

(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2009-529655

(P2009-529655A)

(43) 公表日 平成21年8月20日(2009.8.20)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 N	4 B 0 6 5
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 7 5	
C 1 2 N 5/06 (2006.01)	GO 1 N 33/53 Y	
	C 1 2 N 5/00 E	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願2008-549566 (P2008-549566)  
 (86) (22) 出願日 平成19年1月4日 (2007.1.4)  
 (85) 翻訳文提出日 平成20年8月25日 (2008.8.25)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2007/000234  
 (87) 国際公開番号 W02007/081778  
 (87) 国際公開日 平成19年7月19日 (2007.7.19)  
 (31) 優先権主張番号 11/327,589  
 (32) 優先日 平成18年1月6日 (2006.1.6)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 503369358  
 バイオアレイ ソリューションズ リミテ  
 ッド  
 アメリカ国 07059 ニュージャージ  
 ー ウォーレン テクノロジードライブ  
 35  
 (74) 代理人 100096024  
 弁理士 柏原 三枝子  
 (74) 代理人 100125520  
 弁理士 高橋 剛一  
 (74) 代理人 100155310  
 弁理士 柴田 雅仁  
 (74) 代理人 100156339  
 弁理士 米村 道子

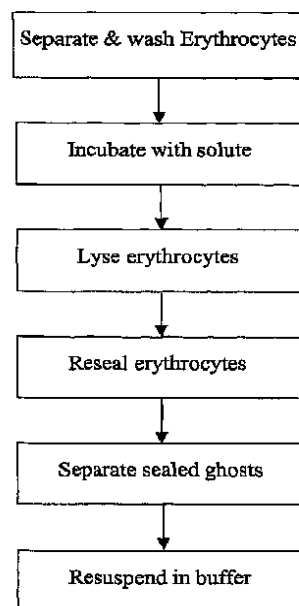
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗赤血球アロ抗体の多重検出

(57) 【要約】

試料中の抗体を検出する方法が開示され、この場合、抗体が赤血球又は赤血球ゴーストによって発現した抗原を標的にしている。(アッセイに基づいた従来の凝集反応におけるような) 特定の抗原 - 抗体対の間の結合事象を検出するというよりはむしろ、ここでの方法は、血液型抗原に対する临床上重要なアロ免疫抗体の多重検出を考慮している。特に、本方法は蛍光コード化した赤血球又は赤血球ゴーストを生成するステップと、蛍光サンドイッチ型イムノアッセイを用いて、血清/血漿中の抗体の存在を検出するためにそれらを使用するステップを含んでいる。このアッセイは、画像技術に基づいたフローサイトメトリ法又は蛍光顕微鏡を用いて読み取ることができる。

【選択図】 図 1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

試料中のアロ抗体を検出する方法において：

別々にコード化された赤血球又は赤血球ゴーストセットを生成するステップであって、別々にコード化された細胞又はゴーストが、前記セット中のその他の細胞又はゴーストによって発現されない細胞膜表面上の少なくとも 1 の抗原を発現するステップと；

前記細胞膜表面上の前記抗原に対し、試料中に存在する抗体の結合を可能にする条件下で、前記セットを血清、血液又は血漿の試料へ曝露するステップと；

この結合した抗体を標的として標識された第 2 の抗体を用いて結合を検出するステップと；

を具えることを特徴とする方法。

10

## 【請求項 2】

結合の後に過剰な未結合の試料を洗い落とすステップを更に具えることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

前記コード化が蛍光染料を伴うことを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 4】

前記第 2 の抗体が蛍光染料で標識されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 5】

前記第 2 の抗体がモノクローナルであることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

20

## 【請求項 6】

前記検出ステップが、フローサイトメトリを用いて実行されるか、又は、前記コード化された細胞又はゴーストのアレイを画像化し、前記結合した第 2 の抗体を画像化し、前記結合した第 2 の抗体をこのアレイ画像と相関させて、前記セット内のどの細胞又はゴーストが前記試料中の抗体と反応したかを決定することによって実行されることを特徴とする請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 7】

