み出された)の平均を示す。

【0034】

【表1】

表1 A

	CV 常用	CV 自動化
%CD4+CD69+IFNg+ 3重ポジティブ事象	25.2	12.9
CD4+CD69+IFNg+ 3重ポジティブ事象 におけるIFNgのMFI	30.3	17.4

【0035】

10

20

30

40

【表 2】

表 1 B

	常用のものの 平均	自動化したものの 平均
%CD4+69+IFNg+	3.10	3.31

10

【0036】

実施例 6

図2Bの半自動化方法及び図1の常用の方法によって調製したサンプルに由来する刺激全血中のFR0の検出

ヒト対象者の静脈穿刺によって獲得したヘパリン化全血が等体積のAIM-V血清フリー培地で(Gibco)で希釈された。500 μ lの各血液が標準的な15mlの培養管に次のような伝統的なリンパ球刺激因子：250 μ gのPMA、及び0.5 μ gのイオノマイシンとともに加えられた。次いで、培養管が120分に渡り35 $^{\circ}$ Cでインキュベーターに配置された。次いで2.5 μ g(サイトカイン分泌を予防するのに十分な用量)を含有するBrefeldin-Aの5 μ を培養物に対して加えた。この管を更なる12時間に渡りインキュベーター中に配置した。細胞サンプルを、実施例1に記載の常用の方法に従い、製造者が推奨する用量(10 μ l/試験)の2つの表層プローブ(1つは、Tヘルパーリンパ球の表層に存在するCD3抗原に特異的な、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)色素と結合した抗体CD3;そしてもう一つの抗体は、最も活性化したリンパ球上に存在する表層抗原に対して特異的な、フィコエリトリン-シアニン5タンデム色素(PC5)に対して結合したCD69である))を伴う細胞内分析のために調製した。使用した細胞内プローブは、製造者が推奨する用量20 μ lの、フィコエリトリン(PE)色素と結合した特異的細胞内サイトカインプローブのインターフェロン γ (IFNg)であった。標本は、刺激された培養血液を含有する50 μ lのサンプルであった。洗浄バッファーは、0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBS溶液であった。他の細胞サンプルは図2Bに示す方法に示す細胞内分析のために調製された。一層詳細に、表層分子のための2つのプローブ及び1つの細胞内分子プローブを同時に、回転タイプ管ホルダーにある12 $\times$ 75mm管に分注された。

20

30

上記50 μ lの標本を、12 $\times$ 75mmの管に分注しそして管の内容物を光から保護して室温で15分に渡りインキュベートされた。次いで、回転台を手動により、分注及びインキュベーション段階が行われた(変更を加えたソフトウェアプログラムに従って)PrepPlus2装置に配置された。この管へ、順番に、濃度5.5%における100 μ lのパラホルムアルデヒド(PFA)溶液、100 μ lの赤血球溶解試薬(1 $\times$ 濃度の塩化アンモニウム溶液(10 $\times$ IOTest3溶解試薬、Beckman Coulterから入手可能))、及び100 μ lのサポニン溶液を0.7%の濃度においてを加えた。この管を室温で20分に渡り維持した。この後、600 μ lのPBSをこの管に加え、そして回転台を手動によりCellPrep装置に移動させ、ここで管は標準IsoFlow試薬と共に、装置に内蔵された標準プロトコール2に従い移動させられる。2つの管の各々(1つは、常用の方法によって調製した(図1)及び他の管は図2Bの方法によって調製した)が、データ獲得及び分析のために、EXP0-ADCソフトウェアを使用するEPICS XL-MCL フローサイトメーターに渡された。かかる分析の結果を、各々がCD3+リンパ球を示す、図.8A及び8Bの散布図にまとめている。シグナル対ノイズ比(S:N)は、領域C1のx平均によってゲート化領域C2のx平均を割ることによって計算されている。パーセンテージ(%)は、領域C2における細胞(それらはCD3+、CD69+、及びIFNg+である)における細胞の%である。「手動」とは、図1の常用の方法によって調製したサンプルから達成した結果を意味し、そして「自動化」とは、PrepPlus2及びCellPrep装置の使用によって半自動化されたように、図2Bの方法によって

40

50

調製されたサンプルから達成された結果を意味する。前記散布図は、この2つのサンプル調製法が比較できるほどの結果を示し、そして細胞内サイトカイン及び表層抗原が同時に検出可能であるということを示していることが理解されるだろう。

【0037】

実施例7

予め凍結させたPBMC細胞サンプル中のCD79aを検出すること

図1及び2Aに示した方法によって調製されたサンプルを比較すること

抹消血液単核球(PBMC)を、調製し、凍結させ、そして当業者に公知の方法に従って解凍した。例1におけるように、製造者が推奨する用量(20 μ l/試験)のフルオロクロム-標識した抗体(フルオレセインイソチオシネート(FITC)色素と結合したCD19)を、回転台型管ホルダー中に配置された12 $\times$ 75mmの8個の異なる試験管のそれぞれに手動的に分注した。この抗体はB細胞リンパ球上に存在するCD19表層抗原に対して特異的なモノクローナル抗体であった。次いで、500,000個の解凍したヒトPBMC細胞を含有する15 μ lのサンプルを手動により当該試験管の各々に分注して各管の内容物を、当該管を穏やかに旋回させることによって混合した。次いで、管の内容物を光から保護し室温で15分に渡りインキュベートした。次いで、4つの管を手動で例1に記載の常用の方法に従って且つ下に記した試薬を使用することで調製した。残りの4つの管を回転台型管ホルダーに配置し、次いで、それをPrepPlus2 装置に配置し、その装置は図2A説明されている方法の段階(b)~(e)を行う。固定化剤は25 μ lの5.5%の濃度のパラホルムアルデヒド(PFA)であり;細胞内プローブは(a)フィコエリトリン(PE)色素と結合したCD79aの20 μ l(2つの管において)又は、(b)フィコエリトリン(PE)色素と結合した20 μ lのイソタイププローブ(2つの管において)のいずれかであり;透過化試薬は、0.7%の濃度におけるサポニン100 μ lであった。固定化及び透過化後のインキュベーション時間は、それぞれ室温で20及び45分であった。透過化及びその後のインキュベーション時間の後、600 μ lのIsoFlow バッファーを4本の各管に加えた。次いで、4本の管が入っている回転台を手動によりCellPrep装置に移し、そこで各管は順番にプロトコール2に従い移動させられる。次いで、各管は、データ獲得及び分析のために、RXPソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに移された。かかる分析の結果を図9A~9Dにまとめている。図9Aに示しように、ゲート化スキームは前方散乱(FS)及び側方散乱(SS)測定を使用し、分析されるサンプル中のリンパ球集団を分離する。これらのリンパ球のうちで、CD19に対してポジティブなもの(図9Bの領域B)をCD79a発現についてインテロゲートした(interrogated)図9C。図9Dのオーバーレイプロットは、図9A~9Cに記載したようなゲート化した4つの異なるゲート化したサンプル(例えば、図9Cに示すようにCD19ポジティブリンパ球集団におけるCD79a発現)を比較する。「手動」とは、サンプルを実施例1における(常用の方法)ように調製したことである。「自動化」とは、サンプルをこの例のように調製したことである。「イソタイプ」とは、サンプルがCD19-FITC及びイソタイプ-PEで染色されていることである。「CD79a」とは、サンプルがCD19-FITC及びCD79a-PEで染色されたことを意味する。結論:本明細書中に記載の自動化方法は、凍結及び解凍したPBMC調製物中に存在するCD19B細胞内の細胞内のCD79aの検出において、従来技術の常用の方法に匹敵する。

【0038】

実施例8

刺激された新鮮PBMCにおけるTNFの検出

図1及び2Aに描かれた方法によって調製したサンプルを比較すること

新鮮抹消血液単核球(PBMC)を、当業者に公知の方法により2人の異なるヒト供与者から静脈穿刺によって獲得したヘパリン化全血から調製した。次いで、10%ヒトAB血清を補足した伝統的なRPMI培養培地0.5ml中の各ドナーのPBMC500万個を、(刺激した)伝統的なリンパ球刺激因子(スタフィロコッカス(Staphylococcus)エンテロトキシンB、SEB、及び共刺激物質の抗CD28抗体を伴う)標準的な15mlの培養管中へと配置した。これを、0.5mlの培養培地において各ドナーの250万個のPBMCにより繰り返した。この2つの培養管を、37 $^{\circ}$ Cに設定したLabPackインキュベーターに配置し、そして5%CO₂を90分に渡り補給した。次いで、

2.5 μg(サイトカイン分泌を予防するために十分な投与量)を含む5 μlのBrefeldin-Aを各培養管に加えた。次いで、この管を更なる16時間に渡りインキュベートした。

【0039】

2つの培養管の各々の2つの50 μlサンプルを例1において説明した常用の方法に従い、製造者の推奨用量(10 μl/試験)の次のような4種のフルオロクローム標識した抗体を伴い2重に調製した:T-細胞傷害性リンパ球の表層に存在するCD8抗原に特異的な、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)色素と結合したCD8;最も活性化したリンパ球上に存在する表層抗原に対して特異的な、フィコエリトリン-シアニン5タンデム色素(PC5)と結合したCD69; T-ヘルパーリンパ球の表層上に存在するCD4抗原に対して特異的な、フィコエリトリン-Texas レッド(ECD)タンデム色素と結合したCD4;及び全Tリンパ球上に存在するCD3抗原に対して特異的な、フィコエリトリン-シアニン7(PC7)タンデム色素と結合したCD3。使用した細胞内プローブは、製造者が推奨する用量の20 μlの、フィコトリエン(PE)色素と結合した特異的細胞内サイトカインプローブ腫瘍壊死因子α(TNFα)であった。固定化剤は、濃度5.5%におけるパラホルムアルデヒド(PFA)であり、そして透過化試薬は、0.7%の濃度におけるサポニンであった。洗浄バッファーは、0.1%アジ化ナトリウム及び2%ウシ胎児血清(FCS)を含むPBS溶液であった。

【0040】

4個の他のサンプルを2重に調製し、2つのサンプルは、図2Aの方法を使用する2つの各培養管に由来し;この方法は、上記PrepPlus2及びCellPrep装置を使用することによって半自動化された。全試薬は、上記の常用のサンプル調製方法において使用したものと同様であった。当該サンプル調製法の終了により、8本の管を、データ獲得及び分析のために、RXPソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに渡した。この結果を、2つの各培養物から調製した2つの管からの平均値を示す下の表2にまとめた。表に示すように、2人の供与者に由来する2種類の異なる濃度(500万及び250万個のPBMC)に由来するPBMCサンプル中で発見された2つの異なるプローブの組み合わせ(即ち、CD3+CD8+CD69+TNFα+、及びCD3+CD4+CD69+TNFα+)について4つのポジティブリンパ球のそれぞれの%(図16Aに示されたゲート化スキームによって測定された)が記録されている。本発明のサンプル調製法により新鮮培養PBMCに関する常用の手動方法と実質上同じ値が得られることは明らかである。

【0041】

【表3】

表2

	供与者1		供与者2	
	従来技術の方法	新規方法	従来技術の方法	新規方法
5百万PBMC濃度				
%CD3+CD8+CD69+TNFα+	5.38	4.69	5.32	5.29
%CD3+CD4+CD69+TNFα+	2.47	2.5	4.71	5.12
2.5百万PBMC濃度				
%CD3+CD8+CD69+TNFα+	5.13	5.23	8.65	8.29
%CD3+CD4+CD69+TNFα+	4.82	4.96	8.98	9.11

【0042】

実施例9

図1及び2Aに記載の方法によって調製したサンプルに由来する予め凍結させたPBMCにおいて、細胞内ビメンチン及びチューブリンを単独で又は同時のいずれかで検出すること。

