

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5047803号
(P5047803)

(45) 発行日 平成24年10月10日(2012.10.10)

(24) 登録日 平成24年7月27日(2012.7.27)

(51) Int.Cl.	F I	
C 1 2 Q 1/06 (2006.01)	C 1 2 Q 1/06	
G O 1 N 33/53 (2006.01)	G O 1 N 33/53	D
G O 1 N 33/543 (2006.01)	G O 1 N 33/53	Y
G O 1 N 21/78 (2006.01)	G O 1 N 33/543	5 9 7
C O 7 K 16/28 (2006.01)	G O 1 N 21/78	C
請求項の数 15 (全 27 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2007-543297 (P2007-543297)
 (86) (22) 出願日 平成17年11月18日(2005.11.18)
 (65) 公表番号 特表2008-520247 (P2008-520247A)
 (43) 公表日 平成20年6月19日(2008.6.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2005/041917
 (87) 国際公開番号 W02006/055816
 (87) 国際公開日 平成18年5月26日(2006.5.26)
 審査請求日 平成19年12月5日(2007.12.5)
 (31) 優先権主張番号 60/629,654
 (32) 優先日 平成16年11月19日(2004.11.19)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(73) 特許権者 507162544
 トリリウム ダイアグノスティクス, エル
 エルシー
 TRILLIUM DIAGNOSTIC
 S, LLC
 アメリカ合衆国 メーン州 04074、
 スカボロー、リサーチ ドライブ 81、
 c/oメーン メディカル センター リ
 サーチ インスティテュート
 (74) 代理人 100102842
 弁理士 葛和 清司
 (72) 発明者 デービス, ブルース, エイチ.
 アメリカ合衆国 メーン州 04074、
 スカボロー、ティール ポイント 21

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】白血球 F c y R I 受容体 (C D 6 4) の定量化のための、ソフトウェアを統合したフローサイト
 メトリーアッセイ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

白血球における C D 6 4 および C D 1 6 3 発現を定量化する自動性能解析およびフロー
 サイトメーターの較正のためのキットであって、前記キットはフローサイトメーター、血
 液試料、プログラム可能なコンピューターおよびディスプレイスクリーンとともに用い、
 以下を含む前記キット：

(a) フルオレセインイソチオシアネート (F I T C) または同様の蛍光色素に結合した
 、 C D 6 4 を対象とする、少なくとも 1 つまたは 2 つ以上のモノクローナル抗体；

(b) フィコエリトリンまたは同様の蛍光色素に結合した、 C D 1 6 3 を対象とする、少
 なくとも 1 つまたは 2 つ以上のモノクローナル抗体；

(c) 少なくとも 1 つまたは 2 つ以上の蛍光色素とのポリスチレンマイクロビーズの懸濁
 液であって、蛍光色素の 1 つは C D 6 4 モノクローナル抗体に結合したものと同一であり
 、細胞に結合する抗体の蛍光に影響する同様の要素に対して環境的に感度がよく、および
 外部標準に対して追跡可能な前記懸濁液；

(d) 有効期限を有し、前記有効期限はかかるキットにおいて指定されている少なくとも
 1 つまたは 2 つ以上の蛍光色素；および

(e) 前記コンピューター上で操作をするソフトウェアであって、以下を含むソフトウェ
 ア。

1) それぞれの蛍光剤およびマイクロビーズの蛍光強度の情報であって、前記ソフトウェ
 アは前記コンピューターとともに、較正の計算および前記マイクロビーズに合わせた蛍光

情報を制御する操作をし、および前記スクリーン上に前記マイクロビーズの有効期限に関連させた期限日を、前記フローサイトメーターを前記マイクロビーズで較正する操作者に向けて表示をする操作をし、ここで前記ソフトウェアは、前記フローサイトメーターを、前記ソフトウェアおよび前記マイクロビーズを用いてもはや較正できなくなり、操作者が、他のマイクロビーズ群の懸濁液およびフローサイトメーターを較正するための前記他の懸濁液を用いる前記コンピューター上での使用に合わせたソフトウェアを使用しなければならない前記期限日において、前記コンピューター上での操作を止める前記情報；2) 蛍光シグナル、前角光散乱 (forward angle light scatter、FS) および 側角または広角光散乱 (side or wide angle light scatter、SS) を用いて血液試料上のデータを獲得し、そして自動的にゲートし、およびデータを平滑化し、それぞれのマイクロビーズおよび細胞特異的な集団に対応する蛍光強度におけるピークを配置し、直線回帰プロットを作成し、フローサイトメーターの蛍光閾値強度を決定し、ヒストグラムを作成する能力；3) 細胞特異的な集団を発見する能力；4) 自動データ正規化を実施する能力；および5) 特異的な細胞集団での CD 6 4 値および CD 1 6 3 値を計算する能力。

10

【請求項 2】

外部標準が NIST SRM 8640 である、請求項 1 に記載のキット。

【請求項 3】

CD 6 4 を対象とするモノクローナル抗体が Clone 2 2 である、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 4】

CD 6 4 を対象とするモノクローナル抗体が Clone 3 2 . 2 (ATCC 番号 HB - 9 4 6 9) である、請求項 1 または 2 に記載のキット。

20

【請求項 5】

CD 1 6 3 を対象とするモノクローナル抗体が Clone Mac 2 (ATCC 番号 HB - 1 0 7 1 4) である、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 6】

蛍光色素がフルオレセインイソチオシアネート (FITC) である、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 7】

マイクロビーズがポリスチレンを含む、請求項 1 または 2 に記載のキット。

30

【請求項 8】

細胞特異的な集団がリンパ球を含む、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 9】

細胞特異的な集団が単球を含む、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 10】

細胞特異的な集団が好中球を含む、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 11】

ソフトウェアがさらに、品質管理の機能を実施する能力を含む、請求項 1 または 2 に記載のキット。

【請求項 12】

品質管理の機能が、単球集団が蛍光モノクローナル抗体により同定される予測した CD 6 4 発現を有することを評価するものであり、結果的にそれぞれの試料に対する内部陽性対象としての役割を果たす、請求項 1 1 に記載のキット。

40

【請求項 13】

統合されたソフトウェア - 蛍光マイクロビーズ標準システムであって、
1 つまたは 2 つ以上の蛍光色素で標識したモノクローナル抗体、
抗体の標識に用いられる同様の 1 つまたは 2 つ以上の蛍光色素を含むマイクロビーズ、
および
コンピューターで実行するためのソフトウェアプログラムを記録したコンピュータ読み取り可能な記録媒体を含み、

50

ここで、前記ソフトウェアプログラムが、特定のロットのマイクロビーズ標準およびモノクローナル抗体の蛍光標識した混合物に適合し、マイクロビーズのそれぞれの群の蛍光強度に関する情報を含み；

マイクロビーズおよび蛍光試薬のそれぞれのバッチに対して、関連ソフトウェアプログラムは、バッチ内のマイクロビーズのそれぞれの群の蛍光強度に関する情報を含み；

前記ソフトウェアプログラムは、フローサイトメーターからのマイクロビーズ懸濁液および細胞に結合する蛍光標識抗体に関する情報を得て、データを解析し、曲線を平滑化し、新たなパラメーターを計算し、品質管理の手段を提供しおよび前記マイクロビーズおよび前記蛍光標識抗体の有効期限を示し；

前記ソフトウェアプログラムは、操作者に警告を発し、さらに使用者に使用中のアクセシロットおよび試料解析の一部として用いるフローサイトメトリー装置の型を確認するよう問いただし；

前記ソフトウェアプログラムの記録は、装置の性能の包括的な文書化を提供するため、累積的なファイル履歴をもたらし；

前記ソフトウェアプログラムは、異なる製造ロット間の蛍光発現におけるバイアスまたは相違を、ロット間の回帰分析およびソフトウェア内で前記マイクロビーズに割り当てられる蛍光価での変化により決定される要素により正規化し；

前記ソフトウェアプログラムは、前記マイクロビーズが、ロット間の5%未満の不正確レベルを確保するのに必要とされる蛍光強度の範囲内であるかどうかを決定するための、異なるマイクロビーズの製造ロットおよび異なる生物学的サンプルにおける蛍光標識抗体の製造ロットの相違のデータの比較をモニターする、前記システム。

【請求項14】

試料細胞に結合する蛍光標識抗体の実際の量が、外部標準を使用して決定される、請求項13に記載のシステム。

【請求項15】

血液試料におけるヒト白血球CD64 (Fc RI受容体) またはCD163の発現を定量化するための、請求項13または14に記載の統合されたソフトウェア - 蛍光マイクロビーズ標準システムの使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

発明の分野

本発明は、フローサイトメトリー、蛍光ラベル抗体、マイクロビーズ標準および統合されたソフトウェアを用いて定量化できる、細胞表面抗原の分野、発現、特にCD64およびCD163における定量化に関する。

【背景技術】

【0002】

背景

敗血症は、年間に推定で約750,000の新しい症例が発生する、米国において重大な健康問題である[1]。敗血症は11番目の主な死因であり、非冠状動脈疾患の集中治療室において死亡率30~50%である主な死亡原因である[1~3]。敗血症の頻度は10年の間で135%を越えて増加し、抗生物質耐性の増加に伴い上昇し続けると予測されている[1,4]。完全に進展した敗血症の症例に加えて、米国単独で年間基準で何百万もの重度の感染または診断評価を要する敗血症に類似する臨床徴候に罹患する患者が存在する。皮肉なことに、敗血症の処置はここ数十年の間に改善された抗生物質および新規の方法、例えば炎症反応の障害物質など、の新しい治療の選択肢とともに発展してきているが、診断および治療モニタリングを改善する変化は少ない[1~8]。今までのところ、感染または敗血症に罹患する患者の医療上の検出および確定をするためには、実験室血液試験を要する。

【0003】

感染または敗血症の実験室診断は、未だに1970年代またはそれ以前以来利用されてきているものと同様の、基本的な手段に依存している。感染または敗血症の可能性に関する臨床的決定は、典型的には、白血球計数、末梢血での未熟骨髄性細胞の存在（バンドまたは「左方移動」）、「急性期反応物質」に対する実験室試験、例えばC反応性タンパク質など、および臨床所見、例えば発熱など、に対してなされる。細胞性診断パラメーターは典型的には問題があり、特に乳幼児[9, 10]および高齢者[11]で特異性を欠く。さらに、近年の証明されるところによれば、白血球計数は外科手術に際し腹部痛を有する患者における臨床的決定に対し重大な影響をもたらさないかもしれず[12]、バンド計数はある患者において感染の可能性に対し診断情報をほとんど提供しないかまたは全く提供しないかもしれない[13, 14]ということを示唆する。C反応性タンパク質（C

10

【0004】

CRP値の長所、例えば解釈の主観性および改善された感度および特異度などは、研究により白血球の計数および未熟値の診断的有用性が乏しいと実証される患者群、例えば新生児、高齢者および免疫不全患者などで最も明白である。しかしながら、敗血症または感染検出にあたってのCRP値への依存は、合併疾患過程を伴う患者においては問題のあるものである。多数の急性期反応物質の1つであるところ、CRPは感染においてだけでなく、組織損傷を伴ういかなる疾患過程においても上昇する[16, 18, 20, 21]

