

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4554766号
(P4554766)

(45) 発行日 平成22年9月29日(2010.9.29)

(24) 登録日 平成22年7月23日(2010.7.23)

| | | | | |
|---------------------|------------------|--------------|--|---|
| (51) Int.Cl. | | F I | | |
| GO 1 N 33/53 | (2006.01) | GO 1 N 33/53 | | K |
| GO 1 N 33/80 | (2006.01) | GO 1 N 33/80 | | |

請求項の数 5 (全 21 頁)

| | | | |
|--------------|------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2000-171824 (P2000-171824) | (73) 特許権者 | 594199337 |
| (22) 出願日 | 平成12年6月8日(2000.6.8) | | オルソークリニカル ダイアグノスティクス、インコーポレイティド |
| (65) 公開番号 | 特開2001-4625 (P2001-4625A) | | アメリカ合衆国、ニューヨーク 14650、ロチェスター、インディゴ クリーク |
| (43) 公開日 | 平成13年1月12日(2001.1.12) | | ドライブ 100 |
| 審査請求日 | 平成19年4月10日(2007.4.10) | | |
| (31) 優先権主張番号 | 60/138136 | (74) 代理人 | 100077517 |
| (32) 優先日 | 平成11年6月8日(1999.6.8) | | 弁理士 石田 敬 |
| (33) 優先権主張国 | 米国 (US) | (74) 代理人 | 100092624 |
| | | | 弁理士 鶴田 準一 |
| | | (74) 代理人 | 100087871 |
| | | | 弁理士 福本 積 |
| | | (74) 代理人 | 100082898 |
| | | | 弁理士 西山 雅也 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液の分析方法および血液分析キット

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 単一カラム内で血液試料を、A抗原を保有する第一の試薬赤血球及びB抗原を保有する第二の試薬赤血球と混ぜるとともに、その際に、前記第一及び第二の試薬赤血球の一つを区別して染色し；

(b) 凝集が起こるのに十分な条件下で前記混合物をインキュベートし；

(c) 前記単一カラム内のインキュベートされた混合物に目視分析を施し、前記第一及び/又は第二の試薬赤血球の凝集あるいはそれらの欠如を判定し；そして

(d) 凝集の目視分析の結果を分析して、ABOうら式血液型を判定することを特徴とする、うら試験におけるABOうら式血液型の分析方法。

【請求項 2】

前記目視分析を施される単一カラムが、チューブ及びカラム凝集技法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 3】

前記カラム凝集技法が、カラム凝集試験反応であり、カセット形態の分離容器内で行なわれる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記血液試料が血清又は血漿である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

(a) その中に、A抗原を保有する試薬赤血球の第一の集団及びB抗原を保有する試薬

10

20

赤血球の第二の集団を有する容器であって、前記試薬赤血球の第一又は第二の集団の一つが区別して染色される容器；

(b) カラム凝集反応容器からなる、A B O うち式血液型試験を行なうための反応手段；並びに

(c) 単一カラム内で A B O うち式血液型試験を行なうための使用説明書であって、前記単一カラムに目視分析を施し、前記抗体を検出して特定する使用説明書を含む、単一カラム内で A B O うち式血液型試験を行なうための血液分析凝集試験キット

【発明の詳細な説明】

【0001】

10

【発明の属する技術分野】

本発明は、血液型判定の分野に、特におもておよびうら血液型検査の同時判定に関する。

【0002】

【従来の技術】

血液型血清学は、患者に関連した輸血または臓器移植の前に、血液ドナーと患者レシピエントとの間の血球適合性の判定を要する。血球適合性は、患者の血清中に含有される抗体とドナーからの血球上に存在する抗原との間の免疫反応が起きないことにより判定される。

【0003】

20

多数の異なる血液型抗原が、すべての個体の赤血球表面に見出される。遺伝された遺伝子生成物であるこれらの抗原は、一卵性双生児を除いてすべての個体間で唯一無二であると思われる組合せで存在する。血液型判定は、一般に、抗原が存在することを、そして存在しないことを、通常は試験される抗原に対する抗体を用いて判定する赤血球の検査方法である。さらに、人が彼または彼女の赤血球上に特定の赤血球抗原を有していない場合、彼または彼女の血清はその抗原に対する抗体を含有し得る。血清中に抗体が存在するか否かは、その人の免疫系が特定の抗原またはそれと非常によく似た何かにより過去に誘発試験を受けたことがあり、そしてそれに応答したか否かによっている。例えば、赤血球が A 型である、即ち赤血球上に「A」抗原を有する人は、彼または彼女の血清中に抗 B 抗体を有する。したがって、このような人が B 型血液を投与された場合、免疫反応が起きて、重篤な臨床的結果が考えられる。

30

【0004】

さらに考慮すべきこととして、ヒトの身体は花粉、食物、細菌およびウイルス中の抗原に絶えず曝されている、ということに留意する必要がある。これらの「天然」抗原は外見上ヒトの血液型抗原に非常によく似ているので、それらはほとんどすべての感受性ヒトを刺激して抗体を産生させる。したがって、ある種の抗体は、赤血球が相互抗原を欠いているヒトの血清中に予期される。したがって、二次判定検査はしばしば、患者/ドナー血清に関して実施される。血清中の A B O 式血液型系の予期される抗体に関する検査は、「うら」血液型判定と呼ばれる。

【0005】

40

A B O 式血液型判定系の抗体は、一般に、イムノグロブリン M (I g M) である。これらの抗体は、1 分子当たり 10 個の抗原結合部位を有する。I g M 抗体は赤血球間の距離に亘るのに十分な大きさで、したがってそれらが遠心分離されると、細胞は格子「細胞 - 抗体 - 細胞 - 抗体」で一緒に結合され、凝集体中に一緒に凝集したままである。例えば、抗 A を A 型血球または A B 型血球に付加し、混合物を遠心分離した場合、血球は、再懸濁されても血球塊中に残存する。同一抗体を用いた場合、O 型および B 型血球は個々の細胞として懸濁する。一抗体、例えば I g M 抗体により引き起こされる凝集は、直接凝集反応と呼ばれる。

【0006】

輸血医学において、最も高頻度で実施される検査は、前記の理由のために、A B O 式血液型の判定である。当業界の最新事情は、赤血球上の A、B 抗原を別々に、そして時として

50

A + B を一緒に検査すること（おもて検査）であり；そして血清または血漿中の抗 A および抗 B 抗体に関して試験する（うら検査）判定（クロスチェック）である。したがって、最低で4つの、しかし7つという多くの別々の検査（試料赤血球上の A、B、A + B 抗原；A₁、A₂、B、O 試薬赤血球を用いた試料血清 / 血漿中の抗 A および抗 B）がルーチンに用いられる。これらの判定（おもておよびうら検査）実践の各々による結果は、一致しなければならない。したがって、米国一国だけで、血液センターで血液型を判定するために、年間約1億400万の検査が実施される。

【0007】

1900年代初頭以来、Ashby (J. Exp. Med. 29:267 (1919)) およびCoombs (Brit. J. Exp. Pathol. 26:255 (1945)) の研究とともに、「ランドシュタイナー」法 (Landsteiner, Science 73:405 (1931)) として既知の一般的アプローチは、ある血液型抗体（例えば抗 A または抗 B）を含有する標準実験室試験管に患者の赤血球を付加し、混合して抗体 / 抗原結合反応を起こさせ、そして次に遠心分離してきた。試験される抗原が存在する場合、抗体 / 抗原結合が起こって、患者の赤血球の凝集が生じる。試験管を手で振盪して、底の「凝集化」細胞の遠心分離ボタンを除去する。次に、除去細胞が「凝集」されたか否か、そしてどの程度かに関して、主観的判定が成される。

【0008】

1900年代中頃、試験の主観性を最小限にして誤りを低減するために、この技法を簡易化する試みが成された。適合性検査の結果の多少恒久的な記録は、その表面の少なくとも一部に必要な免疫化学試薬を有する、湿潤性で、非吸収性、またはいくつかの場合には吸収性の検査スライドまたは検査カードを用いることにより生じ得る、ということが認識された。これに関して、米国特許第2,770,572号、第2,850,430号、第3,074,853号、第3,272,319号、第3,424,558号、第3,502,437号および第3,666,42号、ならびに欧州特許出願第0104881-A2号は、このような検査カードおよび関連装置の選択例を示す。マイクロプレートでの血液型判定の利点としては、多数の試料の操作がより容易であること、計器を用いた凝集反応の客観的測定、ならびに結果の編集および管理のためのコンピューターインターフェーシングが挙げられる。コンピューター制御ロボットおよび高スループット分光測光的読取機を備えた多数の高価で且つ公共の用に供される系が血液バンクオートメーションのために導入されてきた (Chung, et al., Transfusion 33:384 (1992))。

