

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2012-215593

(P2012-215593A)

(43) 公開日 平成24年11月8日(2012.11.8)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 9 7	4 B O 6 3
C 1 2 Q 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04	
C 1 2 Q 1/68 (2006.01)	C 1 2 Q 1/68 Z	

審査請求 有 請求項の数 10 O L 外国語出願 (全 45 頁)

(21) 出願番号	特願2012-178579 (P2012-178579)	(71) 出願人	510005889
(22) 出願日	平成24年8月10日 (2012. 8. 10)		
(62) 分割の表示	特願2007-527539 (P2007-527539) の分割	(74) 代理人	ベックマン コールター, インコーポレ イテッド アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 2 8 2 1, ブレア, エス. クレーマー ブー ルバード 2 5 0
原出願日	平成17年5月18日 (2005. 5. 18)		
(31) 優先権主張番号	60/573, 167	(74) 代理人	100078282 弁理士 山本 秀策
(32) 優先日	平成16年5月21日 (2004. 5. 21)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100062409 弁理士 安村 高明
(31) 優先権主張番号	11/130, 492	(74) 代理人	100113413 弁理士 森下 夏樹
(32) 優先日	平成17年5月17日 (2005. 5. 17)		
(33) 優先権主張国	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 完全自動化したモノクローナル抗体による広範な識別法

(57) 【要約】

【課題】生物試料中の血液学的細胞の様々な構成小集団または型を識別し計数する方法の改良、より詳細にはこの目的のための高処理量の自動装置を提供する。

【解決手段】本発明は、複数の細胞型に対する、例えば好ましくは5種類の正常な白血球集団および少なくとも2種類の非定型集団に対する自動化され、迅速な、拡張された白血球の識別を行うための方法を提供する。このような方法に使用するための試薬を含む組成物もまた本明細書中で提供される。

【選択図】なし

【特許請求の範囲】

【請求項1】

生物試料中の血液学的細胞集団を同定、分析または計数するための方法であって、以下のステップ：

A i 前記生物試料；

ii a) 第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体であって、前記試料中の白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する抗体；

b) (b1) 前記第一の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する追加の抗体、および

(b2) 追加の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、前記追加の抗体が成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、かつ前記追加の蛍光色素が前記第一の発光スペクトルと識別できる追加の発光スペクトルを有する追加の抗体

(b3) 追加の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、前記追加の抗体が成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、かつ前記追加の蛍光色素が前記第一の発光スペクトルと重なり合う追加の発光スペクトルを有する追加の抗体

からなる群から選択される少なくとも1種類の追加の抗体、並びに

c) 前記第一の発光スペクトルまたは前記追加の発光スペクトルの少なくとも一方と重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素を含む組成物；

を含む混合物を、細胞上で複数の相互に関連する測定値を生成することができるトランスデューサ内のフローアパーチュアに通過させるステップ、

B 追加の蛍光を明らかにする重なり合ったピーク発光スペクトル内の発光波長において、蛍光の第1のチャンネル内の前記蛍光色素および核酸色素の蛍光を検出するステップ、

C 1つまたは複数の蛍光のチャンネル、1つまたは複数の光学的パラメータ、1つまたは複数の電気的パラメータ、およびこれらの組合せからなる群から選択される追加のパラメータを検出するステップ；並びに

D ステップBにおいて検出した前記追加の蛍光と、ステップCにおいて検出した少なくとも1つの追加のパラメータを分析することによって前記試料中の血液学的細胞の集団を同定、分析または計数するステップ、
を含む、前記方法。

【請求項2】

前記ステップCの追加のパラメータが電気的パラメータである、請求項1に記載の方法

【請求項3】

前記ステップCの追加のパラメータが光学的パラメータである、請求項1に記載の方法

【請求項4】

前記混合物を球状化剤と接触させるステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

前記核酸色素が細胞非浸透性色素または細胞浸透性色素である、請求項1に記載の方法

【請求項6】

前記第一の抗体の抗原決定基が、成熟白血球および未熟白血球上で違った形で発現する、請求項1に記載の方法。

【請求項7】

前記生物試料中の非有核赤色血液細胞を違った形で溶血し、かつ前記生物試料中の白血

10

20

30

40

50

球集団を保存する溶血試薬と、前記混合物とを接触させるステップを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 8】

ステップDが、少なくとも2つの蛍光のチャンネルと、光学的パラメータまたは電気的パラメータのいずれかの分析を含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 9】

前記第一および追加の蛍光色素が、赤色、青色および緑色の放射エネルギー、ならびにこれらの組合せによって励起可能な色素類からなる群から独立に選択される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 10】

前記核酸色素が、アクリジンオレンジであり、前記第一または追加の蛍光色素が、PE、APC、PC-7、ECD、FITC、PE-Cy5、PerCPおよびアレクサ色素からなる群から独立に選択される、請求項 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物試料中の血液学的細胞の様々な構成小集団または型を識別し計数する方法の改良、より詳細にはこの目的のための高処理量の自動装置に関する。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

一般に、様々な疾患に罹っているヒト被験者由来の全血および末梢血試料は、液体培地または血漿中に懸濁した血液細胞または非血液細胞（例えば腫瘍細胞、細菌など）の両方を含む可能性がある。これら血液細胞には、赤色血液細胞（赤血球すなわちRBC）、白色血液細胞（白血球すなわちWBC）、および血小板が含まれる。細胞の成熟レベルによっては、赤色細胞はさらに3つの部分集合、すなわち有核RBC（NRBC）、網目状RBC（網状赤血球）、および成熟RBCに分類される。成熟白色細胞は、5つの異なるカテゴリー、すなわち単球、リンパ球、好酸球、好中球、および好塩基球のうちの一つに分類される。これら白色細胞の部分集合のそれぞれは、さらにそれらそれぞれの成熟度、活性化、系列、機能、表現型、または異常のレベルに基づいてサブクラスに分類される。一般には成熟細胞のみが、普通は検出可能な量で末梢血中に存在する。正常なヒト中の赤色細胞の数は、白色細胞の全数よりも約1000：1で多い。凝固の役割を果たす血小板は、3種類の包括的な型、すなわち巨核球、未熟網状血小板、および成熟血小板である。

【0003】

患者の末梢血中の血液細胞および血小板のこれらの様々な型の識別および計数、またそれらの幾つかのパラメータまたは特性を求めることにより、様々な血液の異常または疾患の診断が可能になる。様々な型の血液細胞の絶対数、濃度、および相対的割合は、ある種の疾患の状態の存在の有無および/またはステップの高度な徴候を示す。

【0004】

現在市販されている高処理量の流動式血液分析計（hematology flow analyzer）は、末梢血試料中の赤色血液細胞、血小板、および白色血液細胞に関する測定および数学的に得られる細胞の複数の指標を提供する。一次成熟細胞型を検出し、計数し、またさらなる細胞パラメータを求めることは、例えばBeckman CoulterのLH 750(商標)、GEN S(商標)、STKS(商標)、およびMAXM(商標)血液計測器、Abbot LaboratoriesのCell Dyne 3000/4000血液計測器、Sysmex Systems(商標)シリーズ血液計測器、ABX診断用計器、およびBayer Technicon計器を含めた幾つかの市販の血液計測器のいずれかを用いて達成することができる。各細胞型に関してデータを自動的に得る場合、上記血液計測器の大部分は、少なくとも2個の別個の細胞分析用トランスデューサを使用している。これらのトランスデューサの1個（または複数個）は、その5種類の異なる型のWBCを識別し計数するのに役立つデータを得るように動作する。別のトランスデューサは、試料の正確な容積中のRBC、WBC、および

10

20

30

40

50

血小板の計数および分粒専用である。これら複数トランスデューサのそれぞれのアウトプットは中央処理装置で処理され、統合された細胞分析報告をもたらす。これら数個のトランスデューサのそれぞれのアウトプットを関連づけて5要素の識別情報を与える。

【0005】

「広範な識別」測定には、正常な「5要素の識別」ならびに非定型細胞（例えば、健康なヒトの血液中の細胞と比較した異常と考えられる細胞）および未熟細胞の検出と計数が含まれる。現在の市販血液計測器の限界のせいで医療技術者は、広範な識別分析の結果を得るのに顕微鏡検査（人手による識別）を行わなければならない。まず考察対象の試料の血液塗沫標本を手で顕微鏡スライドガラス上に作る。次いでこの塗沫標本を色素で染めて、考察対象の非定型または未熟細胞を含めたすべての細胞を視覚的に互いに識別することを可能にする。得られた着色血液塗沫標本を顕微鏡で検査する。

10

【0006】

別法では幾種類かの血液細胞型の広範な識別の測定値を、通常フローサイトメーターを用いて検出することができる。このような計測器では、例えば（1）その試料を、考察対象のある種の細胞を選択的に「標識する」のに役立つ蛍光色素で標識したモノクローナル抗体などと混ぜ合わせるか、または（2）その試料を、選択的に考察対象の細胞にマークを付けるようにした蛍光色素と混ぜ合わせることによって前もって調製した血液試料が、光学的フローセルを通過する。試料中の各細胞がフローセルを通過するとき、考察対象の細胞と結合した蛍光物質を励起するようにした光子線を照射する。標識した細胞のそれぞれによって放射される蛍光と各細胞によって散乱した光とが検出され、それらを用いて試料中の考察対象の細胞を他の細胞から識別する。

20

【0007】

要約すると従来血液計測器は、末梢血試料中に通常存在する大多数の細胞型および部分集合を識別し計数することはできるが、単一試料中の細胞の多数の部分集合、特に非定型または未熟なそれら細胞を容易に差別化することができない。

【0008】

全白色血液細胞の計測の範囲を超えて関連のある情報を与える能力は、血液検査システム内に多数の分析パラメータを含ませることに直接関係する。上記のように現在の大多数の血液検査システムは、同一反応混合物（すなわち同一試料のアリコート）の一連の分析中に収集される、あるいは同一試料の異なる反応混合物の分析から収集される散乱光の測定値の組合せ、または散乱光と電気的測定値の組合せを調べることによって正常な血液細胞集団を識別する。電流インピーダンス、導電率、散乱光、吸光度、軸方向光損失、および蛍光の様々な構成または組合せを用いて5要素の識別を決定し、また同一試料の異なるアリコートを使用することにより非定型細胞型が存在するかどうかの信号情報を提供してきた。

30

【0009】

市販の独立型フローサイトメーターは、Beckman Coulter、Sysmex Corporation、Cytomation、Bio-Rad、およびBecton Dickinsonによって製造されている。これらフローサイトメーターおよび血液計測器は予め統合されて単一の自動化された実験室システムになっており、血液試料はそのなかを進路に沿ってそれらの異なる計測器を通り過ぎて自動的に進む。試料を含有する複数のガラス瓶が各計測器を通過するとき血液試料が各ガラス瓶から吸引され、その計測器により分析される。別々の血液およびフローサイトメーター計測器を結合した計測器システムがBeckman CoulterおよびSysmex Corporationから市販されており、SysmexのHSTシリーズが参考になる。細胞型または部分集合の幾つの特徴を報告するために複数トランスデューサのそれぞれのアウトプットを関連づけるという要求は、ある種の状況下ではそれが分析結果に不確実性を持ち込む点で疑問の余地がある場合がある（米国特許第5,631,165号明細書および同第5,565,499号明細書）。単一の電気光学トランスデューサを用いて単一細胞の容積（V）導電率（C）、散乱光（S）、および蛍光（F）を同時に測定することが望ましいことは、1個の細胞上で1個のトランスデューサにより幾つかの測定を行い、別のトランスデューサを用いて同じ型の別の細胞上で他の測定を行

40

50

い、次いでこの2個のトランスデューサからの結果を関連づけてその細胞試料についてある結論を引き出すのではなく、同一細胞上ですべての測定を同時に行うという利点を与えるものとして提案されている（例えば、Thomas等の論文、J. Histochem. Cytochem., 25(7): 827-835 (1977)参照）。

【0010】

蛍光を用いたフローサイトメトリーは、白血球系列および成熟の状態を判定するために使用されてきた。多数の質的に異なる抗原決定基の伝統的なフローサイトメトリー分析は、通常その同じ分析に利用される各抗体に対して別個の蛍光色素を使用することによって行われる。一般に一連の分析は、臨床に直接的に関連する情報を得るために行われる。これは、使用される各蛍光色素に対して別個の蛍光検出器、光学機器、および電子機器と、しばしば2個以上のレーザーの組み込みとを必要とする。例えば、C. I. Civen等の論文、1987 Internat'l. J. Cell Cloning, 5:267~288は、骨髄吸引標本中で赤血球細胞上の3種類の細胞表面抗原の発現位置を決めるためのマルチパラメータフローサイトメトリーの使用について言及している。米国特許第5,234,816号明細書は、患者の血液または骨髄細胞を、B、T、骨髄、または未分化細胞に対する複数種のモノクローナル抗体（各抗体はその他のものと識別できる発光スペクトルを有する蛍光色素で標識される）と混ぜ合わせることによって白血病を分類し監視する方法について言及している。蛍光強度および光散乱パラメータは、フローサイトメトリーによって対数蛍光量の二次元散布図として測定される。米国特許第5,137,809号明細書は、白血球上の抗原部位と結合する標識したモノクローナル抗体で造血細胞を処理することによってその細胞の系列および発育ステップを識別する方法について言及しており、各抗体はその他と識別できる発光スペクトルを有し、かつその細胞を大きさ、粒度、および相対蛍光強度によって分析する蛍光色素で標識される。

10

20

【0011】

考察した技術の中で蛍光を用いた測定法は、血液細胞の分析におけるより大きな進歩をもたらす可能性を有する。細胞の固有の物理的性質の差を利用するその他の前述の技術とは違って蛍光検出法は、蛍光色素、組織化学的着色、および蛍光複合ハイブリッド形成プローブまたはモノクローナル抗体などのプローブの使用により細胞の外因性の特性を調べることができる。適切な試薬の選択により高度の感度および特異性を与えることによる蛍光測定法が有利であることが分かっている。蛍光を用いたフローサイトメトリーシステムは、研究環境において多年利用されており、また最近では免疫不全分析、DNA細胞周期分析、および白血病/リンパ腫免疫表現型検査を行うための臨床実験室において利用されている。より最近では、蛍光測定法は、網状RBCを計数する目的（Sysmex、ABX、およびAbbott）で、続いてNRBCを計数する目的（AbbottおよびSysmex）で定型化された血液フローシステム上で始めて導入された。また蛍光を用いた免疫血小板のカウントが最近発表された。考察してきた3つの蛍光測定のうち2つ（網状赤血球の計数および免疫血小板のカウント）は、二次または反射モードの測定のいずれかである。白血球識別サイクルの一部として行われる唯一の測定は、Cell-Dyne 4000装置上でのNRBCの計数である。この分析は、無傷WBC、損傷WBC、およびNRBCを識別するために核酸挿入色素（ヨウ化プロピジウム）および散乱光を利用して行われる。

30

40

【0012】

これらの技術の応用にもかかわらず、現在利用できるこれら血液検査システムは、まだ共通の欠点に苦慮している。それらには、5要素の識別の遂行を妨げる様々な非定型白血球集団または他の異常条件（細胞/非細胞の）の存在下で正確な5要素からなる白色血液細胞の識別を行うことが困難なことが挙げられる。さらに非定型細胞型の存在を検出することまたはその信号を出すことを可能にするそれらの相関が、高い偽陽性または高い偽陰性率のあおりを受ける。これらの欠点は、それらが不必要な高い人手による再調査率または臨床的に重大な異常を検出できないことのどちらかをひき起すために許容されない。

【0013】

当該分野では、マルチパラメータ高処理量血液分析計または特殊血液分析計上でのただ

50

1回の分析で総合的な5要素の識別および拡張された白血球の識別の両方を求めるための簡便で迅速な方法に対する必要性が残っている。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0014】

発明の概要

一態様において本発明は、第一の抗体、少なくとも1種類の追加の抗体、および第三の成分を含有する組成物を提供する。これらの三成分は、生物試料を混ぜ合わせて単一反応混合物にするために準備される。この第一の抗体は、白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、また第一の蛍光色素で標識される。この追加の抗体（または追加の抗体群）は、成熟および未熟の顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この追加の抗体を標識する蛍光色素は、同じ第一の蛍光色素であるか、または第一の蛍光色素と識別できる発光スペクトルを有する別の蛍光色素である。一実施形態ではその組成物の第三の成分は核酸色素である。別の実施形態ではその組成物の第三の成分は溶血系である。別の実施形態では核酸色素と溶血系の両方がその組成物に含まれる。

【0015】

さらに別の態様において本発明は、これもまた本発明で述べる本発明の組成物を含有するキットと、この組成物を用いて検定を行うための任意選択の使用説明書とを提供する。第三の成分として溶血系のみを含有する組成物またはキットの使用は、生物試料中の少なくとも7種類の血液学的細胞集団を計数することを可能にする。核酸色素（場合によっては溶血系と一緒に）を含有する組成物またはキットの使用は、その試料中の少なくとも8種類の血液学的細胞集団を計数することを可能にする。

【0016】

別の態様において本発明は、生物試料中の血液学的細胞集団を計数する方法を提供する。この方法には、単一反応混合物中で、この試料と、上記第一の抗体と、少なくとも1種類の上記の追加の抗体とを反応させることが含まれる。次いでこの単一反応混合物を、フローサイトメーターを通過させるのに先立って第三の成分と接触させる。この方法の一実施形態ではその第三の成分は、その試料中に存在するいずれの成熟赤色血液細胞をも違った形で溶血し、白血球集団を保存することができる溶血系である。この方法の別の実施形態ではその第三の成分は、その第一の発光スペクトルまたはさらなる発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素である。この方法のさらに別の実施形態ではその第三の成分は、核酸色素と溶血系の両方を含む。これら実施形態のいずれにおいても得られる単一反応混合物は、次いで複数パラメータに関してこの混合物を測定する単一ステップのフローサイトメーターのフローパーチュアを通過させる。これらのパラメータは、同一でも異なってもよく、1つまたは複数の蛍光のチャネル、1つまたは複数の光学的パラメータ、1つまたは複数の電気的パラメータ、およびこれらの組合せを含む。次いでこれら血液学的細胞の集団は、試料中で各細胞集団について少なくとも2つのパラメータを分析することによって計数される。第三の成分として溶血系のみを使用する方法を使用した場合、生物試料中の少なくとも7種類、好ましくはそれ以上の血液学的細胞集団を計数することが可能になる。核酸色素（場合によっては溶血系と一緒に）を用いる方法を使用した場合、その試料中の少なくとも8種類の血液学的細胞集団、好ましくはそれ以上を計数することが可能になる。