20

【0005】

同様に、ここ10年間、敗血症患者における、IL-6および腫瘍壊疽因子（TNF）値など、サイトカインレベルの実現性のある診断の有用性が熱望視されている。しかし、かかる研究は該して、かかる試験に対する明白な診断的有用性を実証し損ねてきており、加えて、かかる炎症性物質の短い半減期および試料の安定性の問題があると示されてきている。分子的診断もまた、早期の検出または診断に対する新規の手法であると有望視されるが、所要時間、感度またはコストの技術的な限界のために、未だに不十分である[32, 33]。PCT、サイトカイン、TNFおよび他の分子診断は、現在実験的なものに留まり、今までin vitroの診断に関してFDAを通過したものはない。

30

【0006】

敗血症および重度の感染に対する最適な診断は、全身炎症反応に関連する早期の特定的な変化を対照とすべきである。感染または組織損傷に関する急性炎症反応を検出する現在の実験室試験における主な問題の1つは、特異性を欠如することである[14]。

【発明の開示】

【0007】

発明の概要：

40

本発明は、白血球でのCD64およびCD163発現を定量化する方法、および、特に定量的蛍光マイクロビーズ標準の懸濁液、CD64およびCD163を対象とする蛍光標識抗体および解析ソフトウェアを含むフローサイトメーターでの使用のためのキットに関する。前記ソフトウェアは、フローサイトメーターからのマイクロビーズ懸濁液および蛍光標識抗体に関する情報を得、データを解析し、曲線を平滑化し、新たなパラメーターを計算し、品質管理の手段を提供しおよびアッセイシステムの有効期限を示すために用いられる。

【0008】

統合されたソフトウェア - 蛍光マイクロビーズ標準システムは、モニターし、蛍光強度測定を最適化し、感度を増強させる強力なツールである。ソフトウェア、定量化標準およ

50

び蛍光ラベル抗体の統合により、アッセイシステムの異なる製造ロット間の白血球でのCD64およびCD163の測定における改善された再現性を実現する。全体の較正および解析を5分未満で完了し、概要の報告がプリンター上に作成される。全ての結果は、装置の性能の包括的な文書化を提供するため、自動的に累積的なファイル履歴に記録される。

【0009】

全ての蛍光分子は分解および製造ロット間の結合効率の変動にさらされるため、前記ソフトウェアは特定のロットのマイクロビーズ標準およびモノクローナル抗体の蛍光ラベル混合物に適合する。そのため、マイクロビーズおよび蛍光試薬のそれぞれのバッチに対して、関連ソフトウェアプログラムは、バッチ内のマイクロビーズのそれぞれの群の蛍光強度に関する情報を含む。前記キットが期限日に近づくと、前記ソフトウェアは操作者に警告を発生し、さらに使用者に使用中のアッセイロットおよび試料解析の一部として用いるフローサイトメトリー装置の型を確認するよう問いたす。本発明の新規の特性の1つは、生物学的試料、特定的にはCD64およびCD163発現レベルの異なる白血球を含むヒト血液サンプルの使用を通じて、製品ロット間の標準化をモニターし較正することである。

10

【0010】

異なる製造ロット間の白血球CD64およびCD163発現におけるバイアスまたは相違は、ロット間の回帰分析およびソフトウェア内でマイクロビーズに割り当てられる蛍光価での変化により決定される要素により正規化される。異なる生物学的サンプルにおいてなされるアッセイキットの異なる製造ロットのこれらのモニターするところの比較は、蛍光強度が必要とする範囲内であり、アッセイロットの5%未満の間の不正確レベルを確保する。本発明のマイクロビーズおよびソフトウェアを用いるフローサイトメーターの日々の較正により、試薬、細胞調製技術、操作条件または染色細胞サンプルによる複雑さにかかわらず、蛍光強度を客観的、包括的にモニタリングできるようになる。

20

【0011】

いったん較正がなされると、試料細胞に結合する蛍光抗体の実際の量を、外部標準、例えばNational Institute of Standards and Technology (NIST)製のSRM8640などを使用して、決定してもよい。この測定を、蛍光標識抗体を用いたCD64分子(受容体)数の計算のために、または絶対的な分子発現に相当する抗原発現価の決定のために使用してもよく、そのため、感染の早期の診断において有用である。

30

【0012】

特に、本発明は白血球におけるCD64およびCD163発現を定量化のための自動性能解析およびフローサイトメーターの較正のためのキットを含み、前記キットは蛍光検出機能を有するフローサイトメーターまたは血球計測器、血液試料、プログラム可能なコンピューターおよびディスプレイスクリーンとともに用いられ、前記キットは以下を含む：

【0013】

- (a) フルオレセインイソチオシアネート(FITC)または同様の蛍光色素に結合した、CD64を対象とする、少なくとも1つまたは2つ以上のモノクローナル抗体；
 - (b) フィコエリトリンまたは同様の蛍光色素に結合した、CD163を対象とする、少なくとも1つまたは2つ以上のモノクローナル抗体；
 - (c) 限られた期間の時間にわたり信頼できる蛍光安定性を有する、マイクロビーズの懸濁液；
 - (d) 少なくとも1つまたは2つ以上の蛍光色素であって、前記蛍光色素は有効期限を有し、前記有効期限は前記キットに指定されている；
- および、(e) 前記コンピューター上で操作をするソフトウェアであって、以下を含む、

40

【0014】

1) 各々の蛍光剤およびマイクロビーズの蛍光強度に関する情報であって、前記ソフトウェアは前記コンピューターとともに較正の計算および前記マイクロビーズに合わせた蛍光情報を制御する操作をし、および前記マイクロビーズで前記フローサイトメーターを較正する操作者に、前記マイクロビーズの耐用年数に相関する有効期限を前記スクリーン上に

50

表示をする操作をし、ここで前記ソフトウェアは、前記フローサイトメーターを、前記ソフトウェアおよび前記マイクロビーズを用いてもはや較正できなくなり、操作者が、他のマイクロビーズ群の懸濁液およびフローサイトメーターを較正するための前記他の懸濁液を用いる前記コンピューター上での使用に合わせたソフトウェアを使用しなければならない有効期限において、操作者が正確に装置モデルを理解せずアッセイキットで正さない場合、前記コンピューター上での操作を止める、前記情報；

【 0 0 1 5 】

2) 蛍光物質を使用した血液試料に関するデータを得る能力であって、前角光散乱 (forward angle light scatter、" F S ") および側角または広角光散乱 (side or wide angle light scatter、" S S ") を用い、そのようにして自動的に特定の細胞部分群をゲートするかまたは同定し、データを平滑化し、それぞれのマイクロビーズおよび細胞特異群に対応する蛍光強度のピークを配置し、直線回帰プロットを作成しフローサイトメーターの蛍光閾値強度を決定し、およびヒストグラムまたは図形表示を作成する前記能力； 3) 反復集団発見アルゴリズムを用いて、特定の細胞集団を発見する能力； 4) 自動データ標準化を実施する能力； および 5) C D 6 4 および C D 1 6 3 値を計算する能力。

10

【 0 0 1 6 】

そのため、本発明の C D 6 4 アッセイは、重篤な感染での全ての年齢の個々人の診断、治療的モニタリングおよび管理において顕著な進歩を示す。他の同等に顕著な C D 6 4 アッセイの社会的な利益は、ヒト敗血症および感染のより感度がよく特異的なアッセイを提供することにより、大きくなりつつある世界規模の健康面の関心事である、細菌の抗生物質耐性の拡大の減少という第 2 の効果もまたあるということである。

20

【 0 0 1 7 】

本発明の他のおよびさらなる特性および長所は、開示の目的のための本教示のさまざまな実施の以下の記載から明らかとなるであろう。

【 0 0 1 8 】

図表の簡単な説明

図 1 は、培養下での患者 P M N C D 6 4 発現の図表の表示であり、健全な対照群 (丸印) の正常な低値と比較して、感染 (ダイヤモンド印) では集団の 97.5% よりも多くで上昇すると証明される； P M N C D 6 4 値は好中球白血球計数で較正しておらず、値は感染する患者では増加するが、正常好中球計数である。

30

【 0 0 1 9 】

図 2 は、P M N C D 6 4 値単位から導き出されるビーズ較正を用いて定量化された、正常 (上のパネル) および上昇 (下のパネル) 好中球 C D 6 4 でのヒト血液のフローサイトメーター解析を示す；リンパ球、単球ならびに好中球の他の血液白血球集団 (図中ゲートする領域で示す) を、アルゴリズムおよびサンプルの抗 C D 6 4 F I T C および抗 C D 1 6 3 P E 染色を発見する反復集団を用いたソフトウェアデータ解析を通じて同定する。

【 0 0 2 0 】

図 3 は、定義された内部細胞コントロールが「通過」しないサンプルのソフトウェア解析を実証するか、または、典型的には不適切な装置の設定または間違っただ剤の添加による C D 6 4 発現欠損リンパ球 (上のパネル) および、通常は血液サンプルに加える不十分な抗 C D 6 4 剤の結果である明白な C D 6 4 発現を欠損する単球 (下のパネル) による予測された結果を実証する。自動化フラグまたはポップアップボックスにより、使用者にアッセイの技術的性能に関する問題を警告する。

40

【 0 0 2 1 】

図 4 は、Trillium P M N C D 6 4 値の、M E S F を用いた P M N C D 6 4 発現の測定の前記測定方法に対する優れた関連性が、2 つの別の臨床的研究で所見されることを示す。

【 0 0 2 2 】

図 5 は、P M N C D 6 4 のレベルが、病院の救急治療室において所見される患者の臨床インプレッションと関連することを示し (左下)、全身炎症反応に対するスクリーニン

50

グにおけるCD64アッセイの役割を示唆し、患者を適切な医療管理の設定および治療へとトリアージする；好中球スコア（左下で定義する）および好中球計数またはCRPレベル間の同程度の関連性は、同じ研究では観察されなかった（左上および右）。

【0023】

図6は、ロット間関連が高いが、マクロビーズ蛍光および抗体蛍光色素結合効率における相違のために、PMN CD64値において相違が存在することを示す（左上のパネル）。しかしながら、複数の生物学的血液サンプルにおけるロット間比較に基づきマイクロビーズ蛍光値を割り当てるLeuko64ソフトウェアを用いる本発明は、良好なロット間関連ならびに低度のロット間不正確を実現する（右上のパネル）。本発明はまた、前記ソフトウェアでの単球CD163値に対するロット間不正確の同様の改善も実現する（下のパネル群）。

10

【0024】

発明の詳細な説明：

本発明の発明者たちおよび他の者たちは、PMN CD64発現が活動性急性炎症反応の特異的な診断的指標を示すということを報告した[34~43]。好中球類（PMN）および他の白血球類、たとえばCD11b、CD18、CD16、CD45RAおよびCD62Lなどでの抗原性の変化に関連する多くの他の活性化とは異なり、好中球CD64は健康個人におけるごくわずかな発現を有し、血液サンプル操作に対する感度に根拠を示さない[35, 37]。多くの他の骨髄性抗原、例えばCD16またはCD11bなどと対照的に、健康な個人および上方調節されたCD64発現の個人両方におけるPMN CD64発現は、走化性の要素、PMAまたはin vitroでの細菌への暴露により変化しない[35, 37, 38, 44, 45]。