【0009】

市販の血液型分類キットは、ゲル形態の試薬を充填した特別なマイクロチューブ中での赤血球抗原および抗体反応の検出改良を伴って導入されてきた (Lapierre, et al., Transfusion 30:109 (1990))。血液型判定のための決定点としての血球凝集反応の使用に内在する問題を克服するための固相技法は、Scott (Transfusion Med. Rev. 5:60 (1991)) により再検討された。近年、Grove 等 (Transfusion Med. Rev. 10:44 (1996)) は、血液センターだけでなく、病院の輸血ラボラトリーにも適用可能な赤血球抗原の自動判定および血清抗体スクリーニング手法の実施および使用を報告した。試料の血液型を判定するためのこれらの方法には、特定の判定試薬を入れた少なくとも7つの異なるウエルが用いられねばならない。大規模血液型判定に用いられる手法はすべて、本質的に、凝集反応ベースの方法を、そして単一試験管 / ウエル中の唯一の抗原または抗体の確定のためにも、使用する。蛍光標識化試薬を用いた別々に同定可能な反応も、米国特許第4,550,017号および第4,748,129号において、血液型判定用途に関して報告されている。

【0010】

最新手法は、決定点として赤血球の凝集反応を利用する。前記のように、これは試験管中で、スライド表面で、マイクロプレートで、およびカラム凝集管中で成し遂げられる。後者2つの方法は、手動で、または自動化器械により実施され得る。どの方法も、おもておよびうら検査の両方を実施するためには、血清（または血漿）を血球と分離する必要がある。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

10

20

30

40

50

したがって、単一検査においておもておよびうら検査の両方を実施する方法を開発することは興味深い、一方、検査前に血液試料を分離する必要がないことが好ましい。このような方法は、血液バンク技術者が赤血球上の血液型抗原ならびに血清中の臨床的意義を有する抗体を同時に確定できるようにする。このような方法は、実施される個々の検査数をかなり低減し、即ち血液センターで実施される検査の数の年間約5000万～1億件の低減を提供して、時間と経費の有意の節約をもたらす。我々は、それらの凝集体が別個のものであるよう、試料赤血球(RBC)の試薬RBCとの区別を可能にする技術を開発した。さらに、本明細書中に開示された新規の方法は、標識判定抗体試薬を用いて、試料中で予備生成された抗体からそれらの反応を識別する。本発明の検査は血液試料を分離する必要を伴わずに成され、したがって全血(WB)に関して成され得る。本明細書中に開示された検査は自動計器で用いられ得るが、この場合、さらなる利点は血清を血球と分離する必要がないことにより得られる。さらに、おもておよびうら検査の同時検査は、血液型を判定し、型を確証するのに必要な検査(おもて&うら検査)の数を低減する。

10

【0012】**【課題を解決するための手段】**

本発明の蛍光標識化実施態様では、おもて検査において、モノクローナル抗体が標識される。うら検査に関しては、試薬赤血球が標識される。さらなる利点は、混合赤血球集団を識別する(肉眼的にまたは自動読取機を介して)能力にある。例えば、うら検査は、2つでなく1つの検査で実施され、実施される検査数の低減をもたらす。さらなる用途は抗体スクリーニングであり、この場合、2つの別々の検査の代わりに2種の細胞のプールが一緒に用いられ、実施される検査数の低減をもたらす。

20

【0013】

視覚系のために細胞を着色する能力は、試験管、マイクロプレート、スライドおよびカラム凝集技法(CAT)、ならびに検査プラットフォーム、例えばビトロスVitros(商標)250、750または950(Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY)スライド法を用いる既存の血液型検査プラットフォームへの適用を有する。

【0014】

Vyas等は米国特許第5,776,711号において、「同時」ABOおよびRH(D)式血液型判定または抗体スクリーニング法を開示する。しかしながら、ABO式血液型判定を実施するための多数の検査を同様に低減しようと試みる一方で、本発明は、試料の赤血球ABO状況、ならびにAおよび/またはB抗原に対する抗体の存在を同時検査する。さらに、本発明は、分離された血清および赤血球構成成分ではなく、全血を用いた。標識化試薬赤血球の本発明の使用はさらに、Vyas等の合成ビーズの使用とは異なる。

30

【0015】

ABO式血液型の同時分析は、適切な蛍光色素で試薬赤血球を標識し、そして蛍光色素標識で適切なモノクローナル抗体を選択することにより実行され得る。血球および凝集体は、顕微鏡スライドまたは等価物上でのレーザー走査血球計算により測定され得る。スライド上の血球は、走査レーザー光源により照明される。典型的には、用いられるレーザー光源としては、青色アルゴンイオンレーザーおよび/または赤色ヘリウム-ネオンレーザーが挙げられる。蛍光および光散乱は、レーザー走査血球計算器(Compucyte, Cambridge, MA)により確定され得る。

40

【0016】

おもておよびうら検査の同時判定におけるレーザー走査血球計算法の使用を以下に示す。血球または血球群(凝集体)はレーザー光線により走査され、照射光は血球または血球群により散乱され、そして散乱強度は血球(または凝集体)のサイズおよび形状に関連する。例えば、個々の赤血球は小型凝集体より少ない光を散乱し、これは順に、大型凝集体より少ない光を散乱する。

【0017】

同様に、血球または血球群(凝集体)がレーザー光線により走査される場合、照射光は、血球に結合されていた蛍光色素(単数または複数)から蛍光を誘発し得る。蛍光色素が試

50

薬赤血球と血球当たり相対的に均一に結合される場合、蛍光強度は凝集体サイズに関連する。例えば、個々の赤血球は小型凝集体より少ない蛍光を発し、これは順次、大型凝集体より少ない蛍光を発する。

【 0 0 1 8 】

散乱光と蛍光の組合せの使用は、異なる種類の凝集体を区別する場合にいずれかのパラメーター単独よりも信頼性がある。

これら2つのパラメーターの他に、蛍光色素に結合されたモノクローナル抗体も、当該血球（および凝集体）を標識するために用いられ得る。照射レーザー光線により励起されると血球から発光される蛍光は、血球または凝集体の亜集団を区別するためのこれらのモノクローナル抗体と血球または凝集体との結合についてのさらに別の情報をもたらす。

10

【 0 0 1 9 】

同時A B O式判定のための5つのパラメーター（前方散乱、側方散乱および3つの蛍光チャンネル）ドットプロット分析を、図1 A ~ Dに示す。

フローサイトメトリーまたは蛍光顕微鏡を用いてもA B O式血液型の同時分析を実施し得る、と当業者には理解され得る。

フローサイトメトリーでは、測定される血球および凝集体は迅速移動液流の中心に導入されて、均一速度で小型直径開口部から単一列で流される。粒子は、鞘流の周囲層により流れの中心に流体力学的に集中される。流れ内の血球は、それらが光源により照明される測定ステーションを通過し、 $2.5 \times 10^2 \sim 10^6$ 血球/分の速度で測定が成される。レーザー光源は血球の測定に用いられる。用いられる典型的レーザー光源としては、アルゴンイオンレーザー（UV、青色および緑色光）、クリプトンレーザー（黄色および赤色光）、ヘリウム-カドミウムレーザー（UVおよび青色光）およびヘリウム-ネオンレーザー（赤色光）が挙げられる。蛍光および光散乱は、フローサイトメーター、例えばCytoron Absolute（商標）フローサイトメーター（Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ）の使用により確定され得る。

20

【 0 0 2 0 】

蛍光顕微鏡では、測定される血球および凝集体は顕微鏡スライドまたは等価物上で読み取られる。血球は、典型的には白色光源により、または実質的に単色の光源により照明される。ここでは、レーザー光源は単色光の光源としても用いられ得る。凝集体の存在は白色光で査定され、関連する蛍光は単色光および適切なフィルターで査定され得る。肉眼または自動読み取りが、これらの読み取りの一方または両方のために用いられ得る。

30

【 0 0 2 1 】

肉眼的検出技法は、本明細書中で意図されるおもておよびうら血液型判定にも用いられ得る。カラム凝集反応検査（C A T）を用いるこのような方法は、BioVue（商標）カセット（Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY）を使用する。このようなカセットは、微小粒子マトリックスを付加されるカラムを含有する。このようなマトリックスは、緩衝液中に分散された適切な血液型判定抗体で覆われて、初期反応帯を形成し得る。

【 0 0 2 2 】

C A Tは、自動読み取りシステムを用いて、凝集反応結果を解釈し得る。このような読み取り機の1つは、全自動システムであるOrtho AutoVue（商標）（Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY）に存在し、C A Tを実施する。自動読み取り機は、C C D（荷電カップリング装置）モノクロビデオカメラおよび画像処理ボードおよびI B MコンパチブルP Cから成るコンピューター映像システムである。読み取り機はまず、デジタル化され、画像処理ソフトウェアにより処理される反応の映像を獲得して反応特徴を抜き出し、次にこれは反応分類プログラムにより用いられる。これらの特徴は、反応を陰性と陽性とに分けるために、そして7つの慣用的反応の種類または等級のうちの1つへの翻訳のために用いられる。線状統計学的パターン認識道具である弁別分析が用いられて、陰性反応と弱反応とを区別する。