コード化したゴースト細胞を調製する方法が：

全血液から赤血球を分離するステップと；

染料溶液を用いて前記赤血球をインキュベートして、前記赤血球の表面上の抗原をコード化するステップと；

溶血溶液を用いて赤血球を溶血させるステップと；

再封入溶液を用いてこの溶血させた赤血球を再封入するステップと；

前記再封入溶液からこの再封入された赤血球ゴーストを分離するステップと；

を具えることを特徴とする方法。

30

## 【請求項 8】

分離が遠心分離によって行われることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 9】

前記溶血溶液が、500 ml の蒸留水に溶解させた 0.69 g の一ナトリウムリン酸塩と、0.203 g の塩化マグネシウム六水和物と、0.0435 g のフェニルメチルスルホン酸クロリドとを具えることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

40

## 【請求項 10】

前記再封入溶液が、50 ml の蒸留水に溶解させた 6 g の塩化ナトリウムを具えることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 11】

前記染料溶液が、pH がほぼ中性で、イオン強度がほぼ等浸透圧で、濃度 0.1 乃至 2 mM のマグネシウムイオンとを有するバッファであることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

## 【請求項 12】

この染料が蛍光性であることを特徴とする請求項 7 に記載の方法。

50

## 【請求項 13】

500mlの蒸留水に溶解させた、4.383gの塩化ナトリウムと、0.345gの一ナトリウムリン酸塩と、0.203gの塩化マグネシウム六水和物と、0.0435gのフェニルメチルスルホン酸クロリドとを具える溶液中で、このゴーストを保存するステップを更に具えることを特徴とする請求項7に記載の方法。

## 【請求項 14】

請求項7乃至13のいずれかの方法により調製されるコード化したゴースト細胞。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

マイナーな血液型抗原（例えば、Jk、Rh、Kell、Kidd及びDuffy）は、感作宿主に投与された場合、自己抗体及び/又はアロ抗体を誘起し、自己免疫性溶血性貧血、溶血性貧血、新生児溶血性疾患、及び溶血性輸血反応を引き起こす。感作は過去の輸血又は抗体陽性の胎児の妊娠から生じる。これらのアロ抗体は通常、別々の凝集反応アッセイで経時的に、既知の表現型の赤血球（RBC）パネルに対して、レシピエントの血清を検査することによって検出し同定される（例えば、抗Jk<sup>a</sup>抗体は、患者の血清がJk<sup>a</sup>+RBCと反応し、Jk<sup>a</sup>-RBCと反応しないかどうかを判定することによって同定される）。様々な抗原表現型のRBCの複数の試料を選択することによって、临床上重要なアロ抗体の存在又は不存在を検出することが可能である。

## 【背景技術】

## 【0002】

凝集反応アッセイは従来、溶液中、すなわち試験管内で行われている。特に反応が弱い場合、試験管の凝集反応用のデータ解釈は、熟練した、経験のある技術者を必要とする。しかしながら近年、ゲルフォーマットや被膜固相フォーマットのような新しい技法が、開発されてきた。ゲル技法はデキストラン-アクリルアミドゲルを通した赤血球凝集反応が制御されるという原理に基づいている [Judd WJ, Steiner EA, Knafel PC, Masters C. The gel test: use in the identification of unexpected antibodies to blood group antigens. *Immunohematology* 1998; 14: 59-62]。マイクロチューブは、ゲル、バッファ及び試薬の混合物で充填される。ゲルの頂部で、患者の血清と様々な既知の赤血球との混合物が添加され、制御された条件下でのゲルを通した遠心分離がその後続く。陰性反応では、細胞はゲルを通過し、マイクロチューブの底部で小球状になる。逆に陽性反応では、最も強い反応（最大の凝集反応塊）が最小ないし観察不能な移動を示し、ほとんどの赤血球が、ゲル微小カラムの頂部で、あるいはその近くで捕捉され、ゲル中の様々な準位で捕捉される。Immucor社により開発された固相システムは、ヒト赤血球固定化用のマイクロウェルを提供し、対応する赤血球抗原に対するIgG赤血球抗体の検出用固相アッセイに用いられる [Plapp FV, Sinor LT, Rachel JM, et al. A solid phase antibody screen. *Am J Clin Pathol* 1984; 82: 179]。ウェルは、マイクロウェル表面への、ユーザが選択した赤血球の固定化を可能にする化学カップリング剤で被膜される。被膜したウェルは、抗体抗原反応を促進する条件下で、血清、血漿又はその他の試薬を含む血液製剤と共にインキュベートされる。インキュベーションに続いて、未結合の残留免疫グロブリンが、ウェルと抗IgG被膜された、添加した指示赤血球からすすがれる。遠心分離は、指示赤血球を固定化赤血球層に結合した抗体と接触させる。陽性試験の場合、IgG-抗IgGは、指示赤血球と感作される固定化細胞との間の形態を複雑にする。架橋抗体の結果として、指示細胞は、第2の固定化層として固定化細胞と接着する。検出可能な抗体抗原相互作用がない場合（陰性試験）、指示赤血球は固定化細胞へ結合せず、すし詰め状態のボタンのように、ウェルの底で小球状になる。

