

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5223676号
(P5223676)

(45) 発行日 平成25年6月26日(2013.6.26)

(24) 登録日 平成25年3月22日(2013.3.22)

(51) Int.Cl.		F I	
GO 1 N 33/543 (2006.01)		GO 1 N 33/543	5 8 1 Z
GO 1 N 33/80 (2006.01)		GO 1 N 33/80	

請求項の数 34 (全 34 頁)

(21) 出願番号	特願2008-539409 (P2008-539409)	(73) 特許権者	508135943 ディアガスト
(86) (22) 出願日	平成18年11月3日(2006.11.3)		D I A G A S T
(65) 公表番号	特表2009-515179 (P2009-515179A)		フランス国、F-59120ロース、アブ
(43) 公表日	平成21年4月9日(2009.4.9)		ニュー・ウジェヌ・アピネ、ウラザンテ
(86) 国際出願番号	PCT/EP2006/068085		・パルク、251
(87) 国際公開番号	W02007/051844	(74) 代理人	100081352
(87) 国際公開日	平成19年5月10日(2007.5.10)		弁理士 広瀬 章一
審査請求日	平成21年10月20日(2009.10.20)	(72) 発明者	バルブロー、イブ
(31) 優先権主張番号	0511207		フランス国、F-59420ムーボー、リ
(32) 優先日	平成17年11月3日(2005.11.3)		ュー・ネグリエ、62
(33) 優先権主張国	フランス (FR)	(72) 発明者	ブーレ、オリビエ
			フランス国、F-62113サリィ・ラブ
			ルス、リユー・マザンガルブ、11

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 特に血液型の抗体／抗原複合体の存在の証明のための磁氣的免疫診断方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

溶液中に存在する抗体と磁性粒子に結合された抗原との反応により形成された特定の複合体の存在の証明方法であって、

該抗原が1または2以上の該磁性粒子に結合した細胞に保有される抗原であり、

前記反応は開口された頂部と封じられた底部とを有する反応器内で発生し、

当該反応器の直径は、底部へと下方に伸びる傾斜壁を形成するように、底部に近接した領域で小さくなり、

当該傾斜壁は、抗免疫グロブリンまたはプロテインAもしくはプロテインGで少なくとも一部が被覆され、

次のステップからなることを特徴とする方法：

a) 反応に先立って、

反応器の傾斜壁の少なくとも一部が被覆されるような粘性溶液または均一なゲルによる反応器の予備的な充填、ここで、粘性溶液または均一なゲルによる反応器の予備的な充填を、その密度が、磁性粒子に結合した抗原と複合体を形成しない抗体が、抗免疫グロブリンまたはプロテインAもしくはプロテインGで被覆された反応器の傾斜壁および底部へ、ステップd)の間に移動することを妨げるような密度である粘性溶液またはゲルを用いて行い、

b) 前記抗体を含むまたは含む可能性が高い溶液の、前記抗原を有するまたは有する可能性が高い磁性粒子懸濁液への、反応器内の粘性溶液上の位置での接触、

10

20

- c) 前記複合体の形成に必要とされる時間および温度での反応器の定温保持、
- d) 磁性粒子が反応器の底部および/または傾斜壁へと引き込まれるような前記反応器への磁場の印加および反応器の攪拌、および
- e) 目視および/または各反応器での反応の終了時に、磁化された細胞の存在および位置の判定を行い得る適切な読み取りシステムによる、抗免疫グロブリンまたはプロテインAもしくはプロテインGで被覆された反応器の底部および/または反応器の傾斜壁で得られた画像の読み取りであって、得られた画像は、特定の抗体/抗原複合体の存否の実証を可能とするものである。

【請求項2】

前記抗体を含むまたは含む可能性が高い溶液と前記抗原を有するまたは有する可能性が高い磁性粒子懸濁液とを混合することにより得られる反応混合物が、磁性粒子に保有された抗原に対するものでなく、かつ抗免疫グロブリンまたはプロテインAもしくはプロテインGに結合可能である1種または2種以上の抗体を有することを特徴とする、請求項1記載の方法。

10

【請求項3】

ステップd)において、前記反応器への磁場の印加および反応器の攪拌が同時に実行されることを特徴とする、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

ステップd)において、前記反応器への磁場の印加および反応器の攪拌が、2.5～10分間、同時に実行されることを特徴とする、請求項1から3のいずれかに記載の方法。

20

【請求項5】

ステップd)において、前記反応器への磁場の印加および反応器の攪拌が、5～6分間、同時に実行されることを特徴とする、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

ステップd)において、磁性粒子が反応器の底部へと引き込まれるように、磁場の印加は反応器の外側の下に配置された磁石によって行われることを特徴とする、請求項1から5のいずれかに記載の方法。

【請求項7】

ステップd)において、前記磁石が10,000～14,000ガウスの磁力の永久磁石であることを特徴とする、請求項6に記載の方法。

30

【請求項8】

ステップd)において、攪拌が回転攪拌器によって行われることを特徴とする、請求項1から7のいずれかに記載の方法。

【請求項9】

ステップd)において、攪拌が250～750rpmで行われることを特徴とする、請求項8に記載の方法。

【請求項10】

ステップc)において、定温保持時間が10～30分間であることを特徴とする、請求項1から9のいずれかに記載の方法。

【請求項11】

ステップc)において、定温保持が20～40℃で行われることを特徴とする、請求項1から10のいずれかに記載の方法。

40

【請求項12】

ステップb)において、定温保持が37±1℃で行われることを特徴とする、請求項1から11のいずれかに記載の方法。

【請求項13】

磁性粒子の直径が100 nm～1.5 μmであることを特徴とする、請求項1から12のいずれかに記載の方法。

【請求項14】

磁性粒子が少なくとも40質量%の強磁性体化合物を含むことを特徴とする、請求項1か

50

ら 1 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 5】

ステップ a) において、前記粘性溶液またはゲルの密度が 1 以上であることを特徴とする、請求項 1 から 1 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 6】

ステップ a) において、前記ゲルがデキストランまたはアガロースゲルであることを特徴とする、請求項 1 から 1 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 1 7】

ステップ a) において、前記ゲルが S e p h a d e x TM (登録商標) ゲルであることを特徴とする、請求項 1 6 に記載の方法。

10

【請求項 1 8】

S e p h a d e x TM (登録商標) ゲルがスーパーファイン G - 1 0 0 TM であることを特徴とする、請求項 1 7 に記載の方法。

【請求項 1 9】

ステップ b) において、前記抗体を含むまたは含む可能性が高い溶液は、前記抗原を有するまたは有する可能性が高い磁性粒子懸濁液を堆積させることに先立って、前記粘性溶液上に堆積されることを特徴とする、請求項 1 から 1 8 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 0】

ステップ b) に先立って、前記粘性溶液またはゲルを、ステップ b) で堆積される反応混合物を希釈するために、水溶液によって覆うことを特徴とする、請求項 1 から 1 9 のいずれかに記載の方法であって、該反応混合物は、前記抗体を含むまたは含む可能性が高い溶液を、前記抗原を有するまたは有する可能性が高い磁性粒子懸濁液へ、反応器内の粘性溶液上の位置で接触させることにより得られる、前記方法。

20

【請求項 2 1】

ステップ b) に先立って、前記粘性溶液またはゲルを、ステップ b) における抗体 / 抗原複合体の形成を促進するために、水溶液によって覆うことを特徴とする、請求項 1 から 2 0 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 2】

前記反応器は丸いまたは V 字の底部を有するマイクロプレート杯状体であることを特徴とする、請求項 1 から 2 1 のいずれかに記載の方法。

30

【請求項 2 3】

ステップ d) において、攪拌が直径 1.0 ~ 2.5 mm の回転軌道を有する回転攪拌によって行われることを特徴とする、請求項 2 2 に記載の方法。

【請求項 2 4】

抗体溶液はヒト血漿または血清サンプルであって、磁性粒子に結合された抗原に対して特異的な抗体の存在の証明が調査されており、抗免疫グロブリンはヒト抗免疫グロブリンであることを特徴とする、請求項 2 3 に記載の方法。

【請求項 2 5】

ステップ e) において、反応器の最底部に磁性粒子が集まることは、特定の抗体 / 抗原複合体の生成がないことによって特徴付けられ、または抗免疫グロブリンによって被覆された傾斜壁における磁性粒子の少なくとも一つの可視部分の存在が前記複合体の生成を特徴付けることを特徴とする、請求項 1 から 2 4 のいずれかに記載の方法。

40

【請求項 2 6】

前記細胞が赤血球であって、溶液中に存在する血液型の抗 - 抗原抗体と血液型の抗原との反応により形成される特定の複合体の存在を証明する請求項 1 ~ 2 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 2 7】

抗原を保有する赤血球懸濁液は、あらかじめアルブミン溶液と接触した磁性粒子に対して吸着により結合されるステップを含む、血清または血漿サンプル中の不規則凝集素調査 (Irregular Agglutinin Research, IAR) のための請求項 2 6 に記載の方法。

50

【請求項 28】

ステップ b) における抗体溶液は公知の血液型の抗 - 抗原抗体を含むテスト用の血清溶液である、赤血球のフェノタイピングのための請求項 26 に記載の方法。

【請求項 29】

磁性粒子の結合に先立って、赤血球はプロテアーゼの作用を受けることを特徴とする請求項 28 に記載の方法。

【請求項 30】

磁性粒子に結合された赤血球懸濁液中の赤血球濃度は 0.1% から 0.5% であることを特徴とする請求項 26 から 29 のいずれかに記載の方法。

【請求項 31】

溶液中に存在する抗体と磁性粒子に結合された抗原との反応により形成された特定の複合体の存在の証明、または溶液中に存在する血液型の抗 - 抗原抗体と赤血球により保有される血液型の抗原との反応により形成された特定の複合体の存在の証明、または IAR もしくは血液型のフェノタイピングのためのシステムであって、

a) - 開口された頂部と封じられた底部とを有し、底部へと下方に伸びる傾斜壁を形成するようにその底部に近い領域の直径が小さくなっている反応器または一連の反応器であって、前記傾斜壁は、抗免疫グロブリンまたはプロテイン A もしくはプロテイン G で少なくとも一部が被覆され、

