

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-517154

(P2005-517154A)

(43) 公表日 平成17年6月9日(2005.6.9)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	2 G O 4 5
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	4 B O 2 9
GO 1 N 33/48	GO 1 N 33/48	4 B O 6 3
GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/48	
GO 1 N 33/577	GO 1 N 33/48	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 105 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2003-525256 (P2003-525256)  
 (86) (22) 出願日 平成14年8月30日 (2002. 8. 30)  
 (85) 翻訳文提出日 平成16年4月27日 (2004. 4. 27)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2002/027762  
 (87) 国際公開番号 W02003/021223  
 (87) 国際公開日 平成15年3月13日 (2003. 3. 13)  
 (31) 優先権主張番号 60/315, 937  
 (32) 優先日 平成13年8月30日 (2001. 8. 30)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/328, 246  
 (32) 優先日 平成13年10月10日 (2001. 10. 10)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 60/386, 072  
 (32) 優先日 平成13年10月19日 (2001. 10. 19)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

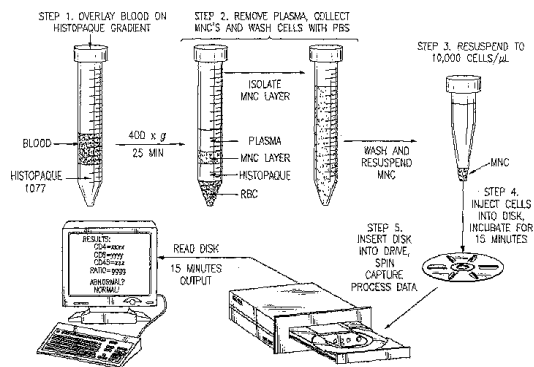
(71) 出願人 501074711  
 バースタイン テクノロジーズ, インコーポレイティド  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 92618, アーバイン, テクノロジー ドライブ 163, スイート 200  
 (74) 代理人 100100549  
 弁理士 川口 嘉之  
 (74) 代理人 100090516  
 弁理士 松倉 秀実  
 (74) 代理人 100098268  
 弁理士 永田 豊  
 (74) 代理人 100089244  
 弁理士 遠山 勉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞の定性および定量分析法ならびに関連する光バイオディスクシステム

(57) 【要約】

臨床診断アッセイが光バイオディスクで実行され、ディスクドライブで読み取られる。光バイオディスクを使用した、生物試料中の特定の血球分析物を検出および定量する方法および装置が開示される。生物試料中の特定の型の血球の量を求める方法は、抗体をディスク上の捕獲帯に結合させること、試料を捕獲帯に用意すること、捕獲帯に結合していない試料の部分の除去すること、および結合細胞を計数することを含む。光ディスクおよびディスクドライブでクラスター標識計数を実行する方法および装置と、そのようなクラスター標識計数を実行するための光アッセイディスクを作製する方法も記載される。



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

生物試料中の血球分析物を検出するシステムであって、  
 基体を有する光ディスクと、  
 前記基体と平行なキャップと、  
 前記基体とキャップとの間にあるチャンバであって、捕獲帯を含む前記チャンバと、  
 第一捕獲帯が第一細胞捕獲剤を有し、かつ第二捕獲帯が第二細胞捕獲剤を有するように、  
 捕獲帯で前記基体に付随する捕獲層と、  
 光を前記ディスクの前記捕獲帯に向ける光源と、  
 前記ディスクの前記捕獲帯で反射またはそこを透過した光を検出して信号を提供する検出器、および  
 前記信号を使用して前記捕獲剤に結合した前記試料中の種目を計数するプロセッサと、  
 を備えるシステム。

10

## 【請求項 2】

光ディスクおよびディスクドライブを用いて生物試料中の血球分析物を検出する方法であって、

細胞の試料を、一種の捕獲剤を持つ少なくとも 1 つの捕獲帯を含む前記ディスクのチャンバ内のディスク表面上に用意し、

該ディスクを光学式読み取り機にロードし、

該光ディスクを回転させ、

20

電磁放射の入射ビームを前記捕獲帯に向け、

前記ディスクと前記捕獲帯で相互作用した後に形成された電磁放射ビームを検出し、

該検出されたビームを出力信号に変換し、そして

該出力信号を分析する工程であって、それにより該出力信号から前記捕獲帯に捕獲された細胞数に関する情報を抽出する、分析する工程を含む、方法。

## 【請求項 3】

前記試料を支持する前記ディスク表面を有するチャンバは、前記ディスク内部にあり、かつ基体およびキャップにより反対側で結合されている、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記光ディスクは、前記捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が反射されるように、反射層を有して構成される、請求項 2 に記載の方法。

30

## 【請求項 5】

前記光ディスクは、前記捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が該光ディスクを透過するように構成され、該ディスクは前記光源と前記検出器との間にある、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 6】

前記ディスク表面は、細胞捕獲剤の第一群でコーティングされる、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 7】

前記細胞捕獲剤は、不連続の捕獲帯を規定する、請求項 6 に記載の方法。

40

## 【請求項 8】

細胞捕獲剤の第二群があらかじめ決められたパターンで第二の不連続の捕獲帯を規定する、請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記第一および第二捕獲帯は 1 つのチャンバにある、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

前記細胞捕獲剤は、細胞表面抗原と結合するためのものである、請求項 6 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記細胞表面抗原は、抗原の CD ファミリーから選択される、請求項 10 に記載の方法

50

。

## 【請求項 1 2】

光ディスクおよびディスクドライブを用いてクラスター標識計数を実行する方法であって、

分離勾配を有する第一の管に血液試料を用意し、

該第一の管を、該血液試料を層に分離するのに十分な時間および速度で回転させ、

M N C 懸濁液を形成するため、T 細胞含有 M N C 層を再懸濁させ、

該 M N C 懸濁液の試料を、少なくとも一種の捕獲剤を持つ少なくとも 1 つの捕獲帯を含む光ディスク表面上に用意し、

該光ディスクを光学式読み取り機にロードし、

該光ディスクを回転させ、

電磁放射の入射ビームを前記少なくとも 1 つの捕獲帯に向け、

前記ディスクと前記捕獲帯で相互作用した後に形成された電磁放射ビームを検出し、

該検出されたビームを出力信号に変換し、

該出力信号を分析する工程であって、それにより前記出力信号から該捕獲帯に捕獲された細胞数に関する情報を抽出する工程を含む、方法。

10

## 【請求項 1 3】

前記分離勾配は、遠心分離で密度勾配を形成するマトリクスにより用意される、請求項 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 1 4】

前記第一の管はさらに抗凝固剤を含む、請求項 1 2 に記載の方法。

20

## 【請求項 1 5】

前記抗凝固剤は E D T A である、請求項 1 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 6】

前記抗凝固剤はクエン酸デキストランである、請求項 1 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 7】

前記抗凝固剤はヘパリンである、請求項 1 4 に記載の方法。

## 【請求項 1 8】

前記表面は、前記ディスク内部にあり、かつ基体およびキャップにより反対側で結合されている、請求項 1 2 に記載の方法。

30

## 【請求項 1 9】

前記光ディスクは、前記捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が反射されるように、反射層を有して構成される、請求項 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 0】

前記光ディスクは、前記捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が該光ディスクを透過するように構成され、該ディスクは前記光源と前記検出器との間にある、請求項 1 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 1】

前記ディスク表面は、捕獲剤の第一群でコーティングされる、請求項 1 2 に記載の方法

。

40

## 【請求項 2 2】

前記捕獲剤は抗体である、請求項 2 1 に記載の方法。

## 【請求項 2 3】

前記抗体は、モノクローナル、ポリクローナル、および組換えで作成された抗体を含む群から選択される、請求項 2 2 に記載の方法。

## 【請求項 2 4】

前記捕獲剤は、架橋系により前記ディスク表面に固定される、請求項 2 1 に記載の方法

。

## 【請求項 2 5】

前記捕獲剤は、前記ディスク表面に直接固定される、請求項 2 0 に記載の方法。

50

## 【請求項 26】

前記捕獲剤は、1つまたは複数の不連続の捕獲帯を規定する、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 27】

前記1つまたは複数の捕獲帯は、前記光ディスク内の1つまたは複数のチャンバ内に配置される、請求項 26 に記載の方法。

## 【請求項 28】

前記捕獲剤は、細胞表面抗原に選択的親和性を有する、請求項 20 に記載の方法。

## 【請求項 29】

前記細胞表面抗原は、抗原のCDファミリーから選択される、請求項 28 に記載の方法。 10

## 【請求項 30】

前記細胞表面抗原は、CD3、CD4、CD8およびCD45からなる群から選択される、請求項 29 に記載の方法。

## 【請求項 31】

前記血液試料は、正常血球、白血病性血球、またはリンパ性血球を含む、請求項 12 に記載の方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、米国出願第09/988,728号(2001年11月20日出願)の一部継続出願である。

## 【0002】

本出願はまた、米国仮出願第60/315,937号(2001年8月30日出願)、同第60/328,246号(2001年10月10日出願)、同第60/386,072号(2001年10月19日出願)、同第60/386,073号(2001年10月19日出願)、同第60/386,071号(2001年10月26日出願)、同第60/344,977号(2001年11月7日出願)、同第60/338,679号(2001年11月13日出願)、同第60/334,131号(2001年11月30日出願)、同第60/355,644号(2002年2月5日出願)、および同第60/358,479号(2002年2月19日出願)からの優先権を主張する。 30

## 【0003】

これら出願は全て本明細書中に参照としてその全体が援用される。

## 【背景技術】

## 【0004】

[発明の背景]

## 1. 発明の分野

本発明は、概して、生物学的、化学的、細胞、および診断アッセイに関し、詳細には、血液、血液白血病、リンパ腫、骨髄、および幹細胞由来の細胞集団に対して行われる、光バイオディスクを使用したアッセイに関する。より詳細には、ただし最適な実施形態に従って本明細書中に記載される特定の実施形態に限定されないが、本発明は、光バイオディスクを使用して生物試料中の細胞性分析物を検出する方法および装置に関する。 40

## 【0005】

## 2. 発明の背景

血球カウントは、診断中、治療中、および追跡中に、患者の健康状態を知るために使用される。全血球計算値(CBC)は、ヘモグロビン、ヘマトクリット、平均血球ヘモグロビン量、平均血球ヘモグロビン濃度、平均血球体積、血小板数、および白血球数を含む検査の集合である。血球カウントは、全血c.u.m.m.あたりの赤血球および白血球の列挙である。

## 【0006】

白血球数(WBC、白血球)は、血液の標準試料中の白血球の総数である。正常な健康人では、WBC数は通常、1マイクロリットル( $\mu\text{L}$ )当たり4000~10800細胞である。運動、緊張、および疾患などの要因がこれらの値に影響を及ぼす可能性がある。高WBCは、感染、白血病、または組織損傷を示唆し得る。WBCが1マイクロリットル当たり1000個の細胞を下回ると、感染の危険性が増加する。

## 【0007】

白血球分画検査は、白血球数自体から得られ得る情報を超える情報を集めるために必須である。白血球分画は、新たに疑われる感染または発熱(たとえCBCが正常であっても)、異常に伴う疾患の疑い、白血球数異常、白血病の疑い、他の異常(好酸球増加症、単球増加症、および好塩基球増加症など)を評価するために使用される。白血球または白血球分画の繰り返し検査は、重篤な白血球減少症(例えば、薬物療法で続発する)の存在下で行われ得る。例えば、化学療法または放射線療法の治療中、癌性細胞に加えて健康な白血球を欠乏させていないかどうかを決定するために、血球カウントは非常に重要である。

## 【0008】

分画白血球数は、コンピューター細胞計数装置により求められる。この機械は、主な5種の白血球の合計数および割合を求める。正常な個体では、主に好中球(50~60%)が存在し、続いてリンパ球(20~40%)、次いで単球(2~9%)、これに少量の好酸球(1~4%)および好塩基球(0.5~2%)が伴われる。

## 【0009】

リンパ球の範疇で、さらなるリンパ球、およびさらなる細胞サブタイプが存在する。例えば、リンパ球は、大きくはT細胞(胸腺由来のリンパ球)とB細胞(ブルサ等価(bursa-equivalent)リンパ球)とに分けることができ、これらはそれぞれ、細胞性免疫および体液性免疫を主に担う。白血球内のグループ分けに形態学的特徴が使用されてきたものの、形態学だけでは、リンパ球サブタイプの多くの機能的な能力を識別するのに不適切であることがわかってきた。様々な機能を持つリンパ球を識別するために、ロゼット形成、免疫蛍光顕微鏡、酵素組織化学および最近では、モノクローナル抗体による分析を含む技法が開発されてきた。T細胞は、表面の2種の糖タンパク質を含む表面マーカー、CD4およびCD8の存在により識別される(CD4+T細胞およびCD8+T細胞)。CD4+ヘルパーT細胞は、抗体性免疫に関与する。それらは、B細胞により提示される抗原に結合する。その結果、抗原性材料に対して抗体を分泌する形質細胞のクローンが発生する。T細胞もまた、細胞媒介型免疫に必要である。CD4+細胞は、貪食マクロファージおよび樹状細胞のような抗原提示細胞(APC)により提示される抗原に結合する。次いで、T細胞はリンホカインを放出し、これが他の細胞をその領域へ呼び込む。その結果が炎症、すなわち抗原性材料の囲い込みおよび破壊を試みる細胞および分子の凝集である。

## 【0010】

CD8+、すなわち細胞毒/抑制因子型細胞は、それらが結合した細胞を破壊する分子を分泌する。標的細胞がウイルスに感染している場合は、これは非常に有用な機能である。なぜなら、細胞は、他の細胞に感染し得るウイルスの新鮮な塊を放出し得る前に、通常は破壊されるからである。

## 【0011】

## HIVおよびAIDS

ヒト免疫不全ウイルス、レトロウイルスは、CD4+T細胞に高い親和性を有し、したがってCD4+T細胞はウイルスにとって魅力的な標的である。後天性免疫不全症候群(AIDS)は、免疫におけるCD4+T細胞の重要性の明瞭かつ悲劇的な例示を提供する。ヒト免疫不全ウイルス(HIV)は、CD4分子に結合し、したがってCD4+T細胞を襲撃してこれに感染する。疾患が進行するに従って、CD4+T細胞数は、1マイクロリットル( $\mu\text{L}$ )当たり約1000個というその正常範囲より下に減少する。説明の1つとして、患者のCD8+T細胞が感染したCD4+細胞を破壊しようとする絶え間ない活動があり得る。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 1 2 】

血液中のCD4 + T細胞数が1マイクロリットル当たり400個より下に落ち込んだ場合、患者が免疫応答を起こす能力は劇的に減少する。患者は、身体を襲撃する病原だけでなく、微生物、特に我々に害を及ぼさず我々の組織にも普通に住んでいる細菌も高感染性になる。最終的には、患者は、カンジダ症、サイトメガロウイルス、単純ヘルペスウイルス、ニューモシスチス・カリニ (Pneumocystis carinii)、肺炎、トキソプラズマ症、結核、およびその他のような日和見感染で死亡する。

## 【 0 0 1 3 】

CD4 + T細胞およびCD8 + T細胞の数およびCD4 + / CD8 + T細胞の比の見積もりは、免疫無防備状態 (immune-compromised) 疾患のヒト患者の免疫の健康状態を評価するのに有用である。例えば、AIDSである個体は、免疫におけるCD4 + T細胞の重要性を示す。疾患が進行するに従って、CD4 + T細胞数は、1μl当たり約1000個の細胞というその正常範囲より下に減少する。患者のCD8 + T細胞が感染したCD4 + T細胞を破壊するため、未感染のCD4 + 細胞はアポトーシスを起こし得る。したがって、CD4 + T細胞対CD8 + T細胞の比は、疾患の進行の診断的マーカーとなる。米国公衆衛生局は、全ての感染者について3 ~ 6か月ごとにCD4 + レベルをモニタリングすることを推奨している (米国の600ヶ所の検査研究所で、4000万件の検査が毎年行われる)。

## 【 0 0 1 4 】

CD4およびCD8に加えて、リンパ球のサブタイプを同定するために使用され得るその他多くの細胞表面抗原 (例えば、CD3、CD16、CD19、CD45、CD56) が存在する。抗体法によりこれらの細胞表面抗原を検出する能力は、診断病理学に新たな側面を加え、そして様々な方法が血液リンパ系 (hematolymphoid) 疾患 (例えば、AIDS、白血病、およびリンパ腫) の免疫表現型研究に利用可能である。放射免疫アッセイ (RIA)、酵素免疫測定 (EIA)、蛍光免疫測定 (FIA) などの従来の微量免疫アッセイ (microimmunoassays) は、同位体、酵素、または蛍光物質を使用して、対応する分析物の有無を検出する。

## 【 0 0 1 5 】

AIDSを治療するために、多数の治療アプローチが用いられている。以下のアプローチは、単独で、または他と組み合わせて、疾患を治療するのに首尾よく用いられる。

1. ヌクレオシド類似体逆転写酵素阻害剤 (NUKES)、最初の抗HIV薬は、プロセスを中断する「罫」ビルディングブロックを提供することにより、RNAからウイルスDNAを合成するために必要な逆転写を遮断する (ジドブジン レトロビル (Retrovir)、AZT、ジダノシン ヴァイデックス、ザルシタピン ハイビッド、ジデオキシシチジン、スタブジンゼリット、ラミブジン エピビル、ジドブジン/ラミブジン コンビビル、アバカビル ザリアジェン、ジドブジン/ラミブジン/アバカビルなどの薬物)。

2. 非ヌクレオシド系逆転写酵素阻害剤 (NNRTIまたはNON-NUKES) は、逆転写酵素に結合してその活性を制限することにより、逆転写を遮断する (ネビラピン ビラミュン、デラビルジン レスクリプター、エファビレンツ サスティバなどの薬物)。

3. プロテアーゼ阻害剤、プロテアーゼ (すなわちHIVタンパク質鎖を切断してウイルスの新コピーを組み立てるのに必要な特定タンパク質にする酵素) の作用を遮断する (サキナビル (商品名インビラーゼ)、リトナビル ノービル、インジナビル クリキシバン、ネルフィナビル ビラセプト、サキナビル フォートベイス、アンブレナビル エジネラーゼ、サキナビルインビラーゼなどの薬物)。

4. インテグラーゼ阻害剤、インテグラーゼ (ウイルスDNAを感染した細胞のDNA鎖中に挿入する酵素) の作用を遮断する。インテグラーゼ阻害剤は未だ承認されていない (ジントービル (Zintevir) はヒト治験の第I相にある)。

5. 付着および融合阻害剤、HIVウイルスが細胞に付着するのを阻止する。融合阻害剤は未だ承認されていない (AMD-3100、ペントフュージド (Pentafusided)、T

10

20

30

40

50

1 2 4 9、P R O 4 5 2、および S C 3 5 1 1 2 5 は、治験の第 I 相および第 I I 相にある。

6. アンチセンス薬物、ウイルスにロックしてそれが機能することを阻止する H I V 遺伝暗号の一部の「鏡像」が存在する。1つのアンチセンス薬物、Enzoの H G T V 4 3 が治験の第 I 相にある。

7. 免疫刺激剤、身体の化学的メッセンジャーを使用して免疫応答を刺激する。インターロイキン 2 ( I L - 2、アルデスロイキン ( Aldesleukin)、プロロイキン ( Proleukin)、レチキュロース ( Reticulose)、およびマルチカイン ( Multikine)、ならびに不活化ウイルス調製物、H I V - 1 免疫原が、治験の第 I I I 相にある。

#### 【 0 0 1 6 】

##### 白血病

白血病は、髄の細胞で発生する悪性疾患である。これは、発育髄細胞の制御されない増殖により特徴付けられる。白血病には、骨髄性またはリンパ性の 2 つの主な分類があり、これらはそれぞれ急性または慢性であり得る。急性白血病は、急速に進行し、そして一般に、まだ完全に発育していない細胞に影響を及ぼす。それゆえ、これらの未成熟細胞は、それらの正常な機能を完全に実行することができない。一方で、慢性白血病はゆっくりと進行し、そしてより成熟しかつ機能する細胞の増殖を許容する。白血病は、リンパ球 ( リンパ性白血病) または骨髄細胞 ( 骨髄性白血病) に影響を及ぼす。リンパ性白血病は、白血球またはリンパ球に影響を及ぼし、一方骨髄性はリンパ球を除くその他全ての型の血球を含む。骨髄性またはリンパ性という用語は、関係する細胞の型を示す。4 つの主な型の白血病、急性または慢性骨髄性白血病、および急性または慢性リンパ性白血病が存在する。白血病の原因は未知であるが、発育白血球が成熟するのに失敗することに伴うようである。

#### 【 0 0 1 7 】

正常な、成熟白血球は再生することができず、そして骨髄で産生される新たな細胞で置き換えられる。対照的に、白血病細胞は再生する能力を持つが適切に機能するのに十分なまで発育しない。白血病が進行するにつれて、白血病細胞は正常白血球と置き換わり、患者を感染に対して極度に脆弱にする。白血病には複数の形、急性および慢性の両方があり、これらは影響を受ける白血球の型によって分類される。白血病に関係する白血球の主な型は、リンパ球および多形核白血球を含む。

#### 【 0 0 1 8 】

急性白血病には主に 2 つの形、急性リンパ芽球性白血病 ( A L L ) および急性骨髄芽球性白血病 ( A M L ) がある。A L L はリンパ球に影響を及ぼし、そして子供でより多く発生する。A M L は多形核白血球を形成する細胞に影響を及ぼし、そして成人でより一般的であるが、もっともこれはどの年齢でも起こり得る。急性白血病は、急速に進行する疾患であり、髄および血液中の、未成熟で機能しない細胞の蓄積をもたらす。しばしば、髄は十分な正常赤血球および白血球ならびに血小板を産生することができなくなる。貧血、すなわち赤血球の欠乏が、実質的に全ての白血病患者で進行する。正常な白血球の欠乏は、身体が感染と戦う能力を損なわせる。血小板の不足は、挫傷および易出血性をもたらす。

#### 【 0 0 1 9 】

慢性白血病には、2 つの型、慢性骨髄性白血病 ( C M L )、および慢性リンパ性白血病 ( C L L ) がある。C M L は、未成熟多形核白血球に影響を及ぼし、そして通常は 3 5 歳以上で発生する。C L L は、リンパ組織およびリンパ球に影響を及ぼし、そして通常は 5 0 歳を過ぎた男性で発生する。慢性白血病である患者らの予後は、疾患が発生した年齢に大きく依存する ; A M L に関しては、症状は制御可能であり、そして延命される。C M L の患者は、C L L の患者よりも白血病の結果として死亡する可能性がより高くなる、なぜなら C M L は通常、より若い年齢で始まるからである。

#### 【 0 0 2 0 】

白血病に特定した診断は、血球カウント数および骨髄バイオプシーを必要とする。白血病は、血液中の多数の異常白血球の存在、および骨髄中の典型的な白血病細胞の存在によ

10

20

30

40

50

り確認される。慢性白血病に関して、患者は疾患に気付いていない可能性があり、そしてしばしば患者が別の理由（定期検診または手術前など）で検査された時にだけ、診断がなされる。

#### 【0021】

急性および慢性白血病の治療は、しばしば類似しているが、しかしそれは各場合に関係する様々な要因に依存する。治療の目的は、白血病細胞の再生を抑制することである。この目的で、細胞増殖を阻止する細胞毒性薬が使用される。急速に分裂する白血病細胞は、正常白血球よりもこれらの薬物への感受性が高い。急性白血病の治療は、通常、複数の細胞毒性薬の同時使用を伴う。いったん白血病細胞数が減少すると、コルチコステロイドおよび一種または二種の細胞毒性薬のみを使用して改善を維持すればよい。慢性白血病に関して、細胞毒性薬およびコルチコステロイドが同様に使用され得る。場合によっては、輸血が必要になるかもしれない。白血病の診断は、血液または髄中の細胞の検査を必要とする。治療の目的は、完全な寛解を成し遂げることである。完全な寛解とは、疾患の徴候が無く、かつ患者が正常な血液および髄細胞を持つ良好な健康状態に戻ることを意味する。再発は、白血病細胞の復活、および疾患の他の徴候および症状の復活を示す。

10

#### 【0022】

急性白血病の臨床的発見の大部分は、正常骨髄成分が悪性細胞で置き換わることからもたらされる骨髄不全によるものである。直接組織浸潤（皮膚、胃腸管、髄膜）が稀に出現する。急性リンパ芽球性白血病（ALL）は、小児期の急性白血病の80%を占める。発生率のピークは、3歳～7歳の間である。しかしながら、ALLはまた、成人でも見られ、そして成人急性白血病の約20%を占める。急性骨髄性白血病（AML；急性非リンパ性白血病、「ANLL」）は、主に成人疾患である。

20

#### 【0023】

慢性リンパ性白血病（CLL）は、Bリンパ球（稀にTリンパ球）クローン悪性である。この疾患は通常、無痛性で、ゆっくりと進行する長命の小リンパ球の蓄積を伴う。これらの細胞は免疫的無能（immunoincompetent）である。慢性リンパ性白血病は、免疫抑制、骨髄不全、およびリンパ球の組織浸潤により、臨床的に発現する。

#### 【0024】

疾患の評価は、優勢芽細胞分布の系統割当てを評価する一次パネル、続いて一次パネルの結果に依存して、芽細胞分布の明確な表現型および成熟段階を特性決定するmAbsの二次パネルを使用してなされる。あるいは、あらかじめ決定されたパネルが、試料中の広範な未成熟および成熟造血細胞を即座に直接「大規模」特性決定するために選択される。これらの「大規模」特性決定は、悪性細胞が少数に過ぎない場合には検査の感度を増加させることができ、そしてまた病理細胞の異質性、ならびに随伴する他の細胞系統の成熟への妨害を特性決定する助けともなり得る。また、この戦略は、染色結果の一貫性のより良い制御を提供する。

30

#### 【0025】

白血病免疫表現型化

白血病の表面マーカーは、診断および予後目的の腫瘍系統同定に役立つ。総合的白血病表現型化は、病歴および形態を検討することで開始され、そしてマーカーパネルが各場合について選択される。大部分の場合、系統はT細胞、B細胞、または骨髄球と同定され得、そして診断または鑑別診断がなされ得る。

40

#### 【0026】

白血病表現型化の目的は、新生物プロセスの細胞型を同定することである。この表現型同定は、白血病またはリンパ腫の分類の助けとして、細胞系譜および成熟レベルの概略を示すはずである。さらに、この表現型同定は、細胞群が正常であるか異常であるかの決定を、および疾患の寛解、発達、または再発をモニタリングするための、試料中の既に特性決定された細胞群の検出を補助するはずである。

#### 【0027】

次いで、全血球計算値（白血球数を含む）が行われる。血球カウントは、治療に対する

50

疾患の応答の重要な指標である。これらのカウントはまた、薬物治療または放射線療法の効果を知るために重要である。血球カウントは、薬物が働いているかどうかを決める助けとなる。細胞の実際の計数は、通常、高価な電子計数器により行われ、この計数器を使用して検査を行うためには技術的専門知識が必要とされる。各細胞型のパターンは、白血病かどうか、および白血病の型を示す。

#### 【0028】

平均で、血液1立方ミリメートルあたり約4000~11,000個の白血球が存在する。全WBC数が11,000個の細胞/mm<sup>3</sup>を超える場合、これは白血球増加症(身体の感染に対する正常な応答)と呼ばれる。しかしながら、過剰な異常WBC(白血病性芽球)の存在は白血病と呼ばれる。約500万個の赤血球/mm<sup>3</sup>が血液中に存在する。異常に低いRBCは貧血によるものである可能性がある。貧血は白血病を暗示する。

10

#### 【0029】

白血病免疫表現型化は、血液または骨髄標本で行われるが、しかしながら、他の体液または組織が検査されてもよい。RBC溶解法または密度勾配単離(フィコール・ハイパックなど)を使用して得られた白血球が使用され得る。可能な場合、処理の前に全白血球数および分画が行われるべきであり、これに従って細胞濃度が調節される。

#### 【0030】

##### モノクローナル抗体パネル

多くの研究所では、多色免疫蛍光検出法が使用されるが、もっとも場合によっては、単色免疫蛍光が適切なこともある。ルーチン的に含まれる抗体は、CD2、CD3、CD5、CD10、CD11c、CD14、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD45、CD103、FMC7、重鎖、および である。臨床的または形態的特徴が「T」または「NK」リンパ球障害を示唆するならば、以下のさらなる抗体の組合せもまた行われる: CD3/CD4/CD8、CD7/CD5/HLA-DR、CD25/CD2/CD3、CD16/CD56/CD19、CD57/CD8/CD3、TCR - / - /CD3。

20

#### 【0031】

多数の、現在の生体治療が、白血病と闘うために使用される。例えば、白血病に対して、それらは髄補充療法で有効であり、そしてドナー骨髄の拒絶を阻止する。インターフェロンもまた、慢性骨髄球性白血病(CML)の治療に使用されている。

30

#### 【0032】

白血病性芽細胞の存在もまた、髄の検査により確認される。骨髄液が抜き取られて、顕微鏡で検査される。次いで、白血病性芽細胞が確認される。白血病細胞が骨髄試料中に見い出されたならば、次いで疾患の度合いを決定するために試験が行われる。脊椎穿刺は、脳および脊椎の中および周囲の空間を満たす液、すなわち脳脊髄液中の白血病細胞をチェックし、そして胸部への疾患の伝播をチェックするためにx線が使用される。

#### 【0033】

様々な化学療法薬が、様々な方法で癌細胞を攻撃する。それゆえ、組合せ化学療法治療が通常同時に与えられて、化学療法の効果を最大にする。

#### 【0034】

##### リンパ腫

従来、細胞を機能類似性でグループ分けするのに、形態的特徴が用いられてきた。しかしながら、形態のみでは、リンパ球サブセット(T細胞、B細胞、およびナチュラルキラー細胞など)の多くの機能能力を識別するのに不適切であることがわかっている。様々な機能を持つリンパ球を識別するために、ロゼット形成、免疫蛍光顕微鏡、酵素組織化学、および最近では蛍光標識化モノクローナルシグナル抗体フローサイトメトリーによる分析を含む技法が開発されてきた。リンパ球は、大きくはT(胸腺由来)リンパ球とB(ブルサ等価)リンパ球とに分けることができ、これらはそれぞれ細胞性免疫および体液性免疫を担う。

40

#### 【0035】

50

リンパ腫は、白血球の一種であるリンパ球に由来する悪性疾患群の総称である。リンパ球は、身体じゅうに分布するが、髄、リンパ節、脾臓、胃腸管、および皮膚に集中している。これらの部位は、リンパ系を構成する主要な組織である。

#### 【0036】

リンパ節は非常に数が多く、そして頭皮から足まで身体中に位置する。これらは、リンパ管と呼ばれる特別な循環系で連結されている。これらの管は、リンパと呼ばれる液を運び、液の中にリンパ球が懸濁することで、リンパ球は節から節へ、そして最終的には血液中へ移動する。リンパ球の悪性形質転換がリンパ腫を起こす。通常、これはリンパ節で起るが、胃、腸、皮膚、または他の組織で起こることもある。悪性リンパ球またはリンパ腫細胞は増殖して、もたらされる細胞が蓄積し、肥大したリンパ節（単数または複数）、または別の組織（胃、皮膚、または他の部位など）での塊を産生する。リンパ節では、増殖するリンパ腫細胞が、正常細胞を押し出して異常な細胞パターンを産生し、これがバイオプシー標本で同定かつ分類され得る。あるリンパ腫は髄に関係し、そして血球発達に干渉して、貧血を、そしてより重篤な場合には、低白血球数および低血小板数をもたらし得る。

10

#### 【0037】

全てのリンパ腫は、共通して、悪性リンパ球の異常増殖を有する。しかしながら、リンパ腫の型は、影響を受けたリンパ球の種類およびリンパ節の関与パターンで異なる。リンパ腫は、主に3つの型に分けられる：低悪性度、中悪性度、または高悪性度。これらの区分は、存在するリンパ腫細胞の型、リンパ節の分布パターン、リンパ球の免疫表現型（特にB細胞対T細胞）、および染色体異常性の性質に基づく。リンパ腫は、ホジキン型または非ホジキン型のいずれかに属する。ホジキン病またはホジキンリンパ腫は、リンパ系での細胞の悪性増殖である。ホジキン病は、リンパ腫のよく知られた形であり、そしてその他のリンパ腫は、非ホジキンリンパ腫と呼ばれる群に分けられる。しかしながら、1996年、WHOは、起源となる細胞（B対T）および分化段階（未成熟または前駆体対成熟または末梢性）に基づく分類系を推奨した。

20

#### 【0038】

ホジキン病は、通常、リンパ節（単数または複数）で発生する。免疫系細胞（リンパ球）は、悪性形質転換を起こし、それが増殖し、節の正常リンパ球を押し出してその機能を損なわせ、そしてリンパ節が肥大する。疾患を特徴付ける悪性細胞は、リード-スターンバーグ（Reed-Sternberg）細胞であり、そしてリンパ球に由来する。リンパ節で、疾患に特徴的な、他の異常細胞パターンと併せてリード-スターンバーグ細胞が見いだされる場合、診断がなされる。

30

#### 【0039】

ホジキン病は1つのリンパ節で始まり、そして悪性細胞がリンパチャンネル、すなわち隣り合うリンパ節を連結する管のネットワークを通じて移動すると考えられている。より進行したホジキン病では、肺、肝臓、および骨髄が、腫瘍塊に含まれ得る。悪性細胞がリンパ節からリンパ管または血管を通じて広まった場合、疾患は、他の組織に影響を及ぼし得る。症状はほとんどの場合首の片側でのリンパ節の膨張であるが、時々腋窩、鼠径部、または腹部でのリンパ節の膨張を含む。他の症状または徴候として、疲労、反復性発熱、夜間の発汗、かゆみ、背中、脚、または腹部の痛み、骨の痛み、食欲喪失、および体重減少が挙げられる。

40

#### 【0040】

リンパ腫の診断は、バイオプシーにより確定する。悪性細胞の存在、型、および配列について、組織が検査される。組織の細胞でも、検査が行われて、それらがリンパ球であるかどうか、およびそれらのリンパ球の型が決定される。疾患がリンパ系じゅうに、または身体他の部分に広まっているかどうかを決定するために、さらなる検査が行われる。これらの検査には、さらなるバイオプシー、核医学、x線、または核磁気共鳴画像法が含まれ得る。

#### 【0041】

50

リンパ腫を検出することは非常に困難である可能性がある。非ホジキン病にはいくつかの症状があるが、それらは特異的なものではない。しばしば、リンパ節が、特に上半身で膨潤する。診断は、組織バイオプシーを採取することで開始される。組織は、癌性細胞について顕微鏡検査される。リンパ腫を評価するために、多数の検査が行われる：リンパ節検査、異常血球カウントのための全血検査、血液化学、異常沈降速度、リンパ節を観るための、および他の組織が関係しているかどうかを見るための胸部×線、疾患の伝播の可能性を判断するための胸部、骨盤、および腹部のコンピュータ断層撮影（CTまたはCAT）スキャンまたは核磁気共鳴画像法（MRI）スキャン、膨潤および結局は疾患を示すリンパ系へのガリウムの放射能取り込みをチェックするガリウムスキャン、骨髄がリンパ腫により影響を受けているかどうかを決定するための骨髄吸引およびバイオプシー、骨髄液および骨細片が抽出されて顕微鏡検査される。非ホジキンリンパ腫型は、以下の型のものである：リンパ芽球性リンパ腫、切れ込みを有さない（non-cleaved）小細胞リンパ腫（パーキット型/非パーキット型）、および大細胞リンパ腫。リンパ腫の分類は、リンパ球増殖性新生物全てを包含する。より臨床的に有用な無痛性または急速進行性リンパ腫への米国立癌研究所（NCI）により記載される20を超える臨床病理学的実体が存在する。

10

## 【0042】

リンパ腫の診断および治療は、細胞型、リンパ節の関与パターン、および疾患の程度に依存する。疾患の初期局所段階は、放射線治療をすることができる。化学療法は、リンパ腫治療でより頻繁に見られる形態である、なぜなら、疾患は、診断された時には、通常身体の複数箇所にあるからである。高悪性度（急速進行性）リンパ腫は、通常、複数の異なる化学療法薬で同時に治療される。

20

## 【0043】

ホジキン型は、組織試料を採取し（バイオプシー）、そしてリード-スターンバーグ細胞（ホジキン病に特異的な細胞）の存在を検査することにより、医学的に診断される。針バイオプシーが用いられることもあるが、確定的な診断に十分な組織を得るには外科的バイオプシー（全節取り出し）が好適である。

## 【0044】

疾患の評価は、通常、優勢芽細胞分布の系統割当てを評価する一次パネル、続いて一次パネルの結果に依存して、芽細胞分布の明確な表現型および成熟段階を特性決定するモノクローナル抗体の二次パネルを使用してなされる。あるいは、あらかじめ決定されたパネルが、試料中の広範な未成熟および成熟造血細胞を即座に直接大規模特性決定するために選択される。これらの大規模特性決定は、悪性細胞が少数に過ぎない場合には検査の感度を増加させることができ、そしてまた病理細胞の異質性、ならびに随伴する他の細胞系統の成熟への妨害を特性決定する助けともなり得る。また、この戦略は、染色結果の一貫性のより良い制御を提供する。

30

## 【0045】

## リンパ腫免疫表現型化

リンパ腫の表面マーカーは、診断および予後目的の腫瘍系統同定に役立つ。総合的白血病/リンパ腫表現型化は、病歴および形態を検討することで開始され、そしてマーカーパネルが各場合について選択される。大部分の場合、系統はT細胞、B細胞、または骨髄球と同定され得、そして診断または鑑別診断がなされる。

40

## 【0046】

リンパ腫表現型化の目的は、新生物プロセスの細胞型を同定することである。この表現型同定は、リンパ腫の分類の助けとして、細胞系譜および成熟レベルの概要を示すはずである。さらに、この表現型同定は、細胞群が正常であるか異常であるかの決定を、および疾患の寛解、発達、または再発をモニタリングするための、試料中の既に特性決定された細胞群の検出を補助するはずである。

## 【0047】

次いで、全血球計算値（白血球数を含む）が行われる。血球カウントは、治療に対する疾患の応答の重要な指標である。これらのカウントはまた、薬物治療または放射線療法の

50

効果を知るために重要である。正常な白血球数は、血液1立方ミリメートルあたり約4000~11,000個である。全WBC数が11,000個の細胞/mm<sup>3</sup>を超える場合、これは白血球増加症(身体の感染に対する正常な応答)と呼ばれる。血球カウントは、薬物が働いているかどうかを決める助けとなる。従来、細胞の計数は、FACSスキャナーのような高価な電子計数器により行われ、検査を行うためには技術的専門知識が必要とされる。各細胞型のパターンは、リンパ腫かどうか、およびリンパ腫の型を示す。

#### 【0048】

##### モノクローナル抗体パネル

多くの研究所では、多色免疫蛍光が使用されるが、もっとも場合によっては、単色免疫蛍光が適切なこともある。ルーチン的に含まれる抗体は、CD2、CD3、CD5、CD10、CD11c、CD14、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD45、CD103、FMC7、重鎖、およびである。臨床的または形態的特徴が「T」または「NK」リンパ球障害を示唆するならば、以下のさらなる抗体の組合せもまた行われる: CD3/CD4/CD8、CD7/CD5/HLA-DR、CD25/CD2/CD3、CD16/CD56/CD19、CD57/CD8/CD3、TCR - / - /CD3。

10

#### 【0049】

リンパ腫と闘うために、近年開発された多数の生体治療が用いられる。例えば、モノクローナル抗体(特定の標的細胞を除去するために産生された抗体)が、リンパ腫に使用されている。

20

#### 【0050】

リンパ腫の患者でのWBC分画計数は、次の2つの理由によると思われる、いずれかの白血球増加により、通常は異常である。(a)反応性-すなわち感染、異常増殖、または炎症の続発性。リンパ球増加は、子供に多い、(b)新生物性-すなわち、白血病型および関連した障害または白血球減少、これは(a)消費または破壊(例えば、脾機能亢進)、(b)髄不全(この場合、通常は、汎血球減少がある)によるものであり得る。

#### 【0051】

好中球は、感染と闘うために重要である。好中球数が1マイクロリットルあたり1000細胞より落ち込んだ場合、その状態は好中球減少症と呼ばれる。リンパ腫治療は、リンパ球減少症を引き起こし得る。肥満および喫煙は、好中球数を増加させる。リンパ球は、B(骨髄成熟)リンパ球とT(胸腺成熟)リンパ球とに分けられる。リンパ数が、大人で1マイクロリットルあたり1500個の細胞、または子供で1マイクロリットルあたり3000個の細胞より落ち込んだ場合、その状態はリンパ球減少症と呼ばれる。リンパ腫は、リンパ球減少症を引き起こし得る。血小板(platelets(thrombocytes))は、出血が起こっている部位に集まることで出血を止める細胞様粒子である。次いで、それらは活性化して互いに凝集し、出血を止めて凝固を促進する。患者が骨髄増殖性障害(感染、炎症、悪性を含む)を有する場合、および脾臓が除去されてしまっている場合、血小板数は、精力的な活動中に増加する。血液の標準試料中の血小板数は、代表的には、1マイクロリットルあたり133,000~333,000個の血小板である。血小板減少症は、血小板数が30,000個より落ち込んだ場合に起こり、これは異常な出血をもたらす。5000個より少ない計数は、命にかかわると判断される。血小板増加は、(a)反応性-出血、感染、または異常増殖に対して、および(b)一次的-骨髄増殖性障害などであり得る。血小板減少は、(a)破壊性-例えば、免疫血小板減少症、または(b)髄不全-通常、他の血球も同じく関与する(すなわち、汎血球減少である)によるものであり得る。化学療法は血球の産生に影響を及ぼすため、血液中の様々な種類の細胞の量をチェックすることが重要である。

30

40

#### 【0052】

CBCは、市販のマニュアル、またはヘモグロビンレベル、ヘマトクリット、全白血球、および赤血球数を測定する電子機器により行われ得る。変形として、血小板数、白血球分画計数、および細胞指標が含まれ得る。血液学的分析器は、完全に自動化されており、

50

そして結果は、体液（CSF、胸水、腹水、心嚢液、および胃吸引物など）中の細胞数、細胞の型について正確である。

【0053】

抗体法による細胞関連抗原の検出能力は、診断病理学に新たな側面を加えた。様々な技法が、血液リンパ系障害の免疫表現型の研究に利用可能である。しかしながら、多数の疾患（後天性免疫不全症候群およびT細胞白血病などのウイルススペースの疾患、ならびに様々な癌を含む）の全域（global）検出法で、抗体-抗原反応を利用する免疫アッセイ方法のさらなる開発がなされる必要がある。当業者に明らかであるとおり、本発明のアッセイ方法および光バイオディスクシステムは、そのような免疫アッセイを実行するために使用され得る。