抹消血液単核球(PBMC)を当業者に公知の方法に従って、調製し、凍結させ、そして解凍させた。血液サンプル中の様々なリンパ球の表層上の所定の抗原に対して特異的な3種の異なるプローブを製造者の推奨用量(10 μ l/試験)で手動により、12本の各々12 $\times$ 75mm試験管に分注した。この使用した3種の細胞表層プローブを以下のようなフルオロクローム-標識したモノクローナル抗体で標識した:T-リンパ球の表層上に存在するCD3抗原に対して特異的なフィコエリトリン(PE)色素と結合したCD3;T-ヘルパーリンパ球の表層上に主に存在するCD4抗原に対して特異的なフィコエリトリン-Texas red エナジー結合色素(ECD)と結合したCD4;及びT-細胞傷害性リンパ球の表層上に主に存在するCD8抗原に対して特異的なフィコエリトリンシアニン-5タンデム色素(PC5)と結合したCD8)。次いで、約250,000~500,000個の解凍したヒトPBMC細胞を含むサンプル50 μ lを次いで各試験管に手動で分注し、そして各管の内容物を、当該管を穏やかに混合することによって混合した。次いで、この管内容物を室温で15時間に渡り光から保護してインキュベートした。次いで、6本の管を実施例1に記載の方法に従い且つ2種類の細胞内抗原プローブを単独で又は同時に使用することにより調製した。2つの管は1種類の細胞内プローブを受容した、2つの管は他の細胞内プローブを受容した、そして2つの管は両方のプローブを獲得した。この使用した2つの細胞内プローブは:フルオレセインイソチオシアネート(FITC)色素と結合した抗-ビメンチン;及びフィコエリトリン-シアニン-7(PC7)タンデム色素と結合した抗チューブリンであった。ビメンチンは、核膜の下に発見され且つ細胞に強度を与えるために細胞を横切る様々な細胞中間体フィラメントである。それは新生物を同定するためにガン研究において使用されている。チューブリンタンパク質サブユニットは、細胞移動を可能にし且つ「トラック」を生細胞内で輸送物質に提供する細胞内分子を含んで成る。チューブリンにおける突然変異は、急性リンパ性白血病(ALL)のいくつかの治療処置において複雑化されている。表層プローブ及び解凍したPBMC細胞を含有する残りの6本の管を回転台型管ホルダーに配置し且つ実施例3及び図2Aに記載の方法に従い調製している。細胞内プローブは上記のものと同じであり、そして各管のペアは細胞内プローブの1つもしくは他のプローブもしくは両方を受容した。固定化剤(PFA)、透過化試薬(サポニン)及びインキュベーション時間は、実施例1及び2に記載のとおりであった。次いで、各管を、データ獲得及び分析のために、RPXソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに移した。かかる分析の結果を図10A~10Gにまとめている。

【0043】

ビメンチン及び/又はチューブリンポジティブ細胞の値(%)特定するために使用したゲート化スキームを図10A~10Cにおいて説明している。図10Aにおいて、CD3ポジティブリンパ球を分離及びゲート化するために側方散乱パラメーター(SSC)がCD3パラメーターに対してプロットされている(領域A)。図10Bにおいて、CD8及びCD4パラメーターは、CD4表層マーカー(領域B)に対してポジティブでもあるCD3ポジティブ細胞を同定するために互いに対してプロットされている。図10Cの代表的な散布図において、チューブリン及びビメンチンパラメーターは、CD3(領域A)又はCD3とCD4の組み合わせ(領域B)について試験されポジティブな細胞を同定するために互いに対してプロットされている。ゲート化された細胞(領域A又はB)のうちで、両細胞内プローブ(チューブリン及びビメンチン)について試験されてポジティブである細胞が領域D2に示されており;類似して、ゲート化された細胞のうちで、チューブリンについて試験されポジティブである細胞が領域D1及びD2に示されており、そしてビメンチンについて試験されてポジティブな細胞が領域D2及びD4に示されている。図10D~10Gの棒グラフは、従来技術の方法によって調製したサンプルの試験結果(「Man」)と本発明の半自動化方法によって調製したサンプルの結果(「AUTO」)を示す。これらのグラフに示す値(%)は、複製サンプルの平均である。図10Dは、ICプローブとして抗ビメンチンのみを受容したサンプルのD2及びD4領域において検出されたビメンチンポジティブ細胞の%を示す。これらのビメンチンポジティブ細胞は、領域A(CD3-ポジティブ)又はB(CD3及びCD4-ポジティブ)のいずれかからゲート化された。図10Eは、ICプローブとして抗チューブリン

のみを受容したサンプルのD1及びD2領域において検出されたチュブリンポジティブ細胞の%を示す。これらのチュブリンポジティブ細胞は、領域A(CD3-ポジティブ)又はB(CD3及びCD4-ポジティブ)のいずれかからゲート化された。図10Fは、ICプローブとして抗ビメンチン及び抗チュブリンの両方を受容したサンプルのD1及びD2領域において検出されたチュブリンポジティブ細胞の%を示す。これらのチュブリンポジティブ細胞は、図10A及び10Bの領域A又はBのいずれかからゲート化された。図10Gは、ICプローブとして抗チュブリン及び抗ビメンチンの両方を受容したサンプルのD2及びD4領域において検出されたビメンチンポジティブ細胞の%を示す。結論:実施例2の新たな方法は、単独で又は同時に、CD3又はCD4リンパ球のいずれかに存在する、解凍したPBMC調製物中に存在する細胞内ビメンチン又はチュブリンの検出に干渉しない。

10

【0044】

実施例10

予め凍結及び培養したPBMCにおけるサイトプラズム増殖抗原(CPA)の検出、図1及び2Aに記載の方法によって調製されたサンプルを比較すること。

抹消血液単核球(PBMC)を当業者に公知の方法に従って、調製し、凍結させ、そして解凍させた。いくつかの標準的な15mlの各培養管において、500万個のPBMCをかか管に入っている伝統的なRPMI培養培地に加えた。RPMI培養培地には10%ヒトAB血清を補足している。培養管のいくつかに伝統的なリンパ球刺激因子(スタフィロコッカスエンテロトキシンB、SEB、及び共刺激物質の抗CD28抗体)を加えた。残りの管において、かかる刺激因子は加えなかった。次いで、培養管を37°Cに設定したLabPackインキュベーターに配置して5%CO₂を72時間に渡り補給した。実施例1に記載した常用の調製方法におけるように、注目の所定の表層抗原に対して特異的な、製造者が推奨する用量(典型的には10ml/試験)のプローブを20本の12×75mm試験管のそれぞれに手動により分注した。この表層プローブは以下の3種類のフルオロクローム標識した抗体である:i)Tリンパ球の表層上に存在するCD3抗原に対して特異的な抗体の、フィコエリトリンシアニン-7タンデム色素(PC7)色素と結合したCD3; ii)Tヘルパーリンパ球の表層に主に存在するCD4抗原に対して特異的な、フィコエリトリンシアニン-5-タンデム色素(PC5)と結合したCD4; 及びiii)T細胞傷害性リンパ球の表層上に主に存在するCD8抗原に対して特異的な抗体の、フルオレセインイソチオシアネート色素(FITC)と結合したCD-8であった。次いで、50µlの250,000個の72時間に渡り刺激しなかった培養ヒトPBMCを含有するサンプルを手動的に第1組の10本の試験管の各々に分注した。類似して、250,000個の72時間に渡り刺激した培養ヒトPBMCを含有するサンプル50µlを手動的に第2組の10本の試験管に分注した。20本の管の内容物を、当該管を穏やかに旋回させることによって混合した。次いで、管の内容物を室温で15分に渡り光から保護してインキュベートした。次いで、10本の管の1組(刺激したもの5本及び刺激しなかったもの5本)を更に、実施例1に記載の常用の手動方法を使用することで細胞内分析のために調製した。残りの10本の管の組(刺激したもの5本及び刺激していないもの5本)を回転台型の管ホルダーに配置し、順番にそれを、PrepPlus2装置に配置し、それが図2A及び例3に記載のように分注及びインキュベーション段階(変更が加えられたソフトウェアプロトコルに従う)を行った。この例において、細胞内プローブは、フィコエリトリン(PE)色素と結合した20µlのサイトプラズム増殖抗原(CPA)中の0.5µgであった。両方のサンプル調製方法において、濃度5.5%のパラホルムアルデヒド(PFA)を固定化剤として使用し、濃度0.7%のサポニンを透過化/溶解試薬として使用した。第1組の管を、サンプル調製の常用の手動方法に従う多数回の遠心及びボルテックス混合段階に委ねた。第2組の管を洗浄段階のみに委ね、それは当該方法の最後においてCellPrep装置(プロトコル2を使用する)によって行われた。次いで、20本の管をそれぞれ、データ獲得及び分析のために、RXPソフトウェアを使用する、Beckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに移した。かかる分析の結果を、図11A~11Fに示されたゲート化スキーム、及び図12A及び12Bのグラフにまとめた。このグラフは、CD3-PC7、CD4-PC5、CD8-FITC、CPA-PEで染色した72時間培養した複製PBMCサンプル、及び図11A~11Fに記載のゲート化された複製PBMCサンプルを示す。PBMCを培地中単独で(刺激していない)又は刺激因子SEB及びCD28の存在下(刺激した)のいずれ

20

30

40

50

かで培養した。CD3-ポジティブリンパ球集団(領域Aからゲート化された)におけるCPA-ポジティブ集団発現の%、CD3-ポジティブ-CD4-ポジティブリンパ球集団のCPA発現の%(領域Cからゲート化された)、及びCD3-ポジティブ-CD8-ポジティブリンパ球集団(領域Dからゲート化された)のCPA発現の%が示されている。図12Aにおいて、サンプルを常用の手動方法に従って調製した(図1)。図12Bにおいて、PrepPlus2及びCellPrep装置の使用による半自動化法として、本発明の方法に従い調製した。結論:本明細書中に記載の自動化方法により、72時間に渡り培養した解凍したPBMCのCPA値について、常用の方法から獲得される値と匹敵するCPA値が生み出される。重要なことに、本発明の自動化方法は、複製物におけるばらつきが、常用の方法による値に比較して実質上少ないことを証明する。

