

(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2005-505746

(P2005-505746A)

(43) 公表日 平成17年2月24日(2005.2.24)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/50	GO 1 N 33/50	Z 2GO43
C 1 2 Q 1/02	C 1 2 Q 1/02	2GO45
C 1 2 Q 1/04	C 1 2 Q 1/04	4BO24
C 1 2 Q 1/68	C 1 2 Q 1/68	A 4BO63
GO 1 N 21/64	GO 1 N 21/64	F

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 92 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2002-562212 (P2002-562212)	(71) 出願人	500204740 ダナーファーバー キャンサー インスチ チュート インコーポレーテッド アメリカ合衆国マサチューセッツ州021 15, ボストン, ピニー・ストリート 4 4
(86) (22) 出願日	平成14年2月1日 (2002.2.1)	(74) 代理人	100102978 弁理士 清水 初志
(85) 翻訳文提出日	平成15年8月4日 (2003.8.4)	(74) 代理人	100108774 弁理士 橋本 一憲
(86) 国際出願番号	PCT/US2002/002832	(72) 発明者	クラエフト スタイン-キャスレイン アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 ブ ルックリン リテル ロード 25
(87) 国際公開番号	W02002/062201		
(87) 国際公開日	平成14年8月15日 (2002.8.15)		
(31) 優先権主張番号	60/265, 909		
(32) 優先日	平成13年2月2日 (2001.2.2)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 レアイベント検出システム

## (57) 【要約】

標的物体の異なる部分の示差的な蛍光標識によって、多数の候補物体を有する検体ワールド内の標的物体を検出する方法を開示する。蛍光団の使用者によって提供される柔軟性により、任意の稀な標的物体の高い効率および精度での迅速な検出が可能になる。

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

検体中の標的物体の有無を検出する方法であって、  
第1の蛍光団が光子を第1の波長で放出し、第2の蛍光団が光子を第2の波長で放出する、少なくとも第1の蛍光団および第2の蛍光団に対して曝露された、またはそれらによって標識された検体フィールドを入手する段階；

検体フィールドに、第1および第2の蛍光団を励起するのに十分な光を照射する段階；

検体フィールドを第1の光子源に関して第1の波長で、また第2の光子源に関して第2の波長で低倍率で走査する段階；

検体フィールド内部の各々の第1の源および各々の第2の源の位置を登録する段階；

第2の波長の光子を実質的に遮断するが第1の波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して生成された第1の画像である、検体フィールドの各位置での第1の画像を収集および記録する段階；

第1の波長の光子を実質的に遮断するが第2の波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して生成された第2の画像である、検体フィールドの各位置で高倍率の第2の画像を収集および記録する段階；

各々の第1の画像および各々の第2の画像を検体フィールド内部の対応する位置に対して索引付けする段階；ならびに

検体フィールド内部の単一の位置での第1の画像および第2の画像を検査する段階、を含み、

単一の位置での第1および第2の画像に候補物体が存在することにより、検体中に標的物体が存在することが示されるような方法。

## 【請求項2】

検体フィールドの調製が、

a. 細胞試料を可溶化して試料混合物を得る段階；

b. 試料混合物を遠心する段階；

c. 試料混合物から上清を分離する段階；

d. この結果得られた細胞のペレットを生理的緩衝液中に再懸濁する段階；

e. 細胞を接着性スライドに対してプレATINGする段階；

f. 細胞培養液をスライドに対して添加する段階

を含む、請求項1記載の方法。

## 【請求項3】

検体フィールドの調製が、

段階dの後に、細胞混合物の希釈物を作製する段階、希釈物を死細胞に対する感受性のある染色剤で処理する段階、および用いるスライドの試料細胞密度を決定するために細胞数算定を行う段階、

をさらに含む、請求項2記載の方法；

## 【請求項4】

標的物体が、癌細胞、上皮細胞、平滑筋細胞、樹状細胞、記憶T細胞、記憶B細胞、体細胞、正常細胞、異常細胞または幹細胞である、請求項2記載の方法。

## 【請求項5】

システムが、少なくとも1,000,000個の細胞がある検体フィールド内の少なくとも1つの標的細胞を検出する、請求項2記載の方法。

## 【請求項6】

記録が少なくとも1024×1024ピクセルアレイの画像を含む、請求項2記載の方法。

## 【請求項7】

フィールドの検体が大多数の細胞種として白血球を含む、請求項2記載の方法。

## 【請求項8】

検体フィールドを収容するための架台；

ある所定レベルおよび所定レベルの1つまたは複数の追加的な倍率で、検体フィールド内

10

20

30

40

50

部の位置の画像を収集するために配置および構成された検出器；

第1の蛍光団を第1の励起波長で励起するのに十分であって第2の蛍光団を第2の励起波長で励起するのに十分な光を検体フィールドに照射するために配置および構成された光源；  
 検出器に取り付けられたカメラであって、(1)第2の蛍光団の第2の発光波長の光子を実質的に遮断するが第1の蛍光団の第1の発光波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して、検体フィールド内のある位置の第1の画像を取り込むため、および(2)第1の発光波長の光子を実質的に遮断するが第2の発光波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して、検体フィールド内のその位置の第2の画像を取り込むために配置および構成されたカメラ；ならびに

第1の画像および第2の画像を記録して、第1の画像および第2の画像を検体フィールド内部の対応する位置に対して索引付けするコンピュータであって、使用者による要求に応じて、対応する位置に関する第1の画像および第2の画像を表示するコンピュータ、を含む検出システム。 10

【請求項9】

細胞の検体フィールド内の生物兵器細胞に関する分析のための方法であって、

- i) 検体フィールドを、生物兵器細胞を特定する第1の蛍光団によって処理する段階；
- ii) 検体フィールドを、生物兵器細胞を特定する第2の蛍光団によって処理する段階；
- iii) 検体フィールドに、第1の蛍光団に光子を放出させるのに適した光を照射する段階；
- iv) 検体フィールドに、第2の蛍光団に光子を放出させるのに適した光を照射する段階、
- v) 生物兵器細胞である、光子を放出する検体フィールド内の細胞を同定する段階、 20

【請求項10】

検体フィールド内の細胞の調製が、

- i. 試料混合物を遠心する段階；
- j. 試料混合物を再懸濁する段階；
- k. 細胞を接着性スライド上にプレーティングする段階；
- l. スライドをパラホルムアルデヒドで処理する段階；
- m. スライドをトリトンで処理する段階；
- n. スライドをプレハイブリダイゼーション溶液で処理する段階；
- o. スライドを、蛍光団を有するハイブリダイゼーション溶液で処理する段階； 30
- p. スライドを蛍光色素で処理する段階、

を含む、請求項9記載の方法。

【請求項11】

検体フィールドを、生物兵器細胞を特定する1つまたは複数の追加的な蛍光団によって処理する段階、および検体フィールドに、1つまたは複数の追加的な蛍光団に光子を放出させるのに適した光を照射する段階をさらに含む、請求項10記載の方法。

【請求項12】

少なくとも1つの蛍光団が、生物兵器細胞のDNAを特定する、請求項11記載の方法。

【請求項13】

生物兵器が、細菌、リケッチア、ウイルス、真菌またはプリオンである、請求項10記載の方法。 40

【請求項14】

検体フィールドの調製が、

- a. 血液試料を塩化アンモニウム溶液で可溶化する段階；
- b. 試料混合物を遠心する段階；
- c. 上清の塩化アンモニウム溶液および赤血球を分離する段階；
- d. この結果得られた白血球のペレットをPBS中に再懸濁する段階；
- e. 試料混合物を遠心する段階；
- f. この結果得られた白血球のペレットをPBS中に再懸濁する段階；
- g. 段階fの細胞混合物、トリパンブルーおよびPBSの希釈物を作製する段階； 50

h. 細胞を接着性スライド上にプレーティングする段階；

i. 細胞培養液をスライドに対して添加する段階、

を含む、請求項1記載の方法。

【請求項15】

請求項2記載の方法を含む、移植臓器提供者を標的物体の有無に関してスクリーニングするための方法であって、検体フィールドが臓器提供者から採取された試料であるような方法。

【請求項16】

請求項2記載の方法を含む、薬剤候補を投与された対象における疾患または疾患症状に対する薬剤候補の有効性を、その有無が疾患または疾患症状の指標となる標的物体の有無に関するスクリーニングによって評価するための方法であって、検体フィールドが対象から採取された試料であるような方法。 10

【請求項17】

請求項2記載の方法を含む、標的物体の有無に関して血液試料をスクリーニングするための方法であって、検体フィールドが血液試料であるような方法。

【請求項18】

請求項2記載の方法を含む、標的物体の有無に関して液体試料をスクリーニングするための方法であって、検体フィールドが液体試料であるような方法。

【請求項19】

標的物体が癌細胞である、請求項15～18のいずれか一項記載の方法。 20

【請求項20】

請求項2記載の方法を含む、細菌の存在に関するスクリーニングの方法であって、少なくとも1つの蛍光団が細菌に対するDNAプローブを含むような方法。

【請求項21】

検体フィールドが外科患者から手術後に採取される、請求項20記載の方法。

【請求項22】

検体フィールドが食品試料から採取される、請求項20記載の方法。

【請求項23】

j. スライドを、アルデヒド系固定剤に曝露させる段階；

k. スライドを、リン酸緩衝食塩水（PBS）中ですすぎ洗いする段階； 30

l. ヒトAB血清をスライドに対して添加する段階；

m. 一次抗体をスライドに対して添加して、スライドをインキュベートする段階；

n. スライドをPBS中ですすぎ洗いする段階；

o. 二次抗体をスライドに対して添加して、スライドをインキュベートする段階；

p. スライドを有機溶媒中で曝露させる段階；

q. スライドをPBS中ですすぎ洗いする段階；

r. ヒトAB血清をスライドに添加する段階；

s. 一次抗体をスライドに添加して、スライドをインキュベートする段階；

t. スライドをPBS中ですすぎ洗いする段階；

u. 二次抗体をスライドに添加して、スライドをインキュベートする段階； 40

v. スライドをPBS中ですすぎ洗いする段階；

w. 細胞染色剤をスライドに添加して、スライドをインキュベートする段階；

x. スライドをPBS中ですすぎ洗いする段階；

y. スライドを水に曝露させる段階；

z. スライドをマウントする段階、

をさらに含む、請求項10記載の方法。

【請求項24】

j. スライドを有機溶媒中で曝露させる段階；

k. スライドをPBS中ですすぎ洗いする段階；

l. 一次抗体をスライドに添加して、スライドをインキュベートする段階； 50

- m. スライドをPBS中ですすぎ洗いする段階；
- n. 二次抗体をスライドに添加して、スライドをインキュベートする段階；
- o. スライドをPBS中ですすぎ洗いする段階；
- p. 細胞染色剤をスライドに添加して、スライドをインキュベートする段階；
- q. スライドをPBSですすぎ洗いする段階；
- r. スライドを水に曝露させる段階；
- s. スライドをマウントする段階、  
をさらに含む、請求項10記載の方法。

【請求項25】

有機溶媒がアルコールまたはアセトンである、請求項23または24のいずれかに記載の方法 10

【請求項26】

一次抗体がケラチンである、請求項23または24のいずれかに記載の方法。

【請求項27】

二次抗体が抗ウサギローダミンである、請求項23または24のいずれかに記載の方法。

【請求項28】

段階sにおける一次抗体がケラチンであって、段階uにおける二次抗体が抗ウサギローダミンである、請求項23記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

20

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2001年2月2日に提出された「レアイベント検出システム (Rare Event Detection System)」と題する米国特許出願第60/265,909号の利点を請求するものであり、この出願はその全体が参照として本明細書に組み入れられる。

【0002】

連邦政府の資金援助を受けた研究としての申告

本発明は、米国立衛生研究所 (National Institutes of Health) からの助成金 (第CA13849号) により、連邦政府からの資金を受けてなされたものである。政府は本発明において一定の権利を有する。

30

【0003】

発明の背景

ヒトの癌のほとんどは正常および/または異常な遺伝子の異常発現を特徴としており、癌細胞に自然淘汰が作用することによって増殖制御の喪失、血管新生、浸潤および転移が引き起こされる。このため、患者の試料中の特定の表現型の癌細胞を検出することができれば、医療提供者に対して有意義な情報がもたらされる。例えば、転移性癌細胞が体内に検出されれば、医療専門家はその患者に対してより積極的な治療法を検討すると考えられる。

【0004】

癌マーカーの発現に依拠した癌細胞の検出方法は一般に、長く手間がかかり、時には費用もかかる免疫組織化学または核酸ハイブリダイゼーションの手順を必要とし、研究所には広く普及しているが、診療施設ではそれほど利用しやしくない。さらに、多くの場合、スクリーニングされる個々のマーカーは、癌の進行の後期になって初めて、または検出可能なレベルとして産生されるため、早期発見の恩恵が得られる機会を逃してしまう。現在の技術では、1百万分率 (すなわち、100万個の他の細胞の中に癌細胞が1個の割合) 程度の微小転移を検出することも可能であるが、癌によっては、この検出レベルでも真の「早期発見」には不十分である。検出感度のレベルがさらに上がれば、癌細胞の増殖に対する適切でより効果的な介入を可能にし、それによってより効果的かつ適時な癌治療および疾患修飾療法が可能になるような癌細胞の検出能が効果的に得られると考えられる。したがって、診療施設での使用により適した、迅速で、効率的で、信頼性が高く、感度の高い検出 50

方法に対しての需要がある。

#### 【0005】

戦場での生物兵器（BW）の検出にも同様の問題があり、すなわち、多数の粒子の中の稀な粒子（例えば、毒素またはウイルス）を検出するために適した方法も装置もない。生物兵器は、意図的に用いられると他のものに危害を及ぼす、細菌およびウイルスまたは関連毒素などの感染因子として定義され、長きにわたって人類とともに存在してきた。矢尻が、毒素を含む植物もしくは動物の抽出物；またはガス壊疽菌クロストリジウム-パーFRINGENS（*Clostridium perfringens*）の源であってしばしば破傷風菌C.テタニ（*C. tetani*）の源でもある糞便もしくは腐りかけの肉に浸されていることからみて、これらはおそらく元々は先史時代に用いられていたと思われる。BWが記録に初めて現れたのは紀元前6世紀と古く、この時期にアッシリア人が敵の井戸を麦角で汚染させている；同じくアテネのソロンはクリッサ（*Krissa*）包囲攻撃時に下剤性薬草ヘレボルス（ザゼンソウ）を用いて給水路を汚染させた；ローマ人および他の多くの者も同様の戦略を用いている；14世紀には蒙古人が包囲中のカッフアの城壁の向こう側に疫病感染者の死体を射出機で投げ込んでおり、この出来事は欧州全域に波及した黒死病流行のきっかけになった可能性もある。BWの未成熟な使い方やより精巧な使用の例は他にも数多く、20世紀後半までに至っている。

10

#### 【0006】

現在では基礎微生物学および応用微生物学の進歩に伴い、熟練した科学者が、極めて病毒性の強い病原体および毒素を兵器として利用することが可能になっている。いくつかの国（米国を含む）は20世紀中の何らかの時点でBW計画を策定しているが、おそらく最も知られているのは日本および旧ソ連での取り組みであろう。日本陸軍は1932年から第二次世界大戦終了時まで、中国に駐屯した「731部隊」を通じて生物兵器の研究に携わった。ヒト被験者（中国およびロシアの民間人、ならびに米国、英国、中国、韓国およびロシアの捕虜）を対象にさまざまな病原体を用いた研究が行われ、これには炭疽、鼻疽、ペスト、腸チフス、パラチフスAおよびB、チフス、痘瘡、野兎病、伝染性黄疸、ガス壊疽、破傷風、コレラ、赤痢、猩紅熱、波状熱、ダニ脳炎、百日咳、ジフテリア、肺炎、性病、結核およびサルモネラが含まれていた。ソ連の計画は1928年に始まり、統治機関であった革命軍事評議会がチフス菌の形質転換株を戦場兵器として投入する非公開決議に署名している。1930年代には、北極のソロベツキー島にある施設の研究員がチフス、Q熱、鼻疽および類鼻疽の研究に携わっている。ソ連は1973年から少なくとも1990年代初期に至るまで、既存の生物兵器を近代化し、大陸間戦争に用いる強力な兵器として利用できると考えられる抗生物質およびワクチンに耐性のある遺伝子改変病原体を開発することを目標とする計画を実施していた。研究対象の病原体には、炭疽、野兎病、ペスト、鼻疽、痘瘡、エボラ出血熱、マールブルグ病、マチュポウイルス、フニンウイルスおよびベネズエラウマ脳炎が含まれる。

20

30

#### 【0007】

我々の社会のような開かれた社会は、まさにその本質により、国際的集団および国内集団の双方からのテロリストの攻撃を受けやすい。このような現状からみて、生物兵器による攻撃を予期して回避するため、または標的集団（軍隊または民間人）の防御を通じてそれらを無効にするために、有効な対抗手段を開発することはまさに急務である。

40

#### 【0008】

生物兵器にはそれを特に手強いものにしていく独特な特徴が二、三ある。その一つは、能力のある微生物学者および機械技師を含む少人数のチームがさまざまな病原体（細菌、ウイルスまたは毒素）を増殖させて抽出し、有効な分散系を構築することに障壁がほとんどない点である：15フィート×15フィートの空間があり、10,000ドル分の装置があれば立派な生物兵器工場を建設できると推定されている。このため、BWは、敵対側に大量の犠牲者を出すことをもくろんでテロを狙う集団が選ぶ手段となっている。また、場合によっては攻撃の成果が伝染のために最初の攻撃の範囲を地理的にも時間的にもはるかに上回ることもある。さらに、BW病原体の被害者に対する作用は数時間、通常は数日間遅れることが一

50

般的であるため、この期間中は攻撃を顕在化させずに続けられるほか（加えて、攻撃者が逃亡する機会も生じ、これは秘密裡に活動するテロリストにとってもう1つの利点となる）、種々のBW病原体への感染の初期症状は流感様であるため、BW攻撃をそれとして直ちに認識することが極めて困難になる。

#### 【0009】

このため、免疫のない集団に対する生物兵器攻撃に我々が効果的に対応できるかどうかは、環境内のBW病原体を、空気伝染性（室内および室外）および水系伝染性の別なく、疾患の大発生の前に迅速に検出するための新たな手法を開発することに大きくかかっている。また、臨床症状の出現前にヒトの体液中、例えば血液中の病原体を早期発見することが重要な、時間域（time window）も存在する。

10

#### 【0010】

理論的には、あらゆる病原体を生物兵器として用いることが可能である。しかし、いくつかの特徴のために、生物体または細菌毒素などの生物由来の生物活性物質（BDBS）は大量破壊用の兵器として特に適している。これらの病原体は以下のものでありうる：1）感染性、伝染性および毒性が高い（すなわち、低レベルの曝露であっても疾患を引き起こす）；2）大気中などに効率的に分散する；3）容易に増殖し、大量に生産される；4）保存下で安定である；5）環境条件、例えば長期的な影響に対する耐性がある；および6）抗生物質、抗体、他の薬剤などの投与に対する耐性がある。

#### 【0011】

多数の天然の病原体のほかに、遺伝的に改変されたBW病原体も加えるべきであろう。この種の病原体は、新たな疾患さえも生み出すほど（例えば、「脳痘（brainpox）」ウイルスをもたらすなど）より強力なものとして、または既存の対抗手段に対する耐性のある病原体を産生するように作製されているため特に恐ろしい。これらは予測できないため、特に障害となる。

20

#### 【0012】

上記の理由から、BW病原体を用いた秘密裡の攻撃を発見して評価することは（諜報活動がなければ）極めて困難と考えられる。現時点では公式の環境監視システムが存在しないため、攻撃が行われたとの最初の知見は、多くの場合、犠牲者が救急治療室に続々と運ばれだし、疾患の大発生が認識されてはじめて得られると考えられる。言うまでもなく、これでは遅すぎる。病原体の古典的な監視方法は、増殖培地環境試料の採取（大気、給水）または体液試料の採取（血液、尿、喀痰など）を行って試料を培養し、その後原因を同定するために一連の微生物学検査を行うことを含む。培養が容易な作業ではない（例えば、ウイルス用の場合）という事実に加えて、この種の手順は適時に警告を得るには時間がかかりすぎる。考えられる他の分析方法には、生化学アッセイ、免疫アッセイ、「ジーンチップ（GeneChip）」スクリーニングおよびポリメラーゼ連鎖反応（PCR）が含まれるが、これらは最初の試料には存在しない可能性のある量の不純物質を必要とし（現実の脅威に見合った感度を満たすため）、このために培養がやはり必要と思われる；PCRでさえも単一の細菌またはビリオンからは現実的ではない。

30

#### 【発明の開示】

#### 【0013】

40

#### 発明の概要

本発明は、レアイベント（rare event）またはマーカーの存在の検出をもたらす技術に基づく。本発明は、ごく少量のレアイベントまたはマーカーの存在の同定、特徴分析（定量的、定性的またはその両方）、分析または判定を行うための装置および方法に関する。このようなレアイベントまたはマーカーの有無の判定、ならびにこのようなレアイベントまたはマーカーの定量化は、有毒な、または有害な可能性のある実体または状態の早期発見に有用であり、それらが後期ではなく早期に同定されれば、適切な対応、治療または他の介入計画もしくはプロトコルの適用が可能になる。レアイベントには、正常なイベント（例えば、正常な生理的状态下に存在する標的の物体（body）または細胞の有無）および異常なイベント（疾患、疾患症状または遺伝異常に伴うものといった、異常な生理的状态

50

下に存在する標的の物体または細胞の有無)の両方が含まれる。現在の診断方法、特に癌に関するものに伴う1つの問題は、微小残存病変に関する。これはすなわち、疾患細胞または他の疾患マーカー(例えば、核酸、タンパク質、細胞表面受容体)のレベルが現在の検出方法にとっては低すぎるが、診断または治療を行わずに放置すればその後増殖、アップレギュレーションまたは疾患の再発が起こる可能性は十分にある場合のことである。このため、多くの場合には、疾患リスク(すなわち、癌、関節硬化、中枢神経系疾患など)をより時機を逃さずに同定できれば、より早期の治療が可能になり、それがより効果的な治療につながると考えられる;または、集団に対するリスク(すなわち、生物兵器の病原体)をより早期に同定することが、曝露ならびにより多くの集団に対するそのリスクの歯止めのない波及および分散を最小限に留めることが可能になる点から望ましい。

10

**【0014】**

本発明は、大規模な細胞集団における稀な癌細胞を検出する高感度かつ効率的な方法の発見に基づく。さらに、本明細書に組み込まれる癌細胞検出システムは、候補物体の大集団内のほぼあらゆる稀な標的物体を、同定しようとする個別の標的物体に合わせて調整したこのシステムによって検出しようとする認識をもたらした。本発明の方法およびシステムは、検出しようとする標的物体を各サブセットが含む、大規模集団のサブセットと特異的に結合する蛍光標識に依拠している。標的物体とは、同定しようとする(例えば、標的物体に対する直接的なもの、または標識を標的物体と結合もしくは相互作用する分子と結合させるといった間接的なものを含む、標識による)、検体フィールド(specimen field)内の任意の物体(例えば、細胞、病原体、ウイルス、毒素、プリオン)のことである。候補物体とは、分析しようとする、検体フィールド内の任意の物体(例えば、細胞、病原体、ウイルス、毒素、プリオン)のことである。

20

**【0015】**

したがって、本発明は、検体(specimen)中の標的物体(target body)(例えば、癌細胞)を検出するための方法であって、第1の蛍光団が光子を第1の波長で放出し、第2の蛍光団が光子を第2の波長で放出する、少なくとも第1の蛍光団および第2の蛍光団に対して曝露された、またはそれらによって標識された検体フィールド(例えば、ガラス表面上に塗布した末梢血液単核細胞(PBMC)または骨髓細胞)を入手すること;検体フィールドに、第1および第2の蛍光団を励起するのに十分な光を照射すること;検体フィールドを第1の光子源に関して第1の波長で、また第2の光子源に関して第2の波長で走査すること;第2の波長の光子を実質的に遮断するが第1の波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して生成された第1の画像である、検体フィールドの各位置での第1の画像を収集および記録すること;検体フィールド内部の対応する位置の索引付けを行うこと;第1の波長の光子を実質的に遮断するが第2の波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して生成された第2の画像である、検体フィールドの各位置での第2の画像を収集および記録すること;検体フィールド内部の対応する位置の索引付けを行うこと;ならびに、検体フィールド内部の単一の位置での第1の画像および第2の画像を検索(retrieve)および検査(inspect)すること、を含む方法を特徴とする。第1および第2の画像の単一の位置に候補物体が存在することにより、検体中に標的物体が存在することが示される。異なる蛍光シグナルの画像を、イベントが陽性であることの確認のため、または表現型の評価のために重ね合わせることができる。2回の走査は独立に行うことができる。

30

40

**【0016】**

第1の蛍光団は、DNAと特異的に結合するDAPIなどの化合物、またはRNAと特異的に結合するアクリジンオレンジなどの化合物でありうる。第2の蛍光団は、サイトケラチンなどの癌細胞マーカーまたは別のマーカーと特異的に結合する分子(例えば、抗体または核酸)と結合させることができる。

**【0017】**

いくつかの態様においては、レアイベントの検出の特異性を高めるため、または標的物体の複数のサブセット、例えば癌細胞およびウイルスを検出するために検体フィールドを第3の蛍光団で標識することができ、本方法はさらに、第3の波長で光を放出する第3の蛍光

50

団を励起するのに十分な光を検体フィールドに照射すること；検体フィールドを第3の光子源に関して第3の波長で走査すること；検体フィールド内部の各々の第3の源の位置を登録すること；第1および第2の波長の光子を実質的に遮断するが第3の波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して生成された第3の画像である、検体フィールドの各位置での第3の画像を収集および記録すること；各々の第3の画像を検体フィールド内部の対応する位置に対して索引付けすること；ならびに検体フィールド内部の単一の位置での第3の画像の検索および検査を行うことを含む。単一の位置での第1、第2および第3の画像に候補物体が存在することにより、標的物体の存在が示される。第3の蛍光団は、上皮細胞接着分子（例えば、Ep-CAM）またはジシアロ-ガングリオシド抗原（例えば、GD2）などの第2の癌細胞マーカーと特異的に結合する分子（例えば、抗体）と結合させることができる。

10

**【0018】**

本方法はさらに、第1の画像を生じた検体フィールド内の位置の総数を算定すること、第1の画像および第2の画像をいずれも生じた検体フィールド内の位置の総数を算定すること、または第1、第2および第3の画像を生じた検体フィールド内の位置の総数を算定することを含む。これに加えて、本方法は、第1の画像および第2の画像を検体フィールド内部の別の単一の位置で検査することを含むことができ、この別の単一の位置で第1の画像および第2の画像に候補物体が存在することにより、異なる標的物体の存在が示される。

**【0019】**

本発明はさらに、以下のものを含む検出システムを特徴とする：検体フィールドを収容するための架台（stage）；検体フィールド内部の位置の画像を収集するために配置および構成された検出器（例えば、顕微鏡）；第1の蛍光団を第1の励起波長で励起するのに十分であって第2の蛍光団を第2の励起波長で励起するのに十分な光を検体フィールドに照射するために配置および構成された光源；検出器（例えば、顕微鏡）に取り付けられたカメラであって、（1）第2の蛍光団の第2の発光波長の光子を実質的に遮断するが第1の蛍光団の第1の発光波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して、検体フィールド内のある位置の第1の画像を取り込むため、および（2）第1の発光波長の光子を実質的に遮断するが第2の発光波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して、検体フィールド内のその位置の第2の画像を取り込むために配置および構成されたカメラ；ならび

20

30

**【0020】**

架台は3つの直交軸に関して動かすことができ、3つの軸の少なくとも2つでアドレス指定が可能である。または、カメラ、またはカメラおよび/もしくは画像取り込み装置を含む筐体は、3つの直交軸に関して動かすことができ、3つの軸の少なくとも2つでアドレス指定が可能である。カメラは、第1および第2の画像を取り込むための電荷結合素子、または第1および第2の画像の取り込みに用いるための多数の光学フィルターを含む。光学フィルターの代わりに、またはそれとともに、カメラまたはコンピュータは電子フィルター

40

**【0021】**

もう1つの面において、本発明は、少なくとも第1の蛍光団によって標識された検体フィールドであって、第1の蛍光団が光子を第1の波長で放出するような検体フィールドを入手すること；第1の蛍光団を励起するのに十分な光を検体フィールドに照射すること；検体フィールドを第1の光子源に関して第1の波長で低倍率で走査すること；検体フィールドの各位置での第1の画像を収集および記録すること；各々の第1の画像を検体フィールド内部の対応する位置に対して索引付けすること；ならびに検体フィールド内部の単一の位置での

50

第1の画像の検査を行うこと、によって検体中の標的物体を検出する方法であって、その単一の位置で第1の画像に候補物体が存在することによって検体中に標的物体が存在することが示されるような方法の特徴とする。

【0022】

本発明の方法およびシステムは、100万個の健常細胞の中にある1個の稀な癌細胞というような（これは本発明によって達成しうる感度のレベルである）、候補物体の大集団内にある稀な標的物体を迅速、高感度かつ効率的に検出することが可能である。本明細書の方法およびシステムは、約0.1百万分率程度、または相応する形でより有利には、約0.05、約0.03もしくは約0.01百万分率程度の検出レベルを可能にする。