10

【0054】

放射免疫アッセイ（RIA）、酵素免疫測定（EIA）、蛍光免疫測定（FIA）などの従来微量免疫アッセイは、それぞれ、同位体、酵素、または蛍光物質を使用して、対応する抗体または抗原（それらと特異的に反応する）の有無を検出する。しかしながら、上記の方法は、限界および弱点を有する。RIAは、特別な設備、注意、限られた半減期、および様々な他の要因を要求する。標識として酵素または蛍光物質を使用する方法は、着色または蛍光を決定することにより測定されるが、過剰な、未結合、未反応試薬を除去するため複数の洗浄（washing）工程を必要とするのに加えて、熱量測定または蛍光反応を検出する高感度で、高性能な装置を必要とする。そのうえさらに、細胞（特にリンパ球および癌細胞などの標本）への上記検出方法の応用は、高効率での調製、検出、および分析技術の改善を要求する。

20

【0055】

細胞表面抗原に特異的な蛍光抗体の使用に関して開発された強力な道具は、蛍光活性化細胞分類（FACS）法である。これは、非常に信頼のおける、高速かつ高感度な方法である。フローサイトメーターは、最も実用的な方法であり、これは自動化されていて、定量的である。フローサイトメーター分析で第一に試料に必要とされることは、試料が単分散懸濁液中にあり、かつ蛍光マーカーで所望の細胞を標識していることである。しかしながら、これは非常に高価な検査であり、全システムが、臨床分析研究所で訓練された技師により操作されること、および高価な装置を必要とする。モノクローナル抗体は、別個のプロープ、および多数の細胞の対象物定量のフローサイトメーターとして使用される。

30

【0056】

さらに、根本的な弱点は、いったん分析された細胞は、もはや繰り返しての分析またはさらなる調査（例えば、稀な現象の細胞の顕微鏡検査）に利用できないことである。フローサイトメーターを超える利点および弱点を有する多数の代替法が開発されてきており、その全てが独自の問題を持っている。

【0057】

表面マーカー分析は、重要な研究室手段であり、白血病、リンパ腫、および免疫不全疾患を研究するのに、特に非常に有用であった。抗体ベースのマイクロアレイ技術は、確かに、試料（血液試料および組織試料を含む）中の特定抗原の同定用の、特に臨床診断での最新技法である。大部分の診断検査は、分析物（癌、白血病、リンパ腫、甲状腺疾患などのもの）の限られたパネルのみの検出を要求する。それゆえ、小型化技術による極少量の血液試料のみの必要性および、一回の検査での臨床的に関連したパラメーター全ての同時測定による時間および研究所人員のコストの削減は、そのコスト有効性、作業効率、およびその簡便さゆえに、病院検査室および介護拠点（point-of-care）施設に抵抗しがたい魅力になると思われる。

40

【0058】

細胞を計数する先行技術のシステムおよび方法の代替として、本発明者らは、血液および他の生体液（CSFなど）にはびこる寄生虫および病原を含む細胞、特に血球を、分析、検出、および定量する単純で安価なシステムを開発した。関連する情報および信号処理法およびソフトウェアが、様々な血球、寄生虫、および病原を同定するために開発された

50

。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0059】

先行する方法およびシステムと比較して、本発明者らは、単純で、小型化された、超高度で、安価な、細胞分析システムを開発した。本システムは、光バイオディスク、関連する検出アセンブリ、ならびに情報および信号処理法およびソフトウェアを使用する。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0060】

## [発明の概要]

光バイオディスクを使用して、生物試料中の血球分析物を検出する方法および装置を提供することが、本発明の第1の態様である。本発明はさらに、細胞単離および型付け (typing) (免疫表現型化を含む) の定性および定量法に関する。本発明は、有利には、以下の同一出願人による同時係属中の特許出願に開示される、任意のディスク、アッセイ、およびシステムと組み合わせて使用され得る：米国仮出願第60/302,757号、表題「Clinical Diagnostic Optical Bio-Disc And Related Methods For Selection And Detection Of Lymphocytes Including Helper-Inducer/Suppressor-Cytotoxic Cells」(2001年7月3日出願)、米国仮出願第60/306,035号、表題「Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping」(2001年7月17日出願)、米国仮出願第60/305,993号、表題「Capture Layer Assemblies and Optical Bio-Discs for Immunophenotyping」(2001年7月17日出願)、米国仮出願第60/306,592号、表題「Methods for Imaging Blood Cells, Blood-Borne Parasites and Patogens, and Other Biological Matter Including Related Optical Bio-Discs and Drive Assemblies」(2001年7月19日出願)、および米国仮出願第60/307,263号、表題「Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping」(2001年7月23日出願)。これらの出願全ては、本明細書中、参照として援用される。

## 【0061】

別の態様において、本発明は、アッセイのCDファミリーを含む細胞型付けに関する。CD4/CD8アッセイ、すなわちCD4+およびCD8+T-リンパ球の絶対数の迅速な測定および血液試料中のCD4+/CD8+リンパ球の比を得るための一般的な均質固相細胞捕獲アッセイ。

## 【0062】

アッセイのCDファミリーを含む細胞型付け、および白血病およびリンパ球 (lymphoma) 癌の細胞表面マーカーに関するシステムおよび方法を提供することをもまた、本発明の態様である。これらのアッセイは、血液試料中の様々な白血病またはCD特異的表面マーカー絶対数の迅速な測定用の均質固相細胞捕獲アッセイである。

## 【0063】

本発明はさらに、一次抗体を試料でオフサイトインキュベーションし、続いて表面結合二次抗体により捕獲することによる特異的細胞捕獲法に関する。光バイオディスクおよび支援ソフトウェアおよび処理法は、本発明のさらなる態様である。

## 【0064】

さらに別の態様において、本発明は、ディスクの特定位置での局所化細胞捕獲の原理に基づく細胞単離および型付けのシステムおよび方法に関する。複数の特異的細胞捕獲場が、特定のリンパ球 (白血球) 抗原に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体ベースの捕獲化学種 (chemistries) の局所的塗布により、ディスクに作成される。

## 【0065】

アッセイは、固相に付着した特異的抗体を有するフローチャンバを含むバイオディスクで行われる。ヘルパー-誘導因子/抑制因子-細胞毒性検査は、全血から単離された単核細胞 (MNC) 7~15 u l (チャンバ深度に依存する) を使用して、捕獲帯の特異的抗

10

20

30

40

50

体により捕獲された、例えば、CD4+、CD8+、CD3+、CD19+、およびCD45+リンパ球の絶対数を求める。チャンバをMNC(30,000個の細胞/ul)で溢れさせることで、目的の抗原または表面マーカーを現す細胞(CD4+、CD8+、CD3+、およびCD45+細胞など)が、特異的に、ディスクの捕獲帯に捕獲される。あるいは、本細胞捕獲法を使用して、MNCの代わりに全血が直接アッセイされてもよい。同じく分析チャンバに組込まれるものは、規定されたネガティブコントロール範囲である。

#### 【0066】

細胞を検出および計数する光分析ディスクと共同してアッセイを行う方法および装置を提供することもまた、本発明の態様である。本発明のさらなる態様は、リンパ球を検出する光分析ディスクと組み合わせてアッセイを行う方法および装置を提供することである。

10

#### 【0067】

本発明の別の態様に従って、ディスク表面中または上に試料を提供することを含む方法が提供され、ディスクは、光学式読み取り機で読み取り可能な符号化された情報を有する。この情報は、ディスクに対する読み取り機の走査を制御するために使用され得る。

#### 【0068】

本検査またはアッセイは、少なくとも2つの方法で行われ得る。第1の方法は、光バイオディスク上に位置する特別チャンネルの血球の光学画像化の原理に基づく。約5~20マイクロリットルの全血を、ディスク上の特別に設計されたチャンネルに注入する。画像は、様々な赤血球および白血球サブタイプを同定して、赤血球および白血球分画計数をそれぞれ生じる、細胞認識ソフトウェアで分析される。第2の方法は、特定の細胞に対する細胞特異的抗体を使用する、特異的細胞捕獲に基づく。その特定の1実施形態において、抗体は、例えば、リンパ球(CD2、CD19)、単球(CD14)、および好酸球(CD15)に対するものである。これらの白血球サブタイプ特異的抗体は、フローチャンバを含むバイオディスク内の固体表面に集められ/付着させられている。他の実施形態において、捕獲抗体は、目的の特定表面マーカー(例えば、CD3、CD4、CD8、およびCD45など)を有する他の細胞に対するものである。

20

#### 【0069】

いったん試料を分析チャンバ(単数または複数)にロードして、捕獲帯のそれら各自の捕獲剤に結合するのに十分な時間を置くと、ディスクは、ディスクドライブまたは任意の等価なスピナー内で、あらかじめ決められた速度および時間で、未結合細胞を捕獲帯から除去するために回転させられる。回転後、次いでディスクは光学式読み取り機内にロードされ、そして放射源からの電磁放射の入射ビームがディスクに向けられる。ディスクを中心軸で回転させ、そして入射ビームを軸に対して放射方向に動かすことにより、ビームはディスク全体を走査する。ディスクを透過するか、またはこれに反射されるかのいずれかの電磁放射ビームが検出および分析されて、試料に特徴的な情報が抽出される。

30

#### 【0070】

本発明の実施形態はまた、チャンバを形成するように間をとった基体およびキャップを持つディスクを含む。材料の試料(細胞を含む血液など)が、チャンバに提供される。ディスクが回転すると、試料は捕獲帯を通過して動く。捕獲帯は、目的の細胞型の細胞表面マーカーである抗原(CD4およびCD8など)と結合する、抗体または他の特異的結合パートナーを持つ捕獲層を含む。好ましくは、血液試料中のCD4およびCD8ならびに他の分析物を画像化するために1回の検査が用いられ得る。本発明の別の態様に従って、捕獲帯が位置する標的領域へ光を向け、そして透過光または反射光を検出して捕獲細胞を同定および計数するディスク読み取り機が提供される。これらのCD4およびCD8計数、ならびにその比は、AIDSなどの状態をモニタリングするのに有用である。

40

#### 【0071】

検査試料は、好ましくは、ディスク内のチャンバに提供される。単一のチャンバは、好ましくは複数の捕獲領域を有し、そのそれぞれが一種または複数の抗体を有し得る。1実施形態において、単一のチャンネルは複数の捕獲帯(それぞれ異なる型の抗体を持つ)を

50

有し、かつ対照帯として働く捕獲帯を有し得る。これらの捕獲帯は、ディスクの1つまたは複数の半径にそって整列し得る。検出法は、特徴の遷移を検出すること、または表示窓を画像化し、そして画像認識ソフトウェアを使用して捕獲された細胞を計数することを含む。計数は、直接（所望の細胞を計数するなど）であっても、または間接（所望のおよび所望でない細胞の集合を計数し、所望でない細胞を計数し、そして引き算して所望の細胞数を得るなど）であってもよい。捕獲帯は1つまたは複数の抗体層を有し得る。

**【0072】**

細胞試料がディスクに提供されると、ディスクは、1つまたは複数の台で回転して細胞を捕獲帯へ動かし、次いで未結合細胞を捕獲帯から除去することができる。試料は、他の方法でも処理され得る（例えば、インキュベート、または検出に使用される光源での加熱）。試料のディスク上処理に望ましいと思われる染色または任意の他の液体を加えるために、微小流体力学が使用され得る。この処理は、好ましくは、ディスク上の情報記憶領域の符号化された情報に特定される。記憶された情報は、中間の他の工程（インキュベーションなど）でドライブおよび読み取り機を所望の速度で所望の時間回転させるように、有利なように使用され得る。

10

**【0073】**

微小技術は、細胞型、寄生虫、病原、および他の生体物質の同定の臨床診断に、特に有益である。本発明は、光バイオディスク上で全血の白血球分画計数を行うのに、微小技術を利用する。また、本発明は、血球の画像化、白血球分画計数の実行、および関連する処理法およびソフトウェアに関する。

20

**【0074】**

本発明による別の検査またはアッセイが、少なくとも2つの方法で行われ得る。第1の方法は、光バイオディスク上に位置する特別チャンネルの血球の光学画像化の原理に基づく。約5~20マイクロリットルの全血を、ディスク上の特別に設計されたチャンネルに注入する。画像は、様々な白血球サブタイプを同定して、白血球分画計数を生じる、細胞認識ソフトウェアで分析される。第2の方法は、特定の細胞に対する細胞特異的抗体を使用する、特異的細胞捕獲に基づく。この特定の実施形態において、抗体は、例えば、リンパ球（CD2、CD19）、単球（CD14）、および好酸球（CD15）に対するものである。上記に記載される関連アッセイでのように、これらの白血球サブタイプ特異的抗体は、フローチャンパを含むバイオディスク内の固体表面に集められ/付着させられている。

30

**【0075】**

バイオディスクドライブアセンブリは、ディスクを回転させ、ディスクに記憶された任意の符号化された情報を読み取って処理し、そしてバイオディスクのフローチャンパの細胞捕獲帯を分析するために使用される。バイオディスクドライブには、バイオディスクを回転させるモーターと、ディスクの回転速度を制御するコントローラーと、ディスクからの戻り信号を処理するためのプロセッサと、および処理された信号を分析する分析器とが設けられる。回転速度は、可変であり、そして速度に対して、回転時間も、および回転方向も綿密に制御され得る。バイオディスクはまた、フローチャンパの検査材料および標的帯がドライブの読み取りビームにより検索され（interrogated）、そして分析器により分析される前、最中、またはその後のいずれかで、バイオディスクに情報を書き込むのに利用され得る。バイオディスクは、ディスクの回転を制御し、実行されるべき免疫型化（immunotyping）アッセイの型に特異的な処理情報を提供し、そしてバイオドライブに付随するモニターに結果を表示する、符号化された情報を含み得る。

40

**【0076】**

一般の分画細胞計数プロトコル、特に分画白血球計数プロトコルは、CD、CD-R、またはDVDフォーマット、それらフォーマットの変更版、およびそれらの代替物用に開発される。ドライブの読み取りまたは検索ビームは、分析試料の様々な細胞を検出して画像を作成し、これは分画細胞計数ソフトウェアで分析され得る。

**【0077】**

50

顕微鏡法または高性能細胞計数器は、これらの単調で根気のいる細胞計数アッセイを行うのに必須である。本方法は、光バイオディスクおよび関連するアセンブリを使用する。分析チャンバ中に遊離した、または特異的抗体法により捕獲された様々な白血球サブタイプの光学画像が作成され、そして血液または他の体液中の様々な細胞構成要素を光散乱性により同定する細胞認識ソフトウェアプログラムにより分析される。この戻り光は、入射ビームと目的の試料との間の光/物質相互作用後に検出される。検出された戻り光信号は、処理されて、識別される信号符号 (signal signature) またはデジタル ID を提供する。先行技術の方法は、代表的には、準備 (細胞染色、RBC 排除、または他の面倒なプロトコルなど) を必要とするが、本方法の実施形態は、どのような試料の前処理も必要としない。これらの方法は、上部検出器、下部検出器、事象計数器 (event counter)、または細胞計数器を使用する、CD 型または光ディスク読み取り機での顕微鏡分析または細胞検出を含む。

10

**【0078】**

以下の段落は、バイオディスク製造に関する本発明のある特定の好適な実施形態に従った基本的な方法工程の概要を提供する。

**【0079】**

ディスク調製：空気銃を使用して、いかなる埃粒子も除去することにより、金の反射型ディスクまたは透過型ディスクを清浄にする。スピンドーターを使用して、ディスクをイソプロパノールで2回リンスする (rinse)。2%ポリスチレンをディスクにスピンドーティングして、全体に極薄いコーティングを施す。

20

**【0080】**

化学種の堆積：一実施形態は、3工程堆積プロトコルを含み、これは以下のインキュベーションを行う：ストレプトアビジン (30分インキュベートする)；ビオチン標識化 (biotinylated) 第一抗体 (60分インキュベートする)；および第二捕獲抗体 (30分インキュベートする)。全ての工程は、加湿チャンバ中にて室温で、堆積と堆積の間に、厳密な洗浄工程および乾燥工程を用いて行われる。

**【0081】**

簡単には、ストレプトアビジンの  $1\text{ mg/ml}$  リン酸緩衝生理食塩水  $1\ \mu\text{l}$  を、各窓に重ねて30分間インキュベートする。蒸留水を使用して過剰なストレプトアビジンを洗い落とし (rinse off)、ディスクを乾燥させる。等体積のビオチン標識化 IgG (PBS 中  $125\ \mu\text{g/ml}$ ) とアルデヒド活性化デキストラン ( $200\ \mu\text{g/ml}$ ) と合わせることで、ビオチン標識化 IgG - デキストラン複合体を調製する。デキストラン - アルデヒドビオチン標識化 IgG 複合体を、各捕獲窓のストレプトアビジンに重ね、冷蔵庫中で60分間または一晩インキュベートする。過剰な試薬を洗い落とし、ディスクをスピン乾燥させる (spin-dry)。バイオディスクスロットの、指定された点に捕獲抗体を重ねることで、特定のバーコード捕獲パターンを作成する。分画計数のため、例えば、抗好中球 (CD128 またはその他)、抗リンパ球 (CD2、CD19、CD56、およびその他)、抗好酸球 (CD15)、抗単球 (CD14)、抗好塩基球 (CD63)、および抗血小板 (CD32 および CD151) が、各スロットの指定された点に重ねられる。以下の表1、表2、および表3は、捕獲層アセンブリの捕獲パターンの変異体の例を列挙する。30分間または一晩、冷蔵庫でインキュベートする。  $25\ \mu\text{m}$ 、 $50\ \mu\text{m}$ 、または  $100\ \mu\text{m}$  ( $50\ \mu\text{m}$  チャンネルは、 $25\ \mu\text{m}$  チャンバで必要とされるものの2倍の試料体積を必要とする) の、直線、U字型、または他のチャンネルフォーマットを使用して、ディスクと透明カバーディスク (上部検出器で使用するため) または反射カバーディスク (下部検出器で使用するため) とを組立てる。

30

40

**【0082】**

【表 1】

捕獲層アセンブリおよび変異体 I						
窓	1	2	3	4	5	6
第一層 (活性層)	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン
第二層		ストレプトア ビジン	ストレプトア ビジン	ストレプトア ビジン	ストレプトア ビジン	ストレプトア ビジン
二次抗体		B-抗マウス I g G + D C H O	B-抗マウス I g G + D C H O	B-抗マウス I g G + D C H O	B-抗マウス I g G + D C H O	B-抗マウス I g G + D C H O
一次抗体	参照マーカー	リンパ球特異 的抗体	好中球特異的 抗体	好酸球特異的 抗体	好塩基球特異 的抗体	単球特異的抗 体

10

20

30

40

## 【0083】

タンパク質（例えば、抗原および抗体）は、非極性タンパク質下部構造とディスク表面との間の疎水的相互作用の結果として、ディスク表面に受動的に吸着される。タンパク質の吸着の速度および程度は、コーティングされた表面積対コーティング溶液の体積の比、吸着される物質の濃度、温度、および吸着時間を含む、多数の要因に依存する。しかしな

50

がら、化学種の頑強さは、タンパク質自体の安定性に依存する。

【0084】

赤血球と比較して、白血球ははるかに大きく、効率的な細胞捕獲のために安定で頑強な化学種を必要とし得る。バイオディスク表面でこれを達成するために、本発明者らは、ビオチンとアビジンとの強力な相互作用を利用した。ビオチン標識抗マウスIgG（ヒツジで作製）がアルデヒド活性化デキストランとカップリングした架橋法を、本発明の一実施形態の、一次捕獲抗体とストレプトアビジンコーティングされたディスク表面との間の架橋として使用した。アビジン-ビオチン架橋に加えて、またはその代わりに、活性化アルデヒドデキストラン（DCHO）などの多機能性架橋剤が使用されて、*o*g抗体のディスク表面への結合を促進し得る。捕獲層とディスク表面との間の安定で強力な結合は、細胞捕獲を向上させ、かつ抗血清の使用、反応時間、および非特異的結合を減らし得る。

10

【0085】

本発明の別の実施形態において、固相での特異的細胞捕獲は、一次抗体に対する特異的親和性を有する二次捕獲抗体を使用して行われる。二次捕獲抗体は固体表面に結合する。試料細胞は、以下に記載されるように、一次抗体とともにオフサイトでインキュベートされて、アッセイチャンバまたは二次抗体に重ねられた一次抗体に注入され得る。簡潔には、例えば、ストレプトアビジンの1mg/mlリン酸緩衝生理食塩水1 $\mu$ lを、各層に重ねて30分間インキュベートする。蒸留水を使用して過剰なストレプトアビジンを洗い落とし、ディスクを乾燥させる。等体積のビオチン標識化IgG（PBS中125 $\mu$ g/ml）と活性化デキストランアルデヒド（200 $\mu$ g/ml）とを合わせることにより、IgG-デキストラン複合体を調製する。デキストランアルデヒドビオチン標識化IgG複合体を、各捕獲窓のストレプトアビジンに重ね、冷蔵庫中で60分間または一晩インキュベートする。過剰な試薬を洗い落とし、ディスクをスピン乾燥させる。バイオディスクスロットの、指定された点に捕獲抗体を重ねることで、特定の捕獲帯パターンを作成する。ヘルパー/誘導因子-抑制因子/細胞毒性アッセイのため、以下の表2に記載されるように、抗CD4、抗CD8、および抗CD3、および抗CD45が二次抗体に重ねられる。30分間または一晩、冷蔵庫でインキュベートする。25 $\mu$ mまたは100 $\mu$ mの「U」字型接着剤（3M）と、上部検出器で使用する透明カバーディスクまたは下部検出器で使用する反射カバーディスクとを組立てる。二重層抗体捕獲法に関するさらなる詳細は、図35A~図35D、図36、および図37に関連して、以下に記載される。

20

30

【0086】

【表 2】

捕獲層アセンブリおよび変異体 I I						
	1	2	3	4	5	6
窓	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン	ポリスチレン
第一層	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン
第二層	B-抗マウス IgG+DC HO	B-抗マウス IgG+DC HO	B-抗マウス IgG+DC HO	B-抗マウス IgG+DC HO	B-抗マウス IgG+DC HO	B-抗マウス IgG+DC HO
二次捕獲抗体		抗ヒトCD4	抗ヒトCD8	抗ヒトCD3	抗ヒトCD4	抗ヒトCD15
一次捕獲抗体						

10

20

30

40

## 【0087】

あるいは、分取したMNC試料を所定の細胞に対する抗体とともにオフサイトでインキュベートする。ヘルパー/誘導因子-抑制因子/細胞毒性アッセイのため、MNCは、抗CD4、抗CD8、抗CD3、抗CD14、および抗CD45とともに、相互作用が完了するように15分間インキュベートされる。未結合抗体を、洗浄して(1000rpmで5分間の遠心分離)除去する。次いで、洗浄した複合体を、25~100umで、特異的

50

二次捕獲抗体（特異的 I g G など）が重ねられているチャンバに注入する（3 M 接着剤または関連したもので作成される）。30 分間のインキュベーション後、特に捕獲された細胞を、上部検出器（透明カバー）で、または下部検出器（反射型ゴールドカバーディスク）で画像化する。細胞捕獲のこの方法に関するさらなる詳細は、図 3 1 A ~ 図 3 1 E に関連して、以下に記載される。この方法は、所定の一つの特定の抗体を評価することを可能にする。それゆえ、ディスクの各スロットまたはチャンバは、所定の一つの特定細胞型を調査に専用のものである。例えば、リンパ腫で、系統が T 細胞（C D 3 とインキュベートされる細胞）であるか B 細胞（C D 1 9 とインキュベートされる細胞）であるかを決めるため。ディスクは、チャンバ / スロットの必要数と適応するように設計され得る。以下の表 3 に示される例は、8 チャンバ / チャンネルディスクのさらなる捕獲層パターンを示す。

10

【 0 0 8 8 】

【表 3 - 1】

## パターン 3

チャンバ/スロット	1	2	3	4	5	6	7	8
第一層	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン
二次捕獲抗体	B-抗マウスIgG	B-抗マウスIgG	B-抗マウスIgG	B-抗マウスIgG	B-抗マウスIgG	B-抗マウスIgG	B-抗マウスIgG	B-抗マウスIgG
一次捕獲抗体	抗ヒトCD4	抗ヒトCD4	抗ヒトCD8	抗ヒトCD8	抗ヒトCD45	抗ヒトCD45	抗ヒトCD19	抗ヒトCD19

## パターン 4

チャンバ/スロット	1	2	3	4	5	6	7	8
第一層	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン	ストレプトアビジン
二次捕獲抗体	B-抗マウスIgG+DC HO	B-抗マウスIgG+DC HO	B-抗マウスIgG+DC HO	B-抗マウスIgG+DC HO	B-抗マウスIgG+DC HO	B-抗マウスIgG+DC HO	B-抗マウスIgG+DC HO	B-抗マウスIgG+DC HO
一次捕獲抗体	参照マーカー	抗ヒトCD4	抗ヒトCD4	抗ヒトCD8	抗ヒトCD8	抗ヒトCD45	抗ヒトCD19	

【表 3 - 2】

パターン5	チャネル	1	2	3	4	5	6	7	8
	二次捕獲抗体	抗マウス I g G + D C H O	抗マウス I g G + D C H O	抗マウス I g G + D C H O	抗マウス I g G + D C H O	抗マウス I g G + D C H O	抗マウス I g G + D C H O	抗マウス I g G + D C H O	抗マウス I g G + D C H O
	一次捕獲抗体	参照マ ク	抗ヒトC D 4	抗ヒトC D 4	抗ヒトC D 8	抗ヒトC D 8	抗ヒトC D 8	抗ヒトC D 4 5	抗ヒトC D 1 9

パターン6	チャネル	1	2	3	4	5	6	7	8
	一次捕獲抗体	参照マ ク	抗ヒトC D 4	抗ヒトC D 4	抗ヒトC D 8	抗ヒトC D 8	抗ヒトC D 4 5	抗ヒトC D 1 9	空欄

10

20

30

40

## 【 0 0 8 9 】

ディスク漏れチェックおよび望ましくない細胞の非特異的結合の遮断：血液、すなわち生物学的有害性材料が分析されているため、本発明の品質管理製造上の態様の一部として、チャンバのいずれも、ディスクの回転中に *in situ* で試料を漏らさないことを確実にするために、ディスクの漏れをチェックする。各チャンネルに、好ましくはスタビルガード (Stabil Guard、市販の遮断剤) を満たし、1時間遮断する。ディスク

50

を5000rpmで5分間回転させて、漏れおよびディスク安定性を点検する。漏れをチェックした後、ディスクを真空チャンバに24時間置く。真空吸引後、PBS緩衝液で満たしたチャンバまたは空のチャンバを真空パウチに入れて、使用するまで冷蔵庫に貯蔵する。

#### 【0090】

全血からのパフィーコート単離：脱線維素静脈血を、遠心管中にて2800rpmで25分間遠心分離して、パフィーコートを調製する。上清血漿を、極細ピペットで注意深く除去する。次いで、白血球および血小板を含む、下層をなす白層をピペットで取る。遠心分離せずに血液からパフィーコートを得る代替法は、沈降促進剤（フィブリノーゲン、デキストラン、アカシア・ゴム、フィコール、またはメチルセルロースなど）で血液を沈降させることである。Boyum's 試薬（メチルセルロースおよびメトリゾエート（metrizoate）ナトリウム）は、いかなる赤血球混入もなく白血球調製物を得るのに、特に適している。あるいは、リンパ球は、陽性選択または陰性選択、あるいは溶解法により、全血から単離され得る。

10

#### 【0091】

ディスクでのアッセイ - 基本技術の記載：分画白血球計数ディスク試験の好適な一実施形態は、3つの個別のコンポーネント、すなわち、(1)化学種を含む基礎ディスク、(2)チャンネル層、および(3)カバーディスクを含む。

#### 【0092】

パフィーコートまたは全血は、好ましくはPBSに希釈されて、ディスクチャンバに注入され、チャンバの入口および出口はテープで密閉され、ディスクは、好ましくは室温で、所望の時間インキュベートされる。第1の方法として、ディスク上の所定範囲（例えば、1平方ミリメートルの範囲）が、上部検出器または下部検出器とともに光ドライブの標準780nmレーザーを使用して、走査される。本譲受人により開発されて、米国仮出願第60/363,949号、表題「Methods for Differential Cell Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-disc for Performing Same」（2002年3月12日出願）、および米国仮出願第60/404,921号、表題「Methods For Differential Cell Counts Including Related Apparatus and Software For Performing Same」（2002年8月21日出願）に開示される、関連する細胞認識ソフトウェアは、得られた画像（例えば、これは好ましくは1平方ミリメートルに等しい）から分画計数を与えるよう自動化される。第2の方法として、標準780nmレーザーを使用してディスクを走査し、リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、単球、および血小板を含み得る捕獲帯を画像化する。本譲受人により開発された細胞認識ソフトウェアは、以下のルーチンを行うよう自動化される：(a)ディスクを遠心分離して過剰な未結合細胞を除去する、(b)特定範囲または特定捕獲帯を画像化する、および(c)各捕獲帯に特異的に捕獲された細胞の計数および白血球の異なるサブセットの数の振り分けを含むデータ処理。

20

30

#### 【0093】

処理工程の間、認識ソフトウェアは、各捕獲帯を縦断して読み取り、遭遇した細胞をマークする。各捕獲帯からのデータ処理に続いて、ソフトウェアは、血液1マイクロリットル体積あたりの、リンパ球、好中球、好塩基球、好酸球、単球、および血小板区画の数を表示する。ディスクを光学ドライブに挿入してから所定の結果を表示するまで、プロセス全体で、約10~15分かかる。

40

#### 【0094】

本発明に伴い関連する開示もまた、以下に表され、これらは全て、本明細書中に参照により援用される：米国仮出願第60/307,262号、表題「Capture Layer Assemblies and Optical Bio-discs for Immunophenotyping」（2001年7月23日出願）、米国仮出願第60/307,264号、表題「Methods for Imaging Blood Cells, Blood-Borne Parasites and Pathogens, and Other Biological Matter Including Related Optical Bio-Discs and Drive Assemblies」（2001年7月23日出願）、米国仮出願第60/307,562号、表題「Optical Analysis Discs Including Fluidic Circuits fo

50

r Optical Imaging and Quantitative Evaluation of Blood Cells Including Lymphocytes」(2001年7月23日出願)、および米国仮出願第60/307,487号、表題「Methods for Differential Cell Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same」(2001年7月24日出願)。

【0095】

以下の段落は、本発明のある特定の好適な実施形態に従ったディスク仕様の基本エレメントの概要を提供する。

【0096】

追跡設計：本発明の好適な一実施形態において、ディスクは、300nmの金でコーティングされたforward Wobble Set FDL21:13707またはFDL21:1270である。この反射型ディスク上、大きさ2×1mmの長円形データ窓がリソグラフィーによりエッチングされている。「U」字型チャンネルを使用して、高さ25μmのチャンバを作る。入口および出口を含むチャンバ全体を満たすのに約7μlの試料を要する。4窓/4チャンネルフォーマットが、おそらく使用に好適である。しかしながら、透過型ディスクでは、データ窓はエッチングされず、そしてディスク全体が使用に利用可能である。

10

【0097】

接着剤および結合：好適な一実施形態において、本「U」字型流体回路を含む、接着剤またはチャンネル層が、Fraylock adhesive DBL 201 Rev C 3M94661で作られる。あるいは、直線チャンネルを使用してチャンバが作られる。

20

【0098】

カバーディスク：完全反射性の半径26mmで等距離に位置する直径0.040インチの試料入口48個を持つ透明ディスクを、本ディスクアセンブリの具体的な一実施形態で使用する。

【0099】

データ収集および処理：本出願人の細胞認識ソフトウェアを使用して、好適な×4速度および2.67MHzの試料速度で、ソフトウェアでデータディスクを走査および読み取りする。

【0100】

ソフトウェア：本発明はさらに、処理法および関連する細胞認識および画像化ソフトウェアを含む。このソフトウェアは、細胞計数および分画細胞計数を実行して表示することに関する。本ソフトウェアは、光ディスクドライブ読み取り装置の光バイオディスクに記憶されてもよいし、その代わりに保護されたサーバーから光学式読み取り機によってのみアクセス可能であってもよい。このサーバーは、コンピューターネットワーク(ローカルエリアネットワーク(LAN)、広域ネットワーク(WAN)、または所定の用語および条件下インターネットを通じて利用可能にされたその他のものなど)で、実施し得る。そのような配分法は、同一出願人による米国仮出願第60/246,824号、表題「Interactive Method and System for Analyzing Biological Samples and Processing Related Medical Information Using Specially Prepared Bio-Optical Disc, Optical Disc Drive, and Internet Connections」(2000年11月8日出願)、および関連する米国特許出願第09/986,078号、表題「Interactive System for Analyzing Biological Samples and Processing Related Information and the Use Thereof」(2001年11月7日出願)に開示され、この両方が、本明細書中に参照として、その全体が援用される。

30

40

【0101】

材料：本明細書中に開示される様々な好適な実施形態を実行するために使用される材料として、金メッキしたforward wobbleフォトレジストディスク、透過型金メッキディスク、ピペットおよびチップ、スピンコーター、遠心分離機、スイングアウトローター、抗凝固剤(クエン酸ナトリウムまたはエチレンジアミン四酢酸(EDTA)な

50

ど)入りVacutainer(商標)CPT管、加湿チャンバ、ディスクプレス、接着剤、カバーディスク、透明カバーディスク、テープまたは等価物、真空装置、イエローチップ、および真空チャンバが挙げられる。

【0102】

試薬：本発明のある方法に従って細胞計数を実行するのに使用される試薬として、リン酸緩衝食塩水、イソプロピルアルコール、蒸留水、およびスタビルガードが挙げられる。

【0103】

既知の当該技術分野の限界を超えることが本発明の目的である。本発明の別の目的は、光バイオディスクで全血の分画白血球計数を行うために既知の光ディスクシステムを適合させることである。血球を画像化して分画白血球計数を行うことが、本発明のさらなる目的である。

10

【0104】

本発明のこれらのおよび他の目的および利点は、クラスター標識計数を行う光ディスクおよびドライブシステムで達成され、これは、光アッセイディスク、光源、光ディスクドライブの光検出器回路、およびプロセッサを含む。光アッセイディスクは、基体、基体を覆って配置された活性層、および接着部材またはチャンネル部材チャンネル部材により活性層へ一体化して取り付けられたキャップ部分を含む。接着部材は、そこから除去されて、それによりチャンバを形成する部分を一カ所または複数箇所有し、チャンバ中一種または複数の捕獲剤が固定されている。捕獲剤は、活性層に固定されており、そしてチャンバ内で、別々の捕獲帯を定義する。光源は、光をディスクの捕獲帯に向ける。光ディスクドライブの光検出器回路は、ディスクから反射した、またはそこを透過した光を検出して、光ディスクアセンブリから情報運搬信号を提供するように設定される。プロセッサは、光検出器回路と連動して、情報運搬信号(光ディスクシステムを操作するのに使用される操作情報)を得て捕獲剤に結合した試料中の種目を計数する。

20

【0105】

本システムの特定の一態様に従って、プロセッサは、細胞を検出して画像化する画像認識ソフトウェアを含む。一実施形態において、光検出器は、捕獲帯から反射した光を検出するために、ディスクの、光源と同じ側にある。代替的な実施形態において、光検出器は、捕獲帯を透過した光を検出するために、ディスクの、光源と反対側にある。

【0106】

本発明はまた、光ディスクおよびディスクドライブを用いてクラスター標識計数を実行する方法に関する。本方法は以下の：分離勾配を有する第一の管に血液試料を用意する工程と、第一の管を、血液試料を層に分離するのに十分な時間および速度で回転させる工程と、T細胞含有MNC層を再懸濁させる工程であって、それによりMNC懸濁液を形成する、再懸濁させる工程と、MNC懸濁液の試料を、少なくとも一種の捕獲剤を含有する少なくとも一つの捕獲帯を含むディスク表面上に用意する工程と、ディスクを光学式読み取り機にロードする工程と、ディスクを回転させる工程と、電磁放射の入射ビームを捕獲帯に向ける工程と、ディスクと捕獲帯で相互作用した後に形成された電磁放射ビームを検出する工程と、検出されたビームを出力信号に変換する工程、および、出力信号を分析する工程であって、それにより捕獲帯に捕獲された細胞数に関する情報を抽出する、分析する工程とを含む。本方法の一実施形態において、光ディスクは、捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が反射されるように、反射層と合わせて構成される。本方法の別の実施形態において、光ディスクは、捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が光ディスクを透過するように構成される。試料中の細胞集団の濃度を求めることに関する他の関連する態様は、同一出願人による同時係属中の米国仮出願第60/384,205号、表題「Optical Disc Systems For Determining The Concentration Of Cells or Particles In A Sample And Methods Relating Thereto」(2002年5月30日出願)に開示されている。この出願は本明細書中にその全体が参照として援用される。

30

40

【0107】

本方法の他の態様によれば、ディスク表面は、捕獲剤の第一群でコーティングされる。

50

本方法の一実施形態において、捕獲剤は、架橋系によりディスク表面に固定される。代替的な実施形態において、捕獲剤は、ディスク表面に直接固定される。

【0108】

本方法のさらに別の態様によれば、捕獲剤は、1つまたは複数の不連続の捕獲帯を規定する。本方法の特定の一実施形態において、1つまたは複数の捕獲帯は、光ディスク内の1つまたは複数のチャンパ内に配置される。本方法の別の実施形態において、捕獲剤は、細胞表面抗原に選択的親和性を有する。代替的な実施形態において、捕獲剤は細胞表面抗原に選択的親和性を有する一次捕獲剤と結合するためのものである。好適な実施形態において、細胞表面抗原は、抗原のCDファミリーから独立して選択される。さらに好適な実施形態において、細胞表面抗原は、CD3、CD4、CD8およびCD45からなる群から選択される。 10

【0109】

本方法のさらに別の態様に従って、回転は、細胞が捕獲剤と結合する機会を得るように、十分な長さの時間、十分な速度で回転することを含む。本方法のこの態様の実施形態において、回転はさらに、未結合細胞が捕獲帯から取り除かれるように、十分な長さの時間、十分な速度で回転することを含む。本方法のこの態様の好適な実施形態において、回転は、単一速度で行われる。

【0110】

本発明のこれら態様に従った本方法の実施形態は、有利なように、さらに、MNC細胞の試料を捕獲剤の近くに導く工程、捕獲剤の存在下細胞をインキュベートする工程、そして細胞が特に捕獲剤と結合することを可能にする工程を含む。本方法の実施形態はさらに、捕獲された細胞数を分析する工程であって、それにより試料中の細胞濃度を求める、分析する工程を含む。この実施形態の一態様において、分析は、ディスクから反射された、または光を透過した光のレベルの十分に大きな変化を検出することを含む。この実施形態の別の態様において、分析は、画像認識を使用して捕獲された細胞を計数することを含む。本方法の好適な実施形態において、画像認識は、白血球の1つの型を別のものと識別する。 20

【0111】

本方法の別の実施形態は、さらに、捕獲帯のそれぞれで捕獲された細胞を計数する工程、そして細胞計数を含む出力を提供する工程を含む。この実施形態の態様において、出力は、CD4細胞およびCD8細胞の計数、ならびに、CD4細胞対CD8細胞の比を含む。 30

【0112】

本発明のさらに別の主要な態様によれば、クラスター標識計数を実行する代替的な方法が提供される。この代替的な方法は、(1)分離勾配を含む管に血液試料を用意する工程と、(2)管を、血液試料を層に分離するのに十分な時間および速度で回転させる工程と、(3)T細胞含有MNC層を再懸濁させる工程であって、それによりMNC懸濁液を形成する、再懸濁させる工程と、(4)一次抗体をMNC懸濁液に添加する工程であって、それにより一次抗体T細胞複合体を形成する、添加する工程と、(5)一次抗体T細胞複合体の試料を、少なくとも一種の捕獲剤を含有する少なくとも1つの捕獲帯を含むディスク表面上に提供する工程と、(6)ディスクを光学式読み取り機にロードする工程と、(7)電磁放射の入射ビームを捕獲帯に向ける工程と、(8)ディスクと捕獲帯で相互作用した後に形成された電磁放射ビームを検出する工程と、(9)検出されたビームを出力信号に変換する工程と、(10)出力信号を分析する工程であって、それにより捕獲帯に捕獲された細胞数に関する情報を抽出する、分析する工程とを含む。 40

【0113】

同様に、この代替的な方法の一実施形態において、光ディスクは、捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が反射されるように、反射層と合わせて構成される。本方法の別の実施形態において、光ディスクは、捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が光ディスクを透過するように構成される。 50

## 【0114】

本方法の一態様によれば、ディスク表面は、捕獲剤の第一群でコーティングされる。本方法の一実施形態において、捕獲剤は、架橋系によりディスク表面に固定される。代替的な実施形態において、捕獲剤は、ディスク表面に直接固定される。

## 【0115】

この方法のさらに別の態様によれば、捕獲剤は、1つまたは複数の不連続の捕獲帯を規定する。本方法の特定の一実施形態において、1つまたは複数の捕獲帯は、光ディスク内の1つまたは複数のチャンパ内に配置される。本方法の別の実施形態において、捕獲剤は、細胞表面抗原と結合するためのものである。代替的な一実施形態において、捕獲剤は、細胞表面抗原に選択的親和性を有する捕獲剤の第二群と結合するためのものである。好ましい実施形態において、細胞表面抗原は、抗原のCDファミリーから独立して選択される。より好ましい実施形態において、細胞表面抗原は、CD3、CD4、CD8およびCD45からなる群から選択される。

10

## 【0116】

本方法のさらに別の態様によれば、回転は、細胞が捕獲剤と結合する機会を得るように、十分な長さの時間、十分な速度で回転することを含む。本方法のこの態様の実施形態において、回転はさらに、未結合細胞が捕獲帯から取り除かれるように、十分な長さの時間、十分な速度で回転することを含む。本方法のこの態様の好適な実施形態において、回転は、単一速度で行われる。

## 【0117】

本発明のこれら態様に従った本方法の実施形態は、有利なように、さらに、一次抗体T細胞複合体の試料を捕獲剤の近くに導く工程と、捕獲剤の存在下で複合体をインキュベートする工程と、複合体が特異的に捕獲剤と結合することを可能にする工程とを含む。この方法の実施形態はさらに、捕獲された複合体数を分析する工程であって、それにより試料中の細胞濃度を求める、分析する工程を含む。この実施形態の一態様において、分析は、ディスクから反射された、またはディスクを透過した光のレベルの十分に大きな変化を検出することを含む。この実施形態の別の態様において、分析は、画像認識を使用して捕獲された複合体を計数することを含む。本方法の好適な実施形態において、画像認識は、白血球の1つの型を別のものと識別する。

20

## 【0118】

本方法の別の実施形態は、さらに、捕獲帯のそれぞれで捕獲された細胞を計数する工程と、細胞計数を含む出力を提供する工程とを含む。この実施形態の態様において、出力は、CD4細胞およびCD8細胞の計数、ならびに、CD4細胞対CD8細胞の比を含む。