- それぞれの反応器は部分的に粘性溶液またはゲルによって部分的に満たされ、

b) 前記反応器の外側の下に配置される少なくとも一つの磁石または一連の磁石および前記反応器の回転攪拌システム、

c) 反応器の定温保持温度を一定にすることができる定温保持器、ならびに

d) 反応終了時におけるそれぞれの反応器内の磁化された赤血球が存在することおよびその位置を評価しうる読取システム

を含むことを特徴とするシステム。

【請求項 32】

溶液中に存在する抗体と磁性粒子に結合された抗原との反応により形成された特定の複合体の存在の証明のためのキットであって、

a) 少なくとも抗原により被覆されたまたは少なくとも抗原により被覆されるものである磁性粒子の懸濁液を含む試薬、および

b) - 開口された頂部と封じられた底部とを有し、底部へと下方に伸びる傾斜壁を形成するようにその底部に近い領域の直径が小さくなっている反応器または一連の反応器であって、前記傾斜壁は抗免疫グロブリンまたはプロテイン A もしくはプロテイン G で少なくとも一部が被覆され、

- 粘性溶液もしくはゲルを有する容器、または、部分的に粘性溶液またはゲルによって満たされた各反応器、および

c) 回転攪拌器と組み合わされた、前記反応器の外側の下に配置される少なくとも一つの磁石または一連の磁石

を含むことを特徴とするキット。

【請求項 33】

前記試薬が、前記磁性粒子が吸着されまたは連結される既知のフェノタイプのテスト用赤血球の懸濁液を含み、

同じ試薬に含まれる磁性粒子または磁性流体に吸着または結合するための既知のフェノタイプのテスト用赤血球の懸濁液を含む第二の試薬を含むことを特徴とする IAR のための請求項 32 に記載のキット。

【請求項 34】

前記試薬が、血液型の抗 - 抗原抗体を含むテスト用血清を含み、さらに、そのフェノタイプが調査されるものである赤血球懸濁液に対して結合しうる磁性粒子の懸濁液または磁性流体溶液を含むこと

を特徴とする血液型のフェノタイピングのための請求項 32 に記載のキット。

10

20

30

40

50

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、抗体／抗原複合体の存在の証明のための磁氣的免疫診断方法に関する。そのような方法の一つは、抗体または抗原、好ましくは血液型の抗 - 抗原抗体または抗原の調査および／または同定に関連し、赤血球などの細胞により保有されうる抗原により被覆された磁性粒子の懸濁液を備える。本発明はまた、そのような方法の一つを実行するための装置およびキットを含む。

【背景技術】

【0002】

近年、輸血は、ドナーの血液から得られた濃縮された赤血球の調製品（球状濃縮体）の静脈内投与からなる。

輸血の主たる危険性は、抗体とその被提供者（輸血を受ける人）の体内の赤血球抗原とをともに運ぶ可能性である。赤血球膜抗原、とりわけ血液型（または血液系）抗原、は赤血球（erythrocyte、red cellともred blood corpuscleとも呼ばれる。）の表面で見られ、免疫システムによって認識されて免疫反応を引き起こすことができる。

【0003】

ドナーの赤血球は、被提供者がドナーの赤血球抗原に対する循環抗体を有していなければ、被提供者の血液と互換性があるといわれている。

血液型を構成する赤血球膜抗原の変異抗原の中で、20以上のヒトの赤血球抗原系が今まで同定されており、AもしくはB抗原によるABOシステム、D、Eもしくはe、およびCもしくはc抗原によるRhシステム、Kもしくはk抗原によるKellシステム、Duffy（Fya、Fyb）、Kidd（Jka、Jkb）、またはMNS、Lewisなどのような現実面では調査頻度の低いシステムが挙げられる。赤血球抗原の同じ組み合わせを有する個人は、同じ赤血球血液型に属する。いくつもの抗原システムを使用すれば、血液型はましてやなおさら複雑であり非常に多くの種類となる。

【0004】

例えば自己免疫疾患の場合のような病的状態を除いて、個人の血清は、赤血球抗原に対する二種類の抗体を有しうる：

(i) ABOシステムの抗原に対するいわゆる正常な（regular）抗体（例えば、B型の個人にある抗A抗体）。これらはIgMタイプの免疫グロブリンであり、インビトロで赤血球を凝集させることができる。この現象は、Beth-VincentおよびSimoninテストに用いて個人のABO血液型をはっきりさせることに有用である。このBeth-Vincentテストはどの抗原が赤血球によって保有されているか（抗原フェノタイプ）を決定することを可能とし、Simoninテストは補足的研究を実行すること、換言すれば個人の血清の中で循環する抗Aおよびおよび／または抗B抗体を検出することを可能とする。

【0005】

Beth-Vincentテストにおいて、個人の赤血球は試験用血清または試験用抗体と接触され、これらのそれぞれはABOシステムの抗原に対する特定の抗体タイプを有している。それゆえ、これは試験用赤血球を用いる血清の凝集テストである。

【0006】

Simoninテスト、別名カウンターテストにおいて、これらの循環抗体を含む個人の血清は、試験用赤血球（red cellまたはerythrocyte）と接触され、これらのそれぞれは、ABOシステムの特定の抗原グループに属する。それゆえ、これは試験用赤血球に対する血清の凝集テストである、

【0007】

(ii) 血漿の血清中での存在は任意的なものであって非ABOシステムの抗原に対するものである、いわゆる不規則性（または免疫）抗体。これは最も一般的にはIgGを含み、これは外部の赤血球による抗原刺激に引き続いて、例えば、輸血の過程において、ま

10

20

30

40

50

たは母親の血液型には属さない胎児の赤血球抗原に対する母体免疫反応の結果として妊娠中でさえも、とりわけ出産時に生じる一つまたは複数の抗原に対する免疫に引き続いて、発生する。

【0008】

これらの不規則性抗体の調査は、不規則性凝集調査 (IAR) と呼ばれる。このテストは、さまざまな赤血球抗原に対する個人の IgG の血液中における存否を検出するために使用される。このテストを実行するためには、その抗原が知られているテスト用赤血球に対するこれらの IgG の結合を調査する。この方法は、同時に多くの種類の赤血球について実行され、結果の比較によって、IgG の存在が同定される。

【0009】

Rh の D 因子だけでなく、他の Rh タイプ (E > c > e > C)、Kell (K)、Duffy (Fy_a, Fy_b)、Kidd (Jk_a, Jk_b) などのような多くの免疫原性抗原の危険性はより大きい。

【0010】

実際、適切な血液型を適切なときに得ることは不可能であろうから、特にいくつかの抗原の組み合わせはきわめて希であるから、輸血を行う際に全てのこれらの抗原を考慮することは不可能である。標準的な輸血は、ABO 式と Rh 式 (Rh+ または Rh-) のみを考慮する。不規則性凝集の危険性がある場合には、いくつかの他のシステム、とりわけ Rh の C および E ならびに Kell、ならびに時には他のシステムが考慮される。したがって、これらの危険性のある場合には、これらの不規則性凝集の存在および発生の危険性を考慮して、ドナーの血液型の被提供者の血液型との互換性を確保することが重要である。

【0011】

それゆえ、不規則性の抗 - 赤血球抗原を有する輸血を受ける患者において、または危険性のある状況において、例えば複数の輸血を受けているが抗 - 赤血球不規則性抗原を有していない患者や、妊娠中の女性において、ドナーの赤血球が被提供者の抗体に対応する抗原を持っていないまたはその可能性が高いように、輸血される赤血球濃縮体ユニットを選択することが重要なことである。ドナーの赤血球を被提供者の血清や血漿に存在させる直接的な互換性テストによる赤血球濃縮体の投与に先だって、この互換性テストはこれらの患者について義務的なものであり、全ての被提供者について予防的に使用される。IAR に使用された手法において凝集反応および / または溶解反応が見つからないべきである。

【0012】

臨床の輸血の実務において、赤血球表面における血液型の抗原の調査および同定 (対応する正常な抗体の存在もまた調査される ABO システムは除く。) に対応する赤血球のフェノタイプは、被提供者とドナーとの双方に関係する。

【0013】

被提供者およびドナーにとって、危険度の状況に応じて互換性のある赤血球濃縮体を被提供者に提供できるように赤血球フェノタイプには 3 つの段階がある：

- ・ ABO 型フェノタイプ (または ABO 型) の決定および正常な Rh (D 抗原の存否)
- ・ Kell Rh フェノタイプの決定 (C, E, c, e および K 抗原の存否) および
- ・ 拡張された (またはより大きな) フェノタイプの決定 (Duffy システム、Fy_a および Fy_b システム、Kidd システム、Jk_a および Jk_b システムの抗原、ならびに MNS システム (S および s 抗原) の抗原、危険性の種類および / または被提供者の血清に発見された不規則性抗体に依存しておそらく調査される他の抗原の存否)。

【0014】

被提供者および / もしくはドナーの赤血球の表面における血液型抗原の存否の調査および同定に使用される、または被提供者および / もしくはドナーの血清もしくは血漿についての IAR の場合における正常なもしくは不規則性の血液型抗 - 抗原抗体の存否についての調査および同定の目的で一般的に使用される手法は、当業者によく知られているものであり、ここでは記載されない。