【0023】

1つの面において、本発明は、検体中の標的物体の有無を検出する方法であって、少なくとも第1の蛍光団および第2の蛍光団に対して曝露された、またはそれらによって標識された検体フィールドを入手すること、この際、第1の蛍光団は光子を第1の波長で放出し、第2の蛍光団は光子を第2の波長で放出する；  
 検体フィールドに第1および第2の蛍光団を励起するのに十分な光を照射すること；  
 検体フィールドを第1の光子源に関して第1の波長で、また第2の光子源に関して第2の波長で低倍率で走査すること；  
 検体フィールド内部の各々の第1の源および各々の第2の源の位置を登録すること；  
 第2の波長の光子を実質的に遮断するが第1の波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して生成された第1の画像である、検体フィールドの各位置での第1の画像を収集および記録すること；  
 第1の波長の光子を実質的に遮断するが第2の波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して生成された第2の画像である、検体フィールドの各位置で高倍率の第2の画像を収集および記録すること；  
 各々の第1の画像および各々の第2の画像を検体フィールド内部の対応する位置に対して索引付けすること；ならびに  
 検体フィールド内部の単一の位置での第1の画像および第2の画像を検査すること、を含み、  
 単一の位置での第1および第2の画像に候補物体が存在することにより、検体中に標的物体が存在することが示されるような方法である。

【0024】

もう1つの面において、本発明は、検体フィールドの調製が、

- a. 細胞試料を可溶化して試料混合物を得ること；
- b. 試料混合物を遠心すること；
- c. 試料混合物から上清を分離すること；
- d. この結果得られた細胞のペレットを生理的緩衝液中に再懸濁すること；
- e. 細胞を接着性スライドに対してプレATINGすること；
- f. 細胞培養液をスライドに対して添加すること、

を含む、本明細書中の任意の方法であって、

検体フィールドの調製がさらに、

段階dの後に、細胞混合物の希釈物を作製すること、希釈物を死細胞に対する感受性のある色素で処理すること、用いるスライドの試料細胞密度を決定するために細胞数算定を行うことを含む方法である。

【0025】

他の面において、本方法は、以下であるような本明細書中の任意のものである：標的物体が、癌細胞、上皮細胞、平滑筋細胞、樹状細胞、記憶T細胞、記憶B細胞、体細胞、正常細胞、異常細胞または幹細胞である；システムが、少なくとも1,000,000個の細胞がある検体フィールド内の少なくとも1つの標的細胞を検出しうる；システムが、少なくとも25,000,000個の細胞がある検体フィールド内の少なくとも1つの標的細胞を検出しうる；システムが、少なくとも50,000,000個の細胞がある検体フィールド内の少なくとも1つの標的細

10

20

30

40

50

胞を検出する；システムが、少なくとも100,000,000個の細胞がある検体フィールド内の少なくとも1つの標的細胞を検出する；記録が少なくとも1024×1024ピクセルアレイの画像を含む；または、記録が少なくとも1600×1600ピクセルアレイの画像を含む。

【0026】

他の面において、本方法は、以下であるような本明細書中の任意のものである：フィールドの検体が大多数の細胞種として白血球を含む；フィールドの検体が不均一な細胞種を含む；フィールドの検体がマクロファージを含む；検体フィールドが環境試料である；光が紫外光、赤外光または可視光である；標的物体が癌細胞であり、検体フィールドがガラス表面上に塗布された白血球または骨髄細胞である；第1の蛍光団が、DNAと特異的に結合する化合物である；第2の蛍光団が、癌細胞マーカーと特異的に結合する分子と結合している；癌細胞マーカーがサイトケラチンである；癌細胞マーカーが細胞質中に存在する；癌細胞表面マーカーが上皮細胞接着分子である；癌細胞表面マーカーがジシアロ-ガングリオシド抗原である；第1の画像を生じた検体フィールド内の位置の総数を算定することをさらに含む；第1の画像および第2の画像をともし生じた検体フィールド内の位置の総数を算定することをさらに含む；第1、第2および第3の画像を生じた検体フィールド内の位置の総数を算定することをさらに含む；第1の画像および第2の画像を検体フィールド内部の別の単一の位置で検査することをさらに含み、この別の方の単一の位置で第1の画像および第2の画像に候補物体が存在することによって別の標的物体の存在が示される。

10

【0027】

もう1つの面において、本発明は、  
 検体フィールドを収容するための架台；  
 ある所定レベルおよび所定レベルの1つまたは複数の追加的な倍率で、検体フィールド内部の位置の画像を収集するために配置および構成された検出器；  
 第1の蛍光団を第1の励起波長で励起するのに十分であって第2の蛍光団を第2の励起波長で励起するのに十分な光を検体フィールドに照射するために配置および構成された光源；  
 検出器に取り付けられたカメラであって、(1)第2の蛍光団の第2の発光波長の光子を実質的に遮断するが第1の蛍光団の第1の発光波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して、検体フィールド内のある位置の第1の画像を取り込むため、および(2)第1の発光波長の光子を実質的に遮断するが第2の発光波長の光子は許容する光学または電子フィルターを介して、検体フィールド内のその位置の第2の画像を取り込むために配置および構成されたカメラ；ならびに  
 第1の画像および第2の画像を記録して、第1の画像および第2の画像を検体フィールド内部の対応する位置に対して索引付けするコンピュータであって、使用者による要求に応じて、対応する位置に関する第1の画像および第2の画像を表示するコンピュータ、  
 を含む検出システムである。

20

30

【0028】

他の面において、本システムは、以下であるような本明細書中の任意のものである：架台が3つの直交軸に関して動かすことができ、3つの軸の少なくとも2つでアドレス指定が可能である；カメラが、第1および第2の画像を取り込むための電荷結合素子を含む；カメラが多数の光学フィルターを含む；検出器が1024×1024ピクセルアレイの画像を含む；検出器が1600×1600ピクセルアレイの画像を含む；または、検出器がA×Bピクセルアレイの画像を含む、ここでAおよびBはそれぞれ独立に1000から1,000,000までの整数である。

40

【0029】

本発明はまた、細胞の検体フィールド内の生物兵器(biological agent)細胞に関する分析のための方法であって、

- i) 検体フィールドを、生物兵器細胞を特定する第1の蛍光団によって処理すること；
- ii) 検体フィールドを、生物兵器細胞を特定する第2の蛍光団によって処理すること；
- iii) 検体フィールドに、第1の蛍光団に光子を放出させるのに適した光を照射すること；
- iv) 検体フィールドに、第2の蛍光団に光子を放出させるのに適した光を照射すること、
- v) 生物兵器細胞である、光子を放出する検体フィールド内の細胞を同定すること、

50

を含む方法にも関する。

【0030】

もう1つの面において、本発明は、検体フィールド内の細胞の調製が、

- a. 試料混合物を遠心すること；
- b. 試料混合物を再懸濁すること；
- c. 細胞を接着性スライド上にプレATINGすること；
- d. スライドを固定剤（パラホルムアルデヒド）で処理すること；
- e. スライドを透過化剤（トリトン（Triton））で処理すること；
- f. スライドをプレハイブリダイゼーション溶液で処理すること；
- g. スライドを、蛍光団を有するハイブリダイゼーション溶液で処理すること；
- h. スライドを蛍光色素で処理すること、を含み、

10

検体フィールドを、生物兵器細胞を特定する1つまたは複数の追加的な蛍光団によって処理すること、および検体フィールドに、1つまたは複数の追加的な蛍光団に光子を放出させるのに適した光を照射すること、をさらに含む、本明細書中の任意の方法である。

【0031】

他の面において、本発明は、以下のような本明細書中の任意の方法に関する：少なくとも1つの蛍光団が生物兵器細胞のDNAを特定する；少なくとも1つの蛍光団が、生物兵器細胞の表面と結合する分子を特定する；少なくとも1つの蛍光団が生物兵器細胞のDNAを特定し、少なくとも1つの蛍光団が生物兵器細胞の表面と結合する分子を特定する；または、生物兵器が細菌、リケッチア、ウイルス、真菌もしくはプリオンである。

20

【0032】

もう1つの面において、本発明は、以下のような本明細書中の任意の方法である：検体フィールドの調製が、

- a. 血液試料を塩化アンモニウム溶液で可溶化すること；
- b. 試料混合物を遠心すること；
- c. 上清の塩化アンモニウム溶液および赤血球を分離すること；
- d. この結果得られた白血球のペレットをPBS中に再懸濁すること；
- e. 試料混合物を遠心すること；
- f. この結果得られた白血球のペレットをPBS中に再懸濁すること；
- g. 段階fの細胞混合物、トリパンブルーおよびPBSの希釈物を作製すること；
- h. 細胞を接着性スライド上にプレATINGすること；
- i. 細胞培養液をスライドに対して添加すること、を含み、

30

さらに、1つの蛍光団が標的細胞でない細胞を特定する。他の面において、本方法は、本方法が1つの検体フィールドに対して60分未満で完了する；または本方法が1つの検体フィールドに対して10分未満で完了するようなものである。

【0033】

他の面において、本発明は、移植臓器提供者を標的物体の有無に関してスクリーニングするための方法であって、検体フィールドが臓器提供者から採取された試料（例えば、血液試料、組織試料）である、本明細書中の任意の方法を含む方法である。これは、提供者における標的物体を移植の前に同定し、それによって被提供者への物体の波及を防ぐのに有用である。本発明はまた、薬剤候補を投与された対象における疾患または疾患症状に対する薬剤候補の有効性を、その有無が疾患または疾患症状の指標となる標的物体の有無に関するスクリーニングによって評価するための方法であって、検体フィールドが対象から採取された試料である、本明細書中の任意の方法を含む方法にも関する。本発明はまた、標的物体の有無に関して血液試料をスクリーニングするための方法であって、検体フィールドが血液試料である、本明細書中の任意の方法を含む方法にも関する。これは、例えば血液銀行において、汚染された血液試料を、汚染された試料が流通する前に同定するのに有用である。また、これを用いて、提供者となる可能性のある者を提供行為の前にスクリーニングすることも可能と考えられる。本発明はまた、標的物体の有無に関して液体試料を

40

50

スクリーニングするための方法であって、検体フィールドが液体試料である本明細書中の任意の方法を含む方法；および、標的物体が癌細胞である本明細書中の任意の方法を含む方法でもある。

【0034】

もう1つの面において、本発明は、細菌の存在に関するスクリーニングの方法であって、以下のような本明細書中の任意の方法を含む方法である：少なくとも1つの蛍光団が細菌に対するDNAプローブを含む；検体フィールドが外科患者から手術後に採取される；検体フィールドが食品試料から採取される；

または、以下をさらに含む本明細書中の任意の方法である：

j. スライドを、アルデヒド系固定剤に曝露させること； 10

k. スライドを、リン酸緩衝食塩水（PBS）中ですすぎ洗いすること；

l. ヒトAB血清をスライドに対して添加すること；

m. 一次抗体をスライドに対して添加して、スライドをインキュベートすること；

n. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること；

o. 二次抗体をスライドに対して添加して、スライドをインキュベートすること；

p. スライドを有機溶媒中で曝露させること；

q. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること；

r. ヒトAB血清をスライドに添加すること；

s. 一次抗体をスライドに添加して、スライドをインキュベートすること；

t. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること； 20

u. 二次抗体をスライドに添加して、スライドをインキュベートすること；

v. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること；

w. 細胞染色剤をスライドに添加して、スライドをインキュベートすること；

x. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること；

y. スライドを水に曝露させること；

z. スライドをマウントすること；もしくは

段階sの一次抗体がケラチンであって、段階uの二次抗体が抗ウサギローダミンである；

または、以下をさらに含む本明細書中の任意の方法である：

j. スライドを有機溶媒中で曝露させること；

k. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること； 30

l. 一次抗体をスライドに添加して、スライドをインキュベートすること；

m. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること；

n. 二次抗体をスライドに添加して、スライドをインキュベートすること；

o. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること；

p. 細胞染色剤をスライドに添加して、スライドをインキュベートすること；

q. スライドをPBS中ですすぎ洗いすること；

r. スライドを水に曝露させること；

s. スライドをマウントすること；

または以下のようなものである：有機溶媒がアルコールもしくはアセトンである；一次抗体がケラチンである；二次抗体が抗ウサギローダミンである；蛍光団が細菌を検出する； 40  
蛍光団が核酸プローブである；もしくは核酸プローブがオリゴヌクレオチドである。

【0035】

本発明のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明のほか、特許請求の範囲からも明らかになると考えられる。

【0036】

詳細な説明

本発明は、多数の候補物体の中の稀な標的物体を検出するための、蛍光を用いる方法およびシステムに関する。非常にさまざまな蛍光団が市販されており、それらの最大発光波長が異なることから、本方法およびシステムを、候補物体の単一の大集団の中の多くの異なる標的物体を検出するように適合させることができる。例えば、蛍光団A、B、C、D、Eお 50

よびFを、それぞれ標的物体1、2、3、4、5および6と特異的に結合する分子と結合させることができる。必要なのは単に、候補物体の発光波長の取り込みおよび評価を行うこと（もしあれば）、ならびに候補物体が標的物体1、2、3、4、5または6のいずれであるかを決定するために、発光波長を蛍光団A~Fから予想されるものと比較することのみである。事実、極めて多数の標的をこのようにして同時に検出することが可能である。本発明における使用に適した種々の試薬および手順に関するそのほかの詳細については以下に考察する。

#### 【0037】

##### 検出用の検体の調製

一般的な臨床的用途において、検体は通常、特定の表現型（例えば、抗体を用いる）または遺伝子型（例えば、オリゴヌクレオチドプローブを用いる）を有する稀な細胞の存在に関するスクリーニングを行える、体液、骨髄または組織試料中の細胞試料、例えば血液細胞試料である。

#### 【0038】

本明細書の細胞検体の調製方法は、分析するのに望ましい細胞種の濃縮をもたらす。これは例えば、勾配分離、または可溶化および遠心分離を含む、細胞の分離または単離に適した任意の方法によって行える。

#### 【0039】

末梢血液または骨髄におけるレアイベントの自動検出のためには、試料の処理時の細胞の損失ができるだけ少ない調製方法を利用することが重要である。稀な細胞を確実に最大限に回収するためには、赤血球の単純な溶解（例えば、塩化アンモニウム溶液を用いる）の方が、フィコール（Ficoll）を用いる単離方法よりも好ましい。血液試料を含む同じチューブ内で溶解処理を行った後に、同じチューブ内で分離（例えば、遠心分離、遠心沈殿）を行うこと（すなわち、溶解および分離の際に試料の移行を行わない）によっても、細胞の損失が最小限に抑えられ、試料中の細胞の構成のばらつきが最小限に抑えられる（すなわち、処理の前および後のいずれの試料においても、稀な細胞の他の細胞に比した相対的な割合が一定に保たれる）。以下の実施例の項に記載した細胞調製/接着手順により、均一な細胞調製物が得られる。

#### 【0040】

これに対して、通常のサイトスピン調製では細胞の最大2/3が失われてしまう恐れがある。レアイベントの顕微鏡による検出を用いるほとんどの検査では、スライド上の実際に分析される細胞の総数をこれらの検査によって記録することはできないため、細胞数に関する情報を得ることはできない。それどころか、これらの実験は単に、回収が完全であると仮定した上で、陽性イベントの数を、処理した細胞の総数と関連づけるだけである。これは偏りを生じさせる：細胞が調製時に実際には不可避免的に失われることが明らかになっただけでなく、特定の種類の試料の間（表1の「範囲」の欄を参照のこと）ならびに分析する試料の種類によって回収の程度も大きく異なる恐れがある。Marienfeld Laboratory Glassware（Paul Marienfeld GmbH & Co；www.superior.de）による接着性ガラス製顕微鏡用スライドは、これらのスライドによって均一な細胞単層（最適な細胞密度で、重複が極めて少ないもの）を取り込めたことから、以降に蛍光顕微鏡検査を行う目的で細胞検体フィールドを作製するのに優れた基質であった。ひとたび培地をスライドに投入した上で、任意のアルデヒド系固定剤（例えば、パラホルムアルデヒド、ホルマリン、グルタルアルデヒド、架橋剤）によって細胞を固定する。抗原が細胞表面にないある種の細胞種の場合には、透過化剤（例えば、メタノール、トリトン）を用いて細胞を透過化することができる。抗原が表面抗原であれば、透過化の必要はない。スライドの有機溶媒（例えば、アルコール、ケトン、メタノール、エタノール、アセトン）に対する曝露を用いて細胞を可溶化することもでき、ある種の溶媒（例えば、メタノール）では固定および透過化の両方が可能である。細胞培養液は、結合していない結合部位をカバーしうる、または、例えばRPMIもしくはDMEMを含むタンパク質を有しうる、任意の培養液であってよい。生理的緩衝液とは細胞との適合性があるものであり、これには例えば任意の等張液またはPBSが含まれ

10

20

30

40

50

る。細胞染色剤とは細胞を染色するのに適した任意の色素のことであり、これには例えば、DNA染色剤、細胞質染色剤、ミトコンドリア染色剤、DAPI、カルセインなどが含まれる。適切な検体調製を行うことにより、生物組織中または液体中の予期しないあらゆる細胞種を、本発明を用いて検出することができる。例えば、血中に平滑筋細胞が存在すれば、アテローム動脈硬化を意味すると考えられる。もう1つの例として、血液銀行の貯蔵血液を、ヒト免疫不全ウイルス、B型肝炎ウイルスまたはサイトメガロウイルスといった輸血によって伝染する主要な病原体の存在に関してスクリーニングすることもできる。

#### 【0041】

分析用の検体フィールドの調製にどのような方法を用いるにしても、その方法は検出しようとする標的物体を破壊したり大きく変化させたりしないことが重要である。例えば、標的物体がプリオン、細菌、ウイルス、原生動物または多細胞寄生生物であれば、単離の手順は異なると考えられる。固形組織（例えば、固形腫瘍）の分析には細胞の脱凝集が必要と思われるが、プロテアーゼは標的細胞の同定に用いられる細胞表面分子を変化させる恐れがあるため、これは例えば、トリプシン処理による代わりに物理的破壊によって行われる。ウイルス検体フィールドの調製は、検体フィールド内に細胞より小さい粒子のみが存在するように、一定のサイズの大きな粒子（例えば、細胞）を濾過によって除去することを必要とする。または、ウイルスに感染した細胞の検出が望ましい場合には、細胞を検体フィールドに含めることもできる。病理学および顕微鏡法の技術分野の当業者は、個々の生物試料に対するよく知られたさまざまな調製手順を利用することができ、これらの手順は検出しようとするいかなる標的物体に対しても適合化しうる。このような手順には、Shandon Cytocentrifugeを用いたサイトスピン法、Sakura (Torrance, CA) 社によるCytotek Monoprep、およびCysyc (Boxborough, MA) 社によるThinPrepが含まれる。

10

20

#### 【0042】

分析しようとする試料が血液などの生体液でない場合には、異なる装置を用いて大気などから試料を収集することができる。一般に大気捕集装置は、大気もしくは気体の中もしくは傍らを通過する液体を含む、または大気もしくは気体がフィルターを通過する際に微粒子（例えば、標的物体）を捕捉する多孔性フィルターを含む、収集チャンバーを有する。液体を含む収集チャンバーの場合には、収集用液体に遠心または他の処理を行って液体から粒子を分離することができる。続いて、分離した粒子を標識または分析のために基質に沈着させる。フィルター（例えば、ニトロセルロース）を含む収集チャンバーの場合には、フィルターが、後に標識または分析を行うための基質としての役割を果たすことができる。または、粒子をフィルターから洗い流すこと、またはフィルターを溶解もしくは他の様式で粒子から除去することもできる。フィルター式収集チャンバーを、フィルターを通して流れる液体（例えば、給水試料または脳脊髄液）から粒子を収集するように適合させることもできる。さらに、上に考察したように、液体中に存在する粒子状物質を除去するために液体試料を遠心することもできる。被験物質が液体試料中に溶液として保たれ、望ましくない粒子状物質が除去される（例えば、濾過により）場合には、元の液体を分析用の試料とすることができる（溶液として、または試料溶液の真空乾燥を行う）。さまざまな試料採取器が知られており、本発明に用いることができる。SKC BioSampler（登録商標）および他の試料採取装置を販売しているSKC, Inc. (www.skc.com) を参照のこと。

30

40

#### 【0043】

本発明は生物兵器病原体、またはヒト、動物もしくは植物に有害な任意の病原体の検出を含むものと考えている。この点に鑑みて、本発明の方法およびシステムは、ヒト、商業的に価値のある動物または商業的に価値のある植物に有害な病原体を検出するために用いることができる。ヒトの細菌性およびリケッチア性病原体には、以下のものが非制限的に含まれる：Q熱リケッチア (*Coxiella burnetii*)、バルトネラ・クインタナ (*Bartonella Quintana*) (*Rochalimea quintana*, *Rickettsia quintana*)、リケッチア・プロワセッキ (*Rickettsia prowasecki*)、紅斑熱リケッチア (*Rickettsia rickettsii*)、炭疽菌 (*Bacillus anthracis*)、ウシ流産菌 (*Brucella abortus*)、ヤギ流産菌 (*Brucella melitensis*)、ブタ流産菌 (*Brucella suis*)、オウム病クラミジア (*Chlamydia psittaci*)、ボ

50

ツリヌス菌 (*Clostridium botulinum*)、野兔病菌 (*Francisella tularensis*)、鼻疽菌 (*Burkholderia mallei*) (*Pseudomonas mallei*)、類鼻疽菌 (*Burkholderia pseudomallei*) (*Pseudomonas pseudomallei*)、チフス菌 (*Salmonella typhi*)、赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*)、コレラ菌 (*Vibrio cholerae*)、ペスト菌 (*Yersinia pestis*)、ウェルシュ菌 (*Clostridium perfringens*)、破傷風菌 (*Clostridium tetani*)、腸管出血性大腸菌 (血清型0157および他のベロ毒素産生血清型)、レジオネラ菌 (*Legionella pneumophila*) および偽性結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)。ヒトのウイルス性病原体には、以下のものが非制限的に含まれる：チクングンヤウイルス、コンゴ・クリミア出血熱ウイルス、デング熱ウイルス、東部ウマ脳炎ウイルス、エボラウイルス、ハンターンウイルス、フニンウイルス、ラッサ熱ウイルス、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス、マチュポウイルス、マールブルグウイルス、サル痘ウイルス、リフトバレー熱ウイルス、ダニ媒介脳炎ウイルス、痘瘡ウイルス、ベネズエラウマ脳炎ウイルス、西部ウマ脳炎ウイルス、白痘、黄熱病ウイルス、日本脳炎ウイルス、キャサヌル森林熱ウイルス、跳躍病ウイルス、マリーバレー脳炎ウイルス、オムスク出血熱ウイルス、オロブーシェウイルス、ポワサンウイルス、ロシオウイルスおよびセントルイス脳炎ウイルス。

10

## 【0044】

動物の細菌性およびリケッチア性病原体には、マイコプラズマ・ミコイデス (*Mycoplasma mycoides*) および炭疽菌が非制限的に含まれる。動物のウイルス性病原体には、以下のものが非制限的に含まれる：アフリカブタ熱ウイルス、鳥類インフルエンザウイルス2型、ブルータングウイルス、口蹄疫ウイルス、ヤギ痘ウイルス、ヘルペスウイルス (アウジエスキー病)、豚コレラウイルス (ブタ熱ウイルス)、狂犬病ウイルス、ニューカッスル病ウイルス、小反芻動物病ウイルス、ブタ腸内ウイルス9型 (ブタ水疱病ウイルス)、牛痘ウイルス、羊痘ウイルス、テッシェン病ウイルスおよび水疱性口内炎ウイルス。

20

## 【0045】

植物の細菌性およびリケッチア性病原体には、ザントモナス・アルビリネアンズ (*Xanthomonas albilineans*)、柑橘潰瘍病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *Citri*)、イネ白葉枯病菌 (*Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*) および柑橘班入病菌 (*Xylella fastidiosa*) が非制限的に含まれる。植物のウイルス性病原体には、パナナ萎縮病ウイルスが非制限的に含まれる。

## 【0046】

プリオンは、ウシ海綿状脳症、スクレイピーおよびクロイツフェルト・ヤコブ病を非制限的に含む疾患と相互に関係している。

30

## 【0047】

ある具体的な例としては、試料を以下のように調製することができる。微生物の免疫細胞化学的検出のための最適化された調製手順を、環境性 (大気および水) およびヒト (血液および他の体液) 試料に適用することができる。大気試料の収集には、SKC社 (SKC, Inc.) のBioSampler (登録商標) を用いる。BioSampler (登録商標) はすべてガラスでできた真空駆動式のインピンジャー装置であり、液体に通気して泡立たせるのではなく、収集用液体の表面に対して接線方向にノズルを介して大気を通過させる。この設計のため、粒子の跳ね返りが最小限に抑えられ、再噴霧化が減る。水または粘度の類似した液体を収集用液体として用いて流速12.5L/分で動作させることにより、BioSamplerの収集効率は直径1  $\mu\text{m}$ 程度の粒子に関しては100%近くになり、0.5  $\mu\text{m}$ でも依然として約90%、0.3  $\mu\text{m}$ で約80%である。このため、ほとんどの細菌は直径1~10  $\mu\text{m}$ であり、多くのウイルスの大きさはこの範囲の下端である (例えば、エボラウイルスは1000  $\times$  80nm) ことから、BioSampler (登録商標) は大気中の細菌、真菌、花粉およびウイルスを収集するための優れた装置である。

40

## 【0048】

その他の大気捕集装置を用いることもできる。例えば、代替的な装置の一つにAir-0-Cell捕集カセット (SKC, Inc.) がある。この装置では、大気中の粒子を加速させて粘着性スライドに衝突させるが、これはさまざまな染色手順および顕微鏡検査を行うのにまさに適

50

している。しかし、この収集方法は、2 $\mu$ mまたは3 $\mu$ mよりも小さい粒子には有効でない。

【0049】

環境試料の採取において調整する必要のある主なパラメーターは、試料採取時間および収集用液体の組成である。さまざまな液体を、スライドへの接着を補助する能力に関して、既知の量の生物体を用いて試験し、直接接種試験で比較することができる。

【0050】

ヒト体液の分析については、以下の実施例1の記載のように血液試料の分析によって例示する。

【0051】

蛍光染色

本発明の1つの利点は、本発明を、よく知られた公的に入手可能な蛍光分子の大規模ライブラリーを用いて実施しうることである。その供給元には例えば、Molecular Probes社 (Eugene, OR)、Jackson Immuno Research社 (West Grove, PA)、Sigma社 (St. Louis, MO) が含まれる。これらの分子は単独で標的物体 (例えば、蛍光性DNA染色剤) の一部と特異的に結合しうるか、または標的物体の部分と特異的に結合する抗体もしくは核酸と結合させることができる。例えば、Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity、WT Mason編、Academic Press, London, 1993、およびRP HauglandによるHandbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals、MTZ Spence編、Molecular Probes, 1996を参照のこと。一般に、抗体を免疫蛍光法に用いる場合には、蛍光色素を、標的物体上の抗原に対して特異的な一次抗体と結合する二次抗体に化学的に結合させる、または一次抗体に直接結合させる。一次抗体は多岐にわたる抗原に対して入手可能である。例えば、標的物体がプリオンであれば、クロイツフェルト・ヤコブ病の診断を目的として患者の脳脊髄液中のプリオンを検出するために、プリオン特異的抗体を用いることができる。用いるのに適した一次抗体には、抗GD2抗体および抗GD-3抗体 (Matreya Inc., Pleasant Gap, PA)、抗HER-2neu抗体 (Dako, Carpinteria, CA)、抗KSA/EpCAM抗体 (Dako) および抗サイトケラチン抗体 (Sigma, St. Louis, MO) が含まれる。用いるのに適した二次抗体には、Molecular Probes社 (Eugene, OR) およびJackson Immuno Research社 (West Grove, PA) から入手しうるものが含まれる。スライド調製の際の抗体導入段階の間にはPBSによる洗浄を行うべきである。しかし、抗体導入が血清遮断試薬である場合、すなわち、抗体を試料中の非特異的な結合部位を遮断するために導入する場合には、PBSによる洗浄は

10

20

30

【0052】

異なる蛍光団が非常に多く存在し、その多くが異なる最大励起波長または最大発光波長を有することから、検体フィールド内の多数 (例えば、24種またはそれ以上) の標的物体の多重的な検出が可能となる。この態様において、各抗体は1種類の標的物体のみに対して特異的でありうる。さらに、多重化によって標的物体の入れ子式 (nested) グループの検出が可能になり、検出精度が高まる (例えば、偽陽性を最小限に抑えられる)。以下の実施例では、試料における総細胞数を示すことができ、蛍光マーカーが断片または細胞片ではなく実際に細胞と会合していることを確認するのに有用なDNA染色剤であるDAPIを用いて、有核細胞である標的物体を同定している。続いて、抗サイトケラチン抗体を用いて、DAPI陽性細胞の標的グループ内の癌細胞標的の候補を同定した。そして最後に、癌細胞表面マーカーに対する抗体を用いて、DAPI、サイトケラチンおよび細胞表面抗原に関して陽性である真の癌細胞のサブグループを同定して算定した。この入れ子式の蛍光染色により、偽陽性の結果は事実上なくなった。他の考察については以下に述べる。