30

## 【0119】

上記方法のいずれかにおいて、管はさらに、抗凝固剤を含んでもよい。さらに、これらの方法の特定の実施態様および実施形態の多くにおいて、捕獲剤が固定される表面は、ディスクの内部であり、かつ基体およびキャップと反対側で結合されている。

## 【0120】

本発明の製造態様に従って、クラスター標識計数を行う光アッセイディスクの作成法が提供される。この光アッセイディスク作成法は、管に架橋剤を用意する工程、管へ捕獲剤を加える工程、架橋剤と捕獲剤とを組合せる(複合体を形成する)工程、基体を用意する工程、基体を活性層でコーティングする工程、複合体を活性層上に堆積させる工程、そして接着部材を用いてキャップ部分を活性層に付着させる工程を含む。この実施形態において、架橋剤は、アルデヒド活性化デキストランである。捕獲剤は、細胞表面抗原と結合するためのものである。

40

## 【0121】

この方法の態様に従って、堆積は、複合体を所定の位置へ堆積させて、それにより捕獲帯を形成することを含む。それらの一実施形態において、付着は、捕獲帯に向けられかつ細胞には当たらない光が反射されるような反射層を有するキャップ部分を付着させることを含む。それらの代替的な実施形態において、付着は、捕獲帯に向けられかつ細胞には当

50

たらない光が光ディスクを透過するような半反射層を有するキャップ部分を付着させることを含む。

【0122】

別の実施形態において、捕獲剤は、一次および二次捕獲抗体を含む。二次抗体は、ディスク表面に結合しており、そして一次捕獲抗体に特異的親和性を有する。この実施形態において、一次捕獲抗体は、目的の細胞表面抗原に選択的親和性を有する。それらの好適な実施形態において、細胞表面抗原は抗原のCDファミリーから選択される。さらに好適な実施形態において、細胞表面抗原は、CD3、CD4、CD8、およびCD45からなる群より選択される。

【0123】

同じく本発明の製造態様に従って、クラスター標識計数を行う光アッセイディスクの代替作成法が提供される。光アッセイディスクを作成するこの代替法は、基体を用意する工程、基体を活性層でコーティングする工程、捕獲剤を活性層上に堆積させる（捕獲帯を形成する）工程、基体をインキュベートする工程、基体を回転させる工程、そして接着部材を用いてキャップ部分を活性層に付着させる工程を含む。この方法の特定の一実施形態において、インキュベートする工程は、捕獲剤を活性層上に固定させるのに十分な長さの時間、十分な温度で、インキュベートすることを含む。この方法の別の実施形態において、回転させる工程は、固定されていない捕獲剤が捕獲帯からはじき出されるように、十分な長さの時間、十分な速度で回転させることを含む。

10

【0124】

この方法の別の態様に従って、捕獲剤は、IgG、ビオチン標識IgG、抗CD3抗体、ビオチン標識抗CD3抗体、抗CD4抗体、ビオチン標識抗CD4抗体、抗CD8抗体、ビオチン標識抗CD8抗体、抗CD45抗体、およびビオチン標識抗CD45抗体からなる群より選択される。この態様の一実施形態において、捕獲剤は、一次捕獲剤である。代替的な実施形態において、捕獲剤は、二次捕獲剤である。この代替的な実施形態の一態様に従って、この方法はさらに、回転させる工程後、一次捕獲剤を二次捕獲剤上に堆積させる工程を含む。この代替的な実施形態の別の態様において、この方法はさらに、一次捕獲剤を二次捕獲剤上に堆積させる工程に続いて、基体をインキュベートする工程、そして基体を回転させる工程を含む。

20

【0125】

本発明の別の基本態様に従って、クラスター標識計数を行う光アッセイディスクが提供される。光アッセイディスクは、基体、基体を覆って配置される活性層、接着部材で活性層に完全に付着したキャップ部分（除去されて、それらの間に規定される1つまたは複数のチャンバを形成する1つまたは複数の部分を有する）、および活性層に固定された1つまたは複数の捕獲剤を含む。捕獲剤は、1つまたは複数のチャンバ内に不連続の捕獲帯を規定する。このアッセイディスクの一実施形態において、捕獲剤は、架橋系により固定されている。このアッセイディスクの代替的な実施形態において、捕獲剤は、活性層により固定されている。

30

【0126】

この光アッセイディスクの特定の一実施形態において、捕獲剤は、細胞表面抗原に選択的親和性を有する抗体である。好適な実施形態において、捕獲剤は、CD3、CD4、CD8、およびCD45の抗体からなる群より選択される。この光アッセイディスクの別の実施形態において、捕獲剤は、細胞表面抗原に選択的親和性を有する一次抗体に選択的親和性を有する抗体である。同様に、光アッセイディスクのこの態様の好適な実施形態において、一次抗体は、CD3、CD4、CD8、およびCD45の抗体からなる群より選択される。光アッセイディスクのこの実施形態において、一次捕獲剤は、マウスで産生された抗ヒトであり、そして二次捕獲剤は、ヤギで産生された抗マウスである。

40

【0127】

本発明に関連する技術態様はまた、以下の：米国仮出願第60/307,489号、表題「Optical Analysis Discs Including Microfluidic Circuits for Performing Cell C

50

ounts」(2001年7月24日出願)、米国仮出願第60/307,825号、表題「Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Charged Matter Including Heparin, Plasma, or Poly-Lysine」(2001年7月25日出願)、米国仮出願第60/307,762号、表題「Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Blocking Agents」(2001年7月25日出願)、米国仮出願第60/307,764号、表題「Methods for Reducing Bubbles in Fluidic Chambers Using Polyvinyl Alcohol and Related Techniques for Achieving Same in Optical Bio-Discs」(2001年7月25日出願)、米国仮出願第60/308,214号、表題「Sealing Methods for Containment of Hazardous Biological Materials within Optical Analysis Disc Assemblies」(2001年7月27日出願)、および、米国仮出願第60/308,197号、表題「Methods for Calculating Qualitative and Quantitative Ratios of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Optical Bio-Disc Platform」(2001年7月27日出願)に表され、これらは全て、本明細書中に参照としてその全体が援用される。

10

20

30

40

50

#### 【0128】

本発明の方法および装置は、先行技術を超える、1つまたは複数の利点を有し、それには、検査を行うための熟練した技術者を必要としない簡単かつ迅速なディスク上処理、少ない試料容量、安価な材料の使用、ならびに既知の光ディスクフォーマットおよびドライブ製造の使用が挙げられるが、それらに限定されない。これらおよび他の特徴および利点は、添付図面および技術例と合わせて取り上げられる場合に、以下の詳細な説明を参照することにより、より良く理解されるだろう。

#### 【0129】

本発明のさらなる目的は、それらに寄与するさらなる特徴およびそれらから生じる利点と合わせて、これらは全体にわたり同様のコンポーネントを同様の参照番号で示す添付の図面に示される本発明の好適な実施形態の以下の記載から明らかになるであろう。

#### 【0130】

##### [発明の詳細な説明]

本発明は、ディスクドライブシステム、光バイオディスク、細胞アッセイおよび関連する細胞計数法、画像処理技法、ならびに関連するソフトウェアに関する。本発明のこれらの態様それぞれは、以下にさらに詳細に記載される。

#### 【0131】

本明細書中に開示される、ディスクドライブシステム、光バイオディスク、細胞アッセイおよび関連する細胞計数法、画像処理技法、ならびに関連するソフトウェアに関連する本発明の態様はまた、米国仮出願第60/338,679号、表題「Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping」(2001年11月13日出願)、米国仮出願第60/332,001号、表題「Capture Layer Assemblies and Optical Bio-Discs for Immunophenotyping」(2001年11月14日出願)、米国仮出願第60/334,131号、表題「Methods for Calculating Qualitative and Quantitative Ratios of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Optical Bio-Disc Platform」(2001年11月30日出願)、米国仮出願第60/349,392号、表題「RBC Sieving Protocol Evaluations of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Whole Blood and Related Optical Bio-Disc」(2002年1月17日出願)、米国仮出願第60/349,449号、表題「RBC Lysis Protocol Evaluations of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Whole Blood and Related Optical Bio-Disc」(2002年1月18日出願)、米国仮出願第60/353,300号、表題「Methods for Differential Cell Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same」(2002年1月31日出願)、米国仮出願第60/355,644号、表題「Cluster Designation Assays Performed on Optical Bio-Disc Including Equi-Radial Analysis Zones」(2002年2月5日出願)、米国仮出願第60/358,479号、表題「Cluster

Designation Assays Performed on Optical Bio-Disc Including Equi-Radial Analysis Zones and Related Systems and Meyhods」(2002年2月19日出願)、米国仮出願第60/363,949号、表題「Methods for Differential Cell Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same」(2002年3月12日出願)、米国仮出願60/404,921号、表題「Methods For Differential Cell Counts Including Related Apparatus and Software For Performing Same」(2002年8月21日出願)にも提示され、これらは全て本明細書中に参照として援用される。

#### 【0132】

ドライブシステムおよび関連するディスク

図1は、本明細書中開示される細胞計数および分画細胞計数を行うために実施される本発明による光バイオディスク110の斜視図である。本光バイオディスク110は、光ディスクドライブ112および表示モニター114と一緒に示される。この型のディスクドライブおよびディスク分析システムに関するさらなる詳細は、同一出願人による同時係属中の特許出願第10/008,156号、表題「Disc Drive System and Methods for Use with Bio-discs」(2001年11月9日出願)、および特許出願第10/043,688号、表題「Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging」(2002年1月10日出願)に開示され、これらの両方が、本明細書中に参照として援用される。

#### 【0133】

図2は、光バイオディスク110の一実施形態の主要な構造エレメントの分解斜視図である。図2は、本発明で使用され得る反射帯光バイオディスク110(以下「反射型ディスク」)の例である。主要な構造エレメントは、キャップ部分116、接着部材またはチャンネル層118、および基体120を含む。キャップ部分116は、1つまたは複数の入口122および1つまたは複数の排出口124を含む。キャップ部分116は、ポリカーボネートで形成され得、好ましくは、図2の透視図から見てとれるように、その下側が反射表面146(図4)でコーティングされている。好適な実施形態において、トリガーマークまたはマーキング126が反射層142(図4)の表面に含まれる。トリガーマーキング126は、情報で符号化された、バイオディスクの全3層にかかる透明窓、不透明領域、または反射もしくは半反射領域を含み得、情報は図10に示されるとおりプロセッサ166へデータを送り、次いで呼出または入射ビーム152(図6および図10)の操作機能と相互作用する。

#### 【0134】

図2に示される第二のエレメントは、その中に形成される流体回路128またはU-チャンネルを有する接着部材またはチャンネル層118である。流体回路128は、膜を打抜くかまたは切断してプラスチックフィルムを取り除き、示されるとおりの形を形成することにより、形成される。流体回路128のそれぞれは、フローチャンネル130および戻りチャンネル132を含む。図2に示される流体回路128のいくつかは、混合チャンバ134を含む。異なる2種の型の混合チャンバ134が図示される。第一の混合チャンバは、フローチャンネル130に対して対称に形成される対称混合チャンバ136である。第二の混合チャンバは、オフセット混合チャンバ138である。オフセット混合チャンバ138は、示されるとおり、フローチャンネル130の片側に形成される。

#### 【0135】

図2に示される第三のエレメントは、標的帯または捕獲帯140を含む基体120である。基体120は、好ましくはポリカーボネート製であり、その頂部に堆積した反射層142を有する(図4)。標的帯140は、示される形で、または代替的に任意の所望の形で反射層142を取り除くことにより形成される。あるいは、標的帯140は、マスキング技法により形成されてもよく、これは反射層142を付着する前に標的帯140領域をマスキングすることを含む。反射層142は、金属(アルミニウムまたは金など)で形成され得る。

#### 【0136】

図3は、図2に示される光バイオディスク110の平面図で、流体回路128をあらわにするために透明であるとして示されるキャップ部分116上の反射層142、標的帯140、およびトリガーマーキング126が、ディスク内に配置される。

【0137】

図4は、本発明の一実施形態による反射帯型光バイオディスク110の拡大斜視図である。この図は、各主要な層、基体、コーティング、または膜の部分断面図を図示するために切取られた、その様々な層の一部を含む。図4は、反射層142でコーティングされた基体120を示す。活性層144は、反射層142を覆って付着される。好適な実施形態において、活性層144は、ポリスチレンから形成され得る。あるいは、ポリカーボネート、金、活性化ガラス、修飾ガラス、または修飾ポリスチレン（例えば、ポリスチレン-*c o* -マレイン酸無水物）が使用されてもよい。また、ヒドロゲルが使用され得る。あるいは、この実施形態で図示されるとおり、プラスチック接着部材118が、活性層144を覆って付着される。プラスチック接着部材118の露出区分は、流体回路128を作成する切取りまたは打抜きU字型を図示する。本バイオディスクのこの反射帯実施形態における最後の主要な構造層は、キャップ部分116である。キャップ部分116は、その下側に反射表面146を含む。反射表面146は、金属（アルミニウムまたは金など）で形成され得る。

【0138】

図5を参照すると、本発明による光バイオディスク110の透過型の主要な構造エレメントの分解斜視図が示される。光バイオディスク110の透過型の主要な構造エレメントは、同様に、キャップ部分116、接着部材またはチャンネル部材118、および基体120層を含む。キャップ部分116は、1つまたは複数の入口122および1つまたは複数の排出口124を含む。キャップ部分116は、ポリカーボネート層で形成され得る。図6および図9に最良に示されるように、光学トリガーマーキング126は、薄い半反射層143の表面に含まれ得る。トリガーマーキング126は、情報で符号化された、バイオディスクの全3層にかかる透明窓、不透明領域、または反射もしくは半反射領域を含み得、情報はプロセッサ166へデータを送り（図10）、次いで呼出しビーム152（図6および図10）の操作機能と相互作用する。

【0139】

図5に示される第二のエレメントは、その中に形成される流体回路128またはU-チャンネルを有する接着部材またはチャンネル層118である。流体回路128は、膜を打抜くかまたは切断してプラスチックフィルムを取り除き、示されるとおりの形を形成することにより、形成される。流体回路128のそれぞれは、フローチャンネル130および戻りチャンネル132を含む。図5に図示される流体回路128のいくつかは、混合チャンバ134を含む。異なる2種の型の混合チャンバ134が図示される。第一の混合チャンバは、フローチャンネル130に対して対称に形成される対称混合チャンバ136である。第二の混合チャンバは、オフセット混合チャンバ138である。オフセット混合チャンバ138は、示されるとおり、フローチャンネル130の片側に形成される。

【0140】

図5に示される第三のエレメントは、基体120であり、これは標的帯または捕獲帯140を含み得る。基体120は、好ましくはポリカーボネート製であり、その頂部に堆積した薄い半反射層143を有する（図6）。図5および図6に示されるディスク110の基体120に伴う半反射層143は、明らかに、図2、図3および図4に示される反射型ディスク110の基体120上の反射層142よりも薄い。より薄い半反射層143は、図6および図12に示されるように、呼出しビーム152の、透過型ディスクの構造層を通過するいくらかの透過を可能にする。薄い半反射層143は、金属（アルミニウムまたは金など）で形成され得る。

【0141】

図6は、図5に示される光バイオディスク110の透過型実施形態の基体120および半反射層143の拡大斜視図である。薄い半反射層143は、金属（アルミニウムまたは

10

20

30

40

50

金など)で形成され得る。好適な実施形態において、図5および図6に示される透過型ディスクの薄い半反射層143は、10~300の厚さの範囲にあり得、400を超えない。このより薄い半反射層143は、入射ビームまたは呼出しビーム152の一部が半反射層143を貫通して通り抜け上部検出器158により検出されることを可能にし(図10および図12)、一方光の一部は反射されるか、または入射径路に沿って戻される。以下に示されるとおり、表4は、膜の厚さに対する金膜の反射および透過特徴を表す。金膜層は、厚さが800より厚いと完全に反射性である。一方、光が金膜を通過して透過する閾値濃度は、約400である。

【0142】

表4に加えて、図7は、金の厚さに基づく、薄い半反射層143の反射性と透過性の反比例関係のグラフ表示を提供する。図7に示されるグラフで使用される反射値および透過値は、絶対値である。

【0143】

【表4】

Auフィルムの反射および透過(絶対値)

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

【0144】

次に図8を参照して、図5および6に示される透過型光バイオディスク110の平面図が示され、流体チャンネルをあらわにする透明キャップ部分116、トリガーマーキング126、および標的帯140がディスク内に配置される。

【0145】

図9は、本発明の透過型ディスク実施形態による光バイオディスク110の拡大斜視図である。ディスク110は、各主要な層、基体、コーティング、または膜の部分断面図を図示するために切取られた、その様々な層の一部とともに図示される。図9は、透明キャップ部分116、基体120上の薄い半反射層143、およびトリガーマーキング126を持つ透過型ディスクフォーマットを図示する。この実施形態において、トリガーマーキング126は、キャップの頂部に置かれた不透明材料を含む。あるいは、トリガーマーキング126は、ディスクの薄い反射層143にエッチングされた透明な非反射窓により形成されてもよいし、トリガー検出器160から来る信号を吸収または反射しない任意のマークであってもよい(図10)。図9はまた、指定された領域を示される形で、あるいは任意の所望の形でマーキングすることにより形成される標的帯140を示す。標的帯14

0を示すためのマーキングは、基体120上の薄い半反射層143に作られても、または基体120の底部(ディスクの下)に作られてもよい。あるいは、標的帯140は、マスクング技法により形成されてもよく、これは標的帯140を除く薄い半反射層143全体をマスクングすることを含む。この実施形態において、標的帯140は、薄い半反射層143上にインクをシルクスクリーン印刷することにより作成されてもよい。図5、図8、および図9に示される透過型ディスクフォーマットにおいて、標的帯140は、代替的に、ディスクに符号化されたアドレス情報により規定されてもよい。この実施形態において、標的帯140は、物理的に識別可能な縁境界線を含まない。

#### 【0146】

図9を続けて参照して、活性層144が、薄い半反射層143を覆って付着されているとして図示される。好適な実施形態において、活性層144は、2%ポリスチレンの40~200 $\mu\text{m}$ 厚さの層である。あるいは、ポリカーボネート、金、活性化ガラス、修飾ガラス、または修飾ポリスチレン(例えば、ポリスチレン-c-o-マレイン酸無水物)が、使用されてもよい。また、ヒドロゲルが使用され得る。この実施形態で図示されるとおり、プラスチック接着部材118は活性層144を覆って付着されている。プラスチック接着部材118の露出区分は、流体回路128を作成する、切取りまたは打抜きされたU字型形態を図示する。

10

#### 【0147】

本バイオディスク110のこの透過実施形態の最後の主要な構造層は、透明な、非反射性キャップ部分116であり、これは入口122および排出口124を含む。

20

#### 【0148】

ここで図10を参照して、光学コンポーネント148、入射ビームまたは呼出しビーム152を発生させる光源150、戻りビーム154、および透過ビーム156を図示する透視図およびブロック図が表示される。図4に示される反射型バイオディスクの場合、戻りビーム154は、光バイオディスク110のキャップ部分116の反射表面146から反射される。本光バイオディスク110のこの反射型実施形態において、下部検出器157により、戻りビーム154が検出されて信号エレメントの存在について分析される。一方で、透過型バイオディスクフォーマットにおいて、上部検出器158により、透過ビーム156が検出され、同じく信号エレメントの存在について分析される。透過型実施形態において、上部検出器158として光検出器が使用され得る。

30

#### 【0149】

図10はまた、ハードウェアトリガー機構を示し、これはディスク上のトリガーマーキング126およびトリガー検出器160を含む。ハードウェアトリガー機構は、反射型バイオディスク(図4)および透過型バイオディスク(図9)の両方で使用される。トリガー機構は、呼出しビーム152がそれぞれの標的帯140にある場合にのみ、プロセッサ166がデータを収集することを可能にする。そのうえさらに、透過型バイオディスクシステムにおいて、ソフトウェアトリガーもまた使用され得る。ソフトウェアトリガーは、呼出しビーム152がそれぞれの標的帯140の縁に当たるとすぐに、下部検出器を使用して、プロセッサ166にデータを収集する信号を送る。図10はさらに、光バイオディスク110の回転を制御する、ドライブモーター162およびコントローラー164

40

#### 【0150】

図11に示されるとおり、本発明による光バイオディスク110の反射型ディスク実施形態の部分横断面図が表示される。図11は、基体120および反射層142を図示する。上記で示されるとおり、反射層142は、材料(アルミニウム、金、または他の適した反射材料など)で作られ得る。この実施形態において、基体120の頂部表面は、滑らかである。図11はまた、反射層142を覆って付着された活性層144を示す。同じく図11に示されるとおり、標的帯140は、所望の場所で反射層142の領域または一部を除

50

去することにより、またはその代わりに、反射層 142 を付着させる前に所望の領域をマスキングすることにより形成される。さらに図 11 に示されるとおり、プラスチック接着部材 118 が活性層 144 を覆って付着される。図 11 はまた、キャップ部分 116 およびそれに伴う反射表面 146 を示す。したがって、キャップ部分 116 が所望の切取り形を含むプラスチック接着部材 118 に付着されると、フローチャンネル 130 がそれにより形成される。図 11 に示される矢印により示されるとおり、入射ビーム 152 の径路は、最初に、ディスク 110 の下から基体 120 へ向けられる。次いで、入射ビームは、反射層 142 に隣接する点で焦点を合わせる。この焦点合わせは、反射層 142 の一部が欠けている標的帯 140 で行われるため、入射は、活性層 144 を通りフローチャンネル 130 に入る径路に沿って連続している。次いで、入射ビーム 152 は、連続してフローチャンネルを 10 通って上方向に横断して、最終的に反射表面 146 に入射して落ちる。この点で、入射ビーム 152 は、入射径路にそって、戻るかまたは反射して返され、それにより戻りビーム 154 を形成する。

#### 【0151】

図 12 は、本発明によるバイオディスク 110 の透過型実施形態の部分横断面図である。図 12 は、基体 120 上に透明キャップ部分 116 および薄い半反射層 143 を持つ透過型ディスクフォーマットを図示する。図 12 はまた、薄い半反射層 143 を覆って付着された活性層 144 を示す。好適な実施形態において、透過型ディスクは、10 ~ 300 オングストロームの厚さでかつ 400 オングストロームを超えない金属（アルミニウムまたは金など）で作られた薄い半反射層 143 を有する。この薄い半反射層 143 は、光源 150（図 10）からの入射ビームまたは呼出しビーム 152 の一部が、ディスクを貫通して上方向に通り抜け上部検出器 158 により検出されることを可能にし、一方光の一部は、入射ビームと同じ径路に沿って、ただし逆方向で反射して返される。この配置において、戻りビームまたは反射ビーム 154 は、反射層 143 で反射される。したがって、この様式では、戻りビーム 154 はフローチャンネル 130 に進入しない。反射光または戻りビーム 154 は、図 13 および図 14 に関連してより詳細に記載されるとおり、半反射層 143 中または上に形成されるあらかじめ記録された情報トラックで入射ビーム 152 を追跡するために使用され得る。図 12 に図示されるディスク実施形態において、物理的に規定された標的帯 140 は存在してもしなくてもよい。標的帯 140 は、基体 120 上の薄い半反射層 143 に作られる直接マーキングにより作成され得る。これらのマーキングは、シルクスクリーン印刷または任意の等価な方法を使用して形成され得る。標的帯を規定するために物理的証が使用されない代替的な実施形態において（例えば、符号化ソフトウェアアドレッシングが利用される場合など）、事実上フローチャンネル 130 が、試験中の特徴の検査が実行される、限定された標的範囲として用いられ得る。 20

#### 【0152】

図 13 は、本発明によるバイオディスク 110 の反射型ディスク実施形態のトラックを横断して取られた横断面図である。この図は、ディスクの半径およびフローチャンネルに沿って縦に取られている。図 13 は、基体 120 および反射層 142 を含む。この実施形態において、基体 120 は、一連の溝 170 を含む。溝 170 は、ディスクの中心近くから外縁に向かって伸びる螺旋の形をしている。溝 170 は、呼出しビーム 152 がディスクの螺旋型溝 170 に沿って追跡し得るように実施されている。この型の溝 170 は、「w o b b l e 溝」として既知である。うねるようなまたは波状の側壁を有する底部分が溝 170 を形成し、一方立ち上がったまたは隆起した部分が螺旋の隣接する溝 170 を分離させる。この実施形態で溝 170 を覆って付着される反射層 142 は、図示されるとおり、本質的に等角的である。図 13 はまた、反射層 142 を覆って付着された活性層 144 を示す。図 13 に示されるとおり、標的帯 140 は、所望の場所で反射層 142 の領域または一部を除去することにより、またはその代わりに、反射層 142 を付着する前に所望の領域をマスキングすることにより形成される。さらに図 13 に図示されるとおり、プラスチック接着部材 118 は、活性層 144 を覆って付着される。図 13 はまた、キャップ部分 116 およびそれに伴う反射表面 146 を示す。したがって、キャップ部分 116 が 40

10

20

30

40

50

所望の切取り形を含むプラスチック接着部材 118 に付着されると、フローチャンネル 130 がそれにより形成される。

【0153】

図 14 は、例えば、図 12 に記載されるような、本発明によるバイオディスク 110 の透過型ディスク実施形態のトラックを横断してとられた横断面図である。この図は、ディスクの半径およびフローチャンネルに沿って縦に取られている。図 14 は、基体 120 および薄い半反射層 143 を図示する。この薄い半反射層 143 は、光源 150 からの入射ビームまたは呼出しビーム 152 が、ディスクを貫通して通り抜け上部検出器 158 により検出されることを可能にし、一方光の一部は、戻りビーム 154 の形で反射して返される。薄い半反射層 143 の厚さは、ディスク読み取り機の追跡能力を維持するために要求される反射光の最小量により決められる。この実施形態において、基体 120 は、図 13 で記載されたように、一連の溝 170 を含む。この実施形態において、溝 170 は同じく好ましくは、ディスクの中心近くから外縁に向かって延びる螺旋の形をしている。溝 170 は、呼出しビーム 152 が螺旋に沿って追跡し得るように実施されている。図 14 はまた、薄い半反射層 143 を覆って付着された活性層 144 を示す。さらに図 14 に図示されるとおり、プラスチック接着部材またはチャンネル層 118 が、活性層 144 を覆って付着される。図 14 はまた、反射表面 146 のないキャップ部分 116 を示す。したがって、キャップが所望の切取り形を含むプラスチック接着部材 118 に付着されると、フローチャンネル 130 がそれにより形成され、入射ビーム 152 の一部が実質的に反射されずにそこを通過することが可能になる。

10

20

【0154】

図 15 は、図 11 と類似した図で、反射型ディスクの全厚さおよびその初期反射性を示す。図 16 は、図 12 と類似した図で、透過型ディスクの全厚さおよびその初期反射性を示す。溝 170 は、図 15 および図 16 では示されない、なぜなら断面は溝 170 に沿って切られているからである。図 15 および図 16 は、これらの実施形態において、溝 170 に垂直に位置する狭いフローチャンネル 130 の存在を示す。図 13、図 14、図 15、および図 16 は、反射型ディスクおよび透過型ディスクそれぞれの全厚さを示す。これらの図において、入射ビーム 152 は、最初に基体 120 と相互作用するように図示され、基体 120 は反射性を有するので図示されるとおり入射ビームの径路を変えてビーム 152 の反射層 142 または薄い半反射層 143 上での焦点化を提供する。

30

【0155】

細胞アッセイ

血液試料の CD4<sup>+</sup> および CD8<sup>+</sup> T-リンパ球集団の絶対数および CD4<sup>+</sup> / CD8<sup>+</sup> リンパ球比を迅速に求めるための包括的均一固相細胞捕獲アッセイが、本発明の方法を利用して行われ得る。バイオディスクに組込まれた小フローチャンネル内で実行される検査は、全血から単離された単核細胞 (MNC) 7~15 μl で、捕獲帯の特異的抗体により捕獲された、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD2<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>、CD19<sup>+</sup>、および CD45<sup>+</sup> 細胞の数を求める。検査は、ディスクの特定位置での局所的細胞捕獲の原則に基づく。複数の特異的細胞捕獲帯が、特定血液細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に基づく捕獲化学種の局所的塗布により、ディスクに作成される。25 ~ 100 μl チャンバを MNC 血液 (10,000 ~ 30,000 細胞 / μl) で溢れさせることで、CD4、CD8、CD2、CD3、CD19、および CD45 抗原を発現する細胞が、ディスク内の捕獲帯に捕獲される。同じく捕獲帯内に組込まれるのは、規定されたネガティブコントロール範囲である。

40

【0156】

図 17A は、血液試料の分析を示す、絵による流れ図である。工程 1 において、血液 (4~8 ml)、および抗凝固剤 (EDTA、クエン酸デキストロース (ACD) またはヘパリンなど) は、4 ml または 8 ml Becton Dickinson CPT Vacutainer (商品名) に直接集められる。本発明の別の実施形態の等価な工程において、3 ml の抗凝固剤中血液が、分離勾配 176 (ヒストパック (Histopaque)) (登

50

録商標) 1077など)を含む管172に上乘せされる。いずれの場合においても、血液試料174は、好ましくは採血して2時間以内に使用される。分離勾配176に上乘せした血液試料174を含む管172を、バイオハザード遠心分離機中、水平回転機およびスイングアウトバケット(swing out buckets)を用いて、室温で25分間、 $400 \times g$ で遠心分離する。遠心分離後、血漿層178を除去し(工程2)、単核細胞(MNC)画分180上に約2mmの血漿を残す。MNC層180を集め、リン酸緩衝食塩水(PBS)で洗浄する。室温で10分間、300RCF( $1200 \text{ rpm}$ )で遠心分離することにより細胞をペレットにして、全ての残存血小板を除去する。上清を除去し、管をやさしく叩いてMNCペレット180をPBSに再懸濁させる。最終ペレット180は、バイオディスク110のフローチャンネル130の高さに依存して、10,000~30,000細胞/ $\mu\text{l}$ の細胞数に再懸濁される(工程3)。

#### 【0157】

バイオディスク110のフローチャンネル130を $7 \mu\text{l}$ のMNC懸濁液で溢れさせ、チャンバの入口122および排出口124(図3および図8)を接着タブまたは他の適した密閉員で封じる(工程4)。バイオディスク110を、室温で15分間インキュベートし、次いで、光学ドライブ112の780nmレーザーを使用して走査して捕獲場を画像化する(工程5)。透過型バイオディスク110が使用される場合、光学ドライブ112は任意選択で捕獲場を画像化する上部検出器158(図10)を含むことが理解されるべきである。ソフトウェアは、好ましくは、ディスクで符号化されて、ドライブに、自動的に以下のタスクを実行するように指示する：(a)1つまたは複数の段階で過剰な未結合細胞をはじき出すためにディスクを遠心分離する、(b)特定の捕獲窓を、ディスプレイモニター114に画像化する、そして(c)データを処理する。データ処理は、各捕獲帯に特異的に捕獲された細胞を計数すること、および $\text{CD}4^+ / \text{CD}8^+$ の比、またはどの比率が決定されるようにプログラミングされるかを導き出すことを含むが、それらに限定されない。他の望ましい比率が、本発明の代替的な実施形態により容易に提供され得る。

#### 【0158】

図17Aにさらに示されるように、本発明は、光ディスクおよびディスクドライブを用いてクラスター標識計数を実行する方法に関する。本方法は、分離勾配を有する第一の管に血液試料を用意する工程と、第一の管を、血液試料を層に分離するのに十分な時間および速度で回転させる工程と、T細胞含有MNC層を再懸濁させる工程であって、それによりMNC懸濁液を形成する、再懸濁させる工程と、MNC懸濁液の試料を、少なくとも一種の捕獲剤を含有する少なくとも1つの捕獲帯を含むディスク表面上に用意する工程と、ディスクを光学式読み取り機にロードする工程と、ディスクを回転する工程と、電磁放射の入射ビームを捕獲帯に向ける工程と、ディスクと捕獲帯で相互作用した後形成された電磁放射ビームを検出する工程と、検出されたビームを出力信号に変換する工程と、出力信号を分析する工程であって、それにより捕獲帯に捕獲された細胞数に関する情報を抽出する、分析する工程とを含む。この方法の一実施形態において、光ディスクは、捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が反射されるように、反射層と合わせて構成される。この方法の他の実施形態において、光ディスクは、捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が前記光ディスクを透過するように構成される。

#### 【0159】

分析/処理工程の間、ソフトウェアは各捕獲帯画像を横断して読み込み、ソフトウェアが細胞画像に遭遇することで細胞画像をマーキングする。例えば、捕獲された $\text{CD}4^+$ および $\text{CD}8^+$ 細胞の数を計数することに続いて、ソフトウェアは、 $\text{CD}4^+ / \text{CD}8^+$ 細胞比を計算して、全血1マイクロリットルあたりの $\text{CD}4^+$ 、 $\text{CD}8^+$ 、 $\text{CD}3^+$ 、および $\text{CD}45^+$ 捕獲帯にある細胞の絶対数、また $\text{CD}4^+ / \text{CD}8^+$ 比の両方を表示する。ディスクを光学ドライブに挿入してから数および比を得るまで、全プロセスで約12分かかる。試料中の特定の細胞集団の定量に関する他の関連する態様は、同一出願人による同時係属中の米国仮出願第60/382,327号、表題「Methods For Calculating Specific Populations Of Cells Captured In An Optical Bio-Disc」(2002年5月22

日出願)に開示される。この出願は、本明細書中にその全体が参照として援用される。

【0160】

一実施形態において、ディスクは、符号化情報層として300nmの金属でコーティングされたforward Wobble Set FDL21:13707またはFDL21:1270CD-Rディスクである。反射型ディスクにおいて、既知のリソグラフィ技法により、大きさ2×1mmの長円形の表示窓が反射層にエッチングされる。透過型ディスクの設計によっては、個別の表示窓はエッチングされず、ディスク全体が使用に利用可能である。具体的な一実施形態において、接着層は、Fraylock adhesive DBL 201 Rev C 3M94661である。カバーは、半径26mmで等間隔に配置された48個の直径0.040インチの試料入口を持つ透明ディスクである。データディスクは、CD4+/CD8+計数ソフトウェアを使用して、速度4倍、および試料速度2.67MHzでソフトウェアで走査および読み取りされる。

10

【0161】

図17Bを参照して、本発明の一実施形態において、ポリスチレン118の厚い層が、基体120を覆って形成され、そして(任意選択で)ストレプトアビジン182と重ねられる。細胞捕獲抗体は、ビオチンを通じてストレプトアビジン(streptavidin)182に結合している。これらの抗体は、捕獲抗体用に十分な数の結合部位を作り出す、ストレプトアビジンを覆ってコーティングされたデキストラン活性化アルデヒドに結合したビオチン標識化抗体を含み得る。これは、白血球(WBC)と頑強な結合を特異的に形成し得る強力な捕獲化学種を作り出す。

20

【0162】

図18A、図18B、および図18Cは、本発明の実施形態で使用される架橋系の絵図である。架橋系は一種または複数の架橋剤、または共役剤(conjugates)を含んで1つまたは複数の巨大分子部分を他と架橋させることが理解されるはずである。架橋は、2つの巨大分子部分間の共有結合相互作用でも非共有結合相互作用でもよく、通常は2つの巨大分子遊離基が組合わさることで形成される。架橋を達成する化学修飾または共役プロセスは、1つの官能基が他と反応して結合の形成をもたらすことを含む。反応性または選択的官能基を有する生体共役(bioconjugate)試薬の作成により、単純かつ再現性のある架橋分子またはタグ付け分子または標的分子の基礎が形成される("Bioconjugate Techniques," Greg T. Hermanson, Academic Press, San Diego, CA, (1996))。

30

【0163】

架橋剤として、ホモ二機能性(homobifunctional)リンカー、ヘテロ二機能性(heterobifunctional)リンカー、およびゼロ長架橋剤が挙げられるが、これらに限定されない。ホモ二機能性リンカーは、同じ機能性の反応部位を2つ持つリンカー(グルタルアルデヒドなど)である。これらの試薬は、1つのタンパク質を別のものと、両分子の同じ共通する基で共有結合的に反応することによりつなぎあわせ得る。ヘテロ二機能性共役試薬は、タンパク質および他の巨大分子の2つの異なる機能性標的とカップリングし得る2つの異なる反応基を含む。例えば、架橋剤の一カ所は、アミン反応基を含み得、一方別の箇所はスルフヒドリル反応基からなる。結果として、標的分子の選択された部分での架橋反応を指示することが可能になり、したがって共役プロセスにわたりより良い制御を獲得する。ゼロ長架橋剤は、さらなる原子を含まない結合を形成することにより、2つの分子の共役を媒介する。したがって、分子の1つの原子は、介在するリンカーまたはスペーサーなしに、第二の分子の原子と共有結合する。当業者には「生体共役法」(Greg T. Hermanson, Academic Press, San Diego, CA, (1996),架橋剤の詳細な記載に関する)と呼ぶ人もいる。

40

【0164】

本発明において、架橋剤は、バイオディスクの表面に結合して標的帯内の捕獲剤を固定する。好適な架橋系は、ビオチン-ストレプトアビジンからなるヘテロ二官能基、すなわちアビジンとカップリングした基体に結合したビオチン標識捕獲剤である。図18Aは、ストレプトアビジン182の絵図である。制限なしに、ストレプトアビジンは、アビジン

50

、ストレプトアビジン、およびそれらの修飾物を含む。示されるとおり、タンパク質は4つのサブユニットを含み、そのそれぞれが1つのビオチン結合部位を含む(Hermanson)。ストレプトアビジン182は、様々な化学種により、プラスチック(ポリスチレンなど)とカップリングし得る。理想的には、ストレプトアビジン182はバイオディスクの活性層144(図4および図9)に付けられて、基本的に不可逆的にビオチン標識化検出エレメント(例えば抗体)と結合する。

【0165】

図18Bは、ビオチン184の絵図である。ビオチン(またはビタミンH)は、どの細胞にも少量存在する、天然の成長因子である。ビオチンの、タンパク質、すなわちアビジンおよびストレプトアビジンとの相互作用は、既知のものでも最も強力な非共有性親和性のうちに入る。ビオチン分子184は、その吉草酸側鎖を介してタンパク質と直接結合し得るか、または他の有機成分で誘導されてスペーサーアームおよび様々な反応基を作り出し得る。アミン、カルボン酸エステル、スルフヒドリル、および糖基が、ビオチン誘導体の適切な選択を通じたビオチン標識に、特に標的となり得る(Hermanson)。図18Cは、ストレプトアビジン182と相互作用したビオチン184からなる架橋系の絵図である。

【0166】

本発明の実施形態の実施態様は、本明細書中に記載されるアッセイを実行するために捕獲剤を利用する。捕獲剤は、分析物を検出するための任意の巨大分子を示すことが理解されるはずである。本発明の捕獲剤は、目的の分析物に対して、優先的選択性の、または選択的結合親和性を有する巨大分子を含む。捕獲剤として、合成または生体産生された核酸および合成または生体産生されたタンパク質が挙げられるが、これらに限定されない。本発明により用いられ得る捕獲剤の例として、デオキシリボ核酸(DNA)、リボ核酸(RNA)、オリゴヌクレオチド、ポリマーゼ連鎖反応法生成物、またはこれらのヌクレオチドの組合せ(キメラ)、抗体(モノクローナルまたはポリクローナル)、細胞膜受容体、および特定抗原決定因子と反応性の抗血清(ウイルス、細胞、または他の材料上のものなど)、薬物、ペプチド、補助因子、レクチン、多糖類、細胞、細胞膜、および細胞小器官が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、本発明の捕獲剤は、抗体である。

【0167】

抗体として、ポリクローナル、モノクローナル、および組換えで作られられた抗体が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の抗体は、*in vivo*または*in vitro*で産生され得る。抗体の産生法は、当業者に既知である。例えば、「Antibody Production: Essential Techniques」Peter Delves(編)、John Wiley & Son Ltd, ISBN: 0471970107(1997)を参照のこと。これは本明細書中にその全体が参照として援用される。あるいは、抗体は、市販品(例えば、Research Diagnostics Inc., Pleasant Hill Road, Flanders, NJ 07836)から入手してもよい。本発明の抗体は、任意の1つの特定種の抗体に限定されることを意味しない。例えば、ヒト、マウス、ラット、およびヤギの抗体は、全て本発明により考慮される。好ましくは、本発明の一次抗体は、マウスで産生された抗ヒト抗体であり、そして本発明の二次抗体はヤギで産生された抗マウス抗体である。

【0168】

用語「抗体」はまた、任意のまたは全ての抗体型が細胞表面抗原に結合するのに使用され得るとして、任意のクラスまたはサブクラスの抗体を包含する。医薬診断の分野での抗体使用は、当業者に既知である。例えば、「Diagnostic And Therapeutic Antibodies (Methods in Molecular Medicine)」Andrew J. T. George and Catherine E. Urch(編)、Humana Press; ISBN: 0896037983(2000)、および「Antibodies in Diagnosis and Therapy: Technologies, Mechanisms and Clinical Data (Studies in Chemistry Series)」Siegfried Matzku and Rolf A. Stahel(編)、Harwood Academic Pub.; ISBN: 9057023105(1999)を参照のこと。これらは本明細書中に参照として援用される。

【0169】

10

20

30

40

50

本発明の少なくとも複数の実施形態において、目的の分析物を検出するために複数の捕獲剤が使用される。図18Dは、二次捕獲剤186として本発明の方法で使用されるIgGクラスの抗体の絵図である。本発明の二次捕獲剤は、別の捕獲剤（これは目的の分析物に親和性を有する）に親和性を有する薬剤を含むが、これらに限定されないことが理解されるはずである。図18Eは、二次捕獲剤、ビオチン分子184に結合したIgG186（以下、ビオチン標識IgGとして示す）を示す。

【0170】

図18Fは、一次捕獲剤188の絵図である。本発明の一次捕獲剤188は目的の分析物に選択的親和性を有することが理解されるはずである。好ましくは、一次捕獲剤は、白血球に親和性を有する抗体である。より詳細には、これらの抗体は、リンパ球（CD2、CD19）、単球（CD14）、好酸球（CD15）、および他の目的の細胞表面マーカーに対するものである。図18Gは、ビオチン分子184に結合した一次捕獲剤188を示す。CD4およびCD8に加えて、その他多くの細胞表面抗原に対する抗体があり（例えば、CD3、CD16、CD19、CD45、CD56）、これらは、リンパ球のサブタイプを同定するために使用され得る。

【0171】

図18Hは、CD4<sup>+</sup>T細胞190の絵図である。CD4<sup>+</sup>T細胞は、抗原提示細胞（APC）（貪食マクロファージおよび樹状細胞など）により発現される特異的抗原に結合して、他の免疫系細胞をこの領域へ引き寄せるリンホカインを放出する。その結果が、炎症ならびに細胞および分子の蓄積であり、これが抗原性材料を囲い込んで破壊しようとする。CD4<sup>+</sup>T細胞は、細胞表面全体にわたり多数の抗原192を有することが理解されるはずである。しかしながら、図18Hは、例示の目的のみのため、4つの抗原192を有するCD4<sup>+</sup>T細胞190を示す。