20

【0025】

加えて、PMN CD64発現は抗凝固血液サンプルにおいて、48時間以内は安定である[35, 45]。加えて、Trilliumでの先の研究により、他のPMNおよび単球抗原、例えばCD11b、CD14、CD32およびCD62Lなどと対照的に、健康妊婦でない期間のCD64が正常レベルであることを示しており、妊娠期間中の女性において顕著な変化を示すということを報告している[46, 47]。このようにPMN CD64が診断試験として実践的であることを示し、外来患者および入院患者両方に対するいかなる実験室設定においても実施が可能となる。炎症関連サイトカイン、例えばG-CSFおよびインターフェロン（IFN-）などによるPMN CD64の上方調節は、細胞表面発現に対しては4~6時間およびノーザンブロット解析による検出可能なmRNA増加に対しては1~3時間の短いタイムスケールで発生する[35, 40, 48~50]。

30

【0026】

PMN CD64のこの上方調節は、直接増強した殺菌性[40]および抗真菌性[41]活性と関連があるように見える。CD64の正常好中球発現が細胞あたり1000部位より少なく、検知可能な上方調節を急性組織損傷、感染の播種、組換えインターフェロンまたはG-CSFの投与後4~6時間以内に発見できるならば、早期の診断が可能である。つまり、PMN CD64の定量化により、白血球計数、ミエロイド未熟度評価、および急性期反応物質と比較した改善された診断としての理想的な対象であると、表1に羅列した理由および図1におけるデータにより示される。要するに、定量化PMN CD64測定方法により、全身急性炎症反応の臨床的に有用である診断的な細胞を基とするパラメーターの実現性を、まず提供する。

40

【0027】

表1. PMN CD64アッセイの臨床的有用性に対する論理的根拠

- ・PMN CD64発現は健全な状態でごくわずかであり、炎症関連サイトカイン（IFN-、IL-12、G-CSF）の影響下で増加する。
- ・PMN CD64発現が増加する結果、増強した抗体媒介の機能的反応（ファゴサイトーシス、酸化破壊、細菌性活性）がPMNで起こり、病態生理学的な明白な変化が起こる。

50

- ・定常的に収集し操作した抗凝固血液サンプルに関し、室温で30時間および冷蔵で48時間の間、測定的に安全である。
- ・1時間以内に実施されるアッセイであり、少ない分量しか必要とせず、一括処理解析が可能である。
- ・敗血症、感染または全身急性炎症と高度に関連する、PMN CD64の増加。
- ・全身性炎症反応のPMN CD64バロメーターのレベル - 抗細菌用途での治療的モニターの役割に対する可能性。
- ・絶対的な好中球計数、バンド計数、CBC装置減少、沈殿率、C反応性タンパク質に対する代替をなさない、CD64上方調節。
- ・CD64上方調節が可能な、全ての年齢および免疫抑制状態の患者
- ・高い特異性の、PMN CD64発現が以下において上昇しない：
 - ・骨髄性細胞(CML、MPD、MDS)の悪性度
 - ・任意の薬物両方(サイトカイン以外)
 - ・局所組織損傷を伴う臨床状態(心筋虚血、単純な外科手術および運動での損傷)
 - ・妊娠

10

【0028】

フローサイトメーター定量化技術は、骨髄性細胞におけるCD64発現を実現する研究の大多数で採用される手順であった。この装置は、臨床試験の高度に複雑な形態と考えられるが、米国および多くの先進工業国において大学医療センター、大規模な三次医療地域病院および参照診断試験所で現在利用可能である。臨床的適用に間して最も優れた手順は、本発明の発明者たちにより開発されてきており、抗CD64に直接結合して用いる全血溶解技術および標準化蛍光ビーズを立証する[35, 37, 40, 52, 53]。現行の手順は50 μ l以下の全血が必要であり、このため全ての年齢の患者の試験に利用可能である。前記アッセイの正確さは、5%未満の変化率しか有さずして再現可能であると立証され[35]、そのため正確さにおいて他の臨床的実験室アッセイと非常に競合する(図2, 3)。

20

【0029】

臨床的診断試験に対するのと等しく実践的に重要であるところ、定量化PMN CD64の結果は、室温で少なくとも30時間および冷蔵温度で保った抗凝固血液では72時間まで安定である。その結果を、CD64モノクローナル抗体およびアイソタイプ対照抗体の間の相違に由来する、平均等価溶解蛍光単位(mean equivalent soluble fluorescence units(MESF))により定量化できる。日々の結果およびアッセイ間の結果を、Quantum 26 FITCビーズ(かつてのFlow Cytometry standards, San Juan, PR, now Bang Labs, Fishers, IN)の使用およびLeuk64ソフトウェア(Verity Software House, Topsham, Maine)でのコンピューターデータ解析により較正する。代替的に、正確な蛍光色素体タンパク質(F/P)率の決定により、MESF単位を、細胞あたりの実際の平均抗体結合または抗原(モノクローナル試薬が単量体の場合)部位に変換できる。前記方法で問題なのは、定量化のためのビーズを用いるCD64に対するフローメーターアッセイは感度が良好で相対的に正確であるのだが、PMN CD64臨床アッセイに必要な費用は相対的に高く(試験あたり>50\$)、技術的な時間および複雑さはビーズおよび抗体のロット間の測定の不正確に左右される。

30

40

【0030】

本発明はPMN CD64発現の定量化の新規の方法であり、一見、以前のフローサイトメータービーズアッセイと同等ではあるが、アッセイに対して低コストであり、ロット間の不正確さは著しく低下する。CD64の定量化の新規の方法、つまりPMN CD64値は、リンパ球、つまりCD64発現を欠く白血球細胞集団、またはマイクロビーズ懸濁液に対する、好中球への抗CD64抗体結合の率に基づく。今までの進展により、PMN CD64値がビーズ較正を用いるより複雑なCD64定量化と実質的に同等であることが示唆される(図4)。

【0031】

50

今までのPMN CD64測定の研究により、全身性感染の検出に対し98%より大きい、高度の特異性が示唆される[35, 38, 41, 42, 54]。感染に関連する急性炎症反応を同定する感度に関し、興味深いことに、好中球、沈殿率および/またはバンドの存在には弱い関連しかなく[35, 37]、付加的な診断情報が標準的実験室試験手段と比較してCD64測定により活用されるということを示唆する。上昇した好中球計数に対する複数の臨床の上昇が存在するならば、PMN CD64発現に対する可能性により感染の増加した診断的感度および特異度を提供し、時間に関して臨床的設定で実施できる能力を伴うものでもあり、臨床的有用性を見い出すであろう。

【0032】

臨床的血液サンプルは、増加した好中球計数またはバンド計数と平行して、増加したPMN CD64発現に対する中等度の傾向に対して抑制を弱く示すが[35]、PMN CD64発現および白血球の一覧が調和する場合に、臨床的サンプルを一貫して同定する。上昇した絶対的好中球計数を伴う臨床的サンプルは、通常のCD64発現を呈するが、3つの臨床的状況で共通して見られる。かかる状況は糖質コルチコイドまたはステロイド療法、初期の術後期間、および慢性骨髄増殖性障害であるが、そこにおいて治療するところの内科医は上昇するPMN計数を予期するようになってきており、さらなる治療行為または感染への危惧に対する必要性がなくなる。100症例を越える、慢性骨髄性白血病、慢性骨髄増殖性疾患および骨髄異形成症候群の今までの観察により、成熟骨髄性細胞においてCD64発現が増加しないことが示されてきている。ただし、感染または他の確認できるまたは急性炎症過程の確定を報告された患者を除く[45, 55, 56]。

【0033】

そのため、PMN CD64発現のもう1つの付加的な可能性のある臨床的適用は、また、好中球増加をもたらす血液学的悪性腫瘍から急性炎症反応を区別するために用いることができるであろう。結果とする状況は、増加したPMN CD64が正常または低下した好中球計数と平行して観察されるところであるが、患者が骨髄抑制性薬物、例えば癌の化学療法など、を受ける臨床的状況において最も共通して観察され、未だに感染の臨床的徴候または実験室的確証を有する。特異的な臨床条件における定量化PMN CD64測定の診断的有用性を立証し、in vitro診断試験としてFDAの認可を得るためには、さらなる研究を必要とする。

【0034】

しかしながら先行文献は、PMN CD64発現のレベルが、臨床的な感染可能性[35, 37~39, 41~43]ならびに感染の型(グラム陽性菌と比較して高いPMN CD64発現を含む、グラム陰性菌)[42]と関連することを示唆する。加えて、図5で示すように、PMN CD64発現の規模は、全身性感染と比較して一見低く局在化する[37, 42]。要するに、本発明はPMN CD64診断試験に関する; 1)感染を示唆する臨床徴候を有する患者に対するトリアージの役割としての機能; 2)全身性炎症反応の定量化評価を提供する; 3)上昇した白血球計数に対する炎症関連および白血病関連の要因の間の区別をする; 4)敗血症または感染患者における治療的モニターとしての役割をする。

【0035】

本発明のアッセイで用いる構成要素:

以下は、多形核白血球でのCD64発現の定量化による、炎症に対するアッセイおよび組織損傷の検出で用いられる要素および試薬のリストである。

(A)フルオレセインイソシアシアネート(FITC)または同様の蛍光色素に結合した、CD64を対象とする、少なくとも1つまたは2つ以上のモノクローナル抗体;

(B)フィコエリトリンまたは同様の蛍光色素に結合した、CD163を対象とする、少なくとも1つまたは2つ以上のモノクローナル抗体;

(C)ポリスチレンマイクロビーズの、少なくとも1つまたは2つ以上の蛍光色素との懸濁液であって、蛍光色素の1つはCD64モノクローナル抗体に結合したものと同一であって、抗体の蛍光に影響を及ぼす同じ要素に対して環境的に感度がよく、および例えばNI

10

20

30

40

50

ST SRM 8640などの外部標準に対して追跡可能である。

(D) マイクロビーズに対する蛍光価を割り当てられるようにし、ならびにCD64およびCD163の発現、およびユーザーの相互影響に対し独立してゲートする細胞集団の測定を定量化を較正できるようにする、Leuko64ソフトウェア。

【0036】

Leuko64ソフトウェアの説明：

PMN CD64に対する現在のアッセイは、フローサイトメーターのデータを解析できるサードパーティーのソフトウェアを用いて実施できるが、かかる方法はデータ解析において、典型的には技量の幅を有するところの、末端ユーザーに依存するある程度の主観性が残存する。そのため、かかるアッセイ結果において、間違いや主観性に対する可能性が存在する。それゆえ、データ解析におけるユーザーの主観性を最小化し、アッセイを能率化する好ましい方法は、CD64アッセイでのフローサイトメーターデータに対するソフトウェアを含有する。Leuko64 CD64アッセイキットは、アッセイ試薬の期限外と平行して、キットの期限外を示すであろうソフトウェアを含む。かかるソフトウェアは、細胞集団（リンパ球、単球および好中球）を発見し、自動データ標準化およびPMN CD64 価の計算を実施する能力を有する。