40

【0053】

免疫細胞化学アッセイにまず必要なことは抗体の作製である。市販のものまたは他のものが入手可能である場合には、表面または細胞内の標的に対する既存の抗体を得ることができる。その他の場合には、抗体を新規に作製する必要がある。照射処理を行った (死滅させた) 関心対象の生物の試料を入手し (例えば、CDC、USAMRIIDなどからの病原体)、これを例えばA&G Pharmaceutical, Inc. (Baltimore, MD) に提供し、露出されたエピトー

50

ブに対するモノクローナル抗体 (mAb) を作製してもらうことができる。この企業は、ハイブリドーマの迅速な開発 (60日未満) が妥当なコストで得られるmAb作製のための方法を開発している。これらの生物がいずれも交差反応の原因となりうる共通の表面エピトープを有していない場合、または確実に「死滅した」生物を入手できない場合には、その種に特異的な1つまたは複数の抗原を入手することができる。場合によっては、検出しようとする標的物体はあるクラスの標的であってそのクラス内の個々の種ではない。このため、種特異的ではなくクラス特異的な抗体が望ましいことも考えられる。抗原を精製し、それらのクローニングされた遺伝子から発現させること、または化学合成したペプチドによって模倣させることが可能である。抗体は蛍光分子を直接結合させること、または二次蛍光標識抗体と併用することが可能である。直接標識抗体はFACS分析により、他の系統学的な類縁種に対する特異性に関して検討することができる。

10

## 【0054】

血液または骨髄調製物における癌細胞の検出の特異性は一般に、マーカーおよび抗体を手順に用いた場合にのみ優れている。最も広く用いられているマーカーは、上皮細胞および癌由来細胞の細胞骨格成分であるサイトケラチンである。サイトケラチンが乳癌、前立腺癌、胃癌および結腸直腸癌に関する有用なマーカーであることは数多くの臨床試験で立証されているが、これは真の腫瘍細胞特異的マーカーではなく、サイトケラチン細片または染色剤粒子を含む表皮細胞、貪食細胞も染色しうる。このような場合には、免疫染色された細胞が悪性細胞であることを顕微鏡で厳密に確認することが重要である。偽陽性イベントのもう1つの原因は、上皮細胞または癌細胞マーカーによる血液細胞または骨髄細胞の交差反応性染色であり、例えばムチン上皮膜マーカーは造血細胞と交差反応を生じうる。実際に、サイトケラチン抗体が健康な血液提供者からのPBMCを標識しうるということが明らかになった (実施例1における表4)。正常血液提供者の末梢血試料のうち約17%は、低レベルではあるものの (平均は $1.18\text{CK}+/10^6$  個であった)、サイトケラチン陽性を示した。「正常」試料中のこれらのCK+細胞が、良性上皮細胞、交差反応性の造血細胞、または診断されていない原発癌から播種した癌細胞のいずれであるかは不明である。

20

## 【0055】

癌細胞検出の特異性を向上させるために、サイトケラチンならびに上皮表面マーカーEpCAMおよびGD2の同時検出のための二重標識プロトコールを開発した。この手順によって偽陽性は劇的に減少し、検討した77個の試料のうち二重標識された細胞は1つのみであり (CK / Ep-CAMおよびCK / GD2; 実施例の項の表5)、このことから正常試料中に検出された少数のCK+細胞は癌由来ではないことが示唆された。血液または骨髄試料中の癌細胞を単に検出することに加えて、稀な腫瘍細胞の表現型を、例えばその悪性度、細胞周期の時期または増殖挙動に関してさらに特徴付けるための取り組みも行われている (Allgayerら、*J. Histochem. Cytochem.* 45: 203-212, 1997; Allgayerら、*Cancer Res.* 57: 1394-1399, 1997; Pantelら、*J. Natl. Cancer Inst.* 85: 1419-1424, 1993; およびRiesenbergら、*Histochem.* 99: 61-66, 1993)。乳癌試料の分析を目的としてサイトケラチン標識を増殖因子受容体または増殖関連抗原と併用する (Pantelら、前記)、または前立腺癌の分析を目的としてサイトケラチン標識を前立腺特異抗原と併用する (Riesenbergら、前記)、多重マーカー分析のためのプロトコールも開発されている。また、胃癌患者において、サイトケラチンおよびウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター受容体に関して二重陽性であった細胞は高い転移能と相関していた (Allgayerら、*Cancer Res.* 57: 1394-1399, 1997)。有望なそのほかのさまざまな (癌特異的) マーカーも記載されており、これには例えば、糖タンパク質 (Franklinら、*Breast Cancer Res. Treat* 41: 1-13, 1996)、ガングリオシド (Mossら、*N. Engl. J. Med.* 324: 219-226, 1991)、細胞接着分子 (Rossら、*Exp. Hematol.* 23: 1478-1483, 1995; およびRossら、*Bone Marrow Transplant.* 15: 929-933, 1995) および他の分子 (Vrendenburghら、*J. Hematother.* 5: 57-62, 1996) がある。新たなマーカーが利用可能になれば、癌細胞の検出方法の感度、質および特異性が向上する可能性がある。

30

40

## 【0056】

50

一次抗体はさまざまな抗原に関して入手可能である。例えば、標的物体がプリオンであれば、クロイツフェルト・ヤコブ病の診断を目的として患者の脳脊髄液中のプリオンを検出するために、プリオン特異的抗体を用いることができる。

【0057】

抗体の代わりに、蛍光標識した核酸を標的物体特異的プローブとして用いることができる。実際に、インサイチュハイブリダイゼーション (ISH) における核酸プローブを用いた検出が望ましい理由はいくつかある：(1) 核酸 (NA) プローブの方が抗体 (Ab) よりも容易、迅速かつ安価に作製できる；(2) NAプローブは自在かつ安価に増やせる (モノクローナルAbも同じであるが、ポリクローナル抗体はそうでない)；(3) NAプローブはAbよりも均一である (特にポリクローナル；多重標識 (多重) 実験のために、 $T_m$ の一致したプローブを選択することすら可能である)；(4) NAプローブのコグネイトRNAまたはDNA標的とのハイブリダイゼーションは、抗体のエピトープとの相互作用よりもうまく制御できる (例えば、ハイブリダイゼーション温度、イオン強度などによる)；(5) NAプローブの方が多重標識実験を実施しやすい (異なる標識と結合させたヌクレオチドを単に組み入れる、またはビオチンに続いてさまざまなストレプトアビジン標識複合体を組み入れる；免疫蛍光法 (IF) では、一次Abの標識がその結合を妨げることがあり、第2のAbを検出用に用いる場合、IFでは異なる種において産生させた一次Abを用いる必要がある)；および(6) NAプローブを用いて得られたシグナルは、特に直接標識の場合、Abによるものよりも定量的であると考えられ、さらに必要に応じて増幅することも可能である (ビオチンなど)。

10

20

【0058】

標的物体 (例えば、生物兵器用の生物) に関して入手可能な配列情報のすべてを用いることにより、それらのそれぞれに対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計することができる。他の生物と配列がたまたま一致してしまうリスクは交差反応性エピトープの場合よりもはるかに低い、これは設計されるプローブのそれぞれを細菌/ウイルス核酸データベースの全内容と直接比較して、特定の標的に対して一意的となるように設計しうるのである。非常に短いプローブ (例えば20量体) を用いることにより、細胞壁/キャプシド浸透性および細胞内核酸標的に対する到達性を最大限に高めることができる。標的物体に対して一意的な標的配列としては、感度を最大限に高めるために、大量に発現されるRNA上にあるもの、例えば、リボソームRNA中の配列などを選択することができる。ウイルスの場合には、最も大量に発現される遺伝子に対して選択的なプローブを設計することができる。

30

【0059】

単一標識実験には、ジゴキシゲニン検出システム (Zardaら、J. Gen. Microbiol. 137: 2823-2830, 1991) を用いることができる。このシステムはBoehringer Mannheim社からキットとして市販されている。しかし、ほとんどの場合には多重標識が必要と思われ、これはこのシステムでは不可能である。その代わりに、蛍光色素 (例えば、Genset Corp.のもの) と結合させたヌクレオチドの存在下でオリゴヌクレオチドを合成することができる。シグナル増強が必要であるか求められる場合には、オリゴヌクレオチドを合成時にタグ (例えば、ビオチン) で標識しうる。この場合、タグ標識された各プローブは、標識が例えば24種の蛍光団のいずれか1つであるような、複数の異なるストレプトアビジン標識複合体の1つと別個に反応すると考えられる。これらの事前に反応させたオリゴプローブ複合体は細菌膜を通過して自由に拡散する程度に小さい必要がある。しかし、そうでない場合には、細胞をリゾチーム/EDTAによって透過化することができる。

40

【0060】

上記の通り、さまざまな蛍光分子が知られており、利用可能である。50,000種を上回る染色剤が、Eastman Kodak社、Polaroid社、Fuji Film社およびMolecular Probes社 (www.probes.com) から販売されている。有核細胞標的に適した分子の例には、DAPI、ヨウ化プロピジウム、アクリジンオレンジおよびYOPROが含まれる。

【0061】

50

### 検出システムの構成要素

検出システムに必要な種々の構成要素は市販されている。検出器は、光、蛍光、または励起、放出などを含む他のエネルギー伝達の測定、記録、画像化または検出を行うための任意の手段であってよい（例えば、装置、適した鏡および/もしくはレンズの組み合わせ、光電子増倍管または他の検出手段）。一般に、本システムは、電動式架台（例えば、いずれもNikon, Japan製のNikon Microphot-FXAもしくはNikon Eclipse 1000; Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY製の架台またはZeiss, Germany製のAxioplan 2IE MOT）、蛍光フィルター（組み込まれたもの、またはOmega Optical, Brattleboro, VTに発注）、カメラ（例えば、DAGE-MIT, Inc., Michigan City, IN製のCCD 72カメラ; Zeiss, Germany製のAxioCam; またはPixelvision (www.pixelvision.com) 製のSpectraVideoカメラ）、ならびにプリンタ、モニタ、記憶媒体、ディスプレイおよび本発明を実施するのに必要なソフトウェアを有するコンピュータを備えた蛍光顕微鏡を含む。上に挙げた構成要素の多くは、Nikon、Zeiss、Georgia Instruments (Roswell, GA)、Vaytek (Fairfield, IA)、Applied Imaging, Inc. (www.micrometastasis.org/metfs1.htm) およびChromavision Medical Systems, Inc. (www.chromavision.com) などの製造元から入手可能である。

10

#### 【0062】

どの構成要素を用いるにせよ、本システムは、以下の段階またはその変形物および同等物を行えるべきであると考えられる：

- 1) 検体フィールド（例えば、顕微鏡用スライドガラス）当たりの標的物体（例えば、癌細胞）の数を、第2もしくは第3の蛍光団またはその両方を含む物体のカテゴリーに細分して算定すること；
- 2) 各標的物体の画像を保存すること（例えば、記録、画像化、データ記憶媒体への保管）；
- 3) 各標的物体のx、y座標を記録すること；
- 4) スライド上の物体の総数を算定すること。分析は検体フィールドを走査することによって行われる。走査は顕微鏡のハードウェアによって規定されるすべての倍率で行うことができる。使用者は何らかのフィルターセット（単一、二重または三重）を用いて検体フィールドを走査することを選択できる。走査は独立に行うことができる。

20

#### 【0063】

標的物体の検出および同定のためのアルゴリズムは、生物学的画像解析のための市販のソフトウェアに基づく（例えば、Media Cybernetics, www.mediacy.com製のImage Pro Plus; またはKontron, Germany製のKS 400）。標的物体の検出に関する選択基準は、例えば、以下のものでありうる：

30

- a) 第2および第3の蛍光チャンネルにおける蛍光強度の閾値；
- b) 真の標的物体（例えば、完全な細胞）を偽標的物体（例えば、夾雑物、残渣）と識別するための、第2および第3の蛍光チャンネルにおける面積および形状；ならびに
- c) 第2および/または第3の蛍光チャンネルのシグナルが、常に第1の蛍光チャンネルからのシグナル（例えば、DAPIシグナル）と共存すべきであること。

#### 【0064】

各走査の前に、使用者が標的物体に対する選択基準を定義する。走査の後に、選択基準（上記参照）を満たすすべての標的物体の数を表示し、第2、第3またはその両方の蛍光標識を示す標的物体に細分する必要がある。選択基準を満たすすべての標的物体を画像化し、三色RGB画像として保存する（上記の段階2）。走査の終了時に、すべての画像を画像の一覧として表示し、オプションとして各画像の拡大を用意する。選択基準（上記参照）を満たすすべての標的物体についてx,y座標を記録し、使用者が各位置を呼び出して架台がその位置に自動的に移動するようにすることができる（上記の段階3）。このオプションにより、使用者は検出されたすべての標的物体を顕微鏡の高倍率下で調べ直すことができる。また、指定された位置で入手した対応する画像を呼び出すことも可能である。各走査時には、細胞の総数（第1の蛍光団、例えば、DAPIシグナルを計数し、走査終了時に表示する必要がある（上記の段階4））。

40

50

## 【0065】

検出システムのユーザーインターフェース

1. 走査の設定。走査の開始時に、使用者は以下の情報を入力し、走査のパラメータを選択するように促される：

1. スライドの識別情報；
2. 走査するスライドの数；
3. 走査の倍率（対物レンズを選択）；および
4. 走査のフィルター設定（走査中の単一、二重／三重フィルター、またはフィルターの交互使用を選択）。

## 【0066】

入力した情報に基づいて初期画像が表示され、カメラが設定される（輝度およびコントラストを調整する）。使用者は陽性細胞に関する選択基準を定義し、以下を選択しなければならない：

1. 強度の閾値；
2. 面積の下限および上限；ならびに
3. 形状の基準。

## 【0067】

2. 走査。初期設定の後に、走査が自動的に始まり、仕様に従ってスライドを分析する。  
3. データの出力および記憶。各スライドに関して、以下の情報を表示して保存する：

1. 標的物体の数；
2. 各標的物体の画像および架台上での対応する座標；ならびに
3. スライド上の標的物体の総数。

## 【0068】

上の情報1～3は、使用者が命名して定義したフォルダ（スライドの識別情報）に保存される。

## 【0069】

4. 陽性細胞の手作業による確認。使用者は保存された画像を手作業で選択し、画像を入手した位置を呼び出すことができる。架台が自動的にその位置に移動し、接眼レンズを通してフィールドを観察することができる。

## 【0070】

速度は、レアイベントの自動分析システムを評価するための基本的なパラメータである。以下の実施例1に記載したシステムは、100万個の細胞を陽性イベント（例えば、CK陽性）に関して走査し、総細胞数を算定するのに約1時間を要する。より高感度の電荷結合素子（CCD）カメラおよびより高速なコンピュータを用いて、はるかに高速なシステムを利用することもできる。このようなシステムは、細胞100万個当たりの処理時間を数分程度に短縮させうると考えられる。このフロースルー速度はフローサイトメトリーと同程度であり、さらに必要に応じて形態学的確認のために、各々の陽性イベントをより高倍率で、または異なる光学素子を用いて観察しうる能力も保っている。

## 【0071】

これ以上の詳述は行わないが、当業者は上記の開示および下記の説明に基づいて本発明を十二分に利用しうると考えられる。以下の説明は、当業者がいかにして本発明を実施しうるかを単に例示するためのものとみなされるべきであり、いかなる意味においても開示の残る部分を制限するものではない。本明細書中に引用した参考文献は、印刷物、電子形態、コンピュータが読める記憶媒体またはその他の形態のいずれかにかかわらず、要約書、論文、専門誌、刊行物、教科書、論説、インターネットのウェブサイト、データベース、特許および特許公報を非制限的に含む、その全体が明示的に参照として本明細書に組み入れられる。

## 【0072】

実施例1：癌細胞に関するレアイベント画像化システム材料と方法

10

20

30

40

50

血液検体および骨髄検体の収集。5~10mlの血液または骨髄を、対照被験者または乳癌もしくは小細胞肺癌と診断された患者から採取し、EDTAを抗凝固薬として含むヴァキュテナー採血管 (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY) に入れた。試料はすべて被験者または患者からインフォームドコンセントを得た上で採取し、収集して24時間以内に顕微鏡分析用に処理した。

#### 【0073】

細胞株。乳癌細胞株MCF-7および小細胞肺癌細胞株SW2をAmerican Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VAから購入し、以下の染色プロトコールの評価およびレアイベント画像化システムの感度の決定のために用いた。細胞株は、10%ウシ胎仔血清、100U/mlペニシリンおよび0.1mg/mlストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (MCF-7) またはRPMI 1640 (SW2)。

10

#### 【0074】

顕微鏡分析のための試料の調製。血液試料または骨髄試料を2倍容積の0.17M塩化アンモニウムと混合し、室温 (RT) で40分間インキュベートした上で、800×gで室温にて10分間遠心した。続いて、細胞ペレットを洗浄し、リン酸緩衝食塩水 (PBS) 中に再懸濁した。生存している末梢血単核細胞 (PBMC) または有核骨髄細胞の総数を、トリパンブルー色素排除法を用いて算定した。続いて細胞を接着性スライド (Paul Marienfeld GmbH & Co., KG, Bad Mergentheim, Germany) に37℃で40分間かけて接着させ、その後にスライドを細胞培養液により37℃で20分間かけてブロックした。スライド1枚あたりに適用された細胞の総数は約 $1.5 \times 10^6$ 個であった。3つの別々のサークルに分割された総接着面積は約530mm<sup>2</sup>であった。

20

#### 【0075】

サイトケラチンの単一標識のために、細胞を氷冷メタノール中で5分間固定し、PBSですすぎ洗いした上で、クラスIおよびIIサイトケラチンを標的とするウサギ抗サイトケラチン抗血清 (Biomedical Technologies, Stoughton, MA) とともに37℃で1時間インキュベートした。その後、スライドをPBSで洗浄し、ローダミン結合抗ウサギ抗体 (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) とともに37℃で30分間インキュベートした上で、0.5μg/ml 4',6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI; Molecular Probes, Eugene, OR) (PBS中) による対比染色を室温で10分間行い、グリセロール-ゼラチン (Sigma, St. Louis, MO) 中にマウントした。処理したスライドは室温で保存し、1カ月以内に顕微鏡分析を行った。

30

#### 【0076】

サイトケラチンと細胞表面抗原Ep-CAMまたはGD2との二重標識のためには、細胞を1%パラホルムアルデヒド (PBS中、pH 7.4) 中で室温にて5分間固定し、PBSで洗浄した上で、20%ヒトAB血清 (Nabi Diagnostics, Boca Raton, FL) (PBS中) により37℃で20分間かけてブロックした。その後、Ep-CAM (モノクローナルマウスKS1/4抗体) またはGD2 (モノクローナルマウス1418抗体) を標的とする一次抗体を37℃で1時間適用した (抗体はいずれもKim-Ming Lo博士、Lexigen Pharmaceuticals, Lexington, MA.により寄贈された)。Ep-CAMを標的とする抗体は複数の製造元から入手可能であり、例えば、モノクローナルマウス抗ヒト上皮特異抗原はBiomed社、Foster City, CAから販売されている; モノクローナル抗ヒト上皮抗原 (Ber-EP4) はAccurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NYから販売されており、モノクローナルHEA-FITC抗体はMiltenyi Biotec社、Bergisch Gladbach, Germanyから販売されている。GD2に対する抗体はMatreya, Inc., Pleasant Gap, PAから販売されている。続いて、細胞を洗浄し、氷冷メタノール中で5分間固定した上で20%ヒトAB血清によりブロックし、抗サイトケラチン抗血清とともに37℃で1時間インキュベートした。二次抗体 (FITC結合抗マウス抗体およびローダミン結合抗ウサギ抗体; Jackson Immuno Research) を混合し、37℃で30分間適用した。核を0.5μg/ml DAPI (PBS中) により対比染色した。二重標識細胞をGel/Mount (Biomed, Foster City, CA) 中にマウントした。スライドは40℃で保存し、1週間以内に顕微鏡分析を行った。

40

#### 【0077】

50

感度の決定のための腫瘍細胞の希釈。サイトケラチン陽性 (CK+) 細胞の検出の感度を決定するために、MCF-7乳癌細胞を健康血液提供者のPBMCにより連続希釈した。検討した希釈度は $1:10^3$ 、 $1:10^4$ 、 $1:10^5$ 、 $1:2 \times 10^5$ 、 $1:5 \times 10^5$  および $1:10^6$  である。溶液を接着性スライドに接触させ、上記の通りにサイトケラチン標識のための処理を行った。希釈度毎に最大8枚の接着性スライドを調製して走査した。試料をスライド1枚当たりの腫瘍細胞の数に関して分析し、総細胞数との関係をみた。

#### 【0078】

腫瘍細胞および総細胞数の顕微鏡による自動検出。画像化システム、例えば、Georgia Instruments, Inc. (Roswell, GA) により開発されたレアイベント画像化システム (Rare Event Imaging System) などを用いて、スライドを自動的に走査した。このシステムは、  
10  
同社が権利を持つ、稀な蛍光イベントを検出して、分析した細胞の総数を決定する画像処理アルゴリズムを利用している。これは、自動焦点式でX、YおよびZ軸の電動制御、電動式フィルター選択および電子シャッターを備えた先進型コンピュータ制御式顕微鏡 (Nikon Microphot-FXA, Nikon, Japan) から構成される。画像は積算式冷却型CCD検出器によって取り込まれ、60MHzペンティアム画像化ワークステーションによって処理される。

#### 【0079】

第1の段階では、陽性イベント (例えば、CK+細胞) の検出に関して、ローダミンフィルターセットを用いて、スライドを自動的に走査した。陽性イベントは蛍光強度および面積に基づく。各陽性イベントの(x,y)座標をコンピュータのメモリに格納し、画像を保管した。第2の段階では、スライド1枚当たりのDAPI標識された核の総数 (これは総細胞数を表す) に関してスライドを走査した。スライド1枚当たりの総走査面積は、周辺効果を避けるために $448\text{mm}^2$  とした (接着面積の84%)。2回の走査が終了すると、陽性イベントの数および総細胞数が得られ、すべての陽性イベントを含む画像の一覧が表示される。使用者はこれらの画像を観察し、各画像に添付された記憶済みの座標を用いて、任意のイベントを以降の検討のために呼び出す。続いて、関心対象のフィールドを、より高倍率および追加のフィルターセット (例えば、フルオレセイン用またはUV用のフィルター) を用いて画像化することが可能と考えられる。イベントが陽性であることの確認および表現型の評価のために、異なる蛍光色の画像を電子的に重ね合わせることも可能と考えられる (多重標識)。1枚のスライドに対する総走査時間 (2回の走査) は約1時間であった。2回の走査は独立に行えるため、陽性イベントのみをスクリーニングするという選択肢が得られ、これ  
20  
30  
によってスライド1枚当たりの走査時間を30分間に短縮することもできる。

#### 【0080】

##### 結果

細胞付着手順の評価。試料調製時に最も重要な段階の一つは、スライドに対する細胞の付着である。ポリ-L-リジン / PBSでコーティングされたスライド (0.1%; Sigma, St. Louis)、SectionLockスライド (Polysciences, Inc., Warrington, PA) および接着性スライド (Paul Marienfeld GmbH & Co., KG) に接着させた細胞調製物の顕微鏡下での定量的比較により、最も均一な細胞単層 (最適な細胞密度で、重複が極めて少ないもの) が得られるのはPaul Marienfeld社製のスライドであることが明らかになった。このスライドは生細胞が接着するように荷電表面を含む。異なる種類の試料で本発明者らの付着技法を検証  
40  
するために、レアイベント画像化システムによって決定された細胞の総数を、スライドに最初に付着した細胞の数と比較した。最適化を行うと、いずれの接着性表面 (例えば、ポリ-L-リジンなどの正荷電物質でコーティングされたもの) も用いることができる。表1は、健康血液提供者の末梢血では細胞回収率が高いが (89%)。癌患者の試料では細胞の損失が幾分多いことを示している (PB、BMおよびSC試料のそれぞれの回収率は64、58および73%; PBおよびBMは正常PBとの比較で $p < 0.05$ 、t検定による)。

#### 【0081】

(表1)

試料の種類	細胞数/スライド	範囲 (n)	回収率
正常 PB	1,120,237 ± 93,372	733,833 - 1,470,633 (8)	89%
癌 PB	811,400 ± 89,039*	223,393 - 1,473,777 (17)	64%
癌 BM	731,945 ± 72,906*	157,110 - 1,459,414 (25)	58%
癌 SC	915,983 ± 95,806	76,745 - 1,631,660 (23)	73%

## 【0082】

健康被験者（正常）または癌患者からの末梢血（PB）、骨髄（BM）または末梢血幹細胞（SC）試料を「材料と方法」の項に記載した通りに調製し、 $1.5 \times 10^6$  個の細胞を接着性顕微鏡スライドのそれぞれに適用した。各群に指定された数（n）のスライドに関して細胞を計数し（DAPI標識に基づく）、その結果を平均 ± SEMとして表す。回収率の算出に関しては、各スライドの走査面積が総接着面積の84%であることに注意されたい（「材料と方法」の項を参照）。星印は、t検定による正常PBとの比較で $p < 0.05$ であることを意味する。

10

## 【0083】

検出方法の感度。レアイベント画像化システムの感度を調べる目的で、乳癌細胞（MCF-7）を加えたPBMC試料を調製し、サイトケラチン標識のための処理を行った。高輝度に染色された上皮MCF-7細胞は間葉由来の白血球と容易に区別することができる。CK+細胞の検出感度を、「材料と方法」の項に記載したように、種々の希釈度の腫瘍細胞（MCF-7/PBMC）を用いて検討した。 $10^6$  個のPBMC当たりのMCF-7細胞が1個という、検討した中で最も希釈度の高い試料でも、予想された量の癌細胞を検出することができた（表2；予想曲線と観測曲線との間に有意差がない、<sup>2</sup> 検定）。

20

## 【0084】

(表2)

$10^6$ 個のPBMC 細胞当たりの添加 細胞	検出された 細胞の総数	総細胞数	$10^6$ 個のPBMC 細胞当たりの検出 細胞
1000	1789	$1.94 \times 10^6$	922
100	169	$1.79 \times 10^6$	95
10	27	$2.35 \times 10^6$	12
5	38	$5.16 \times 10^6$	7
2	11	$3.94 \times 10^6$	3
1	13	$6.13 \times 10^6$	2

30

## 【0085】

腫瘍細胞の二重標識。レアイベントの検出の特異性を高め、同定された癌細胞の特徴をさらに分析するために、細胞内サイトケラチンおよび癌細胞表面マーカーの同時検出を可能にする染色プロトコールを開発した。この二重標識手順は、第1に細胞表面を固定してEp-CAMまたはGD2に対する標識を行い、第2に細胞を透過化して細胞内サイトケラチンに対する染色を行うという2つの逐次的な段階からなる。この二重標識プロトコールを癌細胞株MCF-7（乳癌）およびSW2（小細胞肺癌）に対して最適化した。蛍光顕微鏡検査により、SW2細胞が抗GD2抗体および抗サイトケラチン抗血清によって効率的に標識されることが示された。この逐次的固定では、共焦点レーザー走査顕微鏡によって入手した光学切片で示されたように、どちらのタンパク質の抗原部位も細胞内局在の点で維持されていた。染色された細胞には明らかに、細胞質中のサイトケラチン（赤色）および細胞表面のGD2（緑色）が認められた。いずれのタンパク質も細胞集団内での発現レベルは非常に不均一であった。MCF7細胞を抗Ep-CAM抗体および抗サイトケラチン抗血清で二重標識した場合にも同様の結果が得られた。一次抗体の一方を用いずに両方の二次抗体を用いた対照実験により、2つの検出系の間には交差反応がないことが明らかになった。

40

## 【0086】

50

染色プロトコールをさらに検証するために、MCF-7またはSW-2細胞を加えたPBMCを標識した。その目標は、癌細胞から高輝度の蛍光シグナルを入手しつつ、周囲のPBMCから得られる背景シグナルは低くすることであった。この目標を達成するのに最も重要な2つの要因は、一次抗体を逐次的に適用することと、一次抗体とのインキュベーションの前に2回のブロッキング段階（20%ヒトAB血清、PBS中）を行うことであることが明らかになった。蛍光顕微鏡検査により、二重標識したMCF-7細胞は周囲のPBMCと明瞭に区別しうることが示された。より高倍率では、細胞内サイトケラチン標識およびEp-CAMの表面染色が確認された。PBMCにSW-2細胞を加え、GD2およびサイトケラチンに対して二重標識した場合にも同様の結果が得られた。

## 【0087】

この二重標識プロトコールを、癌患者由来の末梢血試料および骨髓試料に対しても適用した。小細胞肺癌患者の末梢血由来のGD2/サイトケラチン陽性細胞の一例では、蛍光顕微鏡検査により、乳癌患者の骨髓からEp-CAM/サイトケラチン陽性細胞が認められた。この例では、癌細胞は周囲の骨髓細胞よりも大きいだけでなく、個々の染色の局在の違いも認められた：すなわち、サイトケラチン（赤色）は細胞質中にあり、Ep-CAM（緑色）は細胞周辺の細胞膜の箇所に集中していた。