【0172】

図18Iは、CD8<sup>+</sup>T細胞194の絵図である。これらのT細胞は、それらが結合した細胞を破壊する分子を分泌する。このことは、ウイルス感染と闘うのに重要である。なぜならCD8<sup>+</sup>T細胞は、他の細胞に感染可能なウイルスの新鮮な塊を感染細胞が放出することができる前に、それらを破壊するからである。CD8<sup>+</sup>T細胞は、細胞表面全体にわたり多数の抗原196を有することが理解されるはずである。しかしながら、図18Iは、例示の目的のみのため、4つの抗原196を有するCD8<sup>+</sup>T細胞194を示す。

【0173】

図18Jは、アルデヒド活性化デキストラン（DCHO）198の三次元マトリクスに結合し、それによりDCHO-抗体複合体199を形成する、二次抗体186を示す絵図である。デキストランは、主に直鎖の多糖類で、グリコシド結合により互いに連結したD-グルコースの繰り返し単位からなる。架橋剤として広く使用され、デキストランは基本的に多価であり、これにより、分子がポリマー鎖に沿って多数の部位で結合することを可能にしている（Hermanson）。例示の目的のみのため、デキストラン198に結合した抗体186は、図18Kに示されるとおりに描写されるだろう。

【0174】

本発明の細胞アッセイに関連する態様はまた、以下の：米国仮出願第60/308,176号、表題「Quantitative and Qualitative Methods for Characterizing Cancerous Blood Cells Including Leukemic Blood Samples Using Optical Bio-Disc Platform」（2001年7月27日出願）、米国仮出願第60/312,248号、表題「Methods for Quantitative and Qualitative Characterization of Cancerous Blood Cells Including Lymphoma Blood Samples Using Optical Bio-Disc Platform」（2001年8月15日出願）、米国仮出願第60/313,514号、表題「Methods for Specific Cell Capture by Off-Site Incubation of Primary Antibodies with Sample and Subsequent Capture by Surface-Bound Secondary Antibodies and Optical Bio-Disc Including Same」（2001年8月20日出願）、米国仮出願第60/313,715号、表題「RBC Lysis Protocol Evaluations of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Us

10

20

30

40

50

ing Whole Blood and Related Optical Bio-Disc」(2001年8月20日出願)、米国仮出願第60/313,536号、表題「RBC Sieving Protocol Evaluations of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Whole Blood and Related Optical Bio-Disc」(2001年8月20日出願)、および米国仮出願第60/315,937号、表題「Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping」(2001年8月30日出願)に開示され、これらは全て本明細書中に参照として援用される。

#### 【0175】

##### 実施I

図19A～図19Dは、本発明の第1の実施態様の分析物捕獲の絵図である。図19Aおよび図19Bは、CD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194のビオチン標識化一次抗体(図18G)による捕獲を示す。抗体188は、架橋剤ストレプトアビジン182によりバイオディスク110の活性層144(図4および図9)に固定されている。図19Cおよび図19Dは、本発明の同じ実施態様の、架橋系がない別の実施形態を示す。この実施形態において、一次抗体188は、バイオディスク110の活性層144に直接固定されている。

#### 【0176】

図20A～図20Iは、本発明の第1の実施態様の実施形態の構成を示す断面図である。第1の実施形態は、バイオディスクのフローチャンネル内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用する反射型ディスクの構成を示す。図20Aを参照して、光バイオディスク110の、光透過性基体120、反射層142、および活性層144が示される。反射層142の一部が除去されて(または堆積する時に開口部が作られる)表示窓200を形成し、ここを通じて光が、抗体が加えられる(affixed)予定の捕獲帯140の場所へ向けられ得る。図20Aは、5つのそのような捕獲帯140を示し、そのうちの最初のものが捕獲帯141として示されている。活性層144は、好ましくはポリスチレンであり、これは反射層142を覆ってスピンコーティングされているか、または当該技術分野で既知の方法により堆積されて、約40～300ミクロンの厚さの滑らかな表面を形成する。次いで、ストレプトアビジン182が、各捕獲帯140および141を覆って堆積し、ディスク110は、加湿チャンバ中で30分間室温でインキュベートされる(図20B)。ディスク110は洗浄されて未結合のストレプトアビジン182が除去され、次いでスピン乾燥されてディスク110の表面から水分が完全に除去される(図20C)。参照マークまたは較正点202は、第一捕獲帯141を覆って堆積し、ビオチン標識化一次抗体188は、各連続捕獲帯140を覆って堆積する(図20Dおよび図20E)。次いで、ディスク110は、加湿チャンバ中で30分間室温でインキュベートされる。未結合抗体188がPBSで洗浄されて除去され、そしてディスク110はスピン乾燥されて表面の水分が除去される(図20F)。接着部材118が、活性層144に接着される(図20G)。キャップ部分116(図2)は、ポリカーボネートから形成されてもよく、好ましくは、図4に最良に示されるように、その底部が反射表面146でコーティングされる。キャップ部分116は、接着部材118に一体化して接着され、それによりディスク内にフローチャンネル130を形成する(図20G)。遮断剤204(スタビルガード(Stabil Guard)(登録商標)など)が各フローチャンネル130に注入され、迅速かつ有効に、活性層144の、どのような残存する非特異的結合部位も遮断する(図20H)。ディスク110は、好ましくは30分のあらかじめ定められた時間加湿チャンバ中で室温でインキュベートされ、全ての残存する溶液が真空中で完全に除去される(図20I)。

#### 【0177】

本発明の第1の実施態様の第2の実施形態は、バイオディスク110のフローチャンネル130内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用しない反射型ディスク110の構成に関する。この実施形態において、参照マークまたは較正点202は、第一窓141を覆って堆積し、非ビオチン標識化一次抗体188(図18F)は、各連続捕獲帯140を覆って、活性層144(図20A)上に直接堆積する(図20Dおよび図20E)。次いで、

ディスク 110 は、加湿チャンバ中で好ましくは 30 分間室温でインキュベートされる (図 20E)。未結合抗体 188 が PBS で洗浄されて除去され、ディスク 110 はスピン乾燥されて表面の水分が除去される (図 20F)。接着部材 118 が、活性層 144 に付けられる。キャップ部分 116 (図 2) は、ポリカーボネートから形成されてもよく、好ましくは、図 4 に最良に示されるように、その底部が反射表面 146 でコーティングされる。キャップ部分 116 は、接着部材 118 に一体化して接着され、それによりディスク内にフローチャンネル 130 を形成する (図 20G)。遮断剤 204 (スタビルガード (登録商標) など) が各フローチャンネル 130 に注入され、迅速かつ有効に、活性層 144 の、どのような残存する非特異的結合部位も遮断する (図 20H)。ディスクは、加湿チャンバ中で 30 分間室温でインキュベートされ、どのような残存する溶液も真空中で完全に除去される (図 20I)。図 21 は、完成した、架橋系を利用しない反射バイオディスク 110 の断面図を示す。

10

#### 【0178】

本発明の第 1 の実施態様の第 3 の実施形態は、バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用する透過型ディスク 110 の構成を含む。この実施形態において、図 5 に示されるように、基体 120、表示窓 200 (図 20A) のない半反射層 143、および活性層 144 が存在する。ストレプトアビジン 182、ビオチン標識化一次抗体 188、参照点 202、および遮断剤 204 の堆積は、上記で記載されるとおりであり、図 20B ~ 図 20H に示されるとおりである。それぞれの接着部材 118 が活性層 144 に接着される。光学的に透明なキャップ部分 116 (図 5) は、ポリカーボネートから形成され得る。キャップ部分 116 は、接着部材 118 に一体化して接着され、それによりディスク 110 内にフローチャンネル 130 を形成する (図 20G)。図 22 は、完成した、架橋系を利用する透過型バイオディスク 110 の断面図を示す。第 1 の実施態様の第 4 の実施形態が当業者により構築され得ることが理解されるはずである。第 4 の実施形態は、バイオディスク 110 のフローチャンネル内に捕獲剤を固定するのに架橋系を使用しない透過型ディスク 110 の構成を含む (図 21 および図 22)。

20

#### 【0179】

##### 実施 II

図 23A ~ 図 23D は、本発明の第 2 の実施態様の分析物捕獲の絵図である。図 23A および図 23B は、CD4<sup>+</sup>T 細胞 190 および CD8<sup>+</sup>T 細胞 194 のビオチン標識化一次抗体 188 (図 18F) による捕獲を示す。一次抗体 188 は、架橋剤ストレプトアビジン 182 によりバイオディスク 110 の活性層 144 (図 4 および図 9) に固定されたビオチン標識化二次抗体 186 (図 18E) に結合する。図 23C および図 23D は、本発明の同じ実施態様の、架橋系がない別の実施形態を示す。この実施形態において、二次抗体 186 は、バイオディスク 110 の活性層 144 に直接固定されている。

30

#### 【0180】

図 24A ~ 図 24L は、本発明の第 2 の実施態様の実施形態の構成を示す断面図である。第 1 の実施形態は、バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用する反射型ディスクの構成を含む。図 24A を参照して、光バイオディスク 110 の、光透過性基体 120、反射層 142、および活性層 144 が示される。反射層 142 の一部が除去されて (または堆積する時に開口部が作られて) 表示窓 200 を形成し、ここを通じて光が、抗体が加えられる予定の捕獲帯 140 の場所へ向けられ得る。図 24A は、5 つのそのような捕獲帯 140 を示し、そのうちの最初のものが捕獲帯 141 として示されている。活性層 144 は、好ましくはポリスチレンであり、これは反射層 142 を覆ってスピンコーティングされているか、約 40 ~ 300 ミクロンの厚さの滑らかな表面を形成する。次いで、ストレプトアビジン 182 が、各捕獲帯 140 および 141 を覆って堆積し、ディスク 110 は、加湿チャンバ中でおよそ 30 分間室温でインキュベートされる (図 24B)。ディスク 110 は洗浄されて未結合のストレプトアビジン 182 が除去され、次いでスピン乾燥されてディスク 110 の表面から水分が完全

40

50

に除去される(図24C)。参照マークまたは較正点202は、第一捕獲帯141を覆って堆積し、ビオチン標識化二次抗体186は、各連続捕獲帯140を覆って堆積する(図24Dおよび図24E)。次いで、ディスク110は、加湿チャンバ中に好ましくは30分間室温でインキュベートされる(図24E)。未結合二次抗体186がPBSで洗浄されて除去され、ディスク110はスピン乾燥されて表面の水分が除去される(図24F)。次に一次抗体188(図18F)は、各捕獲帯140を覆って堆積する(図24G)。次いで、ディスク110は、加湿チャンバ中でおよそ30分間室温でインキュベートされる(図24H)。未結合一次抗体188がPBSで洗浄されて除去され、ディスク110はスピン乾燥されて表面の水分が除去される(図24I)。各々の接着部材118が、活性層144に接着される。キャップ部分116(図2)は、同様に、ポリカーボネートから形成されてもよく、好ましくは、図4に最良に示されるように、その底部が反射表面146でコーティングされる。キャップ部分116は、接着部材118に一体化して接着され、それによりディスク内にフローチャンネル130を形成する(図24J)。遮断剤204(スタビルガード(登録商標)など)が各フローチャンネル130に注入され、迅速かつ有効に、活性層144の、どのような残存する非特異的結合部位も遮断する(図24K)。ディスク110は、加湿チャンバ中で30分間室温でインキュベートされ、どのような残存する溶液も真空中で完全に除去される(図24L)。

10

**【0181】**

本発明の第2の実施態様の第2の実施形態は、バイオディスク110のフローチャンネル130内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用しない反射型ディスク110の構成に関する。この実施形態では、参照マークまたは較正点202は、窓141を覆って堆積し、非ビオチン標識化二次抗体186(図18D)は、各連続捕獲帯140を覆って活性層144(図24A)上に直接堆積する。次いで、ディスク110は、加湿チャンバ中で30分間室温でインキュベートされる(図24E)。未結合二次抗体186がPBSで洗浄されて除去され、ディスク110はスピン乾燥されて表面の水分が除去される(図24F)。次いで、一次抗体188(図18F)は、各捕獲帯140を覆って堆積する(図24G)。次いで、ディスク110は、加湿チャンバ中で30分間室温でインキュベートされる(図24H)。未結合一次抗体188がPBSで洗浄されて除去され、ディスク110はスピン乾燥されて表面の水分が除去される(図24I)。接着部材118が、活性層144に接着される。従来の実施形態と同様に、この実施形態のキャップ部分116は、ポリカーボネートから形成されてもよく、好ましくは、図4に最良に示されるように、その底部が反射表面146でコーティングされる。キャップ部分116は、接着部材118に一体化して接着され、それによりディスク内にフローチャンネル130を形成する(図24J)。遮断剤204(スタビルガード(登録商標)など)が各フローチャンネル130に注入され、迅速かつ有効に、活性層144の、どのような残存する非特異的結合部位も遮断する(図24K)。ディスクは、本実施形態において好ましくは30分間加湿チャンバ中で室温でインキュベートされ、どのような残存する溶液も真空中で完全に除去される(図24L)。図25は、完成した、架橋系を利用しない反射バイオディスク110の断面図を示す。

20

30

**【0182】**

本発明の第2の実施態様の第3の実施形態は、バイオディスク110のフローチャンネル130内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用する透過型ディスク110の構成を含む。この実施形態において、図5に示されるように、基体120、表示窓200(図24A)のない半反射層143、および活性層144が存在する。ストレプトアビジン182、ビオチン標識化二次抗体186、一次抗体188、参照点202、および遮断剤204の堆積は、上記で記載されるとおりであり、図24B~図24Kに示されるとおりである。接着部材118は、同様に活性層144に接着される。光学的に透明なキャップ部分116(図5)は、ポリカーボネートから形成され得る。キャップ部分116は、接着部材118に一体化して接着され、それによりディスク110内にフローチャンネル130を形成する(図24J)。図26は、完成した、架橋系を利用する透過型バイオディスク1

40

50

10の断面図を示す。第2の実施態様の第4の実施形態が当業者により構築され得ることが理解されるはずである。第4の実施形態は、バイオディスク110のフローチャンネル内に捕獲剤を固定するのに架橋系を使用しない透過型ディスク110の構成を含む(図21および図22)。

#### 【0183】

##### 実施III

図27A~図27Dは、本発明の第3の実施態様の分析物捕獲の絵図である。図27Aおよび図27Bは、CD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194の一次抗体188(図18F)による捕獲を示す。一次抗体188は、二次抗体186に結合され(図18D)、これはDCHO鎖に結合される。DCHOは、バイオディスク110の活性層144(図4および図9)に固定されている。図27Cおよび図27Dは、本発明の同じ実施態様の、二次抗体186がない別の実施形態を示す。この実施形態において、一次抗体188は、DCHOに直接結合され、これはバイオディスク110の活性層144に固定されている。

10

#### 【0184】

図28Aは、抗体-DCHO複合体の調製を示す絵による流れ図であるが、一方図28B~図28Jは、本発明の第3の実施態様の実施形態の構成を示す複数の図である。この第3の実施態様の第1の実施形態は、バイオディスク110のフローチャンネル130内に捕獲剤を固定するために架橋剤DCHOを利用する反射型ディスクの構成を含む。図28Aは、DCHO-抗体複合体199の調製を示す。等濃度のDCHO198と二次抗体186とを混合して組合せ、それによりDCHO-抗体(二次)複合体199を形成する。図28Bを参照して、光バイオディスク110の、光透過性基体120、反射層142、および活性層144が示される。反射層142の一部が除去されて(または堆積する時に開口部が作られる)表示窓200を形成し、ここを通じて光が、抗体が加えられる予定の捕獲帯140の場所へ向けられ得る。図28Bは、5つのそのような捕獲帯140を示し、そのうちの最初のものが捕獲帯141として示されている。活性層144は、好ましくはポリスチレンであり、これは反射層142を覆ってスピンコーティングされて、約40~300ミクロンの厚さの滑らかな表面を形成する。この特定の実施形態において、次いで、DCHO-抗体複合体(二次)199が、各捕獲帯140を覆って堆積し、ディスク110は、加湿チャンバ中で30分間室温でインキュベートされる(図28C)。ディスク110は洗浄されて未結合のDCHO-抗体複合体(二次)199が除去され、次いでスピン乾燥されてディスク110の表面から水分が完全に除去される(図28D)。参照点202は第一捕獲帯141を覆って堆積し、一次抗体188は、各連続捕獲帯140を覆って堆積する(図28E)。次いで、ディスク110は、加湿チャンバ中で30分間室温でインキュベートされる(図28F)。未結合一次抗体188がPBSで洗浄されて除去され、ディスク110はスピン乾燥されて表面の水分が除去される(図28G)。接着部材またはチャンネル層118が、活性層144に付けられる。上記実施形態と同様に、キャップ部分116(図2に概して示される)は、ポリカーボネートから形成されてもよく、好ましくは、図4に最良に示されるように、その底部が反射表面146でコーティングされる。本実施形態において、図28Hに示されるように、キャップ部分116は、接着部材118に一体化して付けられ、それによりディスク内にフローチャンネル130を形成する。遮断剤204(スタビルガード(登録商標)など)が各フローチャンネル130に注入され、迅速かつ有効に、活性層144の、どのような残存する非特異的結合部位も遮断する。この工程は図28Iに示される。ディスク110は、この実施形態において、図28Jに表されるように、約30分間加湿チャンバ中で室温でインキュベートされ、どのような残存する溶液も真空中で完全に除去される。

20

30

40

#### 【0185】

本発明の製造態様に従って、図28A~図28Jはまた、クラスター標識計数を実行する光アッセイディスクの作製法を示す。この光アッセイディスクの作製法は、架橋剤を管に用意する工程、捕獲剤を管に加える工程、架橋剤と捕獲剤とを組合せる(複合体を形成

50

する)工程、基体を用意する工程、基体を活性層でコーティングする工程、複合体を活性層上に堆積させる工程、そして接着部材を使用してキャップ部分を活性層に接着させる工程を含む。この実施形態において、架橋剤は、アルデヒド活性化デキストランである。捕獲剤は、細胞表面抗原と結合するためのものである。代替的な実施形態において、捕獲剤は、細胞表面抗原に選択的親和性を有する一次捕獲剤と結合するためのものである。好適な実施形態において、細胞表面抗原は、独立して抗原のCDファミリーから選択される。さらに好適な実施形態において、細胞表面抗原は、独立して、CD3、CD4、CD8、およびCD45からなる群より選択される。

#### 【0186】

本発明の第3の実施態様の第2の実施形態は、バイオディスク110のフローチャンネル130内に一次捕獲剤を固定するために二次抗体を使用しない反射型ディスク110の構成を含む。この実施形態において、等濃度のDCHO198と一次抗体188とが混合されて組合せられ、それにより図28Aに表されるDCHO-抗体(一次)複合体199を形成する。参照または校正点202は、第一窓141を覆って堆積し、DCHO-抗体(一次)複合体199は、各連続捕獲帯140を覆って活性層144上に堆積する(図28C)。次いで、ディスク110は、加湿チャンバ中で好ましくは30分間室温でインキュベートされ、未結合DCHO-抗体188(一次)複合体199がPBSで洗浄されて除去される。ディスク110は、図28Dに図示されるように、スピン乾燥されて表面の水分が除去される。接着部材またはチャンネル層118が、同様に活性層144に付けられる。キャップ部分116は、ポリカーボネートから形成されてもよく、好ましくは、図4に最良に示されるように、その底部が反射表面146でコーティングされる。キャップ部分116は、接着部材118に一体化して接着され、それにより、図28Hに示されるように、ディスク内にフローチャンネル130を形成する。遮断剤204(スタビルガード(登録商標)など)が各フローチャンネル130に注入され、迅速かつ有効に、活性層144の、全ての残存する非特異的結合部位を遮断する(図28I)。ディスクは、図28Jに示されるように、約30分間加湿チャンバ中で室温でインキュベートされ、どのような残存する溶液も真空中で完全に除去される。図29は、完成した、二次抗体を使用しない反射型バイオディスク110の断面図を示す。

#### 【0187】

本発明の第3の実施態様の第3の実施形態は、バイオディスク110のフローチャンネル130内に捕獲剤を固定するために架橋剤DCHOを利用する透過型ディスク110の構成を含む。この実施形態において、図5に示されるように、基体120、表示窓200(図28B)のない半反射層143、および活性層144が存在する。DCHO-抗体(二次)複合体199、一次抗体188、参照マークまたは点202、および遮断剤204の堆積は、上記で記載されるとおりであり、図28C~図28Iに示されるとおりである。接着部材またはチャンネル層118が活性層144に接着される。光学的に透明なキャップ部分116(図5)は、ポリカーボネートから形成され得る。キャップ部分116は、接着部材118に一体化して接着され、それによりディスク110内にフローチャンネル130を形成する。図30は、完成した、DCHO-抗体(二次)複合体199および一次抗体188を利用する透過型バイオディスク110の断面図を示す。第3の実施態様の第4の実施形態が当業者により構築され得ることが理解されるはずである。第4の実施形態は、バイオディスク110のフローチャンネル内に一次捕獲剤を固定するのに二次抗体を使用しない透過型ディスク110の構成を含む(図29および図30)。他の実施形態は、バイオディスク110の活性層144に一次抗体または二次抗体を固定するためのストレプトアビジン182(図18A)およびビオチン184(図18B)の使用を含む。固定された抗体(一次および二次の両方)は、その後、バイオディスク110のフローチャンネル130内の捕獲剤の濃度増加のため、DCHO198と複合化し得る。

#### 【0188】

##### 実施IV

図31Aは、光バイオディスク110の平面図であり、それぞれ特異的細胞表面マーカ

10

20

30

40

50

ーおよびネガティブコントロール帯用の複数の捕獲帯 140 を有する 4 つの流体回路 128 を示す。図示されるように、各流体回路は、具体的には CD3、CD4、CD8、および CD45 のための専用の捕獲帯 140 を有する。任意の他の所望の細胞表面抗原パターンまたは組合せ（例えば、他の CD マーカーまたは細胞表面マーカーなど）を用いてもよい。この特定の実施態様において、それぞれ別個の流体回路は、捕獲帯 140 のそれぞれに種類だけの共通する捕獲剤を有することが必要である。図 31A に示されるディスクは、以下の図 31B ~ 図 31E、図 44A ~ 図 44D、図 45、および図 46 に記載される細胞捕獲化学種および方法で使用するのに、特に適している。図 31A に表示されるバイオディスク 110 は、反射型ディスクまたは透過型ディスクのいずれでもよい。

#### 【0189】

ここで図 31B ~ 図 31E に移って、本発明の第 4 の実施態様での分析物捕獲の絵図が示される。図 31B および図 31C は、あらかじめ一次抗体 188（図 18F）と組合わさって一次抗体 - 細胞複合体を形成した CD4<sup>+</sup> 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> 細胞 194 の、二次抗体 186 による捕獲を示す。一次抗体 188 は、バイオディスク 110 の活性層 144（図 4 および図 9）に、架橋剤ストレプトアビジン 182 により固定されたビオチン標識化二次抗体 186（図 18E）に結合する。図 31D および図 31E は、本発明の同じ実施態様の、架橋系のない別の実施形態を示す。この実施形態において、二次抗体 186 は、バイオディスク 110 の活性層 144 に直接固定されている。

#### 【0190】

図 32A ~ 図 32I は、本発明の第 4 の実施態様の実施形態の構成を示す断面図である。第 1 の実施形態は、バイオディスクのフローチャンネル内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用する反射型ディスクの構成を示す。図 32A を参照して、光バイオディスク 110 の、光透過性基体 120、反射層 142、および活性層 144 が示される。反射層 142 の一部が除去されて（または堆積する時に開口部が作られる）表示窓 200 を形成し、ここを通じて光が、抗体が加えられる予定の捕獲帯 140 の場所へ向けられ得る。図 32A は、5 つのそのような捕獲帯 140 を示し、そのうちの最初のものが捕獲帯 141 として示されている。活性層 144 は、好ましくはポリスチレンであり、これは反射層 142 を覆ってスピンコーティングされて、約 40 ~ 300 ミクロンの厚さの滑らかな表面を形成する。次いで、図 32B に表示されるように、ストレプトアビジン 182 が、各捕獲帯 140 および 141 を覆って堆積し、ディスク 110 は、加湿チャンバ中で 30 分間室温でインキュベートされる。図 32C に示されるように、ディスク 110 は洗浄されて未結合のストレプトアビジン 182 が除去され、次いでスピン乾燥されてディスク 110 の表面から水分が完全に除去される。図 32D および図 32E に示されるように、参照マークまたは較正点 202 は、第一捕獲帯 141 を覆って堆積し、ビオチン標識化二次抗体 186 は、各連続捕獲帯 140 を覆って堆積する。この実施形態では、次いで、ディスク 110 は、加湿チャンバ中で約 30 分間室温でインキュベートされる。この工程は、図 32E に図示される。未結合二次抗体 186 が PBS で洗浄されて除去され、ディスク 110 はスピン乾燥されて表面の水分が除去される。本方法のこの工程は、図 32F に表示される。接着部材またはチャンネル層 118 が、同様に活性層 144 に付着される。それぞれのキャップ部分 116 は、好ましくはポリカーボネートから形成され、図 4 に最良に示されるように、その底部が反射表面 146 でコーティングされる。図 32G に示されるように、キャップ部分 116 は、接着部材 118 に一体化して付着され、それによりディスク内にフローチャンネル 130 を形成する。遮断剤 204（スタビルガード（登録商標）など）が各フローチャンネル 130 に注入され、迅速かつ有効に、活性層 144 の、どのような残存する非特異的結合部位も遮断する。この工程は、図 32H に示される。図 32I に表示されるように、ディスク 110 は、好ましくは 30 分間加湿チャンバ中で室温でインキュベートされ、どのような残存する溶液も真空中で完全に除去される。

#### 【0191】

本発明の第 4 の実施態様の第 2 の実施形態は、バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用しない反射型ディスク 110 の構成を

10

20

30

40

50

含む。本実施形態において、参照マークまたは較正点 202 は、第一窓 141 を覆って堆積し、非ビオチン標識化二次抗体 186 は、図 18D に概して示されるように、各連続捕獲帯 140 を覆って、活性層 144 上に直接堆積する。次いで、ディスク 110 は、加湿チャンバ中で 30 分間室温でインキュベートされる。未結合二次抗体 186 が P B S で洗浄されて除去され、ディスク 110 はスピン乾燥されて表面の水分が除去される。接着部材 118 が、活性層 144 に接着される。キャップ部分 116 は、ポリカーボネートから形成されてもよく、好ましくは、図 4 に最良に示されるように、その底部が反射表面 146 でコーティングされる。キャップ部分 116 は、接着部材 118 に一体化して接着され、ディスク内にフローチャンネル 130 を形成する。遮断剤 204 (スタビルガード (登録商標) など) が各フローチャンネル 130 に注入され、迅速かつ有効に、活性層 144 の、どのような残存する非特異的結合部位も遮断する。ディスクは、およそ 30 分間加湿チャンバ中で室温でインキュベートされ、どのような残存する溶液も真空中で完全に除去される。図 33 は、完成した、架橋系を利用しない反射バイオディスク 110 の断面図を示す。

10

#### 【0192】

本発明の第 4 の実施態様の第 3 の実施形態は、バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 内に捕獲剤を固定するために架橋系を利用する透過型ディスク 110 の構成を含む。この実施形態において、図 5 に示されるように、基体 120、表示窓 200 (図 32A) のない半反射層 143、および活性層 144 が存在する。ストレプトアビジン 182、ビオチン標識化一次抗体 188、参照点 202、および遮断剤 204 の堆積は、上記で記載され、図 32b ~ 図 32H で示されるとおりである。接着部材 118 が活性層 144 に付けられる。光学的に透明なキャップ部分 116 (図 5) は、ポリカーボネートから形成され得る。キャップ部分 116 は、接着部材 118 に一体化して接着され、それによりディスク 110 内にフローチャンネル 130 を形成する (図 32G)。図 34 は、完成した、架橋系を利用する透過型バイオディスク 110 の断面図を示す。第 4 の実施態様の第 4 の実施形態が当業者により構築され得ることが理解されるはずである。第 4 の実施形態は、バイオディスク 110 のフローチャンネル内に二次捕獲剤を固定するのに架橋系を使用しない透過型ディスク 110 の構成を含む (図 33 および図 34)。

20

#### 【0193】

##### クラスター標識計数 - 実施態様 I

図 35A は、光バイオディスク 110 の平面図であり、それぞれ、4 種の異なる特異的細胞表面マーカーおよびネガティブコントロール帯用の複数の捕獲帯 140 を有する 4 つの流体回路 128 を示す。図示されるように、各流体回路は、それぞれが具体的には CD3、CD4、CD8、および CD45 のための専用の 4 つの捕獲帯 140 を有する。任意の他の所望の細胞表面抗原パターンまたは組合せ (例えば、他の CD マーカーまたは細胞表面マーカーなど) を用いてもよい。この特定の実施形態において、それぞれ別個の流体回路は、捕獲帯 140 のそれぞれに一種類だけの共通する捕獲剤を有することが必要であるという制限はない。反対に、この実施形態では、異なる捕獲剤を持つ捕獲帯を有することが望ましい。これらの捕獲帯は、例えば、少なくとも 2 x 2 のマトリクスを有するアレイフォーマットで、配置され得る。図 35A に示されるディスクは、以下の図 35B ~ 図 35D、図 36、図 37、図 38A ~ 図 38C、図 39、図 40、図 41A ~ 図 41C、図 42、および図 43 に記載される細胞捕獲化学種および方法で使用するのに、特に適している。図 35A に表示されるバイオディスク 110 は、反射型ディスクまたは透過型ディスクのいずれでもよい。

30

40

#### 【0194】

次に図 35B ~ 図 35D を参照して、本発明の第 1 の実施態様のバイオディスクを使用する、精製および洗浄した MNC 試料 (図 17A) の分析が示される。図 35B に表示されるように、バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 を MNC 試料で溢れさせる。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および / または遠心力 (すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力) が検査試料に

50

作用して、一次抗体 188 との接触を達成させる。図 35C に示されるように、一次抗体は、検査試料内に存在する CD4<sup>+</sup> 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> 細胞 194 のいずれかと接触することになり、次いでこれらを捕獲する。光学ドライブモーター 162 (図 10) はディスクを回転させ、これが捕獲帯 140 (図 20I) の未結合 T 細胞を一掃する。光ディスクドライブ 112 (図 1) の入射ビーム 152 は、捕獲された CD4<sup>+</sup> 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> 細胞 194 と相互作用し (図 35D)、戻りビーム 154 が、処理および分析用検出器 157 (図 10) へ反射される。

#### 【0195】

図 36 は、本発明の第 1 の実施態様の第 2 の実施形態を使用する、図 35B ~ 図 35D からの同一検査試料の分析を示す。バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 を MNC 試料で溢れさせる (図 35B)。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および / または遠心力 (すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力) が検査試料に作用して、一次抗体 188 との接触を達成させる。一次抗体は、検査試料内に存在する CD4<sup>+</sup> T 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> T 細胞 194 のいずれかと接触することになり、次いでこれらを捕獲する (図 35C)。光学ドライブモーター 162 (図 10) はディスクを回転させ、これが捕獲帯 140 (図 20I) の未結合 T 細胞を一掃する。光ディスクドライブ 112 (図 1) の入射ビーム 152 は、捕獲された CD4<sup>+</sup> T 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> T 細胞 194 と相互作用し (図 35D)、戻りビーム 154 が、処理および分析用検出器 157 (図 10) へ反射される。

#### 【0196】

図 37 は、本発明の第 1 の実施態様の第 3 の実施形態を使用する、図 35B ~ 図 35D からの同一検査試料の分析を示す。バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 を MNC 試料で溢れさせる (図 35B)。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および / または遠心力 (すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力) が検査試料に作用して、一次抗体 188 との接触を達成させる。一次抗体は、検査試料内に存在する CD4<sup>+</sup> T 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> T 細胞 194 のいずれかと接触することになり、次いでこれを捕獲する (図 35C)。光学ドライブモーター 162 (図 10) はディスクを回転させ、これが捕獲帯 140 (図 20I) の未結合 T 細胞を一掃する。光ディスクドライブ 112 (図 1) の入射ビーム 152 は、捕獲された CD4<sup>+</sup> T 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> T 細胞 194 と相互作用し (図 35D)、透過ビーム 156 が、処理および分析用検出器 157 (図 10) へ通過される。

#### 【0197】

##### クラスター標識計数 - 実施態様 II

次に図 38A ~ 図 38C を参照して、本発明の第 2 の実施態様のバイオディスクを使用する、精製および洗浄した MNC 試料 (図 17A) の分析が示される。図 38A に表示されるように、バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 を MNC 試料で溢れさせる。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および / または遠心力 (すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力) が検査試料に作用して、一次抗体 188 との接触を達成させる。一次抗体は、検査試料内に存在する CD4<sup>+</sup> 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> 細胞 194 のいずれかと接触することになり、次いでこれを捕獲する。この工程は図 38B に示される。光学ドライブモーター 162 (図 10) はディスクを回転させ、これが捕獲帯 140 (図 24L) の未結合 T 細胞を一掃する。光ディスクドライブ 112 (図 1) の入射ビーム 152 は、捕獲された CD4<sup>+</sup> 細胞 190 および CD8<sup>+</sup> 細胞 194 と相互作用し (図 38C)、戻りビーム 154 が、処理および分析用検出器 157 (図 10) へ反射される。

#### 【0198】

図 39 は、本発明の第 2 の実施態様の第 2 の実施形態を使用する、図 38A ~ 図 38C からの同一検査試料の分析を示す。バイオディスク 110 のフローチャンネル 130 を MNC 試料で溢れさせる (図 38A)。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および / または遠心力 (すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運

動で本体にかかる力)が検査試料に作用して、一次抗体188との接触を達成させる。一次抗体は、検査試料内に存在するCD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194のいずれかと接触することになり、次いでこれを捕獲する(図38B)。光学ドライブモーター162(図10)はディスクを回転させ、これが捕獲帯140(図24L)の未結合T細胞を一掃する。光ディスクドライブ112(図1)の入射ビーム152は、捕獲されたCD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194と相互作用し(図38C)、戻りビーム154が、処理および分析用検出器157(図10)へ反射される。

#### 【0199】

図40は、本発明の第2の実施態様の第3の実施形態を使用する、図38A~図38Cからの同一検査試料の分析を示す。バイオディスク110のフローチャンネル130をMNC試料で溢れさせる(図38A)。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および/または遠心力(すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力)が検査試料に作用して、一次抗体188との接触を達成させる。一次抗体は、検査試料内に存在するCD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194のいずれかと接触することになり、次いでこれを捕獲する(図38B)。光学ドライブモーター162(図10)はディスクを回転させ、これが捕獲帯140(図24L)の未結合T細胞を一掃する。光ディスクドライブ112(図1)の入射ビーム152は、捕獲されたCD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194と相互作用し(図38C)、透過ビーム156が、処理および分析用検出器157(図10)へ通過される。

#### 【0200】

##### クラスター標識計数 - 実施態様III

次に図41A~図41Cを参照して、本発明の第3の実施態様のバイオディスクを使用する、精製および洗浄したMNC試料(図17A)の分析が示される。図41Aに表示されるように、バイオディスク110のフローチャンネル130をMNC試料で溢れさせる。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および/または遠心力(すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力)が検査試料に作用して、一次抗体188との接触を達成させる。一次抗体は、検査試料内に存在するCD4<sup>+</sup>細胞190およびCD8<sup>+</sup>細胞194のいずれかと接触することになり、次いでこれを捕獲する。本方法のこの工程は図41Bに示される。光学ドライブモーター162(図10)はディスクを回転させ、これが捕獲帯140(図28J)の未結合T細胞を一掃する。光ディスクドライブ112(図1)の入射ビーム152は、捕獲されたCD4<sup>+</sup>細胞190およびCD8<sup>+</sup>細胞194と相互作用し(図41C)、戻りビーム154が、処理および分析用検出器157(図10)へ反射される。

#### 【0201】

図42は、本発明の第3の実施態様の第2の実施形態を使用する、図41A~図41Cからの同一検査試料の分析を示す。バイオディスク110のフローチャンネル130をMNC試料で溢れさせる(図41A)。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および/または遠心力(すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力)が検査試料に作用して、一次抗体188との接触を達成させる。一次抗体は、検査試料内に存在するCD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194のいずれかと接触することになり、次いでこれを捕獲する(図41B)。光学ドライブモーター162(図10)はディスクを回転させ、これが捕獲帯140(図28J)の未結合T細胞を一掃する。光ディスクドライブ112(図1)の入射ビーム152は、捕獲されたCD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194と相互作用し(図41C)、戻りビーム154が、処理および分析用検出器157(図10)へ反射される。

#### 【0202】

図43は、本発明の第3の実施態様の第3の実施形態を使用する、図41A~図41Cからの同一検査試料の分析を示す。バイオディスク110のフローチャンネル130をMNC試料で溢れさせる(図41A)。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および/または遠心力(すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運

10

20

30

40

50

動で本体にかかる力)が検査試料に作用して、一次抗体188との接触を達成させる。一次抗体は、検査試料内に存在するCD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194のいずれかと接触することになり、次いでこれを捕獲する(図41B)。光学ドライブモーター162(図10)はディスクを回転させ、これが捕獲帯140(図28J)の未結合T細胞を一掃する。光ディスクドライブ112(図1)の入射ビーム152は、捕獲されたCD4<sup>+</sup>T細胞190およびCD8<sup>+</sup>T細胞194と相互作用し(図41C)、透過ビーム156が、処理および分析用検出器157(図10)へ通過される。

#### 【0203】

##### クラスター標識計数 - 実施態様IV

ここで図44A~図44Dを参照して、本発明の第4の実施態様のバイオディスクを使用する、精製および洗浄したMNC試料(図17A)の分析が示される。図44Aは、一次抗体-T細胞複合体の調製を示す、絵による流れ図である。CD4<sup>+</sup>T細胞190とCD8<sup>+</sup>T細胞194の両方を含むMNC懸濁液を一次抗体188と混合して結合させ、それにより一次抗体-T細胞複合体を形成する。当業者に明らかであるように、異なる表面マーカを持つ他の細胞もまた、本実施態様を使用してタグ付けされ得る。図44Bに示されるように、バイオディスク110のフローチャンネル130を一次抗体-T細胞複合体で溢れさせる。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および/または遠心力(すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力)が検査試料に作用して、バイオディスク110の活性層144に固定された二次抗体188との接触を達成させる。図44Cに示されるように、一次抗体-T細胞複合体に親和性を有する二次抗体186が、複合体を捕獲する。光学ドライブモーター162(図10)はディスクを回転させ、これが捕獲帯140(図32I)の未結合複合体を一掃する。光ディスクドライブ112(図1)の入射ビーム152は、捕獲された複合体と相互作用し(図44D)、戻りビーム154が、処理および分析用検出器157(図10)へ反射される。

#### 【0204】

図44A~図44Dはまた、本発明の方法の別の主要な態様を示す。図17Aと関連して、クラスター標識計数を実行する別の方法が提供される。この方法は、以下の:(1)分離勾配を含有する管に血液試料を提供する工程、(2)血液試料を層に分離するのに十分な時間および速度で、管を回転させる工程、(3)T細胞含有MNC層を再懸濁させる工程であって、それによりMNC懸濁液を形成する、再懸濁させる工程、(4)一次抗体をMNC懸濁液に添加する工程であって、それにより一次抗体-T細胞複合体を形成させる、添加する工程、(5)一次抗体-T細胞複合体を、少なくとも一種の捕獲剤を含有する少なくとも1つの捕獲帯を含むディスク表面に提供する工程、(6)ディスクを光学式読み取り機にロードする工程、(7)電磁放射の入射ビームを捕獲帯に向ける工程、(8)ディスクと捕獲帯で相互作用した後に形成された電磁放射ビームを検出する工程、(9)検出されたビームを出力信号へ変換する工程、および(10)出力信号を分析する工程であって、それにより捕獲帯に捕獲された細胞数に関する情報を抽出する、分析する工程を含む。この方法の一実施形態において、光ディスクは、捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が反射されるような反射層で構成される。この方法の別の実施形態において、光ディスクは、捕獲帯に向けられかつ細胞に当たらない光が光ディスクを透過するように構成される。

#### 【0205】

図45は、本発明の第4の実施態様の第2の実施形態を使用する、図44A~図44Dからの同一検査試料の分析を示す。バイオディスク110のフローチャンネル130を一次抗体-T細胞複合体で溢れさせる(図44B)。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および/または遠心力(すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力)が検査試料に作用して、バイオディスク110の活性層144に固定された二次抗体188との接触を達成させる。一次抗体-T細胞複合体に親和性を有する二次抗体186が、複合体を捕獲する(図44C)。光学ドライブモーター

ー 1 6 2 ( 図 1 0 ) はディスクを回転させ、これが捕獲帯 1 4 0 ( 図 3 2 I ) の未結合複合体を一掃する。光ディスクドライブ 1 1 2 ( 図 1 ) の入射ビーム 1 5 2 は、捕獲された複合体と相互作用し ( 図 4 4 D ) 、戻りビーム 1 5 4 が、処理および分析用検出器 1 5 7 ( 図 1 0 ) へ反射される。

【 0 2 0 6 】

図 4 6 は、本発明の第 4 の実施態様の第 3 の実施形態を使用する、図 4 4 A ~ 図 4 4 D からの同一検査試料の分析を示す。バイオディスク 1 1 0 のフローチャンネル 1 3 0 を一次抗体 - T 細胞複合体で溢れさせる ( 図 4 4 B ) 。毛管作用、外部アプリケーションでかけられる圧力、および / または遠心力 ( すなわち、回転の中心または屈曲または軸から外へ向かう曲線運動で本体にかかる力 ) が検査試料に作用して、バイオディスク 1 1 0 の活性層 1 4 4 に固定された二次抗体 1 8 8 との接触を達成させる。一次抗体 - T 細胞複合体に親和性を有する二次抗体 1 8 6 が、複合体を捕獲する ( 図 4 4 C ) 。光学ドライブモーター 1 6 2 ( 図 1 0 ) はディスクを回転させ、これが捕獲帯 1 4 0 ( 図 3 2 I ) の未結合複合体を一掃する。光ディスクドライブ 1 1 2 ( 図 1 ) の入射ビーム 1 5 2 は、捕獲された複合体と相互作用し ( 図 4 4 D ) 、透過ビーム 1 5 6 が、処理および分析用検出器 1 5 7 ( 図 1 0 ) へ通過される。

10

【 0 2 0 7 】

当業者は、これらの教示に照らし合わせて、本発明の方法の 1 つまたは複数の実施態様の 1 つまたは複数の実施形態が本発明の範囲および精神から逸脱することなく組み合わせ得ることを、理解するだろう。

20

【 0 2 0 8 】

細胞検出および関連するソフトウェア

ここで図 4 7 を参照して、試料保持用流体回路 1 2 8 を含む光バイオディスク 1 1 0 が示される。図 4 7 はまた、異なる捕獲帯または標的帯 1 4 0 ならびに参照マークまたは校正点 2 0 2 を含む標的帯 1 4 1 を図示するために拡大された流体回路 4 7 を示す。この特定の実施形態において、5 つの捕獲帯 1 4 0 が用いられ、それぞれが、各自 CD 4 + 細胞、CD 8 + 細胞、CD 3 + 細胞、CD 4 5 + 細胞、およびネガティブコントロールとしてミオグロビンを捕獲するように実施される。

