

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2009-186459

(P2009-186459A)

(43) 公開日 平成21年8月20日(2009.8.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N 21/64 F	2 GO 4 3
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 4 1 A	
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
	GO 1 N 33/53 Y	

審査請求 未請求 請求項の数 22 O L 外国語出願 (全 25 頁)

(21) 出願番号 特願2009-853 (P2009-853)
 (22) 出願日 平成21年1月6日(2009.1.6)
 (31) 優先権主張番号 61/010, 686
 (32) 優先日 平成20年1月10日(2008.1.10)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 595117091
 ベクトン・ディキンソン・アンド・カンパニー
 BECTON, DICKINSON AND COMPANY
 アメリカ合衆国 ニュー・ジャージー O
 7417-1880 フランクリン・レイクス
 ベクトン・ドライブ 1
 1 BECTON DRIVE, FRANKLIN LAKES, NEW JERSEY O7417-1880, UNITED STATES OF AMERICA

(74) 代理人 100077481
 弁理士 谷 義一

最終頁に続く

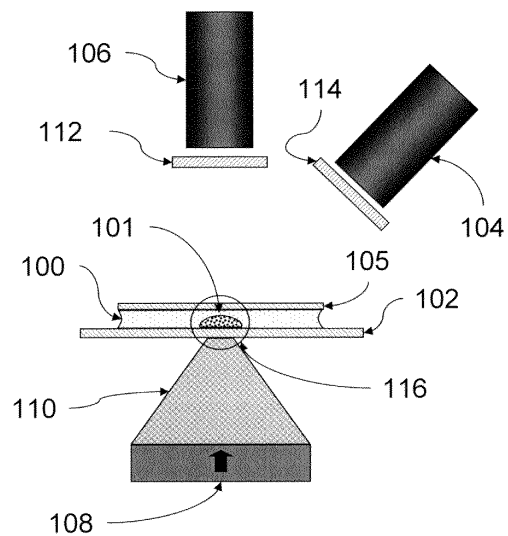
(54) 【発明の名称】 高速な粒子検出分析

(57) 【要約】

【課題】 流体試料内の分析物を検出および/または定量化するための機器と方法を提供する。

【解決手段】 流体試料は、小さくて狭い検出領域を有する試料室内に置かれる。分析物は、結合試薬で被覆された磁性粒子を用いて磁氣的に標識化され、蛍光染料または他の検出試薬を用いて検出可能なように標識化される。磁氣的に標識化された分析物は、試料室の検出領域の下に配置された集束性磁石を用いて検出領域に濃縮される。濃縮された分析物は、試料室の検出領域の最上部に置かれた、検出領域だけを照射する励起光学系と、検出領域の上部に置かれ、検出領域から放出される光だけを検出する検出光学系を用いて測定される。好適なる実施形態では、本発明は、全血液試料中のCD4⁺T細胞の濃度を測定するための、簡単で迅速な分析を提供する。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

流体試料に含まれる分析物の分析をするための光学機器であって、

約 100 μ l 未満の体積を有する試料室、および、約 100 μ m 未満の垂直深さを有する検出領域を備える試料ホルダであって、前記試料室の前記検出領域上の最上面が、光学的に透明である試料ホルダと、

傾斜した磁極片を有する集束性磁石であって、前記磁極片は、約 100 μ m 未満にまで傾斜し、前記集束性磁石は、前記試料室の前記検出領域の下に配置されている集束性磁石と、

前記試料室の前記検出領域上の前記光学的に透明な最上面を通して、前記検出領域を照射する励起光源と、

前記検出領域から、前記試料室の前記検出領域上の前記光学的に透明な最上面を通過して放出された光を検出し、検出された光の量に対応する信号を発生する検出光学系とを備えたことを特徴とする光学機器。

【請求項 2】

前記集束性磁石は、永久磁石と、軟磁性材料で出来た円錐または円錐台を備えることを特徴とする請求項 1 に記載の光学機器。

【請求項 3】

前記検出領域内の試料室の深さは、検出領域外の試料室の深さよりも小さいことを特徴とする請求項 1 に記載の光学機器。

【請求項 4】

前記試料室の前記最上面は、前記検出領域内の前記試料室の深さが、前記検出領域の外部の試料室の深さよりも小さくなるように、前記検出領域上に窪みを有することを特徴とする請求項 1 に記載の光学機器。

【請求項 5】

前記検出光学系は、前記検出領域から前記試料室の前記検出領域上の前記光学的に透明な最上面を通過して放出された光を検出するフォトダイオードを含むことを特徴とする請求項 1 に記載の光学機器。

【請求項 6】

前記検出領域の外部の試料室から放出された光が、前記検出光学系に入るのを遮断するために、前記試料室と前記検出光学系との間に置かれる開口を更に備えることを特徴とする請求項 1 に記載の光学機器。

【請求項 7】

前記試料室は、前記試料室内に導入された試料の流れを方向付けるように隔壁を更に備えることを特徴とする請求項 1 に記載の光学機器。

【請求項 8】

前記試料室は、検出用流体の液滴を更に備え、前記検出用流体は、光学的に透明であり、前記流体試料内で不溶であり、前記液滴は、前記検出領域内に位置づけられることを特徴とする請求項 1 に記載の光学機器。

【請求項 9】

前記試料室は、検出用流体の液滴を更に備え、前記検出用流体は、光学的に透明であり、前記流体試料内で不溶であり、前記液滴は、前記検出領域内に位置づけられることを特徴とする請求項 3 に記載の光学機器。

【請求項 10】

流体試料中に含まれる分析物の量を分析するための均質法であって、

(a) 前記流体試料を磁氣的捕捉試薬と光学的に検出可能な検出試薬とに接触させるステップであって、前記磁氣的捕捉試薬は、少なくとも 1 つの、分析物に特有の結合試薬に結合した磁性粒子からなり、前記磁氣的捕捉試薬と前記検出試薬とを前記流体試料内に存在する分析物に結合させることによって磁性複合物が形成されるようにするステップと、

(b) 前記試料を試料室に添加するステップであって、前記試料室は、約 100 μ l 未

10

20

30

40

50

満の体積を有し、約100 μ m未満の垂直深さを有する検出領域を備え、前記試料室の前記検出領域上の最上面は、光学的に透明であるステップと、

(c) 磁性複合物が前記検出領域内の小球に濃縮されるように、傾斜した磁極片を有し、前記磁極片が、約100 μ m未満になるまで傾斜している集束性磁石を、前記試料室の前記検出領域の下に配置するステップと、

(d) 前記試料室の前記検出領域上の前記光学的に透明な最上面を通して前記検出領域を照射するように、前記磁性複合物を励起光源からの励起光に晒すステップと、

(e) 前記試料室の前記検出領域上の前記光学的に透明な最上面を通して前記検出領域から放出される光を測定するステップと、

(f) 前記検出領域から放出され、測定された光から前記試料内に含まれる分析物の量を決定するステップと

を備え、前記流体試料は、ステップ(b)以後は試料室から取り除かれないことを特徴とする方法。

【請求項11】

前記ステップ(f)は、前記検出領域から放出される光と複数の校正用測定結果とを比較するステップを備え、前記校正用測定結果は、複数の校正用試料を用いて前記ステップ(a)から前記ステップ(e)までを実行することによって得られ、各校正用試料は、既知の量の分析物に対応して放出される光の複数の校正用測定結果を得るために、既知の量の分析物を含むことを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項12】

前記磁氣的捕捉試薬は、少なくとも1つの、分析物に特有の結合試薬、すなわち抗体に結合した磁性粒子から成ることを特徴とする請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記光学的に検出可能な検出試薬は、蛍光染料に結合した分析物に特有の抗体から成ることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記光学的に検出可能な検出試薬は、前記分析物に結合する蛍光染料から成ることを特徴とする請求項12に記載の方法。

【請求項15】

流体試料内の前記分析物は、生物学的流体の試料内の免疫細胞であることを特徴とする請求項10に記載の方法。

【請求項16】

全血液から導出された流体試料内に含まれるCD4⁺T細胞の量を分析する方法であって、

(a) 前記流体試料を磁氣的捕捉試薬と光学的に検出可能な検出試薬とに接触させるステップであって、前記磁氣的捕捉試薬は、CD4⁺T細胞の表面上に存在する分子に結合する少なくとも1つの結合試薬に結合した磁性粒子から成り、前記磁氣的捕捉試薬をCD4⁺T細胞の表面上に存在する前記分子に結合させ、前記検出試薬を前記CD4⁺T細胞に結合させることによって磁性複合物が形成されるステップと、

(b) 前記試料を試料室に添加するステップであって、前記試料室は、約100 μ m未満の体積を有し、約100 μ m未満の垂直深さを有する検出領域を備え、前記試料室の前記検出領域上の最上面は、光学的に透明であるステップと、

(c) 磁性複合物が前記検出領域内に濃縮されるように、傾斜した磁極片を有し、前記磁極片が、約100 μ m未満になるまで傾斜している集束性磁石を、前記試料室の前記検出領域の下に配置するステップと、

(d) 前記試料室の前記検出領域上の前記光学的に透明な最上面を通して前記検出領域を照射するように、前記磁性複合物を励起光源からの励起光に晒すステップと、

(e) 前記試料室の前記検出領域上の前記光学的に透明な最上面を通して前記検出領域から放出される光を測定するステップと、

(f) 前記検出領域から放出され、測定された光から前記試料内に含まれる分析物の量

10

20

30

40

50

を決定するステップと

を備え、前記流体試料は、ステップ (b) 以後は試料室から取り除かれないことを特徴とする方法。

【請求項 17】

前記ステップ (f) は、前記検出領域から放出される光と複数の校正用測定結果とを比較するステップを備え、前記校正用測定結果は、複数の校正用試料を用いて前記ステップ (a) から前記ステップ (e) までを実行することによって得られ、各校正用試料は、既知の量の CD 4⁺T 細胞に対応して放出される光の複数の校正用測定結果を得るために、既知の量の CD 4⁺T 細胞を含むことを特徴とする請求項 10 に記載の方法。