## 【0088】

正常血液試料におけるサイトケラチン陽性細胞および二重陽性細胞の検出。単一染色および二重染色プロトコールの特異性を評価するために、健康提供者からの血液試料を分析した。サイトケラチンの単一標識を用いる方法とサイトケラチン/Ep-CAMまたはサイトケラチン/GD2の二重標識法との間で「陽性」細胞の数を比較した。蛍光顕微鏡検査により、PB試料の16~18%はいずれのプロトコールを用いてもサイトケラチンに関して陽性と評価され、CK+細胞の数は $10^6$ 個の白血球当たり標識細胞1~26個の範囲であることが示された。これに対して、試料を二重標識プロトコールで処理した場合には、陽性のものは健康被験者の試料からほぼ完全になくなった（合計77件のPB試料のうち二重陽性細胞は1個のみ観察された）。

## 【0089】

試料収集の空間的および時間的ばらつきの評価。骨髓の異なる領域でCK+細胞の分布が不均一である可能性を評価するために、同じ患者の右および左の腸骨稜から一対ずつのBM試料を採取して分析した。サイトケラチン陽性に関しては、24対のうち21対で結果が一致した（フィッシャーの直接確率法）（表3A）。末梢血試料におけるCK+細胞の出現に関する時間的変動についても検討した。96例の患者の各例から、治療的介入を行わずに2つずつのSC試料を連日採取した。対をなす試料はサイトケラチン陽性に関して統計的に有意な一致を示した（表3B）。

## 【0090】

（表3A）

		BM 2	
		+	-
BM 1	+	11	1
	-	2	10

## 【0091】

（表3B）

10

20

30

40

		SC 2	
		+	-
SC 1	+	19	9
	-	8	60

## 【0092】

癌患者の血液試料および骨髄試料におけるサイトケラチン陽性細胞の検出。レアイベント画像化システムの能力を示すために、355件の末梢血、骨髄および幹細胞試料を分析した。これらの試料は、乳癌患者から、自家骨髄移植を行う前で、しかも大量化学療法を行った後に採取した。試料はサイトケラチン単一標識法を用いてスクリーニングした。乳癌患者の末梢血からの2つのCK+細胞に関する一例では、陽性細胞は明瞭な細胞質標識を呈したが、周囲の血液細胞は染色されなかった。CK+細胞は骨髄試料の52%、末梢血試料の34%および幹細胞試料の27%に認められた(表4)。

## 【0093】

(表4)

	総試料数	CK陽性試料(すべて)		CK陽性試料( $\geq$ CK陽性細胞9個/PBMC $10^6$ 個)	
		数	%	数	%
BM 試料	63	33	52	25	40
病期 II/III	20	7	35	5	25
病期 IV	43	26	60	20	46
PB 試料	59	20	34	14	24
病期 II/III	13	2	15	2	15
病期 IV	46	18	39	12	26
SC 試料	233	64	27	29	12
病期 II/III	49	11	22	4	8
病期 IV	184	53	29	25	14

## 【0094】

表4に関しては、合計156例の患者からの骨髄(BM)、末梢血(PB)および末梢血幹細胞(SC)試料をサイトケラチン陽性細胞および総細胞数に関して分析した。複数の試料を分析できた患者もあれば、1種類の試料しか分析できなかった患者もあることに注意されたい。「CK陽性試料(すべて)」とは、少なくとも1個のCK陽性細胞がみられた試料の数を指す。CK陽性試料(CK陽性細胞9個/PBMC $10^6$ 個)とは、PBMC $10^6$ 個当たりのCK+細胞が9個またはそれ以上である試料の数を指す(正常PBにおけるCK+細胞の平均+2SD;表5)。試料1件当たりの最も多いCK+細胞数は、BMでは504個/ $10^6$ 個、PBでは371個/ $10^6$ 個、SCでは1020個/ $10^6$ 個であった。

## 【0095】

(表5)

マーカー	総試料数	CK+標識			二重標識	
		陽性試料	CK+ /10 <sup>6</sup> 個 ( 全試料 )	CK+ /10 <sup>6</sup> 個 (CK+ 試料)	陽性試料	DBL+ /10 <sup>6</sup> (DBL+ 試料)
CK	57	10 (17%)	1.18 ± 0.53	7.28 ± 2.59	---	---
CK/Ep-CAM	43	7 (16%)	0.46 ± 0.21	2.85 ± 0.81	1 (2.3%)	1.4
CK/GD2	34	6 (18%)	0.78 ± 0.44	4.41 ± 1.98	0 (0.0%)	0

## 【 0 0 9 6 】

表5に関しては、健康血液提供者からの血液試料をサイトケラチン単独、またはCK / Ep-CAMもしくはCK / GD2に対する二重標識によって評価した（「材料と方法」の項を参照）。陽性試料とは、CK+細胞（単一標識の場合）または二重標識細胞（二重標識の場合）を含むものである。各カテゴリーにおける陽性細胞の数は分析した細胞10<sup>6</sup>個当たりとして表しており、平均 ± SEMとして示している（7.14 × 10<sup>5</sup>個の細胞を含むCK / Ep-CAM群の1件の試料で陽性細胞が1個のみであった場合を除く）。DBL+は二重標識されたことを意味する。

## 【 0 0 9 7 】

表4にみられる通り、陽性試料におけるCK+細胞の頻度は1個 / 10<sup>6</sup>個 ~ 1020個 / 10<sup>6</sup>個とさまざまであった。しかし、正常被験者からの多くのPB試料ではCK+細胞は少数であり、これらは偽陽性細胞であることが二重標識実験に基づいて明らかになった（表5）。このため、癌患者からのPB試料で明確に陽性であることを示すために、対照試料で認められたCK+細胞数の平均 + 標準偏差の2倍、すなわち9個 / 10<sup>6</sup>個というカットオフ点を設定した。この閾値を適用しても、骨髓調製物におけるサイトケラチン陽性の程度（40%）は、末梢血調製物（24%）または幹細胞調製物（12%）よりも依然として高かった（表4）。さらに、分析したすべてのタイプの試料において、疾患の病期がステージIVの患者は、疾患の病期がステージII / IIIの患者よりもサイトケラチン陽性率が有意に高いことも明らかになった（表4）。

## 【 0 0 9 8 】

以上を要約すると、二重または多重マーカー分析を用いる、低い頻度で存在する関心対象の細胞（レアイベント）の検出のための自動分析システムを開発した。血液試料または骨髓試料の顕微鏡分析のための調製手順を自動化のために最適化したが、これは赤血球細胞の溶解、接着性スライドに対する単核細胞の付着および試料の免疫蛍光標識を含む。続いてスライドを、電動式架台を装備した蛍光顕微鏡により低倍率で観察し、すべての蛍光イベントを画像化し、後で呼び出すためにコンピュータデータベース中にカタログ化した。自動画像解析のためには、背景シグナルを低く維持しながら高輝度シグナルが得られる二次抗体を用いることが非常に重要である。本発明者らは最近、極めて高輝度かつ安定した蛍光シグナルが得られるAlexaシリーズの染色剤（Molecular Probes）を検討した。蛍光標識したスライドは1週間以内に分析する必要がある。より長期的な保存が望ましい場合には、安定な蛍光シグナルが保たれる封入剤を用いるべきである。本発明者らは、ProLong Antifade Kit（Molecular Probes）を用いると、スライドを40℃で3カ月保存した後にも優れた結果が得られることを見いだしている。

## 【 0 0 9 9 】

実施例2：レアイベント画像化システムの最適化試料の調製、細胞接着および染色のための基本的手順の適合化および最適化

用いたスライド（Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Bad Mergentheim, Germany）は、細胞がその上に播かれる、接着性のある各150mm<sup>2</sup>のサークルを3つ含んでいる。ヒト細胞に対して開発された接着手順を、微生物の処理に対して適合させる。検討する主なパラメータには、接着性スライドとの接触時間、温度、pH、緩衝液の組成およびそのイオン強度が含まれる。細菌（例えば、大腸菌、枯草菌、コレラ菌）およびウイルス（例えば、レオウイルス）に対して、スライドに対する接着特性のばらつきを検証するために別々の検査

を行う。検出はDAPIまたはアクリジンオレンジ（これはRNAウイルスの場合にRNAを標識する）を用いて行う。自動化のためには平坦な細胞単層が必須であるため、他の細胞付着システム（例えば、Shandon Cytocentrifugeを用いたサイトスピン法；Sakura社（Torrance, CA）によるCytotek Monoprep、およびCysyc社（Boxborough, MA）によるThinPrepなど）を用いた試験を比較のために用いる。

#### 【0100】

##### REIS自動化のためのコンピュータソフトウェアの開発

本発明者らは、本発明者らの当初の分析装置の一連の全工程を自動化している（Kraeftら、Clin. Cancer Res. 6: 434-442, 2000）。必要に応じて、実装する特定のシステムに適したカメラドライバを入手する。この種のドライバを作ることは、コンピュータプログラミングの技術分野ではルーチンの技能の範囲に十分に含まれる。REISは、稀な蛍光イベントを検出するための画像処理アルゴリズムを含んでいる。画像は検出器によって取り込まれ、PCベースの画像化ワークステーションで処理される。このソフトウェアは、蛍光シグナル（抗原陽性生物）の検出に加えて、総細胞数の計数（例えば、DAPI/アクリジンオレンジ染色に基づく）、自動的なシグナル位置決定、画像保管および画像処理も行う。最初は、これは1つまたは2つの蛍光団（例えば、AlexaFluor488およびAlexaFluor568）を用いて行われる。多重検出システムは、多数の染色剤（例えば、最大で24種の染色剤）に適応するように拡張可能であり、ソフトウェアが各染色剤によって観察された各々の蛍光シグナルを、対応する画像、例えばDAPI/アクリジンオレンジ染色によって得られたものと重ね合わせる。

10

20

#### 【0101】

##### 多重標識システムに対する改良

本明細書の方法は、大気試料または水試料における細菌およびウイルスの存在を観測するためだけでなく、病原体、特にBW病原体として特定されているものを検出および同定するためにも有用である。これらは多種にわたっており、検査しようとする病原体と同じ数のスライドを作製することも可能ではあるが現実的ではないと考えられる。1つの面は、その代わりとして、励起/放出スペクトルを区別しうるさまざまな蛍光団を用いる多重システムの開発にかかわる。

#### 【0102】

上に考察した通り、推定50,000種もの蛍光色素が利用可能である。したがって、この集団を、最も高輝度な蛍光シグナル（最大の感度のため）が得られ、その励起および放出スペクトルが区別可能であって、イソチオシアネート架橋を介して抗体と首尾良く結合させることが可能な、少なくとも24種の染色剤のセットを求めてスクリーニングすることが可能である。蛍光強度が類似している染色剤のセットも好ましいと考えられる。

30

#### 【0103】

選択した染色剤の少なくとも放出ピークを付き合わせて区別するためのフィルターのセットを、DAPIおよびアクリジンオレンジに加えて、本方法に用いるために選択する。励起波長の調節は、フィルターの別個のセットによって行うか、または入射光に対して狭帯域プリズムを用いることによって行う。蛍光フィルターを備えたホイールを、異なる蛍光団の識別のために必要な励起および放出フィルターのすべての組み合わせに適応するように変更する。

40

#### 【0104】

##### 実施例3：免疫細胞化学による病原体検出のための方法の開発

蛍光標識抗体の作製。免疫細胞化学アッセイのためにまず必要なことは、優れた抗体の作製である。市販のものまたは他のものが入手可能である場合には、BW病原体の表面抗原を標的とする既存の抗体を使用のために選択する。その他の場合には、照射処理を行った（死滅させた）関心対象の生物の試料（例えば、CDC、USAMRIIDなどからのもの）を使用のために選択し、露出されたエピトープに対するモノクローナル抗体（mAb）を作製する；これらの生物がいずれも交差反応の原因となりうる共通の表面エピトープを有していない場合、または確実に「死滅した」生物を入手できない場合には、その種に特異的な1つま

50

たは複数の抗原を選択し、精製した上でそれらのクローニングされた遺伝子から発現させること、または化学合成したペプチドによって模倣させることが可能である。抗体はすべて、蛍光分子を直接結合させるか、または二次蛍光で標識した抗体と併用する。直接標識抗体の検査は、FACS分析により、他の系統学的な類縁種、特に本明細書に記載したものに対する特異性に関して行う。

**【0105】**

上に挙げたさまざまな細菌、リケッチア、ウイルスおよび真菌、または他の適したモデル微生物に対する抗体を用いて、病原体検出用のレアイベント画像化システム (REIS) を開発することができる。6種の異なる抗体のそれぞれを4種の異なる染色剤と結合させ、合計24種の識別可能な蛍光標識抗体を作製する。究極的には、24種の識別可能な蛍光団 (24種の特異抗体のセットと結合させたもの) を用いる多重検出システムにより、2枚のスライド (すなわち、24種の抗体が2セット) のみで、ヒトを標的とする既知のBW病原体またはBW病原体と疑われるもののすべてを、3枚のスライドのみで本明細書に挙げたBW病原体のほぼすべてを観測し、陽性のものを同定することが可能になると考えられる。

10

**【0106】**

スライド上に固定化された病原体の免疫細胞化学的検出。抗体を産生させた6つの種の弱毒株または照射 (死滅) 生物の試料 (病原性であれば、CDC、USAMRIIDなどからのもの) を、既知の数として、REISを用いた分析のために接着性スライドガラスに対して直接適用した。

**【0107】**

第1のセットの実験では、各々の種からの既知の多数の生物体を、それらのコグネイト標識抗体の感度レベルを評価する目的で、REISを用いて個別に検討する; それぞれが単一の個々の生物体を検出しうる必要があり、その計数は定量的である必要がある。DAPIを従来通りにDNAの染色に用いる、またはRNAウイルスに対してアクリジンオレンジを用いる。手順のすべてのパラメーター (温度、緩衝液の組成、抗体濃度など) を、インキュベーション時間が最短になるように特に注意を払って、各々の生物体 / 抗体のセットに対して最適化する。初期条件は本質的には実施例1に記載した通りである。

20

**【0108】**

第2のセットの実験では、10% ~ 90% および90% ~ 10% の比率でスライド上に播種した関心対象の生物体のすべての対を、REIS分析の下で交差反応性がないことを確認する目的で検討する。

30

**【0109】**

第3のセットの実験では、多重構成に関して検討する; すなわち、多重物を用いた検出効率の検証が可能になるように、6種の生物の混合物 (細菌 / リケッチア、ウイルス、およびその2つの混合物) を5、10、15、19、23および28% の比率で用いる。続いて、6種の抗体のそれぞれの4種の調製物を用い、生物体を上記と同じ比率で播種して、24通りの強力な多重実験を行う。

**【0110】**

これらの実験の全体を通じて、検出効率に関するデータを収集する。これは本明細書に記載した75種の生物体 (または任意の他のBW病原体) に対して行うことができる。この種の情報は、合わせて効率的に分析しうる生物体のセットを決定するのに有用であり、この点は、スライドに対する接着性 (実施例2参照) または抗体とのインキュベーションに関する必要条件に種間での差異がある場合に特に重要と思われる。

40

**【0111】**

環境試料またはヒト体液中の病原体の免疫細胞化学的検出。上に考察した通り、微生物の免疫細胞化学的検出のための最適化された調製手順は、環境 (大気および水) 試料およびヒト (血液および他の体液) 試料に適用される。水中の病原体はその源から直接処理しうるが、大気中の細菌およびウイルスはそれらをスライド上に固定化するために特別な試料採取手順を必要とする。SKC社からのBioSampler (登録商標) を含め、適した大気捕集装置がいくつか市販されている。これはすべてガラスでできた真空駆動式のインピンジャー

50

装置であり、液体に通気して泡立たせるのではなく、粒子の跳ね返りが最小限に抑えられ、再噴霧化が減少するように、収集用液体の表面に対して接線方向にある空気ノズルを用いる。水または粘度の類似した液体を収集用液体として用いて流速12.5L/分で動作させることにより、BioSamplerの収集効率は直径1 $\mu$ m程度の粒子に関しては100%近くになり、0.5 $\mu$ mでも依然として約90%、0.3 $\mu$ mで約80%である。このため、ほとんどの細菌は直径1~10 $\mu$ mであり、多くのウイルスの大きさはこの範囲の下端である（例えば、エボラウイルスで100 $\times$ 80nm）ことから、BioSampler（登録商標）は大気中の細菌、真菌、花粉およびウイルスを収集するための優れた装置である。その他の大気捕集装置も適している。例えば、ある種の試料に好都合と思われるSKC社の別の製品にAir-0-Cell捕集カセット（SKC, Inc.）があり、この装置では、大気中の粒子を加速させて粘着性スライドに衝突させるが、これはさまざまな染色手順および顕微鏡検査を行うのにまさに適している。しかし、この収集方法は、2 $\mu$ mまたは3 $\mu$ mよりも小さい粒子には有効でない。

10

## 【0112】

環境試料の採取において調整する必要のある主なパラメーターは、試料採取時間および収集用液体の組成である。さまざまな液体を、スライドへの接着を補助する能力に関して、既知の量の生物体を用いて試験し、直接接種試験で比較することができる。

## 【0113】

ヒト体液の分析について、血液試料の分析によって例示する。第1に、提供者からの正常血液に既知の量の病原体（細菌およびウイルス）を加える。微生物の回収を分析し、検出閾値を確立した上で、手作業による分析と自動分析を比較する。微生物学研究所（例えば、Dana-Farber Cancer Institute）から第2の陽性血液培養物を入手し、本明細書に記載した細菌検出法に利用して、臨床結果（細菌培養に基づく）と比較する。これに加えて、患者からの陰性血液試料を対照として役立てることができる。

20

## 【0114】

インサイチュ-ハイブリダイゼーションによる病原体検出のための方法の開発。免疫蛍光法（IF）はレアイベントの分析のために現時点で選択される方法ではあるものの、核酸プローブおよびインサイチュ-ハイブリダイゼーション（ISH）の手法を用いた検出の方が好ましいと考えられる理由もいくつかある。これらを表7にまとめた。このように、この種の手法はIFにおける抗体の使用に代わる有用な選択肢となる。

## 【0115】

（表7）ISHがIF手順よりも優れると考えられる利点

30

1. 核酸 (NA) プローブの方が抗体 (Ab) よりもはるかに容易、迅速かつ安値に作製できる。
2. NA プローブは自在かつ安値に増やせる (モノクローナル Ab も同じであるが、ポリクローナル抗体はそうでない)。
3. NA プローブは Ab よりも均一である (特にポリクローナル; 多重標識 (多重) 実験のために、 $T_m$  の一致したプローブを選択することすら可能である)。
4. NA プローブのコグネイト RNA または DNA 標的とのハイブリダイゼーションは、抗体のエピトープとの相互作用よりもうまく制御できる (例えば、ハイブリダイゼーション温度、イオン強度などによる)。
5. NA プローブの方が多重標識実験をはるかに実施しやすい (異なる標識と結合させたヌクレオチドを単に組み入れる、またはビオチンに続いてさまざまなストレプトアビジン標識複合体を組み入れる; 免疫蛍光法 (IF) では、一次 Ab の標識がその結合を妨げることがあり、第2の Ab を検出用に用いる場合、IF では異なる種において産生された一次 Ab を用いる必要がある)。
6. NA プローブを用いて得られたシグナルは、特に直接標識の場合、Ab によるものよりも定量的であると考えられ、さらに必要に応じて増幅することも可能である (ジオビンなど)。

40

## 【0116】

核酸プローブの作製。標的とする生物に関して入手可能な配列情報のすべてを用いることにより、それらのそれぞれに対して特異的なオリゴヌクレオチドプローブを設計することができる。他の生物と配列がたまたま一致してしまうリスクは交差反応性エピトープの場合よりもはるかに低い (実施例2参照)、これは設計されるプローブのそれぞれを細菌/ウイルス核酸データベースの全内容と直接比較して、特定の標的に対して一意的となる

50

ように設計しうるためである。非常に短いプローブ（例えば20量体）を用いることにより、細胞壁/キャプシド浸透性および細胞内核酸標的に対する到達性を最大限に高めることができ、感度を最大限に高めるために、大量に発現されるRNAを用いることができる。この場合には、それぞれの種に対して特異的な、関心対象の細胞性生物に対するリボソームRNA中の配列を選択することが有用である。ウイルスの場合には、最も大量に発現される遺伝子に対して選択的なプローブを設計する。

#### 【0117】

単一標識実験にはジゴキシゲニン検出システムを用いることができ、このシステムはキットとして市販されている（Boehringer Mannheim）。しかし、ほとんどの場合には多重標識が必要と思われ、これはこのシステムでは不可能である。その代わりに、蛍光色素（例えば、Genset Corp.のもの）と結合させたヌクレオチドの存在下でオリゴヌクレオチドを合成することが考えられる。シグナル増強が必要であるか求められる場合には、オリゴヌクレオチドを合成時にタグ（例えば、ビオチン）で標識してもよい。この場合、タグ標識された各プローブは、標識が例えば24種の蛍光団のいずれか1つであるような、複数の異なるストレプトアビジン標識複合体の1つと別個に反応すると考えられる。これらの事前に反応させたオリゴプローブ複合体は細菌膜を通過して自由に拡散する程度に小さい必要がある。しかし、そうでない場合には、細胞をリゾチーム/EDTAによって透過化を行うことができる。

10

#### 【0118】

スライド上に固定化された病原体のインサイチュールハイブリダイゼーションによる検出。これらの実験は、上記の実施例2に記載したものと類似すると考えられる。「第1のセットの実験」は単一標識のみを要し、ジゴキシゲニンシステムによって行われる。他のすべてには、上記の蛍光標識オリゴヌクレオチドまたはビオチン化オリゴ+ストレプトアビジン標識複合体による検出方法を用いる。この場合も同じく、これらの実験の全体を通じた検出効率に関する収集データの評価により、単一のスライド上での多重アッセイとして合わせて観測することが可能な、BW病原体の最適なセット（最大24種）を決定することができる。

20

#### 【0119】

環境試料およびヒト体液中の病原体のインサイチュールハイブリダイゼーションによる検出。これらの実験は実施例2に記載したものと類似している。環境試料およびヒト試料を、免疫細胞化学およびインサイチュールハイブリダイゼーションを用いて並行的に分間析する。

30

#### 【0120】

##### 実施例4：単一標識のプロトコール

抗体はすべて、20%ヒトAB血清を含むPBS中に希釈する。

1. 血液を溶解させる：15mlコニカルチューブ内で3mlの血液に対して11mlの等張NH<sub>4</sub>Cl。室温で40分間放置する。
2. 1500rpmで5分間遠心する。
3. NH<sub>4</sub>Clおよび赤血球の上清を除去し、白血球のペレットを残す。ペレットを10ml PBS中に再懸濁する。
4. 1500rpmで5分間遠心する。
5. 上清を除去する；ペレットのサイズに応じて、ペレットを1、0.5または0.25ml中に再懸濁する。
6. 血球計算器による細胞数算定のために細胞、トリパンプルーおよびPBSの希釈液を作製する。1：100希釈：10μlトリパンプルー、10μl細胞、980μl PBS。
7. （接着スライド上の）サークル1つ当たりの細胞が5x10<sup>5</sup>個/100μlとなるように計算して調整する。
8. 接着性スライド上に細胞を播く；細胞の接着のために37℃で40分間おく。
9. サークル1つ当たり60μlの50：50培地をスライドに添加する；37℃で20分間インキュベートする。

40

50

10. スライドを2%パラホルムアルデヒド中に室温で20分間おく。
11. スライドを3分間×2回すすぎ洗いする。
12. スライドを-20℃のメタノール中に5分間おく。
13. PBSで3分間×2回すすぎ洗いする。
14. 60μlの20%ヒトAB血清を各サークルに添加し、37℃で20分間おく。すすぎ洗いは行わないこと。水を切る。
15. 60μlの一次抗体（例えば、抗サイトケラチン）を各サークルに添加する。37℃で1時間インキュベートする。
16. PBSで3分間×2回すすぎ洗いする。
17. 60μlの二次抗体（例えば、抗ウサギロダミン）を添加する。37℃で30分間インキュベートする。 10
18. PBSで3分間×2回すすぎ洗いする。
19. 60μlのDAPIを各サークルに添加する。室温で10分間インキュベートする。
20. PBSで1回すすぎ洗いする。
21. dH<sub>2</sub>O中におく。
22. グリセロールゼラチン中に封入する。35μlを各サークルに載せる。カバーガラスを被せる。
23. スライドはホイルで覆った上で室温で保存してよい。

【0121】

#### 実施例5：二重標識のプロトコール

20

##### 標識のプロトコール

抗体はすべて、20%ヒトAB血清を含むPBS中に希釈する。

1. 血液を溶解させる：15mlコニカルチューブ内で3mlの血液に対して11mlの等張NH<sub>4</sub>Cl。室温で40分間放置する。
2. 1500rpmで5分間遠心する。
3. NH<sub>4</sub>Clおよび赤血球の上清を除去し、白血球のペレットを残す。ペレットを10ml PBS中に再懸濁する。
4. 1500rpmで5分間遠心する。
5. 上清を除去する；ペレットのサイズに応じて、ペレットを1、0.5または0.25mL中に再懸濁する。 30
6. 血球計算器による細胞数算定のために細胞、トリパンブルーおよびPBSの希釈液を作製する。1：100希釈：10μlトリパンブルー、10μl細胞、980μl PBS。
7. (接着スライド上の)サークル1つ当たりの細胞が $5 \times 10^5$ 個/100μlとなるように計算して調整する。
8. 接着性スライド上に細胞を播く；細胞の接着のために37℃で40分間おく。
9. サークル1つ当たり60μlの50：50培地をスライドに添加する；37℃で20分間インキュベートする。
10. スライドを2%パラホルムアルデヒドPBS中に室温で20分間おく。
11. スライドをPBS中3分間×2回すすぎ洗いする。
12. 60μlの20%ヒトAB血清を各サークルに添加し、37℃で20分間おく。水を切る。すすぎ洗いは行わないこと。 40
13. 60μlの一次抗体（例えば、抗GD2、抗GD3、抗Her-2neuまたは抗KSA/EpCAM）を各サークルに添加する。37℃で1時間インキュベートする。
14. PBSで3分間×2回すすぎ洗いする。
15. 60μlの二次抗体（例えば、抗マウスAlexa Fluor488）を添加する。37℃で30分間インキュベートする。
16. PBSで3分間×2回すすぎ洗いする。
17. スライドを-20℃メタノール中に5分間おく。
18. PBSで3分間×2回すすぎ洗いする。
19. 60μlの20%ヒトAB血清を各サークルに添加する；37℃で20分間おく。水を切る。す 50

すぎ洗いは行わないこと。

20. 60  $\mu$  l の一次抗体（抗サイトケラチン）を各サークルに添加する。37 で1時間インキュベートする。

21. PBSで3分間  $\times$  2回すすぎ洗いする。

22. 60  $\mu$  l の二次抗体（例えば、抗ウサギロダミン）を添加する。37 で30分間インキュベートする。

23. PBSで3分間  $\times$  2回すすぎ洗いする。

24. 60  $\mu$  l のDAPIを各サークルに加える。室温で10分間インキュベートする。

25. PBSで1回すすぎ洗いする。

26. ddH<sub>2</sub>Oですすぎ洗いする。スライドを乾燥させる。

27. スライドをPro-Long Anti-fade封入剤（Molecular Probes）で封入し、カバーガラスを被せて、無色透明のマニキュア液で封止する（選択的）。

28. アルミニウムホイルで覆い、4 で保存する。

【0122】

#### 実施例6：細菌試料の調製

1. 細菌を半対数期まで増殖させる（600nmでのOD = 0.5）。

2. 0.5mlの細菌懸濁液を遠心する（5Krpmで5分間）。

3. 細菌を1mlの10% PBS中に再懸濁する。

4. 50  $\mu$  l の細菌再懸濁液をスライド上のウェルに添加する（Clear-CellまたはAd-Cellスライドを用いる場合はゼラチンコーティングは不要であるが、他の場合には細菌のスライドに対する結合性を高めるためにスライドをゼラチンで前処理する）。