【0045】

10

実施例11

図1及び2Aに記載の方法によって調製されたサンプルに由来する刺激したTall-104T細胞系統PB120における細胞内サイトカインTNF- α の検出

Tall-104は、急性リンパ性白血病と診断された患者に由来するヒトT細胞由来の細胞系統である。これらの細胞は、構成的にサイトカイン(インターフェロン γ 、IFN γ 、及び腫瘍壊死因子 α 、TNF α)の発現レベルが低く且つ培養における刺激によりこのレベルは増加する。この例において、500万個のTall-104細胞を、(刺激した)又は(刺激していない)伝統的なリンパ球刺激因子(Dextranに結合したCD3抗体、CD28抗体、及びIL-2サイトカイン)を伴うかあるいは伴わない伝統的な50 μ l培養管中、500 μ lのIsocoveの改変Dulbecco培地(20%ウシ胎児血清を伴う)に配置した。次いで、培養管を37 $^{\circ}$ Cに設定し且つ5%CO $_2$ を6分に渡り補給したLabPackインキュベーター配置した。サイトカイン分泌を予防する十分な用量を含む10 μ lのBrefeldin-Aを各培養培地に加えた。この管を更なる5時間に渡りインキュベーターに置いた。常用の調製方法(実施例1)におけるように、製造者が推奨する用量のフルオロクローム標識した表層抗原プローブ(T-リンパ球の表層上に存在するCD3抗原に対して特異的な、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)色素と結合した抗体CD3の試験あたり10 μ l)を手動的に各12 $\times$ 75mmの各異なる試験管12本に分注した。次いで、500,000個の刺激されていない培養Tall-104細胞を含む50 μ lのサンプルを手動的に6本の各試験管に分注した。次いで500,000個の刺激されていない培養Tall-104細胞を含むサンプル50 μ lを他の組の6本の試験管中へと分注した。12本の管の内容物を、当該管を穏やかに旋回することによって混合した。次いで、管の内容物を室温で15分に渡り光から保護してインキュベートした。次いで、手動で6本の管(3本は刺激していない、そして3本は刺激した)を実施例1に記載の常用の方法に従い且つ20 μ lのイソタイププローブ(2つの管において、1つは刺激されており且つ他は刺激されていない)又は特異的細胞内サイトカインプローブ(TNF α)(どちらもフィコエリトリン(PE)色素と結合している)を使用することで調製した(他の4個の管において、2個は刺激されておらず、そして他の2個は刺激されている)。残りの6本の管を回転台型のホルダーに配置し、次いでそれを、実施例2に記載のように、分注及びインキュベーション段階を行う(変更が加えられたソフトウェアプロトコールに従って)PrepPlus2装置へと配置した。5.5%の濃度の25 μ lのパラホルムアルデヒド(PFA)を各管に分注して20分に渡りインキュベートした。次いで、20 μ lのどちらもフィコエリトリン(PE)色素と結合したイソタイププローブ又は特異的細胞内サイトカインプローブ(TNF α)のいずれかを各管に加え、直後に100 μ lのサポニンを0.7%の濃度で加えた。管を45分に渡りインキュベートした。この後、600 μ lのIsoFlowを各管に対して加えた。次いで、回転台をCellPrep装置に移し、ここで各管は順番に、当該装置に搭載されている標準的なプロトコール(No.2)に従い移動させられた。次いで、20本の管を各々、データ獲得及び分析のために、RXPソフトウェアを使用する、Beckman Coulter Cytomics FC500 フローサイトメーターに渡した。かかる分析の結果を図13A~13Dにまとめている。

20

30

40

【0046】

図13C及び13Dのオーバーレイプロットは、図13A及び13Bに示されるようにゲート化された4つの異なるサンプルについてCD3ポジティブTall-104細胞におけるTNF α 発現を比較する。図13Bにおいて、下方閾値レベルEは、上の実施例4で説明したように、イソタイププロ

50

ープを含むサンプルから測定されている。「常用」とは、サンプルが例1に従って調製されたことを示し、そして「自動化」とは、サンプルが実施例2に記載され且つ図2に示された方法により調製されたことを意味する。「イソタイプ」とは、CD3-FITC及びイソタイプ-PEで染色されたサンプルを意味する。「TNFa」とは、CD3-FITC及びTNFa-PEで染色されたサンプルを意味する。結論:本発明の方法は、細胞内TNFaサイトカイン内CD3ポジティブ刺激Tall-104細胞の検出のための細胞サンプルを調製することにおいて常用の方法に匹敵する。

【0047】

実施例12

全血の好中球集団中に存在する細胞内デフェンシン分子の間接的検出

10

フルオレセインイソチオシネート (FITC) 色素と結合した、モノクローナル抗体、抗CD15を手動的に12×75mmの8本の試験管の各々に分注した。CD15抗原分子は、好中球、好酸球、単球、マクロファージ、マスト細胞、及び正常骨髄前駆体細胞の表層に存在する。次いで、ヒト対象者から静脈穿刺によって獲得した50μlのヘパリン化細胞サンプルを各試験管に手動的に分注しそして各管の内容物を、当該管を穏やかに旋回することによって混合した。この管の内容物を室温で15分に渡り光から保護してインキュベートした。4本の管を例1に記載の常用の方法に従い、細胞内プローブを伴い調製した。当該プローブは、2本の管中に、適切な精製イソタイプ抗体(例えば、マウスIgG)、又は2本の管中に精製抗デフェンシン(例えば、タイプHNP-B)モノクローナル抗体を2μg含む5μlのPBSである。デフェンシンは小型の陽イオン性抗微生物タンパク質でありそしてヒト好中球の重要な構成要素である。空間的に仕切られた疎水性及び帯電した(陽イオン性)残基によりペプチドがリン脂質膜に挿入され、そして好適に負に帯電したリン脂質に富む細菌の膜を崩壊させる)。以下の2つの段階の実施例1に記載の方法、図1の段階(m)の直後及び段階(n)の前に対して添加があった;即ち、4μlの第2検出プローブ(Chemicon International Companyから入手したPEに対して結合したマウス抗体Fab断片(SAM)に対して特異的なヒツジ抗体)を含む100μlのPBSを最後の遠心段階から生じたペレットに加え、しかる後に、更なる15分のインキュベーションである。

20

【0048】

次いで、インキュベートされた抗CD15及び全血を含む残りの4つの管を、回転台型の管ホルダーに配置し、それは次いで例2に従い分注及びインキュベーション段階を行ったPrepPlus2装置に配置され、そして細胞内プローブは上記と同じ型であり且つ回転台をCellPrep装置に移す前に更なる3つの段階があったことは除く。後の段階は:600μlのIsoFlowの添加後、4本の管を回転台から取り外しそして500g力の力で5分に渡りBeckman J6B遠心器に配置した。上清の大部分を吸引して100μlの第2プローブを含有するPBSを手動的に4つの管の各々に分注した。この管を、細胞ペレットを懸濁させるために旋回させ、そして45分に渡りインキュベートしそして直後に900μlのPBSを各4本の各管に手動により添加した。この管を回転台に移しそしてCellPrep装置に移し、ここで各管は、当該装置に搭載された標準的なプロトコール(No.2)に従って移動させられた。8本の管をそれぞれ、データ獲得及び分析のために、RXPソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに移した。かかる分析の結果を図14A~14Cにまとめた。

30

40

【0049】

図14Cのオーバーレイプロットは、CD15-ポジティブ顆粒球集団におけるデフェンシン発現を示す図14A及び14Bに記載のように4つの異なるゲート化サンプルを比較する。「手動」とは、サンプルが例1に記載の方法により調製されたことを示す(上記を除くことに留意されたい)。「自動化」とは、サンプルが例2に記載のように調製されたことを意味する(上記を除くことに留意されたい)。イソタイプとは、サンプルがCD15-FITC及びイソタイプ+第2プローブSAM-PEで染色されたことを意味する。デフェンシンは、サンプルがCD15-FITC及び抗デフェンシンプローブ+第2プローブSAM-PEで染色されたことを意味する。結論:本明細書中に記載の自動化法は実行可能であるが、全血中に存在する細胞内デフェンシン内CD15ポジティブ顆粒球を間接的に検出するために至適化されていなかった。

50

【0050】

EXAMPLE 13

全血の好中球集団中に存在する細胞内MP0分子の検出

フルオレセインイソチオシネート (FITC) 色素と結合したモノクローナル抗体、抗-CD15を手動的に12×75mmの8本の各試験管に分注した。この抗体は、好中球、好酸球、単球、マクロファージ、マスト細胞及び正常骨髄前駆体細胞上に存在するCD15抗原分子に対して特異的なモノクローナル抗体であった。次いで、ヒト対象者から静脈穿刺によって獲得した50μlのヘパリン化細胞サンプルを各試験管に手動的に分注しそして各管の内容物を、当該管を穏やかに旋回することによって混合した。次いで、この管の内容物を室温で15分に渡り光から保護してインキュベートした。4本の管を実施例1に記載の常用の方法に従い手動的に調製し、そして4本の管を回転台型の管ホルダーに配置し、次いでホルダーを例2に記載されて図2Aに示されるように分注及びインキュベーション段階を行ったPrepPlus2装置に渡した。フィコエリトリン(PE)色素と結合した細胞内プローブのミエロペルオキシダーゼ(MPO)を各4本の管の組の2本の管に分注して各方法によって調製した；MPOは好中球のブルー顆粒において発見された細胞内抗原である。それは白血病を診断するために有用である。類似して、フィコエリトリン(PE)色素とも結合したイソタイププローブを、各組の残りの2本の管に加え、そしてサンプルを再度各方法によって調製した。次いで、各8本の管を、データ獲得及び分析のためにRXPソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに渡した。かかる分析の結果を図15A～15Cにまとめている。図15Cのオーバーレイプロットは図15A及び15Bに示されたようにゲート化された異なる4個のサンプルを比較する。CD15ポジティブ顆粒球集団におけるMPO発現。「手動」とは、サンプルが例1に記載の方法により調製されたことを示し、「自動化」とは、PrepPlus2及びCellPrep装置の使用により半自動化されている際に、サンプルが例2に記載のように調製されたことを意味する。イソタイプとは、サンプルがCD15-FITC及びイソタイプで染色されたことを意味する。MPOは、サンプルがCD15-FITC及びMPO-PEで染色されたことを意味する。結論：本発明のサンプル調製法は、全血中に存在する細胞内MPOを発現するCD15ポジティブ顆粒球の%を検出することにおいて常用の方法に匹敵する。

【0051】

実施例14

予め凍結させ且つ培養したPBMC細胞中のサイトプラズムサイトカインを検出すること図1及び2Aのサンプル調製法の比較

抹消血液単核球(PBMC)を当業者に公知の方法により調製し、凍結させ、そして解凍した。1500万個のPBMCを、10%ヒトAB血清を補足した1.5mlの伝統的なRPMI培養培地に配置し、そして等しく3本の伝統的な15mlの培養管に分けた。この培養管には伝統的なリンパ球刺激因子(スタフィロコッカスエンテロトキシンB, SEB、及び共刺激因子抗CD28抗体)が入っており「刺激」とラベルした。この3本の培養管を37℃に設定したLabPackインキュベーターに配置して1.5時間に渡り5%CO₂を補給した。次いで、2.5μg(サイトカイン分泌を予防するのに十分な量)を含むBrefeldin-A 5μlを3本の培養管の各々に加えた。この管を更なる15.5時間に渡りインキュベーターに配置した。刺激因子が入っている3本の管の内容物を1本の管にプールした。各々500,000個の細胞が入っている刺激したプール培養管から50μlのサンプルを4本の12×75mmの管各々に配置した。4本の試験管のうち2本に入っているサンプルを、表層プローブを伴い実施例1に記載の常用の方法に従い調製した。表層プローブは製造者が推奨する用量(典型的には10μl/試験)の以下の4種のフルオロクローム-標識したモノクローナル抗体であった：(i)T-細胞傷害性リンパ球の表層上に存在するCD8に特異的な、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)色素と結合したCD8；(ii)最も活性化したリンパ球上に存在する表層抗原に対して特異的な、フィコエリトリン-シアニン5タンデム色素(PC5)に結合したCD69；(iii)T-ヘルパーリンパ球の表層上に存在するCD4抗原に対して特異的な、フィコエリトリン-Texasレッド(ECD)タンデム色素と結合したCD4；及び(iv)全てのTリンパ球上に存在するCD3抗原に対して特異的な、フィコエリトリン-シアニン7(PC7)タンデム色素と結合したCD3。使用した細胞内プローブは、製造者が推奨する用量

である20 μ lの、腫瘍壊死因子 α (TNFa)に対する特異的細胞内サイトカインプローブであり;このプローブをフィコエリトリン(PE)色素と結合させていた。洗浄バッファーは、0.1%アジ化ナトリウム及び2%ウシ胎児血清(FCS)を含むPBS溶液であった。他の試薬は全て例1に記載の通りであった。従って、2つのサンプルを従来技術の方法を使用することで細胞内分析のために調製した。

