

(19)日本国特許庁(J P)

(12) 公開特許公報(A) (11)特許出願公開番号

特開2003 - 210198

(P2003 - 210198A)

(43)公開日 平成15年7月29日(2003.7.29)

(51) Int.Cl <sup>7</sup>	識別記号	F I	テ-マコード* (参考)
C 1 2 Q 1/68		C 1 2 Q 1/68	Z 2 G 0 4 5
G 0 1 N 33/50		G 0 1 N 33/50	P 4 B 0 6 3
33/53		33/53	M

審査請求 有 請求項の数 15 O L (全 22数)

(21)出願番号 特願2002 - 347133(P2002 - 347133)

(22)出願日 平成14年11月29日(2002.11.29)

(31)優先権主張番号 60/337282

(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)

(71)出願人 397067152

ファイザー・プロダクツ・インク

アメリカ合衆国コネチカット州グロトン市

イースタン・ポイント・ロード

(72)発明者 ポーラ アン ミュールバウアー

アメリカ合衆国,コネチカット 06340,グロ

トン,イースタン ポイント ロード,ファ

イザー グローバル リサーチ アンド

ディベロップメント

(74)代理人 100077517

弁理士 石田 敬 (外4名)

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 数値染色体異常を有する細胞の検出方法

(57)【要約】

【課題】 本発明は、数値染色体異常を有する有糸分裂細胞および細胞中で数値染色体異常を誘発する薬品を検出する方法を提供する。

【解決手段】 好ましい実施形態においてこの方法は、有糸分裂中の細胞を検出する有糸分裂マーカーと、有糸分裂細胞中のDNAの量を表示する定量用DNA着色剤を含む。着色された細胞は、好ましくはフローサイトメトリによって分析される。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で有糸分裂細胞を処理すること、および前記定量用DNA着色剤を用いて前記細胞中のDNAの量を定量することを含む、数値染色体異常を検出する方法。

【請求項2】 前記DNAの定量化がフローサイトメトリーの使用を含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】 さらに、前記細胞が正常な倍数性を有する細胞中のDNAよりも多いかまたは少ないDNAを含有することが前記定量化によって決定されるという前提で、前記細胞を数値染色体異常を有するものと特徴づけることを含む、請求項1に記載の方法。

【請求項4】 細胞が有糸分裂マーカーによって有糸分裂性であることが確認されるという前提で、さらに前記細胞が定量用DNA着色剤によって正常な倍数性を有する細胞中のDNAよりも多いかまたは少ないDNAを含有することが決定されるという前提で、細胞の集団を前記有糸分裂マーカーおよび前記定量用DNA着色剤で処理すること、および前記細胞を数値染色体異常を有するものとして前記集団から識別することを含む、細胞の集団から数値染色体異常を有する細胞を識別する方法。

【請求項5】 前記細胞が有糸分裂性であることを確認するために、また前記細胞が正常な倍数性を有する細胞中のDNAよりも多いかまたは少ないDNAを含有することを決定するために細胞サイトメトリーを使用する、請求項4に記載の方法。

【請求項6】 有糸分裂マーカーが、有糸分裂中に起こるヒストンのリン酸化を検出する薬品である、請求項1または4に記載の方法。

【請求項7】 有糸分裂マーカーが6G3単クローン抗体である、請求項1または4に記載の方法。

【請求項8】 定量用DNA着色剤が、挿入性色素、副溝バイнда、シアニン色素、およびヨウ化プロピジウムから選択される、請求項1または4に記載の方法。

【請求項9】 定量用DNA着色剤がヨウ化プロピジウムである、請求項1または4に記載の方法。

【請求項10】 細胞が有糸分裂マーカーによって有糸分裂性であることが確認されるという前提で、さらに前記細胞が定量用DNA着色剤によって正常な倍数性を有する細胞中のDNAよりも多いかまたは少ないDNAを含有することが決定されるという前提で、細胞の集団を前記有糸分裂マーカーおよび前記定量用DNA着色剤で処理すること、前記細胞を数値染色体異常を有するものとして前記集団から識別すること、および前記細胞を単離することを含む、細胞の集団から数値染色体異常を有する細胞を単離する方法。

【請求項11】 前記細胞の集団が各々異なる数値染色体異常を有する少なくとも2つの細胞の分集団を包含する、また前記方法がさらに前記分集団を互いにまた前記細胞の集団から分離することを含む、請求項10に記載

\*の方法。

【請求項12】 細胞またはその子孫が有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で処理されている間ずっと有糸分裂性であるという前提で、前記細胞を供試薬品で処理すること、前記細胞またはその子孫を有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で処理すること、および前記定量用DNA着色剤を用いて前記細胞中のDNAの量を定量することを含む、細胞中で数値染色体異常を誘発する作用物質を特定する検定法。

【請求項13】 前記細胞が、末梢血液の単核細胞、リンパ球、上皮細胞、および結合組織細胞である、請求項12に記載の検定法。

【請求項14】 有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤を含む、細胞中の数値染色体異常を検出するためのキット。

【請求項15】 有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤を含む、組成物。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤を用いた細胞中の数値染色体異常の検出に関する。異数性および倍数性などの数値染色体異常は、細胞毒性および新生物形成の潜在性の判断基準であることができる。

【0002】

【従来の技術】異数性および倍数性などの数値染色体異常は、先天性欠損、妊娠による消耗、および癌を含む数多くの疾病と関連している。疾病の例には、ダウン症候群、クラインフェルター症候群、ターナー症候群、三倍X症候群、四倍X症候群、五倍X症候群、XYY症候群、単一染色体性、または7、10、11、13、18、21、X、およびYを含む任意の染色体の多染色体性がある。加えて、倍数性および異数性などの数値染色体異常は、ヒトの自然流産にしばしば見出される。

【0003】

【0003】数値染色体異常と関連する新生物の例には、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性非リンパ性白血病(ANL)、慢性リンパ性白血病( CLL)、および慢性骨髄球性白血病(CML)などの白血病、ならびに膀胱癌、結腸癌、大腸癌、悪性黒色腫、および子宮癌などの充実性腫瘍がある。加えて、げっ歯類動物の発癌の多段階過程における異数性の役割は、幾つかの腫瘍発生モデルに示されている。

【0004】

【0004】加えて、ベノミル、ジアゼパム、およびグルセオフルピンなどの数多くの化合物が、数値染色体異常を引き起こすことが報告されている。

【0005】

【0005】数値染色体異常を検出するための大部分の既存の方法は、染色体を数える方法に依拠しており、この方法は中期の細胞をギムザなどのDNA特異的な着色剤で着色し、個々の染色体を数える。この方法は、数千個の細胞を手作業で数えることが必要であるため非常に骨

の折れる仕事である。別法では、小核小体の誘発を用いて化学的クラストゲンを検出する。しかしながらこの方法は、クラストゲンとアノイゲン (aneugen) を見分けるのが難しく、染色体の非分離に敏感でない。さらに別の手法には、アニールして染色体上の相補的配列にすることができる、したがって特異的マーカーの役割を果たすことができる染色体特異的なDNAプローブを用いた蛍光in situハイブリッド形成法 (FISH) がある。これらのDNAプローブには、特定の染色体の長さ全体にわたって一様な、またはほぼ一様な一連の蛍光シグナルをもた

らす領域特異的または全染色体プローブがある。  
【0006】しかしながら、これらの手法はすべて、骨の折れる仕事で時間がかかる可能性がある。したがって、数値染色体異常を識別するための迅速で、費用がかさまず、信頼性の高い方法が必要である。このような方法は、生物学的試料中の数値染色体異常を検出するために、また数値染色体異常を誘発する化合物を特定するために用いることができる。

【0007】本出願を通じて引用される文献資料、発行済み特許、および公開特許出願を、その全体として本明細書中に援用する。

【0008】

【課題を解決するための手段】本発明は、細胞中の1または複数の数値染色体異常を検出するための方法を提供する。数値染色体異常は、倍数性または異数性などの異常な倍数性であってもよい。好ましい実施形態においてその方法は、有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤を用いて細胞を標識し、それによって有糸分裂時の細胞中のDNA量を定量し、有糸分裂細胞中の1または複数の数値染色体異常の存在を検出することを含む。有糸分裂マーカーは、有糸分裂細胞の特性、例えば有糸分裂時のクロマチン凝縮と相関関係のあるヒストンのリン酸化、例えばセリン10上のヒストンH3のリン酸化を検出する薬品であってもよい。この薬品は、6G3単クローン抗体などの抗体であってもよい。任意の定量用DNA着色剤を、例えば挿入色素、副溝バインダ、またはシアニン色素からなる群から選択することができる。好ましい定量用DNA着色剤は、ヨウ化プロピジウムである。好ましくはこの方法には、有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で着色した細胞を、着色細胞の分析のためにフロー

サイトメトリーにかけることが含まれる。  
【0009】本発明はまた、有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色マーカーで細胞の集団を着色し、それによって有糸分裂時に細胞中のDNAの量を定量化し、1または複数の細胞中の1または複数の数値染色体異常の存在を決定することを含む、細胞の集団中の1または複数の細胞中の1または複数の数値染色体異常を検出するための方法を提供する。

【0010】本発明はまた、有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で細胞の集団を着色すること、その細胞

をフローサイトメトリーにかけ、それによって細胞のDNA内容を視覚化し、それによって1または複数の染色体異常を有する細胞を識別すること、および細胞の集団から1または複数の染色体異常を有する1または複数の細胞を分離することを含む、細胞の集団中の1または複数の数値染色体異常を有する1または複数の細胞を単離する方法を提供する。分析および分離の好ましい方法には、フローサイトメトリーがある。この方法は、少なくとも2つの異なる細胞の分集団を互いに、また細胞の集団から分離することを含むことができる。本発明の方法は、有糸分裂を受ける任意の型の細胞、またはミトジェンにより刺激されて有糸分裂を受けることができる細胞、例えば真核細胞に適用することができる。細胞の例には、ヒトの細胞などの哺乳類の細胞がある。好ましい細胞には、体細胞および生殖細胞がある。これらの細胞は生物学的試料、例えば生検から得るか、または培養細胞、例えば細胞株から得られる細胞であることができる。

【0011】本発明はさらに、細胞中で数値染色体異常を誘発する化合物を特定するための検定法を提供する。好ましい実施形態において検定法は、任意の潜在的な数値染色体異常を娘細胞中に誘発させるのに十分な時間、細胞の集団を供試化合物と接触させること、この細胞を本発明の方法にかけること、および供試化合物と接触した細胞の集団中に染色体異常を有する細胞の数が供試化合物と接触しなかった類似の細胞の集団と比べて多いならば、その供試化合物は細胞中に数値染色体異常を誘発することを示すようにして細胞中の染色体異常の存在を決定することを含む。任意の真核細胞、例えば哺乳類、例えばヒトの細胞をこの検定に用いることができる。

【0012】別の実施形態において本発明は、ヒトの被検者または動物から得た細胞の集団中の1または複数の染色体異常を含有する細胞の存在を決定する方法を提供する。この方法は好ましくは、ヒトの被検者または動物から細胞試料を入手すること、その細胞試料を本発明の方法にかけ、それによってヒトの被検者または動物中の1または複数の数値染色体異常を含有する細胞の存在を決定することを含む。疾病の例には、さまざまな種類の癌、生殖細胞の異常染色体性、ならびに三染色体性および一染色体性などの遺伝病がある。

【0013】本発明はさらに、細胞中の数値染色体異常を検出するためのキットを提供する。このキットは、細胞毒である化合物を特定するための、または試料中の数値染色体異常を識別するためのキットであることができる。キットは、有糸分裂マーカーまたは定量用DNA着色剤などの1つのマーカーを含んでもよい。好ましい実施形態においてキットは、有糸分裂マーカーと定量用DNA着色剤の両方を含む。キットが含むことができる他の構成要素には、補助のマーカー、検出試薬、緩衝剤、負

たは正の対照標準、および生物学的試料を得るための装置がある。キットはまた、取扱説明書を含むことができる。

【0014】本発明は、少なくとも細胞中の数値染色体異常の分析速度の劇的な向上、データ変動の低減、統計的検出力の増加、および有糸分裂集団中の数値染色体異常の判定の総合的改善をもたらす利点を提供する。

【0015】

[発明の詳細な説明] 本発明の少なくとも一部は、有糸分裂のマーカーで分裂している細胞の集団を標識し、そしてDNA含量の染色及びフローサイトメトリーを介する着色した細胞の視覚化が細胞の集団中の数値染色体異常を有する細胞を検出する単純明快な方法を可能にするという発見に基づいている。その結果は、余分または欠落した染色体あるいは余分の染色体の倍数を有する有糸分裂細胞の数を示す。

【0016】本発明の検出法、識別法、単離法、および検定法においては、細胞をまず有糸分裂マーカー、次いで定量用DNA着色剤で処理してもよく、あるいはこの逆の順序であってもよい。別法では、細胞をまず定量用DNA着色剤で処理し、続いてDNAの定量化を行ってもよい。次いで、数値染色体異常を示すこれらの細胞を有糸分裂マーカーで処理すると有糸分裂であるか非有糸分裂であるかを見分けることができる。別の選択肢として、まず細胞が有糸分裂であるか非有糸分裂であるかを見分け、次いで定量用DNA着色剤で処理して数値染色体異常を見分けることもできる。前述の選択肢はすべて本発明の範囲内にある。