5. 細菌懸濁液を37 で30分間乾燥させる。

6. 室温のPBSですすぎ洗いした後に、4% パラホルムアルデヒド溶液中に25～30分間おく。

7. 室温のPBSですすぎ洗いした後に、100  $\mu$  l トリトン / ウェルを滴下して5分間おく。

8. 室温のPBSですすぎ洗いする。

9. PreHyb溶液を加えて46 で30分間おく（Prehyb溶液；50ng /  $\mu$  l BET42a、Hyb溶液中、Hyb溶液は以下を参照）。

10. \*46 で120分間ハイブリダイズさせる。Hyb溶液は蛍光団濃度5ng /  $\mu$  lおよびBET42a濃度50ng /  $\mu$  l。

11. \*48 で30分間洗浄する。洗浄溶液は前もって48 に加熱しておく必要がある。スライドに少量の洗浄溶液をかけた後に洗浄溶液中に30分間浸漬する。

12. \*スライドを室温のPBSですすぎ洗いする。

13. \*DAPIを室温で5分間適用する。

14. \*室温のPBSですすぎ洗いしてDAPIを洗い流し、風乾後にGel封入し、カバーガラスを被せて縁をマニキュア液で封止する。

\*段階10以降は蛍光団が光退色しないように暗所で行う必要がある。

【0123】

#### Hyb溶液

40% ホルムアルデヒド溶液

5M NaCl 720  $\mu$  l

1M Tris-HCl (pH7) 80  $\mu$  l

10% SDS 4  $\mu$  l

ddH<sub>2</sub>O 1600  $\mu$  l

ホルムアルデヒド 1600  $\mu$  l

蛍光団を濃度5ng /  $\mu$  lとなるまで添加する

【0124】

#### 洗浄溶液

5M NaCl 2.25ml

0.1% SDS 0.1ml

10

20

30

40

50

1M Tris-HCl (pH7.6) 2.0ml  
ddH<sub>2</sub>O 95.65ml

【0125】

FITC、Alexa Fluor 488、Cy 5、Cy3およびBet42aでブロッキング標識したオリゴヌクレオチドを検討した。プローブの特異性および標識のシグナル強度を確認するための実験を行った。上に挙げたプローブ配列はすべて、その標的のみと特異的に反応し、他の細菌とは反応しなかった。

【0126】

実施例7：患者試料の採取

悪性カルチノイド腫瘍と診断された白人男性患者1例が中腸の治療を受けた（内容は不明）。標準的な治療レジメンを完了した後に、この患者は標準的な臨床検査の結果に基づいて「癌が消失した」と診断された。そこで、この患者の血液に対して、本質的には本明細書に記載した通りの方法を行ったが、この際の試料の白血球数は $42 \times 10^6$ であった。これらの白血球の $15 \times 10^6$ 個の試料をプレーティングし、実施例5に例示した二重標識プロトコールにより、抗GD2抗体（14/18）およびAlexa Fluor 488抗体をそれぞれ一次抗体および二次抗体として用いた後に、抗サイトケラチンおよび抗ウサギローダミンをそれぞれ一次抗体および二次抗体として用いることによって染色した。患者の試料中にはサイトケラチン抗体による陽性細胞が3個認められた。この結果は、この患者が実際には癌が消失した状態にないことを示している。この検出の結果として、この患者は、転帰が改善する見込みが高まるように、癌細胞をより徹底的に排除するための治療レジメンをさらに一定期間にわたって受けることになった。

【0127】

その他の態様

本発明をその詳細な記載とともに説明してきたが、以上の説明は本発明を例示するためのものであって、その範囲を制限するものではなく、それは添付する特許請求の範囲によって規定されることが理解される必要があるその他の面、利点および修正は本発明の範囲に含まれる。

【0128】

例えば、実施例1に記載した手順は好印象を与えるが、この「第1世代」のレアイベント画像化システムに改良を加えることも可能である。いくつかの既知の細胞処理速度に関する律速因子は機械的なものであるが、これは数百万個の細胞をかなり高倍率（通常10~20倍）で走査しなければならないためである。実際、システムの速度は問題の一つである：処理速度が細胞1000個/分であれば、 $5 \times 10^6$ 個の細胞を走査するためのデータ収集時間は休まずに約3.5日を要すると考えられる。スライド上の細胞密度は幾分高めることができると思われるが、現在用いられているカメラのサイズおよび感度では倍率はせいぜい10倍または5倍に制限され、時間が重要な要因であるレアイベントの検出に用いるにはこのような遅いシステムは不十分であり、実用性の点から使用できない。これよりもかなり迅速ではあるが（約4時間で最大 $10^7$ 個の細胞）、「第1世代」のシステムも臨床（または環境モニタリング）の現場で真に有用なものとなるには改良が必要である。

【0129】

この欠点に対処するために、顕微鏡分析時間を4時間から10分間未満に短縮することを目標として、「第2世代」のREISシステムを開発することができる。急速に進歩している電子画像化およびソフトウェア業界で利用可能な技術に基づけば、この目標は妥当なものである。その鍵となるのは、非常に視野の広い極めて高感度のカメラを用いることであり、これにより、スライドを走査せずに広範囲の顕微鏡視野を取り込むことが可能と思われる。「第1の世代」システムの処理時間を短縮するために高利得デジタルカメラを用いるというアイデアは、ハッブル望遠鏡の成功によって生まれた。先進型のデジタル式（アナログではなく）電子カメラにより、遠く隔たった星々を単一のピクセルとして取り込むことができる。ある種の最新型カメラに用いられているグレード1の高量子効率バックイルミネーション型電荷結合素子（「CCD」）チップのサイズは $24.5 \times 24.5$ mmであり、ピクセル

アレイは $1024 \times 1024$ である。 $1600 \times 1600$ ピクセルアレイの新たなCCDチップも入手可能であり、これによってさらに広範囲の顕微鏡視野を調査することが可能になると考えられる。このような技術を用いることにより、スライド全体の画像で1枚のチップを構成させ、究極的には大規模な検体フィールド（例えば、細胞 $1 \times 10^9$ 個）内の細胞1個ずつを単一のピクセルとして画像化することも可能と考えられる。

## 【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/062201 A2

- (51) International Patent Classification: **A61B**
- (21) International Application Number: PCT/US02/02832
- (22) International Filing Date: 11 February 2002 (01.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:  
60/265,909 21 February 2001 (02.02.2001) US
- (71) Applicant: DANA-FARBER CANCER INSTITUTE  
[US/US], 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US).
- (72) Inventors: KRAEFT, Stine-Kathrein; 25 Lilient Road,  
Brookline, MA 02446 (US); CHEN, Lan, Bo; 184 East  
Emmerson Road, Lexington, MA 02420 (US); AUCLAIR,  
Daniel; 2 Alonquin Trail, Ashland, MA 01721 (US).
- (74) Agents: TSAO, Y., Rocky et al.; Fish & Richardson P.C.,  
225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US).
- (81) Designated States (*national*): AE, AG, AI, 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, LL, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW,  
MX, MY, NZ, OM, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG,  
SI, SK, SL, TL, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN,  
YU, ZA, ZM, ZW.
- (84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM,  
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW),  
Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM),  
European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FR, GR,  
GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SI, TR), OAPI patent  
(BE, BJ, CE, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR,  
NE, SN, TD, TG).
- Published:**  
*without international search report and to be republished  
upon receipt of that report*
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance  
Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning  
of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/062201 A2

(54) Title: RARE EVENT DETECTION SYSTEM

(57) Abstract: Disclosed is a method of detecting a target body in a specimen field of multiple candidate bodies by differential fluorescence labeling of different portions of the target body. The flexibility provided by the user of fluorophores allows for rapid detection of any rare target body with high efficiency and accuracy.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

RARE EVENT DETECTION SYSTEMCross Reference to Related Applications

This application claims benefit of U.S. Application Serial No. 60/265,909, entitled  
5 Rare Event Detection System, filed February 2, 2001, which application is hereby  
incorporated by reference in its entirety.

Statement as to Federally Sponsored Research

This invention was made with Government funds through a grant (CA13849) from  
10 the National Institutes of Health. The Government has certain rights in the invention.

Background of the Invention

Most human cancers are characterized by the aberrant expression of normal and/or  
mutated genes, and natural selection acts on cancer cells to cause a loss of growth control,  
15 angiogenesis, invasion, and metastasis. Thus, the ability to detect cancer cells of particular  
phenotypes in patient samples provides valuable information to a health care provider. For  
example, if the presence of metastatic cancer cells is detected in the body, then a medical  
professional might consider a more aggressive therapy for the patient.

Cancer cell detection methods that rely on expression of cancer markers generally  
20 require long, labor-intensive, and sometimes expensive immunohistochemistry or nucleic  
acid hybridization procedures that, though ubiquitous in research laboratories, are less  
accessible in the clinic. Furthermore, in many instances the particular marker being screened  
is only produced, either initially, or in detectable levels only at a late stage of cancer  
progression, such that the advantage of early detection is squandered. Current technologies  
25 allow detection of micrometastasis along the order of 1 parts-per-million (i.e., one cancer cell  
per one million other cells), however, this detection level is still inadequate for true "early  
detection" in certain cancers. More sensitive levels of detection would effectively provide  
cancer cell detection capabilities to allow appropriate and more effective intervention of  
cancer cell proliferation and thereby more effective and timely cancer treatment and disease  
30 modulation therapies. Thus, there is a need for fast, efficient, reliable, and sensitive detection  
methods that are more amenable for use in the clinic.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

The detection of biological weapons (BW) on a battle field poses a similar problem, i.e., no suitable method or device for detecting a rare particle (e.g., toxin or virus) among a large population of particles. Biological weapons, defined as infectious agents such as bacteria and viruses or related toxins, when used intentionally to inflict harm upon others, have been with us for a long time. They were probably originally used in prehistoric times, as arrowheads dipped into plant or animal extracts containing toxins; or in fecal matter or decaying meat, which are sources of the gas gangrene bacterium, *Clostridium perfringens*, and often also of the tetanus bacillus, *C. tetani*. BW first appear on the record as early as the 6th Century BC when the Assyrians poisoned enemy wells with rye ergot; and Solon of Athens used the purgative herb hellebore (skunk cabbage) to poison the water supply during the siege of Krissa; the Romans and many others have used a similar strategy; and during the 14th Century AD, the Mongols are said to have catapulted plague-infected corpses over the city walls of Kaffa, which they were besieging, an event that may have started the Black Death pandemic that spread throughout Europe. Other examples for the crude or more sophisticated use of BW abound, up to the late 20th Century.

Advances in basic and applied microbiology now allow skilled scientists to harness and weaponize the most virulent pathogens and toxins. While several countries (including the United States) have developed BW programs at some point or another during the 20th century, efforts in Japan and in the former Soviet Union are perhaps the most notorious. From 1932 until the end of WW II, the Japanese Army engaged in biological weapons research through its "Unit 731," based in occupied China. Research with human subjects (Chinese and Russian civilians and American, British, Chinese, Korean and Russian prisoners of war) was conducted using a variety of agents including anthrax, glanders, plague, typhoid, paratyphoid A and B, typhus, smallpox, tularemia, infectious jaundice, gas gangrene, tetanus, cholera, dysentery, scarlet fever, undulant fever, tick encephalitis, whooping cough, diphtheria, pneumonia, venereal diseases, tuberculosis and Salmonella. The Soviet program was initiated in 1928, when the governing Revolutionary Military Council signed a secret decree ordering the transformation of typhus into a battlefield weapon. In the 1930's, scientists at the Solovetsky Island facility, in the Arctic, worked with typhus, Q-fever, glanders, and melioidosis. From 1973 through at least the early 1990's, the Soviet Union carried out a program aimed at modernizing existing biological weapons and at

WO 02/062201

PCT/US02/02832

developing genetically altered pathogens, resistant to antibiotics and vaccines, which could be turned into powerful weapons for use in intercontinental warfare. Agents studied included anthrax, tularemia, plague, glanders, smallpox, Ebola, Marburg, Machupo, Junin, and Venezuelan equine encephalitis.

5 All open societies, such as ours, are by their very nature vulnerable to terrorist attacks, both from international and domestic groups. With this state of affairs, it is most urgent that effective countermeasures be developed to preempt biological attacks, or render them ineffective through the protection of the target population (troops or civilians).

Biological weapons have a few unique features that make them especially formidable.  
10 For one, hurdles would be few for a small team comprising a competent microbiologist and a mechanical engineer, to grow or extract a variety of pathogenic agents (bacteria, viruses or toxins) and build an effective dispersion system: it has been estimated that a major biological arsenal could be built in a room 15 by 15 ft., with \$10,000 worth of equipment. This makes  
15 BW tools of choice for groups bent on terrorism who may want to inflict massive casualties to their opponent. Also, contagion may in some cases expand the outcome of the attack well beyond the confines of the original hit, both geographically and temporally. Finally, the actions of BW agents on the victims are generally delayed by at least hours, usually days, allowing a covert attack to be sustained during this period (besides giving the perpetrators an  
20 opportunity to flee, another boon for the stealth terrorist), and the early symptoms of an infection with a variety of BW pathogens are flu-like, making it very difficult to quickly recognize a BW attack as such.

Our ability to respond effectively to a biological attack on an unimmunized population therefore depends crucially on the development of new modalities for the rapid monitoring of BW agents in the environment, both airborne (indoors and outdoors) and  
25 waterborne, before an outbreak of the disease. This is also the time window when early detection of pathogens in human body fluids, e.g., blood, prior to the appearance of clinical symptoms is important.

Theoretically, any pathogen could be used as a biological weapon. However, certain characteristics make a biological organism or a biologically derived bioactive substance  
30 (BDBS), such as bacterial toxins, especially suited for use as weapons of mass destruction. These agents can be: 1) highly infectious, contagious, and toxic (i.e., even low-level

WO 02/062201

PCT/US02/02832

exposure causes disease); 2) efficiently dispersible, e.g., in the air; 3) readily grown and produced in large quantities; 4) stable in storage; 5) resistant to environmental conditions, for extended effect; and 6) resistant to treatment, e.g., antibiotics, antibodies, other drugs.

To the list of natural pathogens, one should add genetically modified BW agents.

- 5 This class of agents is particularly dreadful because they would be generated to make them more potent, even creating new diseases (e.g., resulting in a "brainpox" virus), or produce pathogens resistant to existing countermeasures. These pose a special challenge due to their unpredictability.

- For the reasons described above, a covert attack using BW agents would be extremely  
10 difficult to detect and assess (in the absence of intelligence). At the present time, as no formal environmental monitoring system exists, the earliest knowledge that an attack took place would occur in many cases only when victims start pouring into emergency rooms and an outbreak is recognized. This, of course, is far too late. The classical monitoring methods for pathogens involve environmental sampling (air, water supply) or body fluid sampling  
15 (blood, urine, sputum etc.) onto growth media and culture of the sample followed by a battery of microbiological tests to identify the culprit. In addition to the fact that culture is not a trivial endeavor (e.g., for viruses), such a procedure is much too lengthy to provide a timely alert. Other possible analysis methods include biochemical assays, immunoassays, "GeneChip" screening, and the polymerase chain reaction (PCR), but all these require  
20 amounts of the contaminant that may not be present in the initial sample (to meet a sensitivity commensurate with an actual threat), such that culture may still be needed; even PCR from a single bacterium or virion is impractical.

#### Summary of the Invention

- 25 The invention is based on technologies that provide for detecting the presence of a rare event or marker. The invention relates to equipment and methods for identifying, characterizing (either quantitatively, qualitatively, or both), analyzing or determining the presence of minute quantities of rare events or markers. The determination of the presence or absence of such rare events or markers, as well as the quantification of such rare events or  
30 markers, is useful in providing early detection of deleterious or potentially harmful entities or conditions, which if identified earlier rather than later, can allow for the application of an

WO 02/062201

PCT/US02/02832

appropriate response, treatment, or other intervention regimen or protocol. Rare events include both normal events (e.g., the presence or absence of target bodies or cells that are present in normal physiological states) and abnormal events (e.g., the presence or absence of target bodies or cells that are present in abnormal physiological states such as those

5 associated with disease, disease symptoms, or genetic abnormalities). One problem with current diagnostic methods, particularly for cancer, relates to minimal residual disease. That is, instances when the level of disease cells or other disease markers (e.g., nucleic acids, proteins, cell surface receptors) is too low for current detection methods, however, significant enough that they represent the potential for further proliferation, up-regulation or recurrence

10 of the disease if left undiagnosed or untreated. Thus, in many instances, identification of disease risk (i.e., cancer, arteriosclerosis, central nervous system disease, etc.) in a more timely manner would allow for earlier treatment, which leads to more effective treatments; or earlier identification of risk to populations (i.e., biological warfare agents), which allows for minimization of exposure and uncontrolled spreading or distribution of that risk to greater

15 populations, is desirable.

The invention is based on the discovery of a highly sensitive and efficient method of detecting rare cancer cells in a large cell population. In addition, the cancer cell detection system implemented herein led to the realization that almost any rare target body within a large population of candidate bodies can be detected via this system, modified for the

20 particular target body to be identified. The methods and systems of the invention rely on fluorescent labels that specifically bind to subsets of a large population, each subset including the target body to be detected. A target body is any body (e.g., a cell, a pathogen, a virus, a toxin, a prion) in the specimen field that is sought to be identified (e.g., by labeling, including directly to the target body or indirectly such as when the label is coupled to an molecule that

25 binds or interacts with the target body). A candidate body is any body (e.g., a cell, a pathogen, a virus, a toxin, a prion) in the specimen field that is being analyzed.

Accordingly, the invention features a method of detecting a target body (e.g., a cancer cell) in a specimen by obtaining a specimen field (e.g., peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or bone marrow cells spread out on a glass surface) exposed to or labeled with at

30 least a first fluorophore and a second fluorophore, the first fluorophore emitting photons at a first wavelength and the second fluorophore emitting photons at a second wavelength;

WO 02/062201

PCT/US02/02832

exposing the specimen field to light sufficient to excite the first and second fluorophores; scanning the specimen field for first sources of photons at the first wavelength and for second sources of photons at the second wavelength; acquiring and recording a first image of the specimen field at each location, the first image generated via an optical or electronic filter  
5 that substantially blocks photons of the second wavelength but is permissive for photons of the first wavelength and; indexing the corresponding location within the specimen field; acquiring and recording a second image of the specimen field at each location, the second image generated via an optical or electronic filter that substantially blocks photons of the first wavelength but is permissive for photons of the second wavelength; indexing the  
10 corresponding location within the specimen field; and retrieving and inspecting a first image and second image at a single location within the specimen field. The presence of a candidate body in the first and second images at the single location indicates the presence of a target body in the specimen. Images of different fluorescent signals can be overlaid for positive confirmation of the event or for phenotypic evaluation. The two scans can be run  
15 independently.

The first fluorophore can be a compound that specifically binds to DNA, such as DAPI, or RNA, such as acridine orange. The second fluorophore can be coupled to a molecule (e.g., an antibody or nucleic acid) that specifically binds to a cancer cell marker, such as cytokeratin or another marker.

20 In some embodiments, the specimen field can be labeled with a third fluorophore to increase the specificity of the rare event detection or to detect multiple subsets of target bodies, for example a cancer cell and a virus, and the method can further include exposing the specimen field to light sufficient to excite the third fluorophore, the third fluorophore emitting light at a third wavelength; scanning the specimen field for third sources of photons  
25 at the third wavelength; registering the location of each third source within the specimen field; acquiring and recording a third image of the specimen field at each location, the third image generated via an optical or electronic filter that substantially blocks photons of the first and second wavelength but is permissive for photons of the third wavelength; indexing each third image to the corresponding location within the specimen field; and retrieving and  
30 inspecting a third image at the single location within the specimen field. The presence of a candidate body in the first, second, and third images at the single location indicates the

WO 02/062201

PCT/US02/02832

presence of a target body. The third fluorophore can be coupled to a molecule (e.g., an antibody) that specifically binds to a second cancer cell marker such as an epithelial cell adhesion molecule (e.g., Ep-CAM) or a disialo-ganglioside antigen (e.g., GD2).

5 The methods can further include counting the total number of locations in the specimen field that produced a first image, counting the total number of locations in the specimen field that produced both a first image and a second image, or counting the total number of locations in the specimen field that produced a first, second, and third image. In addition, the methods can include inspecting a first image and second image at another single location within the specimen field, where the presence of a candidate body in the first image and in the second image at the other single location indicates the present of a different target body.

10 The invention further features a detection system including a stage for receiving a specimen field; a detector (e.g., microscope) positioned and configured to acquire images of locations within the specimen field; a light source positioned and configured to expose the specimen field to light sufficient to excite a first fluorophore at a first excitation wavelength and sufficient to excite a second fluorophore at a second excitation wavelength; a camera attached to the detector (e.g., microscope), the camera positioned and configured to (1) capture a first image at a location in the specimen field via an optical or electronic filter that substantially blocks photons at a second emission wavelength of the second fluorophore but is permissive for photons at a first emission wavelength of the first fluorophore, and (2) capture a second image at the location in the specimen field via an optical or electronic filter that substantially blocks photons at the first emission wavelength but is permissive for photons at the second emission wavelength; and a computer that records the first image and second image and indexes the first image and second image to the corresponding location within the specimen field, the computer displaying, on demand by a user, the first image and second image for the corresponding location.

20 The stage can be movable about three perpendicular axes and addressable in at least two of the three axes. Alternatively, the camera or a housing containing the camera and/or image capture device can be movable about three perpendicular axes and addressable in at least two of the three axes. The camera can include a charge-coupled device for capturing the first and second images or a plurality of optical filters for use in capturing the first and

WO 02/062201

PCT/US02/02832

second images. Alternatively or in conjunction with optical filters, the camera or computer can include electronic filters. Such filters can dissect a digitized color image taken at a range of wavelengths (e.g., the visible wavelengths) into images formed at only specific wavelengths or narrower ranges of wavelengths.

5 In another aspect, the invention features a method of detecting a target body in a specimen by obtaining a specimen field labeled with at least a first fluorophore, the first fluorophore emitting photons at a first wavelength; exposing the specimen field to light sufficient to excite the first fluorophore; scanning the specimen field at a low magnification for first sources of photons at the first wavelength; acquiring and recording a first image of  
10 the specimen field at each location; indexing each first image to the corresponding location within the specimen field; and inspecting a first image at a single location within the specimen field, where the presence of a candidate body in the first image at the single location indicates the presence of a target body in the specimen.

The methods and systems of the invention are capable of fast, highly sensitive, and  
15 efficient detection of rare target bodies within a large population of candidate bodies, such as a rare cancer cell within a million healthy cells, a level of sensitivity achievable with the present invention. The methods and systems herein allow for detection levels along the order of about 0.1 parts-per-million, or commensurately more beneficial, about 0.05, about 0.03, or about 0.01 parts-per-million.

20 In one aspect the invention is a method of detecting the presence or absence of a target body in a specimen, the method comprising  
obtaining a specimen field exposed to or labeled with at least a first fluorophore and a second fluorophore, the first fluorophore emitting photons at a first wavelength and the second fluorophore emitting photons at a second wavelength;  
25 exposing the specimen field to light sufficient to excite the first and second fluorophores;  
scanning the specimen field at a low magnification for first sources of photons at the first wavelength and for second sources of photons at the second wavelength;  
registering the location of each first source and each second source within the  
30 specimen field;

WO 02/062201

PCT/US02/02832

- acquiring and recording a first image of the specimen field at each location, the first image generated via an optical or electronic filter that substantially blocks photons of the second wavelength but is permissive for photons of the first wavelength;
- 5 acquiring and recording a second image of the specimen field at each location at a high magnification, the second image generated via an optical or electronic filter that substantially blocks photons of the first wavelength but is permissive for photons of the second wavelength;
- 10 indexing each first image and each second image to the corresponding location within the specimen field; and inspecting a first image and second image at a single location within the specimen field,
- wherein the presence of a candidate body in the first and second images at the single location indicates the presence of a target body in the specimen.
- 15 In another aspect the invention is any method herein wherein preparation of the specimen field comprises:
- a. lysing the cell sample to give a sample mixture;
  - b. centrifuging the sample mixture;
  - c. separating the supernatant from the sample mixture;
  - d. resuspending the resulting pellet of cells in a physiological buffer solution;
  - 20 e. plating the cells on an adhesive slide;
  - f. adding cell culture media to the slide.
- and wherein preparation of the specimen field further comprises:
- after step d, making a dilution of the cell mixture, treating the dilution with a dye sensitive for dead cells, performing a cell count to determine the sample cell density for the slide to be used.
- 25 In other aspects, the methods are any of those herein: wherein the target body is a cancer, epithelial, smooth muscle, dendritic, memory T-, memory B-, somatic, normal, aberrant, or stem cell; wherein the system is capable of detecting at least one target cell in a specimen field of at least 1,000,000 cells; wherein the system is capable of detecting at least one target cell in a specimen field of at least 25,000,000 cells; wherein the system is capable of detecting at least one target cell in a specimen field of at least 50,000,000 cells; wherein
- 30

WO 02/062201

PCT/US02/02832

the system is capable of detecting at least one target cell in a specimen field of at least 100,000,000 cells; wherein the recording comprises at least a 1024x1024 pixel array image; or wherein the recording comprises at least a 1600x1600 pixel array image.

In other aspects, the methods are any of those herein: wherein the field specimen  
5 comprises white blood cells as the majority of cell types; wherein the field specimen  
comprises heterogeneous cells types; wherein the field specimen comprises macrophages;  
wherein the specimen field is an environmental sample; wherein the light is ultraviolet light,  
infrared light, or visible light; wherein the target body is a cancer cell, and the specimen field  
is white blood cells or bone marrow cells spread out on a glass surface; wherein the first  
10 fluorophore is a compound that specifically binds to DNA; wherein the second fluorophore is  
coupled to a molecule that specifically binds to a cancer cell marker; wherein the cancer cell  
marker is cytokeratin; wherein the cancer cell marker resides in the cytoplasm; wherein the  
cancer cell surface marker is an epithelial cell adhesion molecule; wherein the cancer cell  
surface marker is a disialo-ganglioside antigen; further comprising counting the total number  
15 of locations in the specimen field that produced a first image; further comprising counting the  
total number of locations in the specimen field that produced both a first image and a second  
image; further comprising counting the total number of locations in the specimen field that  
produced a first, second, and third image; further comprising inspecting a first image and  
second image at another single location within the specimen field, wherein the presence of a  
20 candidate body in the first image and in the second image at the other single location  
indicates the present of another target body.

In another aspect, the invention is a detection system comprising  
a stage for receiving a specimen field;  
a detector positioned and configured to acquire images of locations within the  
25 specimen field at a set level and one or more additional amplifications of the set level;  
a light source positioned and configured to expose the specimen field to light  
sufficient to excite a first fluorophore at a first excitation wavelength and sufficient to excite  
a second fluorophore at a second excitation wavelength;  
a camera attached to the detector, the camera positioned and configured to (1)  
30 capture a first image at a location in the specimen field via an optical or electronic filter that  
substantially blocks photons at a second emission wavelength of the second fluorophore but

WO 02/062201

PCT/US02/02832

is permissive for photons at a first emission wavelength of the first fluorophore, and (2) capture a second image at the location in the specimen field via an optical or electronic filter that substantially blocks photons at the first emission wavelength but is permissive for photons at the second emission wavelength; and

5 a computer that records the first image and second image and indexes the first image and second image to the corresponding location within the specimen field, the computer displaying, on demand by a user, the first image and second image for the corresponding location.

10 In other aspects, the system is any herein wherein the stage is movable about three perpendicular axes and addressable in at least two of the three axes; wherein the camera comprises a charge-coupled device for capturing the first and second images; wherein the camera comprises a plurality of optical filters; wherein the detector comprises a 1024x1024 pixel array image; wherein the detector comprises a 1600x1600 pixel array image; or  
15 wherein the detector comprises an A x B pixel array image, wherein A and B are each independently an integer between, 1000 and 1,000,000.

The invention also relates to a method for analyzing for biological agent cells in a specimen field of cells comprising:

- 20 i) treating the specimen field with a first fluorophore that identifies the biological agent cell;
- ii) treating the specimen field with a second fluorophore that identifies the biological agent cell;
- iii) exposing the specimen field with light suitable for causing the first fluorophore to emit photons,
- 25 iv) exposing the specimen field with light suitable for causing the second fluorophore to emit photons,
- v) identifying cells in the specimen field that are emitting photons, which cells are biological agent cells.

In another aspect, the invention is any method herein: wherein the specimen field cell preparation comprises:

- 30 a. centrifuging a sample mixture;
- b. resuspending the sample mixture;

WO 02/062201

PCT/US02/02832

- c. plating the cells on an adhesive slide;
- d. treating the slide with a fixative (paraformaldehyde);
- e. treating the slide with a permeabilizing agent (Triton);
- f. treating the slide with a pre-hybridization solution;
- 5 g. treating the slide with a hybridization solution having a fluorophore;
- h. treating the slide with a fluorescent dye.

and that further comprising treating the specimen field with one or more additional fluorophore(s) that identifies the biological agent cell and exposing the specimen field with light suitable for causing the one or more additional fluorophore(s) to emit photons.

- 10 In other aspects, the invention relates to any method herein: wherein at least one fluorophore identifies DNA of a biological agent cell; wherein at least one fluorophore identifies a molecule that binds to the surface of the biological agent cell; wherein at least one fluorophore identifies DNA of a biological agent cell and at least one fluorophore identifies a molecule that binds to the surface biological agent cell; or wherein the biological
- 15 agent is bacteria, Rickettsiae, viruses, fungi, or prions.

In another aspect, the invention is any method herein: wherein preparation of the specimen field comprises:

- a. lysing the blood sample with ammonium chloride solution;
- b. centrifuging the sample mixture;
- 20 c. separating the supernatant ammonium chloride solution and erythrocytes;
- d. resuspending the resulting pellet of white cells in PBS;
- e. centrifuging the sample mixture;
- f. resuspending the resulting pellet of white cells in PBS;
- g. making a dilution of the cell mixture of step f, trypan blue, and PBS;
- 25 h. plating the cells on an adhesive slide;
- i. adding cell culture media to the slide.