40

【 0 0 2 3 】

C A Tに用いられるさらに別の読み取り機は、BioVue（商標）読み取り機2（Ortho-Clinical

50

Diagnosics, Inc., Rochester, NY) 全自動システムである。この読取り機は、12のBioVueカセットのための自動ローダーを有し、そしてハロゲンランプ光源および画像分析特徴を有して、RBC波長を基礎にした血球同定を可能にし、それにより凝集反応結果を解釈する。画像獲得は、CCDカメラおよびデジタル化ボードにより成される。

【0024】

本発明は、血液の分析方法であって、(a)血液試料を、検出可能な標識に結合された抗A抗体および抗B抗体と反応させ；(b)血液試料を、標識化A抗原および標識化B抗原を保有する試薬赤血球と反応させ；(c)当該試料に血球計算分析を施し；そして(d)当該血球計算分析を分析してABO式血液型を判定することを特徴とする方法を提供する。血液試料は全血であり得るし、前記の工程(a)および(b)で用いられる血液試料は同一の非分割試料であり得るか、または同一患者からの試料の異なる部分であり得る。抗体に結合された検出可能標識は、蛍光標識、例えばFITC、BODIPY、フィコピリタンパク質(フィコエリトリンを含む)、フィコピリタンパク質のエネルギー転移複合体、ペリジニクロロフィリンタンパク質、カスケードブルー、AMCA、反応性インドカルボシアニン、TRITC、アロフィコシアニン(APC)、フィコシアニン(PC)およびインドジカルボシアニン(Cy5(商標))であり得る。逆に、標識化A抗原および標識化B抗原は、FITC、BODIPY、フィコピリタンパク質(フィコエリトリンを含む)、フィコピリタンパク質のエネルギー転移複合体、ペリジニクロロフィリンタンパク質、カスケードブルー、AMCA、反応性インドカルボシアニン、TRITC、アロフィコシアニン(APC)、フィコシアニン(PC)およびインドジカルボシアニン(Cy5(商標))から成る群から選択される蛍光色素であり得る。

【0025】

本発明は、(a)その中に標識化抗A抗体および標識化抗B抗体を有する第一容器、ならびに(b)その中に標識化A型抗原および標識化B型抗原を保有する標識化試薬赤血球を有する第二容器を包含する血液分析キットを意図する。抗A抗体はIgM-FITCを包含し、そして抗B抗体はIgM-FITCを包含し得る。試薬赤血球は、A1、A2、Bおよび/またはO型であり、そして反応性染料(例えばフルオレセインイソチオシアネート(FITC))、親油性染料(例えばメロシアニン540またはDiIC₁₈(3)-DS)、反応性親油性染料、膜構造物と反応する染料、および蛍光染料と複合化したモノクローナル抗体(これらのモノクローナル抗体の反応性は赤血球上の共通構造物(例えば抗グリコフォリン-PE複合体)とのものである)から成る群から選択される蛍光色素で標識され得る。好ましくは、蛍光色素はDiIC₁₈(3)-DSである。キットは、カラム凝集技法(CAT)カセット、例えばBioVue(商標)カセットを付加的に包含し得る。

【0026】

本発明の方法は、同時おもておよび/またはA B O式血液型判定を実施するためであって、(a)血液試料を、検出可能な標識に結合された抗体である抗A抗体および抗B抗体と反応させ；(b)血液試料を、標識化A抗原および標識化B抗原を保有する試薬赤血球と反応させ；(c)試料に血球計算または蛍光顕微鏡分析を施し；そして(d)血球計算または蛍光顕微鏡分析を分析してABO式血液型を判定することを特徴とする。さらに本方法は血液を分析するためであって、(a)血液試料を抗A抗体および抗B抗体と反応させ、(b)血液試料をA抗原を保有する試薬赤血球と、そしてB抗原を保有する試薬赤血球と反応させ、(c)当該試料に目視分析を施し、そして(d)当該目視分析を分析してABO式血液型を判定することを特徴とする。工程(b)の試薬赤血球は、染色され得る。本方法は、カラム凝集技法により実施され、その結果は、自動読取り機、例えばOrtho AutoVue(商標)システム自動読取り機またはOrtho BioVue(商標)読取り機2により自動的に読み取られる。

【0027】

【発明の実施の形態】

本発明によれば、同時おもておよび/またはA B O式血液型検査が種々の実施態様に関して記載される。本発明は、BIOVUEの商品名でOrtho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester,

10

20

30

40

50

New York からカセット形態で製造され、そして販売されているカラム凝集検査 (CAT) 反応および分離容器とともに用いられ得る。結果は、AutoVue (商標) 自動読取り機コンピュータ映像システムまたはBioVue (商標) 読取り機 2 (ともに本明細書中で前記したシステム) を用いて確定され得る。

【0028】

本明細書中に開示された検査を実行するためのその他の手段は、試験管、マイクロプレート、スライドおよび検査プラットフォーム、例えばVitros (商標) スライド法を用いることである。結果は、フローサイトメトリー、例えばCytronAbsolute (商標) またはレーザー走査血球計算器または本明細書中に前記した方法を用いて確定され得る。

【0029】

うら血液型判定のために典型的に用いられる試薬 RBC は、それらの表面に A_1 、 A_2 、B または非 ABO 型抗原 (A_1 型、 A_2 型、B 型、O 型) を有する。これらの血球は、試薬 RBC の凝集を引き起こす予備生成抗体を検出するのに有用である。おもて血液型検査に関しては、モノクローナル抗 A および抗 B が用いられ、試料赤血球表面のそれらのそれぞれの抗原の存在を検出する。

【0030】

他の血液型抗原、例えば D、C、E、c、e、M、N、S、s、 P_1 、 Le^a 、 Le^b 、K、k、 J_s^a 、 Fy^a 、 Fy^b 、 Jk^a 、 Jk^b 、 Lu^a および Lu^b 、ならびに多数のその他のものの存在を同時判定することは、本発明の教示の範囲内である。本発明の方法は、おもてまたはうら血液型検査の蛍光または肉眼的検出を可能にし、そして好ましい実施態様では、同時おもておよびうら血液型検査を可能にする。

【0031】

蛍光検出系

蛍光検査実施態様では、試薬 RBC、モノクローナル抗 A (マウスモノクローナル IgM から精製) または抗 B 抗体 (これもマウスモノクローナル IgM から精製)、あるいは 3 つすべてが蛍光染料で標識され、そして、(1) 循環抗体を伴う試薬 RBC、および (2) RBC 表面抗原を伴うモノクローナル抗 A または抗 B 抗体が、488nm レーザーを用いて、例えばCompucyte レーザー走査血球計算器を用いて検出される。あるいは、抗血清は蛍光的に標識される必要はないが、しかし光散乱により検出され得る。結果は、レーザーフローサイトメトリーにより、例えばOrtho CytronAbsolute (商標) フローサイトメーターを用いてさらに判定され得る。蛍光顕微鏡も用いられ得る。

【0032】

同時おもておよびうら血液型判定のために、標識化 B 試薬 RBC が A 型 WB の存在下で FITC 標識化抗 A を伴って存在する検査が実施された (図 1 A および 2 参照。実施例 1 参照)。FITC 標識化抗 A は、WB 試料中の A 型赤血球を凝集し、緑色凝集体を生じ得た。WB の血漿中の予備生成抗 B は橙色標識化試薬 B 型 RBC を凝集して橙色凝集体を生じ得た。同様の検査を、B、AB および O 型 WB を用いて実施した (図 1 B ~ D および 図 3 ~ 5 参照)。

【0033】

緑色および / または橙色凝集体の存在を基礎にして、4 つの腫瘍 ABO 式血液型の各々と相関する反応性の 4 つの異なるパターンが観察された (表 1 参照)。したがって、ある検査では、ABO 式血液型は、おもておよびうら血液型を同時に確定することにより判定された。A、B、AB または O 型 WB の存在下で、相互的に、標識化 A_1 試薬 RBC および FITC 標識化抗 B が混和された。さらに、緑色および / または橙色凝集体の存在を基礎にした凝集反応の 4 つの異なるパターンが観察され、各々、特定の ABO 式血液型に対応した。したがって、ABO 式血液型を判定し、確認するために、2 つの検査が実施される (表 1 参照)。混合蛍光 (混合緑色および橙色) を有するいくつかの凝集体が検出された (図 6 ~ 8 参照)。これらは、非標識化血球の凝集体中またはその付近の標識化血球のトラッピング / 近接から、あるいは標識化血球の凝集体中またはその付近の標識化抗体のトラッピングまたは近接に起因する。混合緑色 / 橙色凝集体の存在は、結果の解釈を妨げな

10

20

30

40

50

かった。検査 2 を用いる A B O 式血液型の各々に関する代表的データシートを、表 1 に示す。

【 0 0 3 4 】

【表 1】

表 1

A B O 式血液型を判定し、確証するための反応性パターン

| WB 試料群 | 検査 1 | | 検査 2 | |
|--------|-----------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------------|
| | FITC 抗 - A (緑色凝集体) | 橙色試薬 B 血球 (橙色凝集体) | FITC 抗 - B (緑色凝集体) | 橙色試薬 A, 血球 (橙色凝集体) |
| A | + | + | 0 | 0 |
| B | 0 | 0 | + | + |
| AB | + | 0 | + | 0 |
| O | 0 | + | 0 | + |