【0037】

加えて、かかるプログラムは、品質管理の機能として、いくつかの特定の解析を実施でき、例えば、単球集団が予測したCD64発現を有するものであると蛍光抗体試薬を同定することにより評価し、そうすることによりそれぞれの試料に対する内部陽性対照としての役割を果たし、およびリンパ球集団が有意なCD64発現を有しないと評価し、それによりそれぞれの試料に対する内部陰性対照としての役割を果たす。最も重要なことには、かかるプログラムは多様な市販の臨床的フローサイトメーター装置からの急速なデータ解析を可能にし、品質管理に関する「フラグ」を操作者に提供し、およびデータ解析の標準化を改善しアッセイの不正確さをさらに最小化する。

【0038】

本発明の好ましい態様は、ソフトウェアの統合およびCD64およびCD163値に対するビーズ蛍光値割り当てであり、特異的な蛍光色素に対する蛍光の参照標準へと追跡可能である。生物学的細胞サンプル、例えば血液白血球など、アッセイロット間の回帰相関を用いたビーズのこの値の割り当てにより、低い程度のアッセイロット間の不正確が提供され、そのようにして臨床実務において診断の有用性を改善する。

【0039】

例示：

ここでの例は本発明のさまざまな態様を記す目的のために提供し、本発明をいかなる方法においても限定を意味するものではない。ここで述べる全ての文書を、その全体で引用文献として組み込む。

対象を実施し、記載するところの結果および長所ならびにそこに具備されるものを得るように本発明が構成されていることを、当業者は容易に理解するであろう。本発明の精神または範囲から出発せず、さまざまな派生および変化を本発明の実践において為せるということは、当業者にとっては明らかであろう。請求の範囲で定義する発明の精神内に含まれる当業者は、そこでの変化および用途に到達するであろう。

【0040】

例1：白血球CD64アッセイ：

PMN CD64の血液サンプルのフローサイトメーター解析に対する方法を簡単に概要を述べるが、詳細はDavis et al [34~37, 40, 52, 53, 58, 59]により提供される。フローサイトメーターCD64染色および解析の現行の手順は、以下の通りである：

【0041】

Trillium診断白血球CD64アッセイ染色の手順：

1 10X Trillium Lyse (試薬B) を、1部分の濃縮試薬Bを9部分の濾過蒸留水

10

20

30

40

50

で混合し、1 : 10 で希釈する。試験の予想回数に対する十分量を調製する（各々のサンプルに対して1.0 mL 必要である）。希釈試薬Bの最終pHは、 7.40 ± 0.02 とする；必要ならばNaOHまたはHClで調整する。希釈または1X Trillium Lyseは、室温（20 ~ 26 °C）で1週間または2 ~ 8 日で30日間、安定である。

2 希釈溶液は、使用時は20 ~ 37 °Cとする。溶液を冷却すると、結果として溶解が不十分となるかもしれない。

3 50 μ LのLeuko64試薬Aを12 x 75 mmのポリスチレンチューブに分割する。

4 $< 2.5 \times 10^9$ 細胞/L白血球計数（必要ならば希釈する）の混合抗凝固血液サンプルを試薬A含有チューブへと分割し、静かに混合するかボルテックスし、暗所・室温で10分間培養する。

5 1.0 mLのTrillium Lyse(希釈した試薬B)を加え、完全にボルテックスする。暗所・室温に15分間置く。間欠的にボルテックスするか混合すると、溶解が増強する。

6 5 μ LのLeuko64ビーズ（試薬C）を各々のチューブに加え、装置の設定および以下の解析プロトコルを用いたフローサイトメーターで解析する。調製サンプルは2 ~ 8 日で維持すべきであり、解析まで光から遮断するべきである。解析は染色から24時間以内に実施すべきである。

【0042】

CD64装置構成ビーズ試料：

フローサイトメーターの設定

1 5 μ LのLeuko64ビーズ（試薬C）を0.5 mLの1xTrillium Lyse（試薬B 濾過蒸留水での1 : 10希釈、pH 7.40 ± 0.02 ）を含有するチューブに加える。これを装置のPMT電圧および分散設定を確立するために用いる。

2 4つの2パラメーターヒストグラム：

FS(lin)対SS (log)

CD64 FITC対SS (log)

CD163対SS (log)

CD163 PE対CD64 FITC

および、3つの1パラメーターヒストグラム：

FL1-CD64 FITC

FL2-CD163 PE

FL3（685 nmを検出できる、フィルター設定でのPMT）

3 全ての補正設定をOFFにする。

4 ビーズ懸濁液を流し、1024チャンネル解像度における、1パラメーターヒストグラムで以下の調整をする（ダイアグラムを参照）：

・ FL1（FITC）軸上のピークの中心を、蛍光強度の第2 decadeの末端にする（MFI = ~ 90）。

・ FL2（PE）軸上のピークの中心を、MFI = ~ 20にする（蛍光強度の第2 decadeの第1チック）。

・ FL3軸上のピークの中心を、第2 decadeのスケールの中心にする（MFI = - 30）。

【0043】

5 FS対SSのヒストグラムにおいて、ビーズ群をlog側の散乱シグナルの第3 decade、および前方角および低角散乱シグナルのチャンネル85から125に位置させる。

6 血小板および赤血球の破片を除外する閾値を、リンパ球を用いてSS (log)に設定する。破片および小粒子を除く識別は、リンパ球のちょうど左側に設定すべきである。

7 獲得および蓄積の設定を調節し、50,000の非ゲートイベントをできるようにする。1024で設定の解像度が一般的に推奨されるが、Beckman Coulter FC-500（登録商標）またはBecton Dickinson FACSCanto（登録商標）サイトメーターを使用する場合は

10

20

30

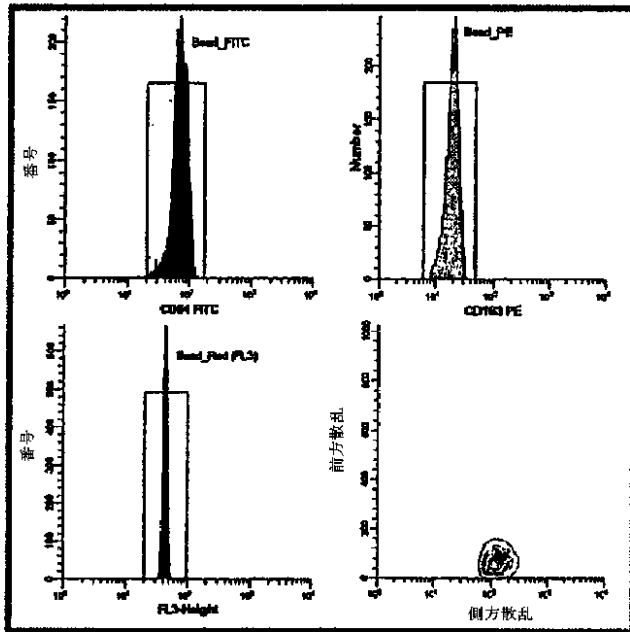
40

50

必須である。

8 設定および取得テンプレートを保存する。

【表 1】



10

20

【0044】

フローサイトメトリーの獲得：

1. フローサイトメーターの日常の装置QCプログラムを実施し、サイトメーターが試料取得のための準備が整っていることを決定する。
2. CD64プロトコールを呼び出し、ビーズを含む染色した試料を流す。
3. 少なくとも50,000イベント取得し、Leuko64ソフトウェアでの解析のためのリストモードファイルを保存する。

【0045】

リストモードファイルの解析：

1. 結果の計算のために用いるソフトウェアプログラムである、Leuko64ソフトウェア
2. ビーズミックスリストモードファイルを呼び出し、Leuko64のマニュアルの指示に従い、Leuko64プログラムを開始する。
3. 第1のリストモードを呼び出し、解析する。リンパ球、単球および顆粒球の白血球集団近辺の粗いゲートが正しく配置されていることを確認する。必要ならば、ゲート領域を適切な細胞集団を囲むように調節できる。
4. 試料のリストモードファイルの解析を、ステップバイステップの方法で、または自動化バッチ解析の方法で解析できる。解析結果をデータベースに蓄積でき、結果印刷を提供し結果の文書化および白血球部分群の適切なゲートの再検討を可能にする。
5. リンパ球または単球のフラグまたは警告ダイアログボックスの出現のために解析が終止される場合、使用者はこれらの不都合な所見の可能性のある原因を調査し、再解析および/またはサンプルの再染色を考慮する(必要ならば)。

30

40

【0046】

手順の限定：

1. 適切な数のビーズイベント(500以上)を取得することが必要不可欠である。不適切なビーズ数は、無効なCD64およびCD163値の結果の原因となるかもしれない、その結果として間違った陽性または陰性結果を引き起こすかもしれない。
2. ある試料は完全に溶解しない。しかしながら、注目は好中球およびビーズの集団であり、それでもなお試料を流すことができる。識別の設定が最適化されない場合、リスト

50

モードファイルは統計的に正常であるビーズまたは細胞イベントを不十分にしか有していないかもしれない。

3. アッセイはチューブに加える十分な抗CD64試薬を必要とし、これは単球集団の試験により検証され、この集団は常に“陽性”の染色をされるため、内部陽性対象としての役割を果たすことができる。そうでない場合、ソフトウェア解析単球フラグが起動される。

【0047】

発明の要素

【表2】

I. 試薬 A

Leuko64 試薬 A:	ロット #L64-03-07	ボトル詰め濃度 (mg/mL)	希釈率
抗 CD64 クローン 32.2 FITC (ATCC: HB9469)	0206113.1T1	0.68	希釈 1:272
抗 CD64 クローン 22 FITC	0104031.1T4	1.47	希釈 1:980
抗 CD163 PE クローン 48 または 158 (ATCC: HB 10714)	ロット 0103203.2E5	0.93	希釈 1:119
PBS w/ 0.1% BSA + 0.01% NaN3 (Sigma)			

試薬 A を試験あたり 0.005 mL の容量で用いる。そのため、250 試験キットには総容量で 1.25 mL、加えて 0.25 mL の損失分が必要である。記録容量 2.0 mL の 1 つの容器にボトル詰めする。ボトルは平底の褐色ガラス組成とすべきであり、漏れ防止スクリーキャップを有するものとすべきである。

【0048】

II. Leuko64 試薬 B: 10x Trillium Lyse 溶液

【表3】

II. Leuko64 試薬 B: 10X Trillium Lyse 溶液

- KCl (塩化カリウム) 80.0 g Sigma # P-9541
- EDTA 3ナトリウム塩 10.0 g Sigma # ED3SS
- KH₂PO₄ (リン酸カルシウム) 1.0 g Sigma # P-5379
- 試薬用 H₂O、1000ml への QS
- 0.2μ 孔バキュームフィルターを用いたフィルター Nalgene # 295 4520
- 溶液が室温に達したとき、pH を 7.4 に調節する (濾過した溶液の汚染を避けるため、アリコートおよび無菌技術を用いる)
- 冷蔵庫中に 2-8°C で貯蔵
- 有効期限 12 ヶ月