【0017】

本発明は例えば、以下の項目を提供する：

(項目1)

A 第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識される第一の抗体であって、試料中の白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する抗体；

B(1) 前記第一の蛍光色素で標識される追加の抗体であって、成熟および未熟顆粒球ま

10

20

30

40

50

たは骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する追加の抗体、および

(2) 追加の蛍光色素で標識される追加の抗体であって、前記追加の抗体が成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、かつ前記追加の蛍光色素が前記第一の発光スペクトルと識別できる追加の発光スペクトルを有する追加の抗体

からなる群から選択される少なくとも1種類の追加の抗体；並びに

C(i) 前記試料中に存在する非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血し、かつ前記試料中の白血球集団を保存する溶血系、

(ii) 前記第一の発光スペクトルまたは前記追加の発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素、および

(iii) (i) および (ii) の組合せ

からなる群から選択される成分

を含む組成物。

(項目2)

前記成分A~Cが、混和されて生物試料との単一反応混合物になるように設計される、項目1に記載の組成物。

(項目3)

前記第一の抗体が成熟白血球と未熟白血球を識別する、項目1に記載の組成物。

(項目4)

前記第一の抗体が、抗CD45、抗CD11a、抗CD50、抗CD18、抗CD53、および抗CD62Lからなる群から選択されるモノクローナル抗体である、項目1に記載の組成物。

(項目5)

前記追加の抗体が、2種類の抗原CD16 およびCD16 と結合することができる抗CD16、抗CD16、抗CD11b、抗CD15、抗CD35、抗CD24、抗CD10、抗CD49d、CD64、抗CD87、および抗CD15からなる群から選択される、項目1に記載の組成物。

(項目6)

前記第一の抗体が抗CD45であり、かつ前記追加の抗体が抗CD16または抗CD16 である、項目1に記載の組成物。

(項目7)

前記第一と第二の蛍光色素が異なる、項目1に記載の組成物。

(項目8)

前記第一と第二の蛍光色素が同じである、項目1に記載の組成物。

(項目9)

前記核酸色素が、細胞非浸透性色素または細胞浸透性色素である、項目1に記載の組成物。

(項目10)

前記核酸色素が、アクリジンオレンジ、チアゾールオレンジ、ヨウ化プロビジウム、ノニルアクリジンオレンジ色素、アクリジンレッド色素、トルイジンプルー色素、SYTO(商標)色素、TOTO(商標)色素、YOYO(商標)色素、およびBOBO(商標)色素である、項目1に記載の組成物。

(項目11)

球状化剤をさらに含む、項目1に記載の組成物。

(項目12)

前記溶血系が試薬を含む、項目1に記載の組成物。

(項目13)

前記溶血系が少なくとも2種類の試薬を含む、項目12に記載の組成物。

(項目14)

A 第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識される第一の抗体であって、生物試料中の白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基

10

20

30

40

50

と結合する抗体；

B(1) 前記第一の蛍光色素で標識される追加の抗体であって、成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する追加の抗体、および

(2) 追加の蛍光色素で標識される追加の抗体であって、前記追加の抗体が成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、かつ前記追加の蛍光色素が前記第一の発光スペクトルと識別できる追加の発光スペクトルを有する追加の抗体

からなる群から選択される少なくとも1種類の追加の抗体；並びに

C 前記第一の発光スペクトルまたは前記追加の発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素を含む組成物。

(項目15)

前記成分A~Cが混和されて生物試料との単一反応混合物になるように設計され、前記混合物が前記試料中の少なくとも8種類の血液学的細胞集団の計数を可能にする、項目14に記載の組成物。

(項目16)

A 第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識される第一の抗体であって、生物試料中の白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する抗体；

B(1) 前記第一の蛍光色素で標識される追加の抗体であって、成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する追加の抗体、および

(2) 追加の蛍光色素で標識される追加の抗体であって、前記追加の抗体が成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、かつ前記追加の蛍光色素が前記第一の発光スペクトルと識別できる追加の発光スペクトルを有する追加の抗体

からなる群から選択される少なくとも1種類の追加の抗体；並びに

C 前記試料中に存在する非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血し、かつ前記試料中の白血球集団を保存する溶血系を含む組成物。

(項目17)

前記成分A~Cが混和されて核酸色素の不在下の生物試料との単一反応混合物になるように設計され、前記混合物が前記試料中の少なくとも7種類の血液学的細胞集団の計数を可能にする、項目16に記載の組成物。

(項目18)

(a) 白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する第一の抗体；

(b) 成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する少なくとも1種類の追加の抗体；

(c) 前記抗体(a)および場合により少なくとも1種類の追加の抗体(b)と関連する第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素；

(d) 追加の抗体(b)と関連した前記第一の発光スペクトルと識別できる追加の発光スペクトルを有する追加の蛍光色素；

(e) (1) 生物試料中に存在する非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血し、かつ生物試料中の白血球集団を保存する溶血系；

(2) 前記第一の発光スペクトルまたは前記追加の発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素、および

(3) (1)および(2)の組み合わせ

からなる群から選択される成分；並びに

10

20

30

40

50

(f) 上記成分 (a) ~ (e) 用の包装を含むキット。

(項目 19)

(g) 生物試料中の血液学的細胞集団を計数するための方法の実施用の使用説明書、試料および混合容器用の使用説明書、および前記抗体を前記蛍光色素で標識するための試薬用の使用説明書からなる群から選択される構成要素をさらに含む、項目18に記載のキット。

(項目 20)

生物試料中の細胞集団を計数するための方法であって、以下のステップ：

A i 前記試料；

ii 第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体であって、前記試料中の白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する抗体；および

iii (a) 前記第一の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する追加の抗体、および

(b) 追加の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、前記追加の抗体が成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、かつ前記追加の蛍光色素が前記第一の発光スペクトルと識別できる追加の発光スペクトルを有する追加の抗体

からなる群から選択される少なくとも1種類の追加の抗体、を含む単一反応混合物中で反応させ；

B 前記単一反応混合物を、

(c) 前記試料中に存在する非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血し、かつ前記試料中の白血球集団を保存する溶血試薬；

(d) 前記第一の発光スペクトルまたは前記追加の発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素；および

(e) (c) および (d) の組合せ

からなる群から選択される成分と接触させ；

C 1つまたは複数の蛍光のチャンネル、1つまたは複数の光学的パラメータ、1つまたは複数の電气的パラメータ、およびこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも2つの同一または相異なるパラメータについて前記混合物を測定する単一ステップにおいて、前記混合物を流動式血液分析計の単一フローアパーチュアに通過させ；並びに

D 前記集団のそれぞれについて少なくとも2つのパラメータを分析することによって前記試料中の血液学的細胞の集団を計数すること、を含む、前記方法。

(項目 21)

前記通過のステップに先立って前記試料中に追加の試薬を導入することによって前記溶血試薬の効果を遅らせるステップをさらに含む、項目20に記載の方法。

(項目 22)

前記通過のステップが、少なくとも1つの蛍光のチャンネルを測定する、項目20に記載の方法。

(項目 23)

電气的パラメータの測定をさらに含む、項目22に記載の方法。

(項目 24)

光学的パラメータの測定をさらに含む、項目22に記載の方法。

(項目 25)

少なくとも1つの光学的パラメータと少なくとも1つの電气的パラメータの測定をさらに含む、項目22に記載の方法。

(項目 26)

10

20

30

40

50

前記通過のステップが、少なくとも2つの蛍光のチャンネルと光学的パラメータとを測定する、項目20に記載の方法。

(項目27)

前記通過のステップが、少なくとも2つの蛍光のチャンネルと電気的パラメータとを測定する、項目20に記載の方法。

(項目28)

前記通過のステップが、少なくとも2つの蛍光のチャンネル、少なくとも1つの光学的パラメータ、および少なくとも1つの電気的パラメータを測定する、項目20に記載の方法。

(項目29)

前記光学的パラメータが、散乱光、前方散乱光、側方散乱光、軸方向光損失、吸光度、後方散乱光、低角前方散乱光、および高角前方散乱光からなる群から選択される、項目20に記載の方法。

(項目30)

前記電気的パラメータが、直流電気インピーダンス、電気抵抗、無線周波数、DC、および不透明度からなる群から選択される、項目20に記載の方法。

(項目31)

前記光学的パラメータが散乱光のただ1つの角度である、項目20に記載の方法。

(項目32)

前記電気的パラメータがDC容積である、項目20に記載の方法。

(項目33)

前記第一の抗体が、抗CD45、抗CD11a、抗CD50、抗CD18、抗CD53、および抗CD62Lからなる群から選択される抗体である、項目20に記載の方法。

(項目34)

前記追加の抗体が、2種類の抗原CD16 およびCD16 と結合することができる抗CD16、抗CD16、抗CD11b、抗CD15、抗CD35、抗CD24、抗CD10、抗CD49d、CD64、抗CD87、および抗CD15からなる群から選択される抗体である、項目20に記載の方法。

(項目35)

前記第一の抗体が抗CD45であり、かつ前記追加の抗体が抗CD16または抗CD16 である、項目20に記載の方法。

(項目36)

前記第一と追加の蛍光色素が同じである、項目20に記載の方法。

(項目37)

前記第一と第二の蛍光色素が異なる、項目20に記載の方法。

(項目38)

前記第一および追加の蛍光色素が、赤色、青色、および緑色、およびこれらの組合せの放射エネルギーによって励起可能な色素類からなる群から独立に選択される、項目20に記載の方法。

(項目39)

前記第一および追加の蛍光色素が、フィコエリトリン(PE)、アロフィコシアニン(APC)、PE-シアニン5(PC5)、PE-シアニン7(PC7)、PE-テキサスレッド(ECD)、フルオレセインイソチオシアナート(FITC)、PE-Cy5.5、PerCP、およびアレクサ色素からなる群から独立に選択される、項目20に記載の方法。

(項目40)

前記少なくとも1つの蛍光のチャンネルが、青色レーザー、緑色レーザー、または赤色レーザーからなる群の少なくとも1種類で励起される、項目20に記載の方法。

(項目41)

前記方法が完全に自動化されている、項目20に記載の方法。

(項目42)

前記核酸色素が細胞浸透性色素である、項目20に記載の方法。

(項目43)

10

20

30

40

50

前記反応混合物を球状化剤と接触させるステップをさらに含む、項目20に記載の方法。

(項目44)

前記核酸色素が細胞非浸透性色素である、項目20に記載の方法。

(項目45)

前記核酸色素がアクリジンオレンジである、項目20に記載の方法。

(項目46)

前記第一の抗体の抗原決定基が、成熟白血球および未熟白血球上で違った形で発現する、項目20に記載の方法。

(項目47)

生物試料中の細胞集団を計数するための方法であって、以下のステップ：

A 核酸着色剤の不在下で、

i 前記試料；

ii 第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体であって、前記試料中の白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する抗体；および

iii (a) 前記第一の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する追加の抗体、および

(b) 追加の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、前記追加の抗体が成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、かつ前記追加の蛍光色素が前記第一の発光スペクトルと識別できる追加の発光スペクトルを有する追加の抗体

からなる群から選択される少なくとも1種類の追加の抗体

を含む単一反応混合物中で反応させ；

B 前記単一反応混合物を、前記試料中に存在する非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血し、かつ前記試料中の白血球集団を保存する溶血試薬と接触させ；

C 1つまたは複数の蛍光のチャネル、1つまたは複数の光学的パラメータ、1つまたは複数の電気的パラメータ、およびこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも2つの同一または相異なるパラメータについて前記混合物を測定する単一ステップにおいて、前記混合物を流動式血液分析計の単一フローアパーチュアに通過させ；並びに

D 前記集団のそれぞれについて少なくとも2つのパラメータを分析することによって前記試料中の血液学的細胞の集団を計数すること、

を含む、前記方法。

(項目48)

生物試料中の血液学的細胞型を計数する方法であって、以下のステップ：

A i 前記試料；

ii 第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体であって、前記試料中の白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する抗体；

iii (a) 前記第一の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する追加の抗体；および

(b) 追加の蛍光色素で標識した追加の抗体であって、前記追加の抗体が成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合し、かつ前記追加の蛍光色素が前記第一の発光スペクトルと識別できる追加の発光スペクトルを有する追加の抗体；

からなる群から選択される少なくとも1種類の追加の抗体、および

iv 前記第一の発光スペクトルまたは前記追加の発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素、

を含む単一反応混合物を準備し；

10

20

30

40

50

B 1つまたは複数の蛍光のチャンネル、1つまたは複数の光学的パラメータ、1つまたは複数の電气的パラメータ、およびこれらの組合せからなる群から選択される少なくとも2つの同一または相異なるパラメータについて前記混合物を測定する単一ステップにおいて、前記混合物を流動式血液分析計の単一フローアパーチュアに通過させ；並びに

C 前記集団のそれぞれについて少なくとも2つのパラメータを分析することによって前記試料中の血液学的細胞の集団を計数すること、を含む、前記方法。

本発明の他の態様および利点は、下記の詳細な説明中で開示する。

【図面の簡単な説明】

【0018】

【図1A】図1Aは、前方散乱光（FS）と側方散乱光（SS）の関係を表す実施例1で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも3種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、顆粒球（好酸球および好中球を含有する）とをこの表示中で識別し計数することができる。

【図1B】図1Bは、（CD16-PC7およびCD45-PC7）の蛍光と側方散乱の関係を表す同じ実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも5種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好塩基球と、好酸球と、好中球とをこの表示中で識別し計数することができる。

【図1C】図1Cは、（CD16-PC7およびCD45-PC7）の蛍光と前方散乱光の関係を表す同じ実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも3種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、好中球と、好酸球、単球、および好塩基球を含有する第三のクラスターとをこの表示中で識別し計数することができる。

【図2A】図2Aは、CD45-PEの蛍光と側方散乱（SS）の関係を表す実施例2で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好塩基球と、好酸球および好中球を含有する顆粒球のクラスターとをこの表示中で識別し計数することができる。

【図2B】図2Bは、CD16-PC7の蛍光と側方散乱（SS）の関係を表す実施例2で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわち好中球と、単球と、好酸球と、ナチュラルキラー細胞および活性リンパ球を含有するクラスターとをこの表示中で識別し計数することができる。

【図2C】図2Cは、CD16-PC7の蛍光とCD45-PEの蛍光の関係を表す実施例2で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、好中球と、好酸球および単球を含有するクラスターと、ナチュラルキラー細胞および活性リンパ球を含有するもう一つのクラスターとをこの表示中で識別し計数することができる。

【図3A】図3Aは、DC（インピーダンス）と、約20～40度からの散乱光の前進角度である中位角散乱光（MALS）の関係を表す実施例3で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、好酸球とをこの表示中で識別し計数することができる。

【図3B】図3Bは、CD45-PC5の蛍光と、不透明度（OP）（ただしOP＝無線周波数（RF）/インピーダンス（DC）（ヒストグラム図3Aから閉め出すことにより好中球および好酸球を除去した後の））の関係を表す実施例3で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、この例では3種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好塩基球とを識別し計数することができる。

【図3C】図3Cは、CD16-PEの蛍光とRFの関係を表す実施例3で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、3種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球とを識別し計数することができる。

【図4A】図4Aは、DC（インピーダンス）と中位角散乱光（MALS）の関係を表す実施例4で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好酸球と、好中球、杆状球、および未熟顆粒球

10

20

30

40

50

を含有するクラスターとを識別し計数することができる。

【図4B】図4Bは、CD16-PEの蛍光とSSの関係を表す実施例4で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、この例では少なくとも3種類の細胞集団、すなわち好中球と、杆状球と、ナチュラルキラー細胞とを識別し計数することができる。

【図4C】図4Cは、DCと、図4B中のヒストグラムから閉め出すことにより好中球および杆状球を除去した後のMALSの関係を表す実施例4で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好酸球と、未熟顆粒球とをこの表示中で識別し計数することができる。

【図4D】図4Dは、CD45-PC5の蛍光と、図4B中のヒストグラムから閉め出すことにより好中球および杆状球を除去した後のSSの関係を表す実施例4で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも5種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好酸球と、好塩基球と、未熟顆粒球とをこの表示中で識別し計数することができる。

10

【図5A】図5Aは、波長約675 nmにおけるAOの蛍光とSSの関係を表す実施例5で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好酸球と、好中球とをこの表示中で識別し計数することができる。

【図5B】図5Bは、波長約775 nmにおけるAO、CD16-PC7、およびCD45-PC7の蛍光と、SSの関係を表す実施例5で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも6種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、好酸球と、好塩基球と、ナチュラルキラー細胞とを識別し計数することができる。

20

【図5C】図5Cは、波長約775 nmにおけるAO、CD16-PC7、およびCD45-PC7の蛍光と、波長約675 nmにおけるAOの蛍光の関係を表す実施例5で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも6種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、好酸球と、好塩基球と、ナチュラルキラー細胞とを識別し計数することができる。

【図6A】図6Aは、波長約575 nmにおけるAOおよびCD16-PEの蛍光とSSの関係を表す実施例6で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも5種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好酸球と、好中球と、ナチュラルキラー細胞とをこの表示中で識別し計数することができる。

30

【図6B】図6Bは、波長約775 nmにおけるAOおよびCD45-PC7の蛍光とSSの関係を表す実施例6で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、好塩基球とを識別し計数することができる。

【図7A】図7Aは、波長約775 nmにおけるAO、CD16-PC7、およびCD45-PC7の蛍光とSSの関係を表す実施例7で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも6種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、好塩基球と、芽球と、好酸球および未熟顆粒球を含有するクラスターとをこの表示中で識別し計数することができる。

【図7B】図7Bは、波長約675 nmにおけるAOの蛍光とSSの関係を表す実施例7で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわち好酸球と、好中球と、リンパ球および芽球を含有するクラスターと、単球および芽球を含有するもう一つのクラスターとを識別し計数することができる。

40

【図7C】図7Cは、波長約775 nmにおけるAO、CD16-PC7、およびCD45-PC7の蛍光と、図7Bから閉め出すことにより好酸球を除去した後のSSの関係を表す実施例7で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも6種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、好塩基球と、芽球と、未熟顆粒球とをこの表示中で識別し計数することができる。

【図8A】図8Aは、波長約525 nmにおけるAOの蛍光とSSの関係を表す実施例8で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、