10

20

【 0 0 3 5 】

表 1 の結果は、Compucyte レーザー走査血球計算器を用いて確定した。しかしながら、凝集体を判定するためのその他の手段が意図され、標識化抗血清が必要な場合も必要でない場合もあり、その例としては本明細書中に前記した方法が挙げられるが、それらに限定されない。本明細書中に記載した種々の検査は別々に、またはそれらの任意の組合せで実施され得るが、しかしおもておよびうら検査を同時に実施するのが本発明の好ましい方法である。

【 0 0 3 6 】

蛍光染料は、試薬血球を（うら検査用）そしてモノクローナル抗 A および抗 B 抗体を（おもて検査用）標識するために用いられる。試薬血球を標識するための好ましい蛍光標識としては、1, 1'-ジオクタデシル-3, 3, 3', 3'-テトラメチルインドカルボシアニン-5, 5'-ニスルホン酸 (DiIC₁₈(3)-DS) が挙げられる。この染料は、488nm 青色アルゴンレーザー光で励起されると血球に橙色の蛍光を発光させる。この実施態様に有用なその他の蛍光標識としては、反応性染料（例えばフルオレセインイソチオシアネート (FITC)）、親油性染料（例えばメロシアニン540）、反応性親油性染料（DiI のクロロメチルベンズアミドおよびメチルベンズアミド誘導体、DiI のスルホン化誘導体、ならびに DiO のスルホン化誘導体）、膜構造物と反応する染料、および蛍光染料と複合化するモノクローナル抗体が挙げられるが、これらのモノクローナル抗体の反応性は赤血球上の共通構造物（例えば抗グリコフォリン-PE 複合体）とのものである。

30

40

【 0 0 3 7 】

モノクローナル抗体を標識するための好ましい蛍光標識としては、フルオレセインイソチオシアネート (FITC) が挙げられる。FITC 標識は、488nm 青色アルゴンレーザーで励起されるとこの抗体が結合するあらゆる血球に緑色の蛍光を発光させる。FITC は、488nm アルゴンイオンレーザーにより励起され得るタンパク質反応性、低分子量蛍光色素染料の種類の一成員であり、これらはすべて本発明のモノクローナル抗体標識目的に有用である。この種類の別の例は、BODIPY (Molecular Probes, Eugene, OR) で、これもこのようなレーザーで励起されると緑色の蛍光を発光する。その他の考え得る有用な

50

蛍光色素としては、フィコビリタンパク質（例えば、フィコエリトリン（P E）、フィコビリタンパク質のエネルギー転移複合体（例えばDuoChrome（商標）（Becton Dickinson, San Jose, CA）、C Y 5（商標）（Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ）等）、ならびにペリジニクロロフィリンタンパク質（PerCP（商標）（Becton Dickinson, San Jose, CA））が挙げられる。前述の染料はすべて488nm 青色アルゴンイオンレーザーにより励起されるが、しかし励起波長光源と発光染料のその他の組合せも考えられる。いくつかの例を以下に挙げる：UV励起によるカスケードブルーおよび7-アミノ-4-メチルクマリリン-3-酢酸（AMCA）；緑色励起によるフィコエリトリン、反応性インドカルボシアニン（Cy 3（商標））およびテトラメチルローダミンイソチオシアネート（TRITC）；赤色励起によるアロフィコシアニン（APC）、フィコシアニン（PC）およびインドジカルボシアニン（Cy 5（商標））。

10

【0038】

前記の蛍光検査系と代替的に、蛍光標識（FITC）で抗血清を標識する必要はない。凝集体は、この分野の当業者の技術の範囲内であるような、このサイズおよび種類の粒子に関する適切な設定で設定された光散乱に基づいて検出され得る。

うら検査条件

凝集反応の結果を最適化するために、それは先ず、標識化試薬RBCおよび標識化モノクローナル抗体対全血の使用比を確定する。したがって、凝集反応の読み取りは、最大にされ、余分の標識は用いられない。擬陰性の数が低減されるため、特異性の改良は適切な検査比の確定の結果である。

20

【0039】

RBCの標識化

DiIC₁₈(3)-DS標識化試薬RBCを用いたうら検査のために、全血中の相対的抗体に対する特異性を有して凝集するその比率の試薬RBCの能力を基礎にして、試薬RBC対全血の所望の比率を確定した。特に標識化A₁試薬RBCを、種々の比率でB型全血と混和した。作業試薬RBC濃度を確定するために、5%、10%および40%の試薬RBC懸濁液を検査した。2 μMのDiI-DSの溶液を用いた。タグ化RBCをCytoronAbsolute（商標）フローサイトメーターで分析し、平均蛍光を測定した。約5%～約10%のRBCの濃度が有用であり、平均蛍光はより低濃度のRBCを用いた場合に匹敵できるほど明るかったため、約5%RBC懸濁液が最も好ましい。しかしながら、十分に検出可能な蛍光またはバックグラウンドを上回る検出可能数の蛍光事象を提供する試薬RBCの濃度、ならびに実際的可能性の見地から使用を思いとどまることのない濃度まで、例えば試薬の容量が用いられ得る。表2は、使用したDiI-DSの濃度で検査された種々の比率の試薬RBCを用いて得られた平均蛍光を示す。

30

【0040】

【表2】

表2

| | 平均蛍光 |
|---------|------|
| 陰性対照 | 2.8 |
| 5% RBC | 7.5 |
| 10% RBC | 8.3 |
| 40% RBC | 4.5 |

40

50

【 0 0 4 1 】

D i I - D S 濃度の範囲

本発明のうら検査の局面に関する D i I - D S 濃度の有用な範囲を確定するために、5つの異なる最終濃度の D i I - D S を、5% R B C 懸濁液に対して検査した。これらの細胞を、CytoronAbsolute (商標) に関して分析した。平均蛍光および% C V (変異係数) を測定した。陽性を検査される 5 μ モル ~ 40 μ モルの D i I - D S の濃度は、あるいは20%未満の% C V を有する十分に明るいシグナルを提供する任意の濃度が、本実施態様において意図される。最小 C V で最も明るいシグナルを有するので、40 μ モル溶液が好ましい(表3参照)。

【 0 0 4 2 】

【表3】

表3

| | 平均蛍光 | % C V |
|------------|------|-------|
| 40 μ M | 186 | 7 |
| 20 μ M | 169 | 10 |
| 10 μ M | 138 | 17 |
| 5 μ M | 119 | 20 |
| 2 μ M | 65 | 35 |
| 陰性対照 | 28 | 52 |

【 0 0 4 3 】

うら検査 - D i I 標識化 R B C & 全血 (W B)

次に、橙色標識化 A 型試薬 r b c が B 型または O 型全血中では凝集するが、A 型または A B 型 W B 中では凝集しない条件を確定した。相互的に、標識化 B 試薬 R B C が A 型または O 型 W B と橙色凝集体を形成するがしかし B 型または A B 型 W B とは形成しない条件を確定した。488nm 青色アルゴンレーザー光を用いた Compucyte レーザー走査血球計算器の最大ピクセルマップ上での橙色および緑色シグナルの相対位置により、着色凝集体を確定した。

【 0 0 4 4 】

異なる組合せを調製することにより W B 対標識化 R B C の比率を確定し、標準血液バンク血清学技法を用いて検査した。W B 検査用に、5% 懸濁液を用いた。凝集反応が観察されたが、しかしながら、検査混合物中の R B C の濃度は一貫した凝集反応結果を生じるには十分ではなかった、ということを見出した(表4参照)。

【 0 0 4 5 】

【表4】

10

20

30

40

表4

| 5% A型 Dil-D S | WB容量 | A型 WB* | O型 WB |
|------------------|------------|--------|-------|
| 25 μ L | 5 μ L | 陰性 | 陽性 |
| 25 μ L | 25 μ L | 陰性 | 陽性 |
| 40 μ L | 10 μ L | 陰性 | 陽性 |

10

* 陰性対照

【0046】

5% 標識化 RBC 懸濁液を40%に濃縮し、その5 μ L を5 μ L のWBに付加した。結果は好ましく、凝集反応が観察されたので、したがって他の比率は検査しなかった。

おもて検査 - FITC 標識化抗体 & 全血

同様に、標識化モノクローナル抗体を用いたおもて検査のために、WB中の相対的血球抗原に対する特異性を有して凝集するその比率の標識化抗体の能力を基礎にして、標識化抗体対全血の所望の比率を先ず確定した。特にFITC標識化抗AをA型WBで滴定して、緑色凝集体がA型またはAB型WB中では生成するが、しかしB型またはO型WB中では生成しない条件を確定した。相互的に、次に、標識化抗BがB型またはAB型WBと緑色凝集体を形成するが、しかしA型またはO型WBとは形成しない条件を確定した。488nm青色アルゴンレーザー光を用いたCompucyte レーザー走査血球計算器の最大ピクセルマップ上での橙色および緑色シグナルの相対位置により、着色凝集体を測定した。