【0017】本明細書で用いる用語は、当業界の通常の意味を持つが、本発明をさらにはっきりさせるために便宜上、この明細書、実施例、および添付の特許請求の範囲の中で採用する特定の用語および表現を下記に示す。

【0018】「アノイゲン」は、異数性を引き起こす化学薬品などの薬品である。「非アノイゲン」は、異数性を引き起こさない薬品である。

【0019】「異数性」および「倍数性」は、細胞が通常の半数体の数（「 $n$ 」）または二倍体の数（「 $2n$ 」）とは異なる染色体の数を有する状態である。ヒトの場合、染色体の正常な半数体の数は23であり、二倍体の数は46である。正常な細胞ならば46染色体の二倍体染色体の内容を有するはずである。異数体細胞は、正常な半数体の数の全倍数と等しくない染色体の数を有する。例えば異数体細胞は、三染色体性を有する細胞、すなわち1つの染色体の3つのコピーを有する細胞、または一染色体性、すなわち1つの染色体の単一のコピーを有する細胞であることができる。異数性は、有糸分裂の間に染色体の非分離の結果生ずる。倍数体細胞は、通常の二倍体の数すなわち $2n$ よりも大きい正常な半数体の数の数倍の染色体の数を有する細胞である。例えば倍数体細胞は、三倍体細胞（ $n = 69$ ）または四倍体細胞

（ $n = 92$ ）であることができる。

【0020】用語「生物学的試料」とは、生物または生物の構成部分（例えば細胞）から得られる試料を意味する。試料は任意の生物の組織または体液であることができる。試料は、患者から取り出された試料である「臨床試料」のこともしばしばあるはずである。このような試料には、喀痰、血液、血液細胞（例えば白色細胞）、組織または穿針生検試料、尿、腹膜液、および胸膜液、あるいはそれらから取り出された細胞があるが、これらには限定されない。生物学的試料にはまた、組織学的目的で採取された凍結切片などの組織の切片が含まれる。

【0021】細胞中の「数値染色体異常」とは、細胞中に正常の細胞と比べて余分の染色体またはその部分がより多量に存在すること、あるいは染色体またはその部分がより多量に欠落していることを意味する。

【0022】細胞の「染色体含量」とは、染色体またはその部分の数を意味する。二倍体細胞の正常な染色体の内容は $2n$ であり、半数体細胞のそれは $n$ である。有糸分裂中の二倍体細胞の正常な染色体の内容は $4n$ である。

【0023】「定量用DNA着色剤」とは、細胞のDNAの検出および定量化を可能にする薬品を意味する。好ましい定量用DNA着色剤は、DNAを着色する薬品、例えば挿入剤である。定量用DNA着色剤の例はヨウ化プロピジウムである。

【0024】「二倍体欠損」細胞は、同一種の正常な二倍体細胞よりも少ない染色体DNAを有する細胞である。

「二倍体過剰」細胞は、同一種の正常な二倍体細胞よりも多い染色体DNAを有する細胞である。

【0025】「標識」および「検出可能な標識」とは、これには限定されないが放射性同位元素、蛍光団、化学発光部分、酵素、酵素基質、酵素共同因子、酵素阻害剤、色素、金属イオン、リガンド（例えば、ピオチンまたはハプテン）などを含む検出能力のある分子を意味する。用語「蛍光剤」とは、検出可能な範囲で蛍光を示す能力のある物質またはその部分を意味する。本発明で使用することができる標識の例には、フルオレセイン、ローダミン、ダンシル、ウンベリフェロン、TexasRed、ルミノール、NADPH、または $\gamma$ -ガラクトシダーゼ、およびワサビダイコンペルオキシダーゼがある。

【0026】「マーカー」は、細胞の幾つかの特性、例えば細胞周期の段階あるいは細胞の構成部分、例えばDNAの存在および/または量に印を付ける薬品であることができる。

【0027】「有糸分裂マーカー」は、有糸分裂中に存在する細胞に印を付ける薬品である。好ましい有糸分裂マーカーは、セリン10部位でヒストンH3のリン酸化を検出する薬品である。

【0028】「倍数性」とは、染色体の正常な数の反復の程度を意味する。「倍数性」を有する細胞は、同一種

の正常な細胞とは異なる染色体の数を有する細胞であり、例えば異数体細胞または倍数体細胞であることができる。細胞の「倍数性の測定」とは、細胞中の染色体の数の決定を意味する。

【0029】本明細書で用いられる「小分子」とは、分子量が約5 kD未満、最も好ましくは約4 kD未満の組成物を指す。小分子は、核酸、ペプチド、ポリペプチド、擬似ペプチド、炭水化物、脂質、またはその他の有機（炭素含有）もしくは無機分子であってもよい。多くの医薬会社は、化学的および/または生物学的混合物、多くの場合真菌、細菌、または藻類抽出物の広範なライブラリーを所有しており、それらは本発明の検定法のいずれかでスクリーニングして数値染色体異常を引き起こす化合物をつきとめることができる。

【0030】「着色剤」とは、標的を検出することができる任意の薬品、例えばDNA色素を意味する。

【0031】一実施形態において本発明は、有糸分裂マーカーで細胞を標識すること、およびDNA内容を着色し、それによって有糸分裂時に細胞のDNAの量を定量し、またそれによって細胞の染色体内容を決定することを含む、細胞の染色体内容、例えば倍数性を決定する方法を提供する。有糸分裂マーカーで得られる標識の存在は、細胞が有糸分裂を受けつつあることの現われである。定量用DNA着色剤で得られる着色量は細胞中のDNA量、例えば細胞中の染色体またはその部分の数と相関性がある。有糸分裂マーカーの使用により、DNA内容の分析を有糸分裂細胞に限定することが可能になる。細胞の染色体内容を決定することには、異数性または倍数性の存在、あるいは細胞中の染色体の一部の存在または不在を決定することが含まれる。したがって、有糸分裂性であり4n以外のDNA内容を有する細胞は、数値染色体異常を持つと判定される。もしDNA内容が8nなど、4nよりも大きい正常な半数体の数の数倍ならば、細胞は倍数体と考えられる。もしDNA内容が実質的に4nと等しくなく、かつ4nよりも大きいnの整数倍でないならば、細胞は異数体と考えられる。さまざまな手法を用いて着色剤を検出および/または定量することができる。好ましい方法はフローサイトメトリーである。

【0032】また細胞中の数値染色体異常、例えば異数性および倍数性の存在は、有糸分裂の状態にかかわらず単に細胞のDNA内容を測定することによって推定することもできる。しかしながら、有糸分裂中の細胞を選択的に評価することにより数値染色体異常の検出が向上する。これは、有糸分裂細胞が細胞の周期性集団から選択され、そのすべてがDNA内容の測定によって数値染色体異常のように見える可能性のある死んだ細胞、プログラムされた細胞死（アポトーシスとして知られる）を受ける細胞、および細胞の断片または残屑を含む背景誤差の幾つかの源泉をかなり除去するために起こる。

【0033】この細胞は、細胞の集団内の細胞であって

もよい。したがって本発明は、有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で細胞の集団を着色し、それによって有糸分裂時の細胞のDNAの量を定量化することを含む、細胞の集団中の1または複数の細胞の数値染色体異常の存在を決定する方法を提供する。本発明は、細胞の集団中の1または複数の数値染色体異常を有する細胞の数を定量する方法を提供する。例えばこの方法は、4nとは異なる染色体数を有する有糸分裂細胞を数えることを含んでもよい。

【0034】本発明の方法は、細胞株ならびに一次細胞の培養細胞および動物から得た生物学的試料、例えば生検試料に適用可能である。有糸分裂を受ける任意の細胞を使用することができる。好ましい細胞には真核細胞がある。この細胞は、脊椎動物細胞、例えば哺乳類の細胞、例えばヒト；ウシ、ヒツジ、ブタ、ウマ、イヌ、ネコなど非ヒト霊長類；マウス；またはラットの細胞であってもよい。この細胞は、真核生物の任意の器官または組織、例えば血液細胞、上皮細胞、骨髄細胞、肺細胞、腎臓細胞、または羊水細胞から得られるものであることができる。本発明の方法はまた、酵母菌細胞、Drosophila細胞、Xenopus細胞、C. elegans、または染色体を有する任意の他の細胞に適用することができる。

【0035】使用される細胞株、例えば数値染色体異常を引き起こす薬品を見分けるのに使用される細胞株は、例えばAmerican Type Culture Collection (ATCC) 10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209から入手することができる。

【0036】細胞の生物学的試料は、「侵襲性」または「非侵襲性」のいずれかのサンプリング手段を用いて個体から得ることができる。サンプリング手段は、もし動物の皮膚または器官内からの細胞の採集を含むならば「侵襲性」とされると言われる。侵襲性の方法の例には、血液採集、精液採集、針生検、胸膜吸引、臍帯生検、羊水生検などがある。このような方法の例は、Kim, C. H. 等の論文 (J. Virol. 66:3879-3882 (1992))、Biswas, B等の論文 (Annals NY Acad. Sci. 590:582-583(1990))、およびBiswas, B等の論文 (J. Clin. Microbiol. 29:2228-2233 (1991)) で論じられている。

【0037】これとは対照的に「非侵襲性」サンプリング手段は、細胞が動物の内面または外面から集められるものである。このような「非侵襲性」サンプリング手段の例には「スワッピング」、すなわち涙、唾液、尿、糞材料、汗または蒸散、毛などの採集がある。このような採集は、鼻、口、直腸、膣、または耳の穴をスワッピングすることにより、皮膚または涙管に触れることにより、毛包を集めることによるなどにより達成することができる。本明細書で用いられる「スワッピング」は、細胞を集めるのに十分なやり方で吸着材を含有または具備する塗布具/採集具（「綿棒」）を表面に接触させることを指す。

【0038】細胞の集団は、細胞、例えば細胞株から得られる細胞の純集団、または細胞の多様な集団であってもよい。一実施形態において細胞は、末梢血液単核細胞(PBMC)である。さまざまな型の細胞からなる集団はさらに、1または複数の特殊型に濃縮することができる。例えばリンパ球をPBMCから単離することができる。細胞の分集団の単離は、アフィニティー精製または細胞表面マーカーと特異的に反応する抗体を用いたパンニング法などのさまざまな方法により行うことができる。

【0039】本発明の方法は単細胞に用いることができる。好ましくは本発明の方法は、少なくとも $10^0$ 、好ましくは少なくとも $10^2$ 、 $10^3$ 、 $10^4$ 、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、または $10^8$ 細胞の集団に用いられる。

【0040】一実施形態において細胞は、紡錘体遮断薬(例えば、コルセミド(登録商標)またはコルヒチン(GIBCO, BLR)およびTN16(Wako Pure chemical))と共にインキュベートされる。例えば、固定する前に細胞をコルセミド(約 $0.1\mu\text{g/ml}$ 、GIBCO)に1~3時間さらすことができる。「紡錘体遮断薬」は、有糸分裂時に細胞を蓄積させる薬品である。

【0041】着色する前または後に、任意選択で細胞を溶媒で処理して細胞膜を固定し、また任意選択で細胞膜の透過性をあげる。複数の固定液および固定条件がこの目的に適している。有用な固定液には、ホルムアルデヒド、例えば2%パラホルムアルデヒド;冷メタノール;冷エタノール、例えば70%エタノールがあるがこれには限定されない。細胞の固定はまた、パラホルムアルデヒドの3.7%溶液中で約15~30分インキュベートすることによって達成することができる。

【0042】固定の前に、細胞は小型ポアピペットを通してピペットで移され、単細胞の懸濁を確実にする。細胞はまたこの目的で、例えば $35\mu\text{m}$ ストレーナキャップ(Becton Dickinson, Franklin Lakes, N. J.)を通して濾過することもできる。

【0043】一般には細胞は、使用する特定のの方法、例えばフローサイトメトリーにとって十分な時間、特定の試薬中で固定化される。特定の細胞型に適した固定方法は、当業界で周知の方法に従って、例えばその特定のの方法に使用するのにどの固定方法が細胞の適切な着色を可能にするかを定めるためにさまざまな固定方法で検定を行うことによって決定することができる。

【0044】使用する有糸分裂マーカーおよび/または定量用DNA着色剤によっては、有糸分裂マーカーで標識する前に細胞の透過性をあげるが必要であるかも知れない。例えば、好ましくは細胞の抗体標識の前に細胞の透過性をあげる。易透化は、粗大なマーカーが普通なら細胞膜に関して不浸透性であるはずの細胞空間に入るのを可能にするのに役立つ。易透化は、アセトン、エタノール、DMSO、またはさまざまな界面活性剤、例えばトウイン80またはトリトンX-100などの試薬中で細胞を

インキュベートすることによって達成することができる。例えば細胞は、もしあれば細胞の固定中または固定後に約0.05~1.0%トリトンX-100中でインキュベートすることによって透過性をあげることができる。

【0045】細胞の透過性をあげる場合一般には、使用する特定の着色剤、マーカー、および/または検出剤が細胞上または細胞中のそれらの標的に到達するのに十分な時間、試薬により細胞の透過性をあげる。特定の細胞にとって適切な易透化の方法およびその方法に用いられる試薬は、当業界で周知の方法に従って、例えばどの易透化の方法が細胞の適切な着色を可能にするかを決定するために、例えば幾つかの異なる易透化の方法で検定を行うことによって決めることができる。

【0046】さまざまな固定液、固定条件、および易透化剤が当業界で知られており、本発明の着色剤に関連して試料細胞を固定または透過性をあげる他の方法は普通の当業技術者には明らかには明らかなはずである。