【請求項 18】

前記磁氣的捕捉試薬は、少なくとも 1 つの、分析物に特有の結合試薬、すなわち抗体に結合した磁性粒子から成ることを特徴とする請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記光学的に検出可能な検出試薬は、蛍光染料に結合した分析物に特有の抗体から成ることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記光学的に検出可能な検出試薬は、前記分析物に結合する蛍光染料から成ることを特徴とする請求項 18 に記載の方法。

【請求項 21】

前記磁氣的捕捉試薬は、CD 3 の CD 4 に特有の抗体に結合した磁性粒子から成ることを特徴とする請求項 19 に記載の方法。

【請求項 22】

前記試料室は、検出用流体の液滴を更に備え、前記検出用流体は、光学的に透明であり、前記流体試料内で不溶であり、前記液滴は、磁性複合物が前記検出領域内の前記検出用流体に濃縮されるように、前記検出領域内に位置づけられることを特徴とする請求項 1 に記載の機器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、一般的には、光検出方法、免疫学、および細胞生物学の分野に関し、より具体的には、免疫機構の状態を評価する方法に関し、更により具体的には、通常は HIV 感染者に実施される CD 4⁺T 細胞を測定する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

CD 4⁺T リンパ球 (CD 4⁺T 細胞) に関する正確で信頼性の高い測定結果を得ることは、ヒト免疫不全ウイルス (HIV) に感染している人の免疫機構を評価し、健康を管理するために必要不可欠である。後天性免疫不全症候群 (AIDS) の発症 (pathogenesis) は、主に CD 4⁺T 細胞の減少に起因し、CD 4⁺T 細胞の段階的な欠乏は、好ましくない予後 (prognosis) を示す。

【0003】

HIV に感染した大人と青年に於いては、血液の単位体積当たりの CD 4⁺T 細胞の数 (測定された量は濃度であると理解して、CD 4⁺T 細胞カウントまたは単に CD 4⁺ カウントと呼ばれる。) の測定値は、病の進行の尺度として用いられ、抗レトロウイルス療法を開始し監視するための判断点を確立するために用いられる。感染した患者における CD 4⁺T 細胞カウントは、HIV 感染が進行するとともに減少し、CD 4⁺T 細胞カウントが低い患者は、カウントが高い患者よりも予後が不良である。

【0004】

CD 4⁺T 細胞を測定するために、多くの異なる技術が用いられてきた。CD 4⁺T 細胞を測定するために最も広く用いられる分析法は、フローサイトメトリー (flow cytometry) に基づくものである。試料中の対象の細胞、例えば CD 4⁺T 細胞は、その結合表現が

10

20

30

40

50

対象の細胞を同定することを特徴とする特有の細胞抗原に結合する抗体であって、蛍光を発して標識化される抗体で標識化されている。細胞は、流体の流れの中で本質的に1つずつ検出領域を通過し、そこで細胞に結合したすべての蛍光標識が、光学的に検出される。対象の細胞は、その結合表現が対象の細胞を同定することを特徴とする細胞抗原に結合した蛍光標識を結合検出することによって同定され、カウントされる。CD4⁺T細胞を測定するのに適した試薬とフローサイトメータ (flow cytometer) は、例えば、BDバイオサイエンス (Biosciences) 社 (サンノゼ、カリフォルニア) から市販入手可能である。

【0005】

蛍光顕微鏡法を用いて試料中のCD4⁺T細胞の数をカウントする方法を説明してきた。磁気的分離は、分析の前に細胞をその場所へ動かすために用いられてきた。例えば、非特許文献1は、CD4⁺T細胞を、試料室 (sample chamber) の上部にある検出領域に磁気的に分離し、該領域を、該領域の画像を得るために光学的に走査し、個々の細胞を、画像処理演算法を用いて同定し、走査された領域内のCD4⁺T細胞の数をカウントするような方法を開示している。試料を走査することが必要なために、機器が複雑になり、コストが増す。対象の細胞を同定してカウントすることに基づく分析法は、個々の細胞を正確に同定する画像処理能力に依存し、該領域内の細胞の密度に敏感である。

10

【0006】

磁気的な免疫検査法を説明してきたが、この方法では、試料溶液からの分析物の磁気的分離を可能にするため、対象の分析物に磁気的に標識を付けるために、磁性粒子に抱合した分析物に特有の抗体を用いる。通常は、磁気的に標識化された分析物が、試料室の側面または底面に対して濃縮されたあとに、試料流体が取り除かれる。そのような検査法は、捕捉した分析物を試料流体から分離するための試料操作の流体機構を必要とし、必然的に多段階工程となる。

20

【0007】

特許文献1は、磁気的免疫検査法を開示している。この方法では、標識化された対象分析物は、試料流体から磁気的に分離され、光学的分析のために試料室から検出領域に移動される。試料は、磁気的捕捉試薬と標識とを含む試料室に加えられ、試料中の対象の分析物は、磁気的捕捉試薬と標識とで複合物を形成する。電位が複合物に印加されて、複合物を検出領域へ輸送し、検出領域内で複合物の存在が決定される。

30

【0008】

特許文献2、3、4、および5は、食物試料内の病原性細菌を試料容器の側面上に磁気的に濃縮させ、該試料容器の側面を通して濃縮された細胞を光学的に検出するための磁気的収束免疫センサを開示している。該磁気的収束免疫センサは、収束用磁石と、磁石の側面に付けて励起光と検出光を通過させるためのファイバ光学系とを備える。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0009】

【特許文献1】米国特許第5,945,281号明細書

【特許文献2】米国特許第6,858,440号明細書

【特許文献3】米国特許第6,645,777号明細書

【特許文献4】米国特許第6,630,355号明細書

【特許文献5】米国特許第6,254,830号明細書

【特許文献6】米国特許第4,883,867号明細書

【特許文献7】米国特許第4,957,870号明細書

【特許文献8】米国特許第5,656,449号明細書

【特許文献9】米国特許第6,468,753号明細書

【特許文献10】米国特許第5,436,134号明細書

【特許文献11】米国特許第5,534,416号明細書

【非特許文献】

40

50

【 0 0 1 0 】

【非特許文献1】Tibbe et al., 2001, Cytometry 43:31-37

【非特許文献2】Pawley(ed), Handbook of Biological Confocal Microscopy, 2nd Edition, Plenum Press(1989) (1989年)

【非特許文献3】Murphy, 2001, "Fundamentals of Light Microscopy and Electronic Imaging", Wiley-Liss, Inc. New York, NY

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 1 】

本発明は、流体試料内の分析物を検出および/または定量化するための機器と方法を提供する。 10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 2 】

本発明は、流体試料内の対象の分析物を分析するための光学機器と方法を提供する。該機器は、試料を光学的に走査する必要なく、試料内の分析物の全量の測定を可能にする。該分析法は、流体試料が、分析中に試料室(sample chamber)から取り除かれることはない「均質(homogeneous)」様式で実行される。本発明は、簡便性と経費における大きな優位性を提供し、CD4⁺T細胞の測定のような応用において特に便利であろう。

【 0 0 1 3 】

流体試料の分析は、試料流体から生じる背景信号を最小にするような形状を持つ試料室で行われ、試料流体は検査中は試料室から取り除く必要はない。該試料室は、大き目の試料室内の小さな検出領域を含み、該検出領域は、好適には約100μm未満の、更に好適には約50μm未満、およびなお更に好適には約30μm未満の垂直深さをもつ。検出領域の上の試料室の上面は、光学的に透明である。試料室の体積は、好適には約100μl未満の、更に好適には約75μl未満、およびなお更に好適には約50μl未満である。試料室は、好適には狭く、平坦な試料室であり、更に好適にはほぼ円盤の形状を持ち、検出領域の上の垂直深さを低減するために最上面に窪み(depression)を有する。 20

【 0 0 1 4 】

試料室は、ガラスまたはプラスチックのような適当な任意の材料から作ることが出来る。好適なる実施形態では、試料室は、ポリスチレンのようなプラスチックで出来ていて、光検出を可能にするために透明な(光学的に透明な)最上面をもち、周囲光または散乱光が検出光と干渉するのを抑えるために黒色の側面と底面を有する。 30

【 0 0 1 5 】

機器は、試料室が機器内に置かれたときに試料室内の検出領域の下および近傍になるように配置された集束性磁石を備える。集束性磁石は、垂直の方向に磁化されていて、好適には円錐または錐台であって、尖端で約100μm未満に、更に好適には約50μm未満に、および更に好適には約30μm未満になるまで傾斜した、傾斜した磁極片(tapered pole piece)を含む。好適なる実施形態では、集束性磁石の磁極片は円錐である。磁極片は、磁石に集積化された1部であってもよく、または、磁石と接触している、軟磁性材料から出来た別の片であってもよい。 40

【 0 0 1 6 】

機器は、検出領域を照射するように設計された励起光学系(excitation optics)と、検出領域から放出される光を測定するように設計された検出光学系(detection optics)とを更に備える。励起光学系と検出光学系とは、試料室の上であって、集束性磁石から見て試料室の反対側に配置される。励起光学系と検出光学系を集束性磁石の反対側に配置することは、磁石をその場に置いたまま、分析物を、磁石の尖端に束縛したまま、磁石そのものとの干渉なしに、磁氣的に濃縮された分析物の様な照射と、分析物から放出される光の様な検出を可能にする。好適なる実施形態では、励起光を提供するためにレーザが用いられ、放出される光を計測するためにフォトダイオードが用いられる。