## 【0003】

10

20

30

40

50

細胞膜は、真核細胞内部と外部環境との間の界面を形成する。従って、この膜に埋め込まれたタンパク質の機能は多様であり、細胞外信号の細胞-細胞及び細胞-細胞外マトリクス認識、感知、及び伝達と、細胞内外への溶質及び水分子の輸送とを含んでいる。細胞表面のタンパク質集合の不均一性は、抽出された膜タンパク質又は未精製の細胞可溶化物を用いたインビトロアッセイの開発の困難性につながっている。赤血球膜は、二重膜と、埋め込まれたタンパク質と糖タンパク質とのアレイと、細胞骨格タンパク質ネットワークの複合体層とからなる複雑な構成である [Steck, T. L. The organization of proteins in the human red blood cell membrane. *J. Cell Biol.* vol. 62 (1974) 1-19; Byers, T. L. and Branton, D. Visualization of the protein associations in the erythrocyte membrane skeleton. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* vol. 82 (1985) 6153-6157; Seeman, P., Cheng, D., and Iles, G. H. Structure of membrane holes in osmotic and saponin hemolysis. *J. Cell Biol.* vol. 56 (1973) 519-527]。

10

## 【0004】

プローブとしてコード化したインタクト細胞を用いることは、細胞表面レセプタに結合するリガンドを選別するための魅力的な代替方法を提供し、高スループット技術を受入可能な小型化され、多重化されたプラットフォームの開発を与える。

20

## 【0005】

赤血球内溶質の封入は、薬剤輸送及びターゲティングの手段として広く研究されてきた [Ihler G. M., Glew, R. H. and Schnure, F. W. Enzyme loading of erythrocytes. *PNAS* vol. 70 (1973) 2663-2666; DeLoach, J. R., Harris, R. L. and Hiler, G. M. An erythrocyte encapsulator dialyzer used in preparing large quantities of erythrocyte ghosts and encapsulation of pesticide in erythrocyte ghosts. *Analytical Biochemistry* vol. 102 (1980) 220-227; Baker, R. F. Entry of ferritin into human red cells during hypotonic haemolysis. *Nature* vol. 215 (1967) 424-425; Marsden, N. V. B., and Ostling, S. G. Accumulation of dextran in human red cells after haemolysis. *Nature* vol. 184 (1959) 723-724]。このアプローチにおいて、軽度の浸透圧溶血が、赤血球の膜有孔性の変化を誘発し、タンパク質及び小さな溶質とほぼ同一サイズのプローブが、赤血球内部に分配することを可能にする。溶血後のイオン強度（等浸透圧条件の復元）を適宜操作することによってこの孔は再封入でき、赤血球に分配された溶質を永久に捕捉する（赤血球ゴーストとしても知られている）。再封入されたゴーストを洗浄することによって、外部媒質から過剰な溶質を除去する。このアプローチを用いて、蛍光性赤血球ゴーストを与えるための蛍光標識されたデキストランを負荷することは、文献に報告されている [Doberstein, S. K. et al. Fluorescent erythrocyte ghosts as standards for quantitative flow cytometry. *Cytometry* vol. 20 (1995) 14-18]。

30

40

## 【0006】

しなしながら、アッセイでの最封入されたゴーストの使用は、細胞表面タンパク質とその配向性が、ゴーストの調製と溶質負荷処理によって影響を及ぼされないことを必要とする。特に低イオン強度バッファの使用、又はバッファ中にマグネシウムイオンがないこと