希釈後、試験あたり 1.0 mL の容量で、試薬 B を用いる (希釈形態は 1 週間の期限を有する)。そのため、250 試験キットには総容量で 25 mL、加えて 15 mL の損失分が必要である。充满容量 50 mL の容器にボトル詰する。ボトルは平底でスクリーキャップを有するプラスチック組成 (nalgene) にすることができる。

【0049】

III. Leuko64 試薬 C: 校正ビーズ (NIST 追跡可能参照材料) 独自の組み込みの赤色染料 (starfire red) でタグをし、FITC で表面被覆したポリスチレン 5.2 μm ビーズ (NTRM to NIST SRM 1932)

BSA、アゾ化ナトリウム、Tween 20 を含有する等張緩衝溶液に懸濁する、pH 7.4。最終ビーズ濃度は、mL あたり $4 \sim 6 \times 10^6$ 。

【表4】

ビーズ希釈:	
Tween 20	10uL
NaN3	0.013g
PBS	100mL
pH = 7.4	
0.01%Tweenおよび2mM NaN3での、それぞれの1:20のPBSへの希釈とする。	
FITC ビーズ:	
ビーズ	250uL
ビーズ希釈(上記)	4750uL

10

試薬Cを試験あたり0.005mLの容量で用いる。そのため、250試験キットには総容量で1.25mL、加えて0.25mLの損失分および装置較正分が必要である。記録容量2.0mLの1つの容器に詰める。ボトルは平底の褐色ガラス組成とすべきであり、漏れ防止スクリュウキャップを有するものとすべきである。Trillium Diagnostics, LLCおよびBangs, Inc製OEMによるQCのあとに、それぞれのロットに対して試薬Cを提供する。

【0050】

IV. Leuko 64ソフトウェア

20

ロット特異的なLeuko 64ソフトウェアは、標準CDディスクにおけるキット中に提供される。CDは、Trillium Diagnostics, LLCおよびVerity software HouseによるQC評価ののちにパッケージ化され提供される。かかるソフトウェアは較正ビーズに割り当てられるロット特異的な値および引き続き最終PMNおよび単球CD64値を提供する；このようにして、ビーズ製造またはモノクローナル抗体蛍光色素ラベル化における、任意のロット間の変化を正す。ソフトウェア検証手順は、ソフトウェアフォルダー中にある。

【0051】

ここに開示する全ての出版物および特許出願は、米国特許番号第4,918,004号および第5,380,663号を含めて、本出願中に引例として全体を組み込み、本発明で用いることができる。

30

【0052】

本発明が目的を実行し、そこに備わるものだけでなく、記載した最終物および長所を得るためにうまく適合していることを、当業者は容易に理解するであろう。さまざまな修飾および変化を、本発明の精神および範疇から開始せず、本発明を實踐するに際し為すことができるということは、当業者には明らかであろう。そこでの変化および他の用途を当業者は思い付くであろうが、請求の範囲により定義する発明の精神内に含まれるものであり、同等のものである。

【0053】

引用文献

【表 5】

1. Balk, R. (2000) Severe sepsis and septic shock. *Critical Care Clinics* 16, 179-192.
2. Bernard, G., Vincent, J., Laterre, P., Dhainaut, J., Lopez-Rodriguez, A., Steingrub, J., Garber, G., Helterbrand, J., Ely, E., Fisher, C. (2001) Efficacy and safety of recombinant human activated protein C for severe sepsis. *New England Journal of Medicine* 344, 699-709.
3. Sands, K., Bates, D., Lanken, P., al., (1997) Epidemiology of sepsis syndrome in 8 academic medical centers. *Journal of American Medical Association* 278, 234-240. 10
4. Opal, S., Cohen, J. (1999) Clinical gram-positive sepsis: does it fundamentally differ from Gram-negative bacterial sepsis? *Critical Care Medicine* 27, 1608-1616.
5. Karzai, W., Reinhart, K. (1998) Sepsis: definitions and diagnosis. *Int J Clin Pract Suppl* 95, 44-8.
6. Horn, K. (1998) Evolving strategies in the treatment of sepsis and systemic inflammatory response syndrome (SIRS). *QJM* 91, 265-77. 20
7. Fry, D. (2000) Sepsis syndrome. *Am Surg* 66, 126-32.
8. Fisher, C., Agosti, J., Opal, S., Lowry, S., Balk, R., Sadoff, J., Abraham, E., Schein, R., Benjamin, E. (1996) Treatment of septic shock with tumor necrosis receptor:Fc fusion protein. *New England Journal of Medicine* 334, 1697-1702.
9. Chiu, C.-H., Lin, T.-Y., Bullard, M.J. (1994) Application of criteria identifying febrile outpatient neonates at low risk for bacterial infections. *Pediatric Infectious Disease Journal* 13, 946-949. 30
10. Engle, W., Rosenfeld, C., Mouzinho, A., Risser, R., Zeray, F., Sanchez, P. (1997) Circulating neutrophils in septic preterm neonates: comparison of two reference ranges. *Pediatrics* 99, E10.
11. Pfitzenmeyer, P., Decrey, H., Auckenthaler, R., Michel, J.P. (1995) Predicting bacteremia in older patients. *Journal of American Geriatric Society* 43, 230-235.
12. Vermeulen, B., Morabia, A., Unger, P.-F. (1995) Influence of white cell count on surgical decision making in patients with abdominal pain in the right lower quadrant. *European Journal of Surgery* 161, 483-486. 40
13. Bentley, S.A. (1988) Alternatives to the neutrophil band count. *Arch Pathol Lab Med* 112, 883-884.

【 0 0 5 4 】

【表 6】

14. Ardron, M.J., Westengard, J.C., Dutcher, T.F. (1994) Band neutrophil counts are unnecessary for the diagnosis of infection in patients with normal leukocyte counts. *Am J Clin Pathol* **102**, 646-649.
15. Bomela, H., Ballot, D., Cory, B., Cooper, P. (2000) Use of C-reactive protein to guide duration of empiric antibiotic therapy in suspected early neonatal sepsis. *Pediatr Infect Dis J* **19**, 531-5.
16. Benitz, W., Han, M., Madan, A., Ramachandra, P. (1998) Serial serum C-reactive protein levels in the diagnosis of neonatal infection. *Pediatrics* **102**, E41. 10
17. Clyne, B., Olshaker, J. (1999) The C-reactive protein. *J Emerg Med* **17**, 1019-25.
18. Povoia, P., Almeida, E., Moreira, P., Fernandes, A., Mealha, R., Aragao, A., Sabino, H. (1998) C-reactive protein as an indicator of sepsis. *Intensive Care Med* **24**, 1052-6.
19. Hogarth, M., Gallimore, R., Savage, P., Palmer, A., Starr, J., Bulpitt, C., Pepys, M. (1997) Acute phase proteins, C-reactive protein and serum amyloid A protein, as prognostic markers in the elderly inpatient. *Age Ageing* **26**, 153-8. 20
20. Da Silva, O., Ohlsson, A., Kenyon, C. (1995) Accuracy of leukocyte indices and C-reactive protein for diagnosis of neonatal sepsis: a critical review. *Pediatr Infect Dis J* **14**, 362-6.
21. Giannoudis, P., Smith, M., Evans, R., Bellamy, M., Guillou, P. (1998) Serum CRP and IL-6 levels after trauma. Not predictive of septic complications in 31 patients. *Acta Orthop Scand* **69**, 184-8.
22. Al-Nawas, B., Krammer, I., Shah, P. (1996) Procalcitonin in diagnosis of severe infections. *Eur J Med Res* **1**, 331-3. 30
23. Whang, K., Steinwald, P., White, J., Nysten, E., Snider, R., Simon, G., Goldberg, R., Becker, K. (1998) Serum calcitonin precursors in sepsis and systemic inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* **83**, 3296-301.
24. Somech, R., Zakuth, V., Assia, A., Jurgenson, U., Spirer, Z. (2000) Procalcitonin correlates with C-reactive protein as an acute-phase reactant in pediatric patients. *Isr Med Assoc J* **2**, 147-50.
25. Kaftan, H., Kinney, J. (1998) Early onset neonatal bacterial infections. *Semin Perinatol* **22**, 15-24. 40
26. Gerdes, J., Polin, R. (1998) Early diagnosis and treatment of neonatal sepsis. *Indian J Pediatr* **65**, 63-78.
27. Carlet, J. (1999) Rapid diagnostic methods in the detection of sepsis. *Infect Dis Clin North Am* **13**, 483-94, xi.

【表 7】

28. Antonelli, M., Raponi, G., Martino, P., Rosa, G., Conti, G., Jalouk, J., Gasparetto, A. (1995) High IL-6 serum levels are associated with septic shock and mortality in septic patients with severe leukopenia due to hematological malignancies. *Scand J Infect Dis* **27**, 381-4.
29. Marie, C., Fitting, C., Muret, J., Payen, D., Cavaillon, J. (2000) Interleukin 8 production in whole blood assays: Is interleukin 10 responsible for the downregulation observed in sepsis? *Cytokine* **12**, 55-61. 10
30. Lehrnbecher, T., Schrod, L., Rutsch, P., Roos, T., Martius, J., von, S.H. (1996) Immunologic parameters in cord blood indicating early-onset sepsis. *Biol Neonate* **70**, 206-12.
31. Ng, P., Cheng, S., Chui, K., Fok, T., Wong, M., Wong, W., Wong, R., Cheung, K. (1997) Diagnosis of late onset neonatal sepsis with cytokines, adhesion molecule, and C-reactive protein in preterm very low birthweight infants. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* **77**, F221-7.
32. Laforgia, N., Coppola, B., Carbone, R., Grassi, A., Mautone, A., Iolascon, A. (1997) Rapid detection of neonatal sepsis using polymerase chain reaction. *Acta Paediatr* **86**, 1097-9. 20
33. Weitkamp, J., Stuber, F., Bartmann, P. (2000) Pilot study assessing TNF gene polymorphism as a prognostic marker for disease progression in neonates with sepsis. *Infection* **28**, 92-6.
34. Akerley, W.L., Guyre, P.M., Davis, B.H. (1991) Neutrophil activation through high-affinity Fc gamma receptor using a monomeric antibody with unique properties. *Blood* **77**, 607-615.
35. Davis, B.H., Bigelow, N.C., Curnutte, J.T., Ornvold, K. (1995) Neutrophil CD64 expression: Potential diagnostic indicator of acute inflammation and therapeutic monitor of interferon-g therapy. *Lab Hematol* **1**, 3-12. 30
36. Davis, B., Bigelow, N. (1996) Neutrophil CD64 (high affinity Fc receptor), indicator of acute inflammation: correlation with band counts and instrument flagging. *International Journal Hematology* **64**, S157.
37. Davis, B. (1996) Quantitative neutrophil CD64 expression: Promising diagnostic indicator of infection or systemic acute inflammatory response. *Clinical Immunology Newsletter* **16**, 121-130. 40
38. Davis, B., Wallace, P., Guyre, P. (1998) Pathophysiology of human Fc-gamma receptors in health and disease. In *Phagocyte Function: A Guide for Research and Clinical Evaluation* (J. Robinson and G. Babcock, eds), John Wiley & Sons, New York 47-76.
39. Fjaertoft, G., Hakansson, L., Ewald, U., Foucard, T., Venge, P. (1999) Neutrophils from term and preterm newborn infants express the high affinity Fc-gamma-receptor I (CD64) during bacterial infections. *Pediatr Res* **45**, 871-6.