【0047】好ましい定量用DNA着色剤は、ヨウ化プロピジウム(PI; Molecular Probes製品番号P-3566, Calbiochem, La Jolla, Calif.)である。他の有用な定量用DNA着色剤は、蛍光核酸着色剤である。これには限定されないがチアゾールオレンジ、エチジウムホモダイマー、臭化エチジウム、HOECHST 33258、およびDAPIを含む、さまざまな適切な核酸着色剤が当業界で知られている。核酸着色剤は、フェナントリジンおよびアクリジンなどの挿入色素、例えば臭化エチジウムおよびヨウ化プロピジウム; DAPIおよびHOECHST色素などの副溝バインダ; またはこれら二つのカテゴリーのどちらにも属さないアクリジンオレンジ、7-AAD、およびヒドロキシスチルバミジンなどであってもよい。シアニン色素は、その高いモル吸光係数、きわめて低い内在蛍光、核酸と結合した場合の大きな蛍光増大機能、他の生体高分子をほとんどまたは全く着色させずに核酸に対するその並みないしきわめて高い親和力に基づいて選択される色素である。幾つかの核酸着色剤は細胞に不浸透性であり、別の着色剤は細胞浸透性着色剤である。細胞浸透性着色剤は、着色の前の細胞の易透化を必要としない。細胞浸透性色素の例には、シアニン色素(SYT0核酸着色剤); ヨウ化ヘキシジウム、ジヒドロエチジウム、およびエチジウムホモダイマーがある。

【0048】利用できるその他の色素には、挿入剤の7-アミノアクチノマイシンDおよびアクチノマイシンD、多色ヒドロキシスチルバミジン、Long-Wavelength LDS751、およびNeurtrace Fluorescent Nissl Stain類がある。別の定量用DNA着色剤は、塩基類似体5-プロモ-2-デオキシウリジン(BrdU, Sigma Chemical Co.から入手できる)である。その他の有用な核酸着色剤が、国際公開第W093/06482号(公開日1993年4月1日)、第W094/24213号(公開日1994年10月27日); Yue他の米国特許第5,321,130号(1994年)、Yue他の第5,410,030

号(1995年)、Haugland他の第5,436,134号(1995年)、およびHaugland他の第5,437,980号(1995年)に記載されている。本発明の有糸分裂マーカーと関連して適切な核酸着色剤の使用は、有糸分裂細胞およびDNA内容の同時または逐次観察を可能にするように選択することができる。

【0049】ヨウ化プロビジウム(PI; Calbiochem, La Jolla, Calif.)は、少なくとも約0.1 $\mu$ g/ml~約100 $\mu$ g/ml、好ましくは少なくとも約0.1 $\mu$ g/ml~約10 $\mu$ g/ml、最も好ましくは少なくとも約1 $\mu$ g/ml~約5 $\mu$ g/mlの濃度で細胞の集団に加えることができる。この細胞は、室温で約1分~約2時間、好ましくは約10分~約1時間、最も好ましくは約15分~約30分、また任意選択で暗所でインキュベートすることができる。インキュベーションはまた、氷上で少なくとも約1分間、好ましくは少なくとも約5分間、最も好ましくは少なくとも約15分間行ってもよい。

【0050】一般には細胞は、細胞中のDNAの検出および定量を可能にするのに十分な量および時間、定量用DNA着色剤で着色される。特定の細胞型にとって適切な着色手順および検出方法は、当業界で知られている方法に従って、例えばどの条件が細胞の適切な着色を可能にするかを定めるために、例えば幾つかのDNA着色剤、濃度、およびインキュベーション回数をを用いた誘導検定によって決定することができる。

【0051】DNA内容のための細胞の着色は、染色体DNAでない、例えばRNAの核酸の着色を妨げる薬品で細胞を処理することを伴ってもよい。例示の実施形態において細胞は、RNAを分解する薬品、例えばRNアーゼで処理される。例えば、RNアーゼA(BD Clontech, Palo Alto, California)を約100~500 $\mu$ g/ml加えることができる。

【0052】一般には細胞は、染色体DNAではない核酸の着色を妨げる薬品と一緒に、もう一方の核酸の着色と比べて染色体DNAの支配的な着色を可能にするのに十分な濃度と時間でインキュベートされる。適切な条件は、当業界の方法に従って、例えば使用する方法にとって適切な条件を決めるために、例えばさまざまな条件でさまざまな薬品を用いて検定を行うことによって決定することができる。

【0053】好ましい有糸分裂マーカーは、非有糸分裂細胞中には本質的に存在しないか、または非有糸分裂細胞では検出されない有糸分裂細胞(M)の特性を検出することによって有糸分裂細胞を特異的に検出する薬品である。好ましい実施形態において有糸分裂マーカーは、間期中ではなく(すなわちG<sub>0</sub>、G<sub>1</sub>、S、またはG<sub>2</sub>中ではない)有糸分裂時に起こるクロマチンの凝縮を検出するマーカーである。さらに一層好ましい有糸分裂マーカーは、セリン10上のヒストンH3(抗H3-P抗体)のリン酸化を検出する薬品(Juan等の論文、Cytometry 32:71

(1998))である。この薬品は、単クローン抗体などの抗体であってもよい。好ましい抗体は、Cell Signaling Technology(Beverly, MA)から市販されている抗H3-P抗体6G3(Juan等の論文、上記)である。この抗体は、リン酸化されていない形態ではなく、セリン10残基のリン酸化された形態を特異的に検出する。前期から終期までの有糸分裂細胞が、抗H3-P抗体によって検出される。これとは対照的に、抗体と間期細胞(すなわちG<sub>0</sub>、G<sub>1</sub>、S、およびG<sub>2</sub>)のクロマチンとの結合は数倍弱い。したがって、この抗体と結合する唯一の細胞は有糸分裂中の細胞である。

【0054】使用することができる別の有糸分裂マーカーには、TG-3単クローン抗体がある(Andersonの論文、Experimental Cell Res. 238, 498-502(1998))。

【0055】一般には細胞は、使用する特定の方法、例えばフローサイトメトリーにより有糸分裂細胞の検出を可能にするのに十分な濃度と時間、有糸分裂マーカーで標識される。適切な条件は、当業界で周知の方法、例えば適切な条件を割り出すために有糸分裂マーカーと一緒にさまざまな条件で細胞をインキュベートすることにより決めることができる。

【0056】幾つかの実施形態において細胞は、1または複数の追加のマーカーで着色することができる。例えば第三のマーカーは、他の2つのマーカーで得られる結果を立証するための別の有糸分裂マーカーまたはDNAマーカーであることができる。別法では別のマーカーは、細胞または細胞オルガネラの大きさまたは粒状度を検出するマーカーであってもよい。

【0057】例えば追加のマーカーは、細胞膜、核、ゴルジ装置、小胞体、リソソームなどの細胞オルガネラを選択的に着色するか、あるいはローダミン123などの第二のミトコンドリア着色剤またはHaugland他の米国特許第5,459,268号(1995年)に記載の定着性ミトコンドリア着色剤である、任意のプローブまたは着色剤であることができる。追加のマーカーの特異な例には、LYSOTRACKER(Molecular Probes, Eugene, Oreg.)などの酸性オルガネラ用着色剤および米国特許第6,291,203号に記載のリソソーム用の他の着色剤がある。本発明の着色剤と組み合わせてリソソームに対して選択的な着色剤を使用することにより、有糸分裂細胞、DNA内容、および、例えば細胞中のミトコンドリアと酸性オルガネラの多色視覚化が可能になる。

【0058】有糸分裂マーカーおよび/または定量用DNA着色剤は、それ自体検出可能ではないが二次的な試薬または「検出試薬」によって検出することができる薬品であってもよい。例えばマーカーは抗体であってもよい。抗体は直接、例えば下記に述べる標識で標識することができる。別法では抗体は、その抗体を識別する二次(または第二)試薬と反応してもよい。さまざまな二次試薬が当業界、例えばFITCで知られている。また、抗体

はビオチンと結合してもよく、二次試薬はアビジンまたはストレプトアビジンと結合してもよい。一般に二次試薬は標識を運ぶことになる。標識を運ぶ試薬は「検出試薬」と呼ばれる。

【0059】一般に検出試薬は、検出可能な応答を生じる手段を内蔵する。検出可能な応答は、直接観察するか計器のいずれかで感知できる、また細胞試料中の特定の結合ペアの特に標的されたメンバーの存在の関数である試験システムのパラメータの変化または発生を意味する。このような検出可能な応答には、色、蛍光、反射率、pH、化学ルミネセンス、または赤外放出の変化もしくは発生がある。検出可能な応答をもたらす適切な標識には、可視または蛍光色素、酵素作用に基づいて可視または蛍光沈殿物を生成する酵素基質（例えば、ジアミノベンジジンに対するワサビダイコンペルオキシダーゼの作用）、酵素変換に基づいて蛍光または可視色を生ずる酵素基質、可視または蛍光標識したラテックス微粒子、または試薬に対する光の作用により放出されるシグナル（例えば、光分解またはジアミノベンジジンに対する光の作用により活性化されるケージ発蛍光団）があるが、これには限定されない。

【0060】興味深い蛍光部分または標識には、クマリンとその誘導体、例えば7-アミノ-4-メチルクマリン、アミノクマリン；Bodipy FL、カスケードブルーなどのボディピー色素；フルオレセインとその誘導体、例えばフルオレセインイソチオシアナート；オレゴングリーン；ローダミン色素、例えばTexas Red、テトラメチルローダミン、エオシン、およびエリトロシン；シアニン色素、例えばCy2、Cy3、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、Cy7；Fluor X；ランタニドイオンの大環状キレート化合物、例えばQuantum dye(商標)；チアゾールオレンジ-エチジウムヘテロダイマー、TOTAB、ダンシルなどの蛍光性エネルギー転移色素などがある。検出試薬と結合するための官能基を有する、またはそのような官能基を組み込むように変性することができる個々の蛍光化合物には、例えば塩化ダンシル；3,6-ジリドロキシ-9-フェニルキサンチドロールなどのフルオレセイン；ローダミンイソチオシアナート；N-フェニル-1-アミノ-8-スルホナートナフタレン；N-フェニル-2-アミノ-6-スルホナートナフタレン；4-アセトアミド-4-イソチオシアナート-スチベン-2,2-ジスルホン酸；ピレン-3-スルホン酸；2-トルイジノナフタレン-6-スルホナート；N-フェニル-N-メチル-2-アミノナフタレン-6-スルホナート；臭化エチジウム；ステブリン；オーロミン-0,2-(9-アントロイル)パルミタート；ダンシルホスファチジルエタノールアミン；N,N-ジオクトアデシルオキサカルボシアニン；N,N-ジヘキシルオキサカルボシアニン；メロシアニン；4-(3-ピレニル)ステアラート；d-3-アミノデスオキシ-エキレニン；12-

(9-アントロイル)ステアラート；2-メチルアントラセン；9-ピニルアントラセン；2,2-(ピレン-p-フェニル)ビスベンズオキサゾール；p-ビス(2-メチル-5-フェニル-オキサゾリル)ベンゼン；6-ジメチルアミノ-1,2-ベンゾフェナジン；レチノール；ニヨウ化ビス(3-アミノピリジニウム)1,10-デカンジール；ヘリブリエニンのスルホナフチルヒドラゾン；クロロテトラサイクリン；N-(7-ジメチルアミノ-4-メチル-2-オキソ-3-クロメニル)マレイミド；N-(p-(2-ベンズイミダゾリル)-フェニル)マレイミド；N-(4-フルオランチル)マレイミド；ビス(ホモバリニン酸)；レサザリン；4-クロロ-7-ニトロ-2,1,3-ベンゾオキサジアゾール；メロシアニン540；レソルフィン；ローズベンガル；および2,4-ジフェニル-3(2H)-フラノンがある(例えば、Kricka著、Non-isotoPlc DNA Probe Techniques, Academic Press San Diego, Calif. (1992)を参照されたい)。多くの蛍光標識が、Sigma chemical company (Saint Louis, Mo.)、Amersham, Molecular Probes, R&D systems (Minneapolis, Minn.)、Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, N.J.)、CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.)、Chem Genes Corp.、Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.)、Glen Research, Inc.、GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersburg, Md.)、Fluka Chemica-Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland)、Applied Biosystems (Foster City, Calif.)、ならびに当業技術者には周知の他の市場供給先により市販されている。

【0061】化学発光性の標識には、ルシフェリンおよび2,3-ジヒドロフタラジンジオン類、例えばルミノールがある。興味深い同位体部分または標識には、<sup>32</sup>P、<sup>33</sup>P、<sup>35</sup>S、<sup>125</sup>I、<sup>2</sup>H、<sup>14</sup>Cなどがある(Zhao等の論文、Gene 156:207 (1995)；Pletu等の論文、Genome Res. 6:492 (1996)を参照されたい)。

【0062】標識はまた、検出可能なシグナルを提供するように同じシステムの1または複数の補助メンバーと協力して作用するシグナル発生システムのメンバーであることもできる。このような標識の実例は、リガンドなどの特異的に結合するペアのメンバー、例えばビオチン、フルオレセイン、ジゴキシゲニン、抗原、多価カチオン類、キレート基などであり、このメンバーは直接的または間接的のいずれかで検出可能なシグナルを提供するシグナル発生システムの補助メンバー、例えば蛍光部分、または基質を色原体生成物に転換することができる酵素部分に接合した抗体、例えばアルカリ性ホスファターゼ複合抗体などと特異的に結合する。使用できる薬品の対の例には、酵素と酵素基質、抗原と抗体、ビオチンとアビジン(またはストレプトアビジン)、免疫グロブリンとタンパク質AまたはC、炭水化物とレクチンがあ