20

【0047】

次に、蛍光標識対抗体の比率を確定した。全血を有する50 μ L を用いて、3つの異なる稀釈で、容量標識化抗体分画を検査した(表5参照)。

【0048】

【表5】

30

表5

| WB : 容量 / 型 | FITC抗-A : 容量 / Dil | 反応等級 |
|------------------|-----------------------|------|
| 10 μ L / A型 | 50 μ L / 1 : 10 | 2+** |
| 10 μ L / A型 | 50 μ L / 1 : 100 | 1+ |
| 10 μ L / O型* | 50 μ L / 1 : 10 | 陰性 |
| 10 μ L / O型* | 50 μ L / 1 : 100 | 陰性 |
| 5 μ L / A型 | 50 μ L / 1 : 50 | 3+ |
| 5 μ L / A型 | 50 μ L / 1 : 100 | 2+ |

40

【0049】

50

* 陰性対照

** AABB Technical Manual, 12th edition; pg607 に定義されている等級分類系

1 : 100 稀釈液は、L S C を用いて最良の結果を示したので、さらなる検査用に選定した。これらの結果に基づいて、50 μ L の F I T C : 抗体を 1 : 100 稀釈で、および 5 μ L の D i I - D S 標識化 R B C を用いた。しかしながら、使用される標識 : 抗体の範囲は、バックグラウンド (低端) および前地帯 (高端) を上回る検出可能な蛍光を生じる任意の濃度であり得る。

【 0 0 5 0 】

目視検出系

赤血球の色を変える能力は、視的にまたは分光測光的に (吸光度または反射率により) 、即ち蛍光を検出する必要を伴わずに、実施される 2 つの血球集団の同時検査を可能にする。例えば、シアニドまたはアジドに曝露された赤血球は明赤色から褐色に変わると予測される。赤色凝集体は、その場合、褐色凝集体から肉眼で検出され得る。赤血球ヘモグロビンの固有の色の変更がこの実施態様により意図されるが、しかし、赤血球に発色団を単に結合させるかまたはそうでなければ会合させると、それらのスペクトル特性が別の方法で検出可能的に変化し得る。

【 0 0 5 1 】

目視検出実施態様では、おもておよびうら検査は、カラム凝集法 (C A T) を用いて、例えば BioVue カセットを用いることにより実施され得る。おもて血液型検定は、本発明のマトリックスに付加されていた円柱状装置を用いることにより、本明細書中に前記したカラム凝集装置を利用して実施され得る。抗血清を含有するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体は生理学的適合性緩衝液中に分散されて、それらを浸漬するための微小粒子のマトリックスに付加されて、そしてマトリックスから注入口に向かって延びて、初期反応帯を形成する。適量のこのような抗体は、一般的に抗体の抗原親和性および特異性によって、当業者によりルーチンに最適化され得る。抗体は、それらの反応性を増強し、そして比特異的結合を防止するのに役立つことが当業界で既知の適切な添加材、例えば高分子量ポリマー等も含有し得る。

【 0 0 5 2 】

これらの例としては、ポリビニル、デキストラン、ゼラチンおよびポリエチレングリコールが挙げられる。低分子量ポリマーも、溶液の密度を増大するために付加され得る。

この説明では、B 型血球に対する抗体が付加された場合、患者試料中に含有される B 型血球は抗体と結合して、マトリックスの上部付近でトラッピングされる集合血球の層を形成する。この実施例では、A 型血球は凝集せず、遠心分離すると装置の底に溜まる。しばしば、患者の血球は弱く反応する変異体も含有し得る。中等度の反応は、カラムマトリックス全体の小型散乱凝集体により実証され得るが、一方陰性物質はマトリックスカラムの底部にボタンを形成する。図 6 は、カラム凝集法を用い、それにより A 型および B 型血球が別々に標識されるうら検査を示す。メーカーの使用説明書通りに、試料血清をカラムの上部に供給し、そしてそれにしたがって試験管をインキュベートし、遠心分離する。試薬 A 血球は存在する抗 A 抗体とともに凝集するが、一方試薬 B 血球はカラムの底部に通過する。これは、試料血清が B 型であったことを示す。

【 0 0 5 3 】

試薬 R B C (Affirmgen (商標) A₁ および B 型血球, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) を、0.2 % の最終濃度でアジ化ナトリウム (N a N₃) で処理した。N a N₃ はヘモグロビン中の鉄を低減し、色を典型的赤色から濃褐色または栗色に変色した。同一 Affirmagen ロットからの未処理血球を、対照として用いた。未処理対照および処理済み検査血球を、メーカーの指図通りに BioVue うら検査カセット中の B 型血清を用いて別々に検査した (10 μ l の 3 ~ 5 % 赤血球および 40 μ l の血清 ; 次にメーカーの使用説明書にしたがって、BioVue (商標) 遠心分離器で 5 分間遠心分離した) 。B 型血清は A₁ 型血球を凝集するがしかし B 型血球を凝集しない、と予測される。未処理対照血球の凝集反応において差は観察されなかったが、但し、未処理血球は赤色で、処理血球は褐色であった (

10

20

30

40

50

本明細書中の実施例 2 および表 6 を参考)。

【 0 0 5 4 】

前記の目視検出系を用いる凝集反応結果の自動判定は、AutoVue (商標) 自動読取り機コンピュータ映像システムまたはBioVue (商標) 読取り機 2 (ともに本明細書中に前記) の使用により成し遂げられ得る。

本明細書中に開示したような凝集体の目視観察が望ましい場合には、先ず、無色血球または血球に付着している無色粒子を、視覚的に知覚可能な凝集反応を実行するのに適した染料で染色するのが好ましい。赤血球のヘモグロビンは、染色しなくても、自然に、このような適切な色を提供する。前記のような A B O 式赤血球、ならびに D、C、E、c、e、M、N、S、s、P₁、Le^a、Le^b、K、k、J s^a、F y^a、F y^b、J k^a、J k^b、L u^a および L u^b 抗原等を含む血球に関して、直接凝集試験を実施し得る。同様に、特定の抗原または抗原を含む血球に対する抗体の存在に関して血清を検査する場合、それらを既知の抗原と混合し得る。未知の血清が提供された既知の抗原に対する抗体を含む場合、反応体は凝集され、それらがマトリックス上を移動したりまたはそれを通して下降する場合にはトラッピングされるが、一方陰性血清は、反応を実行せず、凝集物はトラッピングされない。

【 0 0 5 5 】

血液血清学的状況での使用に関して、本発明の方法を詳細に説明してきた。しかしながら、おもておよびうら検査の両方において、配位子のそれらの結合相手との結合の結果として粒子が反応するように、粒子と会合する任意の結合配位子を包含する同時おもておよびうら血液型結合検定を実行することは本発明の意図内である、と理解されるべきである。例えば、試料 R B C から分離された血漿または血清を用いてルーチン的に実施される「抗体スクリーニング」検定は、本明細書中に開示したように用いられる標識化試薬赤血球とともに全血を用いて実施され得る。あるいは、血清または血漿が用いられ得るが、しかし抗体スクリーニングまたは抗体同定を実施するために必要な検査の数は、1 種類の非標識化試薬赤血球と 1 種類の標識化試薬赤血球を混合することにより、50% 低減され得る。赤血球おもておよびうら検査系を説明したが、その他の系もこの方法で最適化され得る、と当業者は理解する。

【 0 0 5 6 】

【実施例】

以下の実施例は本発明を説明するためだけのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

実施例 1

蛍光検出実施態様

パート A - 試薬調製

1 ml のエタノール (Sigma, St Louis, MO) を Di I - D S の 1 mg バイアルに付加し、激しく混合して 1 mg/ml の濃度にするにより、親油性蛍光膜標識 1, 1' - ジオクタデシル - 3, 3, 3', 3' - テトラメチルインドカルボシアニン - 5, 5' - ニスルホン酸 (Di I - D S) (Molecular Probe Inc., Eugene, OR) のストック溶液を調製した。ストック溶液は、遮光されて室温で 6 ヶ月間貯蔵され得る。

【 0 0 5 7 】

ストック溶液をハンクス平衡塩溶液 (HBSS) (Sigma) で 80 μM の濃度に希釈することにより、Di I - D S の作業溶液を調製した。未使用作業溶液は廃棄した。

パート B - 赤血球 (R B C) 蛍光標識化

血液型が A 1、B および O であるヒトドナーから、全血を Vacutainer アデノシンシトレートデキストロース (A C D) 防腐試験管 (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 中に収集した。約 3000x g で 5 分間の遠心分離により R B C を分離し、3 ~ 5 ml のリン酸塩緩衝食塩水 (P B S) (Gibco) 中で 2 回洗浄し、各洗浄後に、約 3000x g で 3 ~ 5 分間遠心分離した。H B S S を希釈剤として用いて、5% R B C 懸濁液を調製した。

【 0 0 5 8 】

10

20

30

40

50

等容量 (0.1 ~ 5 ml) の 5 % R B C 懸濁液および D i I - D S 作業溶液を試験管中に併合し、37 で30分間インキュベートして、遮光した。試験管を10分毎に軽く手動で攪拌した。標識化 R B C を 3 ~ 5 ml の P B S で 3 回洗浄し、約3000x g で 5 分間遠心分離した。H B S S 中に再懸濁して、5 % 溶液とした。