【表 8】

40. Schiff, D., Rae, J., Martin, T., Davis, B., Curnutte, J. (1997) Increased phagocyte CD64 expression and improved Fc-receptor mediated phagocytosis following in vivo recombinant human interferon-g treatment of normal human subjects. *Blood* **90**, 2987-94.
41. Guyre, P.M., Campbell, A.S., Kniffin, W.D., Fanger, M.W. (1990) Monocytes and polymorphonuclear neutrophils of patients with streptococcal pharyngitis express increased numbers of type I IgG Fc receptors. *J Clin Invest* **86**, 1892-1986. 10
42. Herra, C.M., Keane, C.T., Whelan, A. (1996) Increased expression of Fc gamma receptors on neutrophils and monocytes may reflect ongoing bacterial infection. *Journal of Medical Microbiology* **44**, 135-40.
43. Leino, L., Sorvajarvi, K., Katajisto, J., Laine, M., Lilius, E., Pelliniemi, T., Rajamaki, A., Silvoniemi, P., Nikoskelainen, J. (1997) Febrile infection changes the expression of IgG Fc receptors and complement receptors in human neutrophils in vivo. *Clin Exp Immunol* **107**, 37-43.
44. Turzanski, J., Crouch, S.P., Andrews, M., Rose, M., Finch, R., Burden, R., Holliday, M., Fletcher, J. (1998) Effects of r-metHuG-CSF on polymorphonuclear leucocyte kinetics and function in patients on continuous ambulatory peritoneal dialysis. *British Journal of Haematology* **103**, 387-96. 20
45. Trillium Diagnostics (1996 - 2001) unpublished or proprietary information. .
46. Sacks, G., Studena, K., Sargent, K., Redman, C. (1998) Normal pregnancy and preeclampsia both produce inflammatory changes in peripheral blood leukocytes akin to those of sepsis [see comments]. *Am J Obstet Gynecol* **179**, 80-6.
47. Davis, D., Kaufmann, R., Moticka, E. (1998) Nonspecific immunity in pregnancy: Monocyte surface receptor expression and function. *Journal of Reproductive Immunology* **40**, 119-128. 30
48. Pan, L.Y., Mendel, D.B., Zurlo, J., Guyre, P.M. (1990) Regulation of the steady state level of Fc gamma RI mRNA by IFN-gamma and dexamethasone in human monocytes, neutrophils, and U-937 cells. *J Immunol* **145**, 267-75.
49. Petroni, K.C., Shen, L., Guyre, P.M. (1988) Modulation of human polymorphonuclear leukocyte IgG Fc receptors and Fc receptor-mediated functions by IFN-gamma and glucocorticoids. *J Immunol* **140**, 3467-72. 40
50. Cassatella, M.A., Flynn, R.M., Amezaga, M.A., Bazzoni, F., Vicentini, F., Trinchieri, G. (1990) Interferon gamma induces in human neutrophils and macrophages expression of the mRNA for the high affinity receptor for monomeric IgG (Fc gamma R-I or CD64). *Biochem Biophys Res Commun* **170**, 582-8.
51. Roilides, E., Holmes, A., Blake, C., Pizzo, P., Walsh, T.J. (1995) Effects of granulocyte colony-stimulating factor and interferon-g on antifungal activity of

【表 9】

- human polymorphonuclear neutrophils against pseudohyphae of different medically important *Candida* species. *Journal of Leukocyte Biology* **57**, 651-656.
52. Pizza, F., Davis, B., Hendrickson, S., Mitchell, J., Pace, J., Bigelow, N., DiLauro, P., Nagieri, T. (1996) Adaptation to eccentric exercise: effect on CD64 and CD11b/CD18 expression. *J Applied Physiology* **80**, 47-55.
53. Pizza, F., Mitchell, J., Davis, B., Starling, R., Holtz, R., Bigelow, N. (1995) Exercise-induced muscle damage: effect on circulating leukocyte and lymphocyte subsets. *Med Sci Sports Exercise* **27**, 363-370. 10
54. Simms, H.H., D'Amico, R. (1994) Polymorphonuclear leukocyte dysregulation during the systemic inflammatory response syndrome. *Blood* **83**, 1398-407.
55. Westwood, N.B., Copson, E.R., Page, L.A., Mire-Sluis, A.R., Brown, K.A., Pearson, T.C. (1995) Activated phenotype in neutrophils and monocytes from patients with primary proliferative polycythaemia. *Journal of Clinical Pathology* **48**, 525-30.
56. Felzmann, T., Gadd, S., Majdic, O., Maurer, D., Petera, P., Smolen, J., Knapp, W. (1991) Analysis of function-associated receptor molecules on peripheral blood and synovial fluid granulocytes from patients with rheumatoid and reactive arthritis. *J Clin Immunol* **11**, 205-12. 20
57. Wenzel, R., Edmond, M. (2000) Managing Antibiotic Resistance. *New England Journal of Medicine* **343**, 1961-1963.
58. Davis, B., Bigelow, N. (1994) CD 64 (high affinity Fc receptor) is an indicator of neutrophil activation. *Cytometry Suppl.* **7**, 29. 30
59. Davis, W., Harrison, P.T., Hutchinson, M.J., Allen, J.M. (1995) Two distinct regions of FC gamma RI initiate separate signalling pathways involved in endocytosis and phagocytosis. *Embo J* **14**, 432-41.
60. Michon, J.M., Gey, A., Moutel, S., Tartour, E., Meresse, V., Fridman, W., Teillaud, J.L. (1998) In vivo induction of functional Fc gammaRI (CD64) on neutrophils and modulation of blood cytokine mRNA levels in cancer patients treated with G-CSF (rMetHuG-CSF). *British Journal of Haematology* **100**, 550-6.
61. Wiener, E., Allen, D., Porter, R., Wickramasinghe, S., Porter, J., Chinprasertsuk, S., Siripanyaphinyo, U., Pattanapanyasat, K., Fucharoen, S., Wanachiawanawin, W. (1999) Role of FcγRI (CD64) in erythrocyte elimination and its up-regulation in thalassaemia. *British Journal of Haematology* **106**, 923-930. 40
62. Repp, R., Valerius, T., Sandler, A., Gramatzki, M., Iro, H., Kalden, J.R., Platzer, E. (1991) Neutrophils express the high affinity receptor for IgG (Fc gamma RI, CD64) after in vivo application of recombinant human granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* **78**, 885-9.

【表 10】

63. Moallem, H., Kalayci, O., Homel, P., Fikrig, S., Chice, S., Durkin, H., Michl, J. (2000) Expression of Fc(gamma)RI (CD64) on polymorphonuclear leucocytes during progression to acquired immunodeficiency syndrome in perinatally human immunodeficiency virus-infected children. *Scand J Immunol* **52**, 184-9.
64. Ohsaka, A., Saionji, K., Takagi, S., Igari, J. (1996) Increased expression of the high-affinity receptor for IgG (FcRI, CD64) on neutrophils in multiple myeloma. *Hematopathology & Molecular Hematology* **10**, 151-60. 10
65. Quayle, J.A., Watson, F., Bucknall, R.C., Edwards, S.W. (1997) Neutrophils from the synovial fluid of patients with rheumatoid arthritis express the high affinity immunoglobulin G receptor, Fc gamma RI (CD64): role of immune complexes and cytokines in induction of receptor expression. *Immunology* **91**, 266-73.
66. Kerst, J.M., van de Winkel, J.G.J., Evans, A.H., de Haas, M., Slaper-Cortenbach, I.C., de Wit, T.P., von dem Borne, A.E., van der Schoot, C.E., van Oers, R.H. (1993) Granulocyte colony-stimulating factor induces hFc gamma RI (CD64antigen)-positive neutrophils via an effect on myeloid precursor cells. *Blood* **81**, 1457-1464. 20
67. Krasinskas, A.M., Wasik, M.A., Kamoun, M., Schretzenmair, R., Moore, J., Salhany, K.E. (1998) The usefulness of CD64, other monocyte-associated antigens, and CD45 gating in the subclassification of acute myeloid leukemias with monocytic differentiation. *American Journal of Clinical Pathology* **110**, 797-805.
68. Valerius, T., Repp, R., de Wit, T.P., Berthold, S., Platzer, E., Kalden, J.R., Gramatzki, M., van de Winkel, J.G. (1993) Involvement of the high-affinity receptor for IgG (Fc gamma RI; CD64) in enhanced tumor cell cytotoxicity of neutrophils during granulocyte colony-stimulating factor therapy. *Blood* **82**, 931-9. 30
69. Fadlon, E., Vordermeier, S., Pearson, T.C., Mire-Sluis, A.R., Dumonde, D.C., Phillips, J., Fishlock, K., Brown, K.A. (1998) Blood polymorphonuclear leukocytes from the majority of sickle cell patients in the crisis phase of the disease show enhanced adhesion to vascular endothelium and increased expression of CD64. *Blood* **91**, 266-74.
70. Schwartz, A., Fernandez-Repollet, E., Vogt, R., Gratama, J. (1996) Standardizing flow cytometry: Construction of a standardizing fluorescence calibration plot using matching spectral calibrators. *Cytometry* **26**, 22-31. 40
71. Davis, K., Abrams, B., Iyer, S., Hoffman, R., Bishop, J. (1998) Determination of CD4 antigen density on cells: role of antibody valency, avidity, clones, and conjugation. *Cytometry* **33**, 197-205.
72. Lenkei, R., Andersson, B. (1995) Determination of the antibody binding capacity of lymphocyte membrane antigens by flow cytometry in 58 blood donors. *Journal of Immunological Methods* **183**, 267-277.

【 0 0 5 9 】

【表 1 1】

73. Masuda, M., Roos, D. (1993) Association of all three types of Fc gamma R (CD64, CD32, and CD16) with a gamma-chain homodimer in cultured human monocytes. *J Immunol* **151**, 7188-95.
74. Maeda, M., van Schie, R., Yuksel, B., Greenough, A., Fanger, M.W., Guyre, P.M., Lydyard, P.M. (1996) Differential expression of Fc receptors for IgG by monocytes and granulocytes from neonates and adults. *Clin Exp Immunol* **103**, 343-7. 10
75. Dougherty, G., Selvendran, Y., Murdoch, S., Palmer, D., Hogg, N. (1987) The human mononuclear phagocyte high affinity receptor, RcRI, defined by a monoclonal antibody 10.1. *European Journal of Immunology* **17**, 1453-1459.
76. Guyre, P.M., Graziano, R.F., Vance, B.A., Morganelli, P.M., Fanger, M.W. (1989) Monoclonal antibodies that bind to distinct epitopes on Fc gamma RI are able to trigger receptor function. *J Immunol* **143**, 1650-5.
77. van de Winkel, J.G.J., Anderson, C.L. (1991) Biology of human immunoglobulin G Fc receptors. *J Leukoc Biol* **49**, 511-524. 20
78. Deo, Y., Graziano, R., Repp, R., van de Winkel, J. (1997) Clinical significance of IgG Fc receptors and FcγR-directed immunotherapies. *Immunology Today* **18**, 127-135.
79. van de Winkel, J., de Wit, T., Ernst, L.K., Capel, P.J., Ceuppens, J.L. (1995) Molecular basis for a familial defect in phagocyte expression of IgG receptor I (CD64). *J Immunol* **154**, 2896-903.