10

20

30

40

50

【 0 0 1 5 】

フェノタイピングは、一般的に、適当な抗体を含むテスト用血清を用いる、問題になっている抗原の存否の調査からなる。好ましくは、このこれらのテスト用血清に含まれる抗体は、そのフェノタイプが調査対象の赤血球がテスト用血清に存在する抗体に対応する抗原を保有しているとき、その赤血球の全体または部分的な凝集を得ることを可能とする接着剤（I g MまたはI g A）である。しかしながら、接着剤でない（I g Gタイプの）テスト用抗原を使用することは可能であって、その抗原において凝集は、抗免疫グロブリンによって引き起こされ、（間接クームス試験として知られている）遠心分離ステップとそれにより得られた残留物の再懸濁を経て視認可能となる。また、これらの赤血球に結合されたテスト用抗原が固相に結合された抗免疫グロブリンによって可視化される場合（免疫接着法）には、非接着性のテスト用抗原を使用することは可能である。結果物は裸眼でまたは適切な機器によって読み取られる。

10

【 0 0 1 6 】

テストされる患者の血清または血漿のサンプル内における、A B Oのための正常なまたはI A Rのための不規則性の、血液型抗 - 抗原抗体の調査または同定のために、テスト用赤血球（erythrocyte、red blood corpuscleともtest red cell 5とも呼ばれる。）は、多くの血液型システムのための公知の抗原性（A B O , R h , K e l l , D u f f y , K i d d , M N S s など）を有する患者の血清または血漿に接触される。I A Rの場合には、存在している可能性が高い抗体は非凝集性である可能性がより高く、使用される手法は抗免疫グロブリンを用いて凝集させるまたは抗免疫グロブリンで被覆された固相への免疫接着による間接クームス試験である。

20

【 0 0 1 7 】

I A Rにとって、第1ステップは、赤血球のパネルを使用することを含み、スクリーニング（最大数の抗原を含むように選択された、異なった血液型からの二つまたは三つの赤血球）と呼ばれ、不規則性抗体の存否を検出すること（しかし同定することではない。）を可能とする。スクリーニングにおいて陽性であるとき、存在する不規則性抗体の特異性の同定が赤血球のパネルによって実行され、これは赤血球同定と呼ばれ、非常に多くの公知の血液型システムにおける10の異なるフェノタイプの赤血球を含む。

【 0 0 1 8 】

輸血の分野におけるフェノタイピングやI A Rに使用される手法には数多くの変形例が存在する。これらの手法は、マイクロプレート上、管内もしくはマイクロプレート杯状体の中でなされる手動のものであったり、または、サンプル分配器、試薬、攪拌器、定温保持器およびその使用される手法に適合されたソフトウェアによる自動読み取りによって完全に自動化されたものであったりする。

30

【 0 0 1 9 】

使用される手法は、血液型の抗 - 抗原抗体または血液型の抗原の存在が、透明の小型ろ過カラム（S e p h a d e x（登録商標）またはマイクロビーズ）を用いる遠心分離後の赤血球の凝集の証明に基づいている手法を含む。そのカラムでは、上端の開口部が定温保持チャンバーの役割をし、カラムのために選択されたカットオフしきい値が、遠心分離後の凝集した赤血球がカラムを通過すること防止している（特に、特許文献1および2参照。）。

40

【 0 0 2 0 】

フェノタイピングまたはI A Rが、遠心分離および引き続いての免疫接着の後の抗体で感作された赤血球の存在を証明することに基づく手法も引用することができ、その免疫接着は、ゲルまたは5つの赤血球のみが遠心分離中に通過可能なように濃度が選択された液体から構成される分離障壁を使用し、感作赤血球を捕捉して特徴的な画像をもたらすように、下層が抗免疫グロブリンで被覆された反応容器を用いる。これらの手法の中で、特許文献3を引用することができ、その文献には、反応混合物が（牛アルブミンやポリビニルピロリドン型溶液のような）高密度の媒体を通過するように遠心分離される血液のフェノタイピング法が記載されている。この方法は、感作赤血球のための洗浄ステップを除外で

50

きるといふ有利さを有する。特許文献4を引用することもでき、この文献には、赤血球上の血液抗原またはそのような抗原に結合する抗体の存在を決定するための一般的な方法が記載されている。この方法において、赤血球は、感作されていてもいなくても、抗体を含む液体の密度よりも高く赤血球よりも低い分離媒質を用いる遠心分離により結合されていない抗体から分離され、抗免疫グロブリンが固定化された反応容器の下層壁上において、感作赤血球は非感作赤血球から分離され、非感作赤血球は容器の底部に集められる。得られた最終的な画像の解析は、被分析物の存否それぞれに固有である。

【0021】

フェノタイピングまたはIARに使用される手法の変形例の中で、おおむね、細胞に結合しうるサンプル内の被分析物を、磁性粒子を用いて調査するために開発された方法を引用することもできる。この方法は、IARまたはフェノタイピングのために凝集を基本とする手法（凝集または固相への免疫接着による間接クームス試験）では必要されるプロセスである遠心分離を特に除外するためのものである。IARに関しては、これはまた、続いてのステップで使用される抗免疫グロブリンを認識しうる非特異的な抗体を除去するように感作赤血球の洗浄が必要な場合である。

10

【0022】

遠心分離ステップは実際、完全に自動化されるべき方法において、とりわけコストと遠心分離機の煩雑な特性、取り扱い性などにより、常に実行することが困難である。

磁性粒子は、配位子 - 受容体または抗体 抗原の複合体の検出のために長年にわたり使用されてきた。例えば、次の特許文献に記載された方法を引用することができる：

20

【0023】

- 特許文献5には、磁性を有するラテックス粒子が定温保持されたサンプル内における配位子の存在を決定する方法が記載されている。当該粒子は異なった色を有し、配位子に結合可能な抗体のような基質で被覆されている。この方法では、引き続き定温保持媒体に磁場が印加され、最後に、凝集の存否が観察される、または

【0024】

- 特許文献6には、ある配位子に結合可能な抗原または抗体に感作されたゼラチン磁性粒子が定温保持されたサンプル内におけるこの配位子の存在を決定する方法が記載されている。引き続き定温保持媒体に磁場が印加され、最後に、凝集の存否が観察されるこの方法では、反応容器を傾けた後の、とりわけV型の底部を有するマイクロプレート杯状体内でのこれらの粒子の、傾き状況が観察されることが特徴となっている。

30

そのような磁性粒子は免疫血液学ではフェノタイピングおよび/またはIARのためにすでに使用されてきている。以下は、そのような応用を記載する文献として引用されうる、

【0025】

- 特許文献7には、磁性ラテックスビーズに固定された抗体または抗原のような磁化されたマーカーを用いる免疫アッセイ方法が記載されている。これらのマーカーは、免疫反応ステップにおいて決定されるべきものである基質に結合することができる。ラベル付きの磁性粒子は次に、測定容器の壁表面の予め規定された領域に、この杯状体の下方に配置された磁石を用いて磁場の影響のもとで収集される。この方法は、測定容器の壁表面の予め規定された領域に固定されるものである、決定される基質に特異的に結合しうる基質を含みうる。マイクロプレート杯状体に予め固定された赤血球が被提供者の血清で感作されたのち（洗浄液の吸引および注入によって）洗浄されるという免疫接着によるIAR手法の記載が存在する。この後、磁場の印加に先立って、抗免疫グロブリンで被覆された磁性ラテックスビーズが添加される。

40

【0026】

- 特許文献8には、サンプル内に存在する可能性が高い生体基質の免疫接着による検出方法が記載されている。この方法では、フェノタイプされたりスクリーニングおよび/または同定パネルとして使用されたりする赤血球は、マイクロプレートの底部に予備的な固定がなされる。固定された赤血球のテスト用血清（フェノタイプ用）またはテストされる

50

被提供者の血清（I A R用）による感作後、杯状体は洗浄され、次いで抗免疫グロブリンで被覆された磁性ラテックスビーズが添加される。この方法において、テスト用基質に非特異的に結合された磁性粒子を移動させるように、連続的に二種類（垂直方向および円状）の磁場が印加される、および

【0027】

- 特許文献9には、磁場の存在下におけるポリカチオン性の化合物またはポリアニオン性の化合物による、サンプル内に含まれる基質に結合しうる磁性粒子の共凝集方法が記載されている。特に、当該文献には赤血球を含む血液全体のサンプルにおける血漿の分離が記載され、文献中、その方法は、磁石上に配置された容器への血液全体のサンプルおよびコハク酸化牛血清アルブミンで被覆された磁性流体（ $FeCl_2 / FeCl_3$ ）の連続的な添加を含み、こうして得られた赤血球粒子の凝集体は次に磁石に引き寄せられ、こうしてデカンテーションによって精製された血漿の収集が可能となる。当該文献にはさらに、血漿サンプル内の抗-Rh抗体（抗-D）定量化方法が記載されている。それは、上記の方法にしたがって準備され、蛍光Rh+赤血球の懸濁液の存在下で定温保持され、その混合体にコハク酸化磁性流体およびポリブレンが連続的に添加される。ここで、抗免疫グロブリンの添加に先立って磁場印加およびデカンテーションにより赤血球は何回か洗浄される。血漿サンプル内の抗-Rh抗体の定量評価は、所定の容積で観察される蛍光量のゆらぎを解析することによる実験対照との比較によってなされる。

【特許文献1】欧州特許公開EP 0 194 212

【特許文献2】欧州特許公開EP 0 755 719

【特許文献3】欧州特許公開EP 0 058 780

【特許文献4】国際公開WO 98/02752

【特許文献5】国際公開WO 92/17781

【特許文献6】欧州特許公開EP 0 426 170

【特許文献7】欧州特許公開EP 0 351 857

【特許文献8】欧州特許公開EP 0 528 708

【特許文献9】欧州特許公開EP 0 230 768

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0028】

それゆえ、他の抗原に対する抗体をも含む複合反応混合物における所定の抗原に対して特異的な抗体の存在を検出するすばやくかつ簡単な方法を利用可能とすることは有効であろう。そのような遠心分離ステップおよび洗浄ステップを有さない方法は、とりわけI A R目的で、マイクロプレートのような全自動化された実務的で入手可能なサポートにおいて使用できる有利さを提供する。