50

すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、好酸球とをこの表示中で識別し計数することができる。

【図8B】図8Bは、波長約575 nmにおけるAOおよびCD16-PEの蛍光とSSの関係を表す実施例8で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも6種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好酸球と、好中球と、未熟顆粒球と、ナチュラルキラー細胞とを識別し計数することができる。

【図8C】図8Cは、波長約775 nmにおけるAOおよびCD45-PC7の蛍光と、波長約525 nmにおけるAOの蛍光の関係を表す実施例8で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも5種類の細胞集団、すなわちリンパ球および単球を含有するクラスターと、好塩基球と、好中球と、未熟顆粒球と、有核RBCとを識別し計数することができる。

10

【図9A】図9Aは、波長約525 nmにおけるAOの蛍光とSSの関係を表す実施例9で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも4種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、好酸球とをこの表示中で識別し計数することができる。

【図9B】図9Bは、波長約755 nmにおけるAOおよびCD16-PC7の蛍光と、図9Aから閉め出すことにより好酸球を除去した後のSSの関係を表す実施例9で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも5種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、未熟顆粒球と、ナチュラルキラー細胞とを識別し計数することができる。

20

【図9C】図9Cは、波長約755 nmにおけるAOおよびCD16-PC7の蛍光と、図9Aから閉め出すことにより好酸球を除去した後の波長約575 nmにおけるAOおよびCD45-PEの蛍光の関係を表す実施例9で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムであり、少なくとも6種類の細胞集団、すなわちリンパ球と、単球と、好中球と、未熟顆粒球と、有核赤色血液細胞と、ナチュラルキラー細胞とを識別し計数することができる。

【発明を実施するための形態】

【0019】

本発明は、複数の細胞型に対する、例えば好ましくは5種類の正常な白血球集団および少なくとも2種類の非定型集団に対する自動化され、迅速な、拡張された白血球の識別を行うための方法を提供する。このような方法に使用するための試薬を含む組成物もまた本明細書中で提供される。

30

一実施形態では生物試料中の細胞集団を計数する方法には次のステップが含まれる。その生物試料を、第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体と反応させることによって単一反応混合物を形成する。この第一の抗体は、この試料中の白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。成熟および未熟の顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する少なくとも1種類の追加の異なる抗体をこの反応混合物に加える。この方法の一実施形態ではこの追加の抗体は、同じ第一の蛍光色素で標識される。別の実施形態ではこの追加の抗体は、第一の蛍光色素の第一の発光スペクトルと識別できるもう一つの発光スペクトルを有する追加の蛍光色素で標識される。この方法のさらにもう一つの実施形態ではまた他の「追加の」抗体をこの反応混合物に加えることもでき、それらの抗体は同一の蛍光色素、または前述の抗体を標識する蛍光色素とはさらに別の発光スペクトルを有する蛍光色素で標識することができる。望ましくは本発明の方法および組成物は、2または3種類の抗体（すなわち1または2種類の「追加の」抗体）のみを使用する。

40

【0020】

本発明の方法によれば、得られる単一反応混合物を別の成分で処理することができる。この方法の一実施形態ではその追加の成分は、その試料中に存在する任意の赤色血液細胞を違った形で溶血することができ、かつその試料中の白血球集団を保存することができる溶血系である。反応混合物中の非有核血液細胞の他と異なる溶血と、その有核細胞の固有または外因性の性質を変えることのない溶血作用の任意のクエンチングとが、分析のため

50

の有核細胞の保持を可能にする。この方法の別の実施形態ではその第三の成分は、上記で言及した抗体を標識する蛍光色素の第一の発光スペクトルまたはもう一つの発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素である。本発明のさらに別の実施形態では核酸色素と溶血系の両方がその単一反応混合物に加えらる。

【0021】

反応混合物の調製の後はこの混合物を、複数パラメータについて混合物を測定する単一分析ステップのマルチパラメータ高処理量流動式血液分析計の単一フローアパーチャを通過させる。これらのパラメータは、同一でも異なってもよく、1つまたは複数の蛍光のチャンネル、1つまたは複数の光学的パラメータ、1つまたは複数の電気的パラメータ、またはこれらの組合せを含む。したがって各細胞集団は、細胞集団当たりこれらパラメータの少なくとも2つを使用することによって識別され計数される。

10

【0022】

この方法の最後のステップは、それぞれ別の細胞集団について少なくとも2つのパラメータを分析することによってその試料中の血液学的細胞（および任意選択で幾つかの非定型の非血液学的細胞）の複数集団を計数するものである。例えば、一実施形態では蛍光分析を、試料が細胞集団の識別のためにそのトランスデューサを通過するときそれぞれ個々の細胞上で行われる少なくとも1種類の同時に測定される電気的または光学的測定と組み合わせる。このやり方では広範な識別は、その試料中に溶血または非溶血画分がもし存在するとしてもそのさらなる分離を必要とせず、また様々なトランスデューサ中で試料中の様々な細胞上で行われる様々な測定の相関を必要とせずに行われる。

20

【0023】

したがって本発明の方法は、普通でない応用法で、すなわち色素と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する標識抗体との組合せを選択することによりモノクローナル抗体および核酸色素を使用し、それによって試薬および機器の最小限の使用で複数細胞型の識別を可能にする新しい「フットプリント」を創り出す。

【0024】

本発明の方法および本明細書で有用な組成物の様々な実施形態を下記で詳細に記述する。

【0025】

A 生物試料

本発明によれば生物試料は、白血球を含有する任意の哺乳動物細胞含有懸濁液である。このような標本または試料は、血液学的細胞および非血液学的細胞を含むことができる。このような試料には、全血、末梢血、骨髓吸引液、リンパ節組織、脾組織、脳脊髄液、皮膚組織、粘膜組織、胸腔穿刺液、胸膜液、および髄液が挙げられるがこれに限定されない。血液学的細胞集団は、単球、リンパ球、好中球、好酸球、好塩基球、骨髓球、後骨髓球、前骨髓球、未熟顆粒球、杆状細胞、芽細胞、変異型リンパ球、および非定型リンパ球からなる群から選択される。非血液学的細胞集団には、赤色血液細胞、有核赤色細胞、血小板、および巨核球が含まれる。この血液中で非定型細胞には、骨髓球、後骨髓球、前骨髓球、未熟顆粒球、杆状細胞、芽細胞、非定型リンパ球、変異型リンパ球、有核赤色細胞、巨血小板、形質細胞などが含まれる。非血液学的細胞には、とりわけ上皮細胞および内皮細胞が挙げられる。

30

40

【0026】

好ましくは生物試料は、5種類の「正常な」白血球集団を含有するヒトの全血または末梢血試料であり、これらは単球、リンパ球、好中球、好酸球、および好塩基球、ならびにことによると疾患や、悪条件の刺激、例えば発癌物質に対する反応や、療養治療の結果が原因の多数の非定型細胞集団である。したがって本発明の方法による分析に適した試料はヒトの患者の血液試料であり、これらは成熟および未熟白血球細胞と非白血球集団の両方、ならびに非定型細胞をたぶん含有する。例えば、試料は芽細胞を含有する。別の試料は有核赤色血液細胞を含有する。別の例としてこの試料は未熟顆粒球を含有する。別の例と

50

してこの試料は非定型リンパ球を含有する。正常でない試料中の細胞の他の組合せもまた、本発明の方法および組成物によって分析することができる。

【0027】

本発明の方法をこのような生物試料に適用することにより、様々な疾患の診断、予後、病期分類、および治療の一助となる情報をこの試料の「広範な」すなわち「5つ以上の要素」の識別に基づいて作成することができる。望ましくは本発明の方法は、6要素の識別、7要素の識別、8要素の識別、9要素の識別、または10要素の識別を提供する。10種類を超える細胞集団の識別もまた、上記で指摘したようにその反応混合物の成分の選択によっては、またその試料の性質、例えば血液、骨髄などによっては本発明の方法からもたらされる可能性がある。

10

【0028】

本発明の方法を使用する場合、その生物試料の容積はそのシステムの必要条件を満たすように変えることができるが、好ましくは約10 μ Lから約150 μ Lの範囲にある。

【0029】

B 本発明の組成物 / この方法の成分

1 抗体

少なくとも1つの他のパラメータの測定値と関連して本発明の組成物に有用な抗体によって与えられる蛍光シグナルは、単一の分析過程での包括的な広範な細胞識別にとって必要なデータを提供する。その試料と共に単一反応混合物を形成する試薬の組成は、追加の機器（レーザー、光電子増倍管など）または3種類以上の蛍光色素標識を組み込むことなくわずか2または3種類の抗体（2または3種類の性質の異なる抗原決定基に向けられる）を利用することができるように設計される。それはまた、その組成物内の個々の抗体特異性が相互に関連して、また電気的パラメータまたは散乱光パラメータと関連して、一回の分析でその大部分の情報を提供することができるように設計される。

20

【0030】

したがって本発明の方法に有用な組成物は、その試料中の細胞上に存在する3種類以上の抗原決定基を識別する情報を与えることができる、望ましくは少なくとも2種類の抗体を含有する。一実施形態ではこの識別は、同じ発光スペクトルまたは異なる発光スペクトルのどちらかを有するわずか1種類または2種類の蛍光色素を用いることによって可能になる。一実施形態では同じ蛍光色素で標識した本発明による少なくとも2種類の抗体を利用する。別の実施形態では異なる蛍光色素で標識した本発明による少なくとも2種類の抗体を利用する。別の実施形態では、それぞれが相異なる蛍光色素で標識された、またはその他の抗体の少なくとも一方と同じ蛍光色素で標識された本発明による少なくとも3種類の抗体を利用する。

30

【0031】

本明細書中で用いる用語「抗体」は、クラスIgG、IgM、IgA、IgD、およびIgEのポリクローナル、モノクローナル、合成、または組換え抗体を包含するものとする。これらに限定されないが上記の無傷抗体の1種類または複数種類のFab断片、Fab断片、F(ab)²断片、またはFc抗体断片を含めた抗体断片もまた有用である。同様に、単鎖可変抗体断片または抗体の相補性決定領域（CDR）を含む組換え構築物をこれら方法に有用な抗体として使用することもできる。さらに所望の細胞表面の抗原を拘束する抗体の機能的に同等の結合特性を保持するのに十分なCDRを共用する合成抗体またはキメラ抗体あるいはヒト化抗体構築物もまた最上の抗体として使用することができる。好ましくは高度に特異的な抗体がこの方法では用いられる。

40

【0032】

この反応混合物中で用いられる個々の抗体は、散乱光および/または電気的パラメータと関連した特定の組合せが所望の広範な識別情報を提供するように選択される。この方法で使用することができる抗体には、白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する少なくとも1種類の「第一」の抗体がある。このような抗原決定基は、非白血球には全く不在であり、白血球上でのみ発現することができる。別

50

法ではこのような抗原決定基は、白血球上で多量に発現することができ、非白血球上では極微で発現する。したがってこのような抗体は、RBC、有核赤色血液細胞、または血小板などの非白色血液細胞からの白色血液細胞の識別および識別を可能にする。好ましい実施形態ではその第一の抗体はまた、未熟白血球が成熟し老化するに従って抗原決定基の白血球上での他と異なる発現に基づいて成熟白血球と未熟白血球を識別することができる。

【0033】

この目的で最も望ましい抗体は抗CD45である。CD45抗原は、白血球集団中の大部分の細胞によって発現するか、またはその上に存在するが、好酸球および巨核球などの他の造血細胞上では発現しないか、または発現したとしても極微に発現するのみである。リンパ球が比較的高い発現を示し、一方好塩基球が比較的低い発現を示すように差別的な発現を白血球集団内で見せることができる。CD45抗原の発現もまた、白血球の成熟ステップの関数として変わる可能性がある。例えば芽球または幹細胞は、それらの成熟した対応するものよりも少ないCD45抗原を発現させる。白色細胞、非白色細胞、および芽球の間で類似の差別的な結合の発現を有する他の抗体、とりわけ抗CD11a、抗CD50、抗CD18、抗CD53、および抗CD62Lを含めた抗体を、本明細書中で述べた組成物および方法において第一の抗体として用いることができる。グリコホリンAに対する抗CD235a、抗CD235b、抗CD236、抗CD236r、抗CD239、抗CD240、抗CD241、および抗CD242もまた有用である。さらに、他の有用な第一の抗体には、抗CD48、抗CD82、抗CD235c、および抗CD36を挙げることができる。

10

【0034】

単一反応混合物の一部または組成物の一部を形成するこの「追加の」抗体には、成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する1種類または複数種類の抗体が挙げられる。例えばCD16抗原の分布は、白血球の発現に関してはCD45よりも限定されている。CD16抗原は2種類のアイソフォーム、すなわちCD16 および CD16 を有する。CD16 は、分葉核好中球および杆状球上で強く発現し、骨髄球系列の他の細胞上では弱いかまたは全く発現しない。これとは対照的にCD16 は、ナチュラルキラー（NK）細胞として分類される白血球の部分集合上、また単球およびマクロファージ上で発現する。CD16エピトープ（CD16 および CD16 ）に対して幅広い発現を有する抗体は、分葉核好中球、杆状球、NK細胞、単球、およびマクロファージ上で強く発現し、また骨髄球系列中の他の細胞上では弱いかまたは全く発現しない。したがって抗CD45ならびにこの方法で選択される追加の光学的および電気的パラメータとの関連においてこの1種類または複数種類の追加の抗体の蛍光により、分化した骨髄細胞、未熟骨髄前駆物質、および幹細胞もしくは芽球を識別し、識別することができる。例えばこのCD16抗原は好中球の固有の性質よりもずっと多く保存される可能性があるため、抗CD16もまた老化、療養治療、およびある種の顆粒球減少条件が原因で起こる可能性のあるような脱顆粒した（脱顆粒性）好中球を識別するのに用いることができる。さらにNK細胞を識別することができる。この方法または組成物中で1種類または複数種類の「追加の」抗体として用いるための成熟および未熟骨髄細胞を識別する有用な結合特性を有する他の抗体には、これらに限定されないがCD11b、CD15、CD24、CD35、CD10、CD49d、CD64、およびCD87に対する抗体が挙げられる。

20

30

【0035】

この組成物または反応混合物中で使用することができるさらなる抗体は、望ましくは、別のWBC上で異なる細胞表面決定因子と結合するかまたは特異的に反応するものである。例えばそのCD19抗原は、未熟プレB細胞から成熟Bリンパ球までのB系列の細胞上で発現するBリンパ球特異的抗原である。それはB細胞を規定する古典的エピトープである。この抗体、抗CD19は、未熟および成熟B細胞と結合し、B細胞起源の芽球を識別するために用いることができ、またCD45の結合により識別される他のWBCとは別個にこのような芽細胞の識別を可能にする。非定型WBCには、未熟顆粒球、芽球、杆状細胞、および非定型リンパ球が含まれる。このような非定型細胞に対して特異的な細胞決定因子と結合する抗体には、芽球と結合するCD34や、CD117などがある。これらの追加の抗体の使用は、非定型細胞間のさらなる識別および識別を可能にする。

40

50

【0036】

2 蛍光色素

好ましくは本発明の組成物または方法中で用いるために選択される各抗体は、蛍光色素と呼ばれる蛍光検出可能な標識と会合または接合している。蛍光色素は、一般に診断検査に用いられる。一般に用いられる蛍光色素には、フルオレセインイソチオシアナート (FITC)、フィコエリトリン (PE)、アロフィコシアニン (APC)、が挙げられ、またタンデム色素、すなわちPE - シアニン - 5 (PC5)、PE - シアニン - 7 (PC7)、PE - シアニン - 5.5、PE - テキサスレッド (ECD)、ローダミン、PerCPが挙げられる。タンデム色素ではないアレクサ色素もまた有用である。そのフローサイトメトリー装置で使用されるレーザーの種類によってはこのような標識の組合せ、なかでもテキサスレッドとローダミン、FITC + PE、FITC + PECy5、およびPE + PECy7などを用いることができる。赤色、青色、または緑色の波長、またはこれら波長の組合せの放射エネルギーにより励起可能なものを含めて任意の蛍光色素を使用することができる。複数の蛍光色素を独立に入手可能な蛍光色素から選択することができる。別法ではビオチン - アビジン標識または一次および二次標識した抗体などの間接的な標識方法が、同様の効果を達成するのに有用である。

10

【0037】

これら蛍光性色素のすべてが市販されており、またそれらの使用法も当業界で知られている。さらに他の蛍光性色素を他の供給源から入手できる可能性もあり、また将来開発される可能性もある。このような色素は、下記実施例の蛍光性色素の実例と同じように本発明の方法において有用であると予想される。本発明の一実施形態によれば、ただ1種類の蛍光色素が、第一の抗体および少なくとも1種類の追加の抗体の両方を標識するために使用される。本発明の別の実施形態によれば2種類の蛍光色素が用いられる。一局面では2種類の蛍光色素、例えばPEとPECy7などを使用する場合、それぞれが識別して検出可能な発光スペクトルを有する。別の局面では2種類の蛍光色素を使用する場合、それぞれが部分的に重なり合う検出可能な発光スペクトルを有する。本発明で使用するために選択される結合蛍光色素 (1種または複数種のレーザーを用いる) には、PE + PECy5、PE + APC、FITC + PE、APC + PECy7、およびPE + PECy7が挙げられる。さらに別の実施形態ではその組成物および方法で使用される蛍光色素標識のピーク発光スペクトルは、そのような形で利用される場合、下記のようにその核酸色素のピーク発光スペクトルと部分的に重なり合ってもよい。

20

30

【0038】

この標識をその抗体と結合または会合させる方法も同様に従来のものであり、当業者に知られている。標識付着の既知の方法については下記に記載されている (例えば、なかでもHandbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, 第6版, R. P. Haugland, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 1996、Pierce Catalog and Handbook, Life Science and Analytical Research Products, Pierce Chemical Company, Rockford, IL, 1994/1995、米国特許第6,692,968号明細書および同第5,164,311号明細書を参照されたい)。したがって蛍光色素標識および結合方法の選択は本発明を限定しない。

【0039】

本発明の方法に用いられる抗体の最適濃度は、1種類か2種類のみ蛍光色素標識を有する複数抗体を使用する場合、選択される標識、望ましい染色強度、反応速度、および蛍光チャネル間の蛍光キャリーオーバーに基づいて定められる。そのような濃度については、本発明のこれら教示を与えられた当業者が決めることができる。