る。

【0063】適切な酵素の存在下で蛍光性沈殿物を生じる手段としての酵素基質はさらに、Haugland他の米国特許第5,316,906号(1994年)およびHaugland他の米国特許第5,443,986号(1995年)に記載されている。

【0064】例えば6G3抗体と共に使用することができる、抗体の定常部を識別する標識抗体の例には、蛍光色素、例えばAlexa Fluor 488 (Molecular Probes, A-11011)、フルオレセインイソチオシアナート (FITC)、フィコエリトリン (PE)、R-フィコエリトリン (R-P E)、Cy-Chrome(商標)、およびPerCP (BD PharMingen) がある。抗体はまた、アロフィコシアニン (APC) およびTexas Red(商標)と接合することができる。このような標識した二次的な抗体は当業界でよく知られており、多数の市場の供給先から入手できる。

【0065】その他の適切な補助検出試薬には、Kuhn他の米国特許第5,453,517号(1995年)、Kuhn他の米国特許第5,405,975号(1995年)、およびHauglandの上記HAN DBOOK Sets 20-22 (1992)に記載されているものなど、選ばれたpHまたは金属イオン指示薬がある。さらに別の興味深い標識には、米国特許第5,563,037号、国際公開第W097/17471号、および国際公開第W097/17076号に記載されたものがある。

【0066】共に測定されることになるさまざまなマーカーに使用される区別できる標識の例は当業界でよく知られており、Cy3およびCy5のような2つ以上の異なる発光波長の蛍光色素；フィコエリトリンとCy5のような蛍光タンパク質と色素の組合せ；<sup>32</sup>Pと<sup>33</sup>Pのような異なる発光エネルギーを有する2つ以上の同位体；異なる散乱スペクトルを有する金または銀の粒子；温度、pH、追加の化学薬品による処理などのような異なる処理条件下でシグナルを発するか、または処理後のさまざまな時点でシグナルを発する標識が含まれる。シグナル発生用の1または複数の酵素を用いると、酵素の異なる基質特異性(アルカリ性ホスファターゼ/ペルオキシダーゼ)に基づいてさらにいろいろの区別できる標識の使用が可能になる。

【0067】本発明の好ましい方法は、溶液中で細胞の固定に適した時間の間、細胞を固定することを含む。次いで細胞は、その方法で用いられる着色剤に適した細胞の易透化用試薬を含む溶液中でインキュベートされる。好ましくは細胞は、特定の有糸分裂マーカーのために、また任意選択で二次検出試薬のために細胞の透過性をあげるのに十分な時間、界面活性剤を含有する溶液中でインキュベートされる。易透化のステップは必須ではなく、非細胞浸透性のマーカーまたは検出剤が使用される場合にのみ必要である。次いで細胞は、第一マーカー、例えば有糸分裂マーカーの存在下で、マーカーがその標的分子の少なくとも70%、好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約100%と結合する

のに十分な量および時間、インキュベートすることができる。第一マーカーでインキュベートした後、細胞は二次検出剤と共に、その標的分子の少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約100%と反応するのに十分な量および時間でインキュベートすることができる。細胞は定量用DNA着色剤などの第二マーカーと共に、その標的分子の少なくとも約70%、好ましくは少なくとも約80%、最も好ましくは少なくとも約100%と反応するのに十分な濃度および時間でインキュベートすることができる。

【0068】マーカーを細胞に加える順序は重要である。例えば、定量用DNA着色剤を有糸分裂マーカーの前に細胞に加えることはできない。二次検出剤は、その二次検出剤が識別する薬品によって細胞を着色した後に加えられる。二次検出剤は、細胞が1もしくは2種類またはそれ以上のマーカーにより着色された後に細胞に加えられる。

【0069】したがって例示的な実施形態においては、約1~10<sup>6</sup>個の細胞をPBS中で洗浄し、70%エタノール中で-20で固定する。次いで細胞を遠心分離し、細胞の透過性をあげるのに十分な時間、約0.05~約1%、好ましくは約0.05~約0.5%、最も好ましくは約0.1~約0.2%のPBS/トウイーン80中でインキュベートすることにより透過性をあげる。適切な時間は、細胞の型に左右されることになり、小規模の検定で決めることができる。一般にインキュベーションは、細胞の透過性をあげるために室温で約5分~約30分間、好ましくは約10分~約20分間、最も好ましくは約10分~約15分間が好適なはずである。細胞を遠心分離し、Cell Signaling Technology (Beverly, MA)から市販されている溶液を約100~1000倍、好ましくは約300~700倍、さらに最も好ましくは約400~500倍に希釈したH3(セリン10)6G3抗体を含有する溶液中にその細胞のペレットを再度懸濁する。細胞を37で約10分~1時間、好ましくは約30分~1時間、最も好ましくは約40分間インキュベートする。次いでPBSをその溶液に加え、細胞と共に混合し、細胞を遠心分離する。次いで細胞のペレットをAlexa Fluor 488で標識した第二抗体中に再度懸濁し、37で約10分~60分間、好ましくは約20分~約40分間、最も好ましくは約30分間インキュベートする。PBSをその細胞に加え、細胞と共に混合し、細胞を遠心分離し、そのペレットをヨウ化プロビジウムおよび任意選択でRNアーゼを含む溶液中に再度懸濁する。好ましくはヨウ化プロビジウムは、濃度が少なくとも約0.1μg/ml~約100μg/ml、好ましくは少なくとも約0.1μg/ml~約10μg/ml、最も好ましくは約1μg/ml~約5μg/mlで存在する。RNアーゼは、好ましくは約10μg/ml~約1000μg/ml、より好ましくは約50μg/ml~約500μg/ml、最も好ましくは約100μg/ml~約300μg/mlの濃度で加えら

れる。インキュベーションは、好ましくは氷上で少なくとも約1分間、好ましくは少なくとも約10分間行われる。FACS分析の前、細胞は4で保管することができる。この細胞は、フローサイトメトリーによってDNAの内容(蛍光強度)、異数性(倍数性を含む)、および細胞周期分析の分析を行うことができる。

【0070】一方または両方のマーカーで着色した細胞を分析するための好ましい方法は、多重パラメータ(またはカラー)表示を用いたフローサイトメトリーまたはレーザー走査サイトメトリーによるものである。さらに一層好ましい実施形態においては、有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で着色した細胞を2パラメータフローサイトメトリーにかけ、これは、DNA内容に関して有糸分裂細胞の可視化を可能にし、また例えば異常染色体の内容、例えば異数性または倍数性を有する有糸分裂細胞の異なる分集団の可視化を可能にする。加えてフローサイトメトリーは、有糸分裂細胞の分集団の単離を可能にし、例えばより少数の染色体を有するすべての細胞を1つの管で単離することができ、また余分の染色体を有するすべての細胞を第二の管で単離することができる。したがって細胞の多数分集団を互いに、また他の細胞から分離することができる。次いで細胞のこのような集団をさらに調べることができる。

【0071】フローサイトメトリーは、本明細書にさらに記載し、当業界で周知の蛍光標式細胞分取器(FACS)を用いて行うことができる。使用することができるFACS装置には、FACS-Calibur (Becton Dickinson; Mountain View, Calif.)およびコールターフローサイトメトリー (Hialeah, Fla., USA) EPICS Elite(登録商標)がある。定量化は、CellQuest (Becton Dickinson; Mountain View, Calif.)、WinList (Verity Software House, Inc. Topsham, Maine)、Multicycle Software (Phoenix Flow Systems, San Diego, Calif. USA)、およびFACSsan (Becton Dickinson; Mountain View, Calif.)のソフトウェアを用いて行うことができる。

【0072】フローサイトメトリーは、各細胞と会合した蛍光物質の量およびその他のパラメータを測定し、例えばヒストグラム、点図表、または分画表の形でアウトプットを提供する。各細胞と会合した或る蛍光物質の量は、その細胞の集団もさらされた別の蛍光物質の量、サイズ、粒状度、または固有の発光など、その細胞の他の特性と比較することができる。

【0073】細胞を含有する鞘液は一般に一滴ずつレーザーを通り抜けるので、さまざまな波長の光にさらされる。サイトメーターによって検出される各粒子は「事象」と呼ばれる。事象が入射光の一部を透過または散乱させる程度は、その事象、例えば会合した蛍光物質の特徴の尺度を提供する。例えば事象は、おのずから発光するか、または事象に導入された蛍光物質によって生ずる蛍光を発することができる。このような物質の例は、発

蛍光団と接合した抗体である。抗体は事象の構成成分に付着し、発蛍光団は例えばサイトメーターの光電子倍增管(PMT)によって検出される周知の周波数で発光することにより特定の周波数の入射光に应答する。放射または反射光の強度は、サイトメーターによって測定され記憶される。

【0074】サイトメーターは、発光データをヒストグラムにまとめる。ヒストグラムは一次元の形で報告することができる。別法では、他の入射波長の結果得られる放射光のヒストグラムと組み合わせることができる。このような組合せは一般に、事象が暮盤目上にプロットされ、また暮盤目の軸が測定される2つのパラメータに対応する「点図表」として報告される。例えば、事象は約488nmの入射光にさらされ、前方光散乱および波長530nmにおける発光を検定することができる。この波長は、フルオレセインイソチオシアナート(FITC)、すなわちレーザー走査サイトメトリーに用いられる典型的なフルオロクロマのピーク発光波長に対応する。

【0075】レーザー走査型サイトメーターから得られる典型的な二次元点図表では、有糸分裂細胞を非有糸分裂G2集団から分離することになる。有糸分裂集団は、それらのまわりに「ゲート」を作り出すことによって、すなわち有糸分裂細胞のDNA内容を確認するために受け入れられるであろう最小および最大着色レベルに対する閾値を設定することによって、お互いについて、また細胞分裂しない集団のDNA内容について定量することができる。

【0076】同様に細胞の集団の画分は、それらのDNA内容に基づいて分離されることになる。ピークは、有糸分裂細胞の正常な4nDNAの内容に対応するヨウ化プロピジウムの着色において起こるはずである。ピークはまた、多分倍数体細胞に対応する、半数体の数nのもっと高い倍数で起こるかもしれない。ピークまたはバックグラウンド上の平坦域はまた、半数体の数nの倍数に対応しないヨウ化プロピジウムの着色レベルで起こるかもしれない。これらの事象は、異数体細胞、あるいは余分の染色体部分を持つか、または染色体の一部が欠落した細胞に対応するかもしれない。ゲートは、実施例で述べるようにDNA内容がさまざまな範囲に分かれる細胞をDNA内容のいろいろ異なる細胞から識別するように形成することができる。

【0077】二色フロー分析において興味深い2つのマーカーは、レーザー走査サイトメトリーでそれらの識別を可能にするのに十分異なる蛍光特性を有することになる。例えばホスホヒストンH3(セリン10)6G3単クローン抗体は、FITCと接合することができる。次いでこの抗体で標識した細胞は、約488nmの入射光に应答して約520nmで発光することになる。これとは対照的にヨウ化プロピジウムは、560nmから670nmまで発光する。したがって、これらの範囲で感度がよいよ

うに同調させたPMTは、H3-(セリン10)6G3-FITCおよびヨウ化プロピジウム由来のもう一方のものからの2つのシグナルを識別することができる。

【0078】次いで各事象は、H3-(セリン10)6G3着色の量に応じて「有糸分裂」または「非有糸分裂」のいずれかとしてゲーティングすることができる。次いで有糸分裂細胞を、細胞分裂しない集団中で着色するヨウ化プロピジウムの量に応じて「正倍数体」、「二数体」、「異数体」、「倍数体」、「過剰二数体」、「欠落二数体」、またはその他としてゲーティングすること

【0079】有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤を用いた有糸分裂細胞およびこれら細胞のDNA内容を識別するためのその他の方法には、組織化学、免疫組織化学、免疫細胞化学、および当業界で周知のその他の分子生物学の手法がある。これらの手法はまた、フローサイトメトリー分析と組み合わせることができる。例えば有糸分裂細胞は、フローサイトメトリーを介して他の細胞から分離することができる。次いでこれらの細胞は、フローサイトメトリーでない手法を用いてDNA内容を分析

【0080】一実施形態においてこの方法は、細胞中の数値染色体異常、例えば倍数性を発生させる薬品を特定するために用いられる。このような薬品には、細胞毒性薬品、例えば癌誘発性薬品がある。一実施形態においてこの方法は、もしあれば娘細胞で、細胞が1または複数の数値染色体異常の発生を誘発するのに十分な時間、細胞を供試薬品と接触させ、続いて有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で細胞を着色して数値染色体異常を検出するために有糸分裂時のDNAの量を決定することを含む方法であって、1または複数の娘細胞中の1または複数の数値染色体異常の存在は、供試薬品が数値染色体異常を誘発する薬品であることを示す。別の実施形態においてこの方法は、もしあれば細胞で、薬品が1または複数の数値染色体異常の発生を誘発するのに十分な時間、細胞の集団を供試薬品と接触させ、続いて有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤で細胞を着色して数値染色体異常を検出するために有糸分裂時のDNAの量を決定することを含む方法であって、1または複数の細胞中の1または複数の数値染色体異常の存在は、供試薬品が