【0029】

これがまさしく本発明の目的である。

【課題を解決するための手段】

【0030】

丸みを帯びた底部と特定の抗原に結合可能な抗免疫グロブリンで被覆された傾斜壁マイクロプレート杯状体タイプの反応器において、本発明者は、遊離抗体、とりわけ他の抗原に対するものを含むうる複合反応混合物内で抗体と抗原との間で形成された特定の複合体を検出する簡単で効率的な方法であって、洗浄や遠心分離ステップが行われていない方法を開発した。本方法は細胞によって保有される抗原で被覆された磁性粒子懸濁液を使用し、大いに自動化されることができ、特に赤血球のI A R、必要であれば赤血球のフェノタイプに適用される方法である。

【0031】

この方法において、抗体/抗原複合体の存在は、免疫接着の結果として、反応器の傾斜壁上に形成された複合体の存在の可視化により反応の最後に決定される。

【0032】

10

20

30

40

50

本発明者は、驚くべきことに、抗体溶液と抗原、とりわけ赤血球により被覆された磁性粒子の懸濁液とからなり、杯状体内で、密度が抗体溶液の密度よりも高い粘性溶液またはゲル上で形成されている反応混合物の定温保持に引き続いて、磁性粒子の懸濁液をこの粘性溶液またはこの分離ゲルを通過して抗免疫グロブリンで被覆された杯状体の傾斜壁および/または底部へと、杯状体に下方に設置された磁石を用いて得られる磁場によって移動させることが可能であることを見出した。移動後、免疫接着によって形成された特定の複合体の存在は可視化される。また、この方法では、抗免疫グロブリンを飽和させる可能性が高い遊離抗体の移動を生じることがない。

【0033】

さらに驚くべきことに、本発明者は、粒子、特に被覆された赤血球が粘性溶液またはゲルを通過する移動を大いに促進するだけでなく、磁性粒子に担持される抗原が傾斜壁および杯状体の底部に結合された抗免疫グロブリンに衝突する可能性を高めるといふ、磁場および杯状体の回転攪拌の複合および同時効果によって、本方法を改善することが可能であることを見出した。

【0034】

免疫接着手法において洗浄ステップを除外するために、抗体を含有する液体よりも高いが赤血球よりも低い密度の粘性溶液またはゲルを用いて、遠心分離によって（感作されたまたはそうでない）赤血球をこれらの赤血球に結合されていない遊離抗体から分離しうることは示されているものの（これまで引用した特許文献3、4を参照。）、本発明者は、抗原、とりわけ赤血球を担持する磁性粒子とともにこれらの粘性溶液やゲルを用いて、杯状体の外部の下方に配置された永久磁石によって作り出される磁場によって、特に磁場を反応器内の回転攪拌ステップと複合させることによって、遠心分離ステップを除外することが同様に可能であることを見出した。

【0035】

それゆえ、第一の実施形態として、本発明の対象は、溶液中に存在する抗体と磁性粒子に結合された抗原との反応により形成された特定の複合体の存在の証明方法であって、反応は開口された頂部と封じられた底部とを有する反応器内で発生し、その反応器の直径は、底部へと下方に伸びる傾斜壁を形成するように、底部に近接した領域で小さくなり、この傾斜壁は、前記形成された複合体の抗体に対して結合しうる抗免疫グロブリンまたは他の化合物で少なくとも一部が被覆され、次のステップからなる：

a) 反応に先立って、

- 反応器の傾斜壁の少なくとも一部が被覆されるような粘性材料または均一なゲルによる反応器の予備的な充填、

b) 前記抗体を含むまたは含む可能性が高い溶液の、前記抗原を有するまたは有する可能性が高い磁性粒子懸濁液への、反応器内の粘性溶液上の位置での接触、

c) 好ましくは前記複合体の形成に適した時間、好ましくは少なくとも5分間および温度での反応器の定温保持、

d) 反応器の底部および/または抗体に対して結合しうる抗免疫グロブリンまたは他の化合物で被覆された傾斜壁へと磁性粒子が引き込まれるような、特に、大部分の粒子が反応器の底部に見つかるようなおよび/または抗体に対して結合しうる抗免疫グロブリンもしくは他の化合物によって傾斜壁に特異的に結合されるような前記反応器への磁場の印加および反応器の攪拌、および

e) 目視および/または他の適切な読み取りシステムによる、反応器の底部および/または前記抗免疫グロブリンで被覆された反応器の傾斜壁の読み取りであって、得られた画像は、それゆえ、特異的な抗体/抗原複合体の存否の証明を可能とするものである。

【0036】

「溶液中に存在する抗体と磁性粒子に結合された抗原との反応により形成された特定の複合体」とは、本記載において、ある抗原を特異的に認識可能な抗体とこの抗原との間で形成された複合体であって、抗原に対して結合された磁性粒子上で形成されたものを意味する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 7 】

「特定の複合体」とは、細胞、とりわけ赤血球によって保有される抗原を特異的に認識可能な抗体とこの抗原との間で形成された複合体であって、抗原を保有する細胞が結合された磁性粒子上で形成されたものをも意味する。

一般的に、特異的な抗体 / 抗原複体の抗体として、I g G、I g M、I g AもしくはI g E、またはあらゆる他の抗原種類がありうる。

【 0 0 3 8 】

「形成された複体の抗体に対して結合しうる抗免疫グロブリン」とは、ここでは、抗免疫グロブリンであって、多クローン性または単クローン性の、いかなる抗体、特にヒトの、I g G、I g M、I g AもしくはI g E（全抗免疫グロブリン）、またはある特定の抗原種類、とりわけ特定の抗 - I g G抗体のいずれかについて認識し結合可能なものを意味する。そのような抗免疫グロブリン、特にヒトの抗免疫グロブリンは、当業者によく知られており、多くの提供者から入手可能である。それゆえ、ここでは詳細な説明、特にその製造方法に関しては行わない。

【 0 0 3 9 】

「形成された複体の抗体に対して結合しうるいかなる化合物」とは、特にプロテイン A タイプの化合物またはプロテイン G タイプを意味し、これらは、抗原への認識と特異的な結合で当業者によく知られている。

【 0 0 4 0 】

「大部分の磁性粒子」とは、ここでは、反応混合物内の磁性粒子の数量の少なくとも 60 %、好ましくは少なくとも 70 %、80 %、85 %、90 % および 95 %、さらに好ましくは少なくとも 98 % を意味する。

【 0 0 4 1 】

特に、抗原が細胞、とりわけ赤血球によって保有されているとき、「大部分の磁性粒子」なる用語は大部分の磁性粒子または大部分の細胞を意味し、大部分の細胞は、反応混合物内に存在する磁化された細胞の数量の少なくとも 60 %、好ましくは少なくとも 70 %、80 %、85 %、90 % および 95 %、さらに好ましくは少なくとも 98 % を意味する。

【 0 0 4 2 】

抗原が細胞、とりわけ赤血球に保有されている特別な場合には、反応器に対する磁場の印加および反応器の攪拌に関するステップ d) は、反応器の底部および / または抗体に対して結合しうる抗免疫グロブリンまたは他の化合物で被覆された傾斜壁へと磁性粒子または磁化された細胞が引き込まれように、特に、大部分の磁性粒子または磁化された細胞が反応器の底部に見出される、および / または抗体に対して結合しうる抗免疫グロブリンもしくは他の化合物によって傾斜壁に特異的に結合されるようになされるべきである。

【 0 0 4 3 】

好ましい態様として、本発明は、上記の発明において、抗体を有しているまたは有している可能性が高い溶液と抗原を保有しているまたは保有している可能性が高い磁性粒子懸濁液との定温保持後に得られる反応混合物が遊離抗体、特に磁性粒子に保有された抗原に対するものでないものを有しており、調査対象である抗体に対して結合しうるものである、使用された抗免疫グロブリンもしくは他の化合物にこの遊離抗体は結合可能である方法を含む。

【 0 0 4 4 】

「遊離抗体」とは、ここでは、磁性粒子に保有された抗原と複合体を形成していない抗体を意味する。

同様に好ましい実施形態として、本発明は、上記の発明において、溶液に含まれるまたは含まれる可能性が高い抗体であって、磁性粒子によって保有される抗原とにより特定の複合体が形成されるものは、I g G タイプの抗体、またはこの抗体が血液型抗原の抗体である場合には非凝集性抗体であって赤血球が対応する抗体を保有していることを特徴とする方法を含む。

10

20

30

40

50

【0045】

さらに好ましくは、この抗体がIgGタイプであるとき、抗IgG、とりわけ（ヒト由来の抗体に対する）ヒト抗IgGが好ましい抗免疫グロブリンである。

特に好ましい実施形態として、本発明は、上記の発明において、ステップd)で反応器は磁場の存在下で攪拌される方法を含む。

【0046】

ステップd)では、磁場印加ステップと反応器攪拌ステップとはいずれか一方を開始することで実行されてもよいが、少なくとも所定の時間、磁場の印加と攪拌とが同時に発生するように実行されてもよい。

【0047】

明らかに、ステップd)において反応器の攪拌に先立って磁場の印加が実行され、このとき、磁場の印加のみ（攪拌なし）の時間は最大でも2分、好ましくは1分30秒、1分、または30秒を越えないという上記発明の変形例の方法も本発明に含まれる。磁場の印加に先立って攪拌が実行され、このとき攪拌のみの時間は最大でも2分、好ましくは1分30秒、1分、または30秒を越えないという場合もある。