【0052】

各々が、50 μ lの刺激したPBMCが入っている残りの2本の管中へと上記表層マーカープローブを加えた。2本の管の内容物を、管を穏やかに旋回させることによって混合した。次いで、管の内容物を室温で15分に渡り光から保護してインキュベートした。管を回転台型の管ホルダーに配置し、次いでそれを、図2Aを参照とし実施例3に記載のように、分注及びインキュベーション段階を行った(変更を加えたソフトウェアプロトコールに従って)PrepPlus2装置に配置した。使用した特異的細胞内サイトカインプローブは、腫瘍壊死因子 α (TNFa)に対するものであった。このプローブはフィコエリトリン(PE)色素と結合していた。次いで、回転台をCellPrep装置に移し、ここでは各管が順番に、当該装置に搭載された標準的なプロトコールに従って移動させられた。次いで、常用の方法及び本明細書に記載の新規方法に従い調製した各管を、データ獲得及び分析のためのRXPソフトウェアを使用する、Beckman Coulter Cytomics FC500フローサイトメーターに移した。かかる分析の結果を、図16A及び16Bの散布図にまとめた。解凍し且つ刺激したPBMCサンプルを、サンプル調製の常用方法及び新規方法によりTNF生産について分析した。CD3+CD4+CD69+TNFa+及びCD3+CD8+CD69+TNFa+4重ポジティブの検出%を下の表3に示している。ゲート化スキームを図16Aの散布図に示しており、そして図16Bの散布図は、CD3+CD8+(上方)又はCD3+CD4+(下方)集団のいずれかにゲート化された事象を示す。この散布図は、TNFa-PE(x-軸)対CD69-PC5(y-軸)を示す。本明細書中に記載の新たな方法は、見掛上解凍して培養したPBMCに対する常用の方法とほぼ同様の値を供する。

【0053】

【表4】

表3

	常用の方法	新規方法
%CD3+CD4+CD69+TNFa+	12.8	10.7
%CD3+CD8+CD69+TNFa+	8.4	7.7

【0054】

実施例15

凍結させ且つワクチン抗原と培養したPBMC細胞サンプル中のサイトプラズムサイトカインを検出すること;新規対常用のサンプル調製法

抹消血液単核球(PBMC)細胞を、特定のワクチン抗原ワクチン化した供与者から獲得した。次いで、これらの細胞を当業者に公知の方法に従って凍結させて解凍した。1500万個の解凍したPBMCを、10%ヒトAB血清を補足した3mlの伝統的なRPMI培養培地に配置して、6本の伝統的な15ml培養管に等しく分けた。2本の培養管は伝統的なリンパ球刺激因子(スタフィロコッカスエンテロトキシンB, SEB、及び共刺激因子抗-CD28抗体)を含み、そして「SEB+CD28」とラベルし;他の2本の培養管には「ワクチンAg」とラベル、そして当該ワクチンでPBMCを刺激するために十分な量のワクチン抗原を入れ;そして残りの2本の管は刺激因子がなんら入っておらず、そして「刺激なし」と標識した。次いで、この6本の培養管を、37°Cに設定して5%CO₂を補給したLabPackインキュベーターに1.5時間に渡り配置した。次いで、2.5 μ g(サイトカイン分泌を予防するために十分な用量)を含むBrefeldin-A5 μ lを

、6本の培養管の各々に加えた。この管を更なる16時間に渡りインキュベーターに配置した。各2本の類似する培養物(即ち、SEB、刺激及び無刺激)を、穿刺可能キャップを伴う1本75mm標本管にプールした。これらの標本管をSEB、ワクチン、又は刺激なしと標識した。各々が250,000個の細胞を含む50 μ lのサンプルを、3本のプールした各培養管から分注し、そして3本の12 $\times$ 75mmの管に分注した。次いで、これらのサンプルを更に、実施例14に記載の4種の表層プローブ(即ち、CD8-FITC、CD69-PC5、CD4-ECD、CD3-PC7)を伴い、例1に記載の常用の方法に従って調製した。使用した細胞内プローブは、製造者が推奨する用量20 μ lの、フィコエリトリン(PE)色素と結合した、特異的細胞内サイトカインプローブインターフェロン γ (IFN γ)であった。洗浄バッファは、0.1%アジ化ナトリウム及び2%ウシ胎児血清(FCS)を含有するPBS溶液であった。

10

【0055】

次いで、3本のプールした培養管を、PrepPlus2分注装置の標本ラックの位置1~3に配置した。装置に提供した市販のソフトウェアPanelDefを使用して、回転台型のホルダーに支持された12 $\times$ 75mmの試験管3本へと上記表層抗体と同じ体積を自動的に分注するプロトコールを作り出した。次いで、各250,000個の細胞が入っている50 μ lを、3本の標本管の各々から表層抗体を含む12 $\times$ 75mm試験管へと移した。回転台における管を室温で15分に渡りインキュベートした(PrepPlus2から取り出さずに)。例3に記載の新規方法を行うために、変更を加えたソフトウェアを使用した。この例における特異的細胞内サイトカインプローブは、フィコエリトリン(PE)色素と結合したインターフェロン γ (IFN γ)であった。回転台をCellPrep装置に移動し、ここでは各管が装置に搭載された標準プロトコール(No.2)に従って順番に移動させられた。6本の管(3本は常用の方法に従って調製しそして3本は本明細書中に記載の新規方法に従って調製した)の各々が、データ獲得及び分析のためのRXPソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500 フローサイトメーターに移された。かかる分析の結果を、表4並びに図17A及び17Bにまとめている。図17Aにおいて、実施例1の常用の手動方法によって調製された3本の培養サンプルの各々に関して結果を示す。図17Bは本発明の方法を使用することで達成した類似の結果を示す(図2Aに示している)。両方の図において、散布図は、CD3+CD8+(上方)又はCD3+CD4+(下方)集団のいずれかについてゲート化した事象を示す。ヒストグラムは、IFN γ -PE(x軸)対 CD69-PC5(y軸)を示す。CD3+CD4+CD69+IFN γ +及びCD3+CD8+CD69+IFN γ +4重ポジティブリンパ球の%は表において記録されている。結論:本明細書中に記載の新規方法は、ワクチン抗原と共に培養した解凍PBMCについて常用の方法よりも良い値を示し、それは、刺激していないサンプルにおいて存在する値(バックグラウンド)がより低いことによる。このバックグラウンドがより低いことは、ヒストグラム上にプロットされた事象の分散の程度を減らす新たな方法による。

20

30

【0056】

【表5】

表4

	手動			自動化		
	刺激なし	SEB+ CD28	ワクチン Ag	刺激なし	SEB+ CD28	ワクチン Ag
%CD3+8+69+IFN γ +	0.34	9.06	0.38	0.04	8.08	0.68
%CD3+4+69+IFM γ +	0.14	1.87	0.08	0.03	1.66	0.25

40

【0057】

実施例16

全血及び細胞系統の混合物中のサイトケラチンポジティブ細胞の検出

50

図1及び2Bに記載のされた方法を比較すること

Colo-205は、結腸腺ガンと診断された患者の腹水流体に由来する上皮細胞系統であり、それは懸濁及び接着した細胞の混合物として培養物中で増殖する。これらの細胞は、サイトプラズム内サイトケラチン(上皮細胞中に存在するある型の中間体フィラメントを作りあげる)を発現し、そしてCD71(大部分のヒト腫瘍細胞系統及び正常上皮血液単核球上に存在するヒトトランスフェリンレセプター)を細胞表層上で発現する。これらの細胞がヒト全血中に希釈されて入った場合及びフローサイトメトリーのために調製されている場合、それらは、光散乱特性に基づき白血球集団から分離される(図18)。4本の12×75mm染色管を、Colo-205細胞を含む正常ドナーから静脈穿刺によって獲得した50 μ lの全血を含み調製した。2重の12×75mm染色管を、フィコエリトリン(PE)色素に対して結合させた20 μ lの抗CD-71である表層プローブを伴い、そして使用した細胞内プローブは、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)色素と結合した20 μ lの抗サイトケラチン抗体であった。洗浄バッファは、0.1%アジ化ナトリウムを含有するPBS溶液であった。他の2つの染色管を、図2Bに示す本発明の変更を加えた方法によって調製し、その方法は次のように記載される:CD71表層分子のためのプローブ20 μ l及び20 μ lの細胞内サイトケラチン分子プローブを回転台型の管ホルダーに配置された12×75mmの2本の各管に同時に分注した。次いで、この回転台をPrepPlus2装置に配置し、そして室温で15分に渡りインキュベートした。次いで、このPrepPlus2が本明細書中に記載の分注及びインキュベーション段階(変更を加えたソフトウェアプロトコールに従い)を行った。各管に対して順番に、100 μ lのパラホルムアルデヒド(PFA)溶液を5.5%の濃度で、100 μ lの赤血球溶解試薬(1×濃度の塩化アンモニウム溶液(Beckman Coulter, Inc. IOTest3 Lysing Reagent))、及び100 μ lのサポニン溶液を0.7%の濃度において加えた。この管を室温で20分に渡り維持した。この後、600 μ lのPBSを各管に加えた。次いで、回転台をCellPrep装置に移し、ここで管が順番に、当該装置に搭載された標準的なプロトコール(図2)に従い、標準IsoFlow試薬と共に移動させられた。次いで、各4本の管を、データ獲得及び分析のためにEXP0-ADCソフトウェアを使用するEPICS XL-MCLフローサイトメーターに移した。かかる分析の結果を図18にまとめている。図18における上の3つのヒストグラムは、例1に記載の常用の方法に従い調製したサンプルを示し、そして下方の3つのヒストグラムは図2Bに示すような本発明の方法(半自動化)に従い調製されたサンプルを示す。Log SS対Log FSC散布図の両方の視覚検査により、Colo-205細胞の散乱特性は、顆粒球とは十分に異なり、個別の集団を提供することが示される。この4つのヒストグラムは、Colo-205細胞と顆粒球集団の両方を含んで成る適切なlog FS対log SSゲートからゲート化された。暗黒色の線分析領域(「Grans」)は、CD71及びサイトケラチンの両方に対してネガティブである細胞を各々示すヒストグラム上に描かれている。より明るい黒線領域(「Colo」)は、CD71及びサイトケラチンの両方にポジティブである細胞を示す。それらは、それぞれ顆粒球及びColo-205として、「Grans」ヒストグラム領域中の細胞のみが、当該光散乱散布図のGrans領域に示されており、そして「Colo」ヒストグラム領域に示された細胞のみが光散乱散布図のColo-205領域に示されていることを示す色ブラックゲート化を使用した当業者に共通して使用される分析方法によって同定されている。常用及び自動化方法から獲得した比較可能な結果は、半自動化方法がCD71及びサイトケラチン発現の観点から抹消血液に存在する循環性結腸腺ガン細胞(Colo-205)を検出するために使用されて良いことを示す。

【0058】実施例17全血の好中球集団中に存在する細胞内デフェンシン分子の直接検出

フルオレセインイソチオシアネート(FITC)色素と結合したフルオロクローム標識した抗体CD15を、異なる4本の12×75mm試験管の各々に手動により分注した。この抗体は、抗核球、好酸球、単球、マクロファージ、マスト細胞、及び正常脊髄前駆体細胞上に存在するCD15表層抗原に対して特異的なモノクローナル抗体であった。次いで、ヒト対象者から静脈穿刺によって獲得したEDTA全血のサンプル50 μ lを、各試験管に手動により分注して入れ、そして各管の内容物を、当該管を穏やかに旋回させることによって混合した。次いで、