【図面の簡単な説明】 30

【 0 0 6 0 】

【図 1】絶対的好中球計数と好中球 CD 6 4 の関連を示すグラフである。

【図 2】図 2 の全体図である。

【図 2 A】正常好中球 CD 6 4 でのヒト血液のフローサイトメーター解析を示す図である。

【図 2 B】上昇好中球 CD 6 4 でのヒト血液のフローサイトメーター解析を示す図である。

【図 3】図 3 の全体図である。

【図 3 A】CD 6 4 発現欠損リンパ球の予測された結果を実証する、フローサイトメーター解析を示す図である。 40

【図 3 B】CD 6 4 発現を欠損する単球の予測された結果を実証する、フローサイトメーター解析を示す図である。

【図 4】Trilliumおよび M E S F を用いた測定、PMN CD 6 4 値の関連を示す 2 つのグラフである。

【 0 0 6 1 】

【図 5】図 5 の全体図である。

【図 5 A】臨床炎症スコアと絶対 PMN 計数の関連を示すグラフおよび臨床炎症スコアの一覧である。

【図 5 B】臨床炎症スコアと C 反応性タンパク質の関連を示すグラフである。

【図 5 C】臨床炎症スコアと PMN CD 6 4 の関連を示すグラフである。 50

【図6】 図6の全体図である。

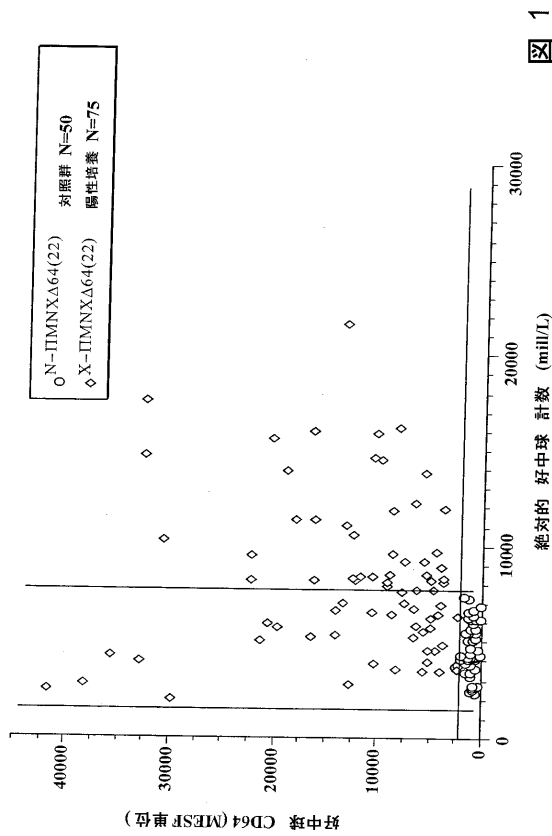
【図6A】 PMN CD64値の、ソフトウェアを用いないロット比較のグラフである。

【図6B】 PMN CD64値の、ソフトウェアを用いたロット比較のグラフである。

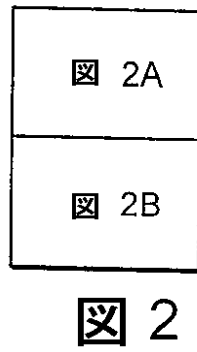
【図6C】 単球CD163値の、ソフトウェアを用いないロット比較のグラフである。

【図6D】 単球CD163値の、ソフトウェアを用いたロット比較のグラフである。

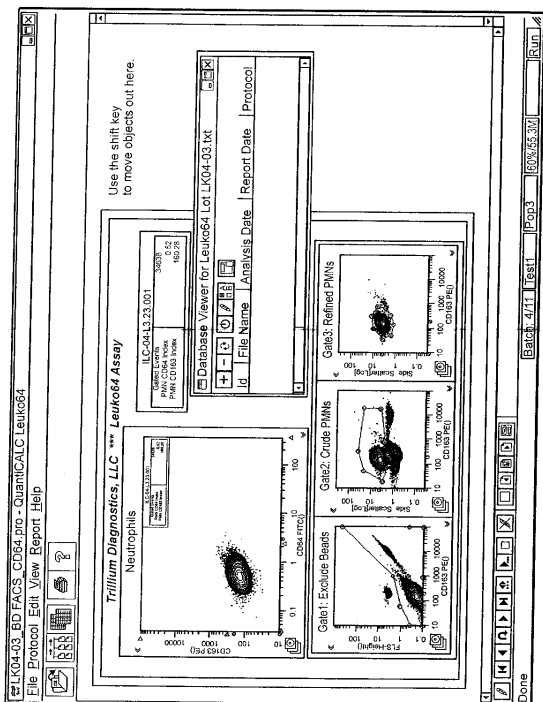
【図1】



【図2】

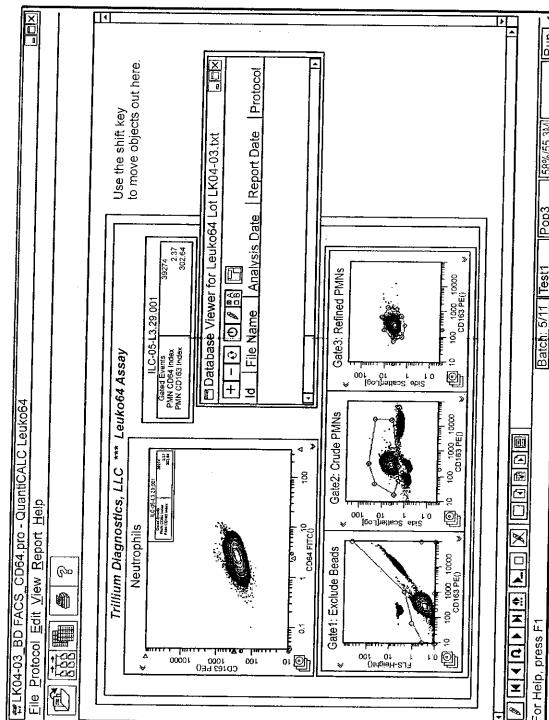


【 2 A 】



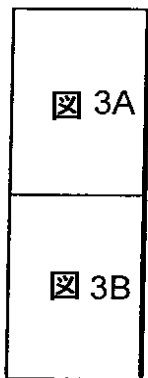
2A

【 2 B 】



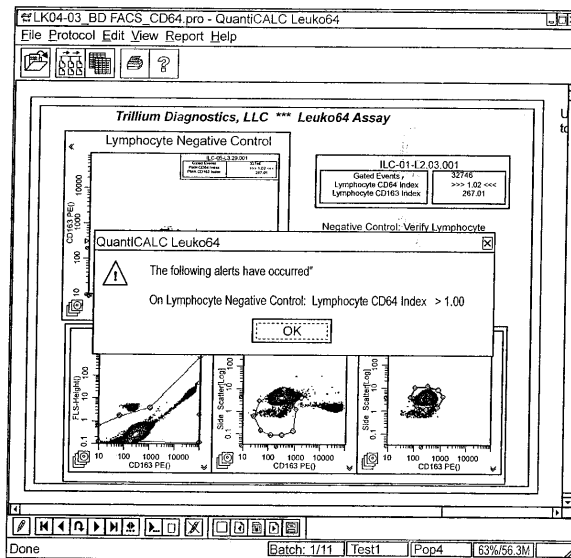
2B

【 3 】



3

【 3 A 】



3A

【 図 3 B 】

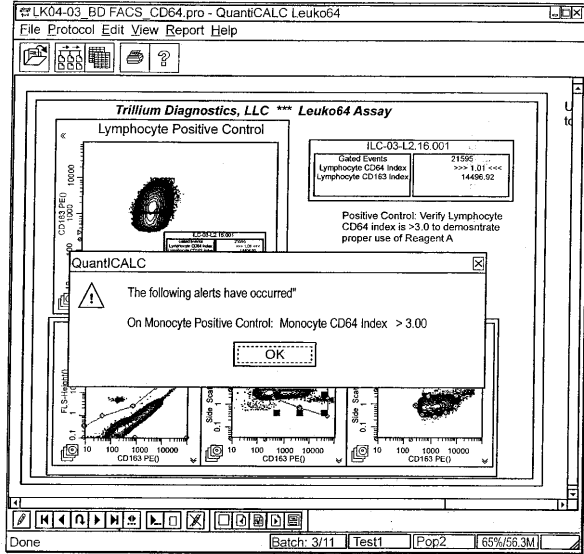


図 3B

【 図 4 】

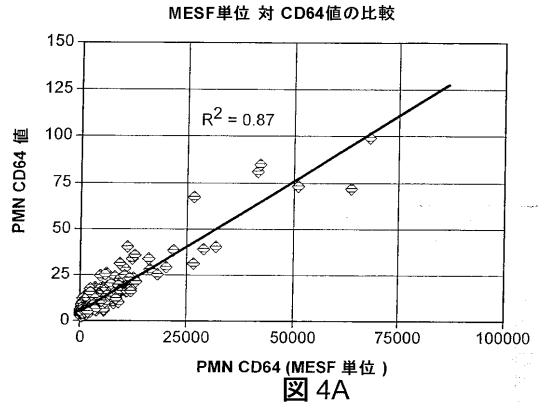


図 4A

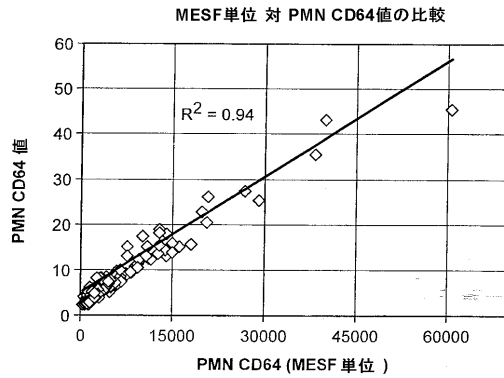


図 4B

【 図 5 】

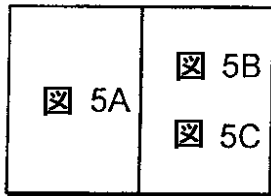
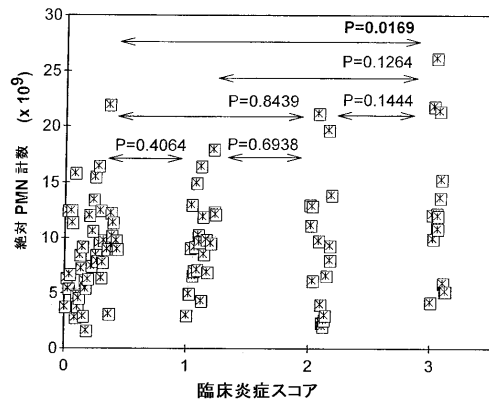