【 0 2 0 9 】

図 4 8 A は、6 つの捕獲帯 1 4 0 を含む異なる実施形態で得られた画像であり、捕獲帯はそれぞれ、各自 CD 4 5 + 細胞、CD 1 5 + 細胞、CD 4 + 細胞、CD 8 + 細胞を捕獲するように、および CD 1 5 + 細胞用第二捕獲帯、および CD 4 5 + 細胞用第二捕獲帯として実施される。この実施形態において、2 つの CD 4 5 捕獲帯および CD 1 5 捕獲帯は、捕獲効率と予想される計数結果が一致していることを検証するために検証用対照またはチェックとして使用され得る。図 4 8 A はまた、CD 4、CD 8、および対照の一連の細胞表面抗原を拡大図で示す。本明細書で示されるとおり、画像は、バックグラウンドフィールドに対して示される細胞数のものである。図 4 8 B は、対照、CD 4、および CD 8 捕獲帯の接近図を表示し、実際の顕微鏡画像からのものを本発明によるバイオディスク由来画像と比較している。図 4 9 は、実際の顕微鏡画像と、対応する本発明によるバイオディスク由来画像との別の比較をより詳細に図示する。図 4 8 B および図 4 9 に表示されるとおり、本発明者らは、バイオディスク画像が、顕微鏡から得られ得るものと比較して同等な品質および分解能のものであることを見いだした。したがって、これらの画像は、本発明の装置および方法を使用して、個々の細胞がバックグラウンドに対し可視化され得ることを実証する。治験用特徴を検出する方法は、同一出願人による米国仮出願第 6 0 / 2 7 0 , 0 9 5 号、および第 6 0 / 2 9 2 , 1 0 8 号、表題「Signal Processing Apparatus and Methods for Obtaining Signal Signatures of Investigational Features Detected on a Surface of an Optical Bio-Disc Assembly」(それぞれ 2 0 0 1 年 2 月 2 日および 2 0 0 1 年 5 月 1 8 日出願)に、および同一出願人による特許出願第 1 0 / 0 4 3 , 6 8 8 号、表題「Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging」( 2 0 0 2 年 1 月 1 0 日出願)に、より詳細に記載され、

30

40

50

これらは全て本明細書中に参照として援用される。

【0210】

これらの細胞は、様々な異なる方法のうちの一つを通じて検出され得、例えば、透過光または反射光レベルの十分に大きな変化を検出および計数し、したがって遷移、よって細胞を計数する、縁検出ハードウェアまたはソフトウェアの使用を含む。別の方法は、以下により詳細に記載されるが、画像またはパターン認識ソフトウェアを使用して、バックグラウンドに対して細胞を同定する。画像認識は、RBCとWBCを識別することができ、同じく好中球、単球、好塩基球、好酸球、顆粒球、およびリンパ球も識別することができる。

【0211】

約1.6ミクロンで離れたトラックを持つ光ディスクが、ディスクに細胞または会合体を画像化するために使用され得る。例えば、白血球は通常、少なくとも5～多くて12トラックの直径を有し、それゆえその白血球の画像を得ることができる。

【0212】

そのような画像を得るために、図2、図3、および図4に示される型の透過型ディスクが用いられ（反射型ディスクが操作可能であるが）、図10に示される型のディスクドライブシステムがトリガーセンサー160および上部検出器158を含む。トリガー検出器158は、透過型ディスクのトリガーマーク126を検出してコンピューターに信号を提供し、マークが検出された時にデータが収集および/または処理されることになっている。光源が表示窓のトラックを横切って通ることで、受信透過光で画像が得られる。この場合上部検出器は、単一の検出器、あるいは半径および/または円周方向に並んだ複数の検出器エレメントの配列であり得る。そのような検出器および検出方法は、例えば、同一出願人による米国仮出願第60/247,465号、表題「Optical Disc Drive For Bio-Optical Disc」（2000年11月9日出願）、米国仮出願第60/293,093号、表題「Disc Drive Assembly For Optical Bio-Discs」（2001年5月22日出願）、および、米国仮出願第10/008,156号、表題「Disc Drive System and Methods for Use with Bio-discs」（2001年11月9日出願）に記載され、これらはそれぞれ本明細書中にその全体が参照として援用される。

【0213】

図48A、図48B、および図49のような画像が得られた後、画像データは、所望の特徴を同定するように設計された画像認識ソフトウェアでさらに処理され得る。画像認識ソフトウェアは、細胞をバックグラウンドと識別する能力を有するだけでなく、1つの型の細胞を別のものと識別する能力を有することがさらに望ましい。

【0214】

ここで図50を参照して、赤血球および白血球の両方を含む治験用データに由来する画像が示される。拡大図に示されるとおり、これら白血球および赤血球は、明らかに異なる特性を有し、したがってバックグラウンドに対して検出され得、かつまた画像認識で互いに識別され得る。また、リンパ球、単球、好中球、好酸球、顆粒球、および好塩基球を含む白血球の型を互いに識別することも可能である。

【0215】

図51は、多数の細胞のある試料フィールドを示し、ここで+記号は細胞として同定された各物体を示す。各帯または任意の数の所望の帯で細胞数が検出された後、結果として得られる細胞計数データは、図52に示されるような見やすい表示を提供する一枚の画面に表示され得る。図52に描写されるとおり、特定の細胞数が、細胞の相対数を表示する棒グラフとともに提供される。CD4/CD8分析の場合、システムはまた、CD4/CD8比、ならびに任意の他の所望の数学計算または比較を算出し得る。図53は、プロセスの異なる表示を提供し、これはCD4数、CD8数、および比率に変換された画像フィールドの細胞を、その比率が正常範囲にあることを示す出力と合わせて示す。

【0216】

細胞検出および伴う処理法に関連する本発明の態様も、同じく以下の：米国仮出願第6

10

20

30

40

50

0 / 3 1 6 , 2 7 3 号、表題「Capture Layer Assemblies and Optical Bio-Discs for Immunophenotyping」(2001年8月31日出願)、米国仮出願第60 / 3 1 8 , 0 2 6 号、表題「Methods for Imaging Blood cells, Blood-Borne Parasites and Pathogens, and Other Biological Matter Including Related Optical Bio-Discs and Drive Assemblies」(2001年9月7日出願)、米国仮出願第60 / 3 2 2 , 5 2 7 号、表題「Optical Analysis Discs Including Microfluidic Circuits for Performing Cell Counts」(2001年9月14日出願)、米国仮出願第60 / 3 2 2 , 0 4 0 号、表題「Optical Analysis Discs Including Fluidic Circuits for Optical Imaging and Quantitative Evaluation of Blood Cells Including Lymphocytes」(2001年9月11日出願)、米国仮出願第60 / 3 2 2 , 8 6 3 号、表題「Methods for Differential Cell Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same」(2001年9月12日出願)、および米国仮出願第60 / 3 2 2 , 7 9 3 号、表題「Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Charged Matter Including Heparin, Plasma, or Poly-Lysine」(2001年9月17日出願)に開示され、それらは全て本明細書中に参照として援用される。

#### 【0217】

分画細胞計数法および関連するソフトウェア

光ディスクデータを使用する、白血球計数の多数の方法および関連アルゴリズムが、本明細書中でさらに詳細に記載される。これらの方法および関連アルゴリズムは、白血球の計数に限定されず、赤血球、白血球、ビーズ、および光学式読み取り機で検出され得る同様な光痕跡を発生する任意の他の物体(生体および非生体の両方)を含むが、これらに限定されない任意の型の細胞性物質の計数を行うのに容易に応用され得る。

#### 【0218】

例示を目的として、本発明に関連する方法およびアルゴリズムの以下の説明は、図54~図58を参照して記載されるとおり、白血球計数に関する。何か修飾することで、これらの方法およびアルゴリズムは、白血球と大きさが類似した他の型の細胞または物体を計数することに応用され得る。細胞計数法およびアルゴリズムのデータ評価態様は、本明細書中で一般的に記載されて、本発明の方法および装置に関連する背景を提供する。光バイオディスクから治験用データを獲得して処理する方法およびアルゴリズムは、一般的な広い応用性を有し、同一出願人による米国仮出願第60 / 2 9 1 , 2 3 3 号、表題「Variable Sampling Control For Rendering Pixelation of Analysis Results In Optical Bio-Disc Assembly And Apparatus Relating Thereto」(2001年5月16日出願)、(これは本明細書中に参照として援用される)、および上記の援用される米国仮出願第60 / 4 0 4 , 9 2 1 号、表題「Methods For Differential Cell Counts Including Related Apparatus And Software For Performing Same」に、より詳細に開示される。

#### 【0219】

以下の論考において、方法およびアルゴリズムの基本スキームが、簡単な説明と合わせて表される。図10に示されるとおり、生体検査試料の属性に関する情報は、検査試料との相互作用により修飾または調節された電磁放射ビームの形で、光バイオディスク110から読み出される。図2、図3、図4、図11、図13、および図15に関連して論考された反射型光バイオディスクの場合、戻りビーム154が生物試料についての情報を伝える。上記で記載されるとおり、そのような生物試料についての情報は、基本的に、入射ビームがフローチャンネル130または標的帯140内にあり、したがって試料と接触する場合にかぎり、戻りビームに含まれる。バイオディスク110の反射型実施形態において、戻りビーム154はまた、反射層142中または上で符号化される、またはそうでなければ図13および図14に示されるw o b b l e溝170で符号化される情報を伝え得る。当業者に明らかであるように、あらかじめ記録された情報は、対応する入射ビームが反射層142と接触する場合に限り、標的帯を持つ反射型ディスクの戻りビーム154に含まれる。そのような情報は、入射ビーム152が、情報保持反射層142が除去されてしまっているかそうでなければ存在しない領域にある場合、戻りビーム154に含まれない

。図 5、図 6、図 8、図 9、図 12、図 14、および図 16 に関連して論考された透過型光バイオディスクの場合、透過ビーム 156 が生物試料についての情報を伝える。

【0220】

続けて図 10 を参照して、生体検査試料についての情報は、それが反射型ディスクの戻りビーム 154 から得られるのであって、透過型ディスクの透過ビーム 156 から得られるのであって、信号処理用プロセッサ 166 に向けられる。この処理は、下部検出器 157 (反射型ディスク) または上部検出器 158 (透過型ディスク) で検出されたアナログ信号を不連続のデジタル型へ変換することを含む。

【0221】

次に図 54 を参照して、信号変換は、一定の時間間隔 212 でアナログ信号 210 をサンプリングし、信号の対応する瞬間アナログ振幅 214 を不連続の二進整数 216 として符号化することを含む。サンプリングは、ある開始時間 218 で開始されて、ある終了時間 220 で停止する。どのようなアナログからデジタルへの変換プロセスにも付随する 2 つの共通値は、サンプリング周波数およびビット深度である。サンプリング周波数 (サンプリングレートとも呼ばれる) は、単位時間あたりに取られるサンプル数である。サンプリング周波数が高いほど、連続する試料間の時間間隔 212 は小さくなり、このことは最初のアナログ信号 210 と比較してデジタル信号 222 のより高い忠実性をもたらす。ビット深度は、アナログ信号 210 のサンプリングされた振幅 214 を符号化するために各サンプリング点で使用されるビット数である。ビット深度が大きくなるほど、二進整数 216 は最初のアナログ振幅 214 をより良く近似するようになる。本実施形態において、1 試料あたり 12 ビットのビット深度でサンプリングレートは 8 MHz であり、0 ~ 4095 (0 ~ (2<sup>n</sup> - 1)) (ここで n はビット深度である) の整数試料範囲を可能にする。この組合せは、他の実施形態で必要な特定の精度に対応するために変更され得る。制限ではなく例として、一般に細胞よりも小さいビーズを計数する方法を含む実施形態において、サンプリング周波数を増加させることが望ましいかもしれない。次いで、サンプリングされたデータは、アナログからデジタルへの変換用プロセッサ 166 に送られる。

【0222】

アナログからデジタルへの変換の間、レーザー径路に沿った、各連続したサンプル点 224 は、連続して、ディスク上またはメモリ中に、一次元配列 (array) 226 として記憶される。各連続したトラックは、独立した一次元配列を与え、これが、画像に相似する二次元配列 228 (図 57A) をもたらす。

【0223】

図 55 は、本発明の光バイオディスク 110 の斜視図であり、示される切取り部分の拡大詳細斜視図は、光バイオディスクのトラック 232 に対して位置する捕獲された白血球 230 を示す。図示されるように、入射ビーム 152 の白血球 230 との相互作用は、反射型ディスクの戻りビーム 154 または透過型ディスクの透過ビーム 156 のいずれかの形で信号含有ビームをもたらす、これが、検出器 157 または 158 のいずれかで検出される。

【0224】

図 56A は、図 55 に示される、光バイオディスク 110 のトラック 232 に対して位置する白血球 230 の別のグラフ表示である。図 55 および図 56A に示されるように、白血球 230 は、約 4 つのトラック A、B、C、および D を覆う。図 56B は、図 55 および図 56A の白血球 210 に由来する一連の微量痕跡を示す。図 56B に示されるように、検出系は、トラック A、B、C、および D に対応する 4 つのアナログ信号 A、B、C、および D を提供する。図 56B にさらに示されるように、アナログ信号 A、B、C、および D のそれぞれは、白血球 230 についての特定の情報を運ぶ。したがって図示されるように、白血球 230 にまたがる走査は、入射ビームの明白な摂動をもたらす、これは検出および処理され得る。次いで、アナログ微量痕跡 (信号) 210 は、図 57A および図 57C に示されるように、相似するデジタル信号 222 への変換用プロセッサ 166 に向けられ、以下でさらに詳細に記載される。

10

20

30

40

50

## 【0225】

図57は、図57A、図57B、図57C、および図57D間の関連を示すグラフ表示である。図57A、図57B、図57C、および図57Dは、図56Bの微量痕跡のデジタル信号222への変換の絵によるグラフ表示であり、デジタル信号222は、一次元配列226として記憶され、組合わされてデータ入力244のための二次元配列228になる。

## 【0226】

ここで特に図57Aを参照して、図55および図56Aに示される光バイオディスクのトラックAおよびトラックBからサンプリングされたアナログ信号210が示される。次いで、プロセッサー166が、アナログ信号210の対応する瞬間アナログ振幅214を不連続の二進整数216に符号化する(図54参照)。得られる一連のデータ点がデジタル信号222であり、これはサンプリングされたアナログ信号210と相似である。

10

## 【0227】

次に図57Bを参照して、トラックAおよびトラックBからのデジタル信号222(図57A)は、独立した一次元メモリ配列226として記憶される。各連続したトラックは、対応する一次元配列を寄与し、これが先の一次元配列と組合わされると、画像に相似した二次元配列228をもたらす。次いで、デジタルデータは、試料範囲の特定の点での戻りビーム154または透過ビーム156(図55)の相対強度を表すサンプル点224(図54)の二次元配列228として、メモリ中またはディスク上に記憶される。ついで、二次元配列は、図57Bに表示されるように、生ファイルまたは画像ファイル240の形で、メモリ中またはディスク上に記憶される。次いで、画像ファイル240に記憶されたデータは、メモリへ読み出され242、図10に示される分析器168へのデータ入力244として使用される。

20

## 【0228】

図57Cは、図55および図56Aに示される光バイオディスクのトラックCおよびトラックDからサンプリングされたアナログ信号210を示す。次いで、プロセッサー166が、アナログ信号210の対応する瞬間アナログ振幅214を不連続の二進整数216に符号化する(図54)。得られる一連のデータ点がデジタル信号222であり、これはサンプリングされたアナログ信号210と相似である。

## 【0229】

ここで図57Dを参照して、トラックCおよびトラックDからのデジタル信号222は、独立した一次元メモリ配列226として記憶される。各連続したトラックは、対応する一次元配列を寄与し、これが先の一次元配列と組合わされると、画像に相似した二次元配列228をもたらす。上記のように、次いで、デジタルデータは、試料範囲の特定の点での戻りビーム154または透過ビーム156(図55)の相対強度を表すサンプル点224(図54)の二次元配列228として、メモリ中またはディスク上に記憶される。ついで、二次元配列は、図57Bに表示されるように、生ファイルまたは画像ファイル240の形で、メモリ中またはディスク上に記憶される。上記で示されるように、次いで、画像ファイル240に記憶されたデータは、メモリへ読み出され242、分析器168(図10)へのデータ入力244として使用される。

30

40

## 【0230】

本発明の計算および処理アルゴリズムは、分析器168(図10)に記憶され、入力データ244に適用されて有用な出力結果262(図58)を算出し、これはディスプレイモニター114(図10)に表示され得る。ここで図58を参照して、本発明の処理法および計算アルゴリズムによるデータ評価の主要な工程の論理流れ図が示される。本処理法の第1の主要な工程は、入力データ244の受取を含む。上記に記載されるとおり、データ評価は、0~4096の範囲の整数の配列で開始される。

## 【0231】

次の主要な工程246は、計数のためディスクの範囲を選択することである。いったんこの範囲が規定されると、次いで目標は、規定された範囲に含まれる全白血球の実際の計

50

数を行うことになる。工程 2 4 6 の実施態様は、ディスクおよび使用者の選択肢の構成に依存する。制限ではなく例として、図 2 および図 5 に示される標的帯 1 4 0 などの窓を持つディスクを使用する本発明の実施形態で、ソフトウェアは窓を認識して、分析および計数のためその一区分を刈り込む。好適な一実施形態において、図 2 に図示されるもののよう、標的帯または窓は、その各端に半円部分のある  $1 \times 2 \text{ mm}$  の長方形をしている。この実施形態において、ソフトウェアはそれぞれの窓の中の  $1 \times 2 \text{ mm}$  範囲の基準長方形を刈り込む。この実施形態の態様において、読み取り機は、複数の異なる窓で、細胞数を比較するために、複数の連続した試料値を取り得る。

#### 【0 2 3 2】

図 5、図 6、図 8、および図 9 に示されるように、窓のない透過型ディスクを使用する本発明の実施形態において、工程 2 4 6 は、2 つの異なる様式のうちの 1 つで行われ得る。基準長方形の位置は、その中心を一定の配置で点に対して位置決めすることによるか、または暗い染料の点である参照マーク 2 0 2 (例えば、図 2 4 L、図 2 5、および図 2 6 を参照) を見つけることによるかのいずれかで選択される。参照マーク 2 0 2 が用られる場合、所望のコントラストを持つ染料が、細胞のクラスター 2 つに対して、ディスク上の特定の位置 1 4 1 (例えば、図 2 0 E) に沈着する。次いで、光ディスク読み取り機は、細胞のクラスターのうち 1 つの中心にスキップして向けられ、次いで、基準長方形が選択されたクラスターの周囲に集中する。

#### 【0 2 3 3】

工程 2 4 6 に関して上記に記載される使用者の選択肢に関して、使用者は、マウスでの選択または他の方法で直接やりとりすることにより、細胞計数のための所望の試料範囲の形(長方形範囲など)を指定し得る。ソフトウェアの本実施形態において、これは、マウスを使用して、モニター 1 1 4 に表示される光バイオディスク由来の画像の所望の位置をクリックして長方形をドラッグすることを含む。評価範囲選択法に関わらず、それぞれ長方形範囲は次の工程 2 4 8 で計数するために評価される。

#### 【0 2 3 4】

図 5 8 の第 3 の主要な工程は、工程 2 4 8 であり、これはバックグラウンド照度均一化に関する。このプロセスは、あるハードウェア構成で引き起される可能性のあるバックグラウンド均一性の変動を補正する。バックグラウンド照度均一化は、バックグラウンド全体、または細胞がない画像部分が、任意のバックグラウンド値  $V_{\text{background}}$  である平面に近づくように、各サンプル点の強度レベルを補正する。 $V_{\text{background}}$  は基準長方形試料範囲にわたり平均値を取るようになっている方法で決定され得るものの、本実施形態においては、この値は 2 0 0 0 に設定される。選択された長方形試料範囲の各点 P での値 V は、数字 ( $V_{\text{background}} + (V - p$  の近傍にわたる平均値)) で置き換えられ、必要であれば切り捨てられて、値の事実上可能な範囲(本発明の好適な実施形態では 0 ~ 4 0 9 5) に合わせられる。近傍の大きさは、細胞の大きさよりも十分に大きく、かつ基準長方形の大きさよりも十分に小さいように選択される。

#### 【0 2 3 5】

図 5 8 の流れ図における次の工程は、規格化工程 2 5 0 である。規格化工程 2 5 0 の実行において、標準偏差 6 0 0 で平均が 2 0 0 0 になるように、基準長方形試料範囲のデータで線形変換が行われる。必要であれば、値は切り捨てられて 0 ~ 4 0 9 6 の範囲に合わせられる。この工程 2 5 0、ならびにバックグラウンド照度均一化工程 2 4 8 は、ソフトウェアを、ハードウェア修飾およびチューニングの影響を受けにくくする。制限ではなく例として、検出回路(上部検出器 1 5 8 (図 5 5) など)の信号利得は、得られる細胞計数に顕著に影響を与えることなく、変わり得る。

#### 【0 2 3 6】

図 5 8 に示されるように、フィルタリング工程 2 5 2 が次に行われる。基準長方形の各点 P について、工程 2 4 8 で示されるものより小さい大きさで、 $V_{\text{background}}$  と十分に識別される値を持つ、P 近傍の点の数が計算される。計算される点は、画像の細胞の大きさに近似するはずである。この数字が十分に大きい場合は、P での値はそのまま

10

20

30

40

50

である。そうでなければ、 $V_{background}$  に割り当てられる。このフィルタリング操作は、ノイズを除去するために行われ、最適な場合では、細胞のみが画像に残り、一方バックグラウンドは  $V_{background}$  に一様に等しい。

#### 【0237】

図58に示されるように、邪魔な成分を除去することに関する任意の工程254が行われ得る。不具合（引っ掻きキズ、気泡、埃、および他の似たような不整など）は、フィルタリング工程252を通り抜ける可能性がある。これらの不具合は、直接、または画像ヒストグラムの分布全体に影響を及ぼすことによるかのいずれかで、細胞計数エラーを引き起こし得る。一般的には、これら欠陥は、大きさが細胞よりも十分に大きいので、以下のように工程254で除去され得る。最初に、選択領域と同じ大きさのバイナリー画像を形成する。バイナリー画像のAを、原画像の対応する点での値が  $V_{background}$  に等しければ、白と定義し、その他は黒とする。次に、黒点の結合したコンポーネントを抽出する。次いで、続く減退および拡大を適用して成分の表示を一般化する。そして最後に、規定された閾値よりも大きい成分を除去する。この任意選択工程の一実施形態において、原画像の対応するサンプル点に  $V_{background}$  の値を割り当てることにより、成分は原画像から除去される。どの成分が計数対象を構成してどれが除去されるべきかを定める閾値は、使用者定義値である。この閾値はまた、計数される治験用特徴、すなわち白血球、赤血球、または他の生体物質に依存して、変更され得る。任意選択工程254後、工程248、工程250、および工程252は、好ましくは繰り返される。

10

#### 【0238】

図58に示される次の主要な処理工程は、工程256であり、これは、輝中心による細胞計数に関する。計数工程256は、複数のサブ工程からなる。これらのサブ工程の第一は、畳み込みを行うことを含む。この畳み込みサブ工程において、畳み込みピクチャ（convolved picture）として示される補助配列が形成される。点Pでの畳み込みピクチャの値は、Pの円形近傍でのフィルタリング後のピクチャの積分の結果である。より正確には、特定の一実施形態について、積分される関数は、 $v$  が2000より大きい場合に  $v - 2000$  に等しく、かつ  $v$  が2000より小さいかまたは等しい場合に0である、関数である。計数工程256で実行される次のサブ工程は、細胞の大きさほどの半径の近傍での畳み込みピクチャの極大を見つけることである。次に、お互いの閉ざされた近傍で同じ値を持つ同じ極大が回避される。計数工程256の最後のサブ工程において、残存する極大を、細胞をマークするとして表す。

20

30

#### 【0239】

ハードウェア構成によっては、ある細胞は輝中心なしで現れ得る。この場合、暗縁のみが可視化され、以下の2つの任意選択工程258および260が有用である。

#### 【0240】

工程258は、見いだした細胞をピクチャから除去することに関する。工程258において、輝中心および暗縁の両方を持つ細胞が2度見つけられないように、各見いだされた細胞の中心周りの円形領域は、値2000で埋め尽くされる。

#### 【0241】

工程260は、暗縁でさらに細胞を計数することに関する。工程258後、2つの変換が画像になされる。このルーチンの第一サブ工程、サブ工程(a)において、各点での値  $v$  は  $(2000 - v)$  で置き換えられ、結果が負の場合にはそれはゼロで置き換えられる。サブ工程(b)において、次いで、得られるピクチャを内部半径  $R_1$  および外部半径  $R_2$  のリングで畳み込みする。 $R_1$  および  $R_2$  は、それぞれ、細胞の最小および最大予想半径であり、続いてリングは、サブ工程(d)で左右および上下に移動させられる。サブ工程(c)において、4つの移動の結果が合計される。この変換後、暗縁細胞の画像は、4枚の花びらの花のようになる。最後に、サブ工程(d)で、サブ工程(c)で得られた関数の最大が、計数工程256で用いられるような様式で見つけられる。それらは、工程256で除外された細胞をマークするとして表される。

40

#### 【0242】

50

計数工程 256 後の、または任意に用いられた場合は計数工程 260 後の、図 58 に示される最後の主要な工程は結果出力工程 262 である。基準長方形中に見いだされた細胞数は、図 1 および図 5 に示されるモニター 114 に表示され、同定された各細胞は、表示される、光バイオディスク由来の画像上、赤十字でマークされる。

#### 【0243】

図 59 を参照して、白血球分析用の異なる捕獲帯を有する分析チャンバを示す絵図が描かれる。パフィーコートまたは白血球試料は、様々な方法（溶解、ポジティブまたはネガティブ選択、および勾配遠心分離、またはこれらの方法の任意の組合せを含む）により全血から単離される。試料調製に関するさらなる詳細は、以下の実施例 1、実施例 2、および実施例 3 に記載され、また、例えば、同一出願人による同時係属中の米国仮出願第 60 / 382, 319 号、表題「Methods For Isolation Of T-Lymphocytes For Use In Differential Cell Counting And Use Of Optical Bio-Disc For Performing Same」（2002 年 5 月 22 日出願）に開示される。この出願は、本明細書中にその全体が参照として援用される。いったん MNC またはパフィーコートが単離されると、次いで MNC は分析チャンバ中に導入され、ここで目的の細胞がそれぞれの捕獲剤と結合し、例えば、以下の実施例 7 で概要される手順に従って分析が行われる。

#### 【0244】

ここで図 60A および図 60B を参照して、赤血球および白血球の分析用の異なる捕獲帯を有する分析チャンバを示す絵図が図示される。図 60A は、赤血球 ABO 分析および CD マーカー 2、19、44、4、および 8 用捕獲帯を有するパフィーコート CD マーカーアッセイを示す。図 60B は、A、B、O、および Rh 表面マーカーに特異的親和性を持つ IgM 捕獲抗体を使用する、別の赤血球分析を示す。図 60B にはまた、試料として全血を使用する白血球分析も示される。このアッセイにおいて、白血球（T 細胞、B 細胞、好酸球、好塩基球、好中球、単球、およびリンパ球）は、特異的捕獲帯に捕獲され、捕獲された細胞数を同定および定量するために二次ゲートが使用される。目的の細胞を同定するために使用される二次ゲートは、ビーズの群であり、その各群は、独特の物理的特性、およびそれらに付着する細胞の型に特異的な信号剤を有する。物理的特性として、大きさ、形、質感、色、蛍光、および燐光が挙げられ得る。例えば、群 A のビーズは、それらに付着した抗 T 細胞信号抗原を有する 1 μm 黄緑（YG）蛍光ビーズであってもよい。次いで、群 A 細胞は、捕獲された T 細胞に特異的に結合し、それにより 1 μm YG 蛍光ビーズで T 細胞にタグ付けする。例えば、別の群のビーズ、すなわち群 B、それらに付着した単球に対する抗体を有する 2 μm 赤色蛍光ビーズが、単球にタグ付けするのに使用され得る。二次ゲートは、捕獲された細胞数のより正確な評価を可能にする、なぜならそれは特定の捕獲帯内の、目的の細胞のみをタグ付けして、非特異的に結合した細胞はタグ付けしないからである。目的の細胞をタグ付けするためのビーズまたは小球体の使用に関するさらなる詳細は、例えば、同一出願人による同時係属中の米国仮出願第 60 / 382, 944 号、表題「Methods and Apparatus for Use in Detection and Quantitation of Cell Populations and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same」（2002 年 5 月 24 日出願）に開示される。この出願は、本明細書中にその全体が参照として援用される。

#### 【0245】

次に図 61 を参照して、光バイオディスクを使用した CD マーカーアッセイの捕獲帯内の細胞濃度の関数として、血液試料からの、捕獲された CD4+ 細胞数を示すグラフが示される。グラフは、試料中の細胞数の増加に関連して細胞捕獲が増加することを示す。細胞は、2つの供給元からの CD4 抗体（DAKO からの抗体 A および Serotech からの抗体 B）を使用して捕獲された。グラフはさらに、両捕獲抗体を使用しての、類似した傾向および捕獲効率を示す。この実験の実行に続く実験手順に関するさらなる詳細は、以下の実施例 7 に記載される。

#### 【0246】

ここで図 62A および図 62B を参照して、本発明の光バイオディスクおよび FACS 分析を用いて分析された血液試料からの CD4 / CD8 比のデータ散布図を示す。これら

10

20

30

40

50

のグラフを作るのに使用されたデータは、以下の表 8 に示される。示されるデータの収集に続く実験手順に関する詳細は、以下の実施例 8 に論考される。

【 0 2 4 7 】

[ 実験の詳細 ]

本発明は図面を参照して詳細に記載されてきたが、本発明の特定の実施例およびさらなる図示が以下に表される。

【 実施例 1 】

【 0 2 4 8 】

図 1 7 A は、試料の調製、バイオディスクの使用、および結果の提供を示す絵による流れ図を図示し、結果は図 5 2 および図 5 3 に、より詳細に示される。以下の実施例の詳細（プロセス工程の各所要時間、回転速度、および他の詳細など）は、図 1 7 A、図 5 2、および図 5 3 を参照して上記で記載されたものよりも具体的である。とはいえ、本実施例の基本工程は、上記で記載されたものと同様である。

10

【 0 2 4 9 】

A . 基体調製および化学種堆積を含むディスク製造

この実施例において、反射型ディスクまたは透過型ディスク基体 1 2 0（それぞれ、図 2 および図 5）を、空気銃を使用してどのような埃粒子も除去してきれいにする。スピナーを使用して、ディスクを、イソプロパノールで 2 回リンスする。2%ポリスチレンをディスクにスピナーコーティングして、全体に非常に厚いコーティングを付ける。

【 0 2 5 0 】

20

次いで、化学種 (chemistry) を堆積させる。一実施形態は、3 工程堆積プロトコルを含み、これは以下をインキュベートする：ストレプトアビジン、30 分間インキュベートされる；ビオチン標識化第一抗体で、60 分間インキュベートされる；および第二捕獲抗体、30 分間インキュベートされる。第一抗体は、第二種（例えばマウス）の免疫グロブリン（例えば、I g G、I g E、I g M）の型に対して第一種（例えばヒツジ）で産生され得る。第二捕獲抗体は、特異的細胞表面抗原例えば、C D 4、C D 8）に対して第二種で産生される。工程は、加湿チャンバ中室温で、堆積の間に、洗浄工程および乾燥工程を用いて行われる。

【 0 2 5 1 】

1  $\mu$  l 比のリン酸緩衝食塩水中 1 m g / m l ストレプトアビジンを、各窓を覆って重ね、そして 30 分間インキュベートする。過剰なストレプトアビジンを、蒸留水を用いて洗い落とし、そしてディスクを乾燥させる。等体積のビオチン標識化抗マウス I g G（P B S 中 1 2 5  $\mu$  g / m l）と活性化デキストランアルデヒド（2 0 0  $\mu$  g / m l）とを組み合わせる。デキストランアルデヒド（D C H O）-ビオチン標識化抗マウス I g G を、各捕獲窓中ストレプトアビジンを覆って重ね、そして冷蔵庫中 60 分間または一晩インキュベートする。過剰な試薬を洗い落とし、そしてディスクをスピン乾燥させる。

30

【 0 2 5 2 】

図 4 7 に示されるとおり、これらのヒト細胞表面抗原に対するマウス I g G 抗体を使用して、多数の放射状に配向した、異なる検査（C D 4（窓 2）、C D 8（窓 3）、C D 3（窓 4）、および C D 4 5（窓 5）、ならびにネガティブコントロール（窓 6）など）につ

40

【 0 2 5 3 】

化学種体積のパターンを以下の表 5 に提示する。

【 0 2 5 4 】

【表 5】

窓	1-2	3-4	5-6	7-8
第一層	ストレプト アビジン	ストレプト アビジン	ストレプト アビジン	ストレプト アビジン
第二抗体	B-抗マウ ス I g G + DCHO	B-抗マウ ス I g G + DCHO	B-抗マウ ス I g G + DCHO	B-抗マウ ス I g G + DCHO
第一抗体	マウス-抗 ヒトCD4	マウス-抗 ヒトCD4	マウス-抗 ヒトCD4	マウス-抗 ヒトCD4

10

## 【0255】

## B. ディスクアセンブリ

打抜き部分（U-字型または「等半径(e-rad)」チャンネルなど）を持つ、例えば、25、50、または100ミクロンの厚さなどの接着層（図2および図5のチャンネル層118）を用いて、ディスクを組み立て、流体チャンネル、および透明キャップ116（図5、透過型ディスクで上部検出器を用いて使用するため）または捕獲帯を覆って配置される反射層142を持つキャップ116（図2、反射型ディスクで下部検出器を用いて使用するため）を作成する。

20

## 【0256】

一実施形態において、ディスクは、符号化情報層として300nmの金でコーティングされたforward Wobble Set FDL21:13707またはFDL21:1270CD-Rディスクである。反射型ディスクでは、大きさ2×1mmの長円形表示窓が、既知のリソグラフィ法により反射層にエッチングされる。透過型ディスクの設計によっては、別々の表示窓はエッチングされずに、ディスク全体が利用可能となる。この特定の実施例において、チャンネル層は、Fraylock adhesive DBL 201 Rev C 3M94661で形成される。カバーは、半径26mmで等間隔に配置された48個の直径0.040インチの試料入口を持つ透明ディスクである。データディスクは、CD4/CD8計数ソフトウェアを使用して、速度4x、および試料速度2.67MHzでソフトウェアで走査および読み取りされる。

30

## 【0257】

## C. ディスク漏れチェック

血液が分析されるため、チャンバのいずれも、ディスクの回転中にin situで試料を漏らさないことを確実にするために、最初にディスクの漏れがチェックされ得る。各チャンネルに、遮断剤（スタビルガードおよびPBS-Tweenなど）を満たす。遮断は、少なくとも1時間である。ディスクを5000rpmで5分間回転させて、漏れ検査およびディスク安定性を点検する。漏れをチェックした後、ディスクを真空チャンバに24時間置く。24時間の真空吸引後、ディスクを真空ポーチに入れて、使用するまで冷蔵庫に貯蔵する。

40

## 【0258】

## D. 試料の収集、調製、およびディスクへの塗布

以下の段落は、試料処理工程に関し、これは概して図17Aに示される。単核細胞(MNC)を、密度勾配遠心分離法により（例えば、Becton Dickinson CPT Vacutainerを使用して）精製する。血液（4~8ml）を、4mlまたは8mlのEDTA含有CPT Vacutainerに直接採取する。管を、バイオハザード遠心分離機中、水平回転機およびスイングアウトパケットを用いて、室温で25分間、1500~1800×gで遠心分離する。血液は、好ましくは採取から2時間以内に使用される。遠心分離後、単核細胞分画の上層をなす血漿を除去し、MNC層上に約2mmの血漿を残す。MNCを集めてPBSで洗浄する。室温で10分間、300×gで遠心

50

分離することにより細胞をペレットにする。上清を除去し、そして管を穏やかに叩いてMNC含有ペレットをPBS中に再懸濁させる。室温で各10分間、 $300 \times g$ で1回より多い洗浄を行い血小板を除去する。最終ペレットを、 $10,000$ 細胞/ $\mu\text{l}$ の細胞数に再懸濁する。 $18 \mu\text{l}$ 体積のMNCを、1つまたは複数の分析チャンバまたはチャンネルへ導入して、ディスクステーションナリーで、室温で15分間インキュベートする。チャンネルを密閉する。次いで、ディスクドライブを使用して、ディスクを $3000 \text{rpm}$ で3~4分間回転させる。ディスクは、好ましくは、速度 $4 \times$ 、および試料速度 $2.67 \text{MHz}$ でソフトウェアで走査および読み取りされる。

#### 【0259】

血液試料をただちに処理することができない場合、最初の遠心分離後、単核細胞を、CPT管を数回穏やかに反転させることで血漿中に再懸濁させて、室温で24時間まで貯蔵することが可能である。24時間内であれば、血漿中の細胞は、上記で記載されるとおり、収集され洗浄され得る。

10

#### 【0260】

##### E. CD4 / CD8 アッセイフォーマット

この実施例のアッセイは、CD4 + および CD8 + T - リンパ球母集団の絶対数および血液試料中のCD4 + / CD8 + リンパ球の比の迅速な決定のための包括的均一固相細胞捕獲アッセイである。CD-ROMに組込まれた小チャンバ内で実行される検査は、全血から単離された $7 \mu\text{l}$ の単核細胞(MNC)で、捕獲帯の特異的抗体により捕獲された、CD4 +、CD8 +、CD2 +、CD3 +、およびCD45 + 細胞の数を求める。検査は、ディスクの特定位置での局所的細胞捕獲の原則に基づく。複数の特異的細胞捕獲帯が、特定血液細胞表面抗原に対するモノクローナル抗体またはポリクローナル抗体に基づく捕獲化学種の局所的塗布により、ディスクに作成される。チャンバをMNC血液( $30,000$ 細胞/ $\mu\text{l}$ )で溢れされることで、CD4、CD8、CD2、CD3、およびCD45抗原を発現する細胞が、ディスクの捕獲帯に捕獲される。同じくバーコード内に組込まれるのは、規定されたネガティブコントロール範囲である。

20

#### 【0261】

##### F. オンディスク分析

上記の工程Dで調製されたMNC細胞(PBS中 $18 \mu\text{l}$ )、をディスクチャンバに注入し、そしてチャンバの入口および排出口を密閉する。ディスクを、室温で15分間、インキュベートし、次いで上部検出器を用いて光学ドライブ中 $780 \text{nm}$ レーザーを使用して走査し、上記で記載されるとおり、捕獲場を画像化する。

30

#### 【0262】

ソフトウェアはディスク上に符号化されており、以下の作用を自動的に実行するようにドライブに指示する：(a) 1つまたは複数の段階で、ディスクを遠心分離して過剰な未結合細胞をはじき出す、(b) 特定捕獲窓を画像化する、そして(c) 各捕獲帯に特異的に捕獲された細胞の計数およびCD4 / CD8比の振り分け(またはどの比が決定されるようにプログラミングされているか)を含むデータの処理を行う。

#### 【0263】

処理工程の間、認識ソフトウェアは、各捕獲帯画像を縦断して読み取り、そしてそれが遭遇した細胞をマークする。例えば、CD4 + および CD8 + 細胞数の見積もりに続いて、ソフトウェアは、CD4 + / CD8 + 細胞比を計算し、そして全血1マイクロリットルあたりの、CD4 +、CD8 +、CD3 +、およびCD45 + 捕獲帯中の細胞の絶対数、および同じくCD4 + / CD8 + 比の両方を表示する。ディスクを光学ドライブに挿入してから個数および比を得るまで、プロセス全体で、約12分かかる。

40

#### 【0264】

##### G. 使用される試薬

ストレプトアビジン(Sigma, cat. # S - 4762) : 脱イオン水を加えて $5 \text{mg} / \text{ml}$ 溶液を作り、分取して $-30$  で貯蔵する。使用するために、Tris緩衝液を加えて最終濃度 $1 \text{mg} / \text{ml}$ にする。

50

ポジティブコントロール：CD45 (Sigma、Lot # 038H4892、cat # C7556)。2～8 で貯蔵。

二次捕獲抗体：ビオチン標識化抗マウスIgG (ヒツジで産生、Vector Laboratories、lot # L0602、Catalog # BA-9200) 蒸留水で作成された貯蔵溶液 1.5 mg/ml。作用 b-IgG 溶液、0.1 MPBS 中 125 μg/ml。2～8 で貯蔵。長期貯蔵には、-30 で保存し得る。

アルデヒド活性化デキストラン (Pierce、lot # 97111761、cat # 1856167)。貯蔵溶液、PBS 中 5 mg/ml、2～8 で貯蔵。

一次捕獲抗体：CD4 (DAKO、cat # M0716)、CD8 (DAKO、cat # M0707)、CD2 (DAKO、cat # M720)、CD45 (DAKO、cat # M0701)、CD14 (DAKO、cat # M825)、および CD3 (DAKO、cat # M7193)。2～8 で貯蔵。

ネガティブコントロール：マウス IgG1 (DAKO、cat # X0931)。2～8 で貯蔵。

リン酸緩衝食塩水 (PBS)、pH 7.4 (Life Technologies / Gibco BRL、cat # 10010-023)、または同等物。室温で貯蔵。

イソプロピルアルコール、90～100%

#### 【0265】

##### H. RBC 溶解プロトコル

###### 塩化アンモニウム溶解緩衝液

1×貯蔵の塩化アンモニウム溶解緩衝液は、2～8 で貯蔵されるべきである。0.155 M の NH<sub>4</sub>Cl、10 mM の KHCO<sub>3</sub>、および 0.1 mM の EDTA 二ナトリウムからなる；pH 7.3～7.4。2～8 で貯蔵。使用前に室温に戻す。

#### 【0266】

##### 手順

1. 100 μl 毎の血液に 2 ml の溶解緩衝液を加える。(バイオハザードフード中でこの手順を行うことが望ましい。)

2. ボルテックスし、そして室温で 15 分間インキュベートする。

3. バイオハザードフード中、遠心分離機を使用して、血液を、室温で、5 分間 500 × g で遠心分離する。

4. 上清を除去し、そして細胞を PBS 中 2% の FCS または FBS で洗浄する。細胞を遠心分離する。

5. WBC の全量を計数して、試料注入用に WBC の最終濃度を 10,000 細胞/μl にする。

#### 【実施例 2】

#### 【0267】

##### 単核細胞分離手順

Becton and Dickinson Vacutainer CPT (BD catalog # 362760 (4 ml のもの)、# 362761 (8 ml のもの))、クエン酸ナトリウム入り細胞調製管、を使用する。全てのバイオハザード対策に従って、手順をバイオハザードフード中行う。工程：