50

は、分子構成の脱凝集反応と、膜のインサイドアウトのフォールディングを導き、本目的のために使用不可能な生成物を与える。

【0007】

細胞を蛍光コード化する代替的な方法は、膜透過性の脂溶性染料の使用 [Tanaka, Y. and Schroit, A. J. Insertion of fluorescent phosphatidylserine in the plasma membrane of red blood cells. *J. Biol. Chem.* vol. 258 (1983) 11335 - 11343; Tokumasu, F. and Dvorak, J. Development and application of quantum dots for immunochemistry of human erythrocytes. *Journal of Microscopy*, vol. 211 (2003) 256 - 261] と細胞表面に対する反応性染料の不可逆性共有結合 [Donald, M. M. et al. RBCs labeled at two biotin densities permit simultaneous and repeated measurements of circulating RBC volume. *Transfusion*, vol. 44 (2004) 431 - 437; Suzuki, T. and Dale, G. L. Biotinylated erythrocytes: In-vivo survival and in vitro recovery. *Blood*, vol. 70 (1987) 791 - 795] を含んでいる。あるとしてもわずかなデータしか、リガンド-レセプタ相互作用上の共有結合の効果については存在しない [Cowley, H., et al. Biotinylation modifies red cell antigens. *Transfusion*, vol. 39 (1999) 163 - 168]。更に、いくつかの染料が多数の異なる色を生成するのに用いられる場合にコード化反応が厳密に制御されないのであれば、多数の別個のコードは表面コード化アプローチを用いて構成することには難しく、異なるスペクトルフィンガプリントを有する多数の染料ライブラリが用いられる。従って、反応を精密にモニタリングせずに、数個の染料の色を用いることができるコード化方法が所望されている。

【0008】

試料中の抗体がゴーストに結合したことを示すべく、コード化したゴースト細胞と第2の抗体を用いた多重アッセイフォーマットにおいて、例えば、フローサイトメトリを用いて、ゴースト細胞アレイの解読がなされる [Wagner, F. F. and Flegelel, W. A. Principles and applications of red blood cell flow cytometry. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* vol. 25 (1998); Roback, J. D., Barclay, S. and Hillyer, C. D. An automatable platform for accurate immunohematology testing by flow cytometry. *Transfusion* Vol. 43 (2003) 918; Roback, J. D., Barclay, S. and Hillyer, C. D. Improved method for fluoresce cytometric immunohematology testing. *Transfusion* vol. 44 (2004) 187; Sharon, R. and Fibach, E. Quantitative flow cytometric Analysis of ABO Red Cell Antigens. *Cytometry* vol. 12 (1991) 545 - 549; Arndt, P. A. and Garratty, G. Flow cytofluorometric analysis in red blood cell immunology. *Transfusion Medicine and Hemotherapy* vol. 31 (2004)]。高スループットに付随する利点を用いてインサイツでの解読を可能にする、その他の解読方法が所望されている。

【発明の開示】

10

20

30

40

50

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0009】

RBCアロ抗体の検出及び評価方法が開示され、既知の抗原が存在すれば、蛍光コード化した赤血球又は赤血球ゴーストを生成し、血液/血清/血漿試料中の抗体の存在を検出するためにそれらの赤血球又は赤血球ゴーストを用い、好ましくは蛍光サンドイッチ型のイムノアッセイを用いることに基づいている。蛍光RBC又はRBCゴーストの多重集合がまず生成され、特定の表現型を表わす各々の集合が、蛍光サイン又はコードとユニークに連結する。陽性反応の場合においては、試料中のアロ抗体が、抗原-抗体複合体を形成するコード化細胞上の同族の抗原に結合する。未結合の免疫グロブリンを除去するための洗浄後に、(コード化染料より、異なるスペクトルサインを有する)蛍光第2試薬が導入され、細胞上に捕捉されたアロ抗体に結合する。蛍光第2試薬によって生成されたこのアッセイ信号は、コード化蛍光を有する結合と相関することによって、特定の細胞/ゴーストと相関し、従って、細胞及び同族のアロ抗体上に存在する抗原を同定することができる。コード化した細胞の解読は、蛍光顕微鏡検査法及び2次元画像分析法を用いてインサイトが為すことができ、解読画像がアッセイ画像と比較され相関される(特許された米国特許出願第09/448,240号参照)。