【0048】

特に好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、ステップd)で磁場の印加が攪拌と同時に実行される方法を含む。

「同時に」とは、攪拌のみまたな磁場の印加のみが実行される時間が20秒を超えないことを意味する。

【0049】

この態様に関して、本発明は上記発明において、ステップd)で磁場の印加と攪拌とが同時に2.5分間～10分間実行される方法を含む。

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、ステップd)で磁場の印加と攪拌とが同時に4分間～7分間の範囲、さらに好ましくは5分間～6分間実行される方法を含む。

【0050】

本発明は上記発明において、ステップd)で、磁性粒子が反応器の底部へと、好ましくは反応容器の縦軸に沿って引き込まれるように、磁場の印加は反応器の外側の下に配置された磁石によって実行される方法を含む。

【0051】

本発明の方法の好ましい実施形態様として、ステップd)において、上記の磁石が、8000～16000ガウスの範囲、好ましくは10000～14000ガウス、さらに好ましくは11500～12500ガウス、特に好ましくは12000ガウスの磁力の永久磁石である方法を含む。

【0052】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、ステップd)で、攪拌が回転攪拌器によって行われる方法を含む。

「回転攪拌器」とは、ここでは、特に、一体化された反応器、または96杯状体マイクロプレート（図1Aおよび1B参照。）の場合には反応器セットを有する回転プラットフォームを意味する。

【0053】

特定の攪拌の様式として、本発明は上記発明において、ステップd)で、攪拌が、反応器の最大直径が7mmのとき直径1.0mmから2.5mm、好ましくは直径1.25mmから2.25mm、1.5mmから2mm、2mmとなる比率の軌道を有する回転攪拌からなる方法を含む。

【0054】

「比率」は、例えば、最大直径が7mmの2倍または半分となったとき、対応する上記の回転軌道の直径は2倍になったり半分になったりすることを意味する。

【0055】

「回転タイプの攪拌装置の軌道」とは、攪拌プロセス中における反応器の最低部（反応

10

20

30

40

50

器の縦軸の最低点5)によって示される円の直径を意味する。

【0056】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、ステップd)で、攪拌が250~750rpm、好ましくは400~600rpmで行われる方法を含む。

特別な実施形態として、各反応器の間に配置された磁石が攪拌プラットフォームの一部を形成する(図1Aおよび1B参照。)。

【0057】

この場合に、反応器の下に配置された磁石の縦方向の中心軸は、攪拌中、反応器の縦方向の中心軸によって形成される軌道に従う。

【0058】

特別な実施形態として、各反応器の間に配置された磁石は攪拌プラットフォームに対して固定されない。この場合には、反応器の下に配置された磁石の縦方向の中心軸は動かず、攪拌中、反応器の縦方向の中心軸によって形成される軌道に従わない。

【0059】

本発明は上記発明において、ステップc)で、定温保持時間が10~30分間、好ましくは15~25分間である方法を含む。

【0060】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、ステップc)で、定温保持が10~40、好ましくは25~40、30~40、好ましくは約37(37±1)で行われる方法を含む。

【0061】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、ステップb)で、定温保持が30~40、好ましくは37で行われる方法を含む。

【0062】

磁性粒子を含む免疫診断における捕捉および三細胞(tri-cellular)手法は、膨大な刊行物の主題となっており、当業者にとってよく知られている。

【0063】

これらの手法の中で、磁性粒子の機能化を利用するものを引用することができ、それゆえ、それは、適切な条件で適した試薬を用いて、粒子に対して共有結合的に結合されるべきものである抗原と反応しうる表面上に反応性官能基、とりわけ、最も一般的なものとして引用すれば、酸基、アミノ基、エポキシまたはアルデヒド基を得ることを可能とする。

【0064】

粒子に対して結合されるべきものである抗原の受動的な吸着を利用する手法をも引用することができ、それは、とりわけ、抗原およびこの受動的吸着が実行されるべき条件に依存して正または負に荷電されたビーズとすることを可能とする適切な処理によりなされる。

【0065】

本発明の目的の使用に適した磁性マイクロビーズ(または粒子)の提供者として特にAdemtech(33600 Pessac, France)が挙げられ、Ademtechは、酸またはアミンで機能化されうる直径約100から500nmの磁性粒子のほかに、これらの官能基との所望の結合の実行を可能とする手順書および試薬を提供している。この企業はまた、直径約300nm±30nmの機能化されていない疎水性粒子も提供する。この粒子は、後記する実施例において主として使用される。これらの磁性粒子は50%以上の強磁性体による(酸化鉄のような)核からなり、この核は、ポリスチレンによって被覆されている。他の企業としてBioclone社(San Diego, CA, U.S.A)が挙げられ、この企業は全範囲の機能化磁性ビーズを提供する。さらに、Dyna1 Biotech GmbH(Hamburg, Germany)の広範囲のDyna beadsTMがあり、この企業は特に、ストレプトアビジン、トシルまたはカルボン酸基により活性化された磁性マイクロビーズを提供する。もう一つの企業としてMerck Chimie SAS(94126 Fontenay-sous-Bois,

10

20

30

40

50

France) が挙げられ、異なった粒子径 (300 nm から 2 μm) の範囲で、最大 50% のフェライトを含むポリスチレンまたはジビニルベンゼンに基づく磁性マイクロビーズの EstaporTM を有し、当該粒子は例えば酸またはアミノ基によって機能化されるしそのままともしうる。これらの粒子は、強磁性化合物の存在下スチレンの高分子化を用いる方法によって調製される。最後に、磁性ポリマーラテックスが記載されている欧州特許 EP0 038 730 (Rhône Poulenc)、このほか、欧州特許出願 EP0 150 714, EP0 190 006, EP0 238 353, EP0 249 357 (Serono Diagnostics) またはフランス国特許 FR2262805 および FR2454098 (Corning Glass Works) に記載される磁性粒子を引用することができる。

【0066】

本発明における「磁性粒子」なる用語は、鉄 (III) ポリ酸化負イオンと鉄 (II) のような少なくとも酸化度 II の M (II) の混合体から得られる磁性流体水溶液を意味し、磁性流体は、特に、フランス国特許 FR 2 4 6 1 5 2 1 の実施例 1 から 8 に記載される方法によって得られるようなものである。

【0067】

好ましくは、本発明の方法において使用されうる磁性流体溶液は、フランス国特許出願 FR2461521 の実施例 1 から 8 に記載される方法によって調製される磁性流体溶液を、赤血球が磁化されるためにその磁性流体溶液に接触したときに赤血球が溶解することを避けるために、水系の溶媒で、好ましくは界面活性剤 (または洗浄剤) を存在させることなく希釈することで生じる。これは赤血球によって保有される抗原を使用する本発明の特に好ましい方法である。

【0068】

好ましい実施形態において、その磁性流体溶液は、Fe (III) ポリ酸化負イオンと少なくとも一つの酸化度 II の金属 M (II)、好ましくは Fe (II), Co (II), Mn (II), Cu (II) または Ni (II) のような第一遷移金属から選ばれる金属とからなる混合物によって調製されることによって特徴付けられる。

【0069】

特に、その磁性流体溶液は、Fe (III) ポリ酸化負イオンと、H⁺, CH₃⁺, N(CH₃)₄⁺, N(C₂H₅)₄⁺ のような正イオンまたはポリ酸化負イオンに Na, K⁺ および NH₄⁺ よりも高い水への溶解度をもたらしうるいかなる他の正イオンに結合された少なくとも一つの酸化度 II の金属 M (II) とからなる混合物によって調製されうる。これらの正イオンは塩酸、酢酸のような適切な酸によって、またはテトラメチルもしくはテトラエチルアンモニウムの水酸化物によって保有されうる。

【0070】

好ましくは、磁性流体を調製するための Fe (III) および M (II) のために選択される開始金属源は次の中から選ばれる塩である：

Fe (III) のためには、フランス国特許 FR2461521 の第 4 ページ第 1 および 2 行に列記されるもの、とりわけ塩化第二鉄、および

M (II) のためには、フランス国特許 FR2461521 の第 4 ページ第 3 から 6 行に列記されるもの、とりわけ塩化第一鉄。

【0071】

好ましくは、磁性流体溶液は Fe (III) と金属 M (II) との混合物から調製され、酸化度 II の初期のモル濃度比率が 2 ± 1、好ましくは 2 ± 0.5、2 ± 0.25 または 2 ± 0.1 であることを特徴とし、Fe (III) と酸化度 II の金属 (II) の最も好ましい初期のモル濃度比率は 2 である。

【0072】

さらにもっと好ましくは、水酸化ナトリウム、または水酸化テトラメチルもしくはテトラエチルアンモニウムのような適切な強アルカリが初期の Fe (III) および金属 M (II) の塩の混合物に添加される。

【0073】

10

20

30

40

50

さらに好ましくは、磁性流体水溶液は緩衝液または食塩水で予備的な希釈がなされる。

ある用途では、感度または反応速度が向上されるべきものであるとき（しかしながらテストの非特異性は増加させることない）に特に、低イオン強度緩衝液（I S B）、L I S S緩衝液とも称される、を使用することができる。

【0074】

好ましい実施形態において、上記の緩衝液または食塩水によって磁性流体溶液は0.25から10%（v/v）、好ましくは0.25から5%、0.25から2.5%、0.25から1%、および0.25から0.75%に希釈される。

【0075】

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、磁性粒子は100nmから1.5μm、好ましくは、150nmから1.2μm、200nmから1μm、または200nmから800nm、の直径を有する方法を含み、200nmから800nmが最も好ましい。

10

【0076】

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、磁性粒子は少なくとも35質量%、好ましくは少なくとも50質量%の強磁性化合物（例えばフェライトまたは酸化鉄）を有する方法を含み、少なくとも70質量%であって強磁性化合物が酸化鉄であることが好ましい。