40

【0040】

3 任意の核酸色素

本発明の組成物および方法の幾つかの実施形態には、核酸色素すなわち細胞親和性色素が含まれる。本発明に有用な核酸色素は、その組成物および方法における第一の抗体または追加の抗体を標識する蛍光色素の発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する。一実施形態ではその核酸色素の発光スペクトルは、本発明のこれら組成物および方法に有用な複数の蛍光色素と部分的に重なり合う。

50

【 0 0 4 1 】

一実施形態では核酸色素は細胞浸透性色素である。用語「細胞浸透性」とは、組成物または反応混合物中の浸透化剤のさらなる存在を必要とせずに細胞膜に容易に浸透し、またその細胞の成分を染める色素を記述することを意図している。一般には細胞浸透性色素は、溶血されなかった生細胞または細胞成分を染めるために利用される。

【 0 0 4 2 】

別の実施形態ではこの核酸色素は細胞非透過性色素、例えば赤色、緑色、または青色で励起される波長領域内にある細胞非透過性色素である。

【 0 0 4 3 】

さらなる実施形態では核酸色素は、挿入色素または異染色素である。例えばUrban等の論文、2000 Acta. Histochem. 102:259-272中で言及されている異染色素を参照されたい。

10

【 0 0 4 4 】

さらなる実施形態では核酸色素は非異染色素である。用語「非異染色素」とは、予め決められた波長を照射したとき、単一波長の励起および/または発光をもたらす蛍光色素を記述することを意図している。

【 0 0 4 5 】

本発明で利用することができる核酸色素の例には、これらに限定されないがピロニンY色素と、アクリジンオレンジ色素、ノニルアクリジンオレンジ色素（臭化3,6-ビス-（ジメチルアミノ）-10-ノニルアクリジニウム、Molecular Probes, Eugene, OR）、およびアクリジンレッド色素（またピロニンBとして市販されている、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）などのアクリジン色素と、チアゾールオレンジ色素（Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ）と、ヨウ化プロピジウム（3,8-ジアミノ-5-（3-ジエチルアミノプロピル）-6-フェニル-フェナントリジニウムヨーゾドメチオゾド、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）と、臭化エチジウム（Sigma Aldrich Corp., St. Louis, MO）と、ヨウ化ヘキシジウム（Molecular Probes, Eugene, OR）と、ジヒドロエチジウム（Molecular Probes, Eugene, OR）と、エチジウムモノアジド（Molecular Probes, Eugene, OR）と、トルイジンブルー色素（2-アミノ-7-ジメチルアミノ-3-メチルフェノチアジニウム塩化物、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）と、TOPRO-3色素と、YOPRO-1色素と、SYTO(商標)17色素およびSYTO(商標)59色素~SYTO(商標)64色素などのSYTO(商標)色素と、TOTO-1色素およびTOTO-3色素などのTOTO(商標)色素と、PO-PRO-3色素と、YOYO-1色素などのYOYO(商標)色素と、BOBO(商標)色素と、POPO-3色素などのPOPO(商標)色素と、キサンテン色素と、カルボシアニン色素と、アストラバイオレットFRを含めたポリメチン色素と、チオファルピンTと、プソイドイソシアニンと、オキサカルボシアニン色素と、アジン色素と、ジフェニルメーターン色素と、メチン色素と、オキサジン色素と、シアニン色素と、スチリル色素と、ヒドロシスチルバミジン（Molecular Probes, Eugene, OR）とが挙げられる。これら色素の多く色素、および本発明で利用することができる他の色素は、Molecular Probes Inc. (Eugene, OR) から市販されている。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第5,563,070号明細書を参照されたい。

20

30

【 0 0 4 6 】

非異染色素の例には、これらに限定されないが、ニュートラルレッド色素（3-アミノ-7-ジメチルアミノ-2-メチルフェナジン塩酸塩、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）、Basic Orange(商標)21色素（Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）、DiOC色素（1,1-ジメチルオキサカルボシアニン、Molecular Probes, Eugene, OR）、Pyronin(商標)Y色素（Polysciences, Inc., Washington, PA）、Methylene Blue(商標)色素（3-ビス-（ジメチルアミノ）-フェノチアジン-5-イウム塩化物、Molecular Probes, Eugene, OR）、Auramine(商標)O色素（4,4'-（イミドカルボニル）-ビス-（N,N-ジメチルアニリン）一塩酸塩、Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO）、LDS(商標)751色素（キノリニウム、6-（ジメチルアミノ）-2-[4-[4-（ジメチルアミノ）フェニル]-1,3-ブタジエニル]-2-エチル過塩素酸塩、Molecular Probes, Eugene, OR）、なかでも

40

50

これらのレッドシリーズ、およびこれらの組合せが挙げられる。例えば、様々なBeckman Coulterカタログ類、The Handbook of Fluorescent Probes and Research Products, 第6版, R. P. Haugland, Molecular Probes, Eugene, ORを参照されたい。幾つかの色素は、ある種の環境下で異染色素であり、また他の環境下で非異染色素である場合があることに留意すべきである。

【0047】

本発明の組成物および方法の一実施形態ではその核酸色素は、アクリジンオレンジまたはノニルアクリジンオレンジである。別の実施形態ではその色素は、チアゾールオレンジである。さらに別の実施形態ではその色素は、ヨウ化プロピジウムである。別の実施形態ではその色素は、アクリジンレッドまたはトルイジンブルー色素である。

10

【0048】

当業者ならば本明細書に含まれているさらなる教示を考慮してこれらの組成物および方法に使用する適切な色素を容易に選択することができるはずである。

【0049】

4 任意の溶血系

任意の溶血系を使用して、その白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら、なおその上に有核赤色血液細胞(NRBC)を保存しながら、生物試料中の非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血することができる。一実施形態では溶血系が、核酸色素の不在下の方法または組成物の成分である。別の実施形態では溶血系を核酸色素の存在下で使用することができ、その場合一般には上記のように核酸色素は非浸透性色素である。幾つかの実施形態では溶血系は、単一の溶血試薬を含むことができる。他の実施形態では溶血系は、失活のステップとそのための試薬を含むことができる。幾つかの実施形態では溶血系は、固定のステップとそのための試薬を含むことができる。

20

【0050】

溶血系は、これには限定されないがErythrolyse II (Beckman Coulter, Inc.)を含めた溶血試薬であることができ、この溶血試薬は米国特許第5,882,933号明細書に開示されており、この特許はその素性を確認する目的で参照により本明細書に組み込まれる。溶血試薬は様々であることができ、その主要な必要条件は赤色血液細胞の効率的な溶血、ならびにWBCとNRBC上および所望の非定型細胞上の抗原決定基と所望の電気的および光学的特性との保存である。

30

【0051】

溶血用単一試薬の使用に加えて、本発明に有用な溶血系には第二の試薬、例えばその方法の残りのステップの間に、例えばその試料がトランスデューサ・モジュールのアーチキュアを通して流れる間にその溶血試薬の効果を消しまたは遅らせるものが挙げられる。有用な溶血遅延剤はその溶血剤に応じて選択することができ、速度が問題である場合にのみ使用される可能性が高い。このような溶血遅延剤の例は、Stabilysis(商標)試薬(Beckman Coulter, Inc.)である。この溶血遅延試薬は、考察対象の細胞上での溶血作用のクエンチング、ならびに抗原決定基と所望の電気的および光学的特性との保存という主要な必要条件が達成されるという条件で変えることができる。

【0052】

通常固定試薬もまた、溶血試薬の選択またはこの方法の好ましい具体化によっては使用することができる。

40

【0053】

他の溶血系も市場で売られており、これらにはImmunoprep(商標)系、Versalyse(商標)系、FACSllyse(商標)系(Bectin Dickenson)、または塩化アンモニウム系が挙げられる。

【0054】

5 他の任意の成分

球状化剤を場合により本発明の組成物、反応混合物、および方法中に含ませることができ、当業者が容易に選択することができる。望ましくはこの球状化剤は、赤色血液細胞および網状赤血球を等積的に球状化し、かつ浸透性を増大させる両性イオン界面活性剤であ

50

る。このような試薬はまた界面活性剤としても働く。球状化剤の例には、好適にはリン酸緩衝塩類液などの緩衝液により溶液状態にある非イオン界面活性剤ドデシル - D - マルトシド、あるいはアルキルアミドベタインまたはアルキルベタイン、例えばラウロアミドプロピルベタイン、ココアミドプロピルベタイン、およびココアミドスルホベタインや、N - テトラデシル - N,N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホナートや、N - ドデシル - N,N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホナートなどの両性イオン物質が挙げられる。参照により本明細書に組み込まれている米国特許第5,633,167号明細書および同第5,438,003号明細書を参照されたい。血液試料内の網状赤血球および赤色血液細胞を効果的に等積的に球状化するには、最も好ましくはその組成物中の球状化剤の濃度は、約200 mOsmから約400 mOsm、好ましくは約250 mOsm から350 mOsmの範囲内のmOsmで約3 µg/mLから約50 µg/mLである。しかし当業者は、その選択される界面活性剤を考慮に入れて、その細胞を等積的に球状化するのに必要なまたは望ましいその濃度および浸透圧モル濃度を容易に調整することができる。

10

【0055】

また、細胞を浸透性にする幾種類かの界面活性剤および洗浄剤を、本発明の組成物中で使用することもまた可能である。界面活性剤の例には、これらに限定されないがアニオン界面活性剤ペルフルオロアルキルカルボン酸アンモニウム (Fluorad(登録商標)FC-143として市販されている (3M Company, Minneapolis, Minnesota)) およびラウロイルミリストイル乳酸ナトリウム (Pationic(登録商標)138Cとして市販されている (R. I. T. A. Corp. Woodstock, Illinois)) や、非イオン界面活性剤からはドデシル - D - マルトシド、N,N - ビス [3 - D - グルコン - アミドプロピル] コラミド、ポリオキシプロピレン - ポリオキシエチレンブロックコポリマー、N - テトラデシル - D - マルトシド、ダコニル - N - メチル - グルカミド、n - ドデシル - D - グルコピラノシド、n - デシル - D - グルコピラノシド、ステアリン酸のポリエチレングリコールエステル、エトキシ化ココモノグリセリド、オクチフェノキシポリ (エチレンオキシ) エタノール、エトキシ化オクチフェノール、および直鎖アルコールや、カチオン界面活性剤のなかからはココヒドロキシエチルイミダゾリン、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、臭化デシルトリメチルアンモニウム、臭化オクチルトリメチルアンモニウムや、両性イオン界面活性剤のなかからはラウラミドプロピルベタイン、N - テトラデシル - N,N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホナート、N - ドデシル - N,N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホナート、ココアミドプロピルベタイン、ココアミドスルホベタイン、N - ドデシル - N,N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホナート、N - テトラデシル - N,N - ジメチル - 3 - アンモニオ - 1 - プロパンスルホナートが挙げられる。洗浄剤の例には、これらに限定されないが非イオン洗浄剤が挙げられる。

20

30

【0056】

他の細胞浸透化剤もまた、細胞非浸透性色素の細胞膜透過を可能にするために本発明の組成物中に含ませることができる。望ましくはこれらの成分は、その全組成の約0から約1%の間の濃度で用いられる。

【0057】

本発明の組成物は、さらに緩衝液などの他の成分を含有することができる。好適な緩衝液には、その組成物のpHを約6から約9の範囲に保つものが挙げられる。望ましくは約7から約7.5の範囲のpHが組成物中で維持される。さらにこのような緩衝液はまた、本発明の組成物の1種類または複数種類の成分の濃度を調整するために用いることもできる。本発明で使用することができる緩衝液の例には、これらに限定されないがリン酸緩衝塩類液、またはISOTON II (Coulter Corporation, Miami, FL) などの等張塩類液が挙げられる。参照により本明細書に組み込まれる米国特許第3,962,125号明細書を参照されたい。適切な緩衝液の選択は、本発明に関する制約ではない。

40

【0058】

保存剤もまた本発明の組成物に加えることができ、これらに限定されないが5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オンおよび2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オ

50

ンから選択することができる（このような保存剤は、例えばProClin 300またはProClin 150として市場で購入することができる）。

【0059】

当業者は、本発明で用いる組成物に利用することが可能なさらなる試薬を選択することができるはずである。

【0060】

6 特定の実施形態

本発明の組成物は適切な方法で一般に調製される。一実施形態ではその試料自体以外の反応混合物のすべての成分を集めてキットを形成することができる。

【0061】

そのような一組成物は、上記の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD45-PECy7で標識した第一の抗体と、上記の「追加の抗体」の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD16-PECy7で標識した第二の抗体と、核酸色素、例えばアクリジンオレンジとを含有する。キットの形態のこの組成物はまた、キットにとっては普通の他の品目のなかでも本発明の方法を実施するための適切な包装、ガラス製品、または容器の構成要素と、使用説明書とを含有することができる。これらの成分を含有する組成物は、生物試料と混ぜ合わせて単一反応混合物にするように設計され、上記混合物はその試料中の少なくとも8種類またはそれ以上の血液細胞集団を計数することを可能にする。

【0062】

別の実施形態では本発明の組成物は、上記の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD45-PECy7で標識した第一の抗体と、上記の「追加の抗体」の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD16-PECy7で標識した第二の抗体と、溶血用でかつクエンチング用の試薬を含有する溶血系とを含有する。上記のようにこれらの類似のキット構成要素が含まれてもよい。これらの成分を含有する組成物は、生物試料と混ぜ合わせて単一反応混合物にするように設計され、上記混合物はその試料中の少なくとも7種類またはそれ以上の血液細胞集団を計数することを可能にする。

【0063】

さらに別の実施形態では本発明の組成物は、上記の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD45-PECy7で標識した第一の抗体と、上記の「追加の抗体」の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD16-PECy7で標識した第二の抗体と、溶血用でかつクエンチング用の試薬を含有する溶血系と、核酸色素、例えばアクリジンオレンジとを含有する。上記のようにこれらの類似のキット構成要素が含まれてもよい。

【0064】

別の実施形態では組成物は、上記の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD45-PECy7で標識した第一の抗体と、上記の「追加の抗体」の記述に適合し、かつ異なる発光スペクトルを有する第二の蛍光色素、例えば抗CD16PEで標識した第二の抗体と、核酸色素、例えばアクリジンオレンジとを含有する。この組成物は、キットの形態の場合にはまた、キットにとっては普通の他の品目のなかでも本発明の方法を実施するための適切な包装、ガラス製品、または容器の構成要素と、使用説明書とを含有することができる。

【0065】

さらに別の実施形態では本発明の組成物は、上記の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD45-PECy7で標識した第一の抗体と、上記の「追加の抗体」の記述に適合し、かつ第二の蛍光色素、例えば抗CD16FITCで標識した第二の抗体と、溶血用でかつクエンチング用の試薬を含有する溶血系とを含有する。上記のようにこれらの類似のキット構成要素が含まれてもよい。

【0066】

さらに別の実施形態では本発明の組成物は、上記の記述に適合し、かつ第一の蛍光色素、例えば抗CD45-PECy7で標識した第一の抗体と、上記の「追加の抗体」の記述に適合し、かつ第二の蛍光色素、例えば抗CD16-PEで標識した第二の抗体と、溶血用でかつクエンチング用の試薬を含有する溶血系と、核酸色素、例えばアクリジンオレンジとを含有する。

上記のようにこれらの類似のキット構成要素が含まれてもよい。

【0067】

これらすべての実施形態は、同一または異なる蛍光色素標識を有する2種類以上の追加の抗体、球状化剤、または前述の他の成分を含めた上記の追加の成分のいずれかを含有することができる。

【0068】

またさらなる態様では本発明の組成物は、個別的な成分として、白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する第一の抗体と、成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現をする抗原決定基と結合する少なくとも1種類の追加の抗体と、第一の抗体および任意選択で少なくとも1種類の追加の抗体と会合させるための第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素と、追加の抗体と会合させるための上記第一の発光スペクトルと識別できるさらなる発光スペクトルを有する追加の蛍光色素と、(1)上記試料中に存在する任意の赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血し、かつ生物試料中の白血球集団を保存することができる溶血系、または(2)上記の第一の発光スペクトルまたは上記のさらなる発光スペクトルの少なくとも一方と部分的に重なり合う発光スペクトルを有する核酸色素、または(3)これらの組合せから選択される1種類または複数種類の成分とを含有するキットであることができる。

【0069】

望ましくはこの組成物の上記成分用の包装が含まれる。別法ではこのようなキットはさらに、生物試料中の細胞集団を計数するための方法の実施用の使用説明書と、試料および混合用容器と、上記蛍光色素で上記抗体を標識するための試薬とのうちの1または複数のセットを含有する。キットのさらに他の通常の構成要素を容易に含ませることができる。

【0070】

C マルチパラメータ高処理量の血液検査法

したがって本発明によれば、生物試料中の正常および非定型両方の細胞集団の迅速な識別および分析のための方法は下記のステップを用いて行われる。必要に応じて幾つかのステップは手動で行うこともできるが、好ましくはこれらの方法は完全に自動化される。

【0071】

1 単一反応混合物および溶血系を伴う方法

本発明の方法の一実施形態では単一反応混合物は、生物試料、例えば約10~200 μ Lを上記「第一の」抗体、約0.1から約2 μ gと反応させることによって形成される。一実施形態では約100 μ Lの試料が用いられる。この第一の抗体の試料中の白血球との結合は、その赤色血液細胞および有核赤色血液細胞との結合と識別することができる。この第一の抗体上の同じ蛍光色素が、またはこの第一の蛍光色素の発光スペクトルと識別できる発光スペクトルを有する第二の蛍光色素のいずれかで標識された少なくとも1種類の上記「追加の」抗体、例えば約0.1から約2 μ gをこの混合物中に導入する。この追加の抗体は、相異なる成熟および未熟顆粒球または骨髄細胞の識別を可能にする。これは、その様々な型の未熟細胞を「正常な」すなわち成熟白色細胞と識別することを可能にする。一実施形態ではその反応混合物は2種類の抗体を含有するが、より少種類またはより多種類の抗体(すなわち3種類)を使用することもできる。例えば上記のように、適切な標識により正常および非定型細胞(例えば成熟および未熟顆粒球、または骨髄細胞)の他の群間の識別を可能にする抗原決定基に向けられる2種類以上の追加の抗体もまた、この反応混合物中に含ませることができる。