10

## 【課題を解決するための手段】

## 【0010】

以下の例は、コード化したゴースト細胞を用いてアッセイを行うと同時に、コード化したゴースト細胞の調製処理を概説している。この処理は、反応の厳密なモニタリングを要求することなく、数個の染料を用いたコード化を可能にし、結果として生ずるゴーストは、蛍光型イムノアッセイで用いられる場合、試料中の抗体を検出するために正確な配向性で抗原を示す。アッセイ結果のインサイト解読例も含まれている。

20

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0011】

コード化したゴースト細胞を調整する際に、好ましいバッファ条件(pHがほぼ中性、の濃度0.1乃至2mMのバッファと、イオン強度がほぼ等浸透圧のマグネシウムイオン)は、細胞表面タンパク質の反応性と元の配向性を保護するのを手助けし、それらのタンパク質が接近できないように転化されることを防いでいる。例示的な方法は、以下の例1で示されている。

30

## 【実施例】

## 【0012】

例1：赤血球の分離と標識されたゴーストの調製

赤血球洗浄保管バッファ：

500mlの蒸留水に溶解された

塩化ナトリウム	= 4.383 g
一ナトリウムリン酸塩	= 0.345 g
塩化マグネシウム六水和物	= 0.203 g
フェニルメチルスルホン酸クロリド	= 0.0435 g

40

赤血球溶血バッファ：

500mlの蒸留水に溶解された

一ナトリウムリン酸塩	= 0.69 g
塩化マグネシウム六水和物	= 0.203 g
フェニルメチルスルホン酸クロリド	= 0.0435 g

赤血球封入溶液：

50mlの蒸留水に溶解された

塩化ナトリウム = 6 g

50

手順：

- i) 1 ml の保管バッファを、2 ml の遠心管に入れる
- ii) 刺した指の鮮血を1滴加え (~ 25  $\mu$ L)、緩やかに逆位にして混ぜ合わせる
- iii) ~ 600乃至1000 gで2分間遠心分離し、上澄みを除去する。1.5 ml の保管バッファを加え、緩やかにRBCペレットを再懸濁し、遠心分離を繰り返す。上澄みを捨て、2回繰り返す。
- iv) 保管バッファ中の蛍光溶質 (又は溶質混合物) を所望の濃度に調整し、200 ml の溶液を赤血球ペレットに加える。RTで5分間インキュベートする。
- v) 1.5 ml のRBC溶血バッファを (iv) 中の溶液に加え、逆位によって素早く混合し、RTで30秒間インキュベートする
- vi) 250  $\mu$ l のRBC封入溶液を (v) に加え、逆位で混合する
- vii) ~ 16,000乃至20,000 gで3分間遠心分離し、上澄みを捨てる。1.5 ml の保管バッファ中でゴーストペレットを再懸濁し、遠心分離 - 再分散サイクルを3回繰り返す。
- viii) 0.13 g/Lのアジ化ナトリウムを伴う1 ml の最終保管バッファ中でペレットを再懸濁し、使用するまで2乃至4 で保管する。1月以上の間保管すると、ゴーストは安定する。

図1 (a) は処理のフローチャートを示す。図1 (b) はサイズ分布を示し、図1 (c) は上述の処理を用いてコード化したゴースト細胞の蛍光画像を示す。

【0013】

#### 例2：コード化したゴースト細胞のライブラリの生成

分子量3000 (標識密度1 mol/mol) のTAMRA標識デキストランは、Molecular Probe社から取得し、分子量4000 (標識密度0.05 mol/mol - 0.5 mol/mol) のFITC標識デキストランは、Sigma-Aldrich社から取得した。5つの濃度の異なる保存液10 mg/ml、2 mg/ml、0.4 mg/ml、0.08 mg/ml及び0.016 mg/mlが、それぞれ保管バッファを用いて調製された。コード化したゴーストの10個の異なる集合は、例1に述べた処方箋を用いて調製した。ゴーストは、その蛍光性についてフローサイトメトリを用いて評価された。TAMRA及びFITCデキストランの別個の1:1 (v/v) 混合物を用いて、2つのコード化した染料を所有するコード化したゴーストを生成した。