Imunocount II ソフトウエアを用いたCytoronAbsolute (商標) フローサイトメーター (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ) で、橙色蛍光を確証した。

【 0 0 5 9 】

光散乱パラメーターを基礎にして R B C をゲート制御し、ゲート化 R B C と会合する蛍光を測定した。バックグラウンドを上回る蛍光の測定は、十分な標識化を示した。蛍光標識の代わりに等容量の P B S (0.1 ~ 5 ml) とともにインキュベートした同一 R B C の陰性対照を平行して実行した。

10

パート C - 抗体のフルオレセインイソチオシアネート (F I T C) 標識化マウスモノクローナル抗 A、クローンMH04およびマウスモノクローナル抗 B、クローンNB 10.5A5を、 Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., 製造所から組織培養形態で入手した。標準的方法を用いて、モノクローナル抗体を一部精製し、濃縮した。

【 0 0 6 0 】

精製抗 A および抗 B を、標準プロトコールにしたがって、炭酸塩緩衝液、p H 9.5 中で透析し、F I T C で標識した。サイズ排除クロマトグラフィーを用いて、F I T C 標識化抗体を遊離 F I T C から分離した。280nm および492nm での個々の分画の吸光度を確定した。各分画に関する F / P (フルオレセイン / タンパク質) モル比を、以下の式を用いて算出した：

20

$$F = A_{495} / 0.15$$

$$P = [A_{280} - (A_{495} \times 0.32)] / 1.2$$

$$F / P \text{ 比} = (F / P) \times 2.39$$

最高 F / P 比を有する 3 つの分画を、本発明の蛍光同時おもておよびうら検査実施態様に用いた。

【 0 0 6 1 】

抗A分画 F/P比 抗B分画 F/P比

| | | | |
|----------|-----------|----------|-----------|
| 3 | 20 | 3 | 36 |
| 4 | 26 | 4 | 20 |
| 5 | 32 | 5 | 12 |

30

パート D - 全血 (W B) 中での同時おもて / うら血液型判定および検査の解釈 - レーザー走査血球計算器 (L S C)

抗 B F I T C 標識化抗体中に稀釈した D i I - D S A 標識化 R B C を我々は調製した。抗体を 2 % ウシ血清アルブミンおよび 1 % アジ化ナトリウムを有す留 0.5ml の P B S 中で 1 : 100 に稀釈した。下記のサブパート 1 ~ 4 に示すように、9 容量の稀釈抗体を 1 容量の標識化血球と混合した。55 μ L の W B を 5 μ L の W B に付加した。試験管を Clay-Adams (Parsippany, NJ) 血清遠心機中で約 3500rpm で 15 秒間遠心分離した。R B C を静かに再懸濁した。3 μ L の反応混合物を 7 μ L の P B S に付加し、次にカバーガラスを適用することにより、スライドを調製した。

40

【 0 0 6 2 】

L S C (Compucyte, Cambridge, MA) を用いて、スライドを分析した。

サブパート 1

本明細書中のパート D の物質および手法を用いて、A 型全血を使用した。A 型全血は A 型赤血球に対する抗体を含有しないため、標識化試薬赤血球との凝集体は形成され得ない。

50

さらに、A型全血はB抗原を保有しないため、抗B FITCとの凝集体は形成され得ない。図1Aは、A型全血を用いた抗B FITCおよびA標識化RBCの前方(x軸)および側方(y軸)散乱(それぞれ緑色最大ピクセルおよび橙色最大ピクセル)を示す。予測通り、凝集体の領域で、側方散乱プロットには何の事象も検出されない。さらに、緑色対橙色プロットにおいてさらに分析される側方散乱から得られる事象は何もない。

【0063】

サブパート2

本明細書中のパートDの物質および手法を用いて、B型全血を次に検査した。B型全血はA型赤血球に対する抗体を含有するため、標識化試薬赤血球との凝集体が形成されるべきである。さらに、B型全血はB抗原を発現するため、抗B FITCと凝集体を形成すべきである。図1Bは、B型全血を用いた抗B FITCおよびA標識化RBCの前方(x軸)および側方(y軸)散乱(それぞれ緑色最大ピクセルおよび橙色最大ピクセル)を示す。凝集体の領域で、側方散乱プロットに事象が検出される。予測通り、緑色対橙色プロットにおいてこれらの事象をさらに分析して、試薬血球(橙色陽性)および被験RBC(緑色陽性)の両方の凝集体の存在を、我々は確認する。

10

【0064】

サブパート3

本明細書中のパートDの物質および手法を用いて、AB型全血を次に検査した。AB型全血はA型赤血球に対する抗体を含有しないため、標識化試薬赤血球との凝集体は形成されるべきでない。しかしながら、AB型全血はB抗原を発現するため、抗B FITCと凝集体を形成すべきである。図1Cは、AB型全血を用いた抗B FITCおよびA標識化RBCの前方(x軸)および側方(y軸)散乱(それぞれ緑色最大ピクセルおよび橙色最大ピクセル)を示す。凝集体の領域で、側方散乱プロットに事象が検出される。予測通り、緑色対橙色プロットにおいてこれらの事象をさらに分析して、試薬血球(橙色陽性)の凝集体を観察できなかったが、しかし被験RBC(緑色陽性)の凝集体の存在を、我々は確認する。

20

【0065】

サブパート4

最後に、本明細書中のパートDの物質および手法を用いて、O型全血を次に検査した。O型全血はA型赤血球に対する抗体を含有するため、標識化試薬赤血球との凝集体が形成される。しかしながら、O型全血はB抗原を発現しないため、抗B FITCと凝集体を形成しない。図1Dは、O型全血を用いた抗B FITCおよびA標識化RBCの前方(x軸)および側方(y軸)散乱(それぞれ緑色最大ピクセルおよび橙色最大ピクセル)を示す。凝集体の領域で、側方散乱プロットに事象が検出される。予測通り、緑色対橙色プロットにおいてこれらの事象をさらに分析して、試薬血球(橙色陽性)の凝集体を観察したが、しかし被験RBC rbc(緑色陽性)の凝集体を、我々は観察しなかった。

30

【0066】

実施例2

目視検出実施態様

パートA - 着色赤血球の調製

A₁およびB型赤血球の市販調製物(Affirmagen)を、Ortho-Clinical Diagnostics, Inc.(Raritan, NJ)から入手した。A₁型RBCの2つの1MIアリコートバイアルを取り出して、別々の試験管中に入れた。一方のアリコートを20μlの10%NaN₃(Mallinckrodt, Paris, KY)と混和した。他方のアリコートは処理せずに、対照として用いた。各試験管に蓋をして、内容物を周囲温度で16時間インキュベートした。一夜処理後、NaN₃処理RBCは褐色となったが、一方未処理対照は赤色のままであった。

40

【0067】

パートB - うらBioVueカラム検査 - 二重カラム検定

異なるカラム(表6のカラム3および4)中で、10μlのA₁血球+40μlのB型血清を用いて、標準BioVueうら検査カセットで、アジ化ナトリウム処理血球を検査した。未処理

50

A 1 および B 血球である対照血球を、それぞれカラム 1 および 2 中で処理した。メーカーの使用説明書にしたがって遠心分離後、凝集 A 1 血球は、未処理対照血球（カラム 1）および処理被験血球（カラム 3）とともにビーズカラムの上部で観察されたが、これは、B 型血清中の抗 A の存在を示す。非凝集 B 血球は、未処理対照血球（カラム 2）および処理被験血球（カラム 4）とともにカラムの底部で観察されたが、これは抗 B の非存在を示す。未処理対照血球は外観が赤色で、処理被験血球は褐色であった。これらの結果は、A 1 および B 血球の処理が、ビーズカラム中で凝集するそれらの能力を損なわなかったことを示した。

【 0 0 6 8 】

パート C - うらBioVueカラム検査 - 単一カラム検定

10

実施例 2 のパート B において、A 1 および B 型血球を別々のカラム中で処理して、試料のうら血液型判定をした。次に、一方のカラムで、10 μ l の A 1 未処理血球（赤色）+ 10 μ l の B 型処理血球（褐色）を 40 μ l の B 型血清と併合した。遠心分離後、2 つの異なる血球集団が観察された。凝集化（A 1）血球はビーズカラムの上部で観察され、そして非凝集化褐色（B）血球はカラムの底部で観察された（表 6 のカラム 5）。結果は、正しいうら血液型が、正常の 2 つのカラムの代わりに 1 つのカラム（1 検査）で確定され得たことを示した。相互的に、10 μ l の処理 A₁ 血球と 10 μ l の非処理 B 血球を、本明細書中のパート B にしたがって検査し、結果は、凝集化褐色（A₁）血球および非凝集化赤色（B）血球を検出し得た（表 6 のカラム 6）。