管の内容物を室温で15分に渡り光から保護してインキュベートした。次いで、この2本の管を、実施例1に記載の常用の方法に従って調製し、そして残りの2本の管を回転台型の管ホルダーに配置し、それを次いで、実施例3におけるような分注及びインキュベーション段階を行ったPrepPlus2装置上に配置した。これらの方法の両方において、細胞内マーカーは、フィコエリトリン(PE)色素に結合した適切なイソタイプ抗体(例えば、マウスIgG1)(2本の管の1本に加えた)、又はフィコエリトリン(PE)色素に結合した抗デフェンシンHNP-B抗体を0.25 μ g(2本の管のうちの残りの1本に加えた)含む20 μ lであった。次いで、各管を、データ獲得及び分析のためにRXPソフトウェアを使用するBeckman Coulter Cytomics FC500 フローサイトメーターに移した。かかる分析の結果を、図19A~19Cにまとめている。ゲート化スキームを図19A及び19Bに示している。図19Cのオーバーレイプロットは、常用の「手動」方法、並びにPrepPlus2及びCellPrep装置の使用により半自動化されたような本発明の「自動化」方法により調製したサンプルから獲得したCD15ポジティブ顆粒球集団におけるデフェンシン発現を示す4つの異なるサンプルを比較する。イソタイプは、サンプルがCD15-FITC及びイソタイプDEで染色されたことを示す、デフェンシンは、サンプルがCD15-FITC及び抗-デフェンシン-PEで染色されたことを示す。結論:例2に記載の方法は、CD15+白血球におけるデフェンシンの細胞内検出するために実行可能である。

10

20

30

40

50

【0059】

上記例から、本発明の方法は、常用の従来方法に比べて複雑さが非常に少なく、様々な種類の細胞サンプル及び注目の細胞内抗原について等しく有効な試験結果を提供することは明らかである。これは、細胞サンプルが新鮮であろうが凍結されていようが当てはまる。最も重要なことに、本発明のサンプル調製法は、下に記載の装置システムで達成されるように、特に完全に自動化された場合、有意に一層再現性のある結果を供する。

【0060】

ここで、図20の略図を参照すれば、本発明の完全に自動化されたサンプル調製法を行うために適合された好適な装置システムは、分注器/インキュベーター要素20、ろ過器/希釈器要素30、ロボットアーム成分RA及びマイクロプロセッサコントロール型ロジック及びコントロールユニットLCUを含んで成るとして示されている。後者は、これらの要素の内部操作を、並びに本発明の方法を行うそれらの相互作用をコントロールする。好適に、分注器/インキュベーター要素は、上記Beckman Coulter PrepPlus2分注及び希釈装置の僅かに改良型であり、そして要素30は、上記Beckman Coulter CeliPrep細胞洗浄及び希釈装置である。これらの装置の基本的な構造及び操作の詳細は、その全体が本明細書中参照によって組み込まれているそれらの操作マニュアルに記載されている。

【0061】

常用のPrepPlus2装置(要素20)は、マイクロプロセッサコントロール分注及びインキュベーター装置であり、次のものを支持するためのハウジングを一般に含む(i)細胞サンプル管(各管には分析、例えばフローサイトメトリー分析のために調製される細胞サンプルが入っている)のラック;(ii)タッチスクリーン等の上で選択される内臓プログラムに従い細胞サンプルを調製するために必要な試薬(例えば、溶解、希釈、プローブなど)を含む様々な個々の試薬ボトルのラック(iii)細胞サンプルが分析のために調製される複数(例えば32)の反応容器V(「ドーター」管(daughter tube)とよばれる)を含む回転台C、並びに(iv)細胞サンプル及び試薬を吸引するために、サンプル管と試薬ボトルの間を選択的に移動し、そして、適切な反応容器に分注する働きをする1つのX/Y/Z駆動分注器である。PrepPlus2装置は、細胞サンプルを適切に希釈するため並びに一連の動作の間に前記吸引プローブを洗い流すための様々な希釈剤の供給をも伴う。内蔵マイクロプロセッサは、分注操作の順番、分注器のX-Y-Z移動、及び吸引及び排出される液体体積をコントロールするようにプログラムされている。それは、一連の液体-分注動作のタイミングをコントロールし、正確に当該反応容器内の内容物の様々なインキュベーション時間を正確にコントロールし、そしてそれはまた、分注器ハウジングの周囲温度をコントロールするプログラムがされていて良い。

【0062】

本発明の観点によれば、PrepPlus2装置の試薬ラックは、例えば、上記並びに図2A及び2Bに示される段階(a)～(e)のような、注目の特定の細胞内サンプル調製法を行うために必要な試薬(固定化剤、透過化剤、溶解剤、細胞表面プローブ、細胞内プローブ及びバッファ)のボトルを受け取るために変更が加えられている。更に、PrepPlus2装置単独の動作をコントロールする動作を通常する内部ロジック及びコントロールユニットは、図2A及び2Bに示す段階(a)～(e)の所定の順番及びタイミングを行うプログラムだけでなく、全体装置システムの一連の動作をコントロールするためにもプログラムされている。従って、LCUを、図20において個別の要素として示している一方で、それは実際には要素20の中に入っている。しかしそれは、3つの主要な要素20、30又はRAのいずれかの中に収容されていて良い。

10

【0063】

更に図20を参照すれば、好適にロボットアームRAは、商標ORCAの下でBeckman Coulter Inc.によって製造及び市販されているプログラム可能ロボットアームである。それは、LCUのコントロール下で、分注/インキュベーター成分のハウジング内に到達し、上記方法の段階(a)～(e)が行われた反応容器Vの回転台Cにアクセスし且つ後退させる動作をする。次いで、ロボットアームは、かかる回転台をトラック40に沿ってろ過/希釈要素30に運び、ここでそれは当該回転台を回転させるために支持する回転可能駆動ハブに移動させる。上に示すように、要素30は好適に、移動してきた細胞サンプルがそれに従って洗浄及び希釈されるいくつかの内臓プロトコールを含むCellPrep装置の未変更型である。TheCeliPrep装置は、それ自身の内部プログラムの下で作動し、受容した反応容器の回転台をその中心垂軸にそって回転させ、順次、個々の反応容器を、1つの吸引プローブの下に渡す。かかるプローブは、内部プロセッサのコントロールの下で、移動して垂直に反应用器に入り、反応容器内のサンプルを吸引し、そして吸引したサンプルを上記多孔質(半透過性)中空繊維の内部(ここでサンプルがろ過されて干渉物質が排除される)に運ぶ働きをする。ろ過後、注目の細胞は、中空ろ過繊維内に残り、そして所定体積の希釈剤、例えばIsoFlowが、同時に注目の細胞を当該繊維から洗い流すため、そして細胞をそれらが来た同じ容器に分注するためにポンプでくみ出される。好適な内蔵プロトコール2によれば、このろ過/希釈プロセスは2度行われる。各反応容器中の細胞サンプルがこの態様でろ過されて希釈された後、回転台はフィルターから外され、そして細胞サンプルは、分析のためにフローサイトメーターに移される。

20

30

【0064】

CellPrep装置が細胞サンプルをろ過するように動作する態様は、図21A～21Cを参照することで理解されて良い。図面に示すように、この装置のろ過要素は、スペースを節約する考えのために不透過性のプラスチック物質の細長い柔軟な管50の形態における代替可能フィルターカートリッジであり、当該管50は環状ループへと曲げられている。管50には中空繊維52のペアが入っており、これは管の軸に沿って延びている。各々の中空繊維は、注目の細胞よりも幾分小さく、当細胞を通過させず粒子(干渉物質)を透過させるだろうあるサイズの孔を間隔をあけて多数有する半透性の物質からできている。典型的な孔の大きさは、約0.65ミクロンである。このろ過カートリッジは、4つの流体連結器C1～C4を有し、それらを介して(a)中空繊維52を細胞サンプルを反応容器から後退させるために使用される吸引プローブへ結合させることができる;(b)真空源が選択的に管50内部に対して陰圧を形成する目的のために結合させることができ、その陰圧によりろ過された細胞サンプルは吸引プローブを通じ引きこまれてろ過のための中空繊維に入れられる、(c)希釈剤が、ろ過された細胞サンプルをフラッシュアウトしてそれを反応容器に戻すために当該繊維に対して適用されて良い、並びに(d)デタージェント溶液が、サンプルろ過サイクル後に洗浄する目的で中空繊維に適用されて良い。図21Bは、管50の切断部分を示し、そこにある中空繊維52を示し、そして図21Cは、ろ過方法の略図であり、より大きな細胞Cが中空繊維52の内部に維持され、一方で干渉物質は当該繊維の壁を通過する。更なる詳細は、上記米国特許出願US 2002/0123154号に記載されている。

40

【0065】

50

図20に説明した装置システムは、ひとたび細胞サンプル及び試薬のラックが要素20に積載されて所定の型のサンプル調製が行なわれることが選択されれば、手動が完全に排除されていることにおいて非常に再現性の高いサンプル調製を供することができる。しかし、この装置システムは、本来モジュール式であり、動作をさせるのには比較的巨大なスペースが必要となる。この欠点は、図22に示し、そして下に記載のように単一プラットフォーム装置によって解消される。

【0066】

図22を参照すれば、図2A及び2Bの方法を自動的に行うために適合された単一プラットフォーム装置60は、その外部保護カバーが取り外れて透視図で示されている。示されているように、装置60は基本的に、細胞サンプルをオンボードで洗浄することができるようにする、上記PrepPlus2装置の拡張型である。PrepPlus2装置と同様に、装置60は、ベルト駆動X/Y/Zアーム62(3個の、マイクロプロセッサによりコントロールされるステッピングモーターのコントロール下で、分注プローブP1のX/Y/Z位置をコントロールするために上記装置の機械プレートMCと平面において移動する)を含む。プローブP1は、その位置に依存し、サンプル調製プログラムが行われるに従って、様々な試薬(試薬ボトルRB又は試薬ラックRR中の)標本管ST又は反応容器Vに浸され、正確な体積の液体を吸引又は分注する。装置60は、PrePlus2装置よりもハイスループットな装置であり更に、標本管の複数のリニアラックSR(典型的に5以上の管/ラック)を受容するため及びかかるラックを一度に、「U字」路(それに沿って各管が、その内容物が吸引のためにプローブP1にアクセス可能である吸引位置APに配置される)に沿って輸送する標本輸送ステーション61を含む。示すように、標本管ラックは「標本ラックイン」から入りそして後方に装置の後方壁へと後方に向かって移動する。この移動の最後で、標本は後方壁に平行に(図に示すように右～左、左～右)に移動し、吸引のために各管の位置を合わせる。最後に、標本ラックは後方壁から「標本ラックアウト」位置へと外側に移動する。

【0067】

装置60の機械プレートは、各々が回転可能なようにハブHに取り付けられている複数の支持体に適合されている。所定数の回転台よりも1個多いハブがあり、それによって当該回転台は、装置内の様々な位置に移動することができ分注動作が促される。回転台の移動は、第2のX/Y/Zアーム64によって行われており、それは、ベルト駆動Bによっても駆動されそして3個のステッピングモーターによってコントロールされている。アーム64は、各回転台上で垂直に延びたハンドル68を、各回転台をそのハブから持ち上げて外して当該回転台をX/Y平面における他のハブに輸送する働きをするクランプ66のX/Y/Z位置をコントロールするように動作する。

【0068】

装置60の更なる特徴は、装置の後方壁にマウントされた溶解ステーションLS1とLS2の組である。反応容器Vがその分注ヘッドDHに移されることにより、各ステーションは、溶解溶液を反応容器に注入し、しかる後に赤血球溶解過程を終結させる停止溶液を反応容器に注射するように適合されている。勿論、タイミングは装置内部のマイクロプロセッサによってコントロールされている。各溶解ステーションは、溶解及び停止溶液と細胞のサンプルの混合を行うために容器を底に従事させ且つ適切な動きを与えるアクチュエーターVAを有するボルテックスミキサーVMを含む。反応容器を回転台から溶解ステーションへと輸送することは、装置内で回転台を輸送するために使用された同クランプ66によって達成される。クランプ66は、示すように、反応溶液の上部を拘束しそして開放するために開閉する狭い後部を有する。

【0069】

上記のように、装置60の非常に有意な特徴は、サンプルの注目の洗浄物質等を除去するために調製サイクルの間のいずれのときにおいてもオンボードで細胞サンプルを洗浄するその能力である。この特徴を供するため装置は、装置の後方壁にマウントされており、そしてF/Dと命名されている。それは、吸引プローブP2を含み、それはアーム64とクランプ66によって、垂直にのみ移動し、それに渡された反応容器を入れそして出す。細胞洗浄装