- and that further wherein one fluorophore identifies cells that are not target cells. In other aspects the methods are those wherein the method is completed for a specimen field in less than 60 minutes; or wherein the method is completed for a specimen field in less than 10
- 30 minutes.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

In other aspects, the invention is a method for screening a transplantation organ donor for the presence or absence of a target body comprising any method herein, wherein the specimen field is a sample (e.g., blood sample, tissue sample) taken from the organ donor. This is useful for identifying target bodies in the donor prior to transplantation, thus preventing spread of those bodies to the donee. The invention also relates to a method for assessing the efficacy of a drug candidate against a disease or disease symptom in a subject who was administered the drug candidate by screening for the presence or absence of a target body whose presence or absence is indicative of the disease or disease symptom comprising any method herein, wherein the specimen field is a sample taken from the subject. The invention also relates to a method for screening a blood sample for the presence or absence of a target body comprising any method herein, wherein the specimen field is a blood sample. This is useful for identifying contaminated blood samples, for example in blood banks, prior to distribution of those contaminated samples. It could also be used for screening potential donors prior to their donation. The invention is also a method for screening a fluid sample for the presence or absence of a target body comprising any method herein, wherein the specimen field is a fluid sample; and any method herein, wherein the target body is a cancer cell.

In another aspect, the invention is a method of screening for the presence of bacteria comprising any method herein: wherein at least one fluorophore comprises a DNA probe for bacteria; wherein the specimen field is taken from a surgical patient after surgery; wherein the specimen field is taken from a food sample; or any method herein further comprising:

- j. exposing the slide to an aldehyde-based fixative;
- k. rinsing the slide in phosphate-buffered saline (PBS);
- l. adding human AB serum to the slide;
- 25 m. adding a primary antibody to the slide and incubating the slide;
- n. rinsing the slide in PBS;
- o. adding a secondary antibody to the slide and incubating the slide;
- p. exposing the slide in an organic solvent;
- q. rinsing the slide in PBS;
- 30 r. adding human AB serum to the slide;
- s. adding a primary antibody to the slide and incubating the slide;

WO 02/062201

PCT/US02/02832

- t. rinsing the slide in PBS;  
u. adding a secondary antibody to the slide and incubating the slide;  
v. rinsing the slide in PBS;  
w. adding a cell dye to the slide and incubating the slide;  
5 x. rinsing the slide with PBS;  
y. exposing the slide to water;  
z. mounting the slide;
- or wherein the primary antibody in step s is keratin and the secondary antibody in step u is anti-rabbit rhodamine;
- 10 or any method herein further comprising:
- j. exposing the slide in an organic solvent;  
k. rinsing the slide in PBS;  
l. adding a primary antibody to the slide and incubating the slide;  
m. rinsing the slide in PBS;  
15 n. adding a secondary antibody to the slide and incubating the slide;  
o. rinsing the slide in PBS;  
p. adding a cell dye to the slide and incubating the slide;  
q. rinsing the slide with PBS;  
r. exposing the slide to water;  
20 s. mounting the slide;
- or those: wherein the organic solvent is an alcohol or acetone; wherein the primary antibody is keratin; wherein the secondary antibody is anti-rabbit rhodamine; wherein the fluorophore detects bacteria; wherein the fluorophore is a nucleic acid probe; or wherein the nucleic acid probe is an oligonucleotide.
- 25 Other features or advantages of the present invention will be apparent from the following detailed description, and also from the claims.

#### Detailed Description

The invention relates to fluorescence-based methods and systems for detecting rare  
30 target bodies within a large number of candidate bodies. Because a wide variety of fluorophores are commercially available and have different peak emission wavelengths, the

WO 02/062201

PCT/US02/02832

methods and systems can be adapted to detect many different target bodies within a single large population of candidate bodies. For example, fluorophores A, B, C, D, E, and F can be coupled to molecules that specifically bind to target bodies 1, 2, 3, 4, 5, and 6, respectively. One merely needs to capture and assess the emission wavelength, if any, of a candidate body and compare the emission wavelength with what would be expected from fluorophores A-F to determine whether the candidate body is a target body 1, 2, 3, 4, 5, or 6. In fact, far large numbers of targets can be detected simultaneously in this manner. Additional details regarding the various reagents and procedures suitable for use in the invention are discussed below.

10 Preparation of Specimens for Detection

In common clinical applications, a specimen will typically be a cell sample in body fluids, bone marrow, or a tissue sample, e.g., a blood cell sample, that can be screened for the presence of a rare cell having a particular phenotype (using, e.g., antibodies) or genotype (e.g., using oligonucleotide probes).

15 The cell specimen preparation methods herein result in enrichment for cell types desired for analysis. This can be accomplished by any suitable method for separating or isolating cells, including for example, gradient separation, or lysis and centrifugation.

For the automated detection of rare events in peripheral blood or bone marrow, it is important to utilize a preparation method with minimal cell loss during sample processing.

20 Simple lysis of erythrocytes (e.g., using ammonium chloride solution) is preferred over Ficoll-based isolation methods to ensure maximal recovery of rare cells. Performing the lysis in the same tube containing the blood sample, then performing the separation (e.g., centrifuging, spinning down) in the same tube (i.e., involving no transfer of sample during the lysis and separation) also minimizes cell loss and minimizes cell representation variation in the sample (i.e., maintaining a consistent relative proportion of rare cells to other cells in the sample both before and after processing). The cell preparation/adhesion procedure described in the Example below yielded a homogeneous cell preparation.

25 In contrast, regular cytospin preparations can result in a loss of up to 2/3 of the cells. Information on cell number is unavailable for most studies using microscopic rare event detection because these studies fail to record the total number of cells actually being analyzed on the slides. Rather, these experiments merely relate the number of positive events to the

WO 02/062201

PCT/US02/02832

total number of cells processed, assuming a complete recovery. This introduces a bias: not only was it found that cells are indeed inevitably lost during preparation, but the recovery can vary greatly between samples of a given type (see "Range" column in Table 1) as well as according to the type of sample analyzed. It was found that adhesive glass microscope slides

5 from Marienfeld Laboratory Glassware (Paul Marienfeld GmbH & Co; www.superior.de) were excellent substrates for producing a cellular specimen field for subsequent fluorescence microscopy, because these slides were able to capture a homogenous cell monolayer (optimal cell density with minimal overlap). Once the media is introduced to the slide, treatment with any aldehyde-based fixative (e.g., paraformaldehyde, formalin, glutaraldehyde, cross-linking

10 agent) fixes the cells. In certain cells types where the antigen is not at the cell surface, the cells can be permeabilized, using a permeabilizing agent (e.g., methanol, TRITON). If the antigen is a surface antigen, then the permeabilization is not required. Exposure of the slides to an organic solvent (e.g., alcohols, ketones, methanol, ethanol, acetone) can be used to permeabilize the cells, and certain solvents (e.g., methanol) can both fix and permeabilize.

15 Cell culture media can be any media that can cover free binding sites, or can have proteins, including for example RPMI or DMEM. Physiological buffer solutions are those that are compatible with cells and include for example, any isotonic solution, or PBS. Cell dyes are any dye suitable to stain a cell and include for example, DNA dyes, cytoplasmic dyes, mitochondrial dyes, DAPI, calcein and the like. With the proper specimen preparation, any

20 unexpected cell type in a biological tissue or fluid can be detected using the invention. For example, the presence of smooth muscle cells in blood may indicate atherosclerosis. In another example, packaged blood in a blood bank can be screened for the existence of common pathogens transmitted by transfusion, such as human immunodeficiency virus, hepatitis B virus, or cytomegalovirus.

25 Whatever method is used to prepare the specimen field for analysis, it is important that the method does not destroy or significantly alter the target body to be detected. For example, if the target body is a prion, bacteria, virus, protozoan, or multicellular parasite, the isolation procedures may differ. Analysis of solid tissue (e.g., a solid tumor) may require disaggregating cells, e.g., by physical disruption instead of by trypsinization, since protease

30 treatment can alter any cell surface molecule that is used to identify a target cell. Preparation of a virus specimen field may entail filtering out large particles of a certain size (e.g., cells)

WO 02/062201

PCT/US02/02832

so that only sub-cellular particles are present in the specimen field. Alternatively, cells can be included in the specimen field if detection of virus-infected cells is desired. Various well known preparation procedures for particular biological samples are available to one skilled in the art of pathology and microscopy, and these procedures can be adapted to whatever target bodies are to be detected. Such procedures include cytospin using a Shandon Cytocentrifuge, Cytotek Monoprep from Sakura (Torrance, CA), and ThinPrep from Cysyc (Boxborough, MA).

When the sample to be analyzed is not a biological fluid such as blood, different devices can be used to collect samples from, e.g., air. In general, an air sampling device has a collection chamber containing liquid through or beside which air or gas is passed through, or containing a porous filter that traps particulates (e.g., target bodies) as air or gas passes through the filter. For collection chambers containing liquid, the collection liquid can be centrifuged or otherwise treated to separate particles from the liquid. The separated particles are then deposited onto a substrate for labeling or analysis. For collection chambers containing a filter (e.g., nitrocellulose), the filter can act as a substrate for subsequent labeling or analysis. Alternatively, particles can be washed from the filter, or the filter can be dissolved or otherwise removed from the particles. A filter collection chamber can also be adapted to collect particles from a liquid (e.g., water supply sample or cerebral spinal fluid) flowing through the filter. In addition, as discussed above, a liquid sample can be centrifuged to remove any particulate material present in the liquid. In instances when the test material remains in solution in the liquid sample and undesirable particulate matter is removed (e.g., by filtration), the mother liquor can be sampled (either in solution, or upon *in vacuo* drying of the sample solution) for analysis. A variety of samplers are known and available for use with the present invention. See SKC, Inc. ([www.skc.com](http://www.skc.com)), which sells the SKC BioSampler<sup>®</sup> and other sampling devices.

It is contemplated that the invention encompasses detection of biological warfare agents or any agent that is harmful to humans, animals, or plants. In that light, the methods and systems of the invention can be used to detect agents harmful to humans, commercially valuable animals, or commercially valuable plants. Human bacteria and Rickettsiae agents include but are not limited to *Coxiella burnetii*, *Bartonella Quintana* (*Rochalimea quintana*, *Rickettsia quintana*), *Rickettsia prowasecki*, *Rickettsia rickettsii*, *Bacillus anthracis*, *Brucella*

WO 02/062201

PCT/US02/02832

- abortus*, *Brucella melitensis*, *Brucella suis*, *Chlamydia psittaci*, *Clostridium botulinum*, *Francisella tularensis*, *Burkholderia mallei* (*Pseudomonas mallei*), *Burkholderia pseudomallei* (*Pseudomonas pseudomallei*), *Salmonella typhi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio cholerae*, *Yersinia pestis*, *Clostridium perfringens*, *Clostridium tetani*, Enterohaemorrhagic
- 5 *Escherichia coli* (serotype 0157 and other verotoxin producing serotypes), *Legionella pneumophila*, and *Yersinia pseudotuberculosis*. Human viral agents include but are not limited to Chikungunya virus, Congo-Crimean hemorrhagic fever virus, Dengue fever virus
- 10 Eastern equine encephalitis virus, Ebola virus, Hantaan virus, Junin virus, Lassa fever virus, Lymphocytic choriomeningitis virus, Machupo virus, Marburg virus, Monkey pox virus, Ri Valley fever virus, Tick-borne encephalitis virus, Variola virus, Venezuelan equine encephalitis virus, Western equine encephalitis virus, White pox, Yellow fever virus, Japanese encephalitis virus, Kyasanur Forest virus, Louping ill virus, Murray Valley encephalitis virus, Omsk hemorrhagic fever virus, Oropouche virus, Powassan virus, Rocio virus, and St. Louis encephalitis virus.
- 15 Animal bacteria and Rickettsiae agents include but are not limited to *Mycoplasma mycoides* and *Bacillus anthracis*. Animal viral agents include but are not limited to African swine fever virus, Avian influenza virus 2, Bluetongue virus, Foot and mouth disease virus, Goat pox virus, Herpes virus (Aujeszky's disease), Hog cholera virus (Swine fever virus), Lyssa virus, Newcastle disease virus, Peste des petits ruminants virus, Porcine enterovirus
- 20 type 9 (swine vesicular disease virus), Rinderpest virus, Sheep pox virus, Teschen disease virus, and Vesicular stomatitis virus.
- Plant bacteria and Rickettsiae agents including but not limited to *Xanthomonas albilineans*, *Xanthomonas campestris* pv. *Citri*, *Xanthomonas campestris* pv. *Oryzae*, and *Xylella fastidiosa*. Plant viral agents including but not limited to banana bunchy top virus.
- 25 Prions are correlated with diseases including but not limited to bovine spongiform encephalopathies, scrapie, and Creutzfeldt-Jakob disease.
- In a particular example, a sample can be prepared as follows. Optimized preparation procedure for the immunocytochemical detection of microorganisms can be applied to environmental (air and water) and human (blood and other body fluids) samples. A
- 30 BioSampler<sup>®</sup> from SKC, Inc. is used to collect an air sample. The BioSampler<sup>®</sup> is a vacuum driven all-glass impinger device that passes air, via nozzles, tangential to the surface of the

WO 02/062201

PCT/US02/02832

collection fluid rather than bubbling air through the fluid. This design minimizes particle bounce and reduces re-aerosolization. When operated at an air flow rate of 12.5 L/min with water or a liquid of similar viscosity as the collection fluid, the collection efficiency of the BioSampler is close to 100% for particles as little as 1  $\mu\text{m}$  in diameter, still approximately 5 90% at 0.5  $\mu\text{m}$ , and 80% at 0.3  $\mu\text{m}$ . As such, the BioSampler<sup>®</sup> is an excellent device for the collection of airborne bacteria, fungi, pollen, and viruses, since most bacteria are between 1 and 10  $\mu\text{m}$  in diameter and many viruses have a size in the lower end of this range (e.g. Ebola virus, 1000 x 80 nm).

Other air samplers can be used. For example, an alternative device is the Air-O-Cell 10 sampling cassette (SKC, Inc.). In this device, the airborne particles are accelerated and made to collide with a tacky slide which is directly suitable for various staining procedures and microscopic examination. However, this collection method is inefficient for particles smaller than 2 or 3  $\mu\text{m}$ .

The main parameters to be modified in environmental sampling are the time of 15 sampling and the collection fluid composition. Various fluids can be tested and compared in direct inoculation tests with known amounts of organisms, for their capacity to support adhesion to the slides.

The analysis of human body fluids are exemplified by the analysis of blood samples, as described in Example 1 below.

#### 20 Fluorescent Staining

An advantage of the present invention is that the invention can be implemented using a large library of well known and publically available fluorescent molecules. Sources include, for example, Molecular Probes (Eugene, OR), Jackson Immuno Research (West Grove, PA), Sigma (St. Louis, MO). These molecules are themselves capable of specifically 25 binding to a portion of a target body (e.g., fluorescent DNA dyes), or can be coupled to antibodies or nucleic acids that specifically bind to portions of a target body. See, for example, *Fluorescent and Luminescent Probes for Biological Activity*, Ed. WT Mason, Academic Press, London, 1993 and *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals* by RP Haugland, Ed. MTZ Spence, Molecular Probes, 1996. In general, when 30 antibodies are used in immunofluorescence, the fluorescent dye is chemically attached to a secondary antibody that binds to a primary antibody that is specific for an antigen on the

WO 02/062201

PCT/US02/02832

target body or attached directly to a primary antibody. Primary antibodies are available for a wide variety of antigens. For example, if the target body is a prion, a prion-specific antibody can be used to detect prions in a patient's cerebral spinal fluid to diagnose Creutzfeldt-Jakob disease. Primary antibodies suitable for use include anti-GD2 and anti-GD-3 antibodies (Matreya Inc., Pleasant Gap, PA), anti-HER-2neu antibodies (Dako, Carpinteria, CA), anti-KSA/EpCAM antibodies (Dako) and anti-cytokeratin antibodies (Sigma, St. Louis, MO). Secondary antibodies suitable for use include those available from Molecular Probes (Eugene, OR) and Jackson Immuno Research (West Grove, PA). Between antibody introduction steps in the slide preparation, PBS washes should be performed. If the antibody introduction, however, is a serum blocking reagent, that is, where the antibodies are introduced to block nonspecific binding sites in the sample, then a PBS wash is unnecessary or even undesirable.

The presence of so many different fluorophores, many of which have different peak excitation or emission wavelengths, enables multiplex detection of a large number (e.g., 24 or more) of target bodies within a specimen field. In this embodiment, each antibody can be specific for only one target body. In addition, multiplexing enables detection of nested groups of target bodies to provide greater detection accuracy (e.g., to minimize false positives). In the Example below, the DNA stain DAPI was used to identify target bodies that were nucleated cells, which can indicate total cell count in a sample and help confirm that a fluorescing marker is in fact associated with a cell, as opposed to a fragment or debris. Anti-cytokeratin antibodies were then used to identify candidate cancer cell targets within the target group of DAPI-positive cells. And finally, antibodies against surface cancer cell markers were used to identify and count the subgroup of true cancer cells that were DAPI-, cytokeratin, and cell surface antigen-positive. This nesting of fluorescence staining virtually eliminated false positive results. Other considerations are described below.

The first requirement for immunocytochemical assays is the generation of antibodies. When available commercially or otherwise, existing antibodies directed against surface or intracellular target antigens can be acquired. In other cases, the antibodies must be generated de novo. Irradiated (killed) samples of the organisms of interest can be obtained (e.g., pathogens from the CDC, USAMRIID, etc.) and provided to, e.g., A&G Pharmaceutical, Inc. (Baltimore, MD) for the production of monoclonal antibodies (mAbs) to exposed epitopes.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

This company has developed a method for mAb production that provides for rapid development of hybridomas (< 60 days) at a reasonable cost. If any of these organisms carry common surface epitope that would cause cross reaction, or if reliably "killed" organisms cannot be obtained, one or several antigens specific to the species can be obtained. In some situations, the target body to be detected is a class of targets and not an individual species within the class. Thus, an antibody that is class-specific rather than species-specific would be desirable. Antigens can be purified, expressed from their cloned genes, or mimicked by a chemically synthesized peptide. Antibodies can be directly conjugated with fluorescent molecules or used in combination with secondary fluorescently labeled antibodies. Directly labeled antibodies can be tested by FACS analysis for specificity against other phylogenetically related species.

The specificity of the detection of cancer cells in blood or bone marrow preparations is typically only as good as the marker and antibodies used in the procedure. The most widely used marker is cytokeratin, a cytoskeletal component of epithelial and carcinoma-derived cells. Although it has been validated as a valuable marker for breast, prostate, gastric, and colorectal cancer in a large number of clinical studies, cytokeratin is not a true tumor cell-specific marker and can stain epidermal cells, phagocytic cells that contain cytokeratin debris, or dye particles. In such cases, accurate microscopic confirmation of the malignant cytology of the immunostained cells is important. Another source of false-positive events is cross-reactive staining of the epithelial or cancer cell marker with blood or bone marrow cells, e.g. mucin-like epithelial membrane markers are able to cross-react with hematopoietic cells. Indeed, it was found that cytokeratin antibodies can label PBMC from healthy blood donors (Table 4 in Example 1). About 17% of the peripheral blood samples from normal blood donors exhibited cytokeratin positivity, albeit at a low level (mean was 1.18 CK+/10<sup>6</sup> cells). It is not clear whether these CK+ cells in "normal" samples represent benign epithelial cells, cross-reacting hematopoietic cells, or cancer cells disseminated from an undiagnosed primary carcinoma.

To improve the specificity of cancer cell detection, a double-labeling protocol was developed for the simultaneous detection of cytokeratin and epithelial surface markers, Ep-CAM and GD2. This procedure dramatically reduced false positives, with only one doubly labeled cell among the 77 samples tested (CK/Ep-CAM and CK/GD2; Table 5 in the

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Example), suggesting that the few CK+ cells detected in normal samples were not of cancer origin. In addition to the mere detection of cancer cells in blood or bone marrow samples, efforts have been made to further characterize the phenotype of rare tumor cells, e.g. with respect to their aggressiveness, cell cycle stage, or growth behavior (Allgayer et al., J. Histochem. Cytochem. 45:203-212, 1997; Allgayer et al., Cancer Res. 57:1394-1399, 1997; Pantel et al., J. Natl. Cancer Inst. 85:1419-1424, 1993; and Riesenber et al., Histochem. 99:61-66, 1993). Protocols for multiple marker analysis, combining cytokeratin labeling with growth factor receptors or proliferation-associated antigens to analyze breast cancer samples (Pantel et al., supra), or combining cytokeratin labeling with prostate specific antigen to analyze prostate carcinoma (Riesenber et al, supra) have been developed. Also, in gastric cancer patients, cells that were doubly positive for cytokeratin and the urokinase plasminogen activator receptor correlated with high metastatic potential (Allgayer et al., Cancer Res. 57:1394-1399, 1997). A variety of possible additional (cancer-specific) markers have been described, e.g. glycoproteins (Franklin et al., Breast Cancer Res. Treat 41:1-13, 1996), gangliosides (Moss et al., N. Engl. J. Med. 324:219-226, 1991), cell adhesion molecules (Ross et al., Exp. Hematol. 23:1478-1483, 1995; and Ross et al., Bone Marrow Transplant. 15:929-933, 1995), and other molecules (Vrendenburgh et al., J. Hematother. 5:57-62, 1996). The sensitivity, quality, and specificity of the cancer cell detection method may improve as new markers become available.

Primary antibodies are available for a wide variety of antigens. For example, if the target body is a prion, a prion-specific antibody can be used to detect prions in a patient's cerebral spinal fluid to diagnose Creutzfeldt-Jakob disease.

Fluorescently labeled nucleic acids can be used as target body-specific probes instead of antibodies. Indeed, there are several reasons why detection using nucleic acid probes in an in situ hybridization (ISH) may be desirable: (1) Nucleic acid (NA) probes are easier, quicker, and cheaper to generate than antibodies (Abs); (2) NA probes can be grown at will and inexpensively (monoclonal Abs too, but not polyclonal); (3) NA probes are expected to be more consistent than Abs (especially polyclonal; can even choose probes with matching  $T_m$  for multiple labeling (multiplex) experiments); (4) NA probe hybridization to its cognate RNA or DNA target can be better controlled than antibody interaction with its epitope (e.g., by hybridization temperature, ionic strength, etc.); (5) Multiple-label experiments are easier

WO 02/062201

PCT/US02/02832

to implement with NA probes (simply incorporate a nucleotide conjugated to different labels, or incorporate biotin and then various streptavidin-label complexes; in immunofluorescence (IF), labeling of primary Ab may interfere with its binding, and when a second Ab is used for detection, IF requires the use of primary Abs raised in different species); and (6) Signals  
5 obtained with NA probes are expected to be more quantitative than with Abs, especially when directly labeled, yet can also be amplified if needed (biotin, etc.).

Using all the sequence information available on targeted bodies (e.g., biological warfare organisms), specific oligonucleotide probes to each of them can be designed. There is much less risk of stumbling onto a sequence shared with other organisms than is the case  
10 with cross-reacting epitopes, because each of the designed probes can be directly compared with the entire content of the bacterial/viral nucleic acids databases and designed to be unique to a particular target. Fairly short probes (e.g. 20-mers) can be used to maximize cell wall/capsid penetration and access to intracellular nucleic acid targets. The target sequence unique to a target body can be chosen to be on an abundantly expressed RNAs to maximize  
15 sensitivity, e.g., sequences in the ribosomal RNAs. For viruses, probes can be designed that are selective for the most abundantly expressed genes.

For single labeling experiments, the digoxigenin detection system (Zarda et al., J. Gen. Microbiol. 137:2823-2830, 1991) can be used. This system is commercially available as a kit from Boehringer Mannheim. In most instances, however, multiple labeling may be  
20 required, which is not possible with this system. Rather, the oligonucleotides can be synthesized in the presence of nucleotides conjugated to a fluorescent dye (e.g., one from Genset Corp.). If signal enhancement is required or sought, the oligonucleotides can be marked with a tag (e.g. biotin) during synthesis. In this case, each tagged probe would be reacted separately with one of several different streptavidin-label complexes, where the label  
25 is one of, for example, 24 fluorophores. These pre-reacted oligo probes complexes should be small enough to diffuse freely through bacterial membranes. If such is not the case, however, the cells can be permeabilized with lysozyme/EDTA.

As mentioned above, a wide variety of fluorescent molecules are known and available. It is estimated that over 50,000 dyes are available from Eastman Kodak, Polaroid,  
30 Fuji Film, and Molecular Probes ([www.probes.com](http://www.probes.com)). Examples of molecules suitable for nucleated cell targets include DAPI, propidium iodide, acridine orange, and YOPRO.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Detection System Components

The various components required for the detection systems are commercially available. The detector can be any means (e.g., instrument, combination of mirrors and/or lenses suitable, photomultiplier, or other detecting means) for measuring, recording, imaging or detecting light, fluorescence or other energy transmission, including excitations, emissions, and the like. In general, the system includes a fluorescent microscope with a motorized stage (e.g., Nikon Microphot-FXA or Nikon Eclipse 1000, both from Nikon, Japan; stages from Ludl Electronic Products Ltd., Hawthorne, NY or Axioplan 2 IE MOT from Zeiss, Germany), fluorescence filters (either included or made to order from Omega Optical, Brattleboro, VT), a camera (e.g., CCD 72 camera from DAGE-MIT, Inc., Michigan City, IN; AxioCam from Zeiss, Germany; or SpectraVideo camera from Pixelvision (www.pixelvision.com)), and a computer having a printer, monitor, storage medium, display and software necessary for implementing the invention. Many of the listed components are available from vendors such as Nikon, Zeiss, Georgia Instruments (Roswell, GA), Vaytek (Fairfield, IA), Applied Imaging, Inc. (www.micrometastasis.org/metfs1.htm), and Chromavision Medical Systems, Inc. (www.chromavision.com).

Whatever components are used, the system should be capable of carrying out the following steps or variations and equivalents thereof:

- 1) counting the number of target bodies (e.g. cancer cells) per specimen field (e.g., glass microscope slide), subdivided into categories of bodies containing the second or third fluorophore, or both;
- 2) saving (e.g., recording, imaging, storing on a data storage medium) an image of each target body;
- 3) storing the x,y coordinates for each target body; and
- 4) counting the total number of bodies on the slide.

The analysis is performed by scanning the specimen field. Scans can be performed at all magnifications provided by the microscope hardware. The user can choose to scan the specimen field using any filter set (single, dual, or triple). Scans can be run independently.

The algorithm for the detection and identification of target bodies is based on commercially available software for biological image analysis (e.g. Image Pro Plus from

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Media Cybernetics, www.mediacy.com; or KS 400 from Kontron, Germany). The inclusion criteria for the detection of target bodies can be for example:

- a) fluorescence intensity threshold in the second and third fluorescent channels;
- b) area and shape in the second and third fluorescent channels to distinguish true target bodies (e.g. intact cells) from false target bodies (e.g. dirt, debris); and
- c) the signal(s) of the second and/or third fluorescent channels should always colocalize with the signal from the first fluorescent channel (e.g. DAPI signal).

Before each scan, the inclusion criteria for a target body are defined by the user. After the scan, a count for all target bodies that fulfill the inclusion criteria (see above) should be displayed and subdivided into target bodies that exhibit second, third, or both fluorescent labels. All target bodies that fulfill the inclusion criteria are imaged and stored as 3-color RGB-image (step 2 above). At the end of the scan, all images are displayed in form of a gallery of images with the option of zooming into each image. For all target bodies that fulfill the inclusion criteria (see above), the x,y-coordinates are stored and the user can recall each position and automatically move the stage to that position (step 3 above). This option allows the user to recheck every detected target body under high microscope magnification. It is also possible to recall the corresponding image that was taken at a specified position. During each scan, the total number of cells (based on the first fluorophore, e.g., DAPI signal) should be counted and displayed at the end of the scan (step 4 above).

#### 20 User Interphase with Detection System

*1. Setup of the scan.* At the beginning of the scan, the user is prompted to give the following information and to choose the parameters of the scan:

1. slide identification(s);
2. number of slides to be scanned;
- 25 3. magnification of the scan (choose objective); and
4. filter set(s) of the scan (choose between single, dual/triple filter, or alternate filters during the scan).

Based on the given information, an initial image is displayed and the camera is set up (adjust brightness and contrast). The user must define the inclusion criteria for the positive cells and choose:

1. intensity threshold;

WO 02/062201

PCT/US02/02832

2. lower and upper limit for the area; and
3. shape criteria.

2. *Scan.* After the initial setup, the scan starts automatically and analyzes the slide(s) according to the specifications.

5 3. *Data output and storage.* For each slide, the following information is displayed and saved:

1. number of target bodies;
2. image of each target body and corresponding coordinates on the stage; and
3. total number of target bodies on the slide.

10 The information 1-3 immediately above is stored in a folder named and defined by the user (identification of the slide).

4. *Manual confirmation of positive cells.* The user can manually select a stored image and recall the position where the image was taken. The stage automatically moves to that position and the field can be viewed through the eyepieces.

15 Speed is a fundamental parameter for evaluation of automated rare event analysis systems. The system described in Example 1 below takes about one hour to scan 1 million cells for positive events (e.g. CK positivity) and for the total cell count. Much faster systems may be employed, using a more sensitive charge-coupled device (CCD) camera and a faster computer. Such a system could bring down the processing time to a few minutes per million  
20 cells. This flow through rate is comparable to flow cytometry, yet retains the ability to observe each positive event at higher magnification or with different optics, for morphological confirmation if desired.