【 0 0 1 7 】

本発明の方法は、磁氣的に標識化された分析物を得るために、対象の分析物を含む試料を、対象の分析物に特有の結合試薬に抱合した磁性粒子から成る捕捉試薬と接触させるステップを備える。試薬によって標識化された分析物は、光検出を可能にするために、蛍光染料のような検出試薬で更に標識化される。試料は、捕捉と検出用の試薬に晒される前に、または後に、試料室に添加される。1つの実施形態では、捕捉試薬および/または検出試薬は、試料添加のときには液体または乾燥形状で、試料室に存在する。捕捉試薬と検出試薬と混合した試料を含む試料室は、機器の中に配置され、磁氣的に標識化された分析物は、試料室の真下に配置された集束性磁石を用いて、試料容器内の検出領域に磁氣的に濃縮される。試料流体から分析物を更に分離することなく（例えば、試料流体を吸引することなく、または濃縮された試料を洗浄することなく）、次に、検出領域内に存在する標識化された分析物の量が、標識化された分析物を励起光学系を用いて照射し、標識化された分析物から放出される光を検出光学系を用いて測定することによって光学的に分析される。検出光学系は、1回の測定として、検出領域上を光学的に走査することなく、検出領域から放出される光を測定する。

10

20

30

40

50

【0018】

本発明の好適なる実施形態では、捕捉試薬は、磁性粒子に付着した結合試薬から成り、捕捉試薬は、対象の分析物または分析物の成分に特有の抗体（"捕捉抗体"）であることを特徴とする。検出試薬は、対象の分析物または分析物の異なる成分上の異なる抗原決定基に特有の抗体（「検出器抗体」）から成り、蛍光染料に結合しているのが好適である。捕捉抗体で被覆された磁性粒子および染料で標識化された検出器抗体は、試料に添加される。対象の分析物が存在するときは、分析物を捕捉抗体と検出器抗体とに結合することによって磁性複合物（magnetic complex）が形成される。磁性複合物は、集束性磁石の磁極に引き付けられて、これにより検出領域において濃縮される。

【0019】

好適なる実施形態では、対象の分析物は、全血液試料内の1つ以上の細胞表面分子または抗原の表現パターンによって定義される1つの細胞タイプである免疫機構細胞のような、身体の流体からの細胞であろう。細胞の磁氣的捕捉と濃縮は、細胞表面分子のような細胞の特定の成分に結合する、磁性粒子に結合した捕捉試薬を用いて行われる。捕捉された細胞の検出は、細胞表面または細胞内の分子のような他の細胞の成分と結合する検出試薬を用いて行われる。

【0020】

磁性粒子に結合した捕捉試薬は、好適には、対象の細胞タイプの細胞上に表現された抗原に特有の抗体である。細胞表面の抗原は、通常は高いコピー数で表現され、細胞は、多数の抗体によって被覆された磁性粒子に同時に結合しうる。磁界に晒される細胞に作用する力は、結合した磁性粒子のそれぞれに働く力の累積であり、細胞を検出領域に濃縮させるのに十分強い力である。

【0021】

いくつかの実施形態では、例えば、特定の細胞表面の抗原に対する抗体のような、単一種の捕捉試薬が用いられる。他の実施形態では、各細胞に結合した磁性粒子の数を増加させるために、および、濃縮ステップの間に細胞に働く累積の磁氣力を増加させるために、それぞれが対象の細胞によって表現される異なる細胞表面の抗原に特有の複数種の捕捉試薬を用いることが出来る。

【0022】

対象の細胞タイプの細胞は、磁氣的濃縮の前あるいは後に、光学的検出を可能にするための検出試薬で標識化される。標識は、任意の適当な結合試薬を用いて細胞に間接的に結合することが出来、または、細胞に直接的に結合することも出来る。好適なる実施形態では、検出試薬は、対象の細胞タイプの細胞上に表現された抗原に特有の抗体であり、蛍光染料に抱合されている。代替としては、膜特有の染料または核酸に結合した染料のような、細胞表面または細胞内の成分と結合する蛍光染料を用いてもよい。

【0023】

捕捉試薬と検出器試薬が抗体である実施形態では、捕捉抗体と検出器抗体とは、捕捉抗体と検出器抗体との両方の同時結合が対象の細胞を同定するように選択される。そのような抗体は、ここでは、細胞の部分集合を規定する抗体と呼ばれる。特定の抗体の対は、試料内に存在する可能性の高い他の細胞に照らして選択すべきである。例えば、CD4⁺T細胞が分析対象であるならば、抗体の対は、単核細胞、顆粒細胞、B細胞、NK細胞その他のような他の血液細胞をも含む試料中でこれらの細胞を同定すべきである。

【0024】

好適なる実施形態では、本発明は、患者の血液試料内のCD4⁺T細胞を定量化するための機器と方法とを提供する。該方法は、全血液試料において、または、末梢血単核球細胞(PBMC)の試料のような全血液から導出された細胞の試料中で行うことができる。捕捉抗体と検出器抗体は、捕捉抗体と検出器抗体の両方の同時結合がCD4⁺T細胞を同定するように選択される。つなぎ合わせの結合がCD4/CD3またはCD4/CD45のようなCD4⁺T細胞を同定するのに十分である抗体対は、よく知られており、文献中で記述されてきた。対のどちらかの抗体は、細胞の捕捉のために用いることが出来、他方は、検出器として用いられる。だが、全体の検査特性は2つの配置のうち的一方を用いることでより良くなるであろう。好適なる対の構成は、決まりきった実験作業を用いて決めることができる。

10

【0025】

好適なる実施形態では、捕捉抗体と検出抗体はCD3とCD4特有の抗体の対から選択され、1つが捕捉試薬として用いられ、他方が検出試薬として用いられる。例えば、細胞は、CD4抗体を用いて捕捉され、CD3抗体で標識化されてもよい。

20

【0026】

他の実施形態では、CD4特有の捕捉抗体は、細胞を磁氣的に標識化するために用いられ、DNAに結合する染料のような、細胞構造に結合する蛍光染料は、光検出のために細胞を標識化するために用いられる。本実施形態の検査法の特徴は、捕捉試薬の特性に全面的に依存する。検出試薬は、捕捉されたもの、されないものを含め全ての細胞に結合する。特に、これも程度は低いCD4を表現する単核細胞が、捕捉され、CD4⁺T細胞と一緒に濃縮され、また、検知可能なように標識化され、測定される全蛍光に影響を及ぼすであろう。本実施形態では、単核細胞を選択的に取り除くために、たとえば、CD14抗体が被覆された磁性粒子を用いることによって、検査を実行する前に試料を前処理することが有利である。血液試料から単核細胞を磁氣的に欠乏化させる試薬は、例えば、BDバイオサイエンス(Biosciences)社(サンノゼ、カリフォルニア)から市販入手可能である。

30

【0027】

本発明の機器の特徴の組み合わせは、いくつかの優位性を提供する。本発明の検査法は、磁氣的濃縮の後で試料を洗浄することなしに、または試料流体から濃縮された分析物を他の方法で分離することなしに実行される。集束性磁石を用いることは、分析物を十分に濃縮可能であるので、分析物の量は、試料を光学的に走査することなしに検出可能である。励起光学系と検出光学系を集束性磁石から見て試料室の反対側に配置することは、集束性磁石との物理的な干渉なしに、マイクロ・リットル程度の試料における光検出を、可能にする。一方、試料室の設計は、励起光と検出光の光路内の試料流体の量を最小にし、これによって、光路内に試料流体が存在することによって引き起こされる背景信号を低減する。

40

【図面の簡単な説明】

【0028】

【図1】本発明の機器の実施形態を示す図である。

【図2】本発明の機器の代替の実施形態を示す図である。

【図3a】本発明の試料室の実施形態の断面図を示す。

【図3b】本発明の試料室の実施形態の上面図を示す。

【図4】本発明の試料室の代替の実施形態の断面図を示す。

50

【図 5 a】試料室を圧縮する前の、本発明の試料室の代替の実施形態の断面図を示す。

【図 5 b】試料室を圧縮した後の、本発明の試料室の代替の実施形態の断面図を示す。

【図 6】本発明の試料室の 2 室構成の実施形態の上面図を示す。

【図 7 a】本方法に用いられる、本発明の試料室の 2 室構成の実施形態の上斜視図を示す

。

【図 7 b】本方法に用いられる、本発明の試料室の 2 室構成の実施形態の上斜視図を示す

。

【図 8】本発明の試料室の代替の実施形態の断面図を示す。

【図 9 a】本発明の試料室の代替の実施形態の断面図を示す。

【図 9 b】本発明の試料室の代替の実施形態の上面図を示す。

10

【図 10 a】本発明の試料室の代替の実施形態の断面図を示す。

【図 10 b】本発明の試料室の代替の実施形態の上面図を示す。

【図 11】例 1 に記述したような、本発明の機器の代替の実施形態を示す図である。

【図 12】例 1 に記した検査法の結果を示す図である。

【図 13】例 2 に記した検査法の結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0029】

機器と試料室の要素を示す図は、これら要素の該略図を描くものであって、寸法の通りには描かれてはいない。

【0030】

20

ここに記述される本発明が完全に理解されるように、以下に多くの用語を明瞭に定義する。その他の用語も、顕微鏡法、サイトメトリ、免疫学、および HIV 生物学の分野での通常の意味を有する。蛍光撮像顕微鏡法は、例えば、非特許文献 2 および 3 に記載されている。

【0031】

「全血液 (whole blood)」という用語は、抗凝血剤の存在のもとに哺乳類から引き抜かれ、その後は実質的に分留されていない流体血液試料を意味する。

【0032】

「分析物 (analyte)」という用語は、分析、検出、測定、または標識化されるべき任意の物質を指すためにここでは広く用いられる。分析物の例は、蛋白質、ペプチド、ホルモン (刺激素)、ハプテン、抗原、抗体、受容体、酵素、核酸、多糖類、化学薬品、高分子、病原体、毒素、有機薬剤、無機薬剤、細胞、体内組織、微生物、ウイルス、細菌、菌、藻、寄生虫、アレルギー抗体、公害物質、およびその組み合わせを含むが、これに限定されるものではない。慣例により、所与の細胞タイプの細胞が分析対象の場合は、細胞の成分分子または細胞そのものが分析物として記述される。

30

【0033】

好適な実施形態では、対象の分析物は、CD4⁺T 細胞のような、全血液の試料内の免疫機構の細胞であろう。細胞の捕捉は、細胞表面分子のような細胞の特定の成分に結合する捕捉試薬を用いて行われ、捕捉された細胞の検出は、細胞表面または細胞内部の分子のような他の細胞成分と結合する検出試薬を用いて可能になり、細胞成分および細胞そのものどちらも分析物として記述されうると理解されよう。