【0072】

この反応混合物の成分は、室温でインキュベートすることによって反応する。その温度は問題ではないが、一般には周囲温度を使用する。そのインキュベーション/反応時間の値域は約15秒間から約15分間である。反応混合物に対する約1分間の反応時間は、その個々の抗体および試薬の濃度を調整し、その調合における球状化剤の使用と最適混合とを組み込むならば達成することができる。このタイプの急速反応時間は実験室で実証されており、自動化高処理量システムにとって必要である。

【0073】

本発明の方法のこの実施形態では、1種類または複数種類の試薬を伴う溶血系が、その反応混合物中に導入される。好ましくはこのステップは、上記のように試料/抗体の混合物の一部を溶血系または溶血試薬と約4から10秒間接触させることを含む溶血/失活反応を伴う。この溶血系は、その白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら、試料中に存在するいかなる非有核赤色血液細胞をもそれぞれ違った形で溶血する。次いで数秒間の後、この溶血系の効能は上記クエンチング試薬により遅延され失活され、RBCは試料中に白血球、もしあれば非定型細胞、および有核RBCを残して溶血される。一般にこのクエンチング試薬は、試料がサイトメトリー/血液分析計中のアパーチュアを通して流れる間、試料と接触している。したがってこの第二の試薬は、少なくとも数秒間その混合物と接触している。溶血試薬、失活試薬、および固定試薬の量は、望むなら使用する溶血系の素性に依じて当業者が容易に選択することができる。この反応混合物のインキュベーションおよびこれに続く溶血およびクエンチングのサイクルは、好ましくは完全に自動化される。

10

【0074】

抗体と任意選択の成分のいずれかを含むし、溶血RBCを含むまたは含まない試料は、次いでその試料がトランスデューサ・モジュールの単一アパーチュアを通過するときに細胞上で複数の相互に関連する測定値(電気的、蛍光、および光学的)を生成することができるトランスデューサの単一フローアパーチュアを通過する。したがってこのトランスデューサは、正常な白血球と、非定型白血球の少なくとも1種類(また好ましくは2種類以上)の分集団との定量分析を可能にする。それら細胞がトランスデューサを通過するときに複数の相互に関連する電気的、蛍光、および光学的測定値が各細胞上で生成される。細胞の蛍光は、好ましくはそれら細胞と結合する抗体を標識するために用いられる色素または蛍光色素のそれぞれの蛍光発光スペクトルによって決まる飛び飛びの複数の波長範囲内で測定される。一実施形態ではこの蛍光分析は、試料中の非白血球から白血球を識別することを可能にし、また少なくとも1種類の非定型細胞の分集団の識別を可能にする。

20

【0075】

その光学的パラメータは一般に散乱光の一つ、例えば側方散乱光または前方散乱光である。単一の蛍光色素のみを使用する場合、散乱光の2つ以上の角度を用いることができる。散乱光の角度は、約20から70度の間の散乱光、すなわち中角散乱光(MALS)、または約10から20度の間の散乱光、すなわちより低い側の中角散乱光(LMALS)、または約20から70度の間の散乱光、すなわち高い側の中角散乱光(UMALS)、または公称上の直交である約80から100度の間の散乱光、すなわち側方散乱光(SS)と、約2から18度の間の低角前方散乱光と、軸方向光損失または吸光度とから選択することができる。

30

【0076】

その電気的パラメータは、一般には容積の直流電気インピーダンス測定(DC)である。別法ではこの電気的パラメータは、その細胞の無線周波数割るDC容積として計算される不透明度であることができる。これらのパラメータは、本願の譲渡人に譲渡された米国特許第5,125,737号明細書で詳細に考察され、また定義されている。この特許は参照により本明細書に組み込まれる。

40

【0077】

上記フローサイトメトリーのステップは、手動で、部分的な手動および部分的自動で、または完全に自動で行うことができる。このような一つの自動化フローサイトメトリー計測器は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,228,652号明細書中に記載されており、この特許は前述の細胞特性、すなわちDC容積、RF導電率(不透明度)、散乱光、および蛍光特性を同時に求めることができ、それによって別々のトランスデューサから集められたデータを相互に関連づけるためのいかなる必要性も回避される。これら電気的測定値は、DC(直流容積/インピーダンス)およびRF(無線周波数)からなる。その光学的測定値には散乱光および蛍光が含まれる。この散乱光の測定値は、低、中、および高前進角の測定値、ならびに直角(90度/側方散乱光)測定値を含めた細胞上で収集される散乱の

50

複数の角度からなる。その蛍光測定値は、2個または3個の光電子倍增管または検出器（PMT）上で蛍光発光を収集することによって生成される。

【0078】

望ましくは電氣的、光学的、および蛍光パラメータを測定する血液計測器が、本発明の分析を行うのに有用である。例えば、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第6,228,532号明細書に記載の計測器を参照されたい。具体例としての実施形態では532 nm緑色ダイオードレーザーが、有用な流動式血液システム（flow hematology system）における照明源として用いられる。しかし当業者にとっては別の輝線を有するレーザー、例えば633 nmまたは644 nmレーザーなどの赤色レーザー、488 nmレーザーなどの青色レーザーに置き換え、蛍光色素を適切なやり方で調整することが可能である。色素は、そのレーザー系

10

【0079】

得られたデータは、広範な白血球識別分析結果を求めるために必要な情報を提供する。この方法によればそれぞれの細胞集団は、その単一反応混合物中の蛍光の蛍光分析で検出可能な発現のパターンを異にすることを利用して、少なくとも2種類のパラメータによって識別される。例えばこれら2種類のパラメータは、蛍光チャンネルと、側方散乱光などの光学的パラメータであることができる。細胞集団を識別するのに用いることができる別の2種類のパラメータは、2つの蛍光チャンネルであることができる。細胞集団を識別するのに用いることができる別の2種類のパラメータは、蛍光チャンネルと、電氣的パラメータ、例えばDCとであることができる。細胞集団を識別するのに用いることができる別の2種類の

20

【0080】

例えば様々な細胞集団は、使用される方法の変形形態、蛍光色素の素性、抗体、色素などによって決まるパラメータの下記の非限定的一覧表によって識別することができる。

【0081】

【表 1】

表 1

特定された細胞群	分析に使用するパラメータ
リンパ球	DC+RLS ; 蛍光 (FL) +SS
単球	DC+RLS ; SS+FL
顆粒球	DC+RLS ; FL+RLS ; FL+SS ; FL+FL
好酸球	FL+SS ; DC+RLS ; FL+FL
好塩基球	DC+RLS+RF ; FL+SS
芽細胞	FS+FL ; SS+FL ; DC+FL
未熟顆粒球	SS+FL ; DC+FL ; FL+FL
NRBC	2角度FS ; FS+FL ; FL+FL
NK細胞	FL+SS ; FL+DC ; FL+FL
異常リンパ球	FL+FL ; SS+FL
B細胞	DC+FL ; SS+FL ; FL+FL
非B細胞	SS+FL ; DC+FL
芽細胞系	FL+DC ; FL+SS
血小板	FS+SS ; FS+FL
未熟	FS+FL
網目状RBC	DC+FL ; FS+FL
芽細胞	FL+SS

10

20

【 0 0 8 2 】

上記のこの方法の実施形態では反応混合物のこの操作が、試料中の少なくとも7種類の血液学的細胞集団を計数することを可能にする。

【 0 0 8 3 】

したがって、第一の抗体、例えば抗CD45と、少なくとも1種類の追加の抗体、例えば抗CD16とがその反応混合物中で同じ蛍光色素で標識される実施形態において、溶血の後、蛍光のパラメータと、光学のパラメータまたは電気のパラメータとを用いて本発明を実施することによって識別することができる様々な細胞集団には、リンパ球、単球、顆粒球、好酸球、好塩基球、芽球、未熟顆粒球、およびNRBCが含まれる。

30

【 0 0 8 4 】

本発明の方法のさらに他の使用法は、本発明の相互に関係のあるマルチパラメータ分析を用いた末梢血標本中の有核赤色血液細胞 (NRBC) の検出を具体的に説明する。NRBCは、RLSおよび不透明度の画面ではデブリと混ざり合っているように見える。CD45は白血球系列の細胞上で発現するが赤血球細胞上では発現しないので、NRBCはCD45陰性集団内に局在化する。したがって最初にNRBCをCD45陰性事象から分離することによって他の有核細胞集団から隔離する。それらNRBCは、デブリと部分的に重なり合うが、CD45発現が不十分な老化したまたは脆弱な白血球などの他の事象を排除するCD45陰性の低SS集団として現れる。次いでこれらNRBCを、CD45陰性の低SS事象に関してゲートを設け、また単一パラメータまたはマルチパラメータのいずれかの画面中で散乱光の様々な角度または電気のパラメータでそれらを表すことによってデブリから分離することができる。

40

【 0 0 8 5 】

別の例としては、その第一の抗体、例えば抗CD45と、少なくとも1種類の追加の抗体、例えば抗CD16とを相異なる蛍光色素で標識する実施形態がある。その反応混合物において溶血の後に蛍光のパラメータと光学のパラメータまたは電気のパラメータとを用いて本発明を実施することによって識別することができる様々な細胞集団には、NK細胞を含めて上

50

記で計数した細胞が挙げられる。

【0086】

別の例としては、その第一の抗体、例えば抗CD45と、追加の抗体、例えば抗CD16とが同一の蛍光色素で標識され、かつ別の追加の抗体、例えばCD19がその反応混合物中で識別できる発光スペクトルを有する異なる蛍光色素で標識する実施形態において、溶血の後に蛍光のパラメータと光学的パラメータまたは電気的パラメータとを用いて本発明を実施することによって識別することができる様々な細胞集団には、上記で識別される細胞と、B細胞、非B細胞、および芽細胞系列とが挙げられる。

【0087】

この方法のこの実施形態は、末梢血中に普通に見出される5種類の成熟白血球集団（リンパ球、単球、顆粒球、好酸球、および好塩基球）をそれぞれ違った形で識別し、かつ赤血球および巨核球系列の細胞などのCD45の発現にない造血細胞を識別し、また幹細胞および芽球などの大部分の未分化細胞を識別することができる。

10

【0088】

3種類のモノクローナル抗体と、2種類の蛍光色素、例えば相異なる蛍光色素に接合した抗CD19および抗CD45に関しての抗CD16蛍光とを、追加の「選別」パラメータと共に使用する実施形態では、本発明の方法はB細胞、NK細胞、および非B / 非NK (T) 細胞を識別し、芽球を少なくとも2つの群（Bリンパ芽球および非Bリンパ芽球）に識別し下位分類し、良性のリンパ球増殖過程をB、NK、および非B / NK過程に分類し、B細胞慢性およびB細胞急性のリンパ球増殖過程間を差別化し識別し、また急性および慢性B細胞新生物を代表する非定型リンパ球の部分集合を識別する。

20

【0089】

この実施形態の特定の例を下記実施例1で述べる。この単一反応混合物は、第一の抗体として抗CD45PC5（フィコエリトリン - シアニン5）の最適濃度を含み、また追加の抗体、抗CD19PE（フィコエリトリン）、抗CD16PEを用いた。実施例1に述べるように同一または類似の一群のデータを生成するためにそのモノクローナル反応混液に対する様々な置換または付加が可能である。

【0090】

2 核酸色素を含有する単一反応混合物を使う方法

本発明の別の変形形態では単一反応混合物は、生物試料を上記「第一」の抗体および少なくとも1種類の上記「追加」の抗体と反応させることによって形成され、これら抗体は上記第一の方法で述べたと同じようにその第一の抗体上の同じ蛍光色素か、またはこの第一の蛍光色素の発光スペクトルと識別できるスペクトルを有する第二の蛍光色素のいずれかで標識される。

30

【0091】

この代替方法では追加の成分、すなわち核酸色素（0.5 μg/mLから約20 μg/mLの溶液を約10 μL、しかし抗体濃度、血液容積、インキュベーション、および / または混合回数を適切に調整するならば、より低いまたはより高い濃度も可能である）が、その単一反応混合物中に導入される。この核酸色素は、単一反応混合物中の蛍光色素で標識したそれら抗体の少なくとも1つの発光スペクトルと部分的に重なり合う発光スペクトルを有する。好ましくはこの蛍光色素標識のピーク発光スペクトルは、その細胞親和性色素のピーク発光スペクトルと部分的に重なり合う。本発明のこの実施形態の特徴は、それら抗体と接合した色素および蛍光色素が明瞭なピーク蛍光発光を有しないことである。したがってその検出システムのいずれかのチャンネルで検出される蛍光シグナルは、色素単独、蛍光色素接合抗体（群）単独、または色素と少なくとも1種類の蛍光色素接合抗体とを足した蛍光の産物のいずれかの蛍光発光に特徴的なものである。

40

【0092】

その反応混合物のこれらの成分は、第一の方法の実施形態について上記で述べたのと同条件下で反応させることが可能である。この実施形態ではその溶血系を反応混合物から除外してもよく、また上記実施形態について述べたと同様に反応混合物に加えてもよい。

50

この方法からの溶血系の省略は、望むなら、網目状RBCもしくは網目状RBCヘモグロビン、または巨核球もしくは血小板などの非有核細胞パラメータを計数することを可能にする。

【0093】

場合によっては溶血RBCを含む試料、抗体、核酸色素を含有するこの得られた単一反応混合物は、次にそれらがトランスデューサ・モジュールの単一アパーチュアを通過するときに細胞上で複数の相互に関連する測定値（電気的および光学的）を生成することができるトランスデューサの単一フローアパーチュアを通過する。フローサイトメーターの操作は上記のとおりであり、次いで分析をこれもまた上記と同様に一集団当たりパラメータ（蛍光、光学的、および電気的）の2つを用いることにより試料中の各細胞集団について行う。

10

【0094】

一実施形態ではこの評価に用いられるパラメータには、前方および側方散乱光と、最低少なくとも2つの蛍光チャンネルとが含まれる。その収集されるチャンネルのそれぞれの蛍光発光パターンは、その反応混合物中の色素単独、蛍光色素接合抗体単独、または色素と蛍光色素少なくとも1種類の光色素接合抗体とのスペクトルを足したもののいずれかを表している。しかしこの方法はまた、散乱光および蛍光測定値とともにインピーダンス（DC）および導電率（RF）のVCSパラメータを使用することもできる。上記で指摘したようにその色素が赤色励起性蛍光色素に接合した抗体と組み合わせて用いられる細胞親和性の赤色励起性色素である場合、488 nm青色アルゴンレーザー、緑色532 nmレーザー、または赤色レーザー（633 nm、635 nm、640 nm、または644 nm）を含めた複数の適切なレーザーを使用してその蛍光を励起することができる。

20

【0095】

上記方法の一実施形態では単一反応混合物のこの操作が、試料中の少なくとも8種類以上の血液細胞集団を計数することを可能にする。次いでその収集されたマルチパラメータデータを分析し、一細胞集団当たり2つのパラメータを使用して各細胞集団を識別する。例えば、蛍光データの少なくとも1つのチャンネル、あるいは蛍光データの2つのチャンネルと組み合わせた少なくとも1つの選別パラメータ（FS、SS、またはDC）を用いて広範な識別分析法が生み出される。この方法により識別される細胞集団には、少なくとも次の集団、すなわちリンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、NRBC、芽球、未熟顆粒球、非定型/変異型リンパ球が挙げられる。本発明の方法の実施形態を用いて識別可能なさらなる細胞集団には、造血幹細胞、ヘマトゴン（hematagones）、芽球系列、骨髓成熟指数、RBC成熟指数、ミエロイド/エリスロイド比および脆弱白色細胞分率、NK細胞、杆状球などが挙げられる。

30

【0096】

本明細書中で述べた特定の実施形態に関して、また下記の実施例においてその混合物中に含有されるモノクローナル抗体に対する置換および付加は、同一または類似の一組のデータを生成する能力に影響を及ぼすことなく行うことができる。特定の抗体と接合した蛍光色素はまた、例えばFITC、PE、ECD、またはPECy5を利用し、その核酸色素発光スペクトルの他の部分と部分的に重なり合うように変えることができる。さらにこれら抗体は、個々の抗体がその色素発光スペクトルの異なる部分と部分的に重なり合うように様々な接合体を有することができる。そのRBC溶血試薬もまた変えることができ、その主な必要条件は考察対象の細胞上の抗原決定基の保存および考察対象の細胞の望ましい固有の性質の保存である。当業者は、上記試薬系に対するこれらの変更を、実質上同じ結果を得る能力に欠陥を生じさせることなく使用することができる。

40

【0097】

例として、第一の抗体、例えば抗CD45と、少なくとも1種類の追加の抗体、例えば抗CD16とが同一の蛍光色素で標識され、かつ溶血なしで核酸色素アクリジンオレンジがその反応混合物に加えられる実施形態では、蛍光のパラメータと光学的または電気的パラメータとを用いる本発明の実施によって識別することができる様々な細胞集団には、さきに識別されたものに、さらに血小板、未熟血小板、および造血RBCを含めたものが挙げられる。

50

【0098】

別の例は、第一の抗体、例えば抗CD45と、少なくとも1種類の追加の抗体、例えば抗CD16とが同一の蛍光色素で標識され、かつ核酸色素アクリジンオレンジが、溶血系と共にその反応混合物に加えられる実施形態のものである。蛍光のパラメータと光学的または電気的パラメータとを用いた本発明の実施によって識別することができる様々な細胞集団には、リンパ球、単球、顆粒球、好酸球、好塩基球、未熟顆粒球、芽球、NRBC、NK細胞、および非定型または変異型リンパ球が挙げられる。

【0099】

別の例は、第一の抗体、例えば抗CD45と、少なくとも1種類の追加の抗体、例えば抗CD16とが相異なる蛍光色素で標識され、かつ核酸色素アクリジンオレンジが、溶血系と共にその反応混合物に加えられる実施形態である。蛍光のパラメータと光学的または電気的パラメータとを用いた本発明の実施によって識別することができる様々な細胞集団には、リンパ球、単球、顆粒球、好酸球、好塩基球、未熟顆粒球、芽球、NRBC、NK細胞、非定型または変異型リンパ球、活性単球、および杆状球が挙げられる。

【0100】

下記の実施例は、さらにこの方法の変形形態の他の実施形態を例示し、またその試料中の複数の細胞集団の識別を例示する。

【0101】

当業者が本明細書中の教示から容易に決めることができるように、これらの方法の多くの他の変形形態は、様々な蛍光、光学的パラメータ、および電気的パラメータの対と、選択される抗体、蛍光色素、および色素、ならびに反応混合物用の他の任意選択の成分とを用いることによって例示することができる。上記の方法に対するあらゆる変形形態は、本明細書中の開示および当業界で周知の情報に基づいて当業者には明白であると考えられる。