Without further elaboration, it is believed that one skilled in the art can, based on the above disclosure and the Examples below, utilize the present invention to its fullest extent.

25 The following examples are to be construed as merely illustrative of how one skilled in the art can practice the invention, and are not limitative of the remainder of the disclosure in any way. All references cited herein, whether in print, electronic, computer readable storage media or other form, are expressly incorporated by reference in their entirety, including but not limited to, abstracts, articles, journals, publications, texts, treatises, internet web sites,  
30 databases, patents, and patent publications.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Example 1: Rare Event Imaging System for Cancer CellsMaterials & Methods

5 *Collection of blood and bone marrow specimens.* Five to ten milliliters of blood or bone marrow were drawn from control subjects or patients with a diagnosis of breast or small cell lung cancer and deposited in Vacutainer tubes containing EDTA as anticoagulant (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NY). All samples were obtained with informed consent from the subject or patient and were processed for microscopic analysis within 24 hours of collection.

10 *Cell lines.* The breast carcinoma cell line MCF-7 and the small cell lung cancer cell line SW2 were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, and used to evaluate the staining protocol below and to determine the sensitivity of the Rare Event Imaging System. Cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (MCF-7) or RPMI 1640 (SW2) containing 10% fetal calf serum, 100 U/ml penicillin, and 0.1 mg/ml streptomycin.

15 *Sample preparation for microscopic analysis.* Blood or bone marrow samples were mixed with 2 volumes of 0.17 M ammonium chloride, incubated at room temperature (RT) for 40 minutes, and centrifuged at  $800 \times g$  for 10 minutes at RT. The cell pellet was then washed and resuspended in phosphate-buffered saline (PBS). The total number of living peripheral blood mononuclear cells (PBMC) or nucleated bone marrow cells was counted using Trypan blue dye exclusion. The cells were attached to adhesive slides (Paul Marienfeld  
20 GmbH & Co., KG, Bad Mergentheim, Germany) at 37°C for 40 minutes, and the slides were then blocked with cell culture medium at 37°C for 20 minutes. The total number of cells applied per slide was about  $1.5 \times 10^6$ . The total adhesive area, divided into three separate circles, was about 530 mm<sup>2</sup>.

25 For the single labeling of cytokeratin, cells were fixed in ice-cold methanol for 5 minutes, rinsed in PBS, and incubated with a rabbit anti-cytokeratin antiserum directed against class I and II cytokeratins (Biomedical Technologies, Stoughton, MA) at 37°C for 1 hour. Subsequently, slides were washed in PBS, incubated with rhodamine-conjugated anti-rabbit antibody (Jackson Immuno Research, West Grove, PA) at 37°C for 30 minutes, counterstained with 0.5 µg/ml 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Molecular Probes,  
30 Eugene, OR) in PBS at RT for 10 minutes, and mounted in glycerol-gelatin (Sigma, St.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Louis, MO). Processed slides were stored at RT and analyzed microscopically within a month.

For the double labeling of cytokeratin and the cell surface antigens Ep-CAM or GD2, the cells were fixed in 1% paraformaldehyde in PBS (pH 7.4) at RT for 5 minutes, washed in 5 PBS, and blocked with 20% human AB serum (Nabi Diagnostics, Boca Raton, FL) in PBS at 37°C for 20 minutes. Subsequently, primary antibodies directed against Ep-CAM (monoclonal mouse KS1/4 antibody) or GD2 (monoclonal mouse 1418 antibody) were applied at 37°C for 1 hour. (Both antibodies were kindly provided by Dr. Kim-Ming Lo, Lexigen Pharmaceuticals, Lexington, MA.) Antibodies directed against Ep-CAM are 10 available from several vendors, e.g., monoclonal mouse anti-human epithelial specific antigen is available from Biomed, Foster City, CA; monoclonal anti-human epithelial antigen (Ber-EP4) is available from Accurate Chemical & Scientific Corp., Westbury, NY; and monoclonal HEA-FITC antibody is available from Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany. Antibodies directed against GD2 are available from Matreya, Inc., Pleasant Gap, 15 PA. Cells were then washed, fixed in ice-cold methanol for 5 minutes, blocked with 20% human AB serum, and incubated with anti-cytokeratin antiserum at 37°C for 1 hour. Secondary antibodies (FITC-conjugated anti-mouse and rhodamine-conjugated anti-rabbit antibodies; Jackson Immuno Research) were mixed and applied at 37°C for 30 minutes. Nuclei were counterstained with 0.5 µg/ml DAPI in PBS. Doubly labeled cells were 20 mounted in Gel/Mount (Biomed, Foster City, CA). Slides were stored at 40°C and analyzed microscopically within a week.

*Tumor cell dilutions for determination of sensitivity.* To determine the sensitivity of the detection for cytokeratin-positive (CK+) cells, MCF-7 breast cancer cells were serially diluted in PBMC of a healthy blood donor. The dilutions tested were 1:10<sup>3</sup>, 1:10<sup>4</sup>, 1:10<sup>5</sup>, 1:2 25 x 10<sup>5</sup>, 1:5 x 10<sup>5</sup>, and 1:10<sup>6</sup>. Solutions were attached to adhesive slides and processed for cytokeratin labeling as described above. Up to 8 adhesive slides were prepared and scanned per dilution. Samples were analyzed for the number of tumor cells per slide and related to the total cell count.

*Automated microscopic detection of tumor cells and total cell count.* Slides were 30 automatically scanned using an imaging system, such as for example, a Rare Event Imaging System, developed by Georgia Instruments, Inc. (Roswell, GA). The system employs

WO 02/062201

PCT/US02/02832

proprietary image processing algorithms to detect rare fluorescent events and determine the total number of cells analyzed. It is comprised of an advanced computer-controlled microscope (Nikon Microphot-FXA, Nikon, Japan) with autofocus, motorized X, Y, and Z axis control, motorized filter selection, and electronic shuttering. Images were taken by an integrating, cooled CCD detector and processed in a 60 MHz Pentium imaging workstation.

5 In a first step, the slide was automatically scanned for the detection of positive events (e.g., CK+ cells) using the rhodamine filter set. The identification of positive events was based on fluorescence intensity and area. The (x,y) coordinates of each positive event were stored in computer memory, and the image was archived. In a second step, the slide was scanned for the total number of DAPI-labeled nuclei per slide, representing the total cell count. The total scanned area per slide was 448 mm<sup>2</sup> (84% of the adhesive area) to avoid edge effects. At the end of the two scans, the number of positive events and the total cell count were given, and a gallery of images containing all positive events was displayed. The user could review the images and recall any of the events for further examination, using the stored coordinates attached to each image. The field of interest could then be visualized using higher magnification and additional filter sets (e.g. fluorescein, or UV filter). Images of different fluorescent colors could be electronically overlaid for positive confirmation of the event and for phenotypic evaluation (multiple labeling). The total scanning time (two scans) for one slide was about 1 hour. The two scans could be run independently, offering the option of just screening for positive events and thus shortening the scanning time to 30 minutes per slide.

#### Results

*Evaluation of the cell deposition procedure.* One of the most critical steps during sample preparation is deposition of the cells onto slides. A qualitative microscopic comparison of cell preparations attached to poly-L-lysine/PBS-coated slides (0.1%; Sigma, St. Louis), SectionLock Slides (Polysciences, Inc., Warrington, PA), and adhesive slides (Paul Marienfeld GmbH & Co., KG) revealed that the most homogeneous cell monolayers (optimal cell density with minimal overlap) was obtained with the slides from Paul Marienfeld. The slides contain a charged surface for the attachment of living cells. To further validate our deposition technique for different types of samples, the total number of cells as determined by the Rare Event Imaging System was compared with the number of

WO 02/062201

PCT/US02/02832

- cells originally deposited onto the slides. With optimization, any adhesive surface (e.g., coated with a positively charged substance such as poly-L-lysine) can be used. Table 1 shows a high cell recovery (89%) for peripheral blood of healthy blood donors, but a somewhat higher cell loss in samples from cancer patients (64, 58, and 73% recovery for PB, BM and SC samples, respectively;  $p < 0.05$  for PB and BM vs Normal PB, by *t*-test).

Table 1

Sample type	Cell count/slide	Range (n)	Recovery
Normal PB	1,120,237 ± 93,372	733,833 - 1,470,633 (8)	89%
Cancer PB	811,400 ± 89,039*	223,393 - 1,473,777 (17)	64%
Cancer BM	731,945 ± 72,906*	157,110 - 1,459,414 (25)	58%
Cancer SC	915,983 ± 95,806	76,745 - 1,631,660 (23)	73%

- Peripheral blood (PB), bone marrow (BM), or peripheral blood stem cell (SC) samples from healthy subjects (Normal) or cancer patients were prepared as described in "Materials and Methods," and  $1.5 \times 10^6$  cells were applied to each adhesive microscope slide. Cells were counted (based on DAPI labeling) on the number of slides indicated for each group (n), and results are expressed as mean ± SEM. For the calculation of recovery, note that the area scanned on each slide is 84% of the total adhesive area (see "Materials & Methods"). Asterisks mean that  $p < 0.05$  vs Normal PB by *t*-test.
- 15 *Sensitivity of the detection method.* To explore the sensitivity of the Rare Event Imaging System, PBMC samples that had been spiked with breast cancer cells (MCF-7) were prepared and processed for cytokeratin labeling. The brightly stained epithelial MCF-7 cells could easily be distinguished from the mesenchymal background of the white blood cells. The sensitivity of detection of CK+ cells was tested with increasing tumor cell dilutions
- 20 (MCF-7/PBMC) as described in "Materials & Methods." Cancer cells in expected quantities could be detected up to the most diluted samples tested, 1 MCF-7 cell per  $10^6$  PBMC (Table 2; expected and observed curves not statistically different,  $\chi^2$  test).

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Table 2

Cells added per 10 <sup>6</sup> PBMC	Total number of cells detected	Total cell count	Cells detected per 10 <sup>6</sup> PBMC
1000	1789	1.94 x 10 <sup>6</sup>	922
100	169	1.79 x 10 <sup>6</sup>	95
10	27	2.35 x 10 <sup>6</sup>	12
5	38	5.16 x 10 <sup>6</sup>	7
2	11	3.94 x 10 <sup>6</sup>	3
1	13	6.13 x 10 <sup>6</sup>	2

*Double-labeling of tumor cells.* In order to increase the specificity of rare event detection and to further characterize the cancer cells identified, a staining protocol that allows the detection of intracellular cytokeratin and a cancer cell surface marker simultaneously was developed. The double-labeling procedure consists of two sequential steps: first fixing the cell surface and labeling for Ep-CAM or GD2, and second permeabilizing the cells and staining for intracellular cytokeratin. The double-labeling protocol was optimized in the cancer cell lines MCF-7 (breast cancer) and SW2 (small cell lung cancer). Fluorescence microscopy indicated that SW2 cells were efficiently labeled with anti-GD2 antibody and anti-cytokeratin antiserum. The sequential fixation preserved the antigenic sites of both proteins with regard to their cellular localization, as demonstrated in the optical sections taken with a confocal laser scanning microscope. The stained cells clearly showed cytokeratin in the cytoplasm (red) and GD2 at the cell surface (green). The expression levels of both proteins was quite heterogeneous within the cell population. A similar result was obtained when MCF-7 cells were doubly labeled with the anti-Ep-CAM antibody and the anti-cytokeratin antiserum. Control experiments in which one of the primary antibodies was omitted but both secondary antibodies were applied revealed no cross-reactivity between the two detection systems.

To further validate the staining protocol, PBMC that had been spiked with MCF-7 or SW-2 cells were labeled. The goal was to obtain a bright fluorescent signal of the cancer cells and a low background signal from the surrounding PBMC. The two most important factors for achieving this goal were found to be the sequential application of the primary antibodies and two blocking steps (20% human AB serum in PBS) prior to the incubation with the primary antibodies. Fluorescence microscopy indicated that the doubly labeled MCF-7 cells could clearly be distinguished from the surrounding PBMC. At higher magnification, the intracellular cytokeratin labeling and the surface staining of Ep-CAM was

WO 02/062201

PCT/US02/02832

confirmed. Similar results were obtained with PBMC spiked with SW-2 cells and doubly labeled for GD2 and cytokeratin.

The double-labeling protocol was also applied to peripheral blood and bone marrow samples from cancer patients. In an example of a GD2/cytokeratin-positive cell from  
5 peripheral blood of a patient with small cell lung cancer, fluorescence microscopy showed an Ep-CAM/cytokeratin-positive cell from bone marrow of a breast cancer patient. In this example, the cancer cell was not only bigger than the surrounding bone marrow cells but it also exhibits the distinct localization of the individual stains: cytokeratin (red) in the cytoplasm and Ep-CAM (green) concentrated towards the cell periphery at the cell  
10 membrane.

*Detection of cytokeratin-positive and doubly positive cells in normal blood samples.*

To evaluate the specificity of the single- and double-staining protocols, blood samples from healthy donors were analyzed. The number of "positive" cells was compared among  
15 methods using the single cytokeratin or double cytokeratin/Ep-CAM or cytokeratin/GD2 labeling methods. Fluorescence microscopy indicated that 16-18% of the PB samples scored positive for cytokeratin using any of the protocols, with the number of CK+ cells ranging from 1 to 26 labeled cells per  $10^6$  white blood cells. In contrast, when the samples were processed with the double-labeling protocol, positivity was almost completely eliminated from samples of healthy subjects (a single doubly positive cell was observed in a total of 77  
20 PB samples).

*Evaluation of spatial and temporal variations in sample collection.* To assess a possible heterogeneity in the distribution of CK+ cells in different areas of the bone marrow, paired BM samples from the right and the left iliac crests of the same patient were obtained and analyzed. Out of 24 pairs, 21 showed concordant results (Fisher exact test) with regard  
25 to cytokeratin positivity (Table 3A). The occurrence of CK+ cells in peripheral blood samples temporal fluctuations was also tested. Two SC samples from each of 96 patient were taken at consecutive days but without therapeutic intervention. Paired samples showed a statistically significant concordance with regard to cytokeratin positivity (Table 3B).

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Table 3A

		BM 2	
		+	-
BM 1	+	11	1
	-	2	10

Table 3B

		SC 2	
		+	-
SC 1	+	19	9
	-	8	60

- 5 *Detection of cytokeratin-positive cells in cancer patient blood and bone marrow samples.* To demonstrate the power of the Rare Event Imaging System, 355 peripheral blood, bone marrow, and stem cell samples were analyzed. These samples were obtained from breast cancer patients before autologous bone marrow transplantation but after high-dose chemotherapy. The samples were screened using the single cytokeratin labeling method. In
- 10 an example of two CK+ cells from peripheral blood of a breast cancer patient, the positive cells showed clear cytoplasmic labeling whereas the surrounding blood cells were not stained. CK+ cells were found in 52% of the bone marrow, 34% of the peripheral blood, and 27% of the stem cell samples (Table 4).

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Table 4

	Total samples	CK+ samples (All)		CK+ samples ( $\geq 9$ CK+/10 <sup>6</sup> PBMC)	
		Count	%	Count	%
BM samples	63	33	52	25	40
stages II/III	20	7	35	5	25
stage IV	43	26	60	20	46
PB samples	59	20	34	14	24
stages II/III	13	2	15	2	15
stage IV	46	18	39	12	26
SC samples	233	64	27	29	12
stages II/III	49	11	22	4	8
stage IV	184	53	29	25	14

For Table 4, bone marrow (BM), peripheral blood (PB), and peripheral blood stem cell (SC) samples from a total of 156 patients were analyzed for cytokeratin-positive cells and total cell count. Note that there were multiple samples from some patients whereas for others, only one kind of sample could be analyzed. "CK+ samples (All)" refers to the number of samples with at least 1 CK+ cell. CK+ samples ( $\geq 9$  CK+/10<sup>6</sup> PBMC) refers to number of samples with 9 or more CK+ cells per 10<sup>6</sup> PBMC (mean + 2 SD of CK+ cells in Normal PB; Table 5). The highest numbers of CK+ cells per sample were 504/10<sup>6</sup> for BM, 371/10<sup>6</sup> for PB, and 1020/10<sup>6</sup> for SC.

Table 5

Marker(s)	Total samples	Positive samples	CK+ labeled		Doubly labeled	
			CK+ /10 <sup>6</sup> (all samples)	CK+ /10 <sup>6</sup> (CK+ samples)	Positive samples	DBL+ /10 <sup>6</sup> (DBL+ sample)
CK	57	10 (17%)	1.18 $\pm$ 0.53	7.28 $\pm$ 2.59	---	---
CK/Ep-CAM	43	7 (16%)	0.46 $\pm$ 0.21	2.85 $\pm$ 0.81	1 (2.3%)	1.4
CK/GD2	34	6 (18%)	0.78 $\pm$ 0.44	4.41 $\pm$ 1.98	0 (0.0%)	0

For Table 5, blood samples from healthy blood donors were labeled for cytokeratin alone, or doubly labeled for CK/Ep-CAM or CK/GD2 (see "Material and Methods"). Positive samples were those containing CK+ cells (in single-labeling) or doubly labeled cells (in double-labeling). Numbers of positive cells in each category are expressed per 10<sup>6</sup> cells analyzed.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

and are given as mean  $\pm$  SEM (except for the single positive cell in one sample containing  $7.14 \times 10^5$  cells, in the CK/Ep-CAM group). DBL+ means doubly labeled

As seen in Table 4, the frequency of CK+ cells in the positive samples varied from  $1/10^6$  to  $1020/10^6$ . However, many PB samples from normal subjects displayed a small  
5 number of CK+ cells, and these were found to be false positive cells, based on the double-labeling experiments (Table 5). Therefore, to declare definite positivity in PB samples from cancer patients, a cut-off point was set at the mean number of CK+ cells plus 2 times the standard deviation as observed in the control samples, i.e.,  $9/10^6$ . Applying this threshold, a higher degree of cytokeratin positivity in bone marrow (40%) compared to peripheral blood  
10 (24%) or stem cell preparations (12%) was still found (Table 4). Furthermore, patients with stage IV disease were found to be cytokeratin-positive in a significantly higher percentage than patients with stages II/III disease, in all types of samples analyzed (Table 4).

In summary, an automated analysis system for the detection of cells of interest that occur at low frequencies (rare events) was developed using dual- or multiple-marker  
15 analysis. The preparation procedure for the microscopic analysis of blood or bone marrow samples was optimized for automation and included lysis of red blood cells, deposition of mononuclear cells onto adhesive sides, and immunofluorescent labeling of the sample. Slides were then examined at low magnification under a fluorescence microscope fitted with a motorized stage, and all the fluorescent events are imaged and catalogued in a computer  
20 database for later retrieval. For automated image analysis it is crucial to work with secondary antibodies that give a bright signal while maintaining a low background. We have recently tested dyes of the Alexa-series (Molecular Probes) that give very bright and stable fluorescence signals. Fluorescently labeled slides should be analyzed within one week. If longer storage is desired, a mounting medium that maintains stable fluorescent signals should  
25 be used. We found that the use of the ProLong Antifade Kit (Molecular Probes) gave excellent results after 3 month storage of the slides at  $40^\circ\text{C}$ .

#### Example 2: Optimization of Rare Event Imaging System

Adaptation and optimization of basic procedures for sample preparation, cell attachment, and staining

30 The slides used (Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Bad Mergentheim, Germany) contain 3 adhesive circles of  $150 \text{ mm}^2$  each, onto which the cells are seeded. The adhesion

WO 02/062201

PCT/US02/02832

procedure developed for human cells is adapted to the processing of microorganisms. Selected parameters tested include the time of contact with the adhesive slide, the temperature, the pH, the composition of the buffer and its ionic strength. Separate tests are performed with a bacteria (e.g., *E. coli*, *B. subtilis*, *V. cholerae*) and viruses (e.g. reovirions) 5 to verify for possible variability in their characteristics of adhesion to the slides. Detection is performed using DAPI or acridine orange (which labels RNA for RNA viruses). Since an even cell monolayer is essential for automation, testing with other cell deposition systems (e.g. cytospin using a Shandon Cytocentrifuge; Cytotek Monoprep from Sakura, Torrance, CA; and ThinPrep from Cysyc, Boxborough, MA) is used for comparison purposes.

10 Develop computer software for REIS automation

We have automated the whole sequence of steps for our original analyzer (Kraeft et al., Clin. Cancer Res. 6:434-442, 2000). As necessary, an appropriate camera driver is obtained for the particular system to be implemented. The writing of such drivers is well within routine skill in the art of computer programming. The REIS employs image 15 processing algorithms to detect rare fluorescence events. Images are taken by the detector and processed in a PC-based imaging workstation. The software performs the detection of fluorescent signals (antigen-positive organisms) as well as total cell count (e.g., based on DAPI/acridine orange staining), automated signal positioning, image archiving, and image processing. Initially, this is done with one or two fluorophores (e.g. AlexaFluor488 and 20 AlexaFluor568). The multiplex detection system can be expanded to accommodate multiple dyes (e.g., up to 24 dyes), and the software superimposes each fluorescent signal observed with each dye, with the corresponding image obtained with, e.g., DAPI/acridine orange stain.

Improvement to the multiple labeling system

The methods herein are useful not only to monitor the presence of bacteria and 25 viruses in air or water samples, but also to detect *and identify* pathogens, in particular those identified as BW agents. These are numerous, and although it would be possible to generate as many slides as there are agents to be tested for, this would be impractical. Rather, one aspect involves development of a multiplex system whereby various fluorophores are be used, whose excitation/emission spectra can be differentiated.

30 As discussed above, an estimated 50,000 fluorescent dyes are available. Thus it is possible to screen this collection for a set of at least 24 dyes that give the brightest

WO 02/062201

PCT/US02/02832

fluorescent signals (for maximum sensitivity) whose excitation and emission spectra can be differentiated, and that can be conveniently conjugated to antibodies, via an isothiocyanate bridge. A set of dyes with similar fluorescence intensity would also be favorable.

5 A set of filters to match and discriminate at least the emission peaks of the dyes chosen, plus DAPI and acridine orange, are selected for use in the methods. The excitation wavelength is controlled either by a separate set of filters or by using a narrow-band prism for the incident light. The wheels carrying the fluorescence filters are modified to accommodate all the excitation and emission filter combinations required for the discrimination of the distinct fluorophores.

10 Example 3: Development of Methods for Pathogen Detection by Immunocytochemistry

*Generation of fluorescently labeled antibodies.* The first requirement for immunocytochemical assays is the generation of good antibodies. When available commercially or otherwise, existing antibodies directed against surface antigens of BW agents are selected for use. In other cases, irradiated (killed) samples of the organisms of interest (from the CDC, USAMRIID, etc.) are selected for use and the production of monoclonal antibodies (mAbs) to exposed epitopes is performed; If any of these organisms carry common surface epitope that would cause cross reaction, or if reliably "killed" organisms cannot be obtained, one or several antigens specific to the species can be selected, and either purified, expressed from their cloned genes, or mimicked by a chemically synthesized peptide, and used as immunogens. All antibodies are either directly conjugated with fluorescent molecules or used in combination with secondary fluorescently labeled antibodies. Testing of directly labeled antibodies is performed by FACS analysis for specificity against other phylogenetically related species, especially those described herein.

20 Antibodies for a variety of bacteria, rickettsiae, viruses and fungi listed above or to other suitable model microorganisms can be used to develop a pathogen detection rare event imaging system (REIS). Each of six different antibodies is conjugated with 4 different dyes, for a total of 24 distinguishable fluorescently labeled antibodies. Ultimately, a multiplex detection system with 24 distinguishable fluorophores (conjugated to a set of 24 specific antibodies), would allow one to monitor and positively identify all the known or suspected BW agents directed to humans on only 2 slides (i.e. 2 sets of 24 antibodies), and nearly all the BW agents listed herein on only 3 slides.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

*Immunocytochemical detection of pathogens immobilized onto slides.* Samples of attenuated strains or irradiated (killed) organisms for the 6 species to which antibodies are raised, (if pathogenic, from the CDC, USAMRIID, etc.), are applied in known numbers directly onto adhesive glass slides for analysis using the REIS.

5 In a first set of experiments, known numbers of organisms from each species individually, are examined to estimate the level of sensitivity of their cognate labeled antibodies, using the REIS; each should be able to detect single, individual organisms, and the enumeration should be quantitative. DAPI is used to stain DNA as before, or acridine orange for RNA viruses. All parameters of the procedure (temperature, buffer composition,  
10 antibody concentration, etc.) are optimized for each organism/antibody set, with a special attention to the minimization of the time of incubation. Initial conditions are essentially as described in Example 1.

In a second set of experiments, every pair of the organisms of interest, seeded on the slides in proportions of 10%-90% and 90%-10%, are examined to ascertain the absence of  
15 cross reactivity in the context of REIS analysis.

A third set of experiments test the multiplex set-up; using a mixture of 6 organisms (bacteria/rickettsiae, viruses, and mixture of the two), in the proportions of 5, 10, 15, 19, 23 and 28%, allowing for a verification of the detection efficiency using multiplex. Then, 24-  
20 strong multiplex experiments are performed using the 4 preparations of each of the 6 antibodies, with the organisms seeded in the same proportions as above.

Throughout these experiments, data is collected on detection efficiency. This can be performed on 75 organisms described herein (or any other BW agent). Such information is useful to determine sets of organisms that can be analyzed together efficiently, a point that may be especially important if, for example, the requirements for adhesion onto slides (see  
25 Example 2) or for the incubation with the antibodies varies between species.

*Immunocytochemical detection of pathogens in environmental samples or human body fluids.* As discussed above, optimized preparation procedures for the immunocytochemical detection of microorganisms are applied to environmental (air and water) and human (blood and other body fluids) samples. Whereas waterborne pathogens  
30 can be processed directly from the source, airborne bacteria and viruses require a special sampling procedure to immobilize them onto the slides. Several suitable air sampling

WO 02/062201

PCT/US02/02832

devices exist on the market, including the BioSampler<sup>®</sup> from SKC. This is a vacuum-drive all-glass impinger device that uses air nozzles tangential to the surface of the collection fluid rather than bubbling air in the fluid, minimizing particle bounce and reducing re-aerosolization. When operated at an air flow rate of 12.5 L/min with water or a liquid of similar viscosity as the collection fluid, the collection efficiency of the BioSampler<sup>®</sup> is close to 100% for particles as little as 1  $\mu\text{m}$  in diameter, and still approximately 90% at 0.5  $\mu\text{m}$  and 80% at 0.3  $\mu\text{m}$ . As such, the BioSampler<sup>®</sup> is an excellent device for the collection of airborne bacteria, fungi, pollen, and viruses: most bacteria are between 1 and 10  $\mu\text{m}$  in diameter, and many viruses have a size in the lower end of this range (e.g. Ebola virus, 100 x 80 nm). Other air samplers are also suitable. For example, an alternative from SKC which may be convenient for certain sample types is the Air-O-Cell sampling cassette, in which airborne particles are accelerated and made to collide with a tacky slide which is directly suitable for various staining procedures and microscopic examination. However, this collection method is inefficient for particles smaller than 2 or 3  $\mu\text{m}$ .

The main parameters to be modified in environmental sampling are the time of sampling, and the collection fluid composition. Various fluids can be tested and compared direct inoculation tests with known amounts of organisms, for their capacity to support adhesion to the slides.

The analysis of human body fluids is exemplified by the analysis of blood samples. First, normal blood from donors is spiked with a known amount of pathogen (bacteria and viruses). We will analyze the recovery of the microorganism, establish a detection threshold and compare manual with automated analysis. Second positive blood cultures from microbiological laboratories (for example, the Dana-Farber Cancer Institute) are obtained and utilized in the detection method for bacteria described herein and compared with the clinical result (based on bacterial culture). Additionally, negative blood samples from patients can serve as controls.

*Development of methods for pathogen detection by in situ hybridization.* Even though immunofluorescence (IF) is currently the method of choice for Rare Event analysis, there are several reasons why detection using nucleic acid probes and an *in situ* hybridization (ISH) approach may be preferable. These are summarized in Table 7. Thus, such approaches offer useful alternatives to the use of antibodies in IF.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

Table 7: Possible advantages of ISH over IF procedures

1. Nucleic acid (NA) probes are a lot easier, quicker, and cheaper to generate than antibodies (Abs).
2. NA probes can be grown at will and inexpensively (monoclonal Abs too, but not polyclonal).
3. NA probes are expected to be more consistent than Abs (especially polyclonal; can even choose probes with matching  $T_m$ , for multiple labeling (multiplex) experiments).
4. NA probe hybridization to its cognate RNA target can be better controlled than antibody interaction with its epitope (hybridization temperature, ionic strength, etc.).
5. Multiple-label experiments are much simpler with NA probes (simply incorporate a nucleotide conjugated to different labels, or biotin and then various streptavidin-label complexes; in IF, labeling of primary Ab may interfere with its binding, and when a 2<sup>nd</sup> Ab is used for detection, IF requires the use of primary Abs raised in different species).
6. Signals obtained with NA probes are expected to be more quantitative than with Abs, especially when directly labeled, yet can also be amplified if needed (biotin, etc.).