【0077】

さらに好ましくは、特定の複合体の抗原が細胞、とりわけ赤血球によって保有されているとき、磁性粒子は疎水性であって、界面活性剤、好ましくはノニオン性洗浄剤の存在下で予備的な洗浄を受けている。

20

【0078】

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、ステップa)で、粘性材料または均一なゲルによる反応器の予備的な充填は、ステップd)の間に、磁性粒子に結合された抗原との複合体を形成しない抗体が、その抗体を認識する抗免疫グロブリンまたは他の化合物で被覆された反応器の傾斜壁および底部に移動することを妨げるような密度の粘性材料またはゲルを使用して実行される方法を含む。

【0079】

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、ステップa)で、粘性材料またはゲルの密度が1以上である方法を含む。好ましくは、粘性溶液は血清アルブミン、特にウシ血清アルブミン、またはポリビニルピロリドン（PVP-40またはPVP-60）、さらにはゼラチンに基づいている。

30

【0080】

均一なスーパーファイン SephadexTM G-100ゲル溶液についての実施例として以下に記載された手順書を、（細胞に保有されているまたは保有されていない）抗原の性質ならびにフェライト磁性粒子の大きさおよび組成に応じて、これらの粘性溶液またはゲルを通過して完全な粒子の移動を得るように、とりわけ粘性溶液またゲルの最終濃度、移動時間（攪拌）、攪拌速度、および必要であれば回転攪拌の回転軌道を変化させることにより、他のタイプのゲルまたは粘性溶液に対して適用するために必要な知識を当業者は有しているであろう。

40

【0081】

例えば、アルブミンまたはPVPに基づく粘性溶液に関し、30%±10%の領域の濃度で用いられうる。

【0082】

好ましい実施形態様において、本発明は上記発明において、ステップa)で、ゲルがデキストランまたはアガロース（SephacroseTM（Pharmacia、Sweden）、すなわちSephacroseTM 4Bまたは6B）である方法を含む。

【0083】

同様に好ましい実施形態として、溶液がゲルタイプであるとき、ゲル溶液の密度を高め

50

るために、ウシ血清アルブミンの存在下でこのゲルは調製され、好ましいゲル溶液における最終濃度は5%から15%、好ましくは10%±2.5%(単位はいずれもW/V)である。

【0084】

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、ステップa)で、粘性溶液またはゲルがSephadexTM(Pharmacia, Sweden、またはSigma-Aldrich)、好ましくはG-10TM、G-25TM、G-75TM、G-100TM、G-150TMまたはG-200TMであって、これらにおいてデキストランビーズの直径は20nmから300nmの範囲にありうる方法を含む。さらに好ましくは、SephadexTMがスーパーファインG-100TMである。

10

【0085】

さらにまして好ましくは、ゲルの濃度、特にまたはSephadexTMまたはSephharoseTMの濃度は1.5%から6%、好ましくは2%から5%、2.5%から4%である。濃度が3%±0.5%であることは、とりわけSephadexTMに、特にスーパーファインG-100TMにとって最も好ましい。

【0086】

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、ステップb)で、抗体を含むまたは含む可能性が高い溶液は、抗原を有するまたは有する可能性が高い磁性粒子懸濁液を堆積させることに先立って、粘性溶液上に堆積される方法を含む。

【0087】

20

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、ステップb)に先立って、粘性液体またはゲルは、ステップb)で堆積される反応混合物を希釈すべく、水溶液によって覆われる方法を含み、抗体溶液が希釈されていないヒト血清または血漿であるときにこのようにすることが好ましい。好ましくは、その抗体溶液またはサンプルを希釈するために使用される水溶液は、抗体溶液の体積の1から10倍、さらに好ましくは2から7倍、3から6倍、または4から5.5倍の体積に相当する。4から5倍の容積が最も好ましい範囲であり、とりわけ96凹タイプのマイクロプレート杯状体において好ましい。それゆえ、希釈溶液はBSAをも含むうる(その好適濃度については後記参照。)食塩水になりうる。

【0088】

30

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、ステップb)に先立って、粘性液体またはゲルは、HAGによって被覆された杯状体の壁にテスト用の抗体を含むサンプル(血清または血漿)が直接的に接触すること、または粘性溶液またはゲルとこのサンプルが交じり合うことを防ぐためにも、水溶液によって覆われる方法を含む。すなわち、その血清または血漿サンプルに含まれる非特異的な抗体を有する壁面の底部における被覆されたHAGとの反応または飽和は、検出対象である特定の抗体抗原複合体の結合を抑制するであろうから、この反応または飽和を防ぐためである。

【0089】

好ましい実施形態において、本発明は上記発明において、ステップb)に先立って、粘性液体またはゲルは、希釈してステップb)における抗体/抗原複合体の形成を促進するように、水溶液によって覆われる方法を含む(図2Aおよび2B参照。)

40

【0090】

この場合には、血液型の抗体/抗原によって形成される特定の複合体が、とりわけIARまたは赤血球フェノタイピングとの関連でその存在を証明されるべきものであって、この希釈された溶液は、血液免疫学の当業者にとってよく知られた低イオン強度緩衝液(ISB)を用いて実行される反応を促進する。必要に応じて、このISBである低イオン強度緩衝液は、最終的な濃度が1.5%から6%、好ましくは2%から5%、好ましくは3%±1%の値(単位はいずれも(W/V))であるであるウシ血清アルブミン(BSA)の存在下得られる。

【0091】

50

いくつかの用途では、とりわけ（テスト対象の非特異性を増加させることなく）感度または反応速度を向上させることに關するとき、低イオン強度緩衝液 I S B、これはまた L I S S (L o w I o n i c S t r e n g t h S o l u t i o n) 緩衝液とも呼ばれる、は使用されうる。

【 0 0 9 2 】

緩衝液または食塩水は細胞生物学、とりわけ免疫血液学の領域において、赤血球の溶解を防ぐために、とりわけ I A R またはフェノタイピングの用途において、一般的に使用される緩衝液を意味することを当業者は知っているだろう。そのような緩衝液または溶液は例えば、生理学的 pH として 6 . 8 から 7 . 5 であって、得られる最終的な緩衝液のモル濃度が浸透圧の観点では 0 . 9 % の食塩水（約 0 . 1 5 M の N a C l ）のモル濃度と同様であるように、緩衝液の構成成分のモル濃度は調製される。特に、これに限定されることなく引用すれば、当業者にとってよく知られたものとして、P B S タイプの pH 7 . 0 - 7 . 4 のリン酸塩緩衝液が挙げられる。

10

【 0 0 9 3 】

I S B または L I S S 緩衝液の組成は、それゆえ、凝集反応を促進しうることについて血液免疫学においてよく知られているので、ここでは記載しない。これらの緩衝液は血液学的試薬の提供者から入手可能である（例えば、これに限定されることなく引用すれば、次の組成を有する L I S S 緩衝液が挙げられる：1 6 g / L のグリシン、0 . 0 3 M の N a C l および 0 . 0 1 5 M のリン酸塩で pH が 6 . 7 ）。

【 0 0 9 4 】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、反応器は丸い底部（U 字底部もしくは半球底部とも呼ばれる。）または V 字の底部を有するマイクロプレート杯状体である方法を含む。

20

【 0 0 9 5 】

抗体を認識しうる抗免疫グロブリンまたは他の物質によって杯状体の底部および傾斜壁があらかじめ感作されて（被覆されて）いるマイクロプレート杯状体タイプの反応器は、当業者によく知られた容易に入手できる（特に下記の実施例を参照。）。

【 0 0 9 6 】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、抗体溶液はヒト血漿または血清のサンプルであって、磁性粒子に結合された抗原に特異的に対する抗体、好ましくは磁性粒子と凝集しない抗体、特に I g G タイプの存在の発見を目的とし、抗免疫グロブリンがヒト抗免疫グロブリン、特にヒト抗 I g G であることを特徴とする方法を含む。

30

【 0 0 9 7 】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、ステップ e) で、反応器の最底部での磁性粒子の収集は特定の抗体 / 抗原複合体の生成がないことによって特徴付けられる、または、抗免疫グロブリンによって被覆された傾斜壁における磁性粒子の少なくとも一つの可視部分の存在が複合体の生成の特徴となる方法を含む。

【 0 0 9 8 】

好ましくは、磁性粒子はこれらの粒子のよりよい可視化のために着色されていることができる。

40

【 0 0 9 9 】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、溶液内に存在する抗体と、細胞またはウイルスの大きさと粒子の大きさとに依存してそれ自体は一つまたは複数の磁性粒子（上記の磁性流体タイプの溶液も含む。）によって結合される細胞またはウイルスによって保有される抗原との反応によって形成された特定の結合体の存在を証明する方法を含む。

【 0 1 0 0 】

好ましくは、細胞は、真核細胞、哺乳動物細胞もしくは酵母細胞、またはバクテリアから選ばれる。

【 0 1 0 1 】

50

さらにより好ましくは、細胞は哺乳動物細胞、とりわけヒトの細胞であって、好ましくはリンパ球もしくはマクロファージタイプの白血球、または血小板もしくは赤血球である。

【0102】

特定の態様において、細胞に保有される抗原は細胞の外表面に自然に存在する抗原でなく、この場合は細胞の表面に共有結合もしくはイオン結合によってあらかじめ固定されたまたは吸着された抗原である。

【0103】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、溶液中に存在する血液型の坑 - 抗原抗体と血液型の抗原との反応により形成される特定の複合体の存在を証明する方法を含み、細胞が赤血球であって、好ましくは抗原がその赤血球により保有される、自然界に存在する抗原である。

10

【0104】

この記載における「赤血球 (erythrocyte, red cell, and red blood corpuscle)」は同一の“blood cell”と互換性のあるように使用される。