40

【0034】

「分析物特有の試薬 (analyte-specific reagent)」または「対象特有の試薬 (target-specific reagent)」は、試料中に存在する可能性のある他の分析物に比べて、対象の分析物または興味の対象物に選り好みして結合することを特徴とする、広く任意の試薬に拡大される。対象物 (分析物) と対象物特有の (分析物特有の) 試薬とは、結合対のメンバーであり、対のメンバーの片方が、対の他方のメンバーに選択的に結合するために、対象物特有の試薬として用いることが出来る。対象物と対象物特有の試薬の対の例は、抗原と抗原特有の抗体、ホルモンとホルモン受容体、ハプテンとアンチ・ハプテン、ビオチンとアビジンまたはストレプトアビジン、酵素と酵素補助因子、レクチン (植物性凝集素)

50

と特有の炭水化物、および一連の相補核酸を含むがこれらに限定されるものではない。好適なる対象物特有の試薬は、特に抗原と結合する（免疫反応する）抗原結合サイトを含む抗体である。

【0035】

「抗体（antibody）」は、抗体または抗体遺伝子から導出された、または導出できる全ての生成物を含み、ここで記述する細胞計測法における対象物特有の結合試薬として有用である。このように、「抗体」は、なかんずく、自然の抗体、抗体断片、抗体誘導体、および遺伝子工学で作られた抗体、抗体断片、および抗体誘導体を含む。

【0036】

「細胞の部分集合を規定する抗体（cell subset-defining antibody）」は、細胞の特定の部分集合の同定を可能にするために、単独で、または他の抗体と組み合わせて用いられる任意の抗体を指して、このように部分集合の細胞によって表示される抗原決定基に特有である抗体を含む。通常は、細胞の部分集合は、細胞によって表現される特定のマーカの存在および/または特定のマーカの不在によって同定出来る。「不在（absence）」は、細胞計測の検査のような免疫検査において測定されるように、背景との差が顕著ではないことのような表現のレベルを表すものと意図されている。

10

【0037】

「磁性粒子（magnetic particles）」は、磁性材料すなわち磁気的に応答する材料を含む任意の粒子を指している。磁性粒子は任意の形状を持つことが出来るが、典型的には、ほぼ球形（微小球）である。本発明に用いるのに適した磁性粒子は、好適には、ナノメートルからマイクロメートル領域の直径、典型的には0.01から50 μmの直径、好適には約0.1から10 μmの直径、より好適には約0.2から0.4 μmの直径を持つ。磁性粒子は常磁性または超常磁性であるのが好適である。本発明に用いるのに適した磁性粒子は、BDバイオサイエンス（Biosciences）社（サンノゼ、カリフォルニア）、インヴィトロゲン（Invitrogen）（カールスバッド（Carlsbad）、カリフォルニア）、ミルテニ・バイオテック（Miltenyi Biotech）（ベルギッシュ グラードバッハ（Bergisch Gladbach）、ドイツ）、およびポリサイエンス（Polysciences）（ワリントン（Warrington）、ペンシルバニア）を含むがこれに限定されることはない数社から市販されている。

20

【0038】

磁気的捕捉試薬（Magnet capture reagent）

磁気的捕捉試薬は、1つ以上の対象物特有の試薬に結合した磁性粒子である。好適なる対象物特有の試薬は、抗体である。CD4またはCD3のような色々な細胞表面分子に特有の抗体で被覆された磁性粒子は、BDバイオサイエンス（Biosciences）社（サンノゼ、カリフォルニア）、インヴィトロゲン（Invitrogen）（カールスバッド（Carlsbad）、カリフォルニア）、およびミルテニ・バイオテック（Miltenyi Biotech）（ベルギッシュ グラードバッハ（Bergisch Gladbach）、ドイツ）を含むがこれに限定されることのない数社から市販されている。一般に、細胞分離分析に用いるために販売されている、抗体で被覆された磁性粒子は、本発明に用いるのに適している。

30

40

【0039】

検出試薬（detection reagent）

検出試薬は、磁気的に濃縮された分析物の光検出を可能とするために用いられる。多くの実施形態では、検出試薬は、蛍光染料をふくむか、または、蛍光染料である。一般に、本発明に用いるのに適した蛍光染料（発蛍光団）は、画像応用分野に適用されている多くの染料の中の任意のものから選択できる。しかしながら、本発明は、蛍光染料を用いることに限定されるものではなく、対象の分析物に結合して光検出を可能にする、表面増強ラマン散乱（SERS）法によって検出可能なナノ粒子のような、蛍光顕微鏡法に便利な任意の検出試薬を用いてもよい。

【0040】

50

検出試薬は、蛍光染料または染料を含む粒子のような、検出可能な標識で標識化された分析物特有の試薬を含んでもよい。蛍光染料は当業者にはよく知られており、数社から市販されている。適当な蛍光染料は、紅藻素(PE)、蛍光イソチオシアネート(FITC)、アロフィコシアニン(APC)、テキサス・レッド(TR、モレキュラー・プローブ社(Molecular Probes Inc))、ペリジニン葉緑素複合物(PerCp)、CY5(バイオロジカル・デテクション・システム(Biological Detection System))とそのPEと結合した抱合体(たとえば、PE/CY5、PE/APCおよびPE/TR)などを含むがこれらに限定されることはない。大多数の染料は、例えば、モレキュラー・プローブ社(Molecular Probes Inc)(ユージン、オレゴン)およびエキシトン(デイトン、オハイオ)のような色々な発売元から市販されている。

10

【0041】

分析物特有の試薬が抗体である場合は、抗体は、蛍光標識に直接抱合してもよいし、または二次抗体(例えば、蛍光標識に直接抱合するヤギ抗マウス抗体)を用いて、または抗体を結合対の片方(例えば、ビオチン)に抱合して結合対の他方(例えば、アビジン、またはストレプトアビジン)に抱合した染料を用いて間接的に標識化しても良い。しかしながら、多くの実施形態では、直接抱合が好適である。本発明に用いるのに適した、広い範囲の色々な蛍光体で標識化された抗体は、例えば、BDバイオサイエンス(Biosciences)社(サンノゼ、カリフォルニア)から市販されている。

【0042】

代替としては、細胞の検出に特有であるが、検出試薬は、細胞表面上にあるか、または細胞内にある細胞成分に結合する蛍光性の化合物から出来ていてもよい。好適なる実施形態では、検出試薬は、細胞膜の壁を浸透して細胞内分子に結合することが出来る蛍光性化合物である「浸透性の染料」である。浸透性の染料は、蛍光性の核酸結合化合物であるのが好適である。

20

【0043】

浸透性の染料は、当業者にはよく知られている。好適なる浸透性の染料は、核酸と結合すると蛍光の増大を呈するような、浸透性で蛍光性の核酸結合化合物であり、例えば、モレキュラー・プローブ社(Molecular Probes Inc)(ユージン、オレゴン)から入手可能である(特許文献6,7,8に記されているもののような)チアゾールオレンジとその類似体、(特許文献9に記載されているDRAQ5(商標)などのような)アントラキノンとその誘導体、および(特許文献10,11に記されている)SYTO(登録商標)染料のようなものである。他の、有用な浸透性の染料は、4',6-ジアミジノ-2-フェニリンドール(DAPI)とホエクスト染色である。

30

【0044】

集束性磁石(focusing magnet)

磁性粒子の磁氣的濃縮は、磁束を集束するための傾斜した磁極片をもつ集束性磁石を用いて行われる。傾斜した磁極片は、円錐または錐台形状であるのが好適である。集束性磁石は、永久磁石、典型的には(例えば、ネオジウム、またはサマリウム・コバルトのような)希土類磁石から成るのが好適である。該永久磁石は、上面と底面に垂直な残留磁化を有し、円錐または錐台形状であり、例えば鉄のような軟磁性材料から出来ている磁極片が磁石の上面に配置されている。代替としては、集束性磁石は、円錐の軸に平行方向に磁化されている一体構造の円錐または錐台形状の永久磁石であってもよい。

40

【0045】

代替としては、集束性磁石は、軟磁性材料のコアの周りを取り囲む線状コイルから出来た、コアが円錐または錐台形状の端部を有することを特徴とする電磁石であってもよい。

【0046】

集束性磁石は、試料中の磁性粒子が小球になるように濃縮するのが好適である。小球のサイズと形状は、試料に添加された粒子の数とタイプによって決定され、それは、応用と、集束性磁石の尖端のサイズと、および集束性磁石の尖端から小球までの距離に依存し、

50

試料ホルダ (sample holder) の底の厚さに依存する。磁性粒子は、円錐形の集束性磁石の先端に引き付けられる。錐台形状の磁石では、粒子は、集束性磁石の先端の端部に引き付けられ、先端の直径に対応するリング内に濃縮される。粒子が単一の小球に濃縮されるように、集束性磁石の先端のサイズは、小球の期待されるサイズよりも大きくはないのが好適である。CD4⁺T細胞検査では、例に記すように、磁性粒子と磁氣的に標識化された細胞とが濃縮された小球は、通常は、直径が約500 μ mから1mmである。

【0047】

図に基づく記述

本発明は、多くの異なる形式の実施形態で満足させることが出来るが、図面に示され、ここに詳細に記述されるものは、本発明の好適なる実施形態である。本開示内容は、本発明の原理を示す例であると考えられるべきものであって、本発明を例示された実施形態だけに限定しようとするものではないと理解されたい。

10

【0048】

(図1)

図1は、本発明の機器の実施形態を示す。機器は、分析物に結合した磁性粒子を含む、細胞または分子のような試料100を保持する平坦な試料ホルダ102を備える。光学的透過性のカバー片105が、試料の深さを低減して一様にするために試料の上面に置かれる。