図 5

【 図 5 A 】



- 0 = 感染または炎症の証拠なし
平均 PMN CD64 (±SD) = 1,432 (±832); N = 39
異常 (>1,500): 36%
- 1 = 局在感染または組織損傷
平均 PMN CD64 (±SD) = 2,025 (±1,057); N = 19
異常 (>1,500): 63%
- 2 = 全身感染および/または中等度の組織損傷
に対する疑いのある臨床所見または実験室試験
平均 PMN CD64 (±SD) = 6,995 (±6,973); N = 16
異常 (>1,500): 81%
- 3 = 確診された敗血症および/または重篤な組織損傷
平均 PMN CD64 (±SD) = 9,867 (±11,378); N = 14
異常 (>1,500): 100%

図 5A

【 図 5 B 】

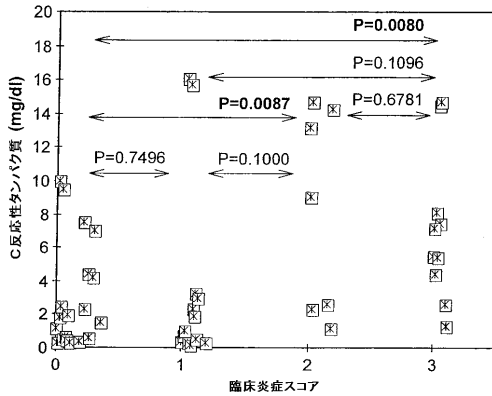


図 5B

【 図 5 C 】

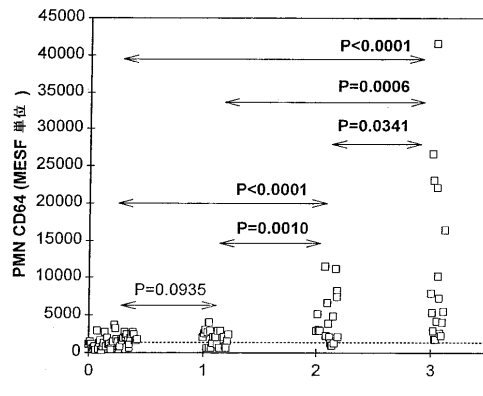


図 5C

【 図 6 】

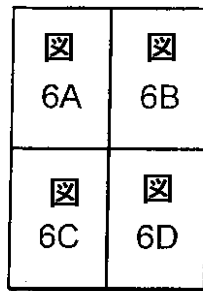


図 6

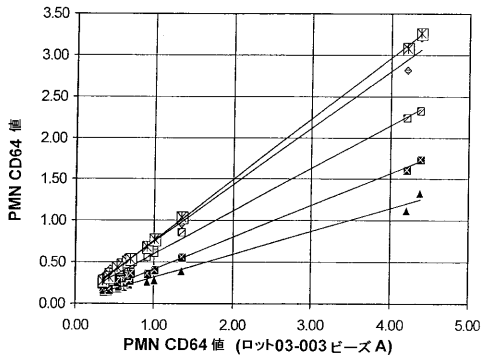
【 図 6 A 】

Leuko64ソフトウェア:

ソフトウェア内でピーズに値が割り当てられることにより CD64 値のロット間標準化が可能となる。

- ◇ L-007 ピーズ A
- L-004 ピーズ B
- ▲ L-007 ピーズ C
- L-003 ピーズ C
- ⊠ L03-004 ピーズ A

ソフトウェアを用いないロット比較



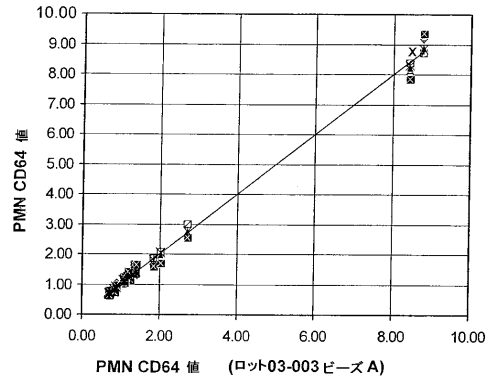
ロット比較	回帰	r2
03-003 A vs 03-003 B	$y = 0.7355x + 0.0212$	0.9996
03-003 A vs 03-007 A	$y = 0.6867x + 0.0568$	0.9956
03-003 A vs 03-004 B	$y = 0.5159x + 0.0841$	0.9984
03-003 A vs 03-003 C	$y = 0.3837x + 0.0325$	0.9958
03-003 A vs 03-007 C	$y = 0.2754x + 0.0438$	0.9884

図 6A

【 図 6 B 】

ソフトウェアを用いたロット比較

- ◇ L-007 ピーズ A
- L-004 ピーズ B
- ▲ L-003 ピーズ C
- Index_L-007 ピーズ C
- ⊠ L03-003 ピーズ B



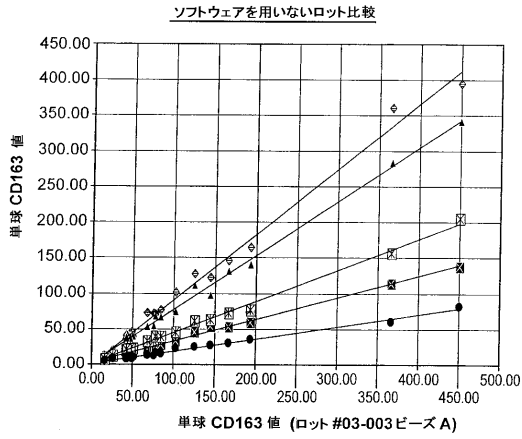
ロット比較	回帰	r2
03-003 A vs 03-007 A	$y = x + 6E-05$	0.9956
03-003 A vs 03-003 B	$y = x - 4E-06$	0.9996
03-003 A vs 03-004 B	$y = x - 3E-05$	0.9984
03-003 A vs 03-003 C	$y = x + 0.0001$	0.9958
03-003 A vs 03-007 C	$y = x - 0.0002$	0.9884

図 6B

【 図 6 C 】

Leuko64アッセイ:

ビーズ蛍光値のソフトウェア割り当てにより
ロット間CD163 値標準化ができるようになる。



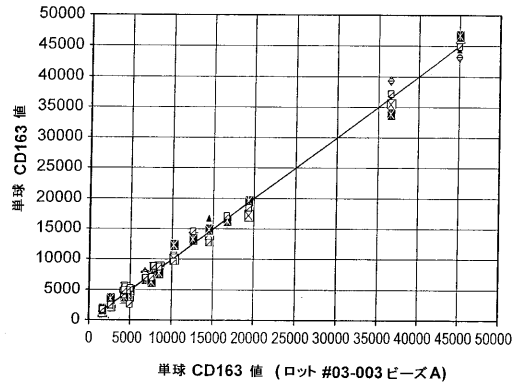
◇ L03-004 ビーズ A	□ L03-003 ビーズ C
▲ L03-003 ビーズ B	● L03-005 ビーズ C
⊠ L03-005 ビーズ B	

ロット比較	回帰	r ²
03-03 A vs 03-04 A	$y = 0.9154x - 0.3291$	0.9916
03-03 A vs 03-03 B	$y = 0.7582x + 1.6349$	0.9926
03-03 A vs 03-05 B	$y = 0.3053x + 2.4133$	0.9948
03-03 A vs 03-03 C	$y = 0.4376x + 1.427$	0.9952
03-03 A vs 03-05 C	$y = 0.1718x + 1.7214$	0.9911

図 6C

【 図 6 D 】

ソフトウェアを用いたロット比較



◇ L03-004 ビーズ A	□ L03-003 ビーズ C
▲ L03-003 ビーズ B	● L03-005 ビーズ C
⊠ L03-005 ビーズ B	

ロット比較	回帰	r ²
03-03 A vs 03-04 A	$y = 1.0017x - 84.496$	0.9918
03-03 A vs 03-03 B	$y = 1.0016x - 11.74$	0.9927
03-03 A vs 03-05 B	$y = 0.9998x + 0.0144$	0.9948
03-03 A vs 03-03 C	$y = 0.9999x - 0.007$	0.9952
03-03 A vs 03-05 C	$y = 1.0000x - 0.0091$	0.9911

図 6D

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
C 0 7 K 16/28

(72)発明者 バグウェル,シー・ブルース
アメリカ合衆国 メーン州 04086、トップシャム、ピー・オー・ボックス 247

(72)発明者 ハンズバーガー,ベンジャミン
アメリカ合衆国 メーン州 04008、ボードンハム、リバー ロード 1139

審査官 濱田 光浩

(56)参考文献 特表2004-532410(JP,A)
国際公開第2002/086498(WO,A1)
ZAREV,P.V., LABORATORY HEMATOLOGY, 2004年10月, V10 N1, P24-31

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12Q 1/00
C07K 16/00
G01N 21/78
G01N 33/53
G01N 33/543
CA/BIOSIS/MEDLINE/WPIDS(STN)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)
PubMed

专利名称(译)	用于定量白细胞FcγRI受体 (CD64) 的软件整合流式细胞术		
公开(公告)号	JP5047803B2	公开(公告)日	2012-10-10
申请号	JP2007543297	申请日	2005-11-18
[标]申请(专利权)人(译)	延龄诊断		
申请(专利权)人(译)	延龄诊断, LLC		
当前申请(专利权)人(译)	延龄诊断, LLC		
[标]发明人	デービスブルースエイチ バグウェルシーブルース ハンズバーガーベンジャミン		
发明人	デービス,ブルース,エイチ. バグウェル,シー.ブルース ハンズバーガー,ベンジャミン		
IPC分类号	C12Q1/06 G01N33/53 G01N33/543 G01N21/78 C07K16/28		
CPC分类号	G01N33/6872 G01N33/537 G01N33/56972 G01N33/582 G01N2333/70535 G01N2333/70596 G01N2496/05 G01N2800/26		
FI分类号	C12Q1/06 G01N33/53.D G01N33/53.Y G01N33/543.597 G01N21/78.C C07K16/28		
审查员(译)	三罗·哈马达		
优先权	60/629654 2004-11-19 US		
其他公开文献	JP2008520247A JP2008520247A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

公开了一种用于评估生物学状况的组合物。该组合物具有 (a) 样品组合物, 该样品组合物包含下列中的至少一种: i.) 包含靶部分的身体样品; ii.) 阳性对照部分; iii.) 阴性对照部分; (b) 抗体组合物, 其包含以下中的至少一种: i.) 至少一种靶抗体; ii.) 至少一种阳性对照鉴定抗体; iii.) 至少一种阴性对照鉴定抗体; (c) 至少一种参考组合物, 其包含以下中的至少一种: i.) 目标信号参考组合物;和ii.) 参考标识符组成。

必須である。

8 設定および取得テンプレートを保存する。

【表 1】