【0102】

したがって本発明は、単一の分析プロセスで広範な細胞識別を行うために用いられるトランスデューサ、機器、蛍光色素、およびモノクローナル試薬の数を最低限に抑えたアプローチを具体的に説明する。本発明の方法は、血液分析の現行の方法を凌ぐ多くの利点または改良点を提供する。これらの利点のなかでも際立っているのは、単一反応混合物中の識別される7種類から約11種類の細胞集団を含むことのできるより確固たる広範な識別である。これらの方法は、基本的な識別を求めるための、すなわち細胞集団、例えば本明細書中で参照した例示図中などのリンパ球、単球、好中球、好酸球、および好塩基球に計算手順を適用するためのより多くのまた代替の手段を提供する。この可能性は、生物標本中のかなりの細胞が、それら集団の判定に対する或る特定のアプローチを妨げる恐れのある条件の存在下にある場合、特に重要である。例えばこのような干渉条件は、或る種の化学的干渉、老化、細胞の脆性、および/または通常の5要素の識別の評価を混乱させる非定型細胞型の存在により起こる。

【0103】

単一の分析でマルチパラメータによる電気的および光学的測定値によって細胞を明確に識別する能力は、非定型細胞型などの臨床上直接関連のあるさらなる血液細胞集団を明確に識別し、選択する能力を大いに改善する。このような選択は、血液分析の現行の方法を悩ませる高い偽陽性または偽陰性判定をなくす。

【0104】

本発明の方法は、さらに現在の血液分析計のパラメータの制約で得ることができない新規な情報を提供する能力を拓ける。これらの分析の自動化は、不必要な作業をなくすことによって、またさらなる試験および分析のために作業の流れをより効率的に管理することによって血液実験室の効率を大幅に改善する。

【実施例】

【0105】

下記の実施例は、本発明の様々な態様を例示するものである。これらの実施例は、添付

10

20

30

40

50

の特許請求の範囲によって規定される本発明の範囲を限定するものではない。下記の実施例1~9は2種類の抗体を使用する。その第一の抗体はCD45に対する抗体である。このCD45抗原は、白血球系列の大部分の細胞で発現するが、赤血球および巨核球などの他の造血細胞上では発現しない。それはまた白血球内で他と異なる発現を示すことが知られており、リンパ球は比較的高い発現を示すが、好塩基球はより低い発現を示す。CD45抗原の発現はまた白血球の成熟ステップの関数として変わる可能性があり、芽球または幹細胞はそれらの成熟した対応物よりも少ないCD45抗原を発現させる。したがって散乱光および/またはDCなどの電氣的測定値に関連したAOの蛍光と抗CD45の蛍光の組合せを用いて、(1)末梢血中に通常見出される白血球集団(リンパ球、単球、顆粒球、好酸球、および好塩基球)を差別的に識別し、(2)赤血球および巨核球系列の細胞などのCD45を発現させない造血細胞を識別し、また(3)幹細胞および芽球などの大部分の未分化細胞を識別することができる。

10

【0106】

これとは対照的にCD16抗原の分布は、白血球の発現に関してはより限定されている。CD16抗原は2種類のアイソフォーム、CD16アルファとCD16ベータを有する。CD16ベータは分葉核好中球および杆状球上では強く発現し、他の白血球上では弱いかまたは全く発現しない。CD16アルファは、ナチュラルキラー細胞および活性単球として分類される白血球の部分集合上でもまた発現することを除いては似た発現パターンに従う。本発明の方法は、CD16の不在下で観察される空間的分離と比べて、CD16PC7を加えられた試料中での好中球と好酸球の間の高度の分離を考慮に入れている。この高度の分離が得られる理由は、成熟した分葉核好中球はCD16抗原を発現させるが、好酸球はCD16抗原がより少ないかまたは全く存在しないためである。したがってCD16を用いてこれら2種類の集団の分離を向上させることができる。CD16抗原はまた、好中球上よりも未熟顆粒球(後骨髄球、骨髄球、および前骨髄球)上で弱く発現するかまたは存在しない。

20

【0107】

したがって様々な有核細胞集団の分離および識別は、本発明の方法においてCD16の添加によって達成することができる。これらの集団の存在の有無は、様々な蛍光チャネルの画面中で異なる可能性がある。したがって本発明は、所望の細胞型を識別し計数するための複数の分析方針または計算手順を所有する能力を提供する。

30

【0108】

したがってAO蛍光、抗CD45蛍光、散乱光、および/または電氣的な測定値とあいまって抗CD16蛍光は、分化骨髄細胞、未熟骨髄前駆物質、および幹細胞もしくは芽球を識別し、それらの相違を見分けることができる。CD16抗原は好中球の固有の性質よりも保存される可能性があるため、それはまた年齢、療養治療、および或る種の低顆粒状態のせいで起こる可能性のあるような脱顆粒化した(脱顆粒性)好中球を識別するために用いることもできる。これに加えてナチュラルキラー細胞および活性単球を識別することもできる。

【0109】

実施例1

正常なヒト末梢血100 μ Lを、抗CD45-PC7、すなわち第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体約1 μ gおよび抗CD16-PC7、すなわち同一の発光スペクトルを有する同一の蛍光色素で標識した追加の抗体約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。上記第一の抗体は、白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この抗CD16抗体は、成熟および未熟顆粒球あるいは骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。この反応は核酸色素の不在下で行った。

40

【0110】

次いでこの反応混合物を、白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら血液標本中の非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血する溶血系(Immunoprep(商標)試薬A約600 μ L、米国特許第5,030,554号明細書参照)と約8秒間反応させた。約8秒の

50

後、クエンチング試薬 (Immunoprep (商標) 試薬B、265 μ L) をこの混合物中に10秒間導入して溶血反応を停止した。固定は使用しなかった。

【0111】

その後、混合物を、細胞がトランスデューサ・モジュールの単一アパーチャを通過するときその細胞上で複数の相互に関連する測定値 (蛍光および光学的) を生成することができるトランスデューサ・モジュール中に流入させる。このフローサイトメトリーシステムは、側方散乱光 (90度) および前方散乱光 (2~18度) を組み合わせた5チャンネルの蛍光を測定することができる。このシステムは、蛍光検出用の励起源として青色アルゴンイオンレーザーを利用するが、この方法は緑色レーザー励起源を使用し、同等またはより良い結果を得ることもできる。

10

【0112】

この具体例としての血液分析法の結果を、後述の図の説明で述べるように、図1A (3種類の細胞集団の識別を可能にするFS+SSの結果を表す)、図1B (5種類の細胞集団の識別を可能にするPC7のFLとSSの関係を表す)、および図1C (3種類の細胞集団の識別を可能にするPC7のFLとFSの関係を表す) の2つのパラメータのヒストグラムで表す。この分析は、RX PまたはCXPソフトウェア (Beckman Coulter, Inc.) またはWinlistソフトウェア (Verity Software)、あるいはフリーウェア、例えばWinMD1ソフトウェアなどの市販のソフトウェアを用いてそれぞれ取得のリストモードデータファイル上でオフラインで行われる。

【0113】

図示よりも多い2つのパラメータの組合せを細胞集団の判定に用いることができる。

20

これらの図は、表現しやすいように二次元散布図として単純化されている。これらの図は、他の光学的パラメータとあいまってそのモノクローナルカクテルが、より一層強くかつ確固たる識別を可能にすることを実証している。好塩基球を識別することができるこの方法によって複数の画面が提供される。広範な特異な細胞型に関しては芽球が出現すると予想されるはずの領域をCD45の対数とSSの関係を表す画面中で観察することができる。この次元の座標形では、また代替の散乱光の次元の座標形では、芽球が正常な細胞型の存在を覆い隠さないことになり、したがって5要素の識別および芽球の検出/計数の両方を行うことができる。芽球は人手による検査の場合、時には非定型リンパ球として記述される。細胞の非定型リンパ球としての類別範囲はかなり広く (芽球、CLL、反応性および/または活性リンパ球)、この記述は一般にさらなる臨床的試験を始めるためのシグナルになる。芽球のこの特徴描写は、末梢血中の他の型の細胞からこれらを識別する明確なパターンを具体的に説明している。これらには、正常な小型リンパ球と比較した場合、CD45抗原の低または無発現、散乱光の増加、および電氣的インピーダンス (DC) の増加が含まれるが、これらには限定されない。したがって、非定型リンパ球または任意の他の記述として形態学的に記述される芽球は、本発明の方法により芽球であることを確認することができる。慢性リンパ球性白血病は、形態学的にはいつもそうとは限らないがしばしば非定型リンパ球として記述される。

30

【0114】

未熟顆粒球はCD16を発現させないので、成熟および未熟顆粒球は互いに、またNK細胞および活性単球を含めた他の細胞型から識別することができる。

40

【0115】

実施例2

正常なヒト末梢血100 μ Lを、抗CD45-PE、すなわち第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体約1 μ gおよび抗CD16-PC7、すなわちこの蛍光色素PEの発光スペクトルと識別できる発光スペクトルを有する第二の蛍光色素で標識した追加の抗体約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。上記第一の抗体は、白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この抗CD16抗体は、成熟および未熟顆粒球あるいは骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。この反応は核酸色素の不在下で行った。

50

【0116】

次いでこの反応混合物を、白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら血液標本中の非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血する溶血系（Immunoprep(商標)試薬A約600 μ L、米国特許第5,030,554号明細書参照）と約8秒間反応させた。約8秒の後、クエンチング試薬（Immunoprep(商標)試薬B、265 μ L）をこの混合物中に10秒間導入して溶血反応を停止した。固定は使用しなかった。

【0117】

その後、混合物を、細胞がトランスデューサ・モジュールの単一アパーチャを通過するときその細胞上で複数の相互に関連する測定値（電氣的、蛍光、および光学的）を生成することができるトランスデューサ・モジュール中に流入させる。

10

【0118】

この具体例としての血液分析法の結果を、図2Aから2Cの2つのパラメータのヒストグラムで表す。図2Aは、側方散乱光（SS）とCD45-PEの蛍光の関係を表す2つのパラメータのヒストグラムである。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、単球、好塩基球、および好酸球と好中球を含有する顆粒球のクラスターがこの表示中で識別され、計数される。図2Bは、CD16-PC7の蛍光と側方散乱光（SS）の関係を表す2つのパラメータのヒストグラムである。少なくとも4種類の細胞集団、好中球、単球、好酸球、およびナチュラルキラー細胞と活性リンパ球を含有するクラスターがこの表示中で識別され、計数される。図2Cは、CD16-PC7の蛍光とCD45-PEの蛍光の関係を表す2つのパラメータのヒストグラムである。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、好中球、好酸球と単球を含有するクラスター、およびナチュラルキラー細胞と活性リンパ球を含有するクラスターがこの表示中で識別され、計数される。

20

【0119】

実施例3

正常なヒト末梢血200 μ Lを、抗CD45-PC5、すなわち第一の発光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体約1 μ gおよび抗CD16-PE、すなわちこの蛍光色素PC5の発光スペクトルと識別できる発光スペクトルを有する第二の蛍光色素で標識した追加の抗体約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。上記第一の抗体は、白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この抗CD16抗体は、成熟および未熟顆粒球あるいは骨髄細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。この反応は核酸色素の不在下で行った。

30

【0120】

次いでこの反応混合物を、白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら血液標本中の非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血する溶血系（Synlyse系約556 μ L、米国特許第6,573,102号明細書および同第5,763,280号明細書参照）と約6秒間反応させる。約6秒後、クエンチング試薬（Stabilysse、240 μ L）をこの混合物中に10秒間導入して溶血反応を停止した。固定は使用しなかった。

【0121】

その後、混合物を、細胞がトランスデューサ・モジュール（米国特許第6,228,652号明細書参照）の単一アパーチャを通過するときその細胞上で複数の相互に関連する測定値（電氣的、蛍光、および光学的）を生成することができるトランスデューサ・モジュール中に流入させる。

40

【0122】

図3Aから3Cは、この実験の結果を表す2つのパラメータのヒストグラムである。図3Aは、DC（インピーダンス）と、約20から40度の散乱光前進角度である中角散乱光（MALS）の関係を表す。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、および好酸球がこの表示中で識別され、計数される。図3Bは、CD45-PC5の蛍光と、不透明度（OP）（ただしOP = 無線周波数（RF）/ インピーダンス（DC）（好中球および好酸球をヒストグラム図3Aから閉め出すことにより除去した後の））の関係を表す。3種類の細胞集団、リンパ球、

50

単球、および好塩基球が識別され、計数される。図3Cは、CD16-PEの蛍光とRFの関係を表す。3種類の細胞集団、リンパ球、単球、および好中球がこの表示中で識別され、計数される。

【0123】

実施例4

未熟顆粒球および杆状球を含有する正常なヒト末梢血の標本200 μ Lを、抗CD45-PC5、すなわち第一の蛍光スペクトルを有する第一の蛍光色素で標識した第一の抗体約1 μ gおよび抗CD16-PE、すなわちこの蛍光色素PC5の蛍光スペクトルと識別できる蛍光スペクトルを有する第二の蛍光色素で標識した追加の抗体約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。上記第一の抗体は、白血球および非白血球のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この抗CD16抗体は、成熟および未熟顆粒球あるいは骨髓細胞のそれぞれの集団上で違った形で発現する抗原決定基と結合する。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。この反応は核酸色素の不在下で行った。

【0124】

次いでこの反応混合物の一部(約34 μ L)を、白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら血液標本中の非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血する溶血系(Synlyse系約556 μ L、米国特許第6,573,102号明細書および同第5,763,280号明細書参照)と約6秒間反応させる。約6秒後、クエンチング試薬(Stabilysse、240 μ L)をこの混合物中に10秒間導入して溶血反応を停止した。固定は使用しなかった。

【0125】

その後、混合物を、細胞がトランスデューサ・モジュール(米国特許第6,228,652号明細書参照)の単一アパーチャを通過するときその細胞上で複数の相互に関連する測定値(電気的、蛍光、および光学的)を生成することができるトランスデューサ・モジュール中に流入させる。

【0126】

図4Aから4Dは、本発明の方法に基づく、この試料の分析を可能にする2つのパラメータのヒストグラムである。図4Aは、DC(インピーダンス)と中角散乱光(MALS)の関係を表す。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、単球、好酸球、および好中球と杆状球と未熟顆粒球とを含有するクラスターがこの表示中で識別され、計数される。図4Bは、CD16-PEの蛍光とSSの関係を表す。少なくとも3種類の細胞集団、好中球、杆状球、およびナチュラルキラー細胞が識別され、計数される。図4Cは、DCと、図4Bのヒストグラムから閉め出すことにより好中球および杆状球を除去した後のMALSの関係を表す。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、単球、好酸球、および未熟顆粒球がこの表示中で識別され、計数される。図4Dは、CD45-PC5と、図4Bのヒストグラムから閉め出すことにより好中球および杆状球を除去した後のSSの関係を表す。少なくとも5種類の細胞集団、リンパ球、単球、好酸球、好塩基球、および未熟顆粒球がこの表示中で識別され、計数される。

【0127】

実施例5

正常なヒト末梢血100 μ Lを、抗CD45-PC7、すなわち第一の抗体約1 μ gおよび抗CD16-PC7、すなわち同じ蛍光色素で標識した追加の抗体約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。これら抗体の濃度(それぞれ約1 μ g)を個々の抗体の滴定に基づいて最適化する。最適濃度を所望の染色強度および反応速度に基づいて定める。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。次いでこの反応混合物を核酸色素(アクリジンオレンジ約1.25 μ g/mL)と接触させた。アクリジンオレンジは、PC7の蛍光スペクトルと部分的に重なり合う蛍光スペクトルを有する。色素PC7は青色または緑色レーザーで励起した場合、約770 nmのピーク発光波長を有する。これと比べてアクリジンオレンジの蛍光スペクトルは、細胞より小さい要素を元来の場所で染メーター場合(青色レーザーで励起した場合)、500 nmの低い値域から755 nmを超える値域まで及ぶ。これは、700 nmで分光発光がきわめて微量または皆無である溶液中のアクリジンオレンジとは

対照的である。

【0128】

この混合物を本発明の方法に従って、しかし試料中に存在する赤色血液細胞を溶血せずに分析した。この混合物を、細胞がトランスデューサ・モジュールの単一アパーチャを通過するときその細胞上で複数の相互に関連する測定値（蛍光および光学的）を生成することができるトランスデューサ・モジュール中に流入させた。

【0129】

図5Aから5Cは、この結果を具体的に説明する2つのパラメータのヒストグラムである。そのRBCは、収集される白色血液細胞の事象の量を強調するようにシステムの電子機器の閾値を故意に低く設定したために、これらヒストグラム中でははっきりしない。図5Aは、波長約675 nmにおけるAOの蛍光と、SSの関係を表す。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、単球、好酸球、および好中球がこの表示中で識別され、計数される。図5Bは、波長約755 nmにおけるAO、CD16-PC7、およびCD45-PC7の蛍光とSSの関係を表す。少なくとも6種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、およびナチュラルキラー細胞が識別され、計数される。図5Cは、波長約755 nmにおけるAO、CD16-PC7、CD45-PC7の蛍光と、波長約675 nmにおけるAOの波長の関係を表す。少なくとも6種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、好酸球、好塩基球、およびナチュラルキラー細胞が識別され、計数される。

10

【0130】

実施例6

正常なヒト末梢血100 μ Lを、抗CD45-PC7（第一の抗体）約1 μ gおよび抗CD16-PE（PC7の発光スペクトルと異なる発光スペクトルを有する蛍光色素で標識した追加の抗体）約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。次いでこの反応混合物をアクリジンオレンジ（約1.25 μ g/mL）と接触させた。アクリジンオレンジは、PC7およびPEの発光スペクトルと部分的に重なり合う発光スペクトルを有する。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。

20

【0131】

次いで試料を、その試料中に存在する赤色血液細胞を溶血することなく流動式血液分析計（flow hematology analyzer）を通過させた。表示される白色血液細胞の事象の量を最大にするようにシステムの電子機器の閾値を低く設定したので、RBCはそのヒストグラム表示中でははっきりしない。