【0014】

#### 例3：磁気反応性のコード化されたゴースト細胞のライブラリ生成

コード化したゴースト細胞は、当該技術分野で既知の磁気細胞表面標識法によって与えられる。いくつかの会社が対象の細胞を磁気標識して分離するキットを販売している ([www.miltenyibiotec.com](http://www.miltenyibiotec.com)、[www.immunicon.com](http://www.immunicon.com)、[www.dvna1biotech.com](http://www.dvna1biotech.com))。磁力標識された全血液細胞は、商業上の製品 ([www.diagast.com](http://www.diagast.com)) としても利用可能である。図2に概説したように、特定の所望のアプローチは、試料からの抗体の結合の後に続いて加えられる、抗ヒトIgGで被膜された磁性ナノビーズを用いた標識を利用している。

【0015】

#### 例4：コード化されたゴーストを解読する方法

上に概説した方法は、明るい、光安定性の、容易に多重化される、蛍光コード化したゴーストを生成している。従って、好結果の解読ストラテジは、フローサイトメトリのような従来の連続照合技術を含め、赤血球を評価するのに従来使用されてきた混合したものの内部から単一の細胞集合の識別を果たすことができるいずれのプラットフォームも含まれている。代替的に、2次元画像分析法と連結した蛍光顕微鏡検査法 [名称READ<sup>TM</sup>、米国特許第6,797,524号参照; "Array Cytometry" 米国特許第6,387,707号参照、双方が引用として取り込まれる] は、解読に用いることができる。機能化した基質上に配置すること [Albrecht, D. R. et al. Photo- and electropatterning of hydrogel-en

10

20

30

40

50

capsulated living cell arrays. Lab Chip vol. 5 (2005) 111 - 118; Soen, Y. et al. Detection and characterization of cellular immune responses using peptide-MHC microarrays. PLOS Biology vol. 1 (2003) 429 - 438; Kato, K. et al. Immobilized culture of nonadherent cells on an oleyl poly(ethylene glycol) ether-modified surface. Biotechniques vol. 35 (2003) 1014 - 1021]、及び画像ファイバ上への捕捉 [Biran, I. And Walt, D. R. Optical imaging fiber-based single live cell arrays: A high-density cell assay platform. Analytical Chemistry vol. 74 (2002) 3046 - 3054] のような事前形成を可能にする方法を含む、細胞の2次元アレイについての多様な方法が報告されている。更に、磁気細胞の選択 [Tibbe, A. G. J. et al. Cell analysis system based on immunomagnetic cell selection and alignment followed by immunofluorescent analysis using compact disk technologies. Cytometry vol. 43 (2001) 31 - 37]、マイクロ流体チャネル [Shelby, J. P. et al. A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes. Proc. Nat. Acad. Sci. vol. 100 (2003) 14618 - 14622]、交流電気泳動 [米国特許第6,387,707号; Minerick, A. R. Manipulating and characterization of red blood cells with alternating current field in microdevices. Electrophoresis vol. 24 (2003) 3703 - 3717] のような、動的又はリアルタイムアレイ組立法がある。

#### 【0016】

##### 例5：全赤血球を用いたイムノアッセイ

図3は、全血液又はRBCゴーストを用いてイムノアッセイを行うための処理フローを示している。この例において、洗浄した全RBC（表現型Fy(a+, b-), (K-, k+)）は、モノクローナルマウス抗Fyとモノクローナルマウス抗K（双方がニューヨーク血液センタのMarion Reed博士からの研究室から贈り物である）と別個に反応させた。双方の場合において、Cy5標識ヤギ抗マウスポリクローナル抗体（Jackson ImmunoResearch社、ペンシルベニア州ウェストグロブ）は、第2の蛍光検出抗体として用いられた。予想通り、特異的な信号は抗Fy<sup>a</sup>の場合に見られ、抗K抗体の場合には見られなかった（結果は示さず）。