【0049】

ガラスで作られるのが好適であるカバー片は、試料流体が広がってカバー片と試料ホルダの空間を満たすように、試料流体の上に置かれる。カバー片のサイズは、所望の寸法の試料の一様な深さを提供するために用いられる試料の体積に基づいて選択される。カバー片の形状は重要ではなく、顕微鏡で用いられる標準の長方形のカバー片が適当である。

20

【0050】

機器は、試料内に存在する磁性粒子を検出領域116内に小球101に濃縮するように集束性磁石を更に備えている。集束性磁石は、永久磁石108で出来ていて、その永久磁石は、(矢印で示したように)上面と底面に垂直な残留磁化を有している。例えば、鉄のような軟磁性材料で出来た、円錐または錐台形状の磁極片110が、磁石108の上に置かれる。磁極片110は、磁石108からの磁束を集束し、また、真上で最大磁束となるような、大きな勾配を持つ磁界をつくる。試料中で最大の磁界の強度と勾配を得るために、磁極片110は、試料ホルダ102の下に置かれ、磁極片の上面が、試料ホルダ102の底に近接するか接触するようにする。構造上の完全性を維持しながら、試料ホルダ102の厚さを最小にするのが好適である。好適には、試料ホルダ102の厚さは、約0.15から0.2mmである。

30

【0051】

機器は、磁性粒子が濃縮された領域に広がる検出領域116上に照射光を提供するようになっていることを特徴とするレーザであるのが好適な照射光源104を更に備える。照射される領域を検出領域に制限するために、照射光源は、照射ビームを集束し又は整形する光学系114を含んでもよい。好適なる実施形態では、光学系114は単純なピンホール装置である。照射光源104は、試料上に照射される波長の範囲を選択するように、(別に図示してはいないが)帯域通過フィルタまたは短波長通過フィルタのような周波数依存フィルタを含むことも出来る。

40

【0052】

機器は、検出領域116から放出される光を検出するようになっている検出器106を更に備える。検出器は、光を検出器上に集束し、放出される光が検出される領域を検出領域116に制限する検出光学系112を含んでもよい。好適なる実施形態では、放出される光が検出される領域を検出領域116に制限するために、単純なピンホール装置が用いられる。検出器へ入る、散乱された励起光の量を低減するために、検出光学系は、帯域通過フィルタまたは長波長通過フィルタのような周波数依存フィルタを更に含む。

【0053】

50

磁性粒子に束縛され、検出領域 1 1 6 に濃縮された、標識化された分析物から放出される光は、検出器 1 0 6 によって検出され、検出器は、検出領域 1 1 6 から測定される光の全量の関数である電気信号を生成する。好適なる実施形態では、検出器 1 0 6 は、フォトダイオードである。しかしながら、光電子増倍管 (P M T)、アパランシェ・フォトダイオード (A P D)、または C C D カメラのような他の光学的検出器も、検出領域 1 1 6 から放出される光の全量を検出するために本機器に用いるようにすることが出来る。

【 0 0 5 4 】

分析物に結合した粒子を、試料 1 0 0 の体積よりもはるかに小さな体積を持つ小球 1 0 1 に濃縮することは、対象の分析物を媒質の大部分から効率よく分離し、試料の他の成分から発生する背景信号からほぼ独立して、小球からの蛍光の測定を可能にする。本機器の更なる特徴は、観測される背景信号を更に低減する。照射光学系は、検出領域 1 1 6 だけを照射するようになっている。検出光学系は、実質的に検出領域 1 1 6 だけから発生する光を測定するようになっている。検出光学系は、更に、検出領域から放出される光を試料ホルダの面にほぼ垂直な光路において測定するようになっているが、これは、試料を出る前に光が通過する試料の量を最小にする。これらの特徴のそれぞれが、試料内の成分によって引き起こされる全蛍光への寄与を最小にするように機能する。

10

【 0 0 5 5 】

好適なる実施形態では、試料 1 0 0 の正確に測られた体積が提供され、それが試料内の分析物の濃度の定量的測定値の取得を可能にする。しかしながら、定性的測定は、試料の体積を管理しなくても得ることが出来る。例えば、試料内の分析物の存在を検出するだけで十分である診断的検査法は、余り正確には測定されていない体積を持つ試料を用いても行うことが出来る。

20

【 0 0 5 6 】

(図 2)

図 2 は、標準的落射蛍光の光路を導入している、本発明の機器の代替の実施形態を示す。ビーム・スプリッタ 2 1 6 は、光源 1 0 4 からの励起光を検出領域 1 1 6 へ反射する二色鏡 (ダイクロイック・ミラー) を含む。試料内の蛍光標識から放出される光は、ビーム・スプリッタを通過して検出器 1 0 6 へ向かう。

【 0 0 5 7 】

(図 3)

図 3 a と 3 b は、本発明の試料ホルダの代替の実施形態の、それぞれ断面図と上面図を示す。試料ホルダ 3 0 2 は、試料ホルダ内に空洞として形成された試料室 3 0 0 を含む。(不図示の) 試料導入口とガスの出口は、試料ホルダ 3 0 2 の外部と試料室 3 0 0 を接続し、閉じた試料室を試料流体で充填することが出来るようになっている。図示のように、閉じた試料室 3 0 0 は円盤形状、すなわち、浅い深さを持つ円形である。しかしながら、他の形状を用いてもよい。決められた体積の閉じた試料室を用いることによって、単に試料室を充填するだけで所定の体積の試料を提供することが出来る。

30

【 0 0 5 8 】

図 3 a に示すように、磁石 1 0 8 と磁極片 1 1 0 からなる集束性磁石は、円盤形状の試料室 3 0 0 の中心の下に配置され、分析物に結合した粒子を、試料室の中心で小球 1 0 1 に濃縮する。集束性磁石を丸い試料室の中心に配置することにより、試料室の端部から検出領域までの距離が、全ての方向で一様になり、これにより、試料室の全ての領域から等しく磁性粒子を小球 1 0 1 に濃縮することが出来る。

40

【 0 0 5 9 】

図示のように、試料ホルダの操作を容易にし、機器内に試料ホルダを保持するのを容易にするために、試料ホルダ 3 0 2 は長方形である。しかしながら、試料ホルダの形状とサイズは本発明の重要な側面ではない。

【 0 0 6 0 】

試料室 3 0 0 の深さは、分析物に結合した磁性粒子の濃縮に影響を及ぼさないように、出来るだけ浅いのが好適である。細胞表面の抗原と結合する抗体に抱合された磁性粒子を

50

用いてリンパ球を濃縮する場合には、試料室の深さは、約50 μ mであるのが好適である。試料室の浅い深さは、分析物に結合した粒子の小球101と検出器との間の光学的経路内の試料流体の量を最小にし、このことは、背景信号の量を最小にし、このようにして、得ることの出来る信号対雑音比を改善する。

【0061】

試料室は、ガラスまたはプラスチックのような任意の適当な材料から作ることが出来る。好適なる実施形態では、試料室は、ポリスチレンのようなプラスチックから作られていて、光検出を可能にするために透明な上面と、周囲の、または散乱された光が検出系と干渉するのを最小化するために黒い側面と底面とをもつ。

【0062】

(図4)

図4は、本発明の試料室の代替の実施形態の断面図を示す。試料ホルダ402は、試料ホルダ内に空洞として形成された試料室400を含む。(不図示の)試料導入口とガスの出口は、試料ホルダ402の外部と試料室400とを接続し、閉じた試料室を試料流体で充填することが出来るようになっている。この実施形態では、試料室400の上面の中心部分は掘り込まれていて、この領域の試料室の深さが、試料室の周縁部の深さよりも小さくなっている。図示のように、試料室400の中心部分は、磁石108と磁極片110の上に配置され、分析物に結合した磁性粒子の小球101は、検出領域に対応するこの中心領域に形成される。検出領域に対応する試料室の領域の深さを低減することにより、小球101から検出光学系への光路(すなわち、図示のごとき垂直経路)は、最小量の試料流体を通過する。細胞表面の抗原に結合する抗体に抱合された磁性粒子を用いてリンパ球を濃縮する場合には、検出領域に対応する領域における試料室の深さは、約50 μ mであるのが好適である。

【0063】

試料室の本実施形態は、いくつかの優位性をもつ。検出領域における試料室の深さを最小にすることによって、小球101を取り囲む残留試料によって引き起こされる背景信号が最小化される。更に、試料室の周縁で大きな深さを用いることにより、試料室の直径を増加することなく、従って、濃縮のステップで、磁石が磁性粒子を動かさねばならない距離を増加させることなしに、より大きな全試料体積を用いることが出来る。

【0064】

図4に示すように、試料室の上面の中心部分は、掘り込まれている。しかしながら、磁性粒子の濃縮が試料室の他の場所の深さよりも深さが浅い検出領域内で起こる限り、試料室は、他の形状を用いてもよい。例えば、この検出領域は、試料室の端部に配置されてもよいし、又は、主試料室の外側の、試料室の横方向の凸部に配置されてもよい。更に、試料室の深さの低減は、試料室の上面を掘り込んで実現しても、試料室の床面にもり上がった部分を設けて実現しても、あるいは両方の方法で実現してもよい。

【0065】

(図5)

図5aと5bは、検出領域での試料室の深さの低減を、分析物に結合した磁性粒子の濃縮後に試料室を圧縮することによって達成するような、本発明の代替の実施形態の断面図を示す。閉じた試料室500は、試料ホルダ502内の空洞として形成される。本実施形態では、試料室の底面は、柔軟な材料で出来ている。図5aに示すように、分析物に結合した磁性粒子を磁氣的に濃縮して小球101を形成する工程は、圧縮される前の試料室内で行われる。図5bに示すように、濃縮後、磁石108と磁極片110から成る集束性磁石を、試料室に対して動かして、検出領域の試料室を圧縮する。このようにして、検出前の光路内に存在する試料流体の量を最小化する。

【0066】

同じように、試料室の圧縮は試料室の最上面を押すことによって達成してもよい。試料室の最上面又は底面のどちらか、又は両方は、柔軟な材料で作ることが出来る。圧縮は、磁極片を持ち上げて実現することも出来るし、試料室を下げて、試料室の真上にある構造