1. 血液を直接 4 ml または 8 ml の EDTA 含有 CPT Vacutainer に採取する。血液試料が既に抗凝固剤中にある場合、最初に Vacutainer 中の EDTA を流し出し、ついで 6～8 ml の血液試料を CPT 管に注ぐ。

2. バイオハザード遠心分離機中、水平回転機およびスイングアウトバケットを用いて、室温で 25 分間、1500～1800 × g で管を遠心分離する。最良の結果のためには、血液は採取の 2 時間以内に遠心分離されるべきである。しかしながら、2 時間以降の血液も、MNC 数が減少して RBC 混入が増大しつつ遠心分離され得る。

3. 遠心分離後、MNC 層上に約 2 mm の血漿を残して、血漿を除去する。白色がかった単核層を収集して 15 ml のコニカル遠心管に移す。

4. 10 ~ 15 ml の P B S を M N C 層へ加え、遠心管を数回反転させることにより細胞を穏やかに混合する。

5. バイオハザード遠心分離機中、室温で10分間、200 × g で遠心分離することにより細胞を洗浄する。

6. 上清を除去する。管を穏やかに叩いて細胞を再懸濁させる。

7. 10 ml の P B S 中でもう一度洗浄する。室温で10分間、200 ~ 300 × g で遠心分離することにより血小板を除去する。

8. 上清を除去し、ペレットを50 ul の P B S 中に再懸濁させる。

9. 試料中の細胞数を見積もる。C B C を実行するか、または2 ul の細胞を18 ul のトリパンブルーに希釈し、穏やかに混合して、血球計数器で細胞を計数する。分析用に、  
10

10. 細胞をただちに処理することができない場合、最初の遠心分離（上記の工程2）後、単核細胞を、C P T 管を数回穏やかに反転させることで分離した血漿中に再懸濁させて、室温で24時間まで貯蔵する。24時間内であれば、血漿中の細胞は、上記で記載されるとおり、収集され、続いて洗浄される。

1 ul 当たりの全細胞数 = 25 の小正方形の細胞数 × (倍) 100。

#### 【実施例3】

##### 【0268】

ヒストパック - 1077 を使用する全血からの M N C S 分離

1 ml のヒストパック - 1077 を 15 ml の遠心管に入れ、そして1 ml の全血をその上に静かに重ねる。次いで、室温で30分間、400 × g で遠心分離する。パスツールピペットで混合物を注意深く吸引し、そして不透明な界面を遠心管に移した。次いで、10 ml の P B S を遠心管に添加した。次いで、溶液を10分間、250 × g で遠心分離した。上清をデカントし、そして細胞ペレットを10.0 ml P B S 中に再懸濁させて、10分間、250 × g で回転させた。次いで、10 ml の P B S 中にペレットを再懸濁させて250 × g で回転させることにより、細胞をもう一度洗浄した。最終的な細胞ペレットを、0.5 ml の P B S 中に再懸濁させた。

#### 【実施例4】

##### 【0269】

ディスク調製および化学種堆積

A. 基体調製および化学種堆積を含むディスク製造

この実施例において、空気銃を使用して埃を除去することにより、透過型ディスク基体を清浄にした。次いで、ディスクをスピンコーターにマウントし、一定流のイソプロパノールで2回リンスした。次いで310 ml のトルエンおよび65 ml のイソプロパノールに溶解した2%ポリスチレンを含むポリスチレン溶液をディスク上に均一にコーティングした。

##### 【0270】

二次抗体堆積については、活性化デキストランアルデヒド（P B S 中 200 ug / ml ）の新しい溶液を等体積のベクター I g G （P B S 中 125 ug / ml ）と混合させた。手動ピン堆積を用いて、約1 ul の I g G + D C H O 複合体を、ディスク上の各捕獲帯に堆積させた。ディスクを、加湿チャンバ中60分間インキュベートした。過剰な抗体を脱イオン（D.I.）水で洗い落とし、そしてディスクをスピン乾燥させた。

##### 【0271】

一次抗体については、D A K O C D 4 を P B S 中 50 ug / ml に希釈し、D A K O C D 8 を P B S 中 25 ug / ml に希釈し、そして D A K O C D 4 5 を P B S 中 145 ug / ml に希釈した。手動ピンアプリケーションを用いて、約1 ul の各一次抗体を、吸着された二次抗体の頂部に堆積させた。加湿チャンバ中30分間インキュベートした。過剰な抗体を P B S で洗い落とし、そしてディスクをスピン乾燥させた。

##### 【0272】

B. ディスクアセンブリ

10

20

30

40

50

使用したカバーディスクは、透明で、その上に取り付けられた Fraylock 接着チャンネル層を持つ。接着層を4つのU-字型チャンネルに打抜いて流体回路を作成した。流体チャンネルが抗体帯を覆うようにして、カバーを透過型ディスク基体上に置いた。次に、ディスクを一緒に固定するために、それらをディスクプレスに8回通した。

【0273】

#### C. ディスク漏れチェック、遮断

各流体チャンネルに、スタビルガードを満たし、そして1時間インキュベートした。インキュベーション中、ディスクをスピニング中5000rpmで5分間回転させた。回転後、漏れについてディスクチャンネルを点検した。次に、スタビルガードをチャンネルから吸引し、そしてディスクを真空チャンバ中一晩真空下に置いた。翌朝ディスクを真空ポーチに入れて、4で貯蔵した。

【実施例5】

【0274】

#### リンパ腫細胞株

##### A. 細胞株の記載

細胞株は、SUP-TIの名称を持つヒトT細胞リンパ腫である。ATCC cat # は CRL-1942である。この株は、T-LLを持つ8歳児の悪性胸水から収集された悪性細胞に由来するものであった。細胞は、複数のT系列マーカーを発現する。抗原発現は、CD1a+、CD3+、CD4+、CD5+、およびCD8+である。10% FBSを含むRPMI媒体の2週間ごとの添加および交換により、培養物は、 $2 \times 10^5 \sim 2 \times 10^6$  細胞/mlの間に維持される。培養物は懸濁液であり、これは5% CO<sub>2</sub> 雰囲気中37で水平にインキュベートされる。

【0275】

##### B. SUP-TI調製

血球計数器を使用して細胞濃度を見積もる。遠心分離して過剰な上清を除去することにより、細胞を濃縮して所望の濃度にする。

【実施例6】

【0276】

#### リンパ腫細胞株を用いたディスクチェック

##### A. SUP-TI細胞での抗体検査

実施例4に従って、25um接着/チャンネル層を用いてディスクを調製した。SUP-TI細胞濃度を、血球計数器を使用して決定した。細胞を30,000細胞/ulに濃縮した。それらを分析ディスクの2つのチャンネルに注入した。15分後、ディスクを3000rpmで5分間遠心分離した。捕獲帯に捕獲された細胞について光学顕微鏡写真を取り、そして細胞を計数した。この実験からの結果を以下の表6に示す。

【0277】

【表6】

捕獲帯に捕獲されたSUP-TI細胞数

チャンネル#	CD4	CD8	CD45
1	3160	3200	3400
2	3264	3144	3008

【実施例7】

【0278】

#### 血液試料のCDマーカー検査

##### A. 臨床血液試料の調製

12mlの血液(試料#176)を、午前10:00にEDTA管に引入れた。午後12:00、3mlの血液を、4x15ml管中、3mlのヒストパック1077上に重ねた。管を、室温で30分間、400xgで遠心分離した。遠心分離後、0.5cmの不透

明MNC層内の上部血漿を、吸引して除いた。残存する不透明MNC層をきれいな15ml管に移して、12mlのPBSを添加した。残りの3本の管についてもこれを繰り返した。

【0279】

洗浄

次いで、細胞懸濁液を250×gで10分間遠心分離した。次いで、上清を、吸引して除いた。そして細胞を14mlのPBSに再懸濁させた。再度、懸濁液を250×gで10分間遠心分離した。上清を吸引して除き、そして各細胞ペレットを175ulのPBSで再懸濁させた。次いで、4つのMNC懸濁液を全て合わせて、Cell Dyne 1600細胞計数器でCBCを走らせることにより細胞濃度を決定した。最終体積は、650ulで、濃度が23.5K細胞/ulであった。次いで、6回の連続希釈を行い、最終的に、以下の表7に示される、1000細胞/ul~100,000細胞/ulの範囲の濃度にした。

10

【0280】

B. DAKOおよびSerotec製CD4抗体の比較

100um接着層を使用して、それぞれ6つのチャンネルを持つ2枚のディスク(#338および339)を、実施例4に従って作成した。別のSerotec製一次CD4抗体(50ug/ml、cat#LN1298)もまた、この実施例で使用された。

【0281】

ディスク338の各チャンネルに試料176の一連の希釈を注入した。15分後、ディスクを3000rpmで5分間遠心分離した。化学種帯に捕獲された細胞の光学顕微鏡写真を取り、そして細胞計数ソフトウェア(Metamorph)を使用して、細胞を計数した。あるいは、捕獲された細胞数は、光ディスク読み取り機および付随するソフトウェアを使用して評価され得る。ディスク339についてはこの手順であった。DAKO CD4化学種帯に捕獲された細胞数を、Serotec CD4化学種帯に捕獲された細胞と比較した。この実験から集められたデータは、表7に、および図61に示される。

20

【0282】

【表 7】

DAKOおよびSerotec CD4 捕獲抗体を使用して捕獲された細胞							
試料 176	CD4 D a k o	CD4 D a k o	CD4 D a k o	CD4 S e r o t e c k	CD4 S e r o t e c k	CD4 S e r o t e c k	CD4 S e r o t e c k
細胞濃度	ディスク 33 8	ディスク 33 9	平均	ディスク 33 8	ディスク 33 9	平均	平均
1,000細胞 /ul	76	59	68	71	49	60	
5,000細胞 /ul	282	211	247	287	273	280	
10,000細胞 /ul	559	526	543	530	525	528	
25,000細胞 /ul	1168	1205	1187	1015	1040	1028	
50,000細胞 /ul	2459	2595	2527	1726	1981	1854	
100,000細胞 /ul	3686	3835	3761	3513	3372	3443	

10

20

30

40

## 【実施例 8】

## 【0283】

ディスク CD4 / CD8 対 FACS CD4 / CD8 比の比較

臨床試料 (番号 154、156、157、159、および 175) を、実施例 7 と同様に調製し、それぞれ 3 ml の血液のみを使用し、最終試料濃度は、10,000 細胞 / u

50

1であった。

【0284】

ディスク（番号272、275、276、267、および327）を、100um接着チャンネルを使用して、実施例4と同様に調製した。

【0285】

各試料を、以下の表8に示されるとおり、それぞれ対応するディスクに注入した。15分後、ディスクを3000rpmで5分間遠心分離した。化学種帯に捕獲された細胞の光学顕微鏡写真を取り、そして細胞を計数した。各臨床試料には、FACS分析も行われた。この実験からの結果は、下記の表8に、ならびに図62Aおよび図62Bに示される。

【0286】

【表8】

光バイオディスクおよびFACを使用した、血液のCD4/CD8比

ディスク#	試料#	ディスクCD4 /CD8	FAC CD4 /CD8
272	154	0.32	0.48
275	156	0.99	0.87
276	157	2.68	2.46
267	159	1.48	1.65
327	175	1.18	1.32

【0287】

記載のまとめ

本明細書中開示される装置、方法、およびプロセスに関連する本発明の態様はまた、以下にも記載され、これらは全て本明細書中に参照により援用される：米国仮出願第60/323,682号、表題「Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Blocking Agents」（2001年9月20日出願）、米国仮出願第60/324,336号、表題「Methods for Reducing Bubbles in Fluidic Chambers Using Polyvinyl Alcohol and Related Techniques for Achieving Same in Optical Bio-Discs」（2001年9月24日出願）、米国仮出願第60/326,800号、表題「Sealing Methods for Containment of Hazardous Biological Materials within Optical Analysis Disc Assemblies」（2001年10月3日出願）、米国仮出願第60/328,246号、表題「Methods for Calculating Qualitative and Quantitative Ratios of Helper/Inducer-Suppressor /Cytotoxic T-Lymphocytes Using Optical Bio-Disc Platform」（2001年10月10日出願）、米国仮出願第60/386,072号、表題「Quantitative and Qualitative Methods for Characterizing Cancerous Blood Cells Including Leukemic Blood Samples Using Optical Bio-Disc Platform」（2001年10月19日出願）、米国仮出願第60/386,073号、表題「Methods for Quantitative and Qualitative Characterization of Cancerous Blood Cells Including Lymphoma Blood Samples Using Optical Bio-Disc Platform」（2001年10月19日出願）、米国仮出願第60/386,071号、表題「Methods for Specific Cell Capture by Off-Site Incubation of Primary Antibodies with Sample and Subsequent Capture by Surface-Bound Secondary Antibodies and Optical Bio-Disc Including Same」（2001年10月26日出願）、米国仮出願第60/344,977号、表題「Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping」（2001年11月7日出願）、ならびに米国仮出願第60/349,975号、表題「Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Charged Matter Including Heparin, Plasma, or Poly-Lysine」（2001年11月9日出願）。

【0288】

本発明は、ある好適な実施形態および技術的实施例を参照して詳細に記載されてきたが、本発明はそれらのまさにその実施形態または実施例に限定されないことが理解されるべきである。むしろ、本発明を実行するための現在の最良の形態を記載する本開示の観点から、多くの修飾および改変が、本発明の範囲および精神から逸脱することなく、当業者に明らかになるだろう。それゆえ、本発明の範囲は、上記の記載によってではなく、添付の特許請求の範囲により示される。特許請求項の意味および等価範囲に入る全ての変更、修飾、および改変は、その範囲内にあると判断されるはずである。

【図面の簡単な説明】

【0289】

【図1】本発明によるバイオディスクシステムの絵図である。 10

【図2】本発明とともに利用される反射型バイオディスクの分解斜視図である。

【図3】図2に示されるディスクの平面図である。

【図4】図2に図示されるディスクの、ディスクの異なる層を示す切欠断面の斜視図である。

【図5】本発明とともに利用される透過型バイオディスクの分解斜視図である。

【図6】図5に示されるディスクの、ディスクの半反射層の機能的態様を示す切欠断面の斜視図である。

【図7】金薄膜の厚さと透過との間の関連を示すグラフ表示である。

【図8】図5に示されるディスクの平面図である。

【図9】図5に図示されるディスクの、図6に示される半反射層の型を含むディスクの種々の層を示す切欠断面の斜視図である。 20

【図10】図1のシステムをより詳細に図示する透視図およびブロック図である。

【図11】図2、図3、および図4に示される反射型光バイオディスクの半径に対して垂直に取られた部分断面図であり、そこに形成されるフローチャンネルを示す。

【図12】図5、図8、および図9に示される透過型光バイオディスクの半径に対して垂直に取られた部分断面図であり、そこに形成されるフローチャンネルおよび上部検出器を示す。

【図13】図2、図3、および図4に示される反射型光バイオディスクの部分縦断面図であり、そこに形成されるw o b b l e溝を図示する。

【図14】図5、図8、および図9に図示される透過型光バイオディスクの部分縦断面図であり、そこに形成されるw o b b l e溝および上部検出器を図示する。 30

【図15】反射型ディスクの全厚さおよびその初期反射性を示す、図11と同様な図である。

【図16】透過型ディスクの全厚さおよびその初期反射性を示す、図12と同様な図である。

【図17A】本発明の方法を用いた血液試料分析を示す絵による流れ図である。

【図17B】図17Aに示されるディスクで使用する抗体の白血球との連結を示す、絵による詳細図である。

【図18】Aはストレプトアビジンの絵図である。 Bはビオチンの絵図である。

Cはストレプトアビジンおよびビオチンからなる架橋系の絵図である。 Dは二次抗体の絵図である。 Eはビオチン標識化二次抗体の絵図である。 Fは一次抗体の絵図である。 40

Gはビオチン標識化一次抗体の絵図である。 Hは4つのCD4表面抗原を示すCD4<sup>+</sup>細胞の絵図である。 Iは4つのCD8表面抗原を示すCD8<sup>+</sup>細胞の絵図である。 Jはアルデヒド活性化デキストランに結合した二次抗体を示す、絵図である。 Kは図18Jの絵による横断面図である。

【図19】Aは、本発明の第1の実施態様で、架橋系により基体へ結合した一次抗体による細胞捕獲を示す、絵図である。 Bは、本発明の第1の実施態様で、架橋系により基体に結合した一次抗体による細胞捕獲を示す、絵図である。 Cは、本発明の第1の実施態様で、基体に直接結合した一次抗体による細胞捕獲を示す、絵図である。 Dは、本発明の第1の実施態様で、基体に直接結合した一次抗体による細胞捕獲を示す、絵図で 50

ある。

【図20A】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図20B】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図20C】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図20D】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図20E】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。 10

【図20F】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図20G】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図20H】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図20I】本発明による架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第1の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図21】図20A～図20Iで示される反射型ディスクの、架橋系を使用しない代替的な実施形態である。 20

【図22】透過型ディスクフォーマットで実施される、図20A～図20Iで利用される捕獲化学種を示す。

【図23】Aは二次抗体に結合した一次抗体による細胞捕獲を示す絵図であり、二次抗体は、本発明の第2の実施態様で、架橋系により基体に結合している。 Bは二次抗体に結合した一次抗体による細胞捕獲を示す絵図であり、二次抗体は、本発明の第2の実施で、架橋系により基体に結合している。 Cは二次抗体に直接結合した一次抗体による細胞捕獲を示す絵図であり、二次抗体は、本発明の第2の実施態様で、架橋系により基体に直接結合している。 Dは二次抗体に直接結合した一次抗体による細胞捕獲を示す絵図であり、二次抗体は、本発明の第2の実施態様で、架橋系により基体に直接結合している 30

【図24A】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24B】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24C】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。 40

【図24D】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24E】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24F】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24G】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バ 50

イオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24H】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24I】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24J】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24K】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図24L】本発明による一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図25】図24A～図24Lで示される反射型ディスクの、架橋系を使用しない代替的な実施形態である。

【図26】透過型ディスクフォーマットで実施される、図24A～図24Lで利用される捕獲化学種を示す。

【図27】Aは二次抗体に結合した一次抗体による細胞捕獲を示す絵図であり、二次抗体は、本発明の第2の実施態様で、DCH鎖により基体へ結合している。Bは二次抗体に結合した一次抗体による細胞捕獲を示す絵図であり、二次抗体は、本発明の第2の実施態様で、DCH鎖により基体へ結合している。Cは、発明の第2の実施態様で、DCH鎖により基体へ直接結合している一次抗体による細胞捕獲を示す絵図である。

Dは、発明の第2の実施態様で、DCH鎖により基体へ直接結合している一次抗体による細胞捕獲を示す、絵図である。

【図28A】抗体-DCH複合体の調製を示す、絵による流れ図である。

【図28B】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図28C】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図28D】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図28E】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図28F】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図28G】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図28H】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図28I】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図28J】一次および二次抗体ならびにDCH鎖を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第2の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図29】図28B～図28Jに示される反射型ディスクの、二次抗体を使用しない代替的な実施形態である。

【図30】透過型ディスクフォーマットで実施される、図28B～図28Jで利用される

10

20

30

40

50

捕獲化学種を示す。

【図3 1 A】光バイオディスクの平面図であり、それぞれ複数の特異的細胞表面マーカー用捕獲帯およびネガティブコントロール帯を有する4つの流体回路を示す。

【図3 1 B】本発明の第3の実施態様で、架橋系により基体に結合した二次抗体による一次抗体 - 細胞複合体の捕獲を示す、絵図である。

【図3 1 C】本発明の第3の実施態様で、架橋系により基体に結合した二次抗体による一次抗体 - 細胞複合体の捕獲を示す、絵図である。

【図3 1 D】本発明の第3の実施態様で、基体に直接結合した二次抗体による一次抗体 - 細胞複合体の捕獲を示す、絵図である。

【図3 1 E】本発明の第3の実施態様で、基体に直接結合した二次抗体による一次抗体 - 細胞複合体の捕獲を示す、絵図である。 10

【図3 2 A】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図3 2 B】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図3 2 C】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図3 2 D】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図3 2 E】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。 20

【図3 2 F】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図3 2 G】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図3 2 H】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図3 2 I】架橋系を使用する、反射型バイオディスクの捕獲帯上への捕獲剤の堆積法の第3の実施態様の実施形態を示す、横断側面図である。

【図3 3】図3 2 A ~ 図3 2 Iに示される反射型ディスクの、架橋系を使用しない代替的な実施形態である。 30

【図3 4】透過型ディスクフォーマットで実施される、図3 2 A ~ 図3 2 Iで利用される捕獲化学種を示す。

【図3 5 A】光バイオディスクの平面図であり、それぞれ複数の異なる細胞表面マーカー用捕獲帯およびネガティブコントロール帯を有する4つの流体回路を示す。

【図3 5 B】反射型光バイオディスクの横断側面図であり、架橋系を使用する血液試料分析法の第1の実施態様の実施形態を示す。

【図3 5 C】反射型光バイオディスクの横断側面図であり、架橋系を使用する血液試料分析法の第1の実施態様の実施形態を示す。

【図3 5 D】反射型光バイオディスクの横断側面図であり、架橋系を使用する血液試料分析法の第1の実施態様の実施形態を示す。 40

【図3 6】図3 5 B、図3 5 C、および図3 5 Dに示される反射型ディスクの、架橋系を使用しない代替的な実施形態である。

【図3 7】透過型ディスクフォーマットで実施される、図3 5 B、図3 5 C、および図3 5 Dで利用される捕獲化学種を示す。

【図3 8】Aは反射型光バイオディスクの横断側面図であり、一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、血液試料分析法の第2の実施態様の実施形態を示す。 Bは反射型光バイオディスクの横断側面図であり、一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、血液試料分析法の第2の実施態様の実施形態を示す。 Cは反射型光バイオ

ディスクの横断側面図であり、一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、血液 50

試料分析法の第2の実施態様の実施形態を示す。

【図39】図38A、図38B、および図38Cに示される反射型ディスクの、架橋系を使用しない代替的な実施形態である。

【図40】透過型ディスクフォーマットで実施される、図38A、図38B、および図38Cで利用される捕獲化学種を示す。

【図41】Aは反射型光バイオディスクの横断側面図であり、一次および二次抗体ならびにDCHO鎖を使用する、血液試料分析法の第3の実施態様の実施形態を示す。Bは反射型光バイオディスクの横断側面図であり、一次および二次抗体ならびにDCHO鎖を使用する、血液試料分析法の第3の実施態様の実施形態を示す。Cは反射型光バイオディスクの横断側面図であり、一次および二次抗体ならびにDCHO鎖を使用する、血液試料分析法の第3の実施態様の実施形態を示す。

10

【図42】図41A、図41B、および図41Cに示される反射型ディスクの、二次抗体を使用しない代替的な実施形態である。

【図43】透過型ディスクフォーマットで実施される、図41A、図41B、および図41Cで利用される捕獲化学種を示す。

【図44A】一次抗体-細胞複合体の調製を示す、絵による流れ図である。

【図44B】反射型光バイオディスクの横断側面図であり、一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、血液試料分析法の第4の実施態様の実施形態を示す。

【図44C】反射型光バイオディスクの横断側面図であり、一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、血液試料分析法の第4の実施態様の実施形態を示す。

20

【図44D】反射型光バイオディスクの横断側面図であり、一次および二次捕獲抗体ならびに架橋系を使用する、血液試料分析法の第4の実施態様の実施形態を示す。

【図45】図44B、図44C、および図44Dに示される反射型ディスクの、架橋系を使用しない代替的な実施形態である。

【図46】透過型ディスクフォーマットで実施される、図44B、図44C、および図44Dで利用される捕獲化学種を示す。

【図47】本発明の実施形態によるバーコード技術を示すための、チャンバを有する光ディスクの絵図である。

【図48A】本発明の実施形態によるバーコードフォーマットを使用するアッセイから得られる結果の図である。

30

【図48B】CD4、CD8、およびコントロール領域に対応する顕微鏡およびディスク画像を示す。

【図49】本発明の方法および装置により得られ得る結果を示すための、顕微鏡およびディスク画像のより大きな表示を示す。

【図50】本発明の実施形態による画像認識の使用を図示する。

【図51】本発明の実施形態による画像認識の使用を図示する。

【図52】本発明の実施形態によるバーコードから予想される出力の画面ショットの例である。

【図53】本発明の実施形態による捕獲された細胞から利用可能な出力へ進行する方法を示す。

40

【図54】サンプリングされたアナログ信号から、一次元配列として記憶される対応するデジタル信号への変換の絵によるグラフ表示である。

【図55】バイオディスクのトラックに対して位置決めされた捕獲白血球が、入射ビームと相互作用した後に信号を含むビームをもたらすことを示す、指示された区域の拡大詳細図と合わせた光ディスクの斜視図である。

【図56】Aは、本発明による、光バイオディスクのトラックに対して位置決めされた白血球のグラフ表示である。Bは、本発明による、図56Aの白血球に由来する痕跡追跡のシリーズである。

【図57A】総合された場合に、図56Bからの痕跡追跡を一次元配列として記憶されるデジタル信号へ変換して、二次元配列へ組み合わせてデータ入力とする、絵によるグラフ

50

表示を形成する。

【図 5 7 B】総合された場合に、図 5 6 B からの痕跡追跡を一次元配列として記憶されるデジタル信号へ変換して、二次元配列へ組み合わせてデータ入力とする、絵によるグラフ表示を形成する。

【図 5 7 C】総合された場合に、図 5 6 B からの痕跡追跡を一次元配列として記憶されるデジタル信号へ変換して、二次元配列へ組み合わせてデータ入力とする、絵によるグラフ表示を形成する。

【図 5 7 D】総合された場合に、図 5 6 B からの痕跡追跡を一次元配列として記憶されるデジタル信号へ変換して、二次元配列へ組み合わせてデータ入力とする、絵によるグラフ表示を形成する。

【図 5 7 E】図 5 7 E は、図 5 7 A、図 5 7 B、図 5 7 C、および図 5 7 D 間の関連を図示するグラフ表示である。

【図 5 8】本発明に関連する処理法および計算アルゴリズムに従ってデータを評価する基本工程を表す論理流れ図である。

【図 5 9】白血球分析用の様々な捕獲帯を有する分析チャンバを示す、絵図である。

【図 6 0 A】赤血球および白血球の分析用の様々な捕獲帯を有する分析チャンバを示す、絵図である。

【図 6 0 B】赤血球および白血球の分析用の様々な捕獲帯を有する分析チャンバを示す、絵図である。

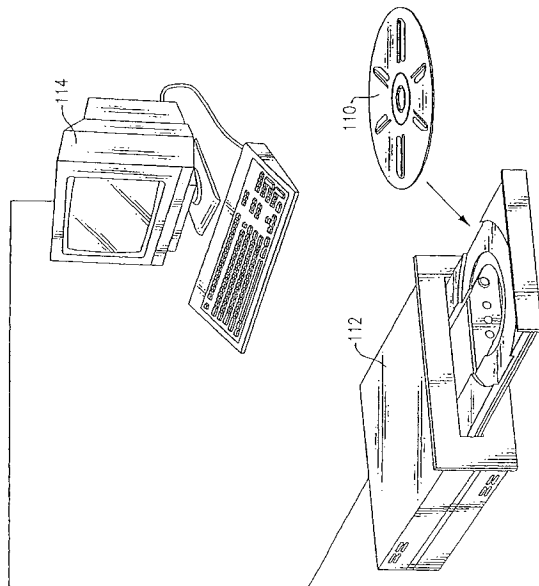
【図 6 1】本発明による光バイオディスクを使用する C D マーカーアッセイで、捕獲された C D 4 + 細胞数を細胞濃度の関数として示すグラフである。

【図 6 2】A は、本発明の光バイオディスクを使用して分析された血液試料からの C D 4 / C D 8 比を示すデータの散布図である。 B は、F A C S 分析を使用して分析された図 6 2 A と同じ血液試料からの C D 4 / C D 8 比を示すデータの散布図である。