#### 【0017】

##### 例6：コード化したゴーストを用いたイムノアッセイ

イムノアッセイは例5に概説したように、洗浄された全RBC（表現型(M+, N-)）と、モノクローナルラット抗M及び抗N抗体（米国Biological社、マサチューセッツ州スワンプスコット）とから調製されるゴースト細胞を用いて行われた。抗Mを伴う反応は、予期される蛍光信号を生成したが、予想通り、抗Nはバックグラウンドにわたり、どんな検出可能な信号も生成しなかった。図7は抗M抗体を用いたイムノアッセイ完成後のRBCゴーストの画像を示す。

#### 【0018】

##### 例7：全赤血球とアロ血清を用いたイムノアッセイ

一連のイムノアッセイは、表現型試薬RBC(0.8%サージスクリーン、Ortho

10

20

30

40

50

Clinical Diagnostics社、ニュージャージー州)及び試薬血清(Ortho Clinical Diagnostics社、ニュージャージー州)を用いて実行された。全ケースで、PE標識ヤギ抗ヒト抗体(Jackson Immuno research社、ペンシルベニア州ウエストグロブ)(1:100希釈)が、第2の検出抗体として用いられた。抗体陰性AB血液型血清は、負のコントロールとして用いられた。結果は以下の表1に示した。蛍光イムノアッセイと報告された表現型(抗グラム)との結果は一致している。

【表1】

サージスクリーン #1		
血清	アッセイ結果 蛍光強度 (a.u)	報告された抗グラム
抗S	1755	+
抗s	78	0
抗Fy <sup>a</sup>	1139	+
抗Fy <sup>b</sup>	78	0
抗k	1592	+
陰性血清	96	0

10

サージスクリーン #2		
血清	アッセイ結果 蛍光強度 (a.u)	報告された抗グラム
抗S	34	0
抗s	4508	+
抗Fy <sup>a</sup>	516	+
抗Fy <sup>b</sup>	258	+
抗k	1197	+
陰性血清	37	0

20

サージスクリーン #3		
血清	アッセイ結果 蛍光強度 (a.u)	報告された抗グラム
抗S	831	+
抗s	5564	+
抗Fy <sup>a</sup>	63	0
抗Fy <sup>b</sup>	853	+
抗k	985	+
陰性血清	36	0

30

## 【0019】

用語、表現及び例示はここでは具体例であり制限はされないこと、及び本発明の範囲は請求項によってのみ制限され、請求される主題の総ての等価物を含んでいることは、理解すべきである。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0020】

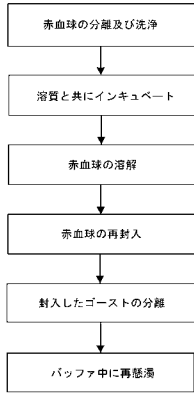
【図1】図1は、赤血球分離及びゴースト細胞調製用のフローチャートである。

【図2】図2は、結合後に続く例示的な手順のフローチャートであり、第2の抗体を展示する磁性ビーズを用いて解読用アレイ内の反応性ゴーストを捕捉している。

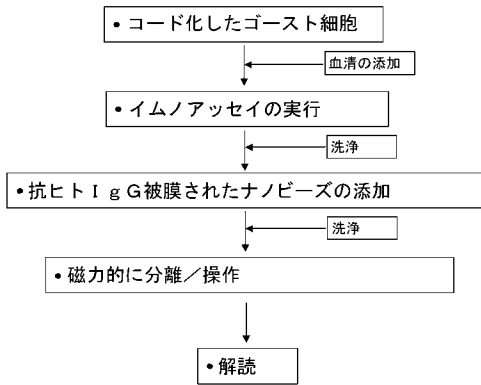
【図3】図3は、ゴーストを用いた血清中で反応性抗体を、かつ、サンドウィッチアッセイフォーマット中で第2の検出抗体を検出する手順のフローチャートである。