10

20

30

40

50

を下げて、あるいは、検出領域の周りの試料室の圧縮を実現する他の任意の方法で実現することも出来る。

【0067】

(図6と図7)

図6と図7は、分析物に結合した磁性粒子が小球に濃縮された後に、濃縮用磁石を試料室に対して動かすことによって小球が試料室から別の検出領域または試料室へ動かされることを特徴とする本発明の代替の実施形態を示す。粒子小球の移動は、磁石を動かすか、または、試料室を動かすか、又は両方で、試料室に対して横方向に磁石を動かすことによって達成される。検出室(detection chamber)は、試料流体とは混ざることのない光学的に透明な、非蛍光性の流体である検出用流体(detection fluid)を含むのが好適である。粒子の小球を試料室から検出室に移動することは小球を光学的に透明な、非蛍光性の流体環境内に配置して、それによって、背景信号を低減する。

10

【0068】

図6は、通路624によって検出室622へ接続される試料室620を含む試料室ホルダ602の上面図を示す。通路624の幅は、濃縮された磁性粒子の小球が通路を通過できるのに十分である。検出室622は、試料流体と混合しない、光学的に透明な、非蛍光性の流体であるのが好適である検出用流体で充満される。例えば、検出用流体は、鉱物性油などのような透明な油であってもよい。試料室620は、試料流体で充満される。試料流体と検出用流体は非混合のままであり、流体の非混合性によってそれぞれの室内と両室を結ぶ制約された通路に存在する。

20

【0069】

図7aと7bは、本方法に用いられるような、図6の試料室の上斜視図を示す。図7aでは、磁極片110は、試料室620の下に位置づけられ、分析物に結合した磁性粒子は小球101に濃縮され、磁極の上に配置される。濃縮の後、磁極の位置は、試料室の底面に沿って通路624を通過して検出室622に移動する。図7bは、磁極の検出室622の下の最終的な位置を示し、分析物に結合した粒子の小球101は今や検出室にある。

【0070】

(図8)

図8は、本発明の試料室の代替の実施形態の断面図を示す。閉じた試料室800は、試料ホルダ802の中に空洞として形成される。本実施形態では、試料流体の中で混合しない、光学的に透明な検出用流体の液滴803が、試料室の中の検出領域に対応する領域に置かれる。検出流体の液滴は、毛細管作用により、あるいは、たとえば、試料室の検出領域の内部表面を疎水性にして油の検出用流体を保持することによるなどの試料ホルダの表面特性によって、その場所に保持されうる。代替としては、検出用流体の液滴は、粒子の検出領域への移動を妨害しないように試料室の上面に形成された部分隔壁(partial partition)または隔膜(septa)によってその場所に保持されてもよい。

30

【0071】

試料流体が、試料室800に添加されて、検出用流体の液滴を取り囲む領域を充填する。次に、分析物に結合した磁性粒子を磁氣的に濃縮して小球101を形成するステップが、試料室の検出領域内の検出用流体の液滴の下に置かれた、磁石108と磁極片110から成る集束用磁石を用いて行われる。磁極110上を粒子が検出領域へ移動する結果、小球101が液滴803の内部に形成される。

40

【0072】

(図9)

図9aと9bは、図4に示した試料室の代替の実施形態の、それぞれ断面図と上面図を示す。試料ホルダ902は、検出領域の上の試料室の上面に掘り込み部分を持つ試料室900を含む。試料導入口905とガスの出口907は、試料室900と試料ホルダ902の外部とを接続し、閉じた試料室を試料流体で充填することを可能にする。試料導入口905とガスの出口907は、互いに隣接して試料室の周縁上に配置される。試料室は、試料室の周縁から、試料導入口とガスの出口との間を、検出領域のほぼ周縁までのびる隔

50

壁 (septum) 903 を含み、流体が、試料導入口からガスの出口へ直接には行けないようになっている。隔壁は、試料流体を試料室の周縁の周りを回るように方向付け、試料室内に空気泡がトラップされる機会を少なくするように、試料室を試料流体で充填することを可能にする。更に、隔壁は、試料室の上面の構造的な支持となり、検出領域の位置と深さを安定化させる。

【0073】

(図10)

図10aと10bは、試料室の全体からの、分析物に結合した磁性粒子が、主試料室の周縁にある検出領域に濃縮されることを特徴とする、本発明の代替の実施形態の断面図を示す。閉じた試料室1020は、試料ホルダ1002内の空洞として形成され、主試料室から張り出した、浅い深さを持つ検出領域1022を含む。分析物に結合した磁性粒子を、試料室の全体から濃縮するステップは、磁石108と磁極片110から成り検出領域の下に配置された集束性磁石を用いて達成される。検出領域の深さが浅いことは、光路に存在する試料流体の量を最小にする。

10

【0074】

希土類の集束性磁石を用いると、液体試料内の磁性粒子の濃縮は、1cmより大きい距離に亘って起こすことが出来ることが観測された。本発明の好適なる実施形態では、試料室は、10 - 100 μl の程度の体積であり、試料室の直径は、1cm未満である。集束性磁石によって発生する磁界は、通常は、十分に強く、静止した集束性磁石を用いて、分析物に結合した磁性粒子を試料室の全体から試料室の周縁に配置された検出領域へ濃縮するのに十分な強度である。

20

【0075】

例

例1

CD4⁺T細胞濃度分析：抗体の標識化

機器

分析は、本質部を図11に示す機器を用いて実行された。

【0076】

図4に示したものと実質的に同じ試料室を含む長方形の試料ホルダ1102が用いられた。試料室の直径は、約7mmであり、試料室の全体積は、約20 μl であった。検出領域は、直径が約2mmであって、試料室の中心にある領域であった。試料室の上面は、試料室の周囲上の上面の約700 μm 下に掘り込まれて、検出領域内の試料室の深さが約50 μm となるようになっていた。試料ホルダは、試料室を機器内へ挿入するのを可能にし、周囲の光から試料室を遮蔽するように試料ホルダ・キャリア1105内で運ばれた。挿入されると、試料室は、集束性磁石1109の直上に配置された。

30

【0077】

集束性磁石は、磁石の上に配置された鉄の円錐を有する円筒形の(円盤状の)磁石からなっていた。磁石は、サマリウム・コバルトの3700ガウスの磁石で、直径は0.25インチ、深さは0.2インチであり、エドムント・オブティクス(Edmunds Optics)(バリントン(Barrington)、ニュージャージー)社から購入したものである。鉄の円錐は、基底部の直径が0.25インチ、高さが0.175インチであり、磁石の上に配置された。

40

【0078】

励起光は、試料室にビームを照射するように配置された、650nm、5mWのレーザー・ダイオード1104からの光であった。

【0079】

フォトダイオード1106の検出器は、試料室の上部に配置され、検出領域から放出される光を検出した。フォトダイオードからの出力電圧は、増幅され(不図示の)デジタル電圧計上に表示された。

【0080】

50

励起光に晒される領域を制限し、検出領域の外部から検出される光を最小にするためにピンホールの開口 (pin-hole aperture) 1 1 1 4 が、試料の検出領域の上部に配置された。開口は、0.15 mm 厚の薄い銅細線中の 1.8 mm x 2.7 mm の卵形の穴であった。レーザ・ビームによる試料の照射が 45 度の角度で入射するように、卵形の長軸は、フォトダイオードおよびレーザと軸が合っていた。

【0081】

放出される光をフォトダイオードへ集束するために、直径が 5 / 8 インチの亚克力球 1 1 1 5 が、ピンホール上に配置された。散乱された励起光を取り除くために、2 つの 695 nm 長波長通過フィルタ 1 1 1 2 が、亚克力球とフォトダイオードの間に配置された。フィルタは、各 12 mm x 12 mm であり、市販の 2 " 2 " フィルタ (エドムント・オプティクス (Edmunds Optics) (バリントン (Barrington) 、ニュージャージー) 社) から切り出した。

10

【0082】

試薬

市販の CD4 抗体で被覆された磁性粒子 (BD Imag (商標) ビーズ、BD バイオサイエンス (Biosciences) 社 (サンノゼ、カリフォルニア)) が磁氣的捕捉試薬として用いられた。

【0083】

市販の APC に抱合された CD3 抗体 (BD バイオサイエンス (Biosciences) 社 (サンノゼ、カリフォルニア)) が検出試薬として用いられた。

20

【0084】

標準試料

測定された蛍光と CD4⁺T 細胞の濃度とを関係付ける標準曲線を発生するために、それぞれは既知の濃度の CD4⁺T 細胞を含む一連の全血液試料が作られた。一連の標準試料は、CD4⁺T 細胞の濃度が医学的に重要な範囲に亘って作られた。既知の濃度の CD4⁺T 細胞を含む一連の全血液試料は、CD4⁺T 細胞が独立に測定されている全血液の第 1 の試料と、CD4⁺T 細胞が取り除かれている全血液の第 2 の試料とを色々な割合で混合することによって作られた。健康な個人からの第 1 の全血液試料内の CD4⁺T 細胞の濃度 (すなわち、正常な CD4 カウント) は、BD FACSCalibur (商標) フローサイトメータ (BD Biosciences 社 (サンノゼ、カリフォルニア)) 上で BD トリテスト (BD Tritest) (商標) 試薬を用いてフローサイトメトリーで測定された。第 2 の CD4⁺T 細胞のない全血液試料は、BD Imag (商標) ビーズ (BD Biosciences 社 (サンノゼ、カリフォルニア)) を用いて、実質的には製品の仕様書に従って、全血液から CD4⁺T 細胞を磁氣的に分離することによって作られた。既知の濃度の CD4⁺T 細胞を含む全血液試料の 1 部と、CD4⁺T 細胞のない全血液の試料の 1 部とを組み合わせ、血液 1 μl 当たり 0 から 600 個の CD4⁺T 細胞を 100 間隔で含む一連の全血液試料が作られた。

30

【0085】

分析 (assay)