30

【0132】

図6Aおよび6Bは、この実験の結果を表示する2つのパラメータのヒストグラムである。図6Aは、波長約575 nmにおけるAOおよびCD16-PEの蛍光と、SSの関係を表す。少なくとも5種類の細胞集団、リンパ球、単球、好酸球、好中球、およびナチュラルキラー細胞がこの表示中で識別され、計数される。図6Bは、波長約755 nmにおけるAOおよびCD45-PC7の蛍光と、SSの関係を表す。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、および好塩基球が識別され、計数される。

【0133】

実施例7

異常なヒト末梢血の標本100 μ Lを、抗CD45-PC7、すなわち第一の抗体約1 μ gおよび抗CD16-PC7、すなわち同一の蛍光色素で標識した追加の抗体約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。次いでこの反応混合物を、発光スペクトルを有する核酸色素（アクリジンオレンジ）約1.25 μ g/mLと接触させた。アクリジンオレンジは、PC7の発光スペクトルと部分的に重なり合う発光スペクトルを有する。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。

40

【0134】

次いでこの反応混合物を、白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら血液標本中の非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血する溶血系（Immunoprep（商標）試薬A約600 μ L、米国特許第5,030,554明細書参照）と約8秒間反応させた。約8秒後、

50

クエンチング試薬 (Immunoprep(商標)試薬B、265 μ L) をこの混合物中に10秒間導入して溶血反応を停止した。固定は使用しなかった。

【 0 1 3 5 】

その後、混合物を、細胞がトランスデューサ・モジュールの単一アパーチュアを通過するときその細胞上で複数の相互に関連する測定値 (蛍光および光学的) を生成することができるトランスデューサ・モジュール中に流入させる。

【 0 1 3 6 】

図7Aから7Cは、この分析の結果を表示する2つのパラメータのヒストグラムである。図7Aは、波長約755 nmにおけるAO、CD16-PC7、およびCD45-PC7の蛍光と、SSの関係を表す。少なくとも6種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、好塩基球、芽球、および好酸球と未熟顆粒球を含有するクラスターがこの表示中で識別され、計数される。図7Bは、波長約675 nmにおけるAOの蛍光と、SSの関係を表す。少なくとも4種類の細胞集団、好酸球、好中球、リンパ球と芽球を含有するクラスター、および単球と芽球を含有するさらなるクラスターが識別され、計数される。図7Cは、波長約755 nmにおけるAO、CD16-PC7、およびCD45-PC7の蛍光と、図7Bから閉め出すことにより好酸球を除去した後のSSの関係を表す。少なくとも6種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、好塩基球、芽球、および未熟顆粒球がこの表示中で識別され、計数される。

10

【 0 1 3 7 】

実施例8

異常なヒト末梢血100 μ Lを、抗CD45-PC7、すなわち第一の抗体約1 μ gおよび抗CD16-PE、すなわちPC7の発光スペクトルとは異なる発光スペクトルを有する蛍光色素で標識した追加の抗体約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。次いでこの反応混合物をアクリジンオレンジ約1.25 μ g/mLと接触させた。アクリジンオレンジは、PC7およびPEの発光スペクトルと部分的に重なり合う発光スペクトルを有する。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。

20

【 0 1 3 8 】

次いでこの反応混合物を、白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら血液標本中の非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血する溶血系 (Immunoprep(商標)試薬A約600 μ L、米国特許第5,030,554号明細書参照) と約8秒間反応させた。約8秒後、クエンチング試薬 (Immunoprep(商標)試薬B、265 μ L) をこの混合物中に10秒間導入して溶血反応を停止した。固定は使用しなかった。

30

【 0 1 3 9 】

その後、混合物を、細胞がトランスデューサ・モジュールの単一アパーチュアを通過するときその細胞上で複数の相互に関連する測定値 (蛍光および光学的) を生成することができる流動式血液分析計の単一フローアパーチュア中に流入させる。

【 0 1 4 0 】

図8Aから8Cは、この実験の結果を表示する2つのパラメータのヒストグラムである。図8Aは、波長約525 nmにおけるAOの蛍光と、SSの関係を表す。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、および好酸球がこの表示中で識別され、計数される。図8Bは、波長約575 nmにおけるAOおよびCD16-PEの蛍光と、SSの関係を表す。少なくとも6種類の細胞集団、リンパ球、単球、好酸球、好中球、未熟顆粒球、およびナチュラルキラー細胞が識別され、計数される。図8Cは、波長約755 nmにおけるAOおよびCD45-PC7の蛍光と、波長約525 nmにおけるAOの蛍光の関係を表す、実施例8で述べた実験から得られる2つのパラメータのヒストグラムである。少なくとも5種類の細胞集団、リンパ球と単球を含有するクラスター、好塩基球、好中球、未熟顆粒球、および有核RBCが識別され、計数される。

40

【 0 1 4 1 】

実施例9

異常なヒト末梢血の標本100 μ Lを、抗CD45-PE、すなわち第一の抗体約1 μ gおよび抗CD16-PC7、すなわちPEとは異なる発光スペクトルを有する第二の蛍光色素で標識した追加の抗体約1 μ gと反応させることによって単一反応混合物を調製した。次いでこの反応混合物

50

をアクリジンオレンジ約1.25 µg/mLと接触させた。アクリジンオレンジは、PC7およびPEの発光スペクトルと部分的に重なり合う発光スペクトルを有する。この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。

【0142】

次いでこの反応混合物を、白血球集団の所望の固有および外因性の性質を保存しながら血液標本中の非有核赤色血液細胞をそれぞれ違った形で溶血する溶血系（Immunoprep(商標)試薬A約600 µL、米国特許第5,030,554号明細書参照）と約8秒間反応させた。約8秒後、クエンチング試薬（Immunoprep(商標)試薬B、265 µL）をこの混合物中に10秒間導入して溶血反応を停止した。固定は使用しなかった。

【0143】

その後、混合物を、細胞がトランスデューサ・モジュールの単一アパーチャを通過するときその細胞上で複数の相互に関連する測定値（蛍光および光学的）を生成することができるトランスデューサ・モジュール中に流入させる。

【0144】

図9Aから9Cは、この分析の結果を表示する2つのパラメータのヒストグラムである。図9Aは、波長約525 nmにおけるAOの蛍光と、SSの関係を表す。少なくとも4種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、および好酸球がこの表示中で識別され、計数される。図9Bは、波長約755 nmにおけるAOおよびCD16-PC7の蛍光と、図9Aから好酸球を閉め出すことにより除去した後のSSの関係を表す。少なくとも5種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、未熟顆粒球、およびナチュラルキラー細胞が識別され、計数される。図9Cは、波長約755 nmにおけるAOおよびCD16-PC7の蛍光と、図9Aから閉め出すことにより好酸球を除去した後の波長約575 nmにおけるAOおよびCD45-PEの蛍光の関係を表す。少なくとも6種類の細胞集団、リンパ球、単球、好中球、未熟顆粒球、有核赤色血液細胞、およびナチュラルキラー細胞が識別され、計数される。

【0145】

抗CD19をこの方法の抗体の一つとして使用する代替の検定法（データは表示せず）において、抗CD19モノクローナルの存在の影響は、リンパ球集団をBと非B細胞集団に分けることによって検出される。非定型標本においてはこれは、B細胞と非B細胞の芽球の間の識別、慢性および急性のB細胞異常の間の識別、およびB細胞系列の非定型リンパ球の存在を観察することを可能にする。

【0146】

この方法は芽球を検出するのに用いることができる。抗CD45の蛍光発現に関連した幾つかの光学的および電気的パラメータは、正常な細胞型およびデブリからの芽球の必要な分離を可能にする。これはその判定を行うために必要である。抗CD19抗体は、この方法に、CD19の発現に基づいて芽球をB細胞系列のリンパ系芽球として類別する能力を与える。具体例としての異常血液標本において芽球は、非B正常リンパ球よりも高いが、この標本中の正常なB細胞のものと同様または低いCD19の発現を実証することができる。この情報を用いて芽球を計数し類別し、次いでその正常な5要素の識別を回復することができるように他の画面から閉め出すことができる。他の散布図を似た異常試料上で描き出して、芽球をその異常末梢血標本中のデブリおよび他の細胞型からはっきり検出することができる。芽球はさらに、非B細胞系列として特徴づけることができる。これは、その芽球が非B細胞と同様または低いCD19発現を表すことを示す散布図によって求められる。

【0147】

他の分析からの結果（示していないが米国特許出願第60/573,167号明細書に記載されており、参照により本明細書に組み込まれる）もまた下記実施例中で要約する。

【0148】

実施例10

本発明の方法を4種類の異なる生物標本、すなわち（1）正常末梢血、（2）Bリンパ芽球性白血病の標本、（3）ほとんどの場合、小型リンパ球を含有する慢性リンパ性白血病（BCLL）の標本、（4）高%の大型白血球を表す前リンパ球性形質転換を有するBCLL上で行っ

10

20

30

40

50

た。この方法は、さきを実施例3および4で述べた溶血系を含む方法に従って3種類の抗体、すなわち抗CD45-PECy5、抗CD16-PE、および抗CD19-PEを使用した。各試料について、パラメータとしてDCとRLSの関係、DCと不透明度（RF）の関係、抗CD45-PECy5の蛍光とSSの関係、抗CD45-PECy5の蛍光の対数とSSの関係、ならびにDCとCD16-PEおよびCD19-PEの蛍光の関係（データは表示せず）を用いて5つの散布図を描いた。

【0149】

正常試料の散布図は、リンパ球、好塩基球、好酸球、好中球、および単球の5個の通常の集団と、B細胞および非B細胞（系列）の集団とを示した。

【0150】

B細胞系列の芽球を含有するBリンパ芽球性白血病試料の散布図は、その通常の5個の集団と、芽球、B細胞系列の芽球、NK細胞、他のB細胞、および非B細胞の集団とを計数した。

10

【0151】

1%の非定型リンパ球を含有するB細胞の慢性リンパ性白血病の散布図は、その通常の5個の集団と、CD34芽球のパターンを示さない無数の小型リンパ球の集団および非B細胞の集団とを計数した。本発明の方法は、手作業による識別が非定型リンパ球とみなしたものを異常B細胞として正確に再分類することができる。これらの白血病性細胞は、正常なリンパ球よりもわずかに低いCD45の発現を有することがあり、大抵はこれもまた小型リンパ球と同等または低いインピーダンス特性を表す小型細胞から構成される。かなりの数の正常なリンパ球が存在するか、または比較的少数のこれらの型のCLL細胞が存在する場合、これはDC中および前方散乱光中に2つのリンパ球ピークを生ずることがある。これらの細胞は、CD45の発現がわずかに低い典型的な芽球のパターンを表さない（きわめて弱いかまたはCD45陰性で、また高い散乱）。これらのCLLは大抵はB細胞系列である（98または99%を超える）のでCD19陽性細胞として現れる。

20

【0152】

手作業による識別で非定型リンパ球を52%含有するB細胞の慢性リンパ性白血病試料の散布図は、以前に非定型リンパ球または芽球と呼ばれた細胞を、異常大型B細胞として再分類するのと同じ結果を示す。このむしろ一般的でないCLLの変種は、小型および大型リンパ球の混合物を有する。主に小型細胞の変種の場合にはこれらの細胞は、上記で具体的に説明してきた典型的な芽球のパターンを現さず、大抵はCD19陽性である。したがって本発明の方法によってこれらの細胞を、末梢血中に見出される芽球および他の細胞型から識別することができる。

30

【0153】

したがって本発明は、芽球およびこの最も有力なCLL細胞の変種を互いに、また末梢血中に見出されるその他の細胞型から検出し識別する能力を有する。この変種の非BCCL（小型細胞）もまた検出されるが、CD19陰性として現れるはずである。したがってこれらの型の小型細胞CLLはまた、コンピュータを使用して非定型リンパ球として記述する（目印を付ける）ことができる。したがってこの方法は、様々な形態の非定型リンパ球（芽球がCLL細胞か）を活性細胞に対して識別するだけでなく、非定型リンパ球の大部分の臨床的に意味のある変種の確実な検出を可能にする。したがってこの方法はこれらの異常の診断を明快にする。

40

【0154】

これまでの実験は、形態学的実験を、特殊な着色、染色体分析、および伝統的なフローサイトメトリーによる白血病表現パターン検査と併用することによる病状対診の結果を、本発明の方法の使用と比較した。このような比較は、本発明の方法がB細胞と非B細胞系列の芽球を識別するすぐれた能力を有することを実証した。

【0155】

図示していないがAOおよび抗CD45-PECy7のみで処理した正常な末梢血試料の散布図は、525 nmから675 nmの範囲における着色パターンがAOのみで染メーター標本について観察されたものと同様であることを示した。その755 nmにおける着色パターンは、CD45-PECy7の

50

みと組み合わせた標本について観察されたものと同様である。これらのデータは、付加蛍光の原理、ならびに部分的に重なり合うピーク発光スペクトルを有するAOと複合抗体で細胞を同時に染める場合に達成された所望の着色結果の特徴を示している。

【0156】

実施例11

次のように反応混合物を形成することによってフローサイトメトリーを用いた血液検査システム上での広範な識別が得られる。18%の未熟顆粒球（9%の骨髄球および9%の後骨髄球）を含有する末梢血試料100 μ Lを、上記実施例1~9で述べたのと同じ濃度でAO、抗CD45-PECy7、および抗CD16-PECy7と混ぜた。

【0157】

この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。このインキュベーション期間の終りに反応混合物を溶血試薬（溶血および失活）に曝してこの分析から非有核RBCを除去し、次いで側方散乱光（90度）および前進角散乱光（2~18度）を組み合わせた5チャンネルの蛍光を測定することができるフローサイトメトリーシステムで分析した。この試料は、蛍光検出用の励起源として青色アルゴンイオンレーザーを使用する。

【0158】

このデータ（表示せず）は、水平軸上の側方散乱光および縦軸上の蛍光により表示される。755 nmの蛍光チャンネルでは未熟顆粒球は、成熟顆粒球よりも低い蛍光と高い側方散乱光を有する細胞の集団として識別することができる。これと比べて成熟および未熟顆粒球の集団は、525 nmおよび675 nmのチャンネルに部分的に重なり合う蛍光のサインを有する。

【0159】

この675 nmのチャンネルにおける単球の分離の向上を用いて、与えられたヒストグラムから755 nmのチャンネルに関してこの集団を除去した。この手法は、その単球集団の重なりを除去し、755 nmのチャンネル中の成熟および未熟顆粒球の集団を識別し計数するのを助けた。

【0160】

したがって本発明の方法は、単球、成熟顆粒球、および未熟顆粒球、ならびに前述の実施例において識別されたその他の細胞集団を識別することができる。

【0161】

実施例12

次のように反応混合物を形成することによってフローサイトメトリーを用いた血液検査システム上での広範な識別が得られる。主に芽球と、少数のリンパ球とを含有する末梢血試料100 μ Lを、上記実施例1~9で述べたのと同じ濃度でAO、抗CD45-PECy7、および抗CD16-PECy7と混ぜた。

【0162】

この反応混合物を少しの間混合し、室温で約10分間インキュベートした。このインキュベーション期間の終りに反応混合物を溶血試薬（溶血および失活）に曝してこの分析から非有核RBCを除去し、次いで側方散乱光（90度）および前進角散乱光（2~18度）を組み合わせた5チャンネルの蛍光を測定することができるフローサイトメトリーシステムで分析した。この試料は、蛍光検出用の励起源として青色アルゴンイオンレーザーを使用する。

【0163】

3つの選択された蛍光チャンネルから得られるデータ（表示せず）は、水平軸上の側方散乱光および縦軸上の蛍光により表示される。芽球がリンパ球よりも低い蛍光を有するが、大部分の小型リンパ球よりも大きい側方散乱のサインを有する細胞集団として現れることは、この755 nmのチャンネルのデータの検討から明らかである。このパターンは、芽球上でのCD45抗原の発現の低下が原因である。また、芽球のパターンがリンパ球集団と部分的に重なり合っており明瞭な集団として現れないことは、この525 nmおよび675 nmのチャンネルによってもたらされるデータの検討から明らかである。この実施例において芽球の標本は

10

20

30

40

50

、これらチャンネル中の標本の老化または脆性が原因の二峰性分布を実例で明らかにしている。

【0164】

実施例13

未熟顆粒球および芽球を含有する異常末梢血の標本を本発明の方法に従って、また上記実施例1~9のものと同じ濃度を用いてAOと、CD45-PC7およびCD16-PC7(755 nm領域でAOと部分的に重なり合う同じ蛍光色素で標識した2種類の異なる抗体)とで染メーター。両方の標本試料をImmunoprep(商標)試薬系を用いて溶血した。標本の調製はさきの実施例中で述べたものと同様である。

【0165】

この分析の結果(表示せず)は、本発明の方法が一回の分析評価で複数細胞の異常性を識別し計数することができることを示している。

【0166】

実施例14

正常末梢血の標本を本発明の方法に従って、また上記実施例1~9のものと同じ濃度を用いてAOと、CD45-PC7およびCD16-PC7(755 nm領域でAOと部分的に重なり合う同じ蛍光色素で標識した2種類の異なる抗体)とで染めた。この同じ試料のアリコートでAOと、CD45-PC7およびCD16-PE(575 nmおよび755 nmでAOの発光スペクトルの様々な範囲で部分的に重なり合う異なる蛍光色素で標識した2種類の異なる抗体)とで染めた。両方の標本試料をImmunoprep(商標)試薬系を用いて溶血した。標本の調製はさきの実施例中で述べたものと同様である。

【0167】

この分析の結果(表示せず)は、CD16抗体が接合する蛍光色素に応じて好酸球/好中球の分離の差を示す。これは、付加蛍光の原理の2つのはっきりした例を実証しており、正常および非定型細胞集団を検出し計数するための様々な分析の可能性を与える。

【0168】

上記実施例は、ピーク発光の重なり合う部分を有するそれらチャンネル中の付加蛍光の原理を例示する。この手法を適用することにより、特定の情報を得るのに有用な特定の蛍光のチャンネル中でそれらのパターンを保存し、また新しい情報を得るために他の蛍光のチャンネル中でそれらパターンを変えるかまたは強調することが可能である。

【0169】

要約するとこの開示した発明は、包括的で広範な識別結果を求めるための新規な分析方法を提供する。これらの方法は、核酸色素およびモノクローナル抗体によって得られる分析の利点を組み合わせて、そのいずれかの方法単独よりも優れた単一の一体化されたアプローチにする。