【0081】供試薬品は、小さな有機分子などの任意の分子または錯体であることができる。例えば試験することができる薬品には、潜在的なアノイゲン性(aneugenicity)を決定するための有望な治療薬が含まれる。例えば本発明の方法は、鉛の医薬用化合物のアノイゲン性を

試験するために使用することができる。次いでアノイゲン性であることが分かった化合物を構造的に変えてそのアノイゲン性を低減することを試みることができ、その化合物各々を本発明の方法に従ってそのアノイゲン性を試験することができる。

【0082】本発明の方法はまた、細胞の集団中の1または複数の数値染色体異常を有する1または複数の細胞を識別および/または検出するために使用することができる。細胞の集団は、例えば被検者の生検材料であってもよい。この方法は、異常細胞、例えば癌細胞の存在を決定するために使用することができる。実際、非常に多くの癌細胞が異数体または倍数体であることが知られている。本発明の方法はまた、数値染色体異常と関連する疾病の段階を決めるために使用することができ、そのような段階は数値染色体異常の存在と関連する。したがって本発明の方法は、被検者中の病気の状態を診断するために、または被検者が病気を発現しやすいかどうかを予見するために使用することができる。

【0083】本発明の方法で診断することができる疾病および染色体異常と関連することが示されている疾病の例には、悪性組織球増加症、急性単球性白血病、および大細胞系リンパ腫などの悪性組織球性障害などの腫瘍；毛様細胞性白血病、T細胞HTLV-III関連白血病、B細胞系白血病、T細胞系白血病、急性リンパ球性白血病、慢性リンパ球性白血病、乳細胞白血病、慢性骨髄性白血病、急性骨髄性白血病、フィラデルフィア陰性骨髄性白血病、フィラデルフィア陽性骨髄性白血病、急性骨髄性単球白血病、急性非リンパ球性白血病、およびプラズマ細胞性白血病などの白血病；リンパ管腫、リンパ管筋腫、リンパ管筋腫症、およびリンパ管内腫などのリンパ管の腫瘍；ホジキン病、免疫増殖性小腸障害、レットレルシグヴェ病、非ホジキンリンパ腫、B細胞系リンパ腫、び慢性リンパ腫、濾胞性リンパ腫、重度リンパ腫、中度リンパ腫、大細胞型リンパ腫、低度リンパ腫、混合型細胞リンパ腫、小細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、未分化性リンパ腫、プラズマ細胞腫、多発性骨髄腫、細網内皮増殖症、および乳細胞肉腫などのリンパ腫；腺様リンパ腫、多形性腺腫、腺筋腫、腺肉腫、腺扁平上皮癌、癌肉腫、胚腫、間葉腫、中胚葉混合型腫瘍、ミューラー混合型腫瘍、筋上皮腫、腎芽細胞腫、WAGR症候群、中胚葉腎腫、肺芽腫、杵状腫瘍、子宮内膜間質肉腫、および胸腺腫などの混合型および複合腫瘍；血管脂肪腫、血管筋脂肪腫、脂肪腫、脂肪肉腫、骨髄脂肪腫、軟骨芽細胞腫、軟骨腫、軟骨肉腫、粘液腫、粘液肉腫、骨形成性線維腫、骨の巨細胞腫瘍、骨芽細胞腫、骨軟骨腫、骨軟骨腫症、骨腫、骨肉腫、ユーイング肉腫、皮膚腺維腫、線維性組織球腫、線維腫、癒着性線維腫、骨形成性線維腫、腹部線維腫症、急速進行性線維腫症、線維肉腫、隆起性皮膚線維肉腫、神経線維肉腫、筋線維腫症、腺線維腫、ブレンネル腫瘍、線維腺腫、明細胞肉腫、小細胞肉

腫、滑液肉腫、顆粒細胞の腫瘍、平滑筋腫、平滑筋肉腫、筋腫、横紋筋腫、筋肉腫、横紋筋肉腫、肺胞軟部肉腫、血管肉腫、脂肪肉腫、リンパ管肉腫、粘液肉腫、葉状腫瘍、およびカボジ肉腫などの結合および軟組織の腫瘍；胚癌、脊索腫、類皮腫、胚細胞腫、精上皮腫、中腎腫、神経外胚葉の腫瘍、奇形癌、奇形腫、および栄養膜の新生物などの胚芽細胞および胚の腫瘍；腺腫および腺癌、基底細胞癌、基底細胞母斑症候群、基底有棘細胞癌、毛質腫、浸潤性腺管の癌、非浸潤性腺管内の癌、乳房のパジェット病、小葉の癌、骨髄癌、膀胱の癌、乳房外のパジェット病、管内乳頭腫、ムチン腺癌、粘膜表皮の癌、印環細胞の癌、クルーケンベルグ腫、嚢胞腺癌、嚢胞腺腫、腺腫様腫瘍、中皮腫、乳頭癌、扁平上皮細胞の癌、いぼ状の癌、乳頭腫、逆方向性乳頭腫、および嚢胞性中皮腫などの腺および上皮の腫瘍；神経膠腫、星状細胞腫、脳室上衣腫、神経節膠腫、神経膠内腫、髓芽腫、希突起膠腫、視神経膠腫、神経細胞腫、松果体腫、および網膜芽腫などの感覚上皮の腫瘍；副副腎の腫瘍、男性ホルモン産生細胞腫、顆粒膜細胞腫、ライディヒ細胞腫、黄体腫、セルトーリ細胞腫、および性索間質腫などの性腺組織の腫瘍；髄膜腫、神経鞘腫、神経線維腫、叢状神経線維腫、神経線維腫症、神経線維肉腫、神経腫、神経鞘腫、頭蓋咽頭腫、および神経鞘粘液腫などの神経組織の腫瘍；血管線維腫、被角血管腫、糸球腫、血管腫、血管内皮腫、および血管周囲細胞腫などの脈管組織の腫瘍；エナメル上皮腫、セメント質腫、石灰化歯原性嚢胞、および歯牙腫などの歯原性腫瘍がある。

【0084】異常倍数性または細胞のDNA質量と関連するその他の疾病には、クラインフェルター症候群；ターナー症候群；ダウソ症候群；脆弱X染色体症候群；ハンチントン症候群；トリプロX症候群；テトラX症候群；ペンタX症候群；XYY症候群；7、10、11、13、18、21、X、およびYを含む任意の染色体のモノソームまたはポリソーム；慢性関節リウマチ；および骨関節症がある。

【0085】本発明はさらに、細胞中の数値染色体異常を検出するためのキットを提供する。このキットは、アノイゲンである化合物を特定するための、または試料中の数値染色体異常を識別するためのキットであってもよい。キットは、有糸分裂マーカーまたは定量用DNA着色剤などの1種類のマーカーを含むことができる。好ましい実施形態においてキットは、有糸分裂マーカーと定量用DNA着色剤の両方を含む。キットが含むことができるその他の構成要素には、補助のマーカー、検出試薬、緩衝液、固定試薬、易透化試薬、RNアーゼ、負または正の対照標準、および生物学的試料を得るための装置が含まれる。このキットはまた、取扱説明書を含む。本発明はまた、有糸分裂マーカーおよび定量用DNA着色剤を含む組成物を提供する。

【0086】本発明をさらに下記の実施例によって例示

するが、これらはいかなる形でも限定するものと解釈されるべきではない。

【0087】本発明の実施には、別に示されない場合は、当業技術の範囲内にある従来の技術の細胞生物学、細胞培養、分子生物学、形質転換生物学、微生物学、組換えDNA、および免疫学を採用することになる。このような手法は文献の中によく説明されている。例えば、Sambrook、Frisch、およびManiatis編、Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2<sup>nd</sup> Ed, (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); D. N. Glover編、DNA Cloning, Volumes I and II (1985); M. J. Gait編、Oligonucleotide Synthesis (1984); Mullis他の米国特許第4,683,195号; B. D. HamesおよびS. J. Higgins編、Nucleic Acid Hybridization (1984); B. D. HamesおよびS. J. Higgins編、Transcription And Translation (1984); R. I. Freshney著、Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc., 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986); B. Perbal著、A Practical Guide to Molecular Cloning (1984); 論文、The Treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); J. H. MillerおよびM. P. Calos編、Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory, 1987); Wu等編、Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; MayerおよびWalker編、Immunohemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London, 1987); D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編、Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I ~ IV (1986) を参照されたい。

【0088】

【実施例】本実施例は、有糸分裂特異的バイオマーカー、すなわち細胞周期分析用ホスホヒストンH3 (セリン10) 6G3単クローン抗体 (H3-P) およびDNA内容を評価するためのヨウ化プロピジウムで着色した細胞への二色フローサイトメトリー分析の使用について具体的に説明する。H3-Pバイオマーカーは有糸分裂 (M) 集団を間期集団 (すなわちG<sub>0</sub>G<sub>1</sub>、S、およびG<sub>2</sub>) と識別するので、細胞の集団、例えば異数体および倍数体細胞の集団の推定は、DNA内容分析を有糸分裂細胞に限定することによって容易に行うことができる。3種類の周知のアノイゲン (ノスカピン、コルセミド (登録商標)、およびグリセオフルビン)、倍数性だが異数性ではない周知の誘発物質 (サイトカシンB)、および異数性および/または倍数性を誘発すると思われる毒性化合物 (シアン化カリウム) で、精製した刺激ヒトリンパ球を24時間処理して得られるフローデータを下記に記述する。このデータは、フローサイトメトリーによる、例えば異数性および倍数性の数値染色体異常の有糸分裂集団の分析が、これらの細胞の集団を分析するための標準的な手作業による顕微鏡法に匹敵することを示している。加えて、ここに記述した方法を利用することにより、分析速度を劇

的に速め、データのばらつきを減らし、有糸分裂集団中の数値異常の評価を全体的に改善することになる。

【0089】実施例1：塩酸ノスカピン処理したヒトリンパ球培養液の数値染色体異常のフローサイトメトリーによる評価

ヒトリンパ球は、健康なドナーからヘパリン添加したバキューター管に静脈穿刺によって得た。

【0090】健康な男性および女性のボランティア（＜40歳）から末梢血液をヘパリン添加したバキューター管中に集めた。全血液の約10mlを、無菌リン酸緩衝塩類液～10mlを含有するLymphoprep(商標)管(Nycomed Pharma AS Diagnostic, Oslo, Norway)に分配した。2000rpmで20分間の遠心分離に続いて、リンパ球集団を単離し、PBS中で洗浄した(1X)。単離したリンパ球の原料培養液を、10%ウシ胎児血清、100U/mlペニシリンと100ug/mlストレプトマイシン、2mM L-グルタミン、および1.0%フィトヘマグルタニンM型(すべての試薬をGibco BRL Life Technologies, Inc., Grand Island, NYから入手した)を補ったウィリアムスE培養液中で樹立した。原料培養液を5%CO<sub>2</sub>雰囲気中37

で約48時間保った。リンパ球をアノイゲン、すなわち周知のアノイゲンであるノスカピン(Sigma Chemicals)0~100μg/mlで37で24時間処理した。

【0091】次いでノスカピン処理および非処理リンパ球を1000rpmで6分間遠心分離し、上澄み液を取り除き、リンパ球をリン酸緩衝塩類液(PBS;GIBCO BRL)5ml中に再度懸濁させた。次いでリンパ球を遠心分離し、上澄み液を取り除き、細胞をPBS 0.5ml中に再度懸濁させた。確実に単細胞懸濁液にするために細胞懸濁液を9in.パストゥールピペット(Kimble Glass Inc.)を通して完全に移し替えた。-20(70%)のエタノール(体積約4.5ml)を入れた管を渦状運動させながら細胞懸濁液を一滴ずつ加えた。蒸留水30mlをPhamco Productsから入手した200ブルーフェタノール70mlに加えることによりエタノール溶液を調製した。次いで細胞をこのエタノール中に-20で少なくとも24時間保管した。

【0092】フロー分析用の試料および対照標準を下記のように調製した。

(1) H3-P(ブランク)：-20に少なくとも24時間保管した細胞を遠心分離し、上澄み液を取り除き、細胞ペレットを0.1%PBS/トウイン80 1~3ml中に再度懸濁させた。この後者の溶液は、Sigma Chemicalsから入手したトウイン80 1mlをPBS 1000mlに混合することによって調製した。細胞を室温で10~15分間インキュベートした。次いで細胞を遠心分離し、上澄み液を取り除き、主要なH3-P抗体溶液(Cell Signaling Technology製品番号9706L、抗体は抗体36μlをPBS 14.4mlに混ぜることにより1:400に希釈した)400μl中に細胞ペレットを再度懸濁させた。細胞を37で40

分間インキュベートした。PBS 5.0mlを細胞に加え、細胞を遠心分離し、上澄み液を取り除き、細胞ペレットをPBS 1ml中に再度懸濁させた。この細胞は分析するまでそのまま保管した。

(2) H3-P+PI(レッド)：-20に少なくとも24時間保管した細胞を、「ブランク」対照標準用に上述のようにH3-P抗体で着色した。抗体と共に40分間インキュベートした後に細胞にPBS 5.0mlを加え、細胞を遠心分離し、上澄み液を取り除き、ヨウ化プロビジウム/RNアーゼA着色剤1ml中に細胞ペレットを再度懸濁させた。この後者の溶液は、RNアーゼA(BD Clontech製品番号4030-1)4mgと、PBS 20mlに溶かしたヨウ化プロビジウム(1mg/mlのMolecular Probes製品番号P-3566)75μlを混合することによって調製した。この細胞は分析するまで氷上に保管した。