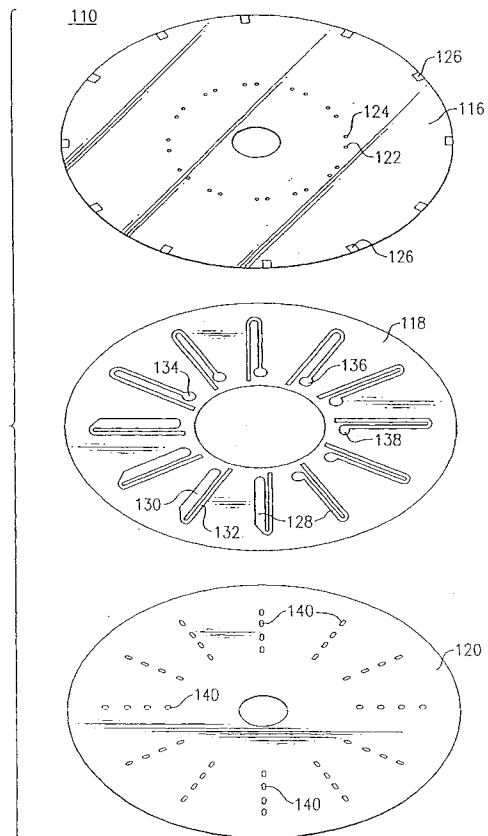
10

20

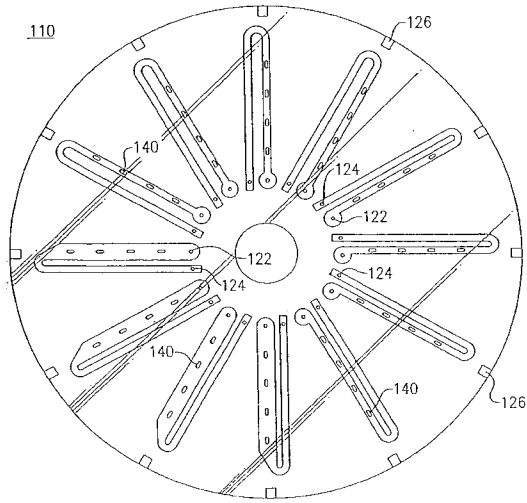
【図 1】



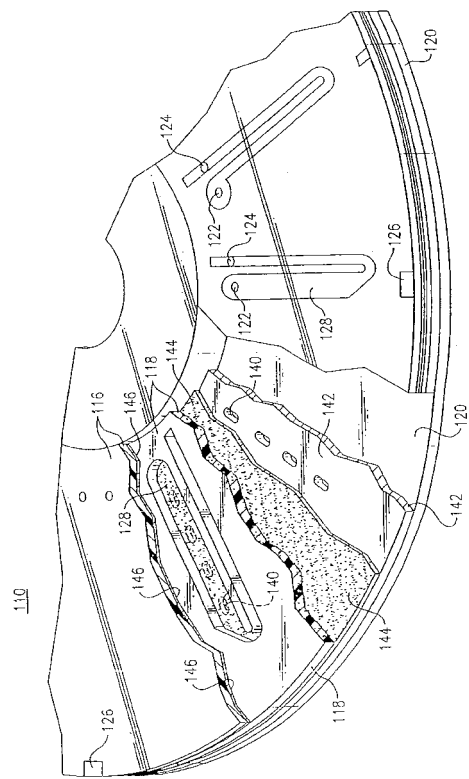
【図 2】



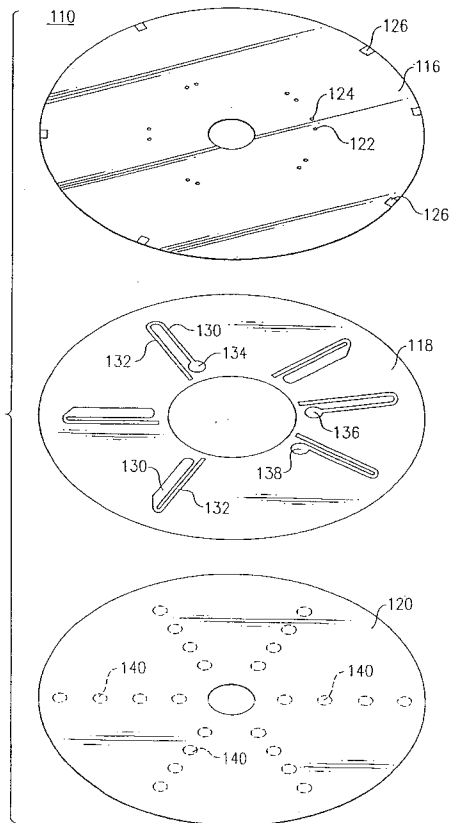
【図3】



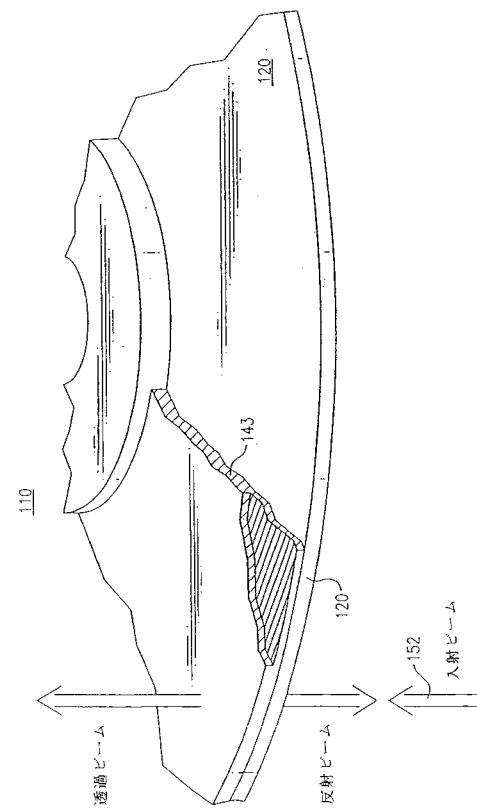
【図4】



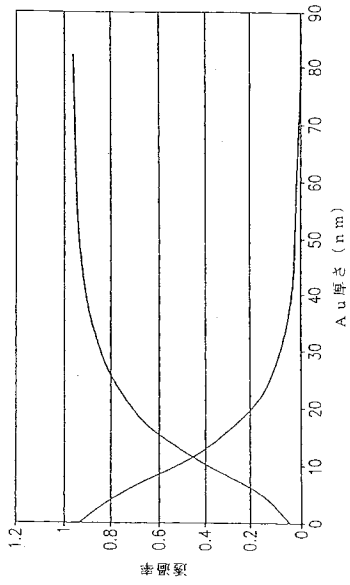
【図5】



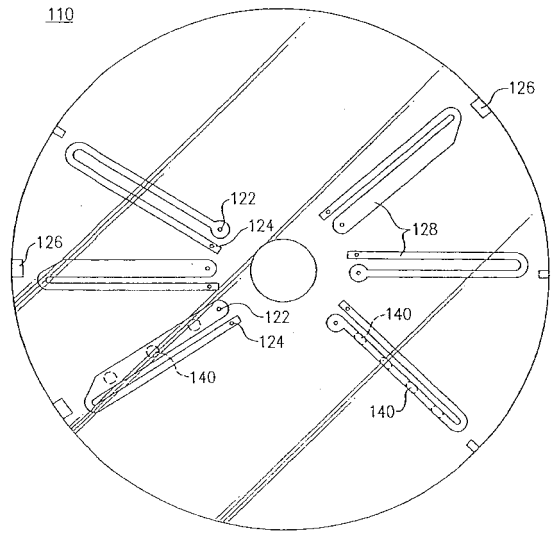
【図6】



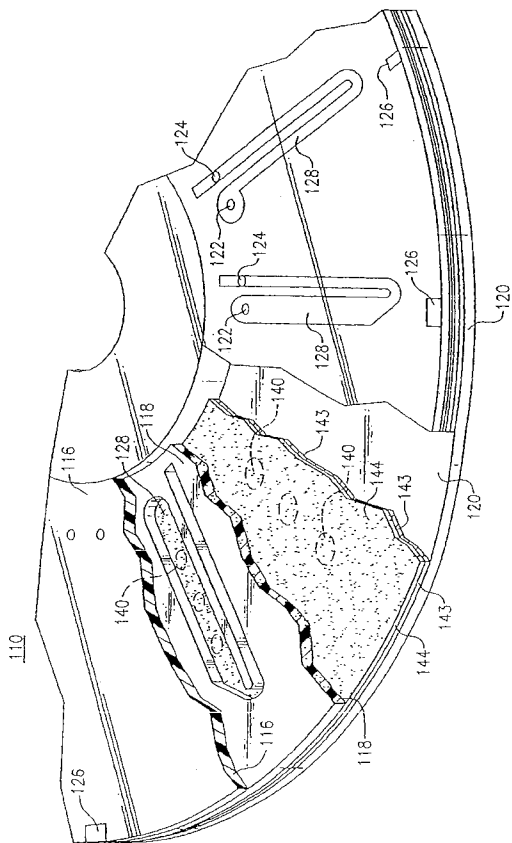
【図7】



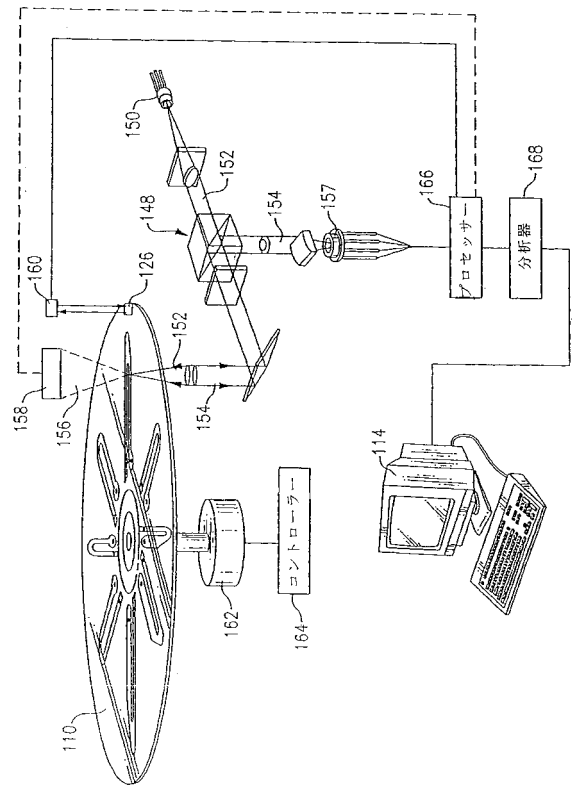
【図8】



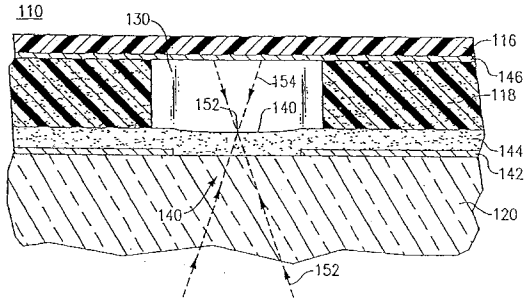
【図9】



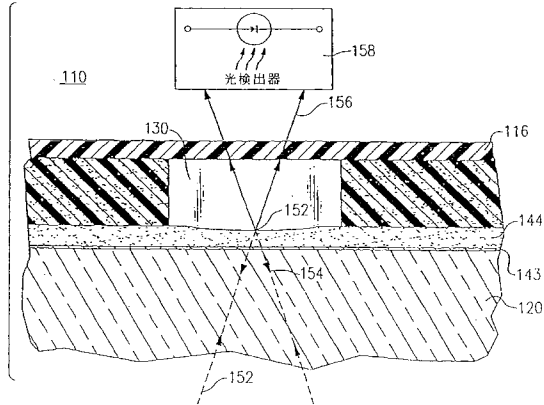
【図10】



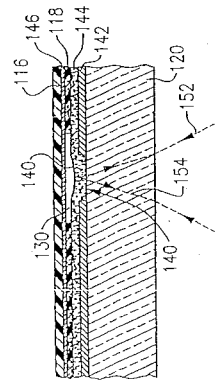
【図 1 1】



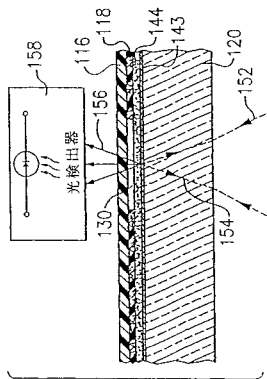
【図 1 2】



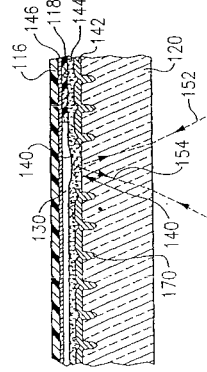
【図 1 5】



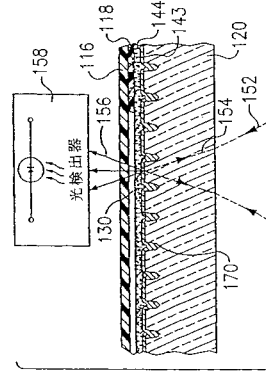
【図 1 6】



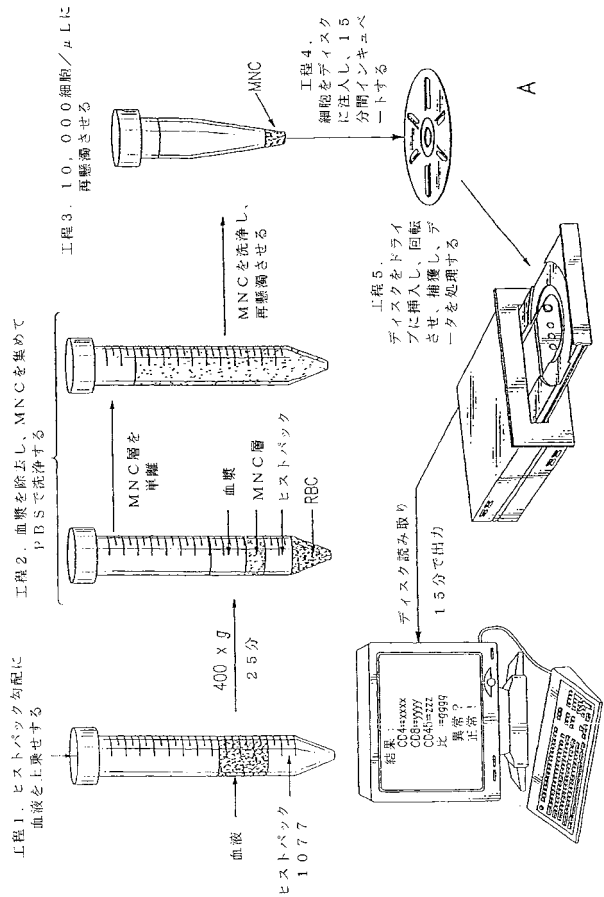
【図 1 3】



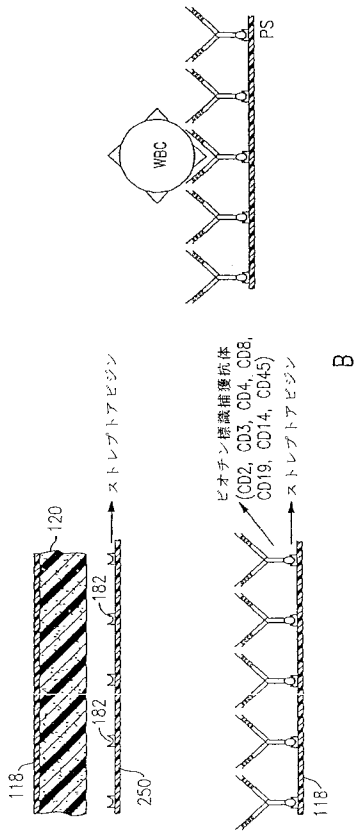
【図 1 4】



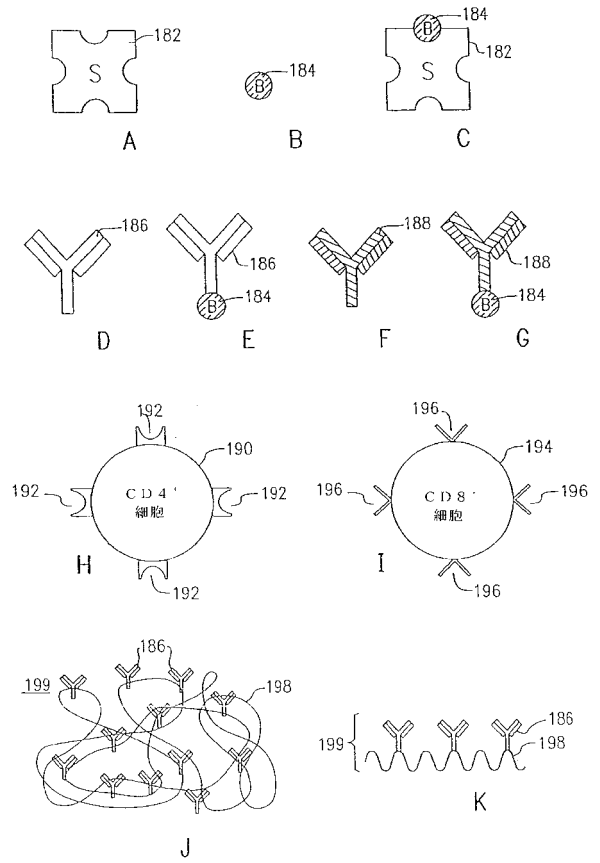
【図 1 7 A】



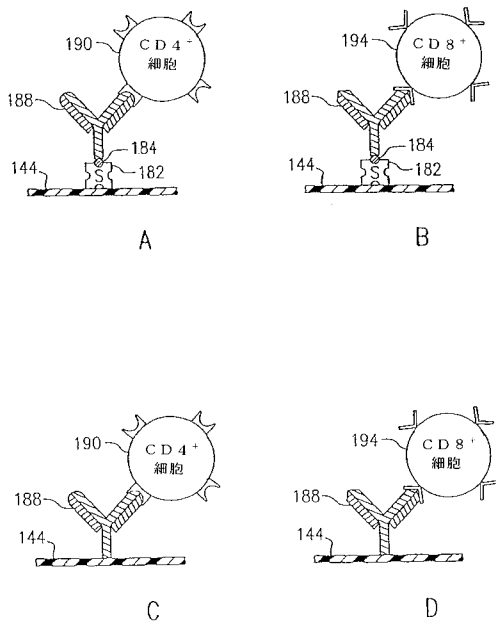
【図 17 B】



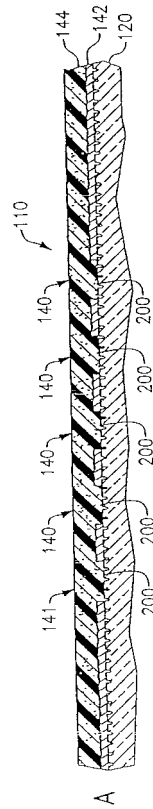
【図 18】



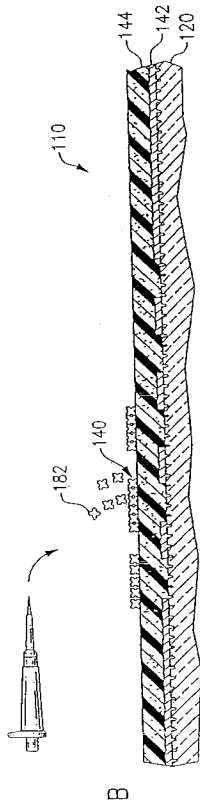
【図 19】



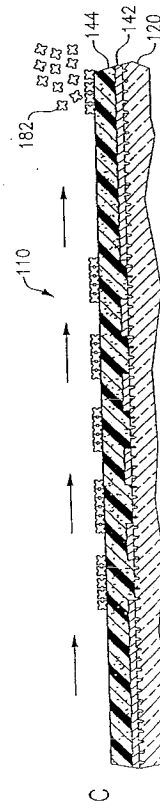
【図 20 A】



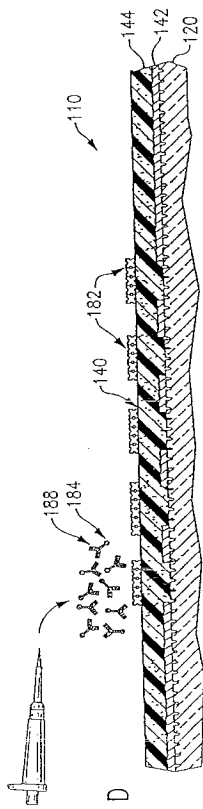
【図 20 B】



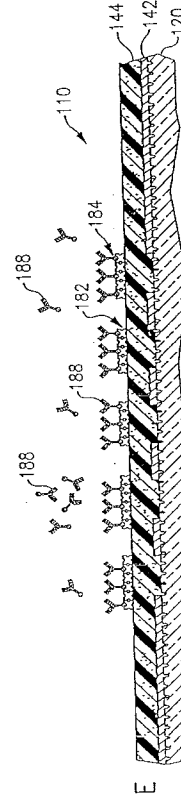
【図 20 C】



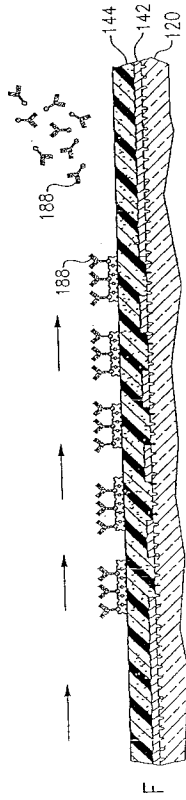
【図 20 D】



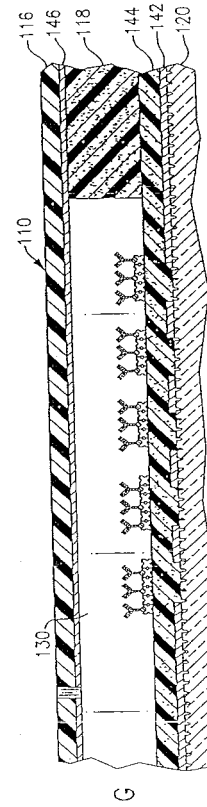
【図 20 E】



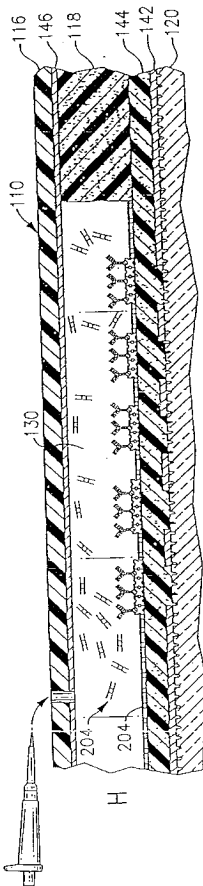
【図 20 F】



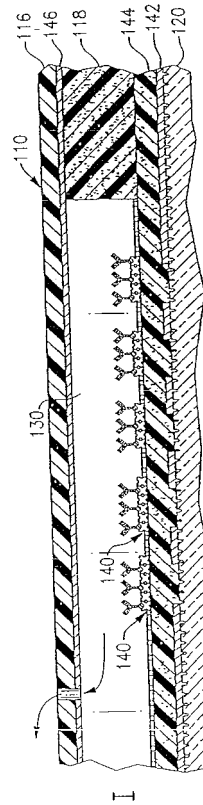
【図 20 G】



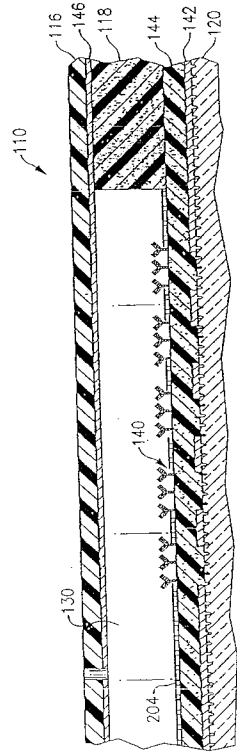
【図 20 H】



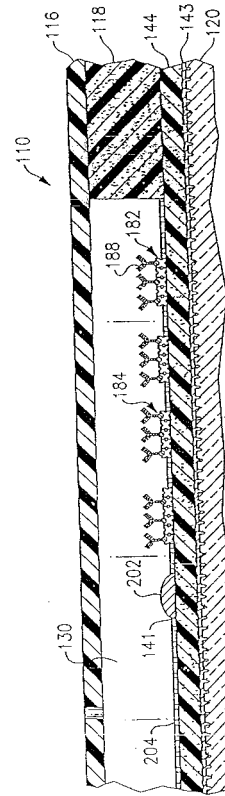
【図 20 I】



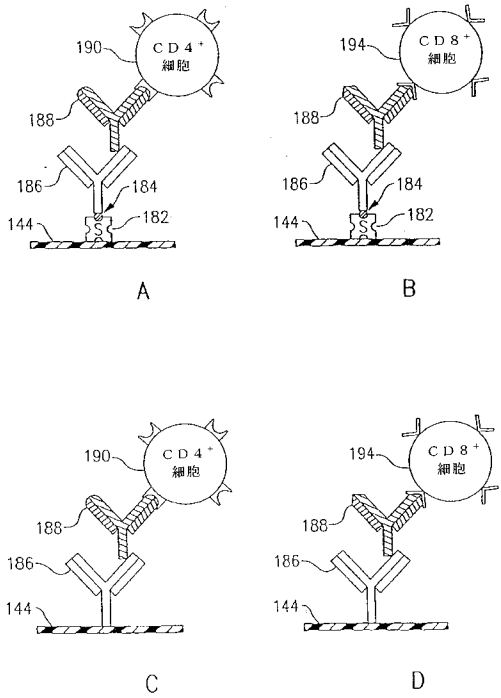
【 図 2 1 】



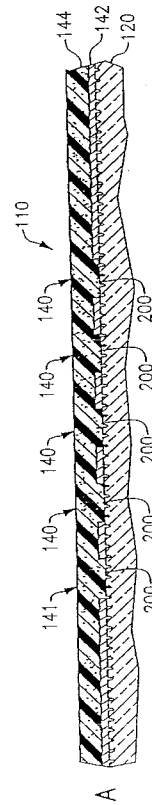
【 図 2 2 】



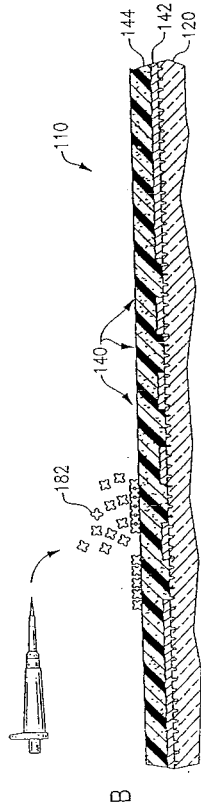
【 図 2 3 】



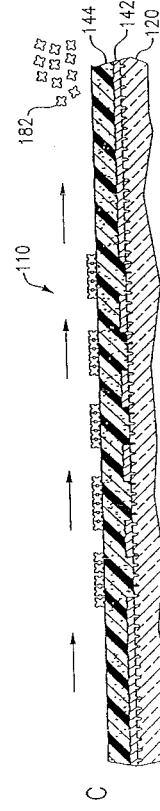
【 図 2 4 A 】



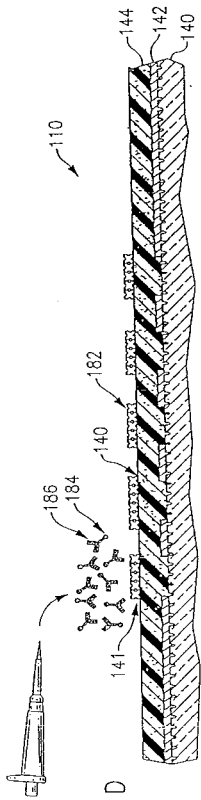
【図 2 4 B】



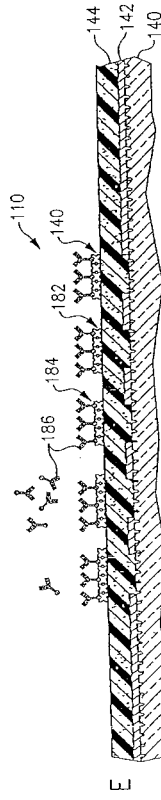
【図 2 4 C】



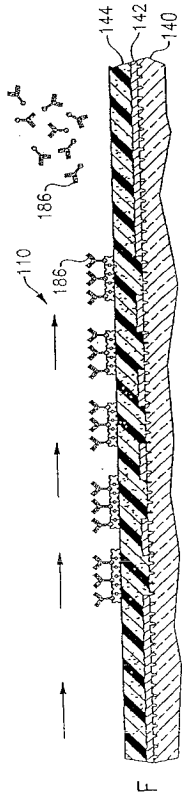
【図 2 4 D】



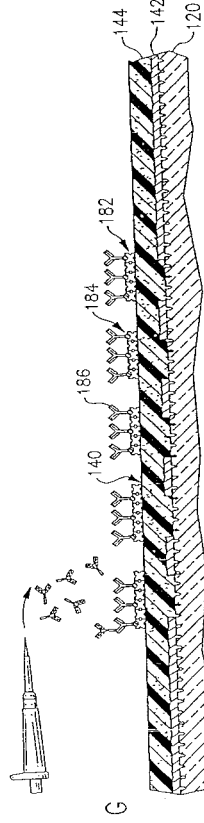
【図 2 4 E】



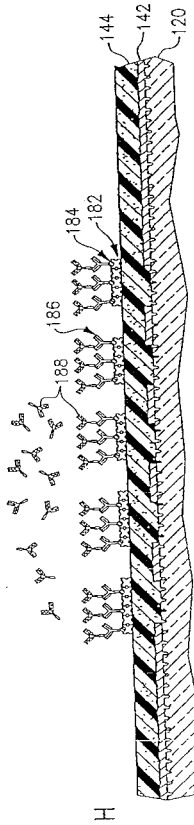
【 図 2 4 F 】



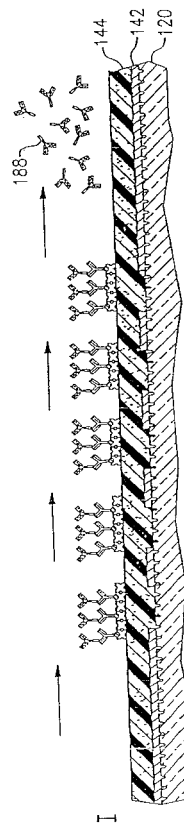
【 図 2 4 G 】



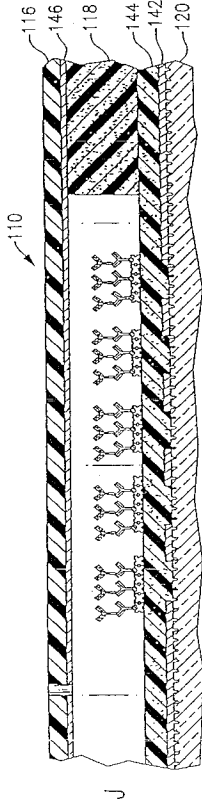
【 図 2 4 H 】



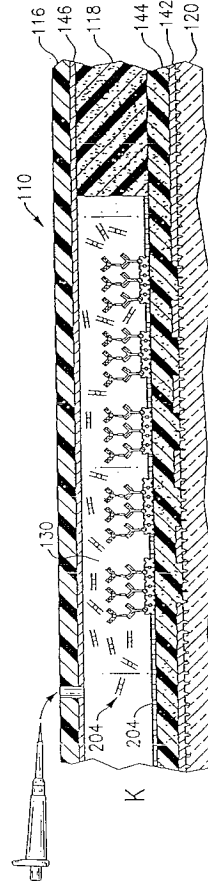
【 図 2 4 I 】



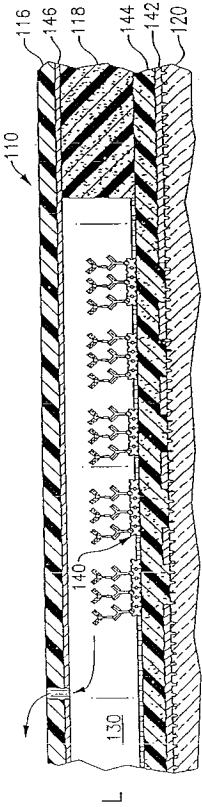
【図 2 4 J】



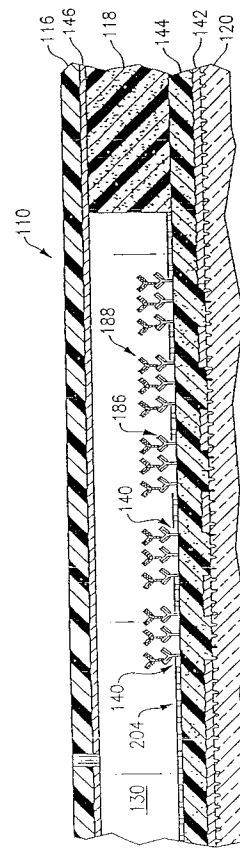
【図 2 4 K】



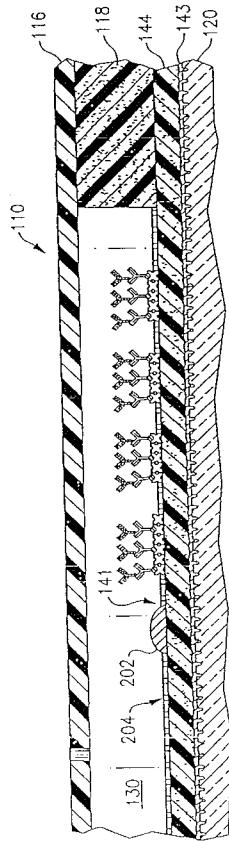
【図 2 4 L】



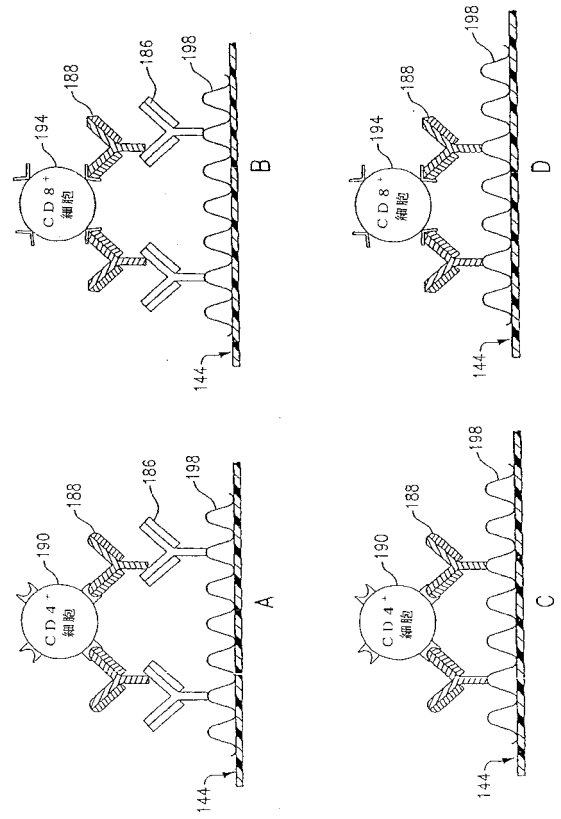
【図 2 5】



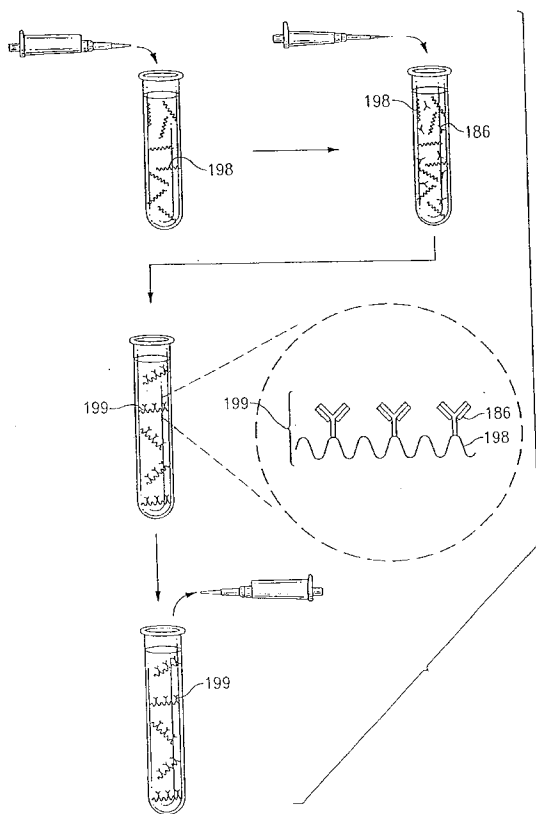
【 図 2 6 】



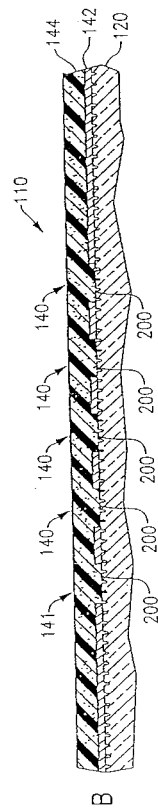
【 図 2 7 】



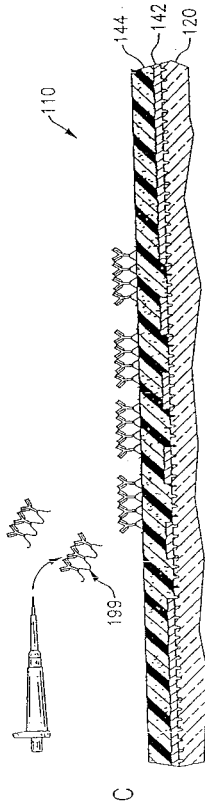
【 図 2 8 A 】



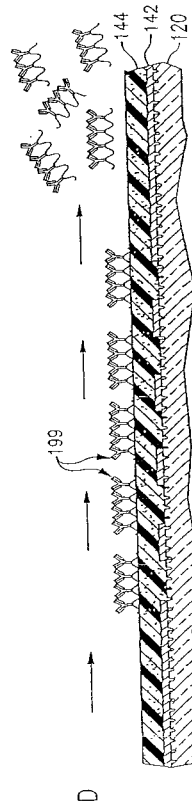
【 図 2 8 B 】



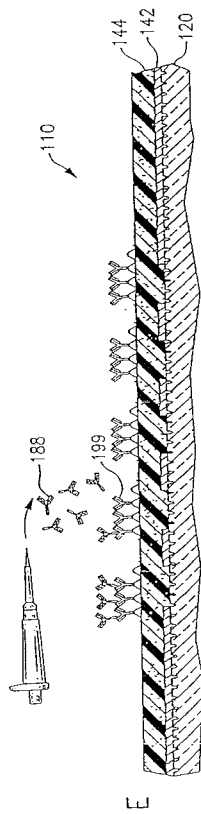
【 図 2 8 C 】



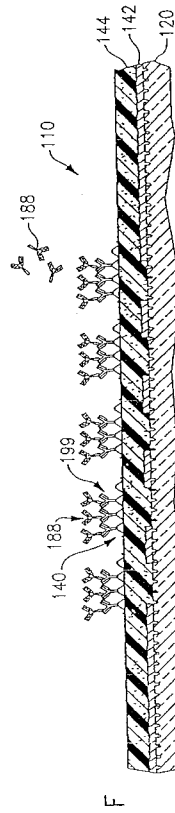
【 図 2 8 D 】



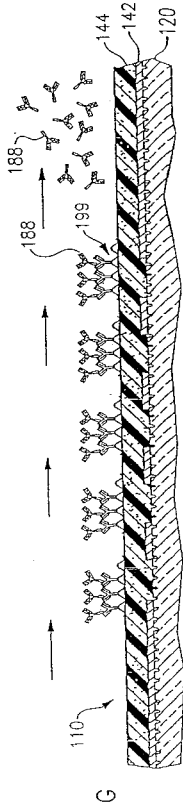
【 図 2 8 E 】



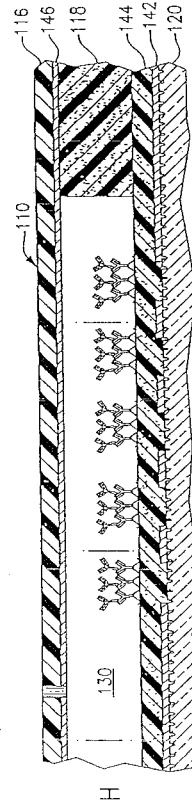
【 図 2 8 F 】



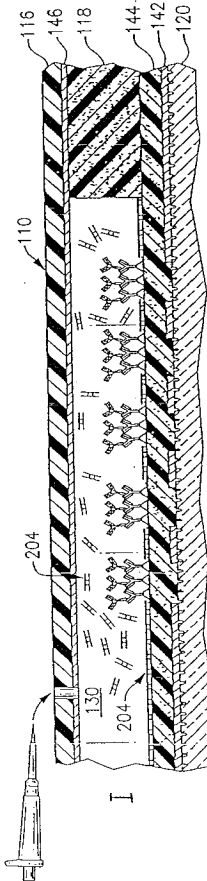
【図 28 G】



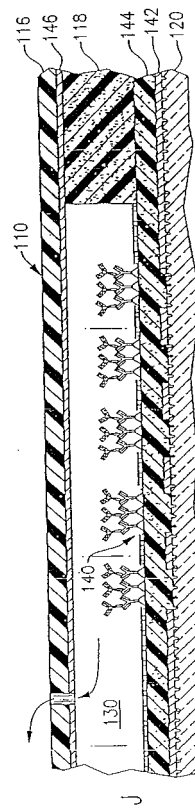
【図 28 H】



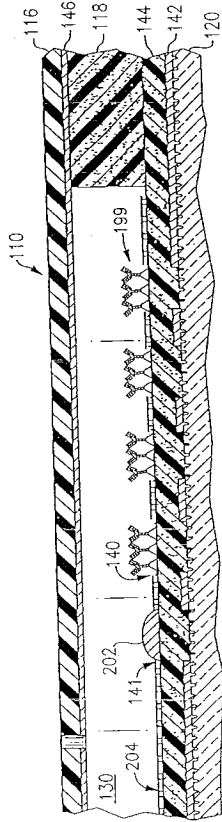
【図 28 I】



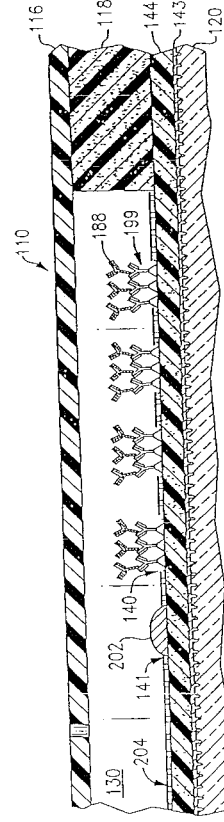
【図 28 J】



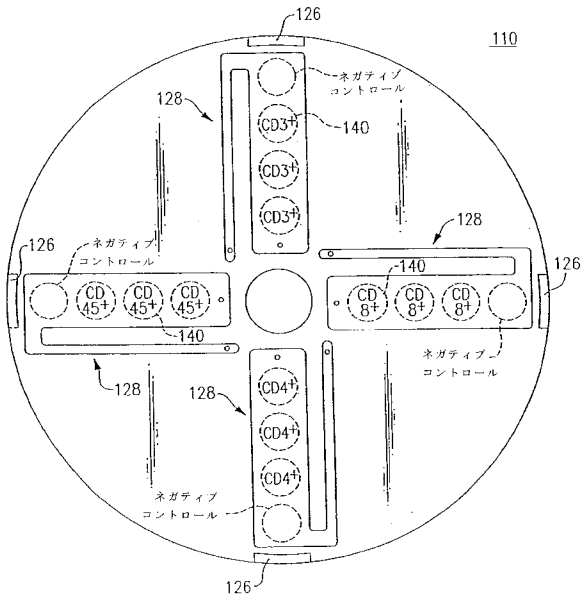
【図 29】



【図 30】

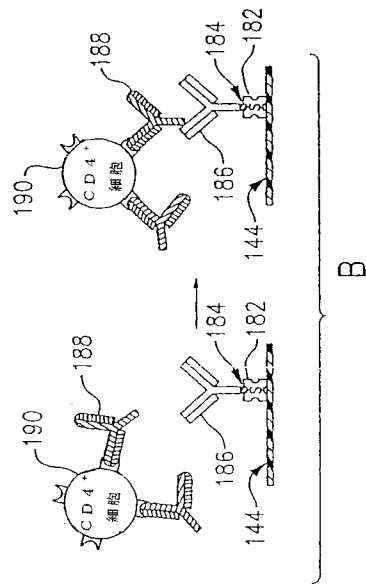


【図 31 A】



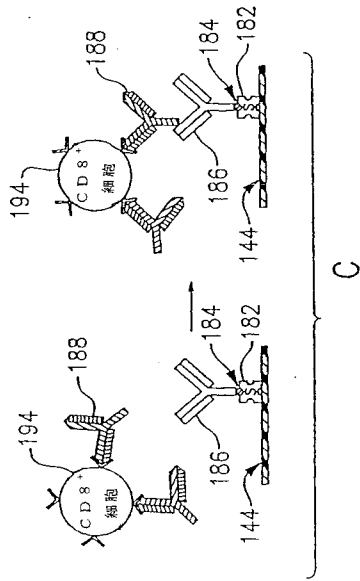
A

【図 31 B】

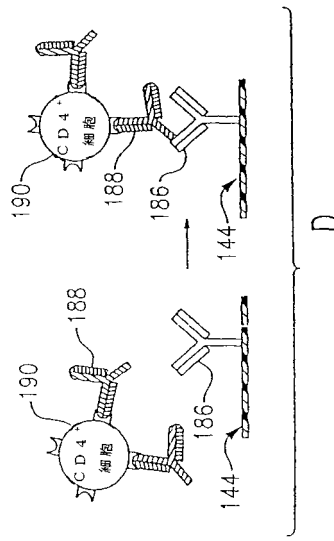


B

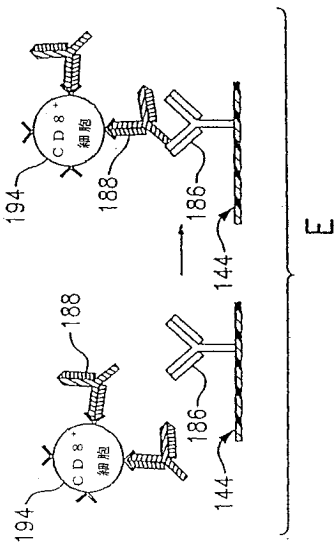
【図 3 1 C】



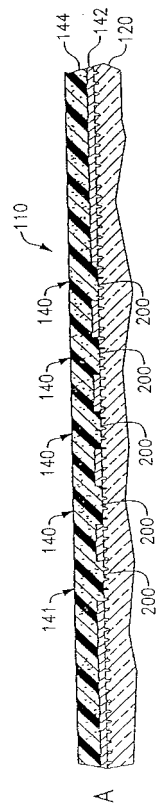
【図 3 1 D】



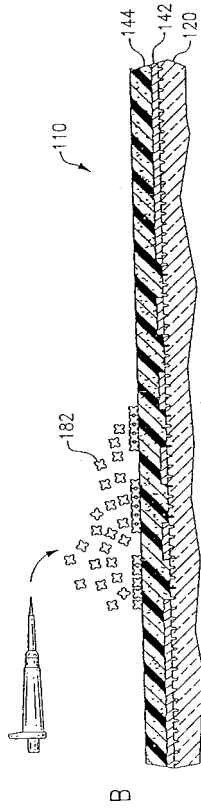
【図 3 1 E】



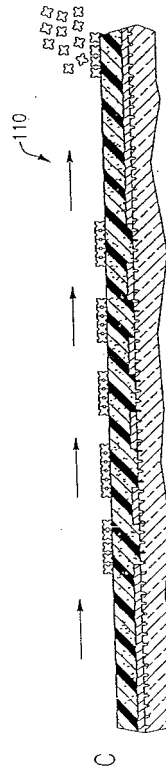
【図 3 2 A】



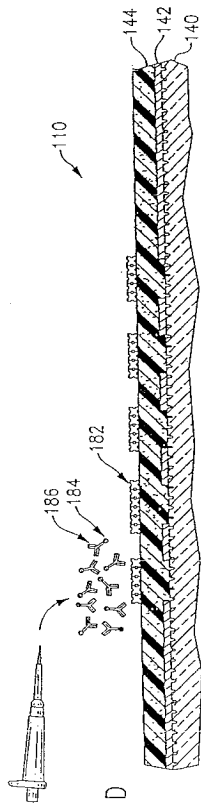
【 図 3 2 B 】



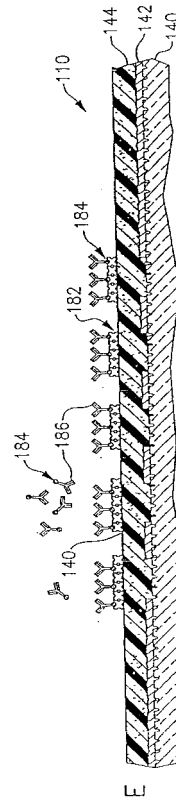
【 図 3 2 C 】



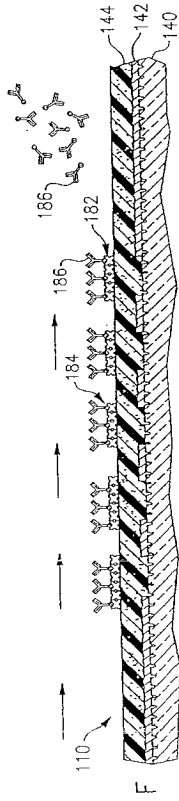
【 図 3 2 D 】



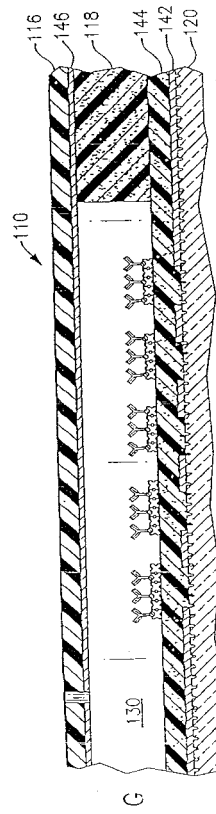
【 図 3 2 E 】



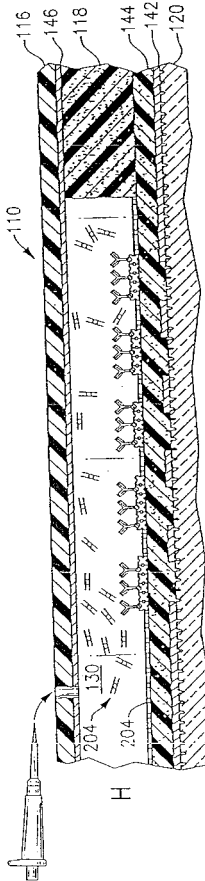
【 図 3 2 F 】



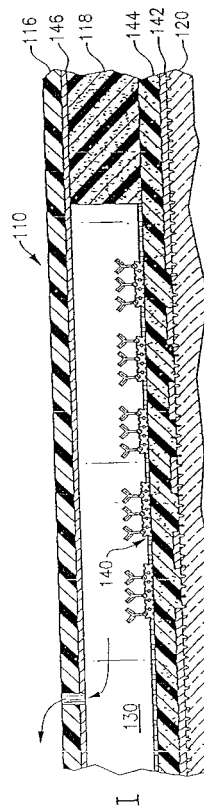
【 図 3 2 G 】



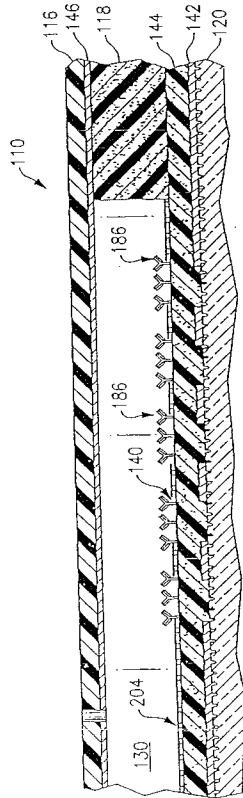
【 図 3 2 H 】



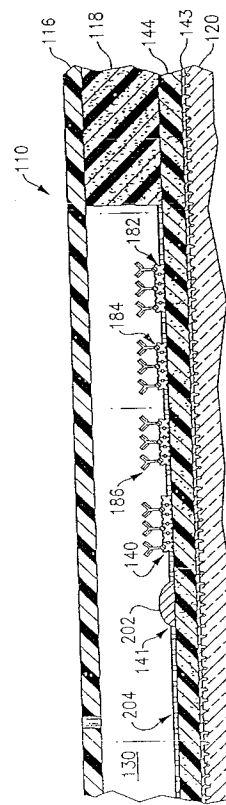
【 図 3 2 I 】



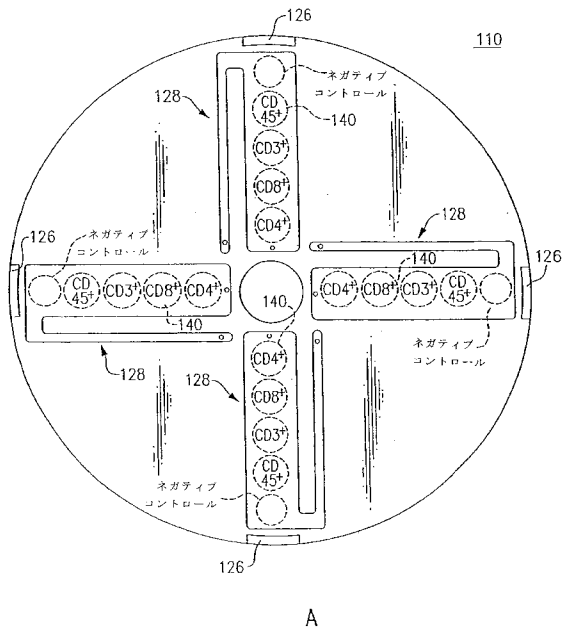
【図 3 3】



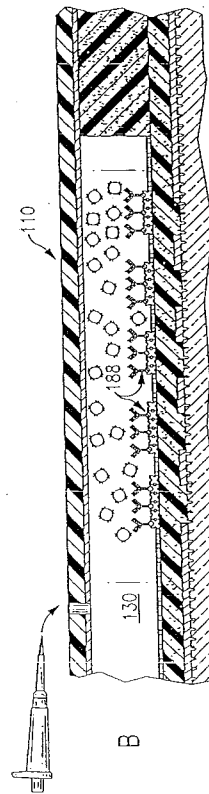
【図 3 4】



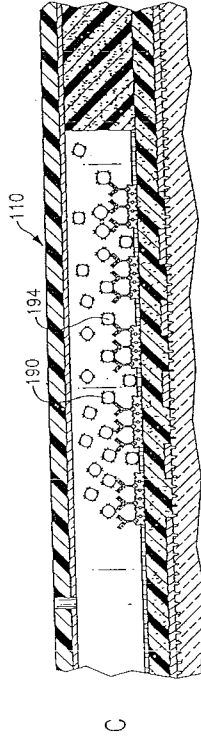
【図 3 5 A】



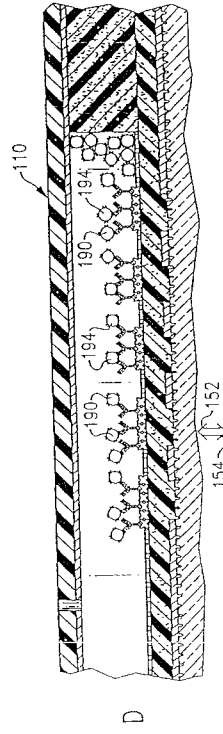
【図 3 5 B】



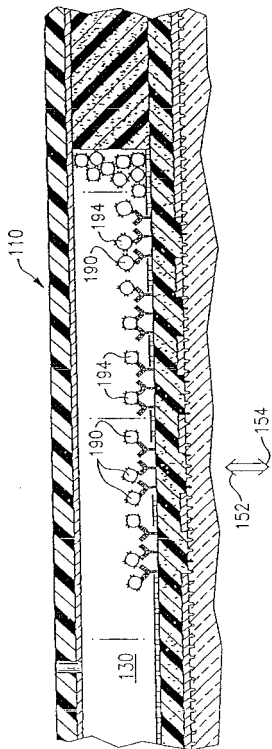
【 図 3 5 C 】



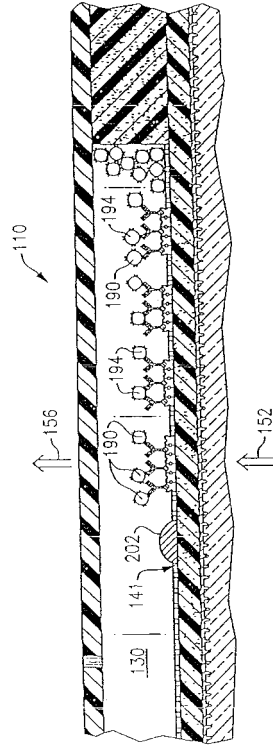
【 図 3 5 D 】



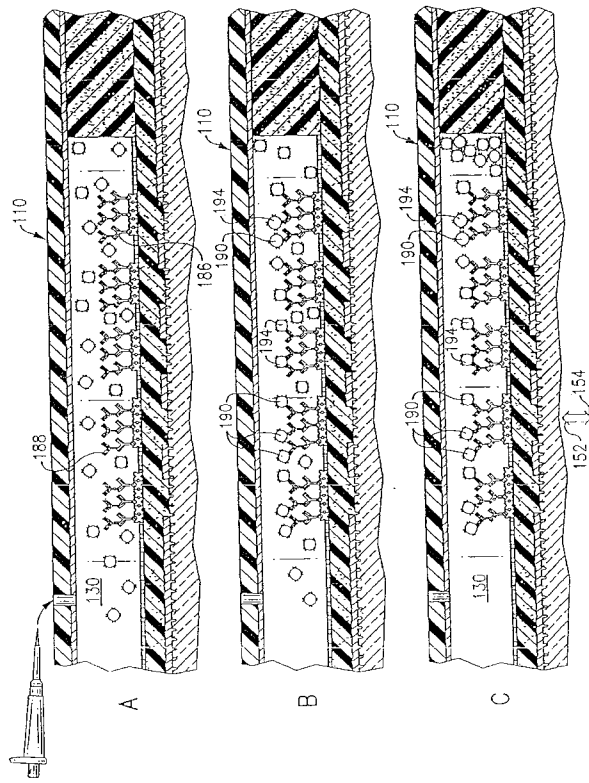
【 図 3 6 】



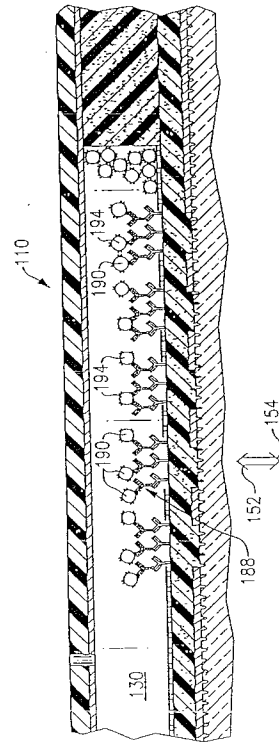
【 図 3 7 】



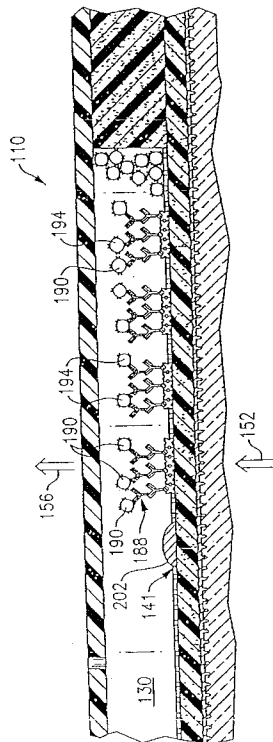
【 図 3 8 】



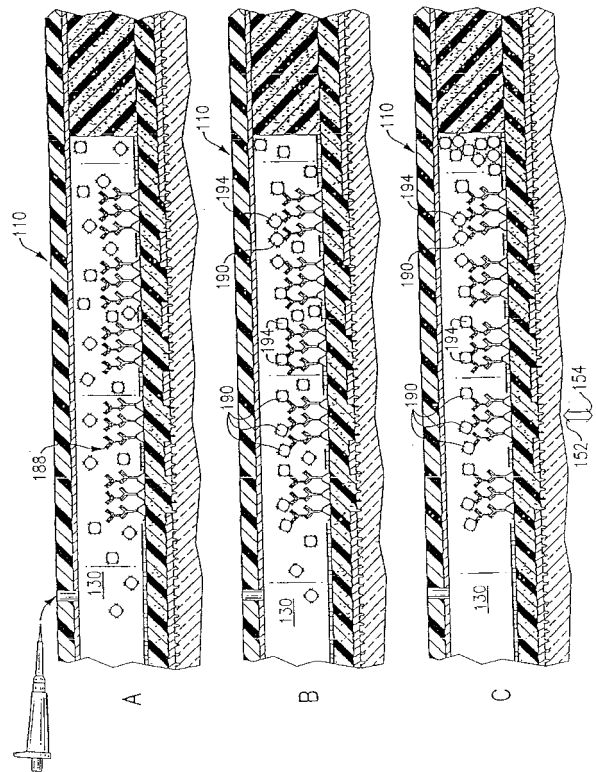
【 図 3 9 】



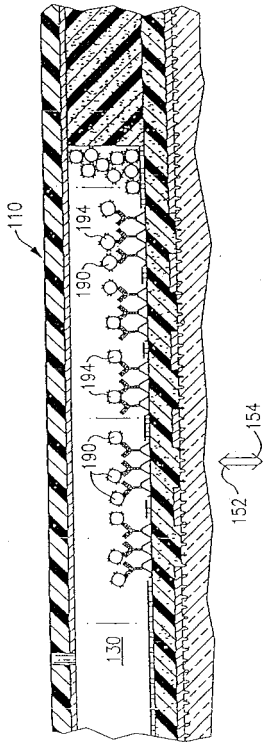
【 図 4 0 】



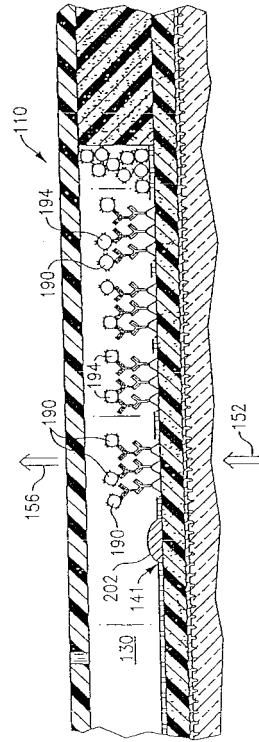
【 図 4 1 】



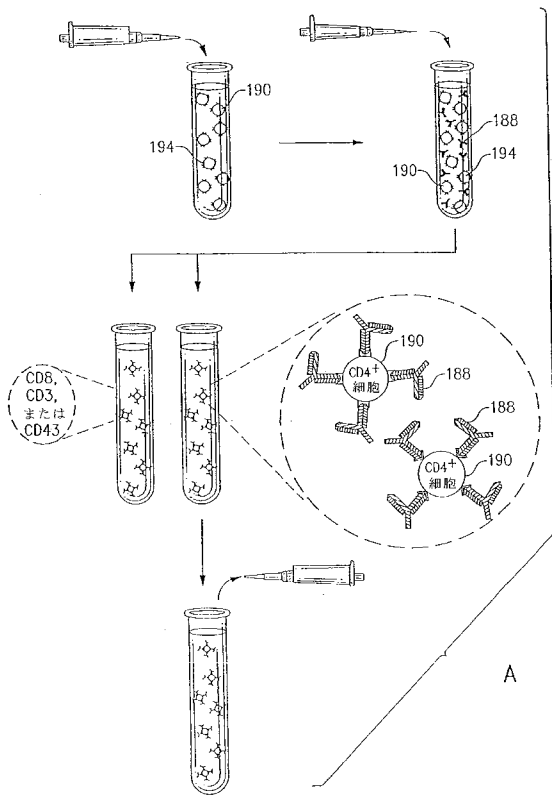
【図42】



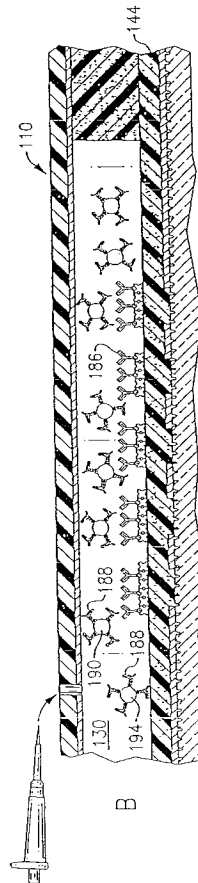
【図43】



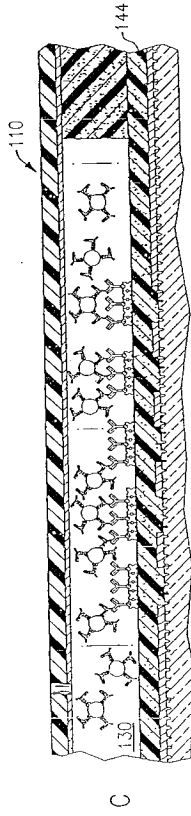
【図44A】



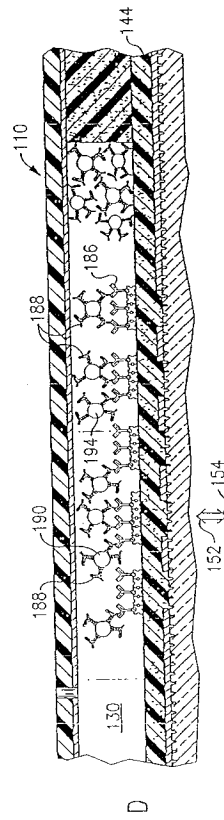
【図44B】



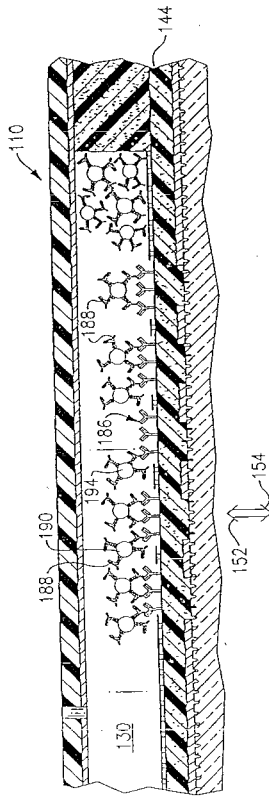
【 図 4 4 C 】



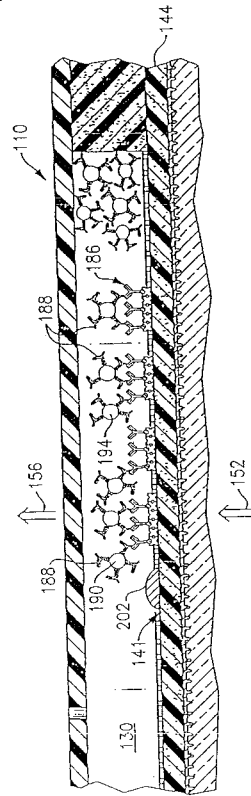
【 図 4 4 D 】



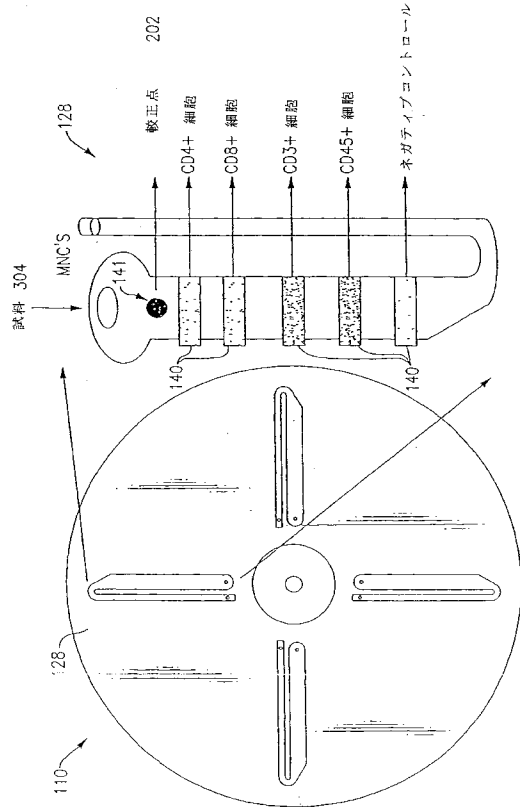
【 図 4 5 】



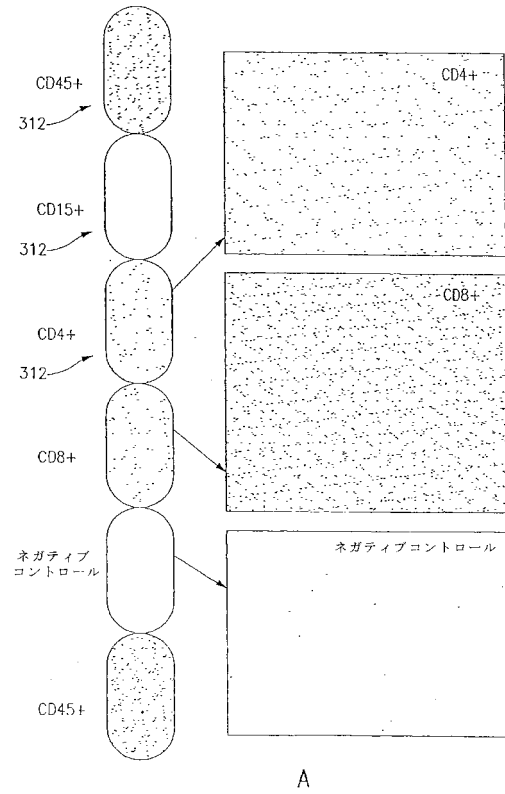
【 図 4 6 】



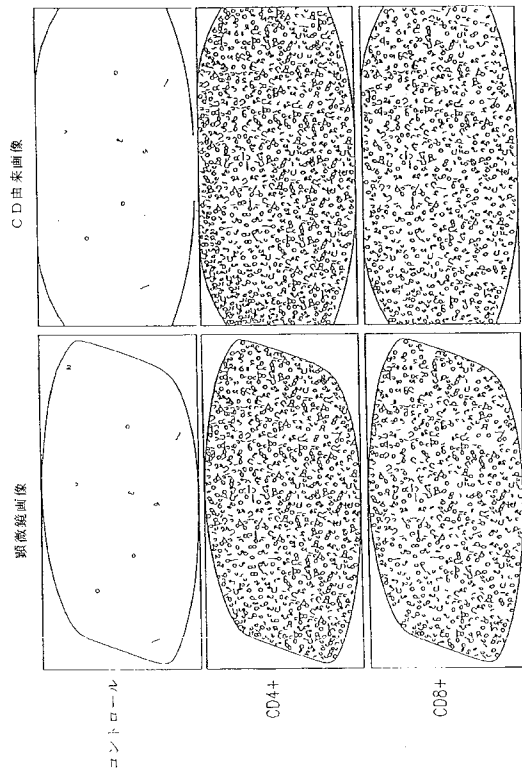
【 図 4 7 】



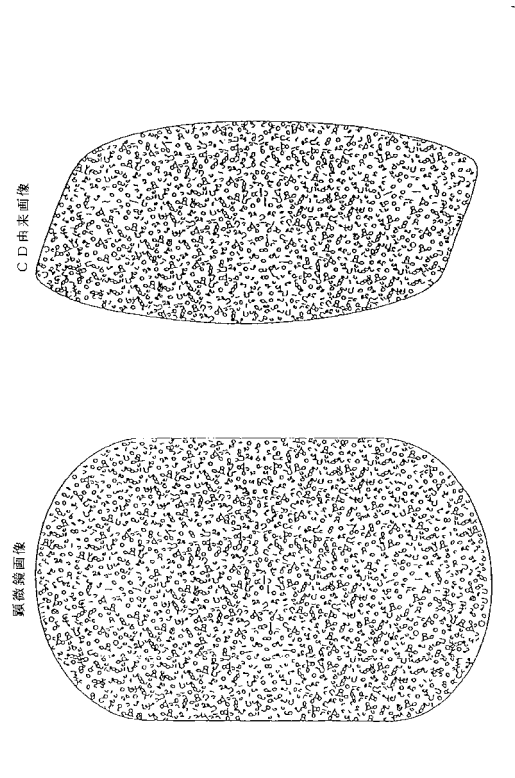
【 図 4 8 A 】



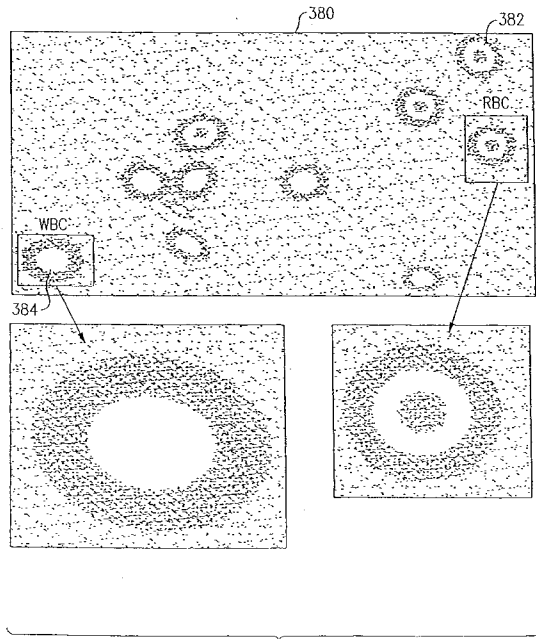
【 図 4 8 B 】



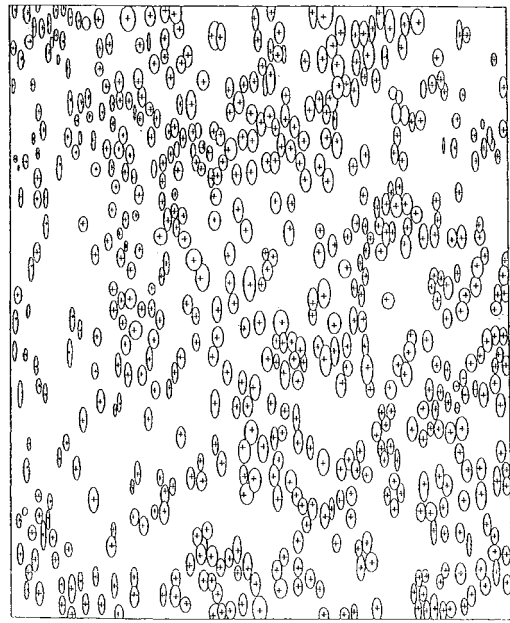
【 図 4 9 】



【図50】



【図51】

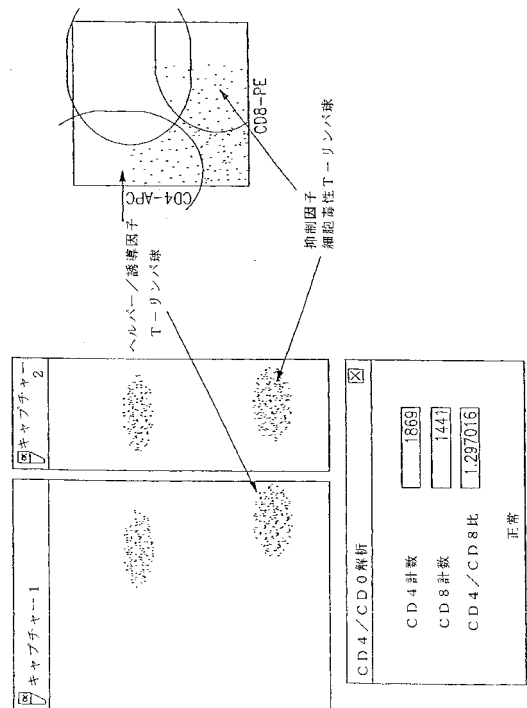


【図52】

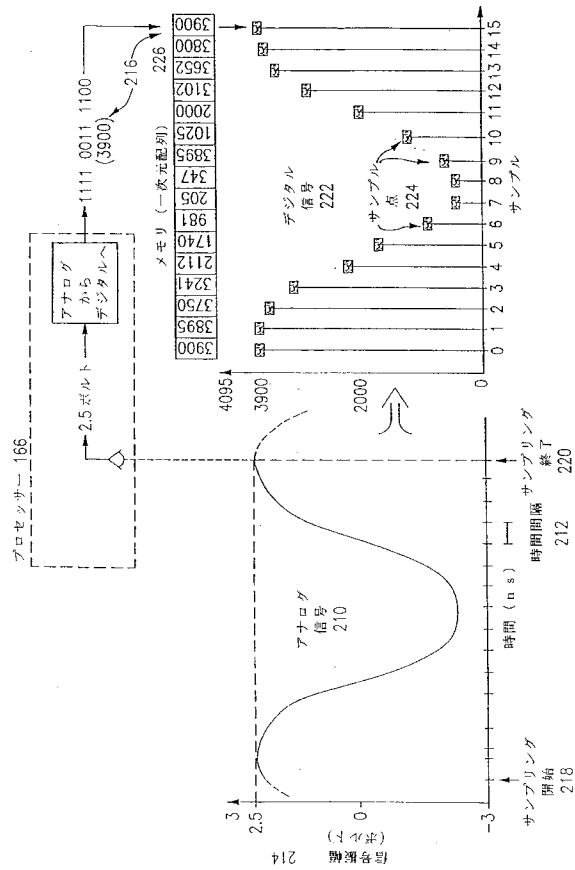
患者ID	C64-cd8 bc-1	検査	全血/リンパ	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+	CD4+
目付け	CD45+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+
	564	400	107	121	151	42	241	262
	CD2+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+
	CD45+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+
	CD45+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+
	CD45+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+
	CD45+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+	CD19+	CD8+

ネガティブコントロール

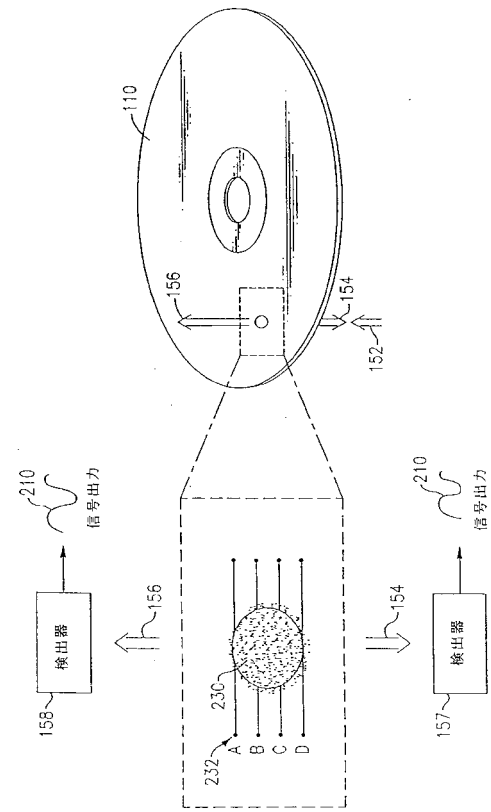
【図53】



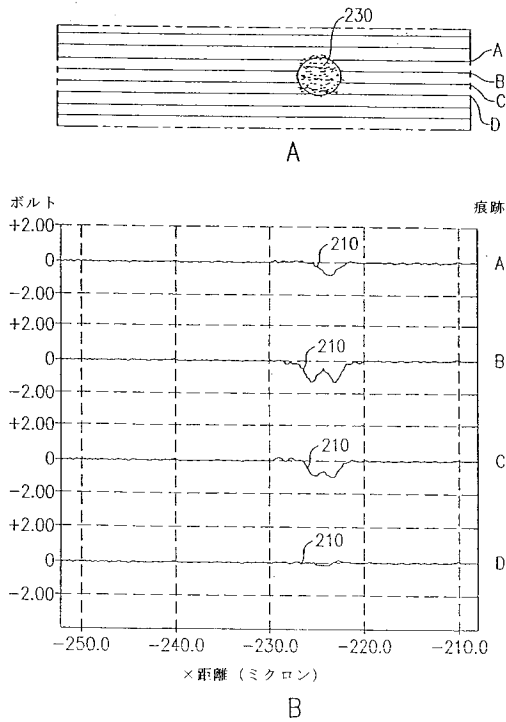
【図 5 4】



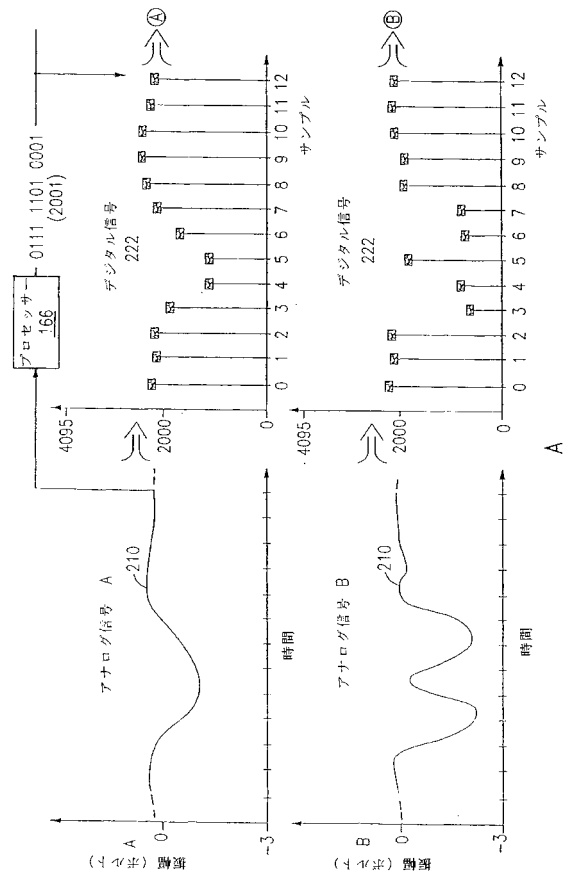
【図 5 5】



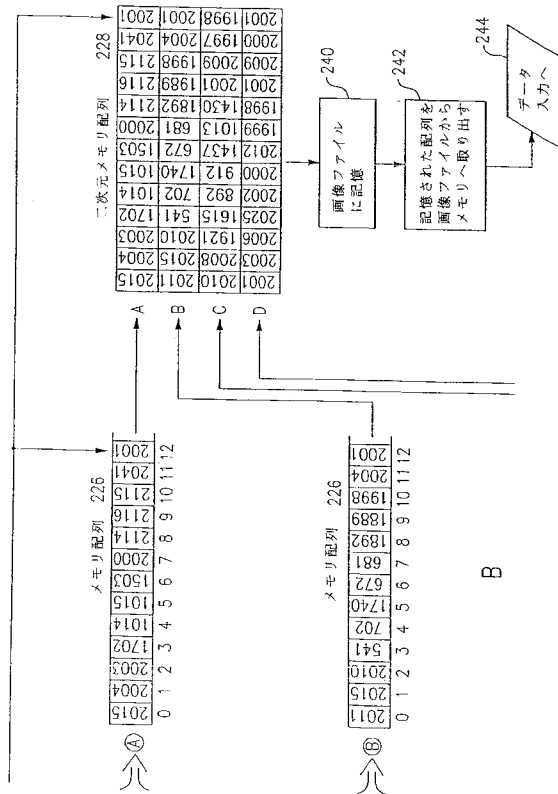
【図 5 6】



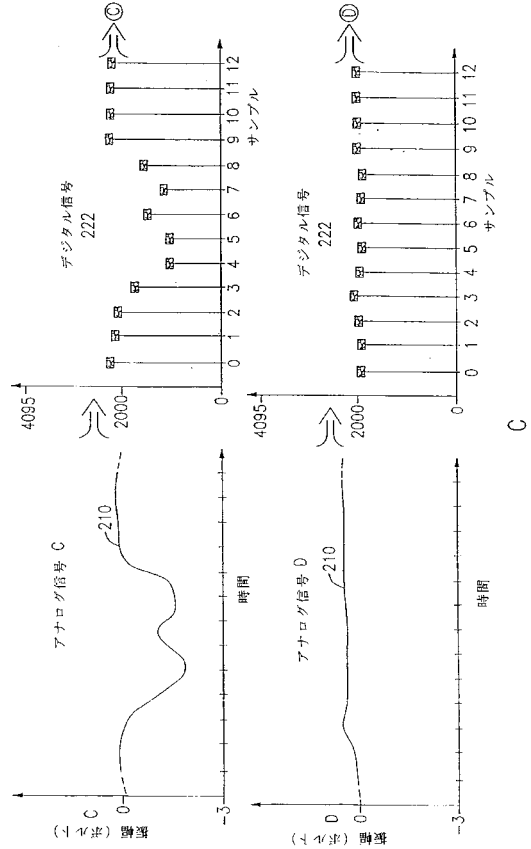
【図 5 7 A】



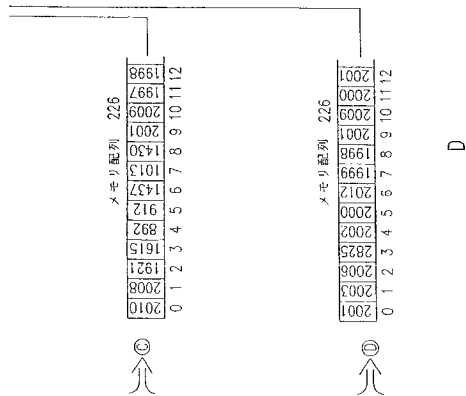
【図 57B】



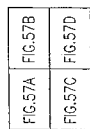
【図 57C】



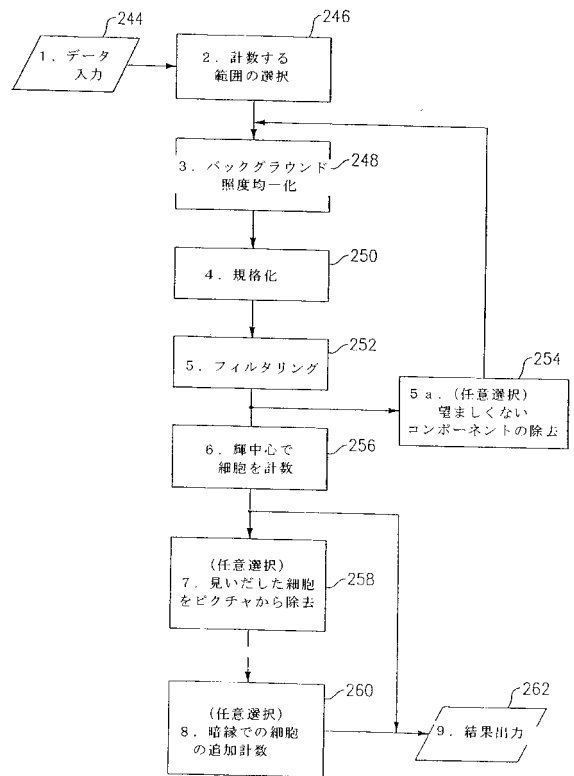
【図 57D】



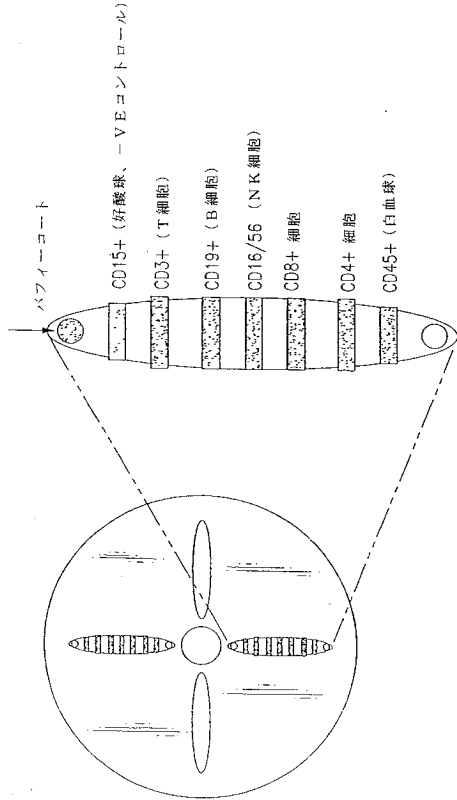
【図 57E】



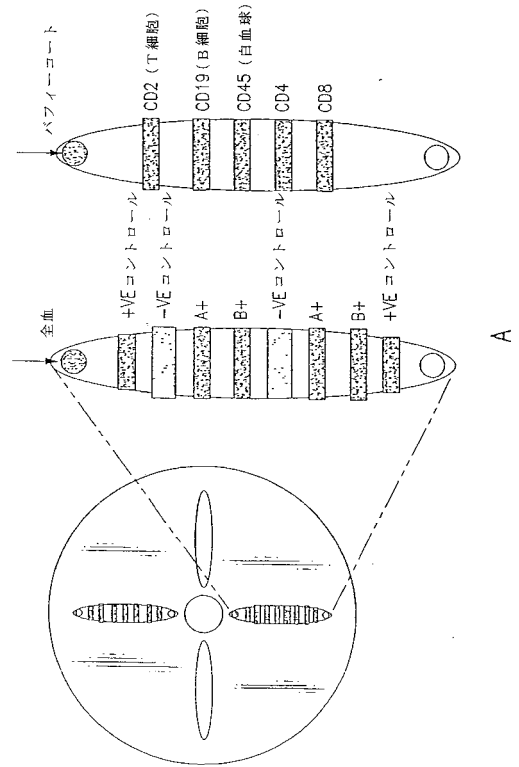
【図 58】



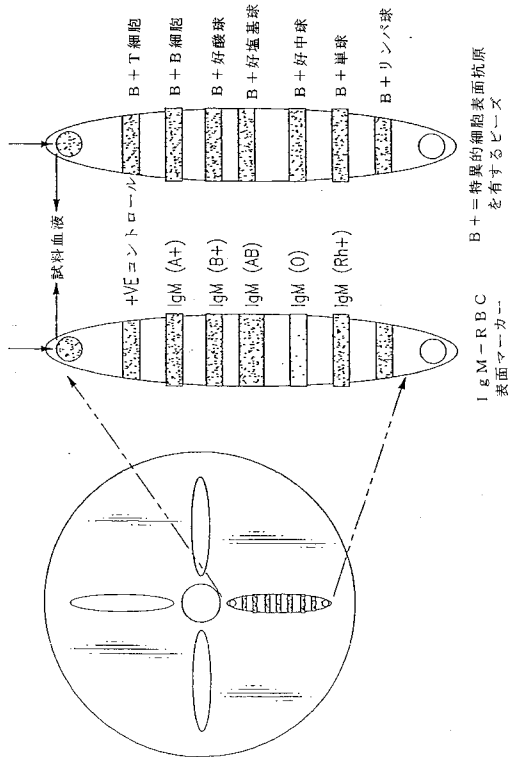
【図 59】



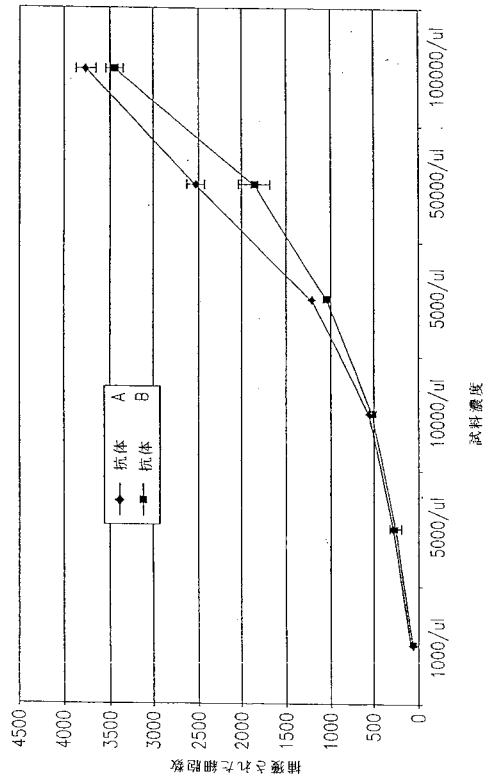
【図 60 A】



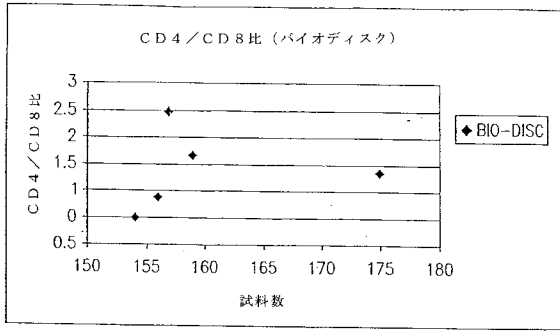
【図 60 B】



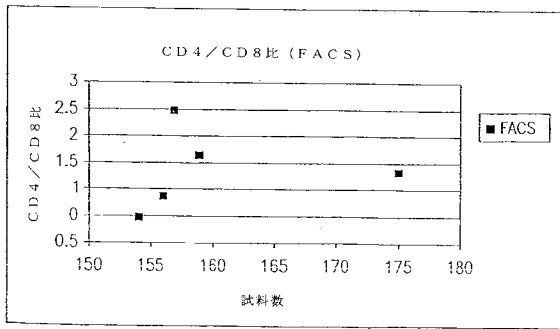
【図 61】



【 図 6 2 】




A



B