*Generation of nucleic acid probes.* Using all the sequence information available on targeted organisms, we can design specific oligonucleotide probes to each of them. There is  
 5 much less risk of stumbling onto a sequence shared with other organisms than was the case with cross-reacting epitopes (see Example 2) because each of the designed probes can be directly compared with the entire content of the bacterial/viral nucleic acids databases. Use of fairly short probes (e.g. 20-mers) can maximize cell wall/capsid penetration and access to intracellular nucleic acid targets, and abundantly expressed RNAs can be used to maximize  
 10 sensitivity. In this instance, selection of sequences in the ribosomal RNAs to the cellular organisms of interest that are specific to each species is useful. For viruses, probes are designed to the most abundantly expressed gene.

For single labeling experiments, we can use the digoxigenin detection system, which is commercially available as a kit (Boehringer Mannheim). In most instances, however,  
 15 multiple labeling may be required, which is not possible in this system. Rather, the oligonucleotides will be synthesized in the presence of nucleotides conjugated to the fluorescent dye (Genset Corp.). If signal enhancement is required or sought, we may mark the oligonucleotides with a tag (e.g. biotin) during synthesis. In this case, each tagged probe would be reacted separately with one of several different streptavidin-label complexes, where  
 20 the label is one of the 24 fluorophores from above. These pre-reacted oligo probes complexes should still be small enough to diffuse freely through bacterial membranes. If such is not the case, one can permeabilize the cells with lysozyme/EDTA.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

*Detection of pathogens immobilized onto slides by in situ hybridization.* These experiments will parallel those described in Example 2 above. The "first set of experiments" requires only single labels and is performed with the digoxigenin system. For all others, fluorescently labeled oligonucleotides or the biotinylated oligo + streptavidin-label complex detection method described above are used. Again, data collection on detection efficiency throughout these experiments can be evaluated to determine the optimal sets of BW agents (up to 24) that can be monitored together, as a multiplex assay on a single slide.

*Detection of pathogens in environmental samples and human body fluids by in situ hybridization.* These experiments parallel those described in Example 2. Environmental and human samples are analyzed in parallel, using immunocytochemistry and in situ hybridization.

#### Example 4: Single Label Protocol

All antibodies are diluted in PBS containing 20% human AB serum.

- 15 1. Lyse blood: 11ml isotonic  $\text{NH}_4\text{Cl}$  for 3ml blood in a 15ml conical tube. Leave at room temperature for 40 minutes.
2. Centrifuge at 1500rpm for 5 minutes.
3. Remove supernatant of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  and erythrocytes, leaving a pellet of white blood cells. Resuspend in the pellet in 10ml PBS.
- 20 4. Centrifuge at 1500rpm for 5 minutes.
5. Remove supernatant; resuspend pellet in 1, 0.5, or 0.25ml, depending on the size of the pellet.
6. Make a dilution of cells, trypan blue and PBS for cell counting on the haemocytometer. 1:100 DILUTION: 10 $\mu\text{l}$  trypan blue, 10 $\mu\text{l}$  cells, 980 $\mu\text{l}$  PBS
- 25 7. Calculate and adjust to have  $5 \times 10^5$  cells in 100 $\mu\text{l}$  per circle (on adhesion slide)
8. Plate cells on adhesive slides; allow 40 minutes for cell attachment at 37°C.
9. Add 60 $\mu\text{l}$  of 50:50 media per circle to the slides; incubate at 37°C for 20 minutes.
10. Put slides into 2% paraformaldehyde for 20 minutes, room temperature.
11. Rinse slides 2X 3 minutes.
- 30 12. Put slides in -20°C methanol for 5 minutes.
13. Rinse in PBS 2X 3 minutes.
14. Add 60 $\mu\text{l}$  of 20% human AB serum to each circle for 20 minutes at 37°C. DO NOT RINSE! Tap off.
15. Add 60 $\mu\text{l}$  of primary antibody (e.g. anti-cytokeratin) to each circle. Incubate at 37°C for 1 hour.
- 35 16. Rinse in PBS 2X 3 minutes.
17. Add 60 $\mu\text{l}$  of secondary antibody (e.g. anti-rabbit rhodamine). Incubate for 30 minutes, 37°C.
18. Rinse in PBS 2X 3 minutes.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

19. Add 60µl of DAPI to each circle. Incubate at room temperature for 10 minutes.
20. Rinse in PBS 1X.
21. Place in dH<sub>2</sub>O.
22. Mount with Glycerol gelatin. Put 35µl on each circle. Put on coverslip.
- 5 23. Slides may be stored at room temperature, covered with foil.

Example 5: Double Label Protocol

All antibodies are diluted in PBS containing 20% human AB serum.

- 10 1. Lyse blood: 11ml isotonic NH<sub>4</sub>Cl for 3ml blood in a 15ml conical tube. Leave at room temperature for 40 minutes.
2. Centrifuge at 1500rpm for 5 minutes.
3. Remove supernatant of NH<sub>4</sub>Cl and erythrocytes, leaving a pellet of white blood cells. Resuspend in the pellet in 10ml PBS.
4. Centrifuge at 1500rpm for 5 minutes.
- 15 5. Remove supernatant; resuspend pellet in 1, 0.5, or 0.25mL, depending on the size of the pellet.
6. Make a dilution of cells, trypan blue and PBS for cell counting on the haemocytometer. 1:100 DILUTION: 10µl trypan blue, 10µl cells, 980µl PBS
7. Calculate and adjust to have 5x10<sup>5</sup> cells in 100µl per circle (on adhesion slide)
- 20 8. Plate cells on adhesive slides; allow 40 minutes for cell attachment at 37°C.
9. Add 60µl of 50:50 media per circle to the slides; incubate at 37°C for 20 minutes.
10. Place slides in 2% paraformaldehyde in PBS at room temperature for 20 minutes.
11. Rinse in PBS 2 X 3 minutes.
12. Add 60µl of 20% human AB serum to each circle; leave on for 20 minutes, 37°C. Tap off. **DO NOT RINSE!**
- 25 13. Add 60µl of primary antibody (e.g. anti-GD2, anti-GD3, anti-Her-2neu or anti-KSA/EpCAM) to each circle. Incubate at 37°C for 1 hour.
14. Rinse in PBS 2X 3 minutes.
15. Add 60µl of secondary antibody (e.g. anti-mouse Alexa Fluor488). Incubate for 30 minutes, 37°C.
- 30 16. Rinse in PBS 2X 3 minutes.
17. Put slides in -20°C methanol for 5 minutes.
18. Rinse in PBS 2X 3 minutes.
19. Add 60µL of 20% human AB serum to each circle; leave on for 20 minutes, 37°C. Tap off. **DO NOT RINSE!**
- 35 20. Add 60µl of primary antibody (anti-cytokeratin) to each circle. Incubate at 37°C for 1 hour.
21. Rinse in PBS 2X 3 minutes.
22. Add 60µl of secondary antibody (e.g. anti-rabbit rhodamine). Incubate for 30 minutes, 37°C.
- 40 23. Rinse in PBS 2X 3 minutes.
24. Add 60µl of DAPI to each circle. Incubate at room temperature for 10 minutes.
25. Rinse in PBS 1X.
26. Rinse in dH<sub>2</sub>O. Let slides dry.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

27. Mount slides with Pro-Long Anti-fade mounting media (Molecular Probes), coverslip and seal with clear nail polish (optional).  
 28. Store at 4°C, covered with aluminum foil.

5 Example 6: Bacterial Sample Preparation

1. Grow bacteria to semi-log phase (OD @600nm = 0.5)
  2. Spin 0.5ml Bacteria Suspension ( 5min @ 5K rpm)
  3. Resuspend Bacteria in 1ml of 10% PBS.
  4. Add 50ul of resuspended bacteria to well on slide ( if use Clear-Cell or Ad-Cell slides do not require gelatin coating otherwise pretreat slides with gelatin to improve binding of bacteria to slide).
  5. Dry bacterial suspension 37 Celsius for 30min.
  6. Rinse in PBS RT then place in 4% Paraformaldehyde soln for 25-30min.
  7. Rinse in PBS RT then drop 100ul of Triton/well leave for 5min
  - 15 8. Rinse in PBS RT.
  9. Add PreHyb soln 30min @ 46 Celsius ( Prehyb soln; 50ng/ul BET42a in Hyb soln, Hyb soln see below)
  10. \*Hyb for 120min @46 Celsius. Hyb soln with Fluorophore conc 5ng/ul and BET42a conc 50ng/ul
  - 20 11. \*Wash for 30 min @ 48 Celsius. Wash soln must be preheated to 48 Celsius. Run some Wash soln over slides before soaking in Wash soln for 30 min.
  12. \*Rinse slides RT PBS
  13. \*Apply DAPI RT for 5 min.
  14. \*Rinse DAPI off with RT PBS, AIR dry then Gel mount, cover slip and nail varnish
  - 25 the edges.
- \* steps from 10 on should be carried in DARK as fluorophore will photobleach.

Hyb Soln

- 30 40% Formaldehyde soln  
 5M NaCl 720ul  
 1M Tris-HCl (pH7) 80ul  
 10% SDS 4ul  
 ddH2O 1600ul  
 Formaldehyde 1600ul  
 35 Add Fluorophore to get conc 5ng/ul

WO 02/062201

PCT/US02/02832

	<u>Wash Soln</u>	
	5M NaCl	2.25ml
	0.1% SDS	0.1ml
5	1M Tris-HCl (pH7.6)	2.0ml
	ddH <sub>2</sub> O	95.65ml

10 FITC, Alexa Fluor 488, Cy 5, Cy3, and Bet42a-blocking labeled oligonucleotides were examined. Experiments were performed to establish the specificity of the probes and signal intensity of the label. All of the above listed probe sequences reacted specifically with their targets but not with the other bacteria.

15 Example 7: Patient Sampling

A male white patient diagnosed as having a malignant carcinoid tumor of the midgut had undergone treatment (don't know). Upon completing the standard treatment regimen, the patient was diagnosed as "cancer-free" based upon results of standard laboratory tests. The patient's blood was then subjected to the method essentially as described herein wherein  
20 the sample indicated a white blood cell count of  $42 \times 10^6$ . A sample of  $15 \times 10^6$  of these white blood cells were plated and stained using anti-GD2 (14/18) and Alexa Fluor 488 antibodies as primary and secondary antibodies, respectively, followed by anti-cytokeratin and anti-rabbit rhodamine as primary and secondary antibodies, respectively, in the double label protocol as exemplified in Example 5. The patient's sample showed three positive cells  
25 detected by the cytokeratin antibodies. This result indicates that the patient was, in fact, not cancer-free. This detection resulted in the patient undergoing a further treatment regimen to attempt to more fully eradicate the cancerous cells in a timeframe such that the prognosis for an improved outcome is greater.

30

Other Embodiments

It is to be understood that while the invention has been described in conjunction with the detailed description thereof, the foregoing description is intended to illustrate and not

WO 02/062201

PCT/US02/02832

limit the scope of the invention, which is defined by the appended claims. Other aspects, advantages, and modifications are within the scope of this invention.

For example, although the procedures described in Example 1 are impressive, improvements of this "first generation" rare event imaging system can be made. The limiting factor in some known cell processing rates is mechanical, as several million cells must be scanned at fairly high magnification (usually 10-20x). Indeed, system speed is a problem: at a processing rate of 1000 cells per minute, it would take about 3.5 days of non-stop data acquisition to scan  $5 \times 10^6$  cells. While the cell density on the slides might be increased somewhat, the size and sensitivity of the camera currently in use limit the magnification to 10x or 5x at best, which is insufficient and in all practicality precludes such slow systems from use in the detection of rare events when time is a factor. While considerably more rapid (up to  $10^7$  cells in about 4 hours), "first generation" systems also need improvement for true usefulness in a clinical (or environmental monitoring) setting.

To address this shortcoming, a "second generation" REIS system can be employed, with a goal to shorten the microscope analyzing time from 4 hours to less than 10 minutes. Based on the technologies available in the rapidly growing electronic imaging and software industries, this goal is reasonable. The key is to use a very large field, extremely sensitive camera, which would allow the capture of large microscope fields without scanning the slide. The idea of using a high-gain digital camera to shorten the processing time of a "first generation" system came from the success of Hubble telescope. Far away stars can be captured by advanced digital (as opposed to analog) electronic cameras down to a single pixel. The size of the grade 1, high quantum efficiency, back-illuminated charge-coupled device ("CCD") chip in some state-of-the-art cameras is 24.5 x 24.5 mm, with a pixel array of 1024 x 1024. New CCD chips with a 1600 x 1600 pixel array are also available, which will allow one to survey even larger microscopic fields. Utilizing such technology, it is envisioned that the image of an entire slide could comprise a chip, and ultimately a cell imaged as a single pixel in a large specimen field (e.g.,  $1 \times 10^9$  cells).

30

WO 02/062201

PCT/US02/02832

**Claims**

What is claimed is:

1. A method of detecting the presence or absence of a target body in a specimen, the method comprising
  - 5 obtaining a specimen field exposed to or labeled with at least a first fluorophore and a second fluorophore, the first fluorophore emitting photons at a first wavelength and the second fluorophore emitting photons at a second wavelength;  
exposing the specimen field to light sufficient to excite the first and second fluorophores;
  - 10 scanning the specimen field at a low magnification for first sources of photons at the first wavelength and for second sources of photons at the second wavelength;  
registering the location of each first source and each second source within the specimen field;
  - acquiring and recording a first image of the specimen field at each location,
  - 15 the first image generated via an optical or electronic filter that substantially blocks photons of the second wavelength but is permissive for photons of the first wavelength;  
acquiring and recording a second image of the specimen field at each location at a high magnification, the second image generated via an optical or electronic filter that substantially blocks photons of the first wavelength but is permissive for photons of the
  - 20 second wavelength;  
indexing each first image and each second image to the corresponding location within the specimen field; and  
inspecting a first image and second image at a single location within the specimen field,
  - 25 wherein the presence of a candidate body in the first and second images at the single location indicates the presence of a target body in the specimen.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

2. The method of claim 1, wherein preparation of the specimen field comprises:
- a. lysing the cell sample to give a sample mixture;
  - b. centrifuging the sample mixture;
  - 5 c. separating the supernatant from the sample mixture;
  - d. resuspending the resulting pellet of cells in a physiological buffer solution;
  - e. plating the cells on an adhesive slide;
  - f. adding cell culture media to the slide.
- 10
3. The method of claim 2, wherein preparation of the specimen field further comprises:
- after step d, making a dilution of the cell mixture, treating the dilution with a dye sensitive for dead cells, and performing a cell count to determine the sample cell density
- 15 for the slide to be used.
4. The method of claim 2, wherein the target body is a cancer, epithelial, smooth muscle, dendritic, memory T-, memory B-, somatic, normal, aberrant, or stem cell.
- 20
5. The method of claim 2, wherein the system is capable of detecting at least one target cell in a specimen field of at least 1,000,000 cells.
6. The method of claim 2, wherein the recoding comprises at least a 1024 x
- 25 1024 pixel array image
7. The method of claim 2, wherein the field specimen comprises white blood cells as the majority of cell types.
- 30
8. A detection system comprising

WO 02/062201

PCT/US02/02832

a stage for receiving a specimen field;  
a detector positioned and configured to acquire images of locations within the specimen field at a set level and one or more additional amplifications of the set level;  
a light source positioned and configured to expose the specimen field to  
5 light sufficient to excite a first fluorophore at a first excitation wavelength and sufficient to excite a second fluorophore at a second excitation wavelength;  
a camera attached to the detector, the camera positioned and configured to  
(1) capture a first image at a location in the specimen field via an optical or electronic filter that substantially blocks photons at a second emission wavelength of the second  
10 fluorophore but is permissive for photons at a first emission wavelength of the first fluorophore, and (2) capture a second image at the location in the specimen field via an optical or electronic filter that substantially blocks photons at the first emission wavelength but is permissive for photons at the second emission wavelength; and  
a computer that records the first image and second image and indexes the  
15 first image and second image to the corresponding location within the specimen field, the computer displaying, on demand by a user, the first image and second image for the corresponding location.

9. A method for analyzing for biological agent cells in a specimen field of  
20 cells comprising:  
i) treating the specimen field with a first fluorophore that identifies the biological agent cell;  
ii) treating the specimen field with a second fluorophore that identifies the biological agent cell;  
25 iii) exposing the specimen field with light suitable for causing the first fluorophore to emit photons,  
iv) exposing the specimen field with light suitable for causing the second fluorophore to emit photons,  
v) identifying cells in the specimen field that are emitting photons,  
30 which cells are biological agent cells.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

10. The method of claim 9, wherein the specimen field cell preparation comprises:
- i. centrifuging a sample mixture;
  - j. resuspending the sample mixture;
  - 5 k. plating the cells on an adhesive slide;
  - l. treating the slide with paraformaldehyde;
  - m. treating the slide with Triton;
  - n. treating the slide with a pre-hybridization solution;
  - 10 o. treating the slide with a hybridization solution having a fluorophore;
  - p. treating the slide with a fluorescent dye.
11. The method of claim 10, further comprising treating the specimen field with one or more additional fluorophore(s) that identifies the biological agent cell and exposing the specimen field with light suitable for causing the one or more additional
- 15 fluorophore(s) to emit photons.
12. The method of claim 11, wherein at least one fluorophore identifies DNA of a biological agent cell.
- 20 13. The method of claim 10, wherein the biological agent is bacteria, Rickettsiae, viruses, fungi, or prions.
14. The method of claim 1, wherein preparation of the specimen field comprises:
- 25 a. lysing the blood sample with ammonium chloride solution;
  - b. centrifuging the sample mixture;
  - c. separating the supernatant ammonium chloride solution and erythrocytes;
  - d. resuspending the resulting pellet of white cells in PBS;
  - 30 e. centrifuging the sample mixture;
  - f. resuspending the resulting pellet of white cells in PBS;

WO 02/062201

PCT/US02/02832

- g. making a dilution of the cell mixture of step f, tryphan blue, and PBS;
- h. plating the cells on an adhesive slide;
- i. adding cell culture media to the slide.

5           15.    A method for screening a transplantation organ donor for the presence or absence of a target body comprising the method of claim 2, wherein the specimen field is a sample taken from the organ donor.

10           16.    A method for assessing the efficacy of a drug candidate against a disease or disease symptom in a subject who was administered the drug candidate by screening for the presence or absence of a target body whose presence or absence is indicative of the disease or disease symptom comprising the method of claim 2, wherein the specimen field is a sample taken from the subject.

15           17.    A method for screening a blood sample for the presence or absence of a target body comprising the method of claim 2, wherein the specimen field is a blood sample.

20           18.    A method for screening a fluid sample for the presence or absence of a target body comprising the method of claim 2, wherein the specimen field is a fluid sample.

            19.    The method of any of claims 15-18, wherein the target body is a cancer cell.

25           20.    A method of screening for the presence of bacteria comprising the method of claim 2, wherein at least one fluorophore comprises a DNA probe for bacteria.

30           21.    The method of claim 20, wherein the specimen field is taken from a surgical patient after surgery.

WO 02/062201

PCT/US02/02832

22. The method of claim 20, wherein the specimen field is taken from a food sample.
23. The method of claim 10, further comprising:
- 5 j. exposing the slide to an aldehyde-based fixative;
  - k. rinsing the slide in phosphate-buffered saline (PBS);
  - l. adding human AB serum to the slide;
  - m. adding a primary antibody to the slide and incubating the slide;
  - n. rinsing the slide in PBS;
  - 10 o. adding a secondary antibody to the slide and incubating the slide;
  - p. exposing the slide in an organic solvent;
  - q. rinsing the slide in PBS;
  - r. adding human AB serum to the slide;
  - s. adding a primary antibody to the slide and incubating the slide;
  - 15 t. rinsing the slide in PBS;
  - u. adding a secondary antibody to the slide and incubating the slide;
  - v. rinsing the slide in PBS;
  - w. adding a cell dye to the slide and incubating the slide;
  - x. rinsing the slide with PBS;
  - 20 y. exposing the slide to water;
  - z. mounting the slide.
24. The method of claim 10, further comprising:
- 25 j. exposing the slide in an organic solvent;
  - k. rinsing the slide in PBS;
  - l. adding a primary antibody to the slide and incubating the slide;
  - m. rinsing the slide in PBS;
  - n. adding a secondary antibody to the slide and incubating the slide;
  - o. rinsing the slide in PBS;
  - 30 p. adding a cell dye to the slide and incubating the slide;
  - q. rinsing the slide with PBS;

WO 02/062201

PCT/US02/02832

- r. exposing the slide to water;
- s. mounting the slide.

25. The method of any of claims 23 or 24, wherein the organic solvent is an  
5 alcohol or acetone.

26. The method of any of claims 23 or 24, wherein the primary antibody is  
keratin.

10 27. The method of any of claims 23 or 24, wherein the secondary antibody is  
anti-rabbit rhodamine.

28. The method of claim 23, wherein the primary antibody in step s is keratin  
and the secondary antibody in step u is anti-rabbit rhodamine.  
15

## 【国際公開パンフレット(コレクション)】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau(43) International Publication Date  
15 August 2002 (15.08.2002)

PCT

(10) International Publication Number  
WO 02/062201 A3

- (51) International Patent Classification: C12Q 1/70, G01N 33/54, 33/533, G06K 9/00
- (21) International Application Number: PCT/US02/02832
- (22) International Filing Date: 1 February 2002 (01.02.2002)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data: 60/265,909 2 February 2001 (02.02.2001) US
- (71) Applicant: DANA-FARBER CANCER INSTITUTE [US/US]; 44 Binney Street, Boston, MA 02115 (US)
- (72) Inventors: KRAEFT, Stine-Kathrein; 25 Little Road, Brookline, MA 02446 (US); CHEN, Lan, Bo; 184 East Emmerson Road, Lexington, MA 02420 (US); AUCCLAIR, Daniel; 2 Alonquin Trail, Ashland, MA 01721 (US)
- (74) Agents: TSAO, Y., Rocky et al.; Fish & Richardson P.C., 225 Franklin Street, Boston, MA 02110-2804 (US)
- (81) Designated States (national): AF, AG, AI, 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, GI, 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, MY, 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.
- (84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CI, CG, CL, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- Published: — with international search report
- (88) Date of publication of the international search report: 10 April 2003
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.*



WO 02/062201 A3

(54) Title: RARE EVENT DETECTION SYSTEM

(57) Abstract: Disclosed is a method of detecting a target body in a specimen field of multiple candidate bodies by differential fluorescence labeling of different portions of the target body. The flexibility provided by the user of fluorophores allows for rapid detection of any rare target body with high efficiency and accuracy.

## 【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US02/02832		
<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>				
IPC(7) : C12Q 1/70; G01N 33/54, 33/533; G06K 9/00 US CL : 435/7.2 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. : Please See Continuation Sheet				
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)				
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>				
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.		
Y/P	US 6,200,762 B1 (ZLOKARNIK et al.) 13 March 2001 (13.03.2001), see entire document.	1-7, 9-28		
Y	US 5,989,835 A (DUNLAY et al.) 23 November 1999 (23.11.1999), see entire document.	1-28		
Y	US 5,548,661 A (PRICE et al.) 20 August 1996 (20.08.1996), see entire document.	8		
Y/P	US 6,221,612 A (KNAPP et al.) 24 April 2001 (24.04.2001), see entire document.	1-7, 9-28		
A	US 4,271,123 A (CURRY et al.) 02 June 1981 (02.06.1981), see entire document.	1-28		
<input 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 border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 50%; vertical-align: top;">               "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%; vertical-align: top;">               "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                "S" 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	"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 "S" 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	"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 "S" document member of the same patent family			
Date of the actual completion of the international search 03 June 2002 (03.06.2002)		Date of mailing of the international search report 31 JUL 2002		
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703)305-3230		Authorized officer <i>Valerie Ball-Harris for</i> Gulene R. Gabel Telephone No. (703) 308-0196		

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US02/02832

**Continuation of B. FIELDS SEARCHED Item 1:**

435/6, 7.1, 7.2, 7.21, 7.23, 7.24, 29, 40.5, 40.51, 288.3, 288.4; 91.1, 230, 235; 436/501, 528, 529, 530, 531, 546, 172, 800;  
382/153; 422/64

## 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)
G 0 1 N 33/15	G 0 1 N 33/15	Z
G 0 1 N 33/483	G 0 1 N 33/483	C
G 0 1 N 33/53	G 0 1 N 33/53	D
// C 1 2 N 15/09	G 0 1 N 33/53	K
	G 0 1 N 33/53	M
	C 1 2 N 15/00	A

(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, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, 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, NO, 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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

ペンティアム

(72) 発明者 チェン ラン ボー

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 レキシントン イースト エマーソン ロード 184

(72) 発明者 オークライア ダニエル

アメリカ合衆国 マサチューセッツ州 アッシュランド アロンクイン トレイル 2

Fターム(参考) 2G043 AA03 BA16 CA04 DA02 EA01 FA06 GA02 GA07 GB18 GB19  
 GB21 JA03  
 2G045 AA24 BB24 CA01 CA11 CB01 CB02 FA11 GC12  
 4B024 AA11 CA04 CA05 CA06 CA09 GA18 GA19 HA08 HA12 HA14  
 4B063 QA01 QA18 QA19 QA20 QQ03 QQ05 QQ20 QQ42 QR08 QR32  
 QR41 QR42 QR55 QR66 QR82 QS10 QS12 QS25 QS28 QS34  
 QS36 QX02

专利名称(译)	罕见的事件检测系统		
公开(公告)号	<a href="#">JP2005505746A</a>	公开(公告)日	2005-02-24
申请号	JP2002562212	申请日	2002-02-01
[标]申请(专利权)人(译)	达那-法伯癌症研究所		
申请(专利权)人(译)	达纳 - 法伯癌症研究所有限公司		
[标]发明人	クラエフトスタインキャスレイン チェンランポー オークライアダニエル		
发明人	クラエフトスタイン-キャスレイン チェンランポー オークライアダニエル		
IPC分类号	C12M1/34 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/04 C12Q1/68 G01N21/64 G01N33/15 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/58 G06F19/00		
CPC分类号	G01N21/6456 G01N21/6428 G01N33/582 G01N2021/6421 G01N2021/6441 G01N2021/6482 G01N2021/8867		
FI分类号	G01N33/50.Z C12Q1/02 C12Q1/04 C12Q1/68.A G01N21/64.F G01N33/15.Z G01N33/483.C G01N33/53.D G01N33/53.K G01N33/53.M C12N15/00.A		
F-TERM分类号	2G043/AA03 2G043/BA16 2G043/CA04 2G043/DA02 2G043/EA01 2G043/FA06 2G043/GA02 2G043/GA07 2G043/GB18 2G043/GB19 2G043/GB21 2G043/JA03 2G045/AA24 2G045/BB24 2G045/CA01 2G045/CA11 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/FA11 2G045/GC12 4B024/AA11 4B024/CA04 4B024/CA05 4B024/CA06 4B024/CA09 4B024/GA18 4B024/GA19 4B024/HA08 4B024/HA12 4B024/HA14 4B063/QA01 4B063/QA18 4B063/QA19 4B063/QA20 4B063/QQ03 4B063/QQ05 4B063/QQ20 4B063/QQ42 4B063/QR08 4B063/QR32 4B063/QR41 4B063/QR42 4B063/QR55 4B063/QR66 4B063/QR82 4B063/QS10 4B063/QS12 4B063/QS25 4B063/QS28 4B063/QS34 4B063/QS36 4B063/QX02		
代理人(译)	清水初衷		
优先权	60/265909 2001-02-02 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

公开了一种通过对目标对象的不同部分进行差分荧光标记来检测具有多个候选对象的分析物场中的目标对象的方法。荧光团的使用者提供的灵活性允许以高效率 and 准确度快速检测任何稀有目标物体。

(19) World Intellectual Property Organization  
International Bureau

(43) International Publication Date  
15 August 2002 (15.08.2002)

(51) International Patent Classification: **A61B**

(52) International Application Number: PCT/US02/02832

(22) International Filing Date: 1 February 2002 (01.02.2002)

(25) Filing Language: English


(26) Publication Language: English

(30) Priority Data: 2 February 2001 (02.02.2001) US 66265369

(71) Applicant: DANA-FARBER CANCER INSTITUTE  
155 State St., Boston, MA 02115 (US)

(72) Inventors: KRAEFT, Stine-Kathrin; 25 Little Road, Brookline, MA 02446 (US); CHEN, Lan; 186 East Emerson Road, Lexington, MA 02420 (US); ALCLEAR, Daniel; 2 Abascoquin Trail, Ashland, MA 01721 (US)

(74) Agents: TSAO, Y., Ruckey et al.; Fish & Richardson P.C., 775 Franklin Street, Boston, MA 02116-7601 (US)




(10) International Publication Number  
**WO 02/062201 A2**

(81) Designated States (national): AR, AU, AT, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GR, GU, HK, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, SM, SN, SV, TH, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (regional): ARIPO patent: GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SI, SZ, TZ, UG, ZM, ZW; Eurasian patent: AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM; European patent: AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IL, IT, MC, NL, PT, SI, SK, TR; OAPI patent: BE, BI, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, NG, TD, TG.

Published: without international search report and to be republished upon receipt of that report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.



02/062201 A2

(54) Title: RARE EVENT DETECTION SYSTEM