(3) H3-P+Alexa(グリーン)：-20に少なくとも24時間保管した細胞を、「ブランク」対照標準用に上述のようにH3-P抗体で着色した。抗体と共に40分間インキュベートした後に細胞にPBS 5.0mlを加え、細胞を遠心分離し、上澄み液を取り除き、Alexa蛍光体488ノヤギ抗マウスIgG(H+L)接合体(2mg/ml)400μl中に細胞ペレットを再度懸濁させた。Alexa蛍光体試薬は、PBS 13.5mlにAlexa(Molecular Probes製品番号A-11011)13.5μlを加え、それを光から遠ざけて保管することによって調製した。細胞を37で30分間インキュベートした。次いでPBS 5.0mlを細胞に加え、細胞を遠心分離し、上澄み液を取り除き、細胞ペレットをPBS 1.0ml中に再度懸濁させた。この細胞は分析するまで氷上に保管した。

(4) 対照標準および処理培養液用のH3-P+Alexa+PI(ジュアルカラー)：-20に少なくとも24時間保管した細胞を、H3-P+Alexa(グリーン)で着色した細胞用に上述のようにH3-P抗体とAlexa蛍光体で着色した。細胞をAlexa蛍光体と共に37で30分間インキュベートした後に細胞にPBS 5mlを加え、細胞を遠心分離し、上澄み液を取り除き、細胞ペレットをPI/RNアーゼA着色剤1.0ml中に再度懸濁させた(上述と同様)。この細胞は分析するまで氷上に保管した。

【0093】これらの細胞を、下記のように校正したBecton Dickinson(BD)Flow Cytometer(488アルゴンレーザー)を用いて分析した。シース液(FACSFlow、Becton Dickinson製品番号340398)1mlをふた付の12×75mmのFalcon製5mlポリスチレン丸底管(製品番号35205)に加えた。シース液3mlを二番目の12×75mmのFalcon製5mlポリスチレン丸底管に加えた。標識していないCalIBRITE(商標)ビーズ(Becton Dickinson製品番号349502)を、その滴状物を分注するに先立って標識していないビーズを数回逆さにした後、各管に1滴加えた。第一の管に管Aのラベルを貼った。フルオレセインイソチオシアナート(FITC)およびCalIBRITE(商

標)フィコエリトリン (PE) ビーズの各1滴を第二の5ml管(管B)に加えた。測定器を起動する前にシース貯蔵槽を整理し、廃液槽を空にした。必要な場合は真空配管にシース液を流した。サイトメーターのスイッチを入れ、約10分間ウォームアップした。コンピュータのスイッチを入れ、ソフトウェアFACSComp (Becton Dickinson Apple Systems 7.5.3 Version 4.0)を開いた。

【0094】キャリブレーションプロセスは下記のように行った。CalIBRITE(商標)ビーズのロット情報をセットアップページに入力した。サイトメーターを高速に設定し、待機状態から実行に切り替えた。サイトメーター上の水を入れた5ml管を取り除き、標識していないビーズ(管A)をサイトメーター上に置いた。標識していないビーズがPMTを設定するように「実行」を選択した。急ぐ場合は管Aを除去し管Bと交換した。混合ビーズが蛍光補償および感度試験を設定するように「実行」を選択した。次いで管Bを取り除き、水を入れた5ml管と交換した。サイトメーターを待機状態に切り替え、キャリブレーションの記録をプリントアウトした。

【0095】サイトメーターを下記のように有糸分裂細胞の存在の測定およびDNA分析用にセットアップした。ソフトウェアCellQuest(商標) (Becton Dickinson, Version3.1)を開いた。選択項目「Choose Connect to Cytometer」を獲得メニューから選択した。選択項目「Choose Acquisition & Storage」を獲得メニューから選択した。事象の数を10,000事象に設定した(デフォルト)。次いで「Choose Acquisition & Storage」の選択を終了した。選択項目「Choose Parameter Description」を獲得メニューから選択した。Parameter Descriptionウィンドウから、ファイルメニュー、ファイルの記憶場所、およびパラメータラベルを選択した。事象速度、全事象、および獲得中の経過時間を閲覧するために獲得メニューから選択項目「Choose Counters」を選択した。各パラメータに対する増幅モード(LinまたはLog)を選択するためにサイトメーターメニューから選択項目「Choose Detectors / Amps」を選択した。試料の補償を調整するために選択項目「Choose Compensation from the Cytometer」メニューを選択した。

【0096】獲得用点図表およびヒストグラム図表は下記のように得た。「Dot Plots and Histogram Plots」をツールバーから選択し、下記のようにセットアップした。

【0097】1. Acquisition Dot Plot: (X) PARAMETER = FSC-Height 1024 FSC (LIN目盛)、(Y) PARAMETER = SSC-Height 1024 (LIN目盛)、ゲートなし、OPTIONSのもとでSHOWを2000ドットに設定し、次いで終了した。

【0098】2. Acquisition Histogram Plot: PARAMETER = FL1-Height 1024 (H3-P)、LOG目盛、ゲートなし、OPTIONSのもとでMANUAL SCALEを50に設定し、SHOWを2000事象に設定し、次いで終了した。

【0099】3. Acquisition Histogram Plot: PARAMETER = FL2-Height 1024 (PI)、LOG目盛、ゲートなし、OPTIONSのもとでMANUAL SCALEを50に設定し、SHOWを2000事象に設定し、次いでクローズした。

【0100】4. Acquisition Histogram Plot: PARAMETER = FL2-Area 1024 (PI)、ゲートなし、OPTIONSのもとでMANUAL SCALEを200に設定し、SHOWを全事象に設定し、次いでクローズした。

【0101】5. Acquisition Dot Plot: (X) PARAMETER = FL2-Area 1024 (PI)、LIN目盛、(Y) PARAMETER = FL2-Width 1024 (PI)、LIN目盛、ゲートなし(後に設定)、OPTIONSのもとでSHOWを全ドットに設定し、次いでクローズした。

【0102】6. Acquisition Dot Plot: (X) PARAMETER = FL2-Area 1024 (PI)、LIN目盛、(Y) PARAMETER = FL1-Height 1024 (H3-P)、LOG目盛、ゲートなし(後に設定)、OPTIONSのもとでSHOWを5000ドットに設定し、次いでクローズした。

【0103】試料は下記のように得た。サイトメーターを速度LOWでRUNに設定し、次いでBLANK(色素なし)試料をサイトメーター上に置いた。FSC/SSC点図表パネルを見ながら、点図表上のBLANK細胞試料が角度約45度でウィンドウを斜めに横切るように見えるようになるまで、検出器/増幅器ウィンドウ中のFSCおよびSSCパラメータに対して電圧設定を修正した。細胞試料の基線は、できるだけ0軸交点に近接して位置決めした。電圧は、すべてのまたは大部分の細胞がフィールドに現れるまで調整を続けた。次いでFL1-Height Histogramを閲覧し、BLANK細胞試料がヒストグラムパネルの左側の四半分に見えるまでFL1検出器の電圧を上下させた。電圧を調整して細胞試料を図表の0軸切片にできるだけ近接させた(ピークを軸の左側へ限度いっぱい持って行った)。次いで、FL2-Height Histogramを閲覧し、BLANK細胞試料がヒストグラムパネルの左側の四半分に見えるまでFL2検出器の電圧を上下させた。電圧を調整して細胞試料を図表の0軸切片にできるだけ近接させた(ピークを軸の左側へ限度いっぱい持って行った)。

【0104】BLANK試料を除去し、GREEN(Alexa蛍光体)試料と交換した。FL2-Height Histogramを閲覧しながら、FL1検出器の電圧を調整して細胞試料ピークを図表の0軸切片に近接するようにした(細胞ピーク全体が図表上に見えるべきである)。FL2-Height Histogramを閲覧しながら必要に応じて補償(FL2-%FL1)を調整した。ヒストグラム中にはピークは1つだけあり、そのピークは0軸切片にきわめて近接した。小さな第二のピークが存在する場合、第二のピークが消えるまで補償値を増加させた。

【0105】GREEN試料を除去し、RED(PI)試料と交換した。FL2-Height Histogramを閲覧しながら(X)軸上で $10^3$ 個にわたってRED細胞試料のピークが生ずるよう

にFL2検出器の電圧を調整した。この調整は、FL2-Area HistogramおよびFL2-Area / FL2-Width点図表中の(X)軸点200にわたってRED細胞試料のG1ピークを生じた。FL1-Height Histogramを閲覧しながら必要に応じて補償(FL1-%FL2)を調整した。ヒストグラム中にはピークは1つだけあり、そのピークは0軸切片に近接する。小さな第二のピークが存在する場合、第二のピークが消えるまで補償値を増加させた。

【0106】RED(PI)試料を除去し、DUAL COLOR(AlexaおよびPI)試料と交換した。FL2-Area Histogram中のX軸の整数200にわたってDUAL COLOR細胞試料のG1ピークを生じるように電圧を最終調整した。これは、FL2-Area / FL2-Width点図表上に点200にわたって細胞試料をもたらし、その周期集団(この集団は非処理細胞においてはX軸上で200から400の範囲に及ぶ)を特定するために2000~4000個の細胞をセットアップモードで獲得した。周期性集団のわずか左寄りで出発し、次いで第二Y軸の点図表の終了ゲートのずっと右側の領域まで続けることによってDNA分布を測定するためのゲートを設定した。このゲートを点図表の第二Y軸まで延長することにより、4nDNAよりも大きな細胞を収容することができた。FL2-Area(PI) / FL1-Height(H3-P) Acquisition Dot Plotを選択し、Format Dot Plotをツールバーから選んだ。Gate G1=R2を選択した。この調整は、獲得プロセス中の有糸分裂細胞の閲覧を可能にした。有糸分裂集団とG2集団は両方とも4nDNAを含有するので、有糸分裂集団は直接G2集団の上方に現れる。

【0107】測定器のセットアップモードを獲得モードに戻した。DNA分析の獲得が開始され、10,000個のゲートされていない細胞が獲得された。処理試料が獲得されるに従って、(X)軸上のG1ピークの移動および周期性細胞の集団の広がり観察され、その結果細胞の周期性集団が点図表の端からそれる場合には、異数性および倍数性獲得(DNA獲得に続く)のためにあとでFL2電圧を下げた。FL2電圧は、異数性および倍数性獲得のために試料ごとに必要に応じて(すなわち、FL2-AのX軸の200上にG1ピークを持ち続けるように)最適化した。50,000個のゲートされていない細胞が各試料から獲得された。データはリストモード・フォーマット中にセーブされた。

【0108】リンパ球中の異数性および倍数性細胞の存在は、下記のように決定された。ソフトウェアCellQuest(商標)を開き、点図表を作るためにツールバーからダイアログボックスをPLOTおよびOPENした。FILEを選択しデータファイルを開いた。「周期性細胞の集団」を特定するためにPARAMETERSをセットアップした。すなわち、(X)=FL2-Area 1024(PI)および(Y)=FL2-Width 1024、OPTIONSはSHOW 100%を示し、ゲートなし。点図表を用紙の幅に拡大した。周期性集団のわずか左寄りで出

発し、次いで第二Y軸でゲートを終了する点図表のずっと右側の領域まで続けることによってDNA分布のためのゲートを設定した。このゲートを点図表の第二Y軸まで延長することにより、4nDNAよりも大きな細胞を収容することができた(図1参照)。点図表を作るためにツールバーからダイアログボックスのPLOTおよびOPENが選択された。「周期性細胞の集団」を特定するためにPARAMETERSを設定した。すなわち、(X)=FL2-Area 1024(PI)および(Y)=FL1-Height 1024(H3-P)、OPTION SはSHOW 100%を示し、GATEはG1=R1に設定した。

【0109】目安として間期細胞を用いて、G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>~S相域より上の有糸分裂細胞域にわたって第一ゲートを設定した。次いで第一ゲートの端から開始して、G<sub>2</sub>域(すなわち、有糸分裂細胞の最も大きな集団である4nDNA)より上の有糸分裂細胞にわたって第二ゲートを設定した。第二ゲートの端から開始して、次の細胞周期の推定G<sub>0</sub>G<sub>1</sub>~S相域にわたって第三ゲートを設定した。この範囲を推定するためには、G<sub>2</sub>(X)軸の値を目安として使用し、その値を2倍することにより次の周期のおおよそのG<sub>2</sub>域を特定する。例えばG<sub>2</sub>が(X)軸(第一周期)上の400に位置するならば、周期性G<sub>2</sub>細胞の第二集団はその(X)軸上のほぼ800のところに現れるはずである(図1-2参照)。ツールバーからSTATSを選択し、REGION GATEを選択した。ソフトウェアは自動的に点図表の各ゲートされた領域のゲートされた集団%を計算する。

【0110】Regions (ID): Gate (1): Region 1 (R1) = 周期性細胞集団

Gate (2): Region 2 (R2) = 二倍体欠損有糸分裂集団

Gate (3): Region 3 (R3) = 正常な有糸分裂細胞

Gate (4): Region 4 (R4) = 二倍体過剰有糸分裂集団

Gate (5): Region 5 (R5) = 倍数体有糸分裂集団

図4は、領域の統計の例である。

【0111】領域:

R1 = 領域1; ゲートされた間期細胞

R2 = 領域2; 或るDNA内容(>2nだが<4nのDNA)を有するゲートされた有糸分裂細胞(二倍体欠損細胞集団)