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/27762		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC(7) : B32B 27/04, 27/12, 5/02; C12M 1/34, 3/00; G01N 9/30, 15/06, 21/00, 21/75-76, 33/48, 33/53, 33/567 US CL : 422/55, 57-58, 64, 68.1, 72; 435, 7.1-7.2, 7.25, 287.1, 287.9, 288.7; 436/10, 63, 164, 45, 172 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC				
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>				
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 422/55, 57-58, 64, 68.1, 72; 435, 7.1-7.2, 7.25, 287.1, 287.9, 288.7; 436/10, 63, 164, 45, 172				
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched				
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Please See Continuation Sheet				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
X	US 6,143,247 A (SHEPPARD et al) 07 November 2000 (07.11.2000), column 10, lines 15-18, 45-50, and 59-64; column 11, lines 5-7, column 14, lines 6-7, lines 39-58, and 61-63; column 21, lines 57-67; column 24, lines 20-26 and 28-31, and column 26, lines 55-56.	1-10 ----- 11-12, 18-23, 25-31		
Y	US 4,816,168 A (CARROLL et al) 28 March 1989 (28.03.1989), column 2, lines 29-39; column 3, lines 60-68; column 4, lines 1-9; column 7, line 65; column 9, line 45; column 11, lines 64-68; column 12, lines 1-13.	12-31		
Y	US 5,812,419 A (CHUPP et al) 22 September 1998 (22.09.1998), columns 69-70, Example 6B, columns 68-69, Example 6A.	11, 30  17		
Y	US 5,736,410 A (ZARLING et al) 07 April 1998 (07.04.1998), column 13, lines 35-46.	24		
A	US 5,478,527 A (GUSTAFSON et al) 26 December 1995 (26.12.1995), entire document.	1-31		
A	US 5,892,577 A (GORDON) 06 April 1999 (06.04.1999), entire document.	1-31		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.				
* Special categories of cited documents: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%; border: none;">               "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance                "E" earlier application or patent published on or after the international filing date                "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)                "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means                "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed             </td> <td style="width: 50%; border: none;">               "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention                "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone                "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art                "&amp;" document member of the same patent family             </td> </tr> </table>			"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 25 June 2004 (25.06.2004)		Date of mailing of the international search report 05 AUG 2004		
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450 Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer Leon Lum Telephone No. 571-272-1600 		

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

PCT/US02/27762

C. (Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 6,143,248 A (KELLOGG et al) 7 November 2000 (07.11.2000), entire document.	1-31
A	WO 98/07019 A1 (KELLOGG et al) 19 February 1998 (19.02.1998), entire document.	1-31

PCT/US02/27762

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 3:**

EAST: biodisc, biodisk, optical, chamber, well, cell, count, CD, antigen, detection, binding, rotate, centrifuge, flow, microfluidic  
STN (medline, embase, biosis, caplus): biodisc, biodisk, cell, count, concentration, number, optical, microfluidic, filter, antibody, antibodies

## フロントページの続き

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード(参考)
// C 1 2 M 1/34	G 0 1 N 33/483	C
	G 0 1 N 33/577	B
	C 1 2 M 1/34	D

(31)優先権主張番号 60/386,073  
(32)優先日 平成13年10月19日(2001.10.19)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/386,071  
(32)優先日 平成13年10月26日(2001.10.26)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/344,977  
(32)優先日 平成13年11月7日(2001.11.7)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/338,679  
(32)優先日 平成13年11月13日(2001.11.13)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 09/988,728  
(32)優先日 平成13年11月20日(2001.11.20)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/334,131  
(32)優先日 平成13年11月30日(2001.11.30)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/355,644  
(32)優先日 平成14年2月5日(2002.2.5)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(31)優先権主張番号 60/358,479  
(32)優先日 平成14年2月19日(2002.2.19)  
(33)優先権主張国 米国(US)

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,IE,IT,LU,MC,NL,PT,SE,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW, ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ,EC,EE,ES, FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,MW,MX,MZ,N O,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SI,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(72)発明者 セルバン, ガウリ プヤパリ  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 1 2 アーバイン ラシーン ドライブ 1 8 9 6 2

(72)発明者 ゴルドン, ジョン フランシス  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 0 6 アーバイン ニュー ジャージー 2 0

(72)発明者 ブラジル, カレン ジーン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 7 7 ラグーナ ニゲル オーシャナス ストリート  
3 0 0 5 6

(72)発明者 アーシア, ジョゼフ ロビー イリンガン  
アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 6 8 3 ウェストミニスター マリオン 8 5 1 1

Fターム(参考) 2G045 BB10 BB34 BB41 BB51 CA01 CA25 CB01 FB13  
4B029 AA07 BB11 CC04 FA10  
4B063 QA01 QQ08 QR48 QR51 QR54 QS33 QX01

专利名称(译)	细胞定性和定量分析方法以及相关的光学生物盘系统		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005517154A</a>	公开(公告)日	2005-06-09
申请号	JP2003525256	申请日	2002-08-30
申请(专利权)人(译)	伯斯坦科技股份有限公司雷开球德		
[标]发明人	セルバンガウリピヤパリ ゴルドンジョンフランシス ブラジルカレンジーン アーシアジョゼフロビーイリンガン		
发明人	セルバン,ガウリ ピヤパリ ゴルドン,ジョン フランシス ブラジル,カレン ジーン アーシア,ジョゼフ ロビー イリンガン		
IPC分类号	G01N33/53 B01L3/00 C12M1/34 C12Q1/02 G01N15/14 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/543 G01N33/569 G01N33/577 G01N35/00 G11B19/00		
CPC分类号	G01N15/1475 B01L3/5027 G01N33/54306 G01N33/54353 G01N33/54386 G01N35/00069 G01N2015/1486		
FI分类号	G01N33/53.Y C12Q1/02 G01N33/48.C G01N33/48.K G01N33/48.M G01N33/483.C G01N33/577.B C12M1/34.D		
F-TERM分类号	2G045/BB10 2G045/BB34 2G045/BB41 2G045/BB51 2G045/CA01 2G045/CA25 2G045/CB01 2G045/FB13 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/CC04 4B029/FA10 4B063/QA01 4B063/QQ08 4B063/QR48 4B063/QR51 4B063/QR54 4B063/QS33 4B063/QX01		
代理人(译)	川口义行 永田豊 远山 勉		
优先权	60/315937 2001-08-30 US 60/328246 2001-10-10 US 60/386072 2001-10-19 US 60/386073 2001-10-19 US 60/386071 2001-10-26 US 60/344977 2001-11-07 US 60/338679 2001-11-13 US 09/988,728 2001-11-20 US 60/334131 2001-11-30 US 60/355644 2002-02-05 US 60/358479 2002-02-19 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

#### 摘要(译)

临床诊断测定在光学生物盘上进行并在磁盘驱动器上读取。公开了使用光学生物盘检测和定量生物样品中的特定血细胞分析物的方法和装置。用于确定生物样品中特定类型的血细胞的方法包括将抗体结合到盘上的捕获区，在捕获区中制备样品，以及去除未结合到捕获区的样品的一部分并计算绑定的细胞。还描述了用于在光盘和磁盘驱动器上执行簇标记计数的方法和装置，以及用于制作用于执行这种簇标记计数的光学测定盘的方法。