【 0 0 6 9 】

20

このパート B および C からの結果を、表 6 に示す（図 9 参照）。

【 0 0 7 0 】

【表 6】

表6

異なる2種類の細胞集団の目視検出および識別

| | BioVue うら検査カラム数 | | | | | | |
|-----------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|----------------------------|---|---|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | |
| RBC (各10 μ l) | A ₁ untr | B untr | A ₁ tr | B tr | A ₁ untr + B tr | A ₁ tr + B untr | 10 |
| 遠心分離後 に観測され た反応 | 4+ | 0 | 4+ | 0 | 3-4+ 混合型 | 3-4+ 混合型 | |
| 説明 | ビーズカ ラムの上 部の赤血 球 | ビーズカ ラムの底 部の赤血 球 | ビーズカ ラムの上 部の褐色 血球 | ビーズカ ラムの底 部の褐色 血球 | ビーズカ ラムの上 部の赤血 球と底部 の褐色血 球 | ビーズカ ラムの上 部の褐色 血球と底 部の赤血 球 | 20 |
| | | | | | カラム中 で散乱さ れる血球 はほとん どない | カラム中 で散乱さ れる血球 はほとん どない | |

【0071】

注：カラムはすべて、示された赤血球の他に、40 μ l のB型血清を含有した。

untr 未処理対照血球

tr 処理済み血球

【図面の簡単な説明】

【図1】同時おもておよびうらABO式血液型判定の4色レーザー走査血球計算分析のグラフを示す。パネルAは、A型全血を用いた抗B FITCおよびA標識化RBCの前方(x軸)および側方(y軸)散乱(それぞれ緑色最大ピクセルおよび橙色最大ピクセル)を示す。凝集体の領域で、側方散乱プロットには何の事象も検出されない。さらに、緑色対橙色プロットにおいてさらに分析される側方散乱から得られる事象は何もない。パネルBは、B型全血を用いた抗B FITCおよびA標識化RBCの前方(x軸)および側方(y軸)散乱(それぞれ緑色最大ピクセルおよび橙色最大ピクセル)を示す。凝集体の領域で、側方散乱プロットにおいて事象が検出される。これらの事象が緑色対橙色プロットにおいてさらに分析される場合、試薬血球(橙色陽性)および被験rbc(緑色陽性)の両方の凝集体の存在を、我々は確認する。混合蛍光(混合緑色および橙色)を有するいくつかの凝集体が検出された。パネルCは、AB型全血を用いた抗B FITCおよびA標識化RBCの前方(x軸)および側方(y軸)散乱(それぞれ緑色最大ピクセルおよび橙色最大ピクセル)を示す。凝集体の領域で、側方散乱プロットにおいて事象が検出される。これらの事象が緑色対橙色プロットにおいてさらに分析される場合、試薬血球(橙色陽性)の凝集体を観察することはできないが、しかし被験rbc(緑色陽性)の凝集体の存在を、我々は確認する。混合蛍光(混合緑色および橙色)を有するいくつかの凝集体が検出された。パネルDは、O型全血を用いた抗B FITCおよびA標識化RBCの前方(x

30

40

50

x軸)および側方(y軸)散乱(それぞれ緑色最大ピクセルおよび橙色最大ピクセル)を示す。凝集体の領域で、側方散乱プロットにおいて事象が検出される。これらの事象が緑色対橙色プロットにおいてさらに分析される場合、試薬血球(橙色陽性)の凝集体を我々は観察するが、しかし被験rbc(緑色陽性)の凝集体の存在は確認されない。

【図2】同時おもておよびうら血液型判定の予測結果の略図を示す。図2は、標識化A試薬RBCおよび標識化抗BとA型全血との混和物は凝集体を生じないことを示す。

【図3】B型RBCと抗B(緑色)および抗A-A試薬血球(橙色)の凝集体を生じる、標識化A試薬RBCおよび標識化抗BとB型全血との混和物の略図を示す。

【図4】AB型RBC-抗B(緑色)の凝集体を生じる、標識化A試薬RBCおよび標識化抗BとAB型全血との混和物の略図を示す。

【図5】抗A-A型試薬血球(橙色)の凝集体を生じる、標識化A試薬RBCおよび標識化抗BとO型全血との混和物の略図を示す。

【図6】緑色凝集体、橙色凝集体、および混合橙色/緑色凝集体を示し、その各々が緑色対橙色最大ピクセルスペクトル上で異なる散乱を示す。

【図7】緑色対橙色最大ピクセルスペクトルに関する橙色凝集体、緑色凝集体および混合橙色/緑色凝集体の相対位置を示す略図である。

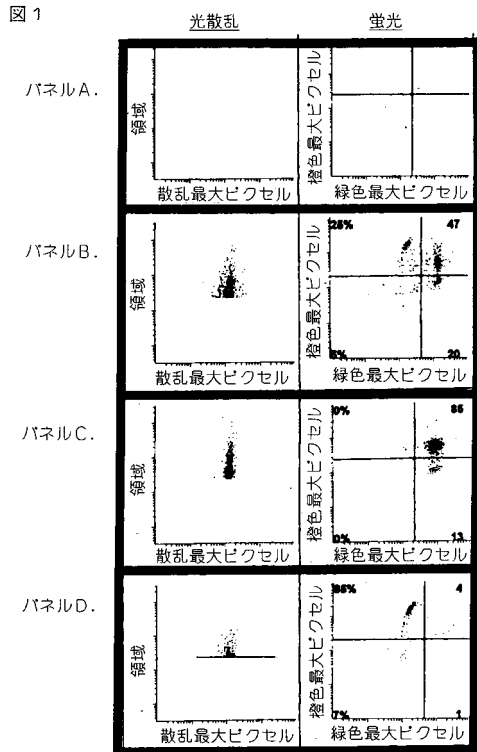
【図8】緑色対橙色最大ピクセル散乱スペクトルに関する橙色凝集体、緑色凝集体および混合橙色/緑色凝集体の相対位置(密度)を示す略図である。

【図9】CAT系におけるB型血清のうら検査の肉眼的検出の模式図である。標識化試薬AおよびB型赤血球はB型血清と混和されて、褐色凝集体を生じ、これは、延伸分離後、CAT系のゲルカラムの上部で観察される。未反応標識化試薬B型血球は、カラムの底部で観察される。