R3 = 領域3; 4nのDNA内容を有するゲートされた有糸分裂細胞(正常な細胞集団)

R4 = 領域4; >4nだが<8nのDNA内容を有するゲートされた有糸分裂細胞(二倍体過剰細胞集団)

R5 = 領域5; 8nのDNA内容を有するゲートされた有糸分裂細胞(倍数体細胞集団)

計算:

1. 二倍体欠損細胞の頻度(%)

【0112】

【数1】

$$\% \text{ 二倍体欠損細胞} = \frac{R_2}{(R_2 + R_3 + R_4 + R_5)} \times 100$$

【0113】2. 二倍体過剰細胞の頻度 (%)

【数2】

【0114】

$$\% \text{ 二倍体過剰細胞} = \frac{R_4}{(R_2 + R_3 + R_4 + R_5)} \times 100$$

【0115】3. 倍数体細胞の頻度 (%)

【数3】

【0116】

$$\% \text{ 倍数体細胞} = \frac{R_5}{(R_2 + R_3 + R_4 + R_5)} \times 100$$

【0117】DNAは下記のように分析した。ソフトウェアMODFIT LT (Verity Software House, Version 3.0 To psham, Maine) をこの目的に使用した。ツールバーから FILEを選び、データファイルを選択した。Choose Parameter for AnalysisのダイアログボックスでP6 FL2 Aを選んだ。Choose Gateのダイアログボックスでボックスをノーチェックのままにした。ツールボックスからMODを選んだ。Edit Properties for Manual Analysisのダイアログボックスには下記のような選択対象があった。すなわち、自己残屑(チェック)、自己凝集物(チェック)、アポトーシス(ノーチェック)、直線性は2.00に設定、標準(0)、モデルテンプレート=二倍体、レンジポジションは「Compute Range Position」に設定すべきである。ツールバー上のRANGEボタンは押されている(呼び出されている)ように見えた。G<sub>1</sub>およびG<sub>2</sub>ピークは自動的に識別された(図5-6参照)。FITをツールバー上で選び、ソフトウェアMODFIT LTによりG<sub>1</sub>相、G<sub>2</sub>相、およびS相細胞%を決定した(図5-6参照)。

【0118】異数性誘発剤のノスカピンで処理したヒトリンパ球のフローサイトメトリー分析の結果を図3-4に示す。負の対照標準、すなわちノスカピンで処理していないリンパ球を図1に示す。結果はノスカピンで処理した細胞の集団中には、二倍体欠損細胞(R2象限中に)、正常な二倍体細胞(R3象限中に)、二倍体過剰細胞(R4象限中に)、および倍数体細胞(R5象限中に)が存在することを示す。異常細胞(すなわち、R2、R4、およびR5中に観察される細胞)の増加は、ノスカピンで処理していなかった細胞の集団中には観察されなかった。二倍体欠損細胞は正常な細胞よりもDNAが

【0119】したがってこの実施例は、有糸分裂マーカーで着色した細胞および定量用DNA着色剤で着色した細胞のフローサイトメトリー分析が、異常な数値染色体内

容を有する細胞をはっきりと識別することを実証する。

【0120】実施例2: ノスカピン処理した培養ヒトリンパ球中の染色体異常頻度のフローサイトメトリー分析および手作業による分析の比較

本実施例は、本明細書に記述した数値染色体異常のサイトメトリーによる分析が、数値染色体異常の古典的な手作業による分析と同様の結果をもたらすことを実証する。

【0121】前述のヒトリンパ球および前述のノスカピン処理または非処理ヒトリンパ球を、実施例1で得られた数値染色体異常(すなわち倍数性)を有する細胞数と比較するために数値染色体異常の手作業による分析にかけた。手作業による分析の場合、細胞試料を6分間、1000 rpmで遠心分離した。上澄み液を取り除き、細胞ペレットを予加温(37℃)した1%クエン酸ナトリウム5mM中に懸濁させた。後者溶液は、蒸留水100ml中にクエン酸(Sigma Chemicals)1gを混ぜることにより調製した。この細胞を前述のように直ちに遠心分離した。上澄み液を取り除き、ペレットを4℃の固定液(メタノール:酢酸が3:1)5ml中で勢よく再度懸濁させた。次いでこの細胞を前述のように遠心分離し、ペレットを4℃の固定液(メタノール:酢酸が3:1)5ml中に再度懸濁させた。次いでこの細胞を-20℃で一晩、またはスライドの調製まで保管した。

【0122】スライドは下記のように調製した。細胞を前述のように遠心分離し、次いで上澄み液を流し出した。ペレットを新鮮な固定液約2ml中に再度懸濁させた。懸濁液を冷やした湿潤スライド上に滴下し、このスライドを強熱して細胞をスライドに固定した。スライドを2~10%ギームザ(GIBCO, BRL)溶液中で着色した。

【0123】倍数体指標は、低倍率下(明視野)で8n有糸分裂細胞の頻度について1000個の連続する有糸分裂細胞に規則正しく点数を付けることにより決定した。

【0124】図7に示す結果は、手作業でカウントした場合とフローサイトメトリーによる評価によりカウントした場合でノスカピンの各濃度でカウントされた倍数体の数が似ていることを示している。したがってフローサイトメトリー分析は、倍数体細胞をカウントする古典的な方法で得られるデータと本質的に同一のデータを提供する。

【0125】実施例3：KCN処理したヒトリンパ球中の数値染色体異常のフローサイトメトリー分析

前述のように得られたヒトリンパ球を、KCN (FLUKA Chemicals) 0~0.04 µg/mlの存在または不在で37°Cで24時間インキュベートした。図8に示す結果は、KCNが数値異常を誘発しないことが知られているので、予想されるように異常細胞(二倍体欠損、二倍体過剰、または倍数体)のパーセントが最少限であることを示す。

【0126】実施例4：サイトカラシンB処理したヒトリンパ球中の数値染色体異常のフローサイトメトリー分析

前述のように得られたヒトリンパ球を、サイトカラシンB (Sigma Chemicals) 0~6 µg/mlの存在または不在で37°Cで24時間インキュベートした。図9に示す結果は、サイトカラシンBが主に倍数性を誘発することが知られているので、予想されるように二倍体過剰細胞のパーセントが最少限であるのに対し、二倍体欠損細胞および倍数体細胞の数が高いことを示している。

【0127】実施例5：コルセミド(登録商標)処理したヒトリンパ球中の数値染色体異常のフローサイトメトリー分析

前述のように得られたヒトリンパ球を、コルセミド(登録商標) (GIBCO BRL) 0~0.04 µg/mlの存在または不在で37°Cで24時間インキュベートした。図10に示す結果は、コルセミド(登録商標)が異数性を誘発することが知られているので、予想されるように二倍体過剰細胞および二倍体欠損細胞のパーセントが増加し、倍数体細胞の数が高いことを示している。

【0128】実施例6：グリセオフルビン処理したヒトリンパ球中の数値染色体異常のフローサイトメトリー分析

前述のように得られたヒトリンパ球を、グリセオフルビン (Sigma Chemicals) 0~100 µg/mlの存在または不在で37°Cで24時間インキュベートした。図11に示す結果は、グリセオフルビンが異数性を誘発することが知られているので、予想されるように二倍体過剰細胞、二倍体欠損細胞、および倍数体細胞のパーセントが高いことを示している。

【0129】実施例7：ノスカピン処理したヒトリンパ球中の数値染色体異常のフローサイトメトリー分析

前述のように得られたヒトリンパ球を、ノスカピン (Sigma Chemicals) 0~100 µg/mlの存在または不在で37°Cで24時間インキュベートした。図12に示す結果

は、ノスカピンが異数性を誘発することが知られているので、予想されるように二倍体過剰細胞、二倍体欠損細胞、および倍数体細胞のパーセントが高いことを示している。

【0130】均等物：当業者は、単に定型化した実験法を用いて本明細書に記述された本発明の特定の実施形態の多くの均等物を認識し、または確かめることができるはずである。このような均等物も、特許請求の範囲に包含される。

【図面の簡単な説明】

【図1】細胞の周期性集団の完全な獲得を保证するための適正な「ゲート設定」を示す、ヒトのリンパ球のフローサイトメトリー分析によって得られた2パラメータ点図表 (FL2-W / FL2-A) を表す図である。

【図2】複数細胞周期のDNA内容 (すなわちG0-G1-SおよびG2) に基づいて異なる有糸分裂細胞の集団を見分けるための適正な「ゲート設定」を示す、正常なヒトのリンパ球のフローサイトメトリー分析によって得られた2パラメータ点図表 (抗H3mAb / FL2-A) を表す図である。

【図3】DNA内容の増加した細胞の「ゲートされた」周期性集団を示す、ノスカピン処理したヒトのリンパ球のフローサイトメトリー分析によって得られた2パラメータ点図表 (FL2-W / FL2-A) の例を表す図である。

【図4】二倍体欠損細胞 (R2)、二倍体細胞 (R3)、二倍体過剰細胞 (R4)、および倍数体細胞 (R5) を定量するための適正な「ゲート設定」を示す、ノスカピン処理したヒトのリンパ球のフローサイトメトリー分析によって得られた2パラメータ点図表 (抗H3mAb / FL2-A) の例を表す図である。

【図5】DNAのG1およびG2のピークの手作業による位置合わせを示す、ソフトウェアMODIFIT 3.0から得られたDNA「セットアップ」ヒストグラムの例を表す図である。

【図6】G1、G2、およびS相、細胞凝集体、および細胞残屑中の細胞の計算された数を示す、ソフトウェアMODIFIT 3.0から得られたDNA「分析」ヒストグラムの例を表す図である。

【図7】異なる量のノスカピンで処理したヒトのリンパ球の集団中の倍数体細胞の手作業とフローサイトメトリー分析の比較を示すグラフである。

【図8】フローサイトメトリー分析により求めた、異なる量のシアン化カリウム (KCN) で処理したヒトのリンパ球の集団中の二倍体欠損細胞、二倍体過剰細胞、および倍数体細胞の比率を示すグラフである。

【図9】フローサイトメトリー分析により求めた、異なる量のサイトカラシンBで処理したヒトのリンパ球の集団中の二倍体欠損細胞、二倍体過剰細胞、および倍数体細胞の比率を示すグラフである。

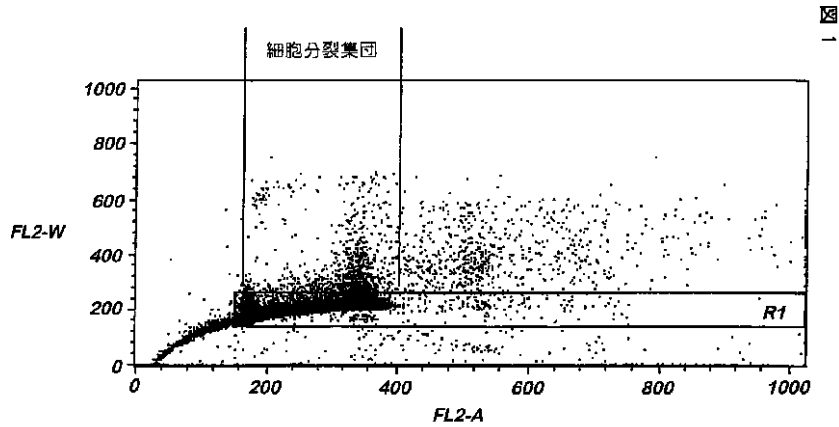
【図10】フローサイトメトリー分析により求めた、異なる量のコルセミドで処理したヒトのリンパ球の集団中の二倍体欠損細胞、二倍体過剰細胞、および倍数体細胞の比率を示すグラフである。

【図11】フローサイトメトリー分析により求めた、異なる量のグルセオフルピンで処理したヒトのリンパ球の\*

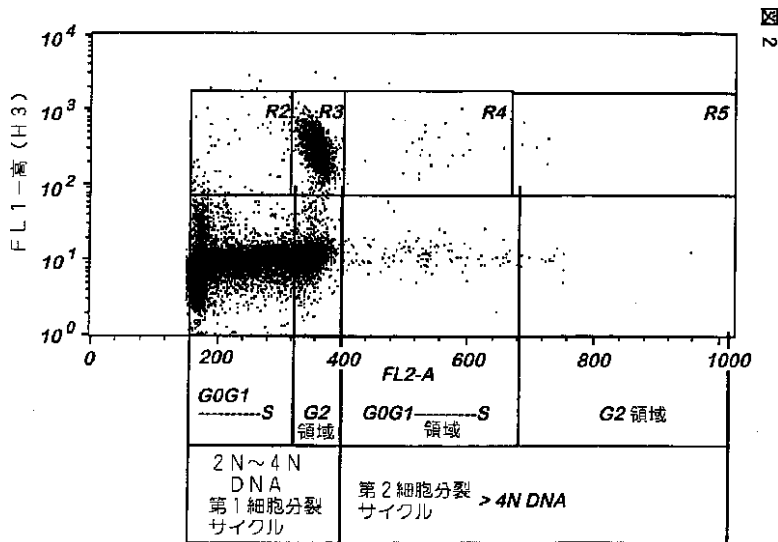
\*集団中の二倍体欠損細胞、二倍体過剰細胞、および倍数体細胞の比率を示すグラフである。

【図12】フローサイトメトリー分析により求めた、異なる量のノスカピンで処理したヒトのリンパ球の集団中の二倍体欠損細胞、二倍体過剰細胞、および倍数体細胞の比率を示すグラフである。