それぞれの分析では、全血液 100 μL が、CD4 抗体で被覆された磁性粒子 (捕捉試薬) 20 μg と 5 μg/mL の APC で標識化された CD3 抗体 (検出試薬) 5 μL と組み合わせられ、試薬が細胞に結合するのを可能にするために攪拌しながら室温で 30 分間培養された。次に、混合液 20 μL を試料室に移した。試料室は、集束性磁石が検出領域の直接下に配置されるように機器に挿入され、磁氣的濃縮が 1 分間行われた。濃縮に続いて、濃縮され、標識化された細胞からの発光が測定された。

40

【0086】

上に記したように、フォトダイオードの出力電圧は、増幅されデジタル電圧計上に表示された。この出力電圧は、測定された蛍光放出の量に対応するが、報告される数値的な値は、フォトダイオードの感度と効率と信号の増幅量のような、いろいろな機器依存要因に依存する。所与の機器に対して、測定される出力電圧は、異なる試料からの相対的な蛍

50

光放出の相対的な尺度を提供するものであり、ここでは、相対蛍光単位（RFU）で測定されたままを報告する。

【0087】

標準曲線

上記したそれぞれの標準試料を用いて検査が行われた。各試料の検査は3回行われた。各試料からの蛍光測定値（RFU）の平均と標準偏差（SD）は、以下の表1と図12に提供されている。図12では、誤差棒は $\pm 1SD$ を示している。

【0088】

【表1】

CD4 ⁺ T細胞 数/ μ l	全蛍光（RFU）				
	複製1	複製2	複製3	平均	標準偏差
0	194	151	172	162	15
133	266	218	223	221	4
266	237	292	289	291	2
400	309	322	297	310	18
533	268	353	386	370	23
666	360	368	334	351	24

10

20

【0089】

データは、標識化され、磁氣的に濃縮されたCD4⁺T細胞からの全蛍光の測定値が、試料中のCD4⁺T細胞の数によく対応することを示している。

【0090】

標準試料から得られたデータから、データを直線にフィッティングさせて標準曲線を生成した。

$$RFU = C_1 \cdot [CD4^+T細胞] + C_2$$

ここで、[CD4⁺T細胞]はCD4⁺T細胞の濃度であり、 C_1 と C_2 は、データを直線にフィッティングすることから得られる定数である。標準曲線は、図12に描かれている。

30

【0091】

患者試料

異なる4人の患者からの全血液試料は、上記の検査法を用いて、および上記のフローサイトメトリーによって分析された。各患者試料におけるCD4⁺T細胞の濃度は、標準試料から得られた標準曲線を用いて、測定されたRFUから次の式を用いて計算された。

$$[CD4^+T細胞]_p = (RFU_p - C_2) / C_1$$

ここで下付き添え字pは、患者試料に対応する値を指す。データは下の表2に示す。

【0092】

【表2】

患者試料ID	血液1 μ l中のCD4 ⁺ T細胞の数	
	フローサイトメトリー	CD4 ⁺ T細胞濃縮分析 ：抗体標識化
930	578	619
3090	439	461
4090	352	381
5035	463	281

40

【0093】

データは、患者試料内のCD4⁺T細胞の濃度の測定値が、フローサイトメトリーを用

50

いて行った測定値とよく対応することを示している。

【0094】

例 2

CD4⁺T細胞濃度分析：DNA染料標識化

この例は、試料内の全ての細胞を蛍光性の標識化をするために核酸染色を用いることを記述する。機器と検査方法は、以下に記す変更点を除いて、本質的には例1に記したものと同一である。

【0095】

試薬

市販のCD4抗体に被覆された磁性粒子（BD Imag（商標）ビーズ、BDバイオサイエンス（Biosciences）社（サンノゼ、カリフォルニア））を例1に記されたような磁氣的捕捉試薬として用いた。

10

【0096】

浸透性のDNAに結合する染料、DRAQ5（バイオステイタス社（Biostatusts Ltd.）、ライセスターシャー（Leicestershire）、英国）が、検出試薬として用いられた。この染料を用いる結果、血液試料中の全ての核細胞を標識化することになる。

【0097】

検査

全血液の試料は、単核細胞を選択的に除去するための前処理が行われた。単核細胞の除去は、CD14抗体で被覆された磁性粒子（BD Imag（商標）ビーズ、BDバイオサイエンス（Biosciences）社（サンノゼ、カリフォルニア））を用いた磁氣的除去によって、製造会社の指示書に従って、行われた。

20

【0098】

それぞれの検査では、全血液100 μ Lを、CD4抗体で被覆された磁性粒子（捕捉試薬）20 μ gと50 μ モルのDRAQ5（検出試薬）10 μ Lとで組み合わせられ、室温で30分間、試薬を細胞に結合できるように攪拌つきで培養された。次に、染色化された試料10 μ Lは、10 μ Lの緩衝液（PBS、0.1g/L TWEEN（商標）20 [ポリオキシエチレン（20）ソルビタンモノラウレート]、0.1%のナトリウムアジド、1.5%胎児ウシ血清、pH7.4）で希釈され、出来上がった20 μ Lの試料は、試料室

30

【0099】

標準曲線

上記のように、標準試料のそれぞれを用いて検査が行われた。検査は2回行われた。試料の準備段階に含まれる希釈のステップのために、各標準検査における μ L当たりの細胞数は、例1に記載された対応する検査のその半分の半分である。各試料からの蛍光測定値（RFU）の平均と標準偏差（SD）は下の表3と図13に提供されている。図13では、誤差棒は ± 1 SDを示している。

40

【0100】

【表 3】

CD 4 ⁺ T細胞数 / μ l	全蛍光 (RFU)			
	複製 1	複製 2	平均	標準偏差
0	6 2 6	6 9 0	6 5 8	4 5
6 7	7 3 9	7 7 6	7 5 8	2 6
1 3 3	8 5 8	8 0 4	8 3 1	3 8
2 0 0	9 0 8	8 6 3	8 8 6	3 2
2 6 6	9 3 8	8 9 4	9 1 6	3 1
3 3 3	9 5 9	記録なし	9 5 9	0

10

【0101】

データは、標識化され、磁気的に濃縮されたCD 4⁺T細胞からの全蛍光の測定値が試料中のCD 4⁺T細胞の数に良く相関していることを示している。

【0102】

標準曲線は、標準試料から得たデータから、上記のように、データを直線にフィッティングすることによって得られる。標準曲線は図 1 3 に描かれている。

【0103】

患者試料

異なる4人の患者からの全血液試料は、上記の検査法を用いて、および上記のフローサイトメトリーによって分析された。各患者試料におけるCD 4⁺T細胞の濃度は、標準試料から得られた標準曲線を用いて、測定されたRFUから上記のように計算された。データは下の表 4 に示されている。

20

【0104】

【表 4】

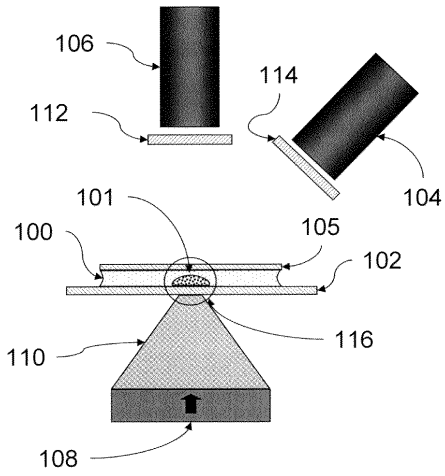
患者試料ID	血液 1 μ l 中のCD 4 ⁺ T細胞の数	
	フローサイトメトリー	CD 4 ⁺ T細胞濃縮分析 : DNA染料標識化
9 3 0	5 7 8	4 3 8
3 0 9 0	4 3 9	3 1 6
4 0 9 0	3 5 2	2 9 3
5 0 3 5	4 6 3	3 0 3