置は、上記の中空繊維カートリッジ、及び中空繊維技術によって細胞を洗浄するためのCellPrep細胞洗浄装置によって細胞を洗浄するために発見される本質的ハードウェア及びソフトウェアを含む。装置60は、内臓型の分注及び細胞洗浄装置であり、上記型のモジュラー装置システムと相対して所定のスペースコストセーブ上の利点を提供する。

【0070】

本発明は、特定の実施態様を参照することにより記載されている。多くの変形が本発明の精神を逸脱することなく可能であることは明らかであろう。従って、本発明の範囲は、実施態様によって特定されるべきではないが、添付の特許請求の範囲及びそれらと法的に同等なものによって特定されるだろう。

【図面の簡単な説明】

10

【0071】

【図1】 常用のフローサイトメーターによる細胞内アッセイのための細胞サンプルを調製するための典型的な従来技術の方法を示す。

【図2】 A及びBは、本発明の2つの好適な実施態様に従う細胞サンプル調製法の段階を示す。

【図3】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図4】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図5】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図6】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図7A】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

20

【図7B】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図8】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図9】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図10】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図11】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図12】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図13】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図14】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図15】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図16】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

30

【図17】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図18】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

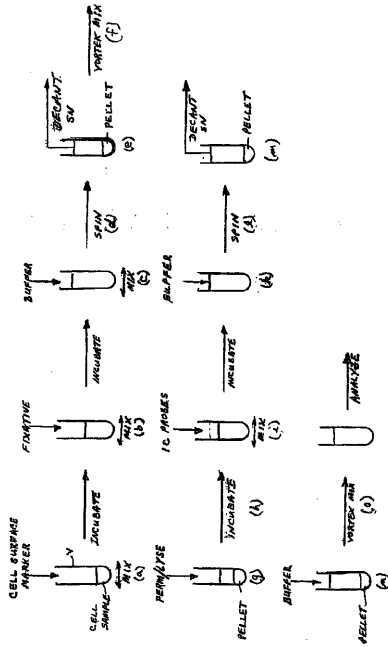
【図19】 供した様々な例に記載の方法の有効性を示す散布図及びグラフである。

【図20】 本発明の細胞サンプル調製法を自動的に行うための好適な自動化装置システムの略図である。

【図21】 A～Cは、中空繊維カートリッジを示す。

【図22】 本発明のサンプル調製法を自動的に行うように適合された好適な単一プラットフォーム装置の透視図である。

【図 1】

FIG. 1
(PRIOR ART)