40

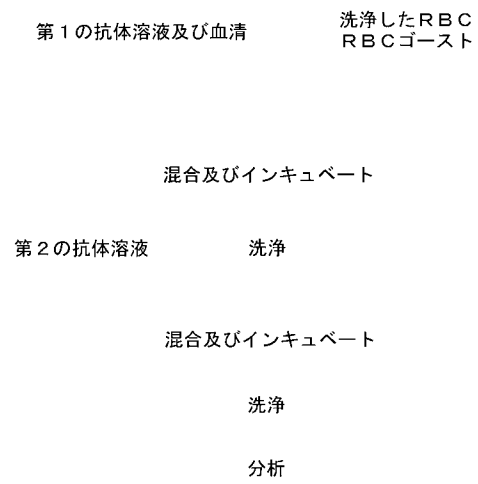
【 図 1 】



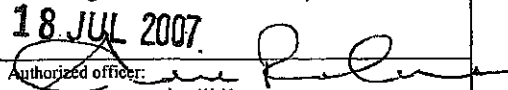
【 図 2 】



【 図 3 】



## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 07/00234
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> IPC(8): G01N 33/53 (2007.01) USPC: 436/520 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) USPC: 436/520 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC: 436/521, 522; 435/6, 7.1 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WEST: (PGPB,USPT,EPAB,JPAB): alloantibodies, monoclonal antibody, flow cytometry, ghost cells, erythrocytes, blood, monosodium phosphate, magnesium chloride hexahydrate, phenylmethylsulfonylchloride Espacenet: ghost, cells, blood; Google Scholar: ghost, cells, erythrocytes, blood, dye, lyse, phenylmethylsulfonylchloride		
<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 — Y	US 5,786,711 A (VYAS et al.) 7 July 1998 (07.07.1998), abstract, col 6, ln 45; col 7, ln 52; col 7, ln 56-67; col 9, ln 4-5; col 9, ln 49-52	1-6 — 12
X — Y	JP 62-265567 (MASAO et al.), 18 November 1987 (18.11.1987), (abstract) [online] [retrieved on 2007-05-16]. Retrieved from esp@cenet database.	7-8 and 14 — 9-13
Y	US 5,389,549 A (HAMAGUCHI et al.) 14 February 1995 (14.02.1995), col 26, ln 23.	9 and 13
Y	US 2004/0137641 A1 (HOLTLUND et al.) 15 July 2004 (15.07.2004), para [0050]	9, 11 and 13
Y	US 4,824,941 A (GORDON et al.) 25 April 1989 (25.04.1989), col 15, ln 9	9 and 13
Y	LIEBER et al. Dynamics of the Holes in Human Erythrocyte Membrane Ghosts. J of Biol Chemistry, October 1982, Vol 257, No 19, pp 1160	10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/>		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but 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 "I" 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 17 May 2007 (17.05.2007)		Date of mailing of the international search report <b>18 JUL 2007</b>
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201		Authorized officer:  Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

## フロントページの続き

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72)発明者 バネルジー, スカンタ

アメリカ合衆国 ニュージャージー州 08534, ペニントン, アンバーリードライブ 307  
Fターム(参考) 4B065 AA93X BA22 BA24 CA46

专利名称(译)	多重检测抗红细胞同种抗体		
公开(公告)号	<a href="#">JP2009529655A</a>	公开(公告)日	2009-08-20
申请号	JP2008549566	申请日	2007-01-04
申请(专利权)人(译)	生物阵列方案有限公司		
[标]发明人	パネルジースカンタ		
发明人	パネルジー,スカンタ		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543 C12N5/06		
CPC分类号	G01N33/80 Y10T436/106664 Y10T436/13 Y10T436/2525		
FI分类号	G01N33/53.N G01N33/543.575 G01N33/53.Y C12N5/00.E		
F-TERM分类号	4B065/AA93X 4B065/BA22 4B065/BA24 4B065/CA46		
代理人(译)	Goichi高桥 美智子米村		
优先权	11/327589 2006-01-06 US		
其他公开文献	JP5154445B2		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了用于检测样品中的抗体的方法，其中所述抗体靶向由红细胞或红细胞重影表达的抗原。不是检测特定抗原抗体对之间的结合事件（如在传统的基于凝集的测定中），本文的方法允许多重检测临床上重要的针对血型抗原的同种异体免疫抗体。具体地，该方法涉及产生具有已知抗原呈递的荧光编码的红细胞或红细胞重影，并使用它们用荧光夹心型免疫测定法检测血清/血浆中抗体的存在。可以使用基于流式细胞术或荧光显微镜的成像技术来读取测定结果。