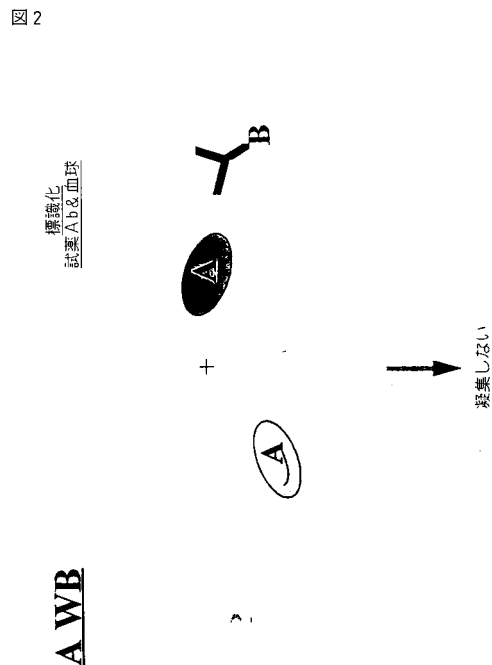
10

20

【図1】

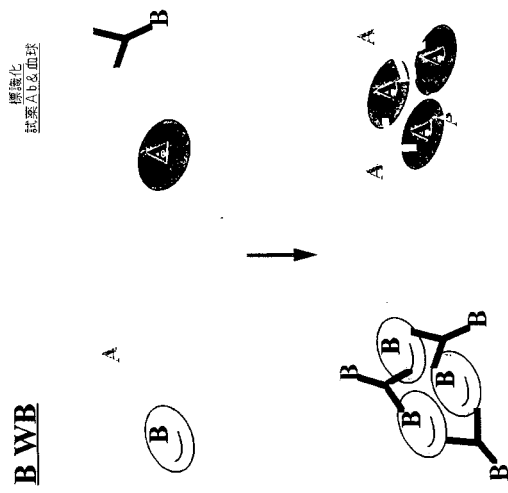


【図2】



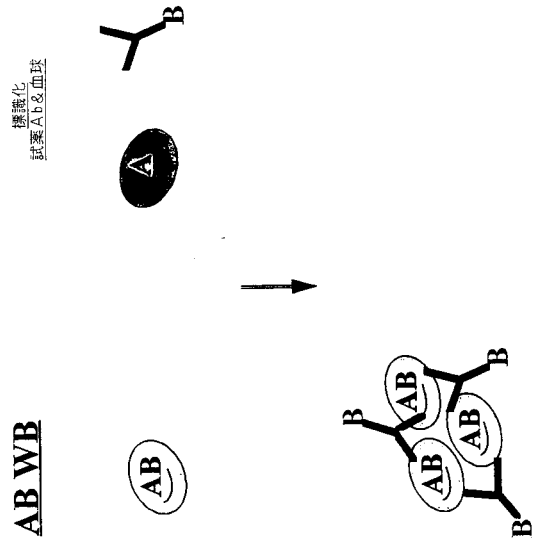
【 図 3 】

図 3



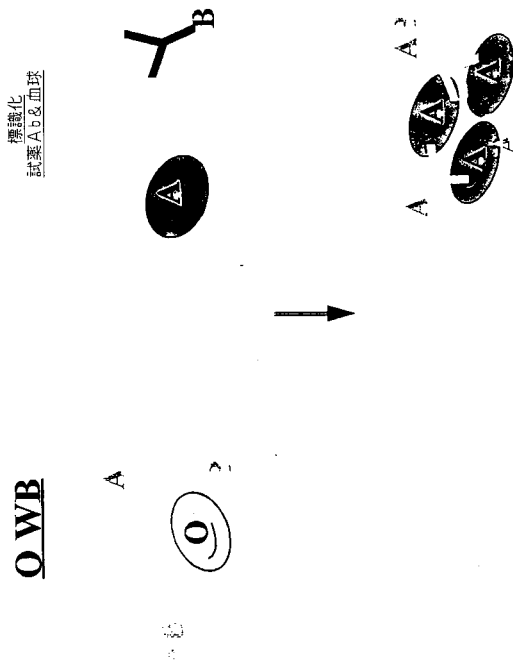
【 図 4 】

図 4



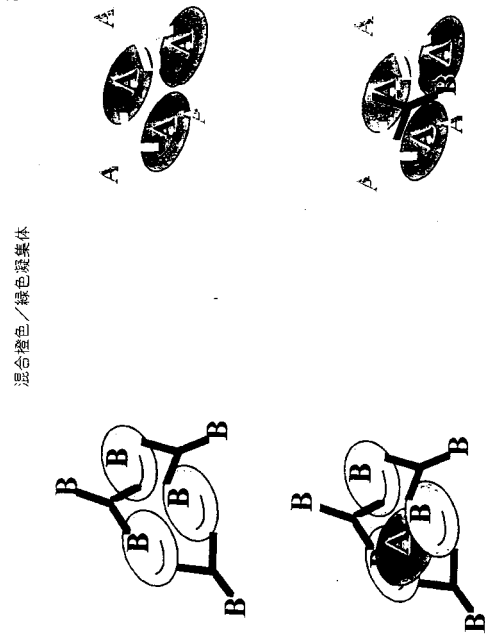
【 図 5 】

図 5



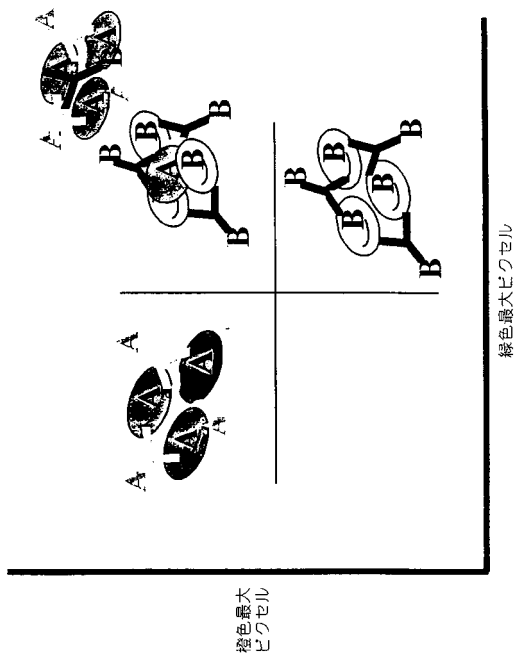
【 図 6 】

図 6



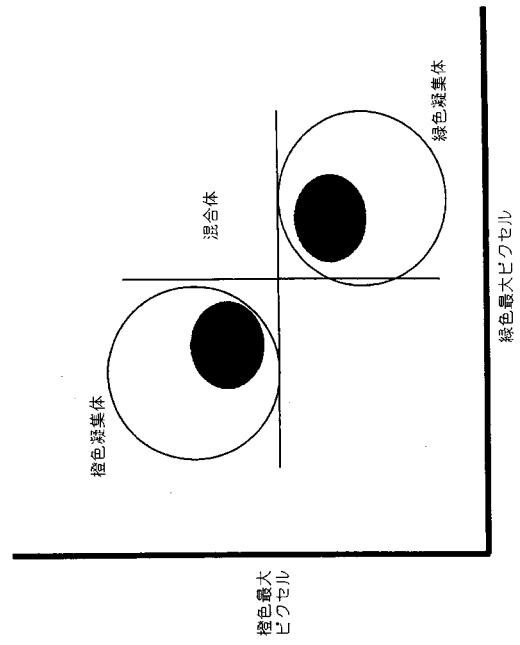
【 図 7 】

図 7



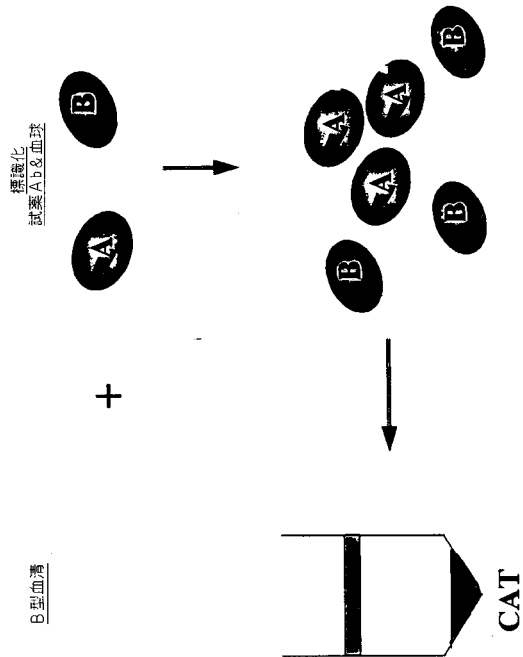
【 図 8 】

図 8



【 図 9 】

図 9



フロントページの続き

(74)代理人 100081330

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 トーマス ジェイ・マーコリノ

アメリカ合衆国, ニュージャージー 08559, ストックトン, ランバートビル ヘッドクォーターズ ロード 121

(72)発明者 キャサリン ジェイ・レイス

アメリカ合衆国, ニュージャージー 08848, ミルフォード, スウィフト ドライブ 803

審査官 草川 貴史

(56)参考文献 特開昭59-195160(JP, A)

特開平04-285858(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-33/98

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 血液分析方法和血液分析试剂盒 | | |
| 公开(公告)号 | JP4554766B2 | 公开(公告)日 | 2010-09-29 |
| 申请号 | JP2000171824 | 申请日 | 2000-06-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 奥索临床诊断有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 奥索 - 临床诊断, 雷法团去开球 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 奥索 - 临床诊断, 雷法团去开球 | | |
| [标]发明人 | トーマスジェイマーコリノ キャサリーンジェイレイス | | |
| 发明人 | トーマス ジェイ.マーコリノ キャサリーン ジェイ.レイス | | |
| IPC分类号 | G01N33/53 G01N33/80 G01N15/00 G01N21/64 G01N21/82 G01N33/49 G01N33/533 G01N33/536 G01N33/555 G01N33/567 G01N33/577 G01N33/58 | | |
| CPC分类号 | G01N33/80 G01N33/582 Y10S435/973 Y10S436/807 Y10T436/25375 | | |
| FI分类号 | G01N33/53.K G01N33/80 G01N33/533 G01N33/536.D G01N33/577.B | | |
| F-TERM分类号 | 2G045/AA01 2G045/AA08 2G045/CA02 2G045/FA16 2G045/FA29 2G045/FB03 2G045/FB12 2G045 /GC15 2G045/HA09 2G045/JA03 | | |
| 代理人(译) | 石田 敬 西山雅也 | | |
| 优先权 | 60/138136 1999-06-08 US | | |
| 其他公开文献 | JP2001004625A | | |
| 外部链接 | Espacenet | | |

摘要(译)

要解决的问题：使用视觉检测系统和基于荧光的标记和检测系统同时进行正面和反向血液分组检查，对血液样本进行细胞计数分析并检查细胞计数分析结果以检查A-，B-或O-型血型。解决方案：使血液样品与结合可检测标记的抗A和抗B抗体反应。使血液样品与保持标记的A抗原和标记的B抗原的试剂红细胞反应。对血液样品进行细胞计数分析。检查细胞计数分析以确定A-，B-或O-型血型。在该过程中，在荧光标记执行方法中，在正面检查中标记单克隆抗体。在反向检查中，标记试剂红细胞。有利地，提供了识别混合红细胞组（通过宏观或自动读取器）的能力。例如，反向检查不是通过两次检查而是通过单次检查进行的，因此可以减少要进行的检查次数。

A B O式血液型を判定し、確認するための反応性パターン

| WD試料群 | 検査1 | | 検査2 | |
|-------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|
| | FITC抗-A (緑色凝集体) | 橙色試薬B 血球 (橙色凝集体) | FITC抗-B (緑色凝集体) | 橙色試薬A 血球 (橙色凝集体) |
| A | + | + | 0 | 0 |
| B | 0 | 0 | + | + |
| AB | + | 0 | + | 0 |
| O | 0 | + | 0 | + |