【図 2 A】

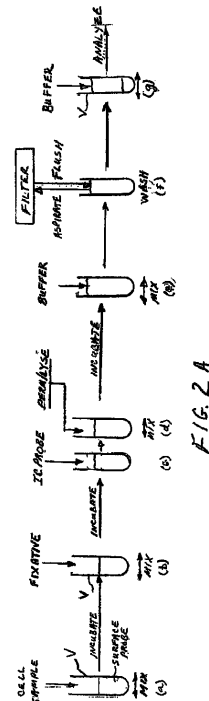


FIG. 2 A

【図 2 B】

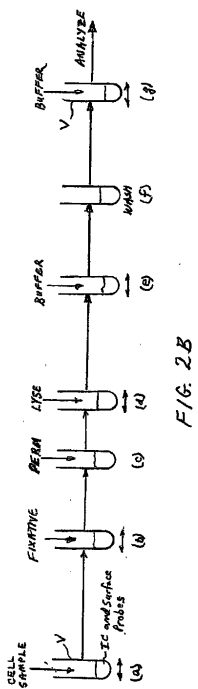


FIG. 2 B

【図 3 A】

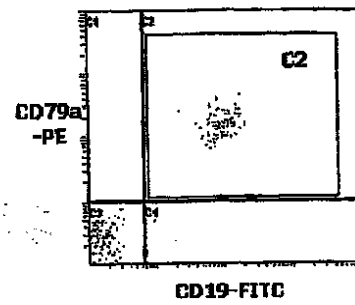


FIG. 3 A

【図 3 B】

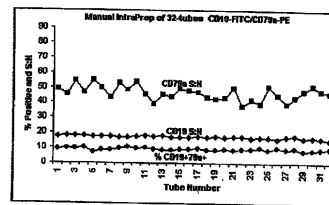


FIG. 3 B

【図 4 A】

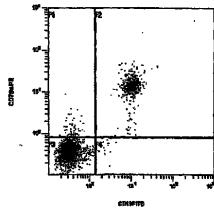


FIG. 4A

【図 4 B】

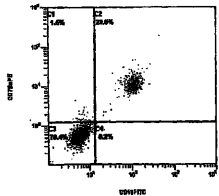


FIG. 4B

【図 4 C】

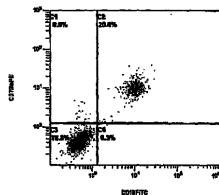


FIG. 4C

【図 6 B】

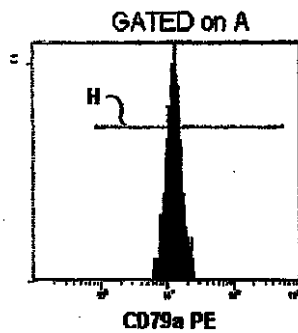


FIG. 6B

【図 6 C】

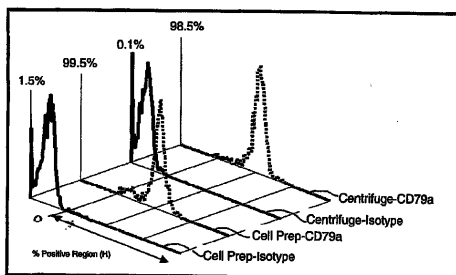


FIG. 6C

【図 5】

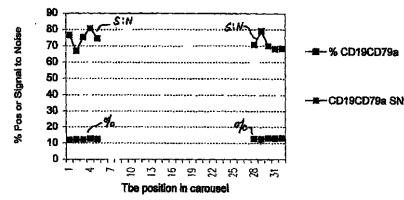


FIG. 5

【図 6 A】

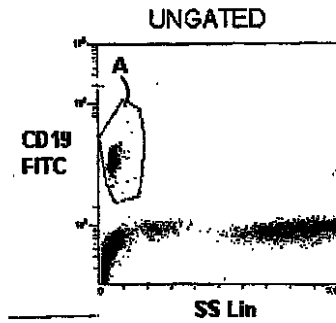


FIG. 6A

【図 7 A】

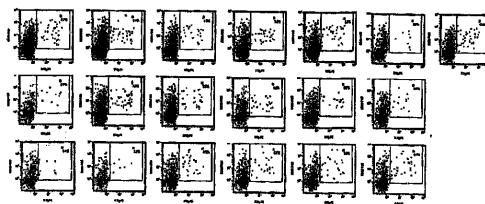


FIG. 7A

【図 7 B】

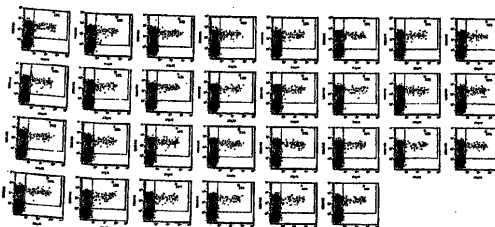


FIG. 7B

【図 8 A】

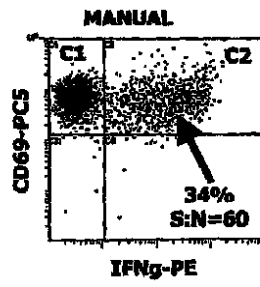


FIG. 8A

【図 9 A】

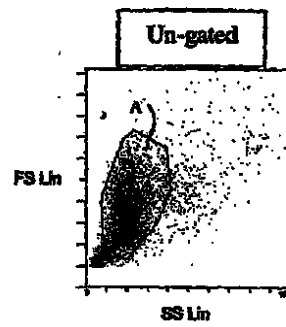


FIG. 9A

【図 8 B】

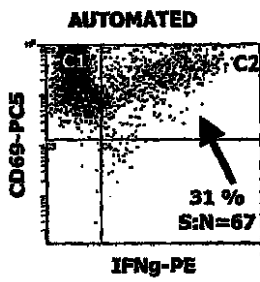


FIG. 8B

【図 9 B】

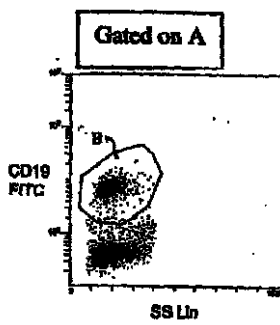


FIG. 9B

【図 9 C】

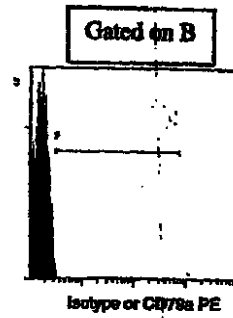


FIG. 9C

【図 9 D】

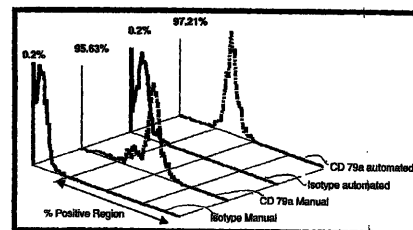


FIG. 9D

【図 10 A】

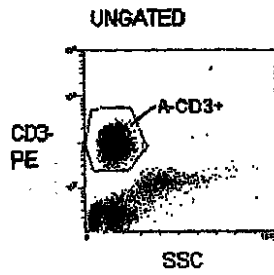


FIG. 10A

【図 10 C】

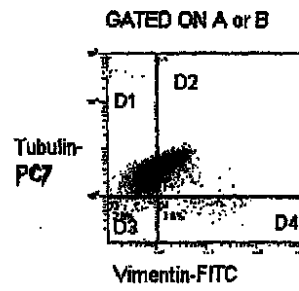


FIG. 10C

【図 10 B】

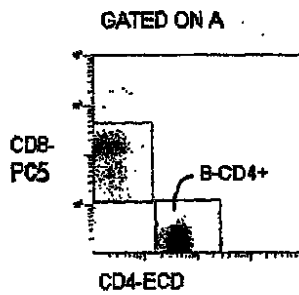


FIG. 10B

【図 10 D】

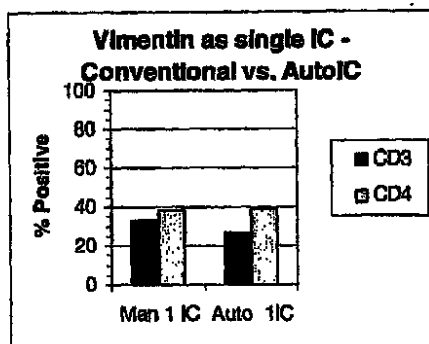


FIG. 10D

【図 10 E】

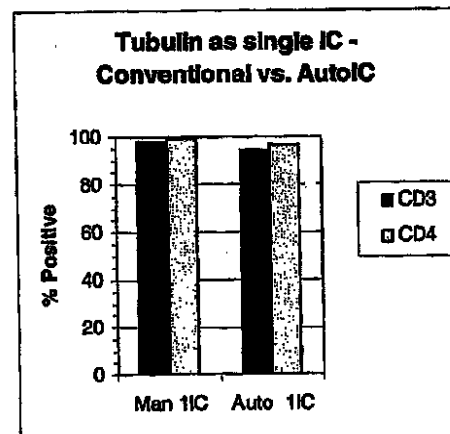


FIG. 10E

【図10F】

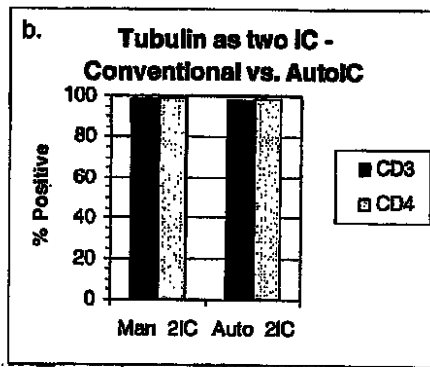


FIG. 10F

【図10G】

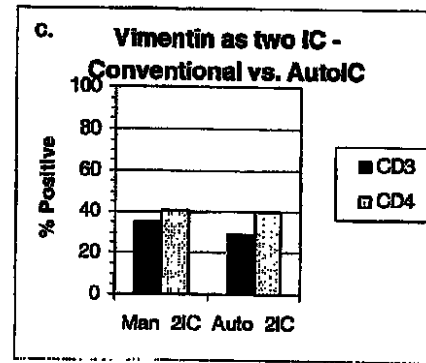
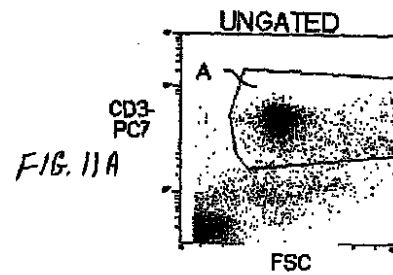
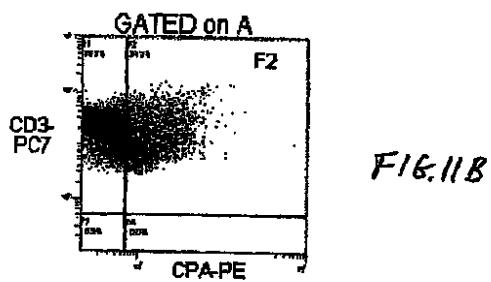


FIG. 10G

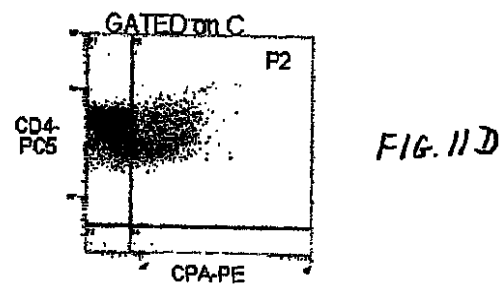
【図11A】



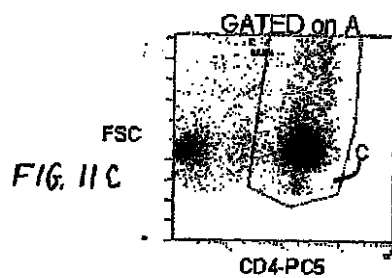
【図11B】



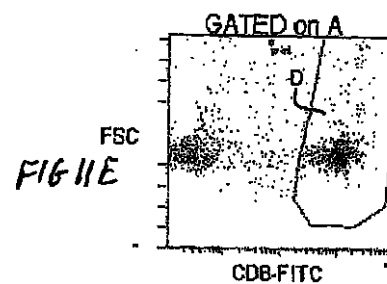
【図11D】



【図11C】



【図11E】



【図 1 1 F】

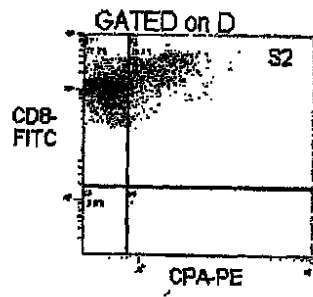


FIG. 11F

【図 1 2 B】

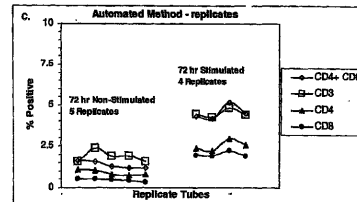


FIG. 12B

【図 1 2 A】

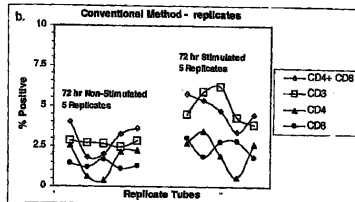


FIG. 12A

【図 1 3 A】

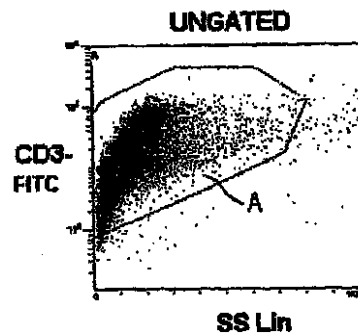


FIG. 13A

【図 1 3 B】

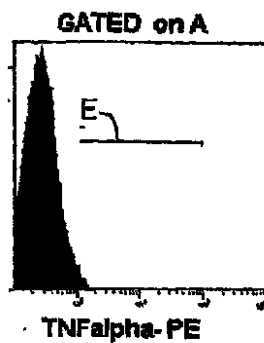


FIG. 13B

【図 1 3 C】

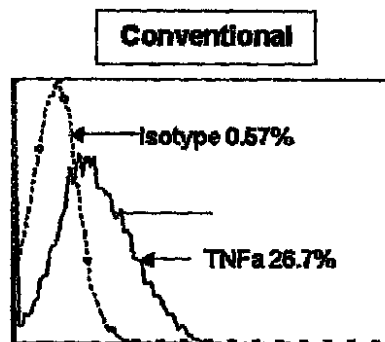


FIG. 13C

【図 1 3 D】

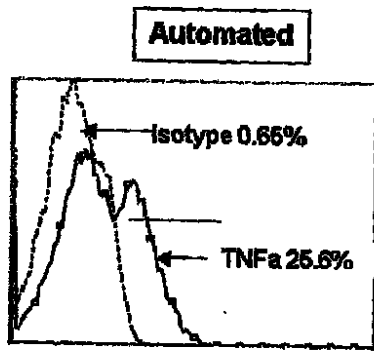


FIG. 13D

【図 1 4 A】

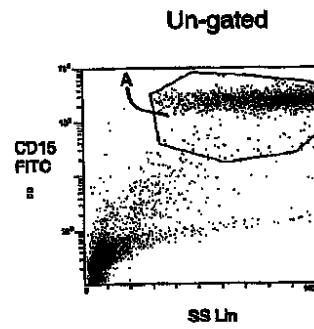


FIG. 14A

【図 1 4 B】

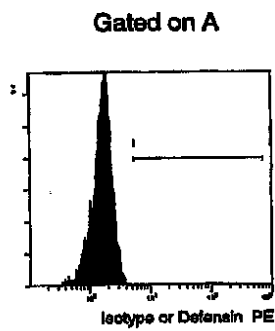


FIG. 14B

【図 1 5 A】

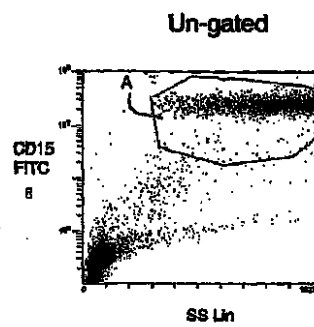


FIG 15A

【図 1 4 C】

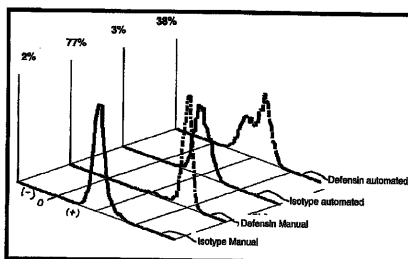


FIG. 14C

【図 15 B】

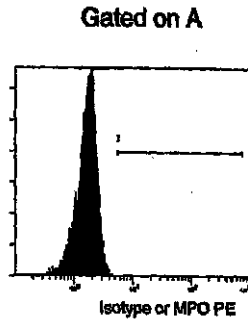


FIG. 15B

【図 15 C】

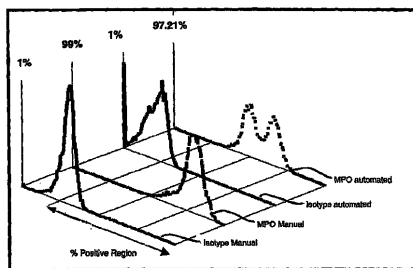


FIG. 15C

【図 16 A】

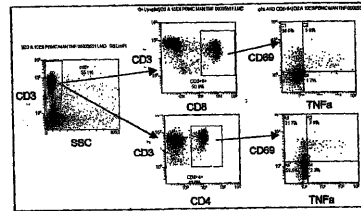


FIG. 16A

【図 16 B】

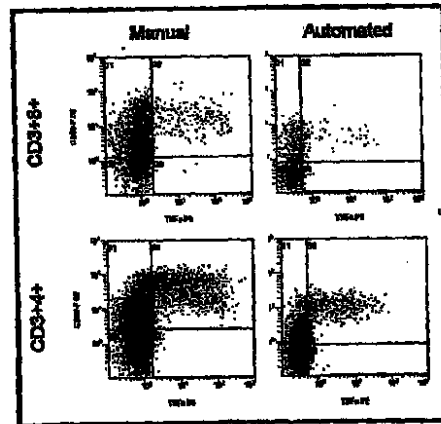


FIG. 16B

【図 17 A】

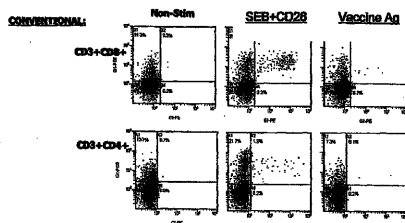


FIG. 17A

【図 18】

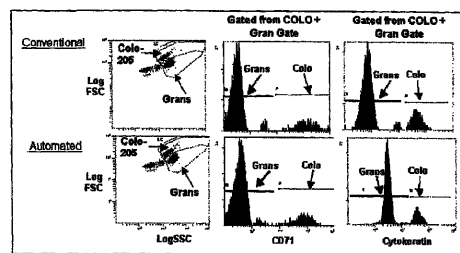


FIG. 18

【図 17 B】

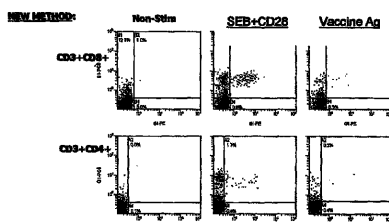


FIG. 17B

【図 19 A】

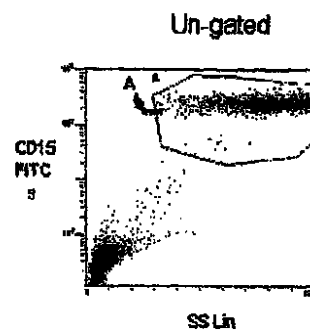
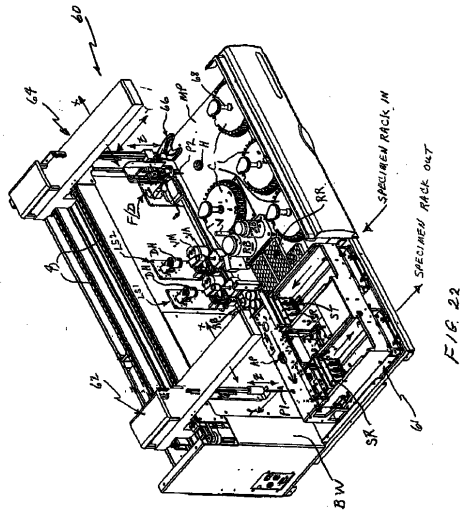


FIG. 19A

【図 2 2】



【手続補正書】

【提出日】平成18年3月1日(2006.3.1)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞内成分を検出するための生物細胞サンプルを調製するための方法であって、当該方法は：