【0105】

好ましい実施形態として、本発明は、不規則性凝集素調査 (IAR) または血清もしくは血漿サンプル中の赤血球抗体、好ましくは非凝集性抗体の調査、あるいは赤血球フェノタイピングの方法に係る上記の発明において、抗原を保有する赤血球が、イオン結合性もしくは吸着によって磁性粒子に対し予備的結合を受けるか、または磁性流体溶液において懸濁状態にされるステップを有し、好ましくは、磁性粒子は機能化されておらず、かつ界面活性剤、好ましくはノニオン性界面活性剤の存在下で洗浄されている。これらの磁性粒子は、洗浄剤中の洗浄後、赤血球の吸着を促進するように、(0.05 から 5%、好ましくは 0.1 から 1% の) アルブミン溶液に接触していてもよい。

20

【0106】

この場合には、この粒子の処理またはその機能化、とりわけその結果としての表面電荷、がそのようなイオン結合もしくは吸着、または磁性粒子上の官能基に対するルブミンの共有結合を可能としているならば、とりわけこれらの粒子に結合されたカルボキシ基もしくはアルデヒド基がアルブミン (BSA) のアミノ基、とりわけレジン残基と共有結合を形成することを可能とするならば、アルブミンはそれ自身磁性粒子の表面にイオン結合により結合されまたは吸着されている。

30

【0107】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、ステップ b) の抗体溶液は公知の血液型の坑 - 抗原抗体、好ましくは IgG タイプを含むテスト用の血清溶液である赤血球のフェノタイピング方法を含み、IgG タイプの場合には、反応器は、使用される (動物もしくはヒトの) 血液型の坑 - 抗原抗体を与える化学種に対する抗免疫グロブリン、またはこのテスト用血清に含まれる特定の抗体 (とりわけ A もしくは G タンパク質) を認識しうる他の化合物で被覆されている。

【0108】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、磁性粒子への結合もしくは磁性流体溶液への懸濁の前または後、好ましくは前に、赤血球はプロテアーゼ、好ましくはプロメラインまたはパインの作用を受けうる方法を含み、これは特定の複合体の生成を促進するものであり、このような血液フェノタイピング手法は当業者にとって公知である。

40

【0109】

好ましい実施形態として、本発明は上記発明において、反応器内の抗体溶液に添加される前の赤血球濃度、または磁性流体溶液中の最終的な赤血球濃度は、0.1% から 0.5%、好ましくは 5% から 2.5% および 0.75% から 2%、最も好ましくは 1% ± 0.25% である方法を含む。

【0110】

本発明に係るマイクロプレート杯状体内で実行される IAR および / またはフェノタイ

50

ピングの特に好ましい方法において、その方法は次のステップを含む：

a) 反応に先立って：

- 反応器の傾斜壁の少なくとも一部が被覆されるような、 $10\% \pm 2.5\%$ のBSAが存在するLISSタイプ緩衝液にスーパーファインSephadexTMG-100ゲルを約 $3\% \pm 0.5\%$ 有する均一な $50\mu\text{L} \pm 10\mu\text{L}$ の溶液による丸い底部を有する杯状体の予備的な充填、および必要に応じて、

- $3\% \pm 1\%$ のBSAを有するLISS緩衝液であって好ましくはpHが6.5から7.55の $60\mu\text{L} \pm 15\mu\text{L}$ の添加、

- 磁性流体溶液または磁性粒子によって磁化された赤血球の使用であって、大きさが100nmから1000nmまたは200nmから800nmである磁性粒子である場合には、機能化されていないことが好ましく、少なくとも40%のフェライト（鉄の酸化物）を有していることが好ましく、さらに好ましくは、抗体と特定のものを形成しうる抗体を保有している赤血球に対してこれらの粒子がイオン結合的結合しにまたは吸着しうるようにBSAで被覆されおよび/またはあらかじめ処理されてしまっている、

b) 杯状体内に含まれる均一なゲル溶液上での、必要であれば $3\% \pm 1\%$ のBSAを有するLISS緩衝液上での、

- 抗体を含むまたは含む可能性が高い $25\mu\text{L} \pm 7.5\mu\text{L}$ の溶液、および抗原を有するまたは有する可能性が高い磁性粒子で被覆された赤血球濃度が0.75%から1.25% (v/v)の赤血球懸濁液の

- 抗体を含む $12\mu\text{L} \pm 8\mu\text{L}$ のサンプル（IARの場合には血清もしくは血漿、またはフェノタイピングの場合にはテスト用血清）への接触、

c) $20\text{分} \pm 5\text{分}$ の時間の 37 ± 1 での反応器の定温保持、

d) 同時になされる、 $5\text{分}30\text{秒} \pm 1\text{分}$ の反応器への磁場の印加および反応器の攪拌、および

e) 目視および/または他の適切な読み取りシステムによる、反応器の底部および/または抗免疫グロブリンで被覆された反応器の傾斜壁で得られた画像の読み取りであって、得られた画像は、特定の抗体/抗原複合体の形成の有無についての証明を可能とするものである。解釈はそれぞれ（特定の複合体が形成されない）陰性の画像および（複合体が存在する）陽性の画像の特徴を示している図3および図4の助けを受けて実行されてもよい。

【0111】

他の態様において、本発明の対象は、溶液中に存在する抗体と磁性粒子に結合された抗原との反応により形成された特定の複合体の存在の証明、好ましくは溶液中に存在する血液型の抗-抗原抗体と、それ自身がいくつかの磁性粒子に結合された赤血球により保有される血液型の抗原との反応により形成された特定の複合体の存在の証明、とりわけIAR、赤血球抗体の調査、または血液型フェノタイピングのための装置であって、次のものを含む：

a) - 開口された頂部と封じられた底部とを有し、その少なくとも底部に近い領域の直径が、底部へと下方に伸びる傾斜壁を形成するように小さくなっている反応器または一連の反応器であって、傾斜壁は形成された複合体の抗体に対して結合しうる抗免疫グロブリンまたは他の化合物で少なくとも一部が被覆され、

- それぞれの反応器は部分的に粘性材料またはゲルによって満たされ、

b) 反応器の外側の下に配置される少なくとも一つの磁石または一連の磁石および反応器の回転攪拌システムであって、好ましくは、攪拌状態においても反応器と同じように磁石を配置するように、その攪拌システムは磁石または磁石を支持するプラットフォームとともに一つのユニットを形成し、

c) 必要であれば、反応器の定温保持温度を一定化することができる定温保持器、ならびに

d) 必要であれば、反応終了時においてそれぞれの反応器内の磁化された赤血球が存在することおよびその位置、とりわけ形成されたかもしれない特定の複合体の抗体に対して

結合しうる抗免疫グロブリンまたは他の化合物で被覆された反応器の傾斜壁および底部について評価しうる読取システム。

【0112】

好ましい態様として、本発明は上記発明において、粘性材料またはゲルが、本発明に係る方法において定義された特性および同じ好適態様を有することを特徴とする装置を含む。このことは磁性粒子または磁化された細胞の懸濁液、磁石および回転攪拌器の特性についてもまた当てはまる。

【0113】

さらに好ましくは、本発明に係る装置は、反応器がマイクロプレート杯状体であって、好ましくは丸い底部（半球状）またはV字状の底部を有し、さらに好ましくは96杯状体マイクロプレートであることで特徴付けられる。

10

【0114】

好ましくは、磁石は図1Aおよび1Bに示される積層形状をなし、好ましくは積層形状をなす96の磁石からなるプラットフォームであって、それぞれの磁石は杯状体の下に配置される。

【0115】

さらにまた別の態様において、本発明は、溶液中に存在する抗体と磁性粒子に結合された抗原との反応により形成された特定の複合体の存在の証明のためのキットに関連し、次のものを含む：

a) 少なくとも抗原により被覆されたまたは少なくとも抗原により被覆されるものである磁性粒子の懸濁液を含む試薬、および

20

b) - 開口された頂部と封じられた底部とを有し、その少なくとも底部に近い領域の直径は、底部へと下方に伸びる傾斜壁を形成するように、小さくなっている反応器または一連の反応器であって、傾斜壁は形成された複合体の抗体に対して結合しうる抗免疫グロブリンまたは他の化合物で少なくとも一部が被覆され、

- 粘性材料もしくはゲルを有する容器、または必要に応じて、部分的に粘性材料またはゲルによって満たされた各反応器、および

c) 必要であれば、反応器の外側の下に配置される少なくとも一つの磁石または一連の磁石であって、好ましくは、その磁石は回転機構の集積化された部分を形成し、好ましくは、最大直径が7mmの反応器における攪拌の軌道は $2\text{mm} \pm 1\text{mm}$ （またはこの等価の比率）である。

30

【0116】

好ましくは、本発明はIARの発明において、試薬が既知のフェノタイプのテスト用赤血球を有し、その赤血球上に磁性粒子が吸着されているまたは結合されていることに特徴付けられる、または、フェノタイプが既知であるテスト用赤血球であって同じ試薬に含まれる磁性粒子または磁性流体に対して吸着または結合するためのものの懸濁液を有する第二の試薬を含むことに特徴付けられるキットに関する。

【0117】

好ましくは、本発明は血液型のフェノタイピングの発明において、試薬が血液型の抗-抗原抗体、好ましくはIgGタイプを有するテスト用血清を含み、加えて、そのフェノタイプが調査対象である赤血球懸濁液に結合することができる磁性粒子の懸濁液または磁性流体溶液を試薬が含むことに特徴付けられるキットに関する。

40

【0118】

さらに好ましくは、本発明は、粘性材料またはゲルおよび必要に応じ磁性粒子または磁化された細胞の懸濁液、さらに必要に応じ磁石および回転攪拌器が、本発明に係る方法のために定義された特性を粘性溶液もしくはゲルまたは他の化合物および要素のために特定された特性をそれらの好適態様とともに有することに特徴付けられる本発明に係るキットに関する。