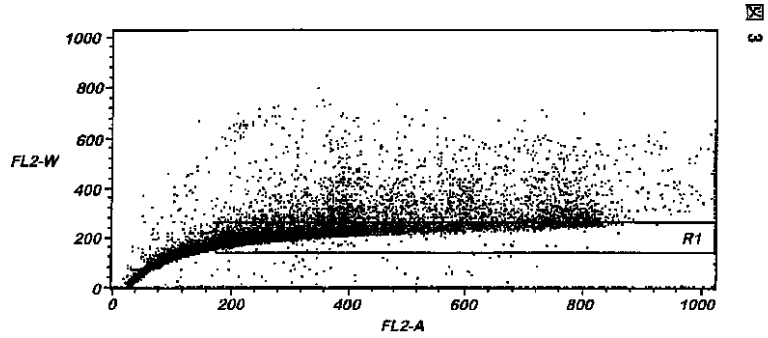
【図1】



【図2】

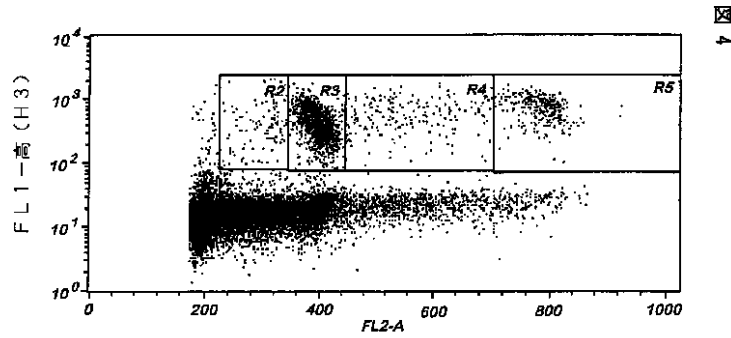


【図3】



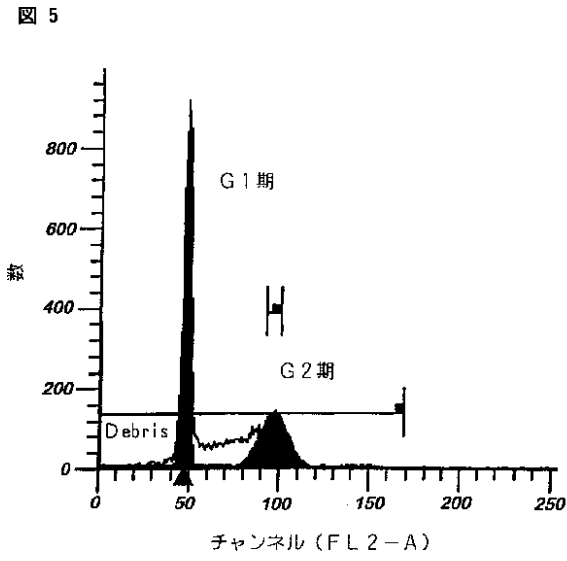
R1	24678	100.00	49.36
R2	117	0.47	0.23
R3	2059	8.34	4.12
R4	215	0.87	0.43
R5	359	1.45	0.72

【図4】

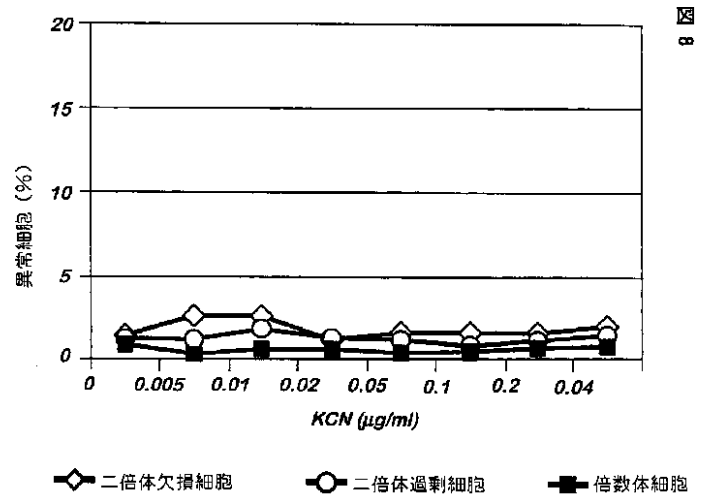


R1	24678	100.00	49.36
R2	117	0.47	0.23
R3	2059	8.34	4.12
R4	215	0.87	0.43
R5	369	1.45	0.72

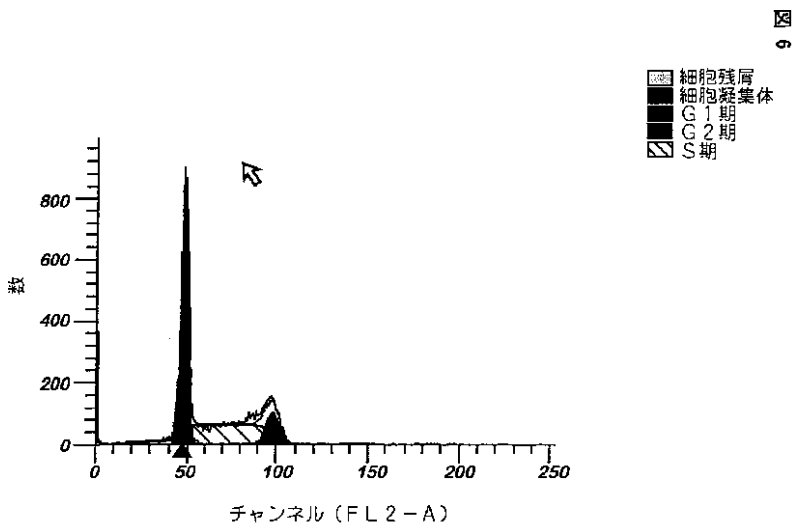
【図5】



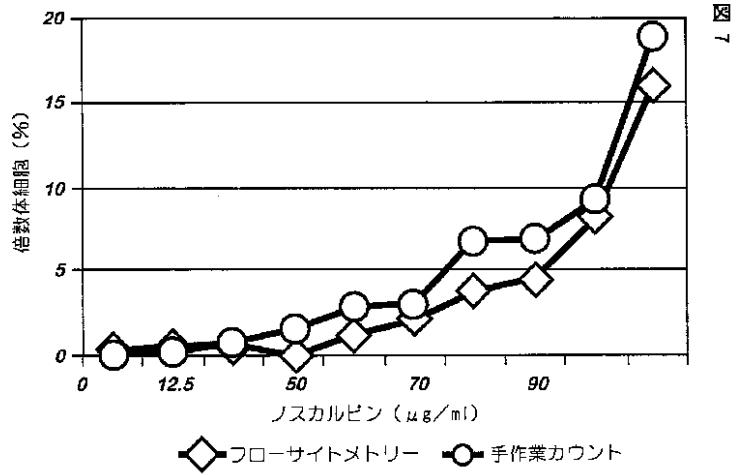
【図8】



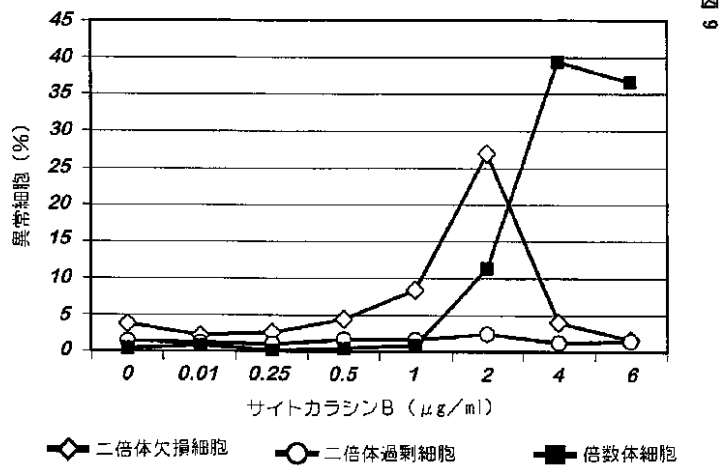
【図6】



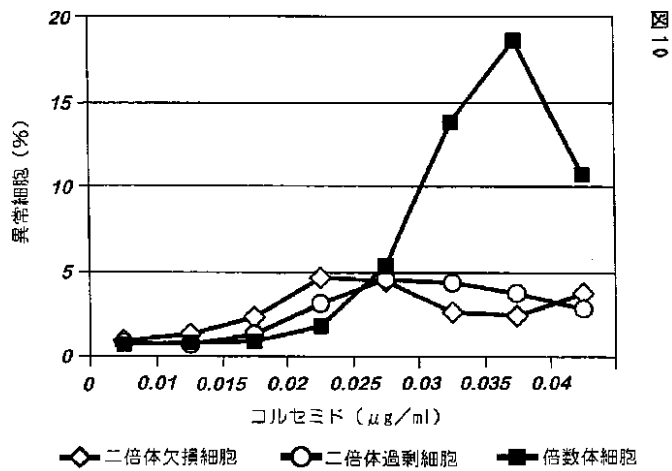
【図7】



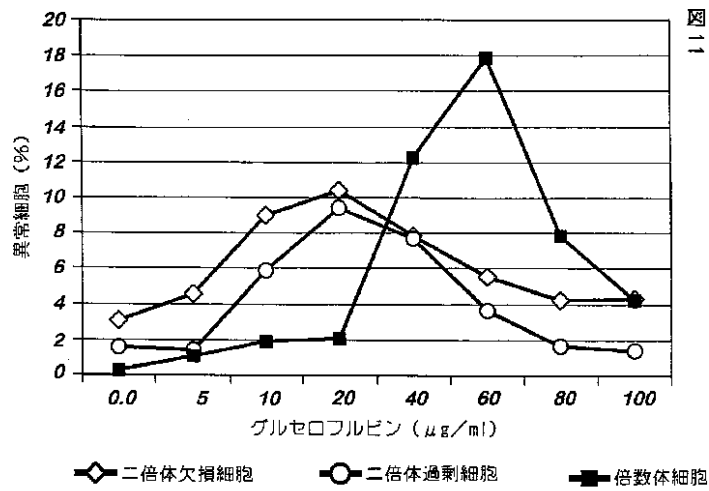
【図9】



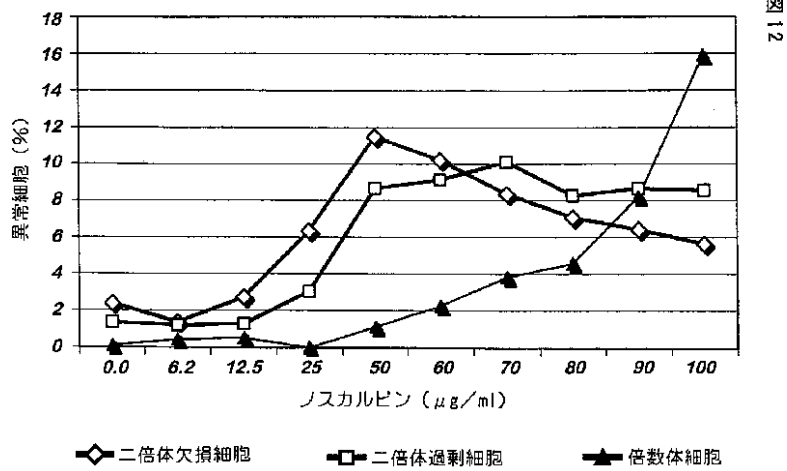
【図10】



【図11】



【図12】



フロントページの続き

(72)発明者 マイク ユールゲン シュラー, シニア  
 アメリカ合衆国, コネチカット 06340,  
 グロトン, イースタン ポイント ロー  
 ド, ファイザー グローバル リサーチ  
 アンド ディベロップメント

Fターム(参考) 2G045 AA24 BA13 BB24 CA01 CA25  
 DA13 FA37 FB03 JA01  
 4B063 QA01 QA18 QA19 QQ08 QQ42  
 QR66 QS36 QS39 QX02

专利名称(译)	检测具有数字染色体异常的细胞的方法		
公开(公告)号	<a href="#">JP2003210198A</a>	公开(公告)日	2003-07-29
申请号	JP2002347133	申请日	2002-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	ポーラアンミュールパウアー マイクユールゲンシュラーシニア		
发明人	ポーラ アン ミュールパウアー マイク ユールゲン シュラー,シニア		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6875 C12Q1/6827 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/5044 G01N33/5091 G01N2500/10 C12Q2563/173		
FI分类号	C12Q1/68.Z G01N33/50.P G01N33/53.M C12Q1/6827.C C12Q1/6827.Z		
F-TERM分类号	2G045/AA24 2G045/BA13 2G045/BB24 2G045/CA01 2G045/CA25 2G045/DA13 2G045/FA37 2G045 /FB03 2G045/JA01 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QQ08 4B063/QQ42 4B063/QR66 4B063/QS36 4B063/QS39 4B063/QX02		
优先权	60/337282 2001-11-30 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

解决的问题：提供一种具有数值染色体异常的有丝分裂细胞，以及一种检测在细胞中引起数值染色体异常的药物的方法。 在一个优选的实施方案中，该方法包括检测经历有丝分裂的细胞的有丝分裂标记物和指示有丝分裂细胞中DNA量的定量DNA染色剂。 优选通过流式细胞术分析染色的细胞。

二倍体过剩細胞の頻度 (%)

【数2】

$$\% \text{ 二倍体过剩細胞} = \frac{R_4}{(R_2 + R_3 + R_4 + R_5)} \times 100$$