30

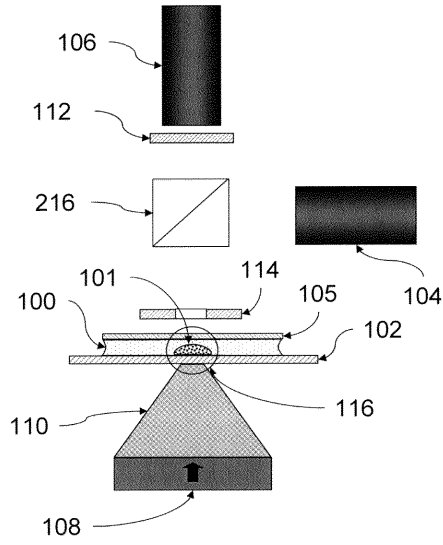
【0105】

データは、患者試料内のCD 4⁺T細胞の濃度の測定値が、フローサイトメトリーを用いて行われた測定値とよく相関することを示している。

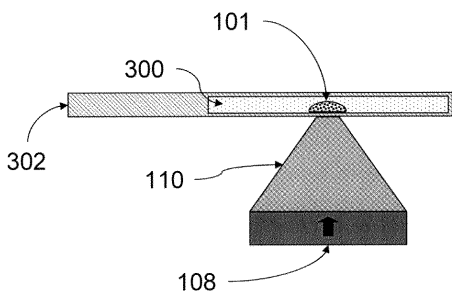
【 図 1 】



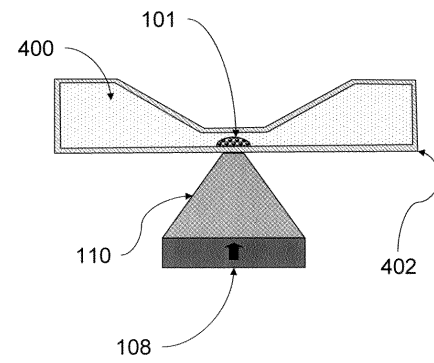
【 図 2 】



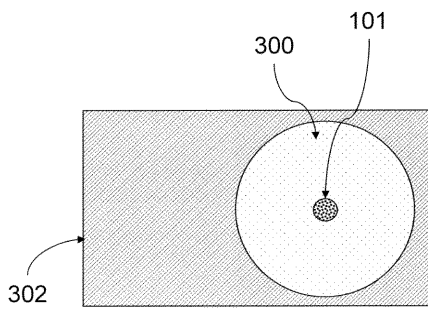
【 図 3 a 】



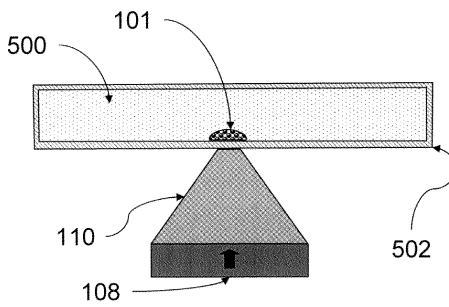
【 図 4 】



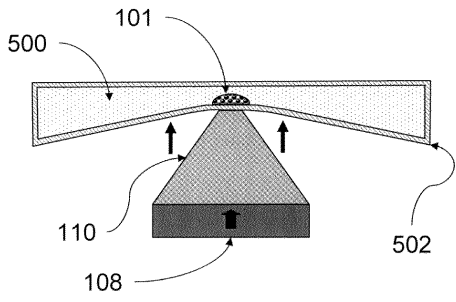
【 図 3 b 】



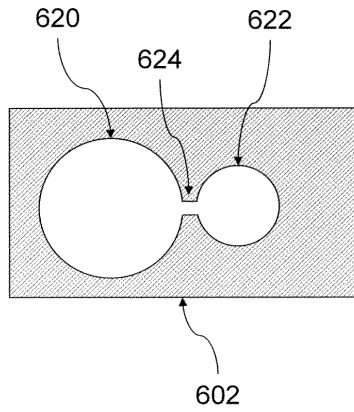
【 図 5 a 】



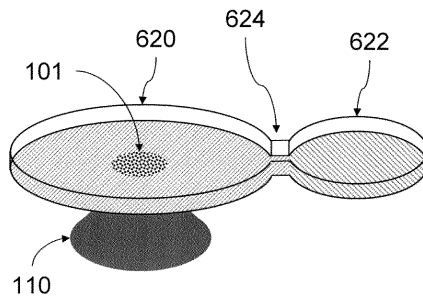
【 図 5 b 】



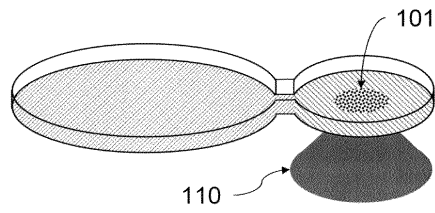
【 図 6 】



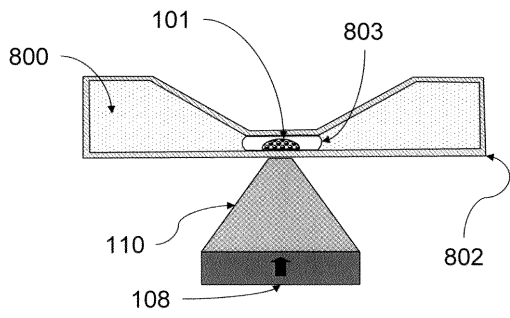
【 図 7 a 】



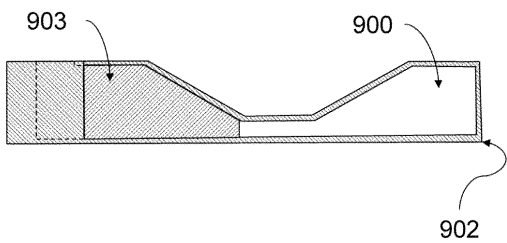
【 図 7 b 】



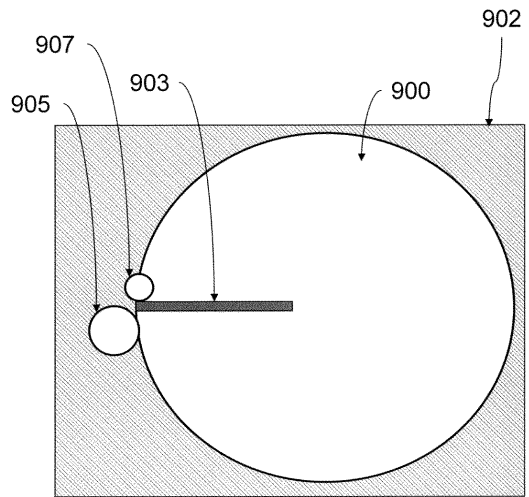
【 図 8 】



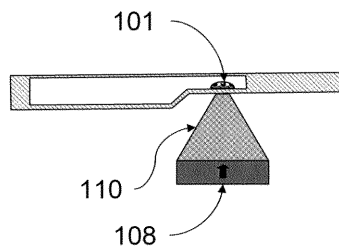
【 図 9 a 】



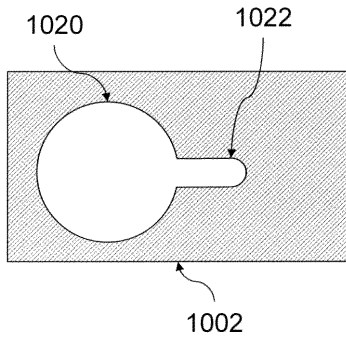
【 図 9 b 】



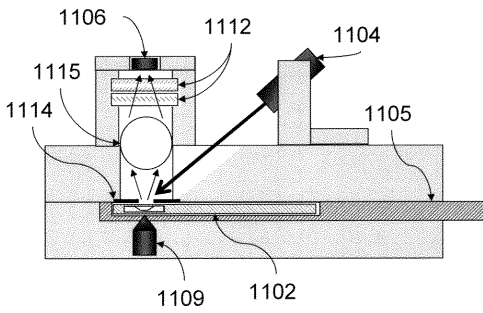
【 図 10 a 】



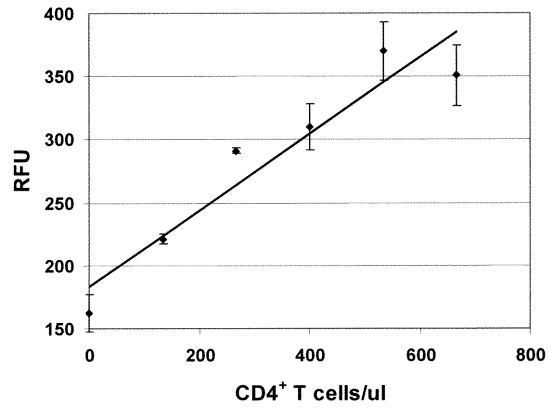
【 図 1 0 b 】



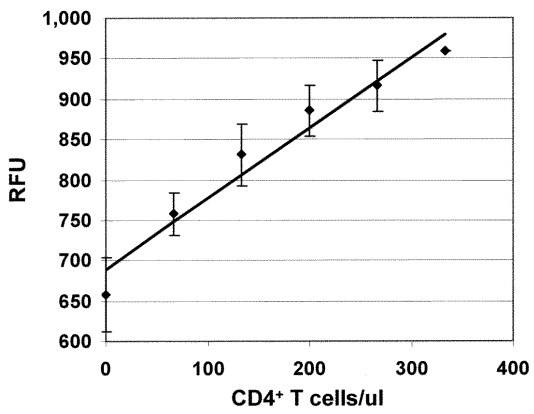
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



フロントページの続き

(74)代理人 100088915

弁理士 阿部 和夫

(72)発明者 フレア キラコシアン

アメリカ合衆国 9 5 1 2 9 カリフォルニア州 サンノゼ ウィリアムズ ロード 4 8 5 1

(72)発明者 ユー リーピン

アメリカ合衆国 9 5 1 2 4 カリフォルニア州 サンノゼ サマリタン ドライブ 2 2 4 5

(72)発明者 ダグラス エー . ペトリ

アメリカ合衆国 9 4 5 8 3 カリフォルニア州 サンラモン ブランズウィック コート 9 9

4 3

Fターム(参考) 2G043 BA16 CA04 DA01 DA06 EA01 GA07 GB02 GB13 GB16 HA09

JA02 KA02 KA05 KA09 LA01 LA02 LA03

【外国語明細書】

2009186459000001.pdf

专利名称(译)	快速粒子检测分析		
公开(公告)号	JP2009186459A	公开(公告)日	2009-08-20
申请号	JP2009000853	申请日	2009-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	贝克顿·迪金森公司		
申请(专利权)人(译)	碧迪公司		
[标]发明人	フレアキラコシアン ユーリーピン ダグラスエーベトリ		
发明人	フレア キラコシアン ユーリーピン ダグラス エー.ペトリ		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/543 G01N33/53		
CPC分类号	G01N21/6428 B01L3/508 B01L2200/0668 B01L2300/0822 B01L2400/043 G01N33/54333		
FI分类号	G01N21/64.F G01N33/543.541.A G01N33/543.575 G01N33/53.Y		
F-TERM分类号	2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA01 2G043/DA06 2G043/EA01 2G043/GA07 2G043/GB02 2G043/GB13 2G043/GB16 2G043/HA09 2G043/JA02 2G043/KA02 2G043/KA05 2G043/KA09 2G043/LA01 2G043/LA02 2G043/LA03		
代理人(译)	谷义 安倍晋三和夫		
优先权	61/010686 2008-01-10 US		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供用于检测和/或定量流体样品中的分析物的仪器和方法。溶解：将流体样品置于具有小的浅检测区域的样品室中。使用涂有结合试剂的磁性颗粒对分析物进行磁性标记，并使用荧光染料或其他检测试剂可检测地标记分析物。使用位于样品室检测区域下方的聚焦磁体将磁性标记的分析物浓缩到检测区域中。使用位于样品室检测区域顶部的激发光学器件测量浓缩的分析物，适于仅照射检测区域，并且位于检测区域顶部的检测光学器件适于仅检测从检测区域发射的光。在一个优选的实施方法中，本发明提供了一种简单，快速的测定方法，用于测量全血样品中CD4 + SP + T细胞的浓度。