(a)所定体積の生物細胞サンプルを反応容器中へと分注し、前記細胞サンプルは注目の所定の細胞内分子を含んで成る注目の所定の細胞を含み；

(b)前記注目の細胞内分子の検出に干渉する傾向がある細胞サンプルの干渉物質を除去するための介在する洗浄段階を何ら伴うことなく、前記注目の細胞を固定化し、前記注目の細胞を透過化し、そして前記注目の細胞内分子を染色し；そして

(c)当該細胞サンプルを段階(b)を行う後に洗浄して前記干渉物質の存在を最小化する、段階を含んで成る方法。

【請求項 2】

前記洗浄段階を、染色された細胞内抗原又は注目の分子を含む注目の細胞を選択的に維持するように適合せしめられた半透膜により前記細胞サンプルをろ過することによって行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記半透過膜は、細胞サンプルがその中へと引き込まれる中空繊維の形態である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記洗浄段階を遠心方法によって行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記段階 (b) が、前記反応容器内で前記注目の細胞上の表層抗原を染色する段階を更に含んで成る、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 6】

前記表層抗原を染色する段階を前記固定化段階の前に行う、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

前記注目の細胞内分子を染色する段階を前記固定化段階の前に行う、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

前記注目の細胞内分子を染色する前記段階を前記固定化段階の後に行う、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

前記生物細胞サンプルが赤血球を含む全血を含んで成り、そしてここで段階 (b) が当該赤血球を溶解せしめて実質的に当該生物細胞サンプルから当該赤血球を除去することを更に含んで成る方法。

【請求項 10】

前記生物細胞サンプルが、全血、精製した細胞系統、腫瘍細胞、組織及び骨髓からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 11】

前記細胞サンプルがタンパク質輸送阻害物質を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

前記細胞内分子が、サイトカイン、チューブリンフィラメント、中間体フィラメント、デフェンシン、エフェクター、サイトケラチン、アクチン、B-細胞抗原レセプター複合体、増殖抗原、酵素、及びアポトーシスタンパク質からなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 13】

前記染色段階を、前記注目の細胞内分子に対して特異的なフルオロクローム標識した抗体により行う、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 14】

前記分析をフローサイトメーター上で行う請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

細胞内アッセイのための生物細胞サンプルを調製するための方法であって、当該方法は本質的に：

(a) 所定の体積の生物細胞サンプルを反応容器中へと分注し、当該細胞サンプルは注目の所定の細胞内分子を含んで成る注目の所定の細胞を含み；

(b) 前記反応容器へ、前記生物細胞サンプル内の前記注目の細胞の細胞膜の完全性を維持するため且つ前記注目の細胞内の前記注目の細胞内分子の局在化を維持するために適合せしめられた所定の体積の固定化試薬を加え；

(c) 前記反応容器内の前記固定化試薬及び前記生物細胞サンプルをインキュベートして安定化した細胞サンプルを提供し；

(d) 前記反応容器へ、前記注目の細胞内の前記注目の細胞内分子に対して特異的である所定体積の少なくとも 1 種類の細胞内プローブを加え；

(e) 前記反応容器に、前記注目の細胞の前記細胞膜を透過化するように適合せしめられた所定の体積の透過化試薬を加え；

(f) 前記安定化した生物細胞サンプルと前記細胞内プローブ及び前記透過化試薬をインキュベートして前記注目の細胞の前記細胞膜を透過化できるようにして、そして前記細胞内プローブを前記注目の細胞内の細胞内分子結合させ、そしてそれにより標識し；

(g) 前記反応容器に、前記注目の細胞を希釈するため且つ前記細胞膜の更なる透過化を

阻害するために適合せしめられた所定の体積の希釈剤を加え、それによって前記注目の細胞内の標識された細胞内分子を含む希釈されたサンプルを形成せしめ；

(h)前記希釈したサンプルを洗浄して、前記注目の標識された細胞内分子の検出に干渉する傾向がある前記サンプルの粒子を除去し、それによって、注目の細胞内の標識された細胞内分子を含む洗浄されたサンプルを提供し；そして

(i)前記洗浄したサンプルへ所定の体積の希釈剤を加えて、フローサイトメーターによる前記標識された細胞内分子の分析をするために適合せしめられた希釈剤中、再懸濁及びろ過されたサンプルを提供する、段階から成る方法。

【請求項 16】

前記洗浄段階が、前記希釈されたサンプルを、半透膜であって、前記希釈剤、並びに当該希釈されたサンプル内の全ての未結合プローブが通過するように適合せしめられた半透膜へ通す段階を含んで成る、請求項 11 に記載の方法。

【請求項 17】

前記半透過膜が、細胞サンプルがその中へと引き込まれる中空繊維の形態である、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

記反応容器へ、前記注目の細胞の表層上の分子に対して特異的である所定の体積の細胞表層プローブを少なくとも1種類加える段階を更に含んで成る、請求項 15 に記載の方法。

【請求項 19】

生物細胞サンプル内の注目の細胞に含まれた細胞内分子の分析をするための前記細胞サンプルを調製するための自動化方法であって、当該方法は、オペレーターが関与せずに以下の段階：

(a)前記所定の体積の生物細胞サンプルを反応容器中へ分注し；

(b)前記反応容器に、前記注目の細胞の細胞膜の完全性を維持するため且つ前記注目の細胞内の細胞内分子の局在化を維持するために適合せしめられた所定の体積の固定化試薬を加え；

(c)前記固定化試薬及び前記生物細胞サンプルを所定の時間に渡りインキュベートして安定化した細胞サンプルを提供し；

(d)前記反応容器へ、前記注目の細胞内の前記注目の分子に対して特異的である所定の体積の細胞内プローブを少なくとも1種類加え；

(e)前記反応容器へ、前記注目の細胞の前記透過化される細胞膜に適合せしめられた所定の体積の透過化試薬を加え；

(f)前記安定化した生物細胞サンプルと前記細胞内プローブ及び前記透過化試薬を所定の時間に渡りインキュベートして前記細胞膜を透過化し、そして前記細胞内プローブを前記注目の細胞内の細胞内分子と結合させ、そしてそれにより標識し；

(g)前記反応容器へ、注目の細胞を希釈するため且つ前記細胞膜の更なる透過化を阻害するために適合せしめられた所定の体積の希釈剤を加え、それによって注目の細胞内の前記標識された細胞内分子を含む希釈されたサンプルを形成せしめ；

(h)前記希釈したサンプルを前記希釈剤を加える所定の時間内にろ過して、当該前記注目の細胞内分子を、段階(a)～(g)を行った結果として前記細胞サンプル中に含まれた未結合プローブ及び他の干渉物質から分離し、それによって、注目の前記細胞内の標識された細胞内分子を含むろ過されたサンプルを提供し；そして

(i)前記ろ過したサンプルへ、所定の体積の希釈剤を加えて、前記細胞内分子の分析をするために適合せしめられた希釈及びろ過されたサンプルを提供する段階、を行う自動化した装置によって行われる方法。

【請求項 20】

前記生物細胞サンプルが赤血球及び白血球を含んで成り、そしてここで前記自動化方法は更に、前記ろ過段階前に前記生物細胞サンプル中の当該赤血球を溶解する段階を更に含

んで成る、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 21】

前記反応容器へ、前記注目の細胞に対して特異的である所定の体積の標識した細胞表層プローブを加える段階を更に含んで成り、当該標識した表層プローブを段階(b)の前に反応容器へ加える、請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

フローサイトメーター装置による細胞内アッセイのための生物細胞サンプルを自動的に調製するための自動化装置システムであって、当該システムは：

a)分注/インキュベート要素であって、所定体積の試薬物質をかかる物質の供給源から、細胞サンプルが入っている複数の反応容器の各々に分注し、そして当該反応容器中の細胞サンプル及び試薬物質の混合物を所定の温度及び所定の時間に渡りインキュベートして処理された細胞サンプルを提供するように選択的に操作可能な要素であって、ここで所定の注目の細胞内の所定の細胞内分子は当該フローサイトメーターによる検出のために標識されており；

b)細胞洗浄要素であって、そこに存在する処理された細胞サンプル内の注目の細胞を注目の細胞内分子のフローサイトメトリ検出を損う傾向があるだろう干渉物質及び破片から分離するために選択的に操作可能な要素；

c)反応容器輸送要素であって、反応容器の前記分注/インキュベート要素から当該細胞洗浄要素への輸送を行うために選択的に操作可能な要素；並びに

d)要素a)～c)の操作を同調させるためのロジック及びコントロール手段、
を含んで成る自動化装置システム。

【請求項 23】

細胞洗浄要素が、細胞破片及び他の干渉物質を通過しうるが注目の細胞を通過しない半透過性の壁を有する管状メンバーを含んで成る、請求項 22 に記載の装置システム。

【請求項 24】

前記細胞洗浄要素が、前記細胞サンプルを、干渉物質を伴い、前記反応容器から引き出して前記管状メンバー中へと入れる真空源を伴う分注装置を含んで成り、ここで前記注目の細胞は、当該真空源により提供された力の下で当該管状メンバーに捕捉され、その一方で、干渉物質は半透過性の壁を通過する、請求項 22 に記載の装置システム。

【請求項 25】

前記細胞洗浄要素が、希釈要素であって、前記管状メンバー中で捕捉された細胞を最初又は他の反応容器に同時に進めるため、そして当該捕捉した細胞をバッファー中で次の分析のために再懸濁するための希釈要素を含んで成る、請求項 22 に記載の装置システム。

【請求項 26】

前記分注/インキュベート要素及び前記細胞洗浄要素が共通のハウジング内部に入れられている、請求項 22 に記載の装置システム。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

PCT/US04/12761

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : G01N 33/53, 1/34 US CL : 435/7.2, 308.1; 436/63, 172, 178, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534; 422/101 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/7.2, 308.1; 436/63, 172, 178, 524, 525, 526, 527, 528, 529, 530, 531, 532, 533, 534; 422/101 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) MEDLINE, EMBASE, SCISEARCH, BIOSIS		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X,P	US 6,692,968 B2 (BURSHTEYN et al.) 17 February 2004 (17.02.2004), see entire document.	1-27
X	US 2002/0123154 A1 (BURSHTEYN et al.) 05 September 2002 (05.09.2002), see entire document.	1-27
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents:		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention	
"E" earlier application or patent published on or after the international filing date	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone	
"I" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 10 November 2005 (10.11.2005)		Date of mailing of the international search report 05 DEC 2005
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (571) 273-3201		Authorized officer Gail R. Gabel Telephone No. (571) 272-1600

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, 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 100117019
弁理士 渡辺 陽一

(74)代理人 100082898
弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ルビオ, オイルダ
アメリカ合衆国, フロリダ 33175, マイアミ, サウスウエスト 18 ストリート 137
10

(72)発明者 アパリシオ, カルロス
アメリカ合衆国, フロリダ 33186, マイアミ, サウスウエスト 141 アベニュー 109
40

(72)発明者 マプレス, ジョン エー.
アメリカ合衆国, フロリダ 33138, マイアミ, ノースイースト 91 テラス 958

(72)発明者 ウィルキンソン, ジュリー
アメリカ合衆国, フロリダ 33326, フォート ローダーデール, ホワイトヘッド サークル
49

(72)発明者 スミス, セシリア
アメリカ合衆国, フロリダ 33196, マイアミ, サウスウエスト 147 プレイス 110
22

(72)発明者 ルーカス, フランク ジェイ.
アメリカ合衆国, フロリダ 33432, ボカ ラトン, ベセル ブールバード 2143

Fターム(参考) 2G045 BA01 BB04 BB10 BB25 BB39 BB41 BB50 CA25 CB01 DA36
FA37 FB07
2G052 AA30 AA33 AD29 CA03 EA03 EB12 ED17 FC02 FC12 FD01
GA12 GA30 JA06
4B063 QA05 QA19 QQ03 QQ96 QR48 QR56 QR66 QS03 QS12 QS39
QX02