【0119】

さらに好ましくは、本発明は、反応器がマイクロプレート杯状体であって、好ましくは

50

丸い底部（半球状）またはV字状底部を有し、最も好ましくはこのマイクロプレートが96の杯状体からなることに特徴付けられる本発明に係るキットに関連する。

【発明を実施するための最良の形態】

【0120】

下記の図および見出しは実施例とともに、本発明の範囲をいかなる意味にでも限定することなく、本発明を説明するためのものである。

【実施例】

【0121】

実施例1：抗免疫グロブリンによる傾斜壁および杯状体底部の被覆

杯状体に使用されたプラスチックの化学的および物理化学的性質は、一層の（単クローン性または多クローン性HAGタイプの）ヒト抗免疫グロブリンであって、いかなる特定の複合体の抗体に対してもその複合体の抗体がヒト由来であるとき特異的に結合しうるもので、杯状体を覆うことを可能とする。

10

【0122】

さらに、このHAG組成物が相補型血清中タンパク質決定基に対する抗体を含みうることは記載されることができる。

HAGで被覆されていない容器の内壁の表面は、従来の固相飽和試薬またはELISA（Enzyme Linked Immunosorbent Assay）式手法を用いて飽和されていてもよい。

【0123】

例えば、1から10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度のHAG溶液は0.2MのpH9.6炭酸塩緩衝液内で調整されうる。

20

【0124】

丸底Maxisorp NUNC U8タイプのマイクロプレートの各杯状体内に75 μL の容量でこの溶液は配分される。そして、これらのプレートは一晩4で定温保持される。

【0125】

次に、杯状体は、プラスチック上に直接吸着されていない全てのたんぱく質を除去するように、リン酸塩緩衝液（PBS 10 2.5mM、pH7.4）を用いて洗浄される。

【0126】

続いて、杯状体1は、PBS緩衝液中に30g/Lのアルブミン溶液を杯状体当たり100 μL ずつ用いて処理される。

30

室温で2時間定温保持された後、杯状体は再びリン酸緩衝液で洗浄される。

【0127】

実施例2：磁性粒子または磁性流体溶液によって磁化された赤血球の懸濁液の調製

A) 磁性粒子の使用

本実施例では、高い形状均一性（直径約300nm）、強磁性材料の高い使用割合（50質量%以上で、約75質量%）、および（機能化されていない）高い疎水性の表面状態を有する常磁性の粒子を用いる。これらの粒子は、好ましくはノニオン性洗浄剤内での予備的な洗浄の後に、赤血球の磁化に直接的に使用されうる。

40

【0128】

これらの粒子はまた、複数の弱い結合が赤血球表面と粒子との間に生成されるようにして、赤血球を結合するウシ血清アルブミン（BSA）で処理されるステップの後に使用されうる。

【0129】

結合は二段階で発生する。第一段階は粒子をBSAで活性化することからなり、一方、第二段階はBSAで被覆されたこれらの磁性粒子がタンパク分解酵素により処理されていてもよいまたはされていなくてもよい赤血球の懸濁液に接触することを含む。

【0130】

こうして得られた赤血球は磁場に引き寄せられ、それゆえ本発明に使用されうる。

50

a) 第一のステップ、強磁性粒子のBSAによる活性化

Ademtechタイプの疎水性で機能化されていない約300nmの粒子は予備的な洗浄およびノニオン性洗浄剤内の保存がなされる。

【0131】

必要であれば、これらの粒子をpH7.2のPBS緩衝液に0.1%（質量/体積）のウシアルブミンを有する溶液に接触させる。磁場印加しない攪拌条件での室温で30分間の定温保持の後、懸濁液中の粒子は磁石によって引き寄せられ、粒子に結合していない浮遊物は除去される。BSAで被覆された粒子残留物は、次に、赤血球磁化ステップに直接的に使用されうる。

【0132】

b) 第一のステップ、赤血球の磁化

適切な濃度のLISS緩衝液内に配置された球状体の懸濁液（0.6から10% v/vの細胞の懸濁液を用いて、必要であれば予め例えば食塩水により三度洗浄されて、赤血球の磁化は実行されうる。）は、前のステップで得られた強磁性粒子の残留物に添加される。十分な均一化が行われた後、懸濁液は30分間室温で穏やかに一様に攪拌されて定温保持される。その後、pH7.4のPBS緩衝液内で赤血球は洗浄（遠心分離ごとに500gを用いて3分間の洗浄を2回）される。続いて、磁化された赤血球残留物は、分析において使用される濃度にLISSタイプ（またはBFIタイプ）の緩衝液によって調製される。

【0133】

特別な実施例において、粒子の使用量と赤血球量との比率は、赤血球表面に存在する血液型抗原の劣化の危険を冒すことなく効果的な磁化が得られるように、10から30である。

【0134】

こうして得られた赤血球は（例えばIAR目的で）直接的に試薬として、または（フェノタイピング目的で）検体として使用されうる。このステージでは、必要であれば、目的の分析を行うように、プロメラインまたはパピンのようなタンパク質分解酵素での処理をも受けうる。

【0135】

B) 磁性流体溶液の使用

1) 精製前の磁性流体の製造

材料および方法特別な材料および生成物

- 1つのフィルター、Stericup GS 200ml 0.22µm (107943参照)

- 1つの磁石

- 28~30%のNH₄OH溶液 (ACROS、205840025参照)

- 60%の硝酸溶液 (NORMAPUR、UN2031参照)

- FeCl₂ · 4H₂O (SIGMA、22029-9参照)

- FeCl₃ · 6H₂O (SIGMA、F-2877参照)

【0136】

磁性流体の製造:準備:

1 / FeCl₃を13.51g計量し濾過脱塩水20mLに磁場攪拌によって溶解させる。50mLの試験管にその溶液を移し、濾過脱塩水ですすいで50mLの容積に調整する(1M溶液)。

【0137】

2 / FeCl₂を19.88g計量し濾過脱塩水20mLに磁場攪拌によって溶解させる。50mLの試験管にその溶液を移し、濾過された脱塩水ですすいで50mLの容積に調整する(2M溶液)。

10

20

30

40

50

【0138】

3 / 各溶液を0.22 μmのシリンジフィルターで濾過する。

4 / 250 mLの試験管に28%のアンモニア溶液(NH₄OH) 30 mLを入れ、総量120 mLになるように濾過脱塩水を添加する(2 M溶液)。

【0139】

5 / 空のRotavapor(ロータリーエバポレータ)用の1 Lのガラスフラスコの重さを計量する。

【0140】

定温保持:

6 / RotavaporフラスコにFeCl₂溶液(2 M) 10 mLとFeCl₃溶液(1 M) 40 mLとを入れ、手動でフラスコ25を攪拌して溶液を均一化させる。 10

【0141】

7 / 200 mLの濾過脱塩水を加え、手動でフラスコを攪拌して溶液を均一化させる。

8 / Rotavaporタイプの装置に所定の角度でフラスコを設置する。

【0142】

9 / 溶液をよく均一化させるようにフラスコを最大スピードで回転させる。

10 / 2 Mのアンモニア溶液120 mLを添加する。

11 / フラスコを15分間回転させる。

【0143】

12 / 1 Lフラスコ内に60%硝酸(HNO₃)溶液105 mLを加え、総量1 Lになるように濾過脱塩水を添加する(1 M溶液)。 20

13 / 15分間の回転の後、フラスコを磁石の上に4分間置く

14 / 浮遊物の全体を吸引する。

【0144】

15 / 残留物を再度懸濁させる。

【0145】

第一の洗浄:

16 / Rotavaporにフラスコを設置し、最大速度で回転させる。

【0146】

17 / 1 MのHNO₃溶液200 mLを添加する。 30

18 / フラスコを10分間回転させる。

19 / 残留物を再懸濁する。

【0147】

20 / このプロセスを残留物が完全に溶解するまで繰り返す。

21 / 鉄懸濁液の上澄みを移動させるように、フラスコを設置する。

22 / 浮遊物を吸引する。

【0148】

23 / 残留物を再懸濁する。

ステップ16から23を必要であれば繰り返してもよい。 40

【0149】

最終希釈:

26 / フラスコ質量を計測する。

【0150】

27 / 得られた残留物質量を推定し、反応収率を計算する:

(得られた残留物質量 / 初期の鉄質量) × 100

初期の鉄質量 = 14.77 g

収率 > 55%

28 / 濾過水200 mLをフラスコに添加する。

【0151】

50

29 / Rotavapor にフラスコを設置する。

30 / 残部を再懸濁する。

31 / 0.22 μm の Stericup フィルターで溶液を濾過する。

【0152】

磁性流体の保存溶液の調製

上記の得られた磁性流体を、L I S S 緩衝液または食塩水によって、ボトル内で所定の濃度になるように希釈する。磁性流体および/または希釈溶液は 4 で保存する。

【0153】

2) 赤血球の磁化

a) 可能性 1 :

- 最終的な懸濁液において所望の赤血球濃度、好ましくは赤血球が 0.5% から 3%、が得られるように、L I S S または食塩水で 0.3 から 0.5% (v/v) に希釈された磁性流体溶液に赤血球を接触させる。

【0154】

b) 可能性 2 :

- 開放滴下 (OD) バルブに対して、0.9 相当の 450 nm で L I S S 内で磁性流体を調整し、

- 磁性流体溶液 240 μL あたりヘマトクリット値 80% の球状の残留物 10 μL を添加する。

【0155】

実施例 3 : I A R の手順書、材料および方法の例

A) 手順書

1. H A G (ヒト抗グロブリン) で被覆された 96 ウェル型マイクロプレートを使用