【0170】

すべての公表された文書および特許出願の参考文献は、参照により本明細書に組み込まれる。本発明の非常に多くの修正形態および変形形態が上記で特定した明細書中に含まれ、それらは当業者には明らかであると思われる。本発明の組成物および方法に対するこのような修正形態および改変形態は、添付の特許請求の範囲の範囲内に包含されると考えられる。

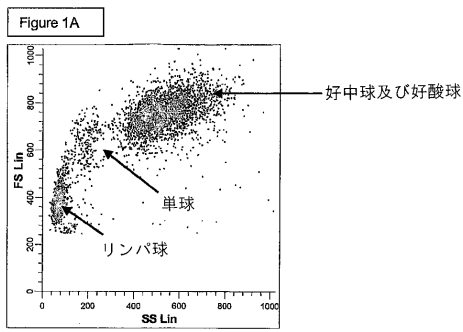
10

20

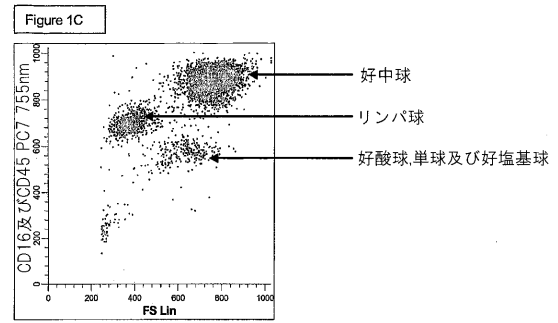
30

40

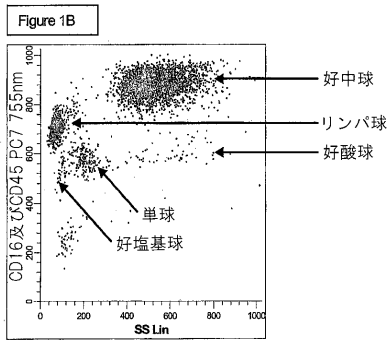
【 図 1 A 】



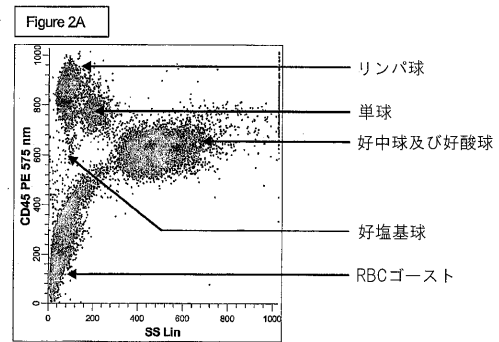
【 図 1 C 】



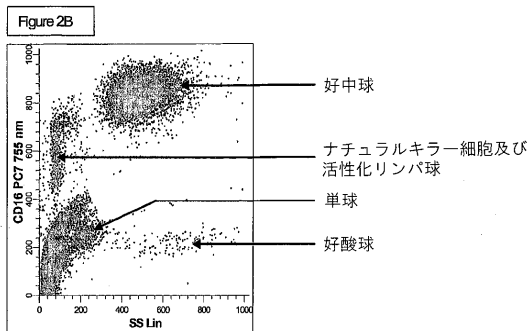
【 図 1 B 】



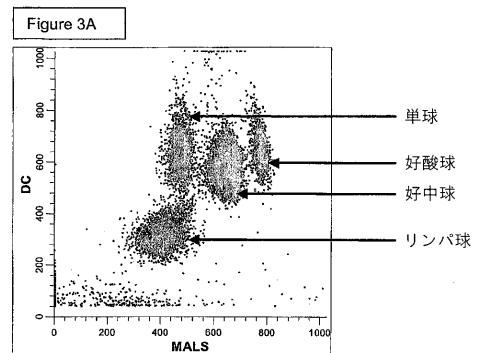
【 図 2 A 】



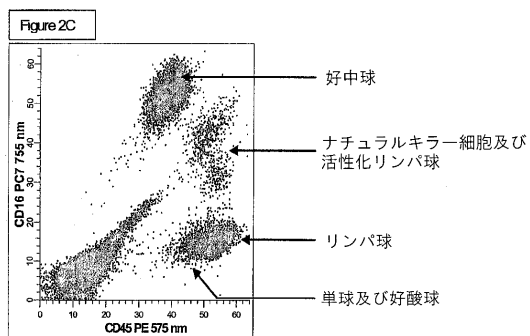
【 図 2 B 】



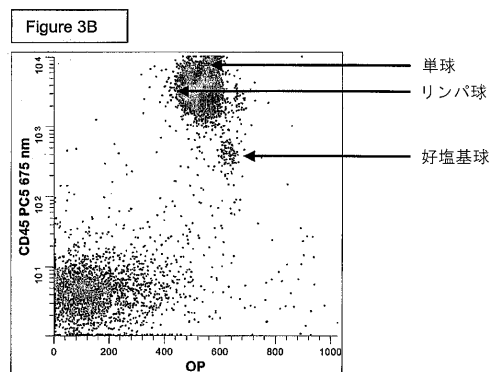
【 図 3 A 】



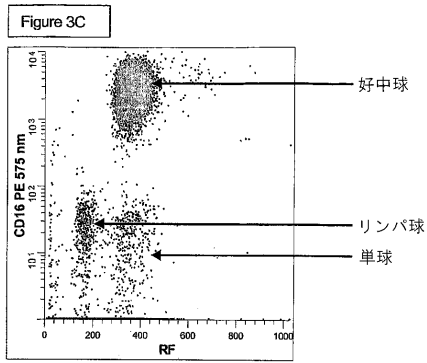
【 図 2 C 】



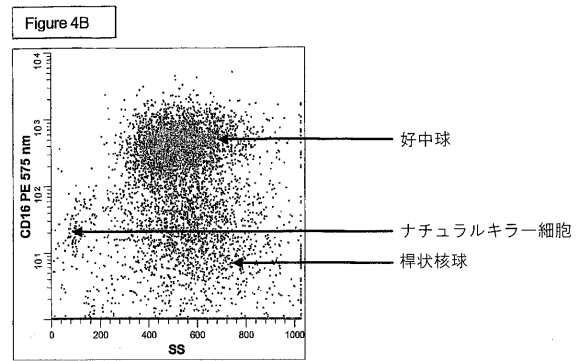
【 図 3 B 】



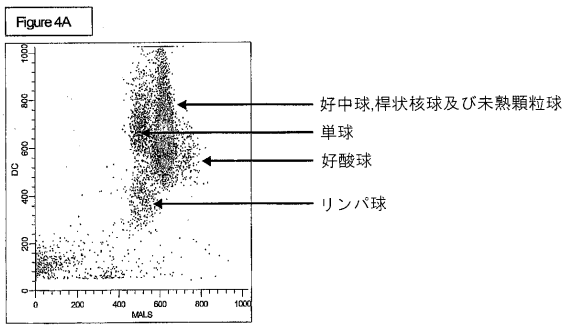
【 図 3 C 】



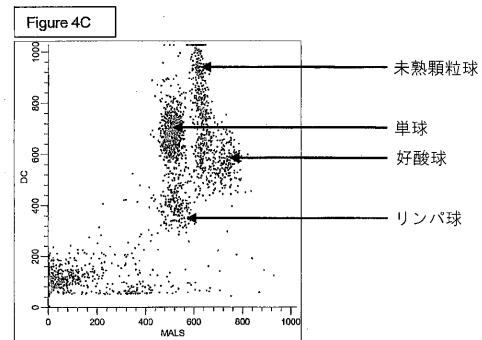
【 図 4 B 】



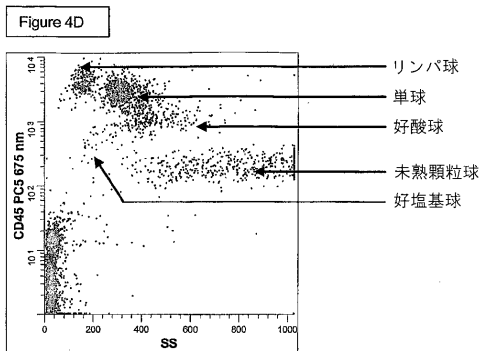
【 図 4 A 】



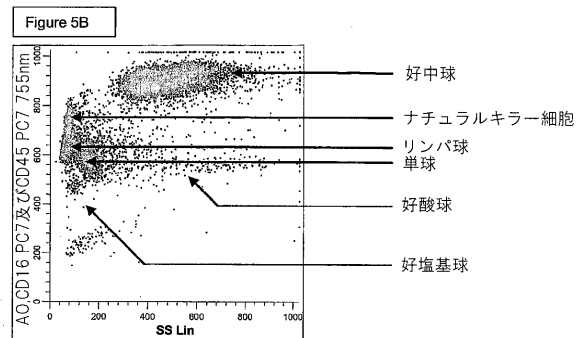
【 図 4 C 】



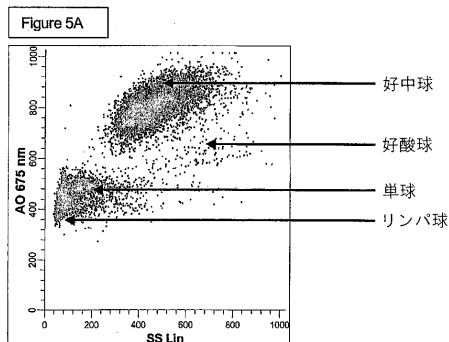
【 図 4 D 】



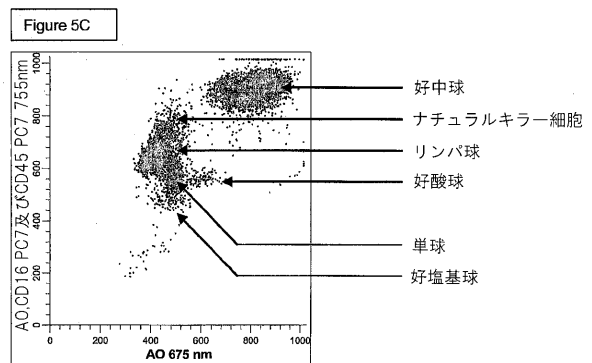
【 図 5 B 】



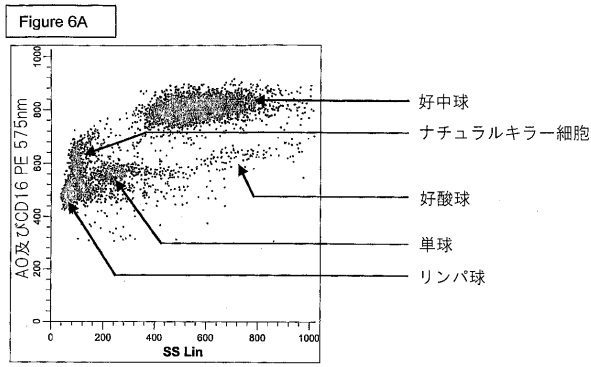
【 図 5 A 】



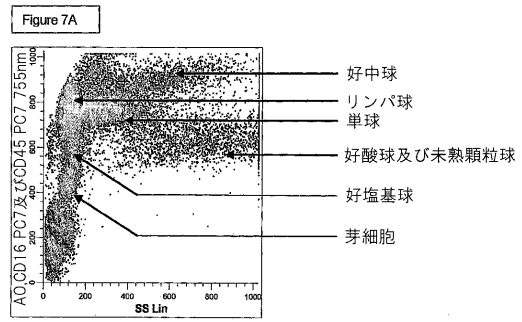
【 図 5 C 】



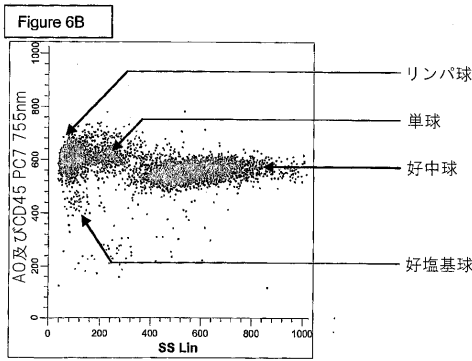
【 図 6 A 】



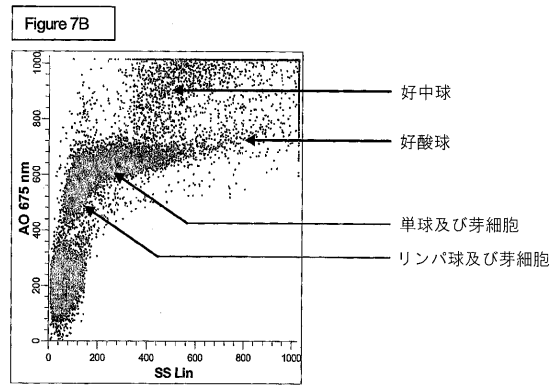
【 図 7 A 】



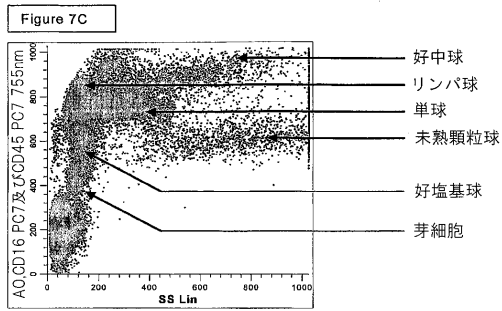
【 図 6 B 】



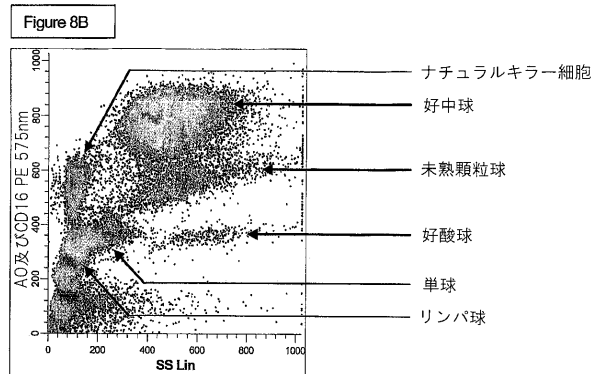
【 図 7 B 】



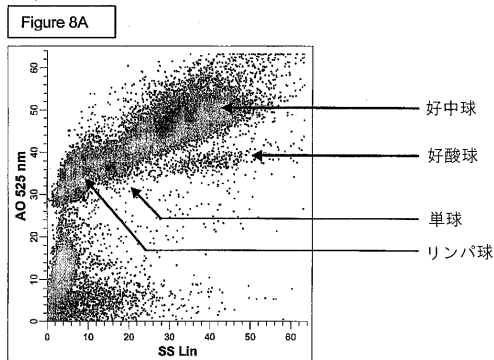
【 図 7 C 】



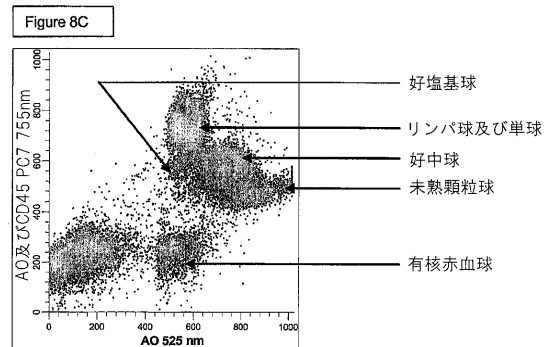
【 図 8 B 】



【 図 8 A 】

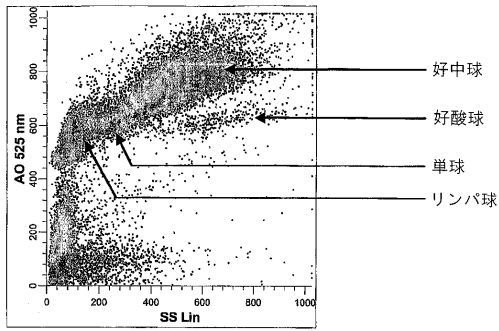


【 図 8 C 】



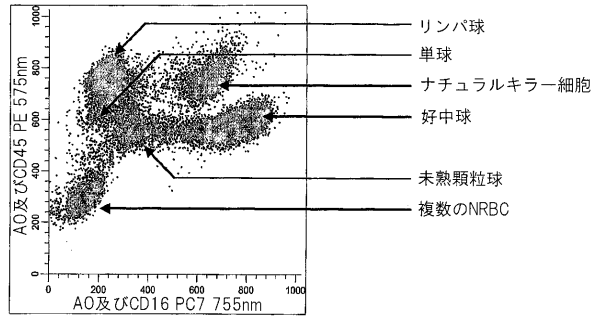
【 図 9 A 】

Figure 9A



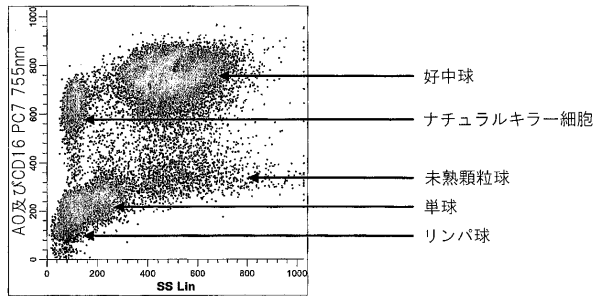
【 図 9 C 】

Figure 9C



【 図 9 B 】

Figure 9B



フロントページの続き

- (72)発明者 ロナルド ディー . ポール
アメリカ合衆国, フロリダ 33312, フォート ラウダーデール, サウスウエスト 24 ア
ベニュー 1738
- (72)発明者 ジェイムズ エル . ワイアット
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92116, サンディエゴ, ウエスト タルマッジ ドライブ
4601
- (72)発明者 パーバラ カーリロ
アメリカ合衆国, フロリダ 33134, マイアミ, サウスウエスト 5 テラス 4410
- (72)発明者 オイルダ ルピオ
アメリカ合衆国, フロリダ 33176, マイアミ, サウスウエスト 18 ストリート 137
10
- (72)発明者 ダイアナ ビー . カレアガ
アメリカ合衆国, フロリダ 33186, マイアミ, サウスウエスト 134 コート 9714
- (72)発明者 リディス エル . ロペス
アメリカ合衆国, フロリダ 33196, マイアミ, サウスウエスト 115 テラス 1429
6

Fターム(参考) 4B063 QA18 QQ08 QQ61 QQ79 QR41 QR48 QR77 QS33 QS39 QX02
QX04

【外国語明細書】

2012215593000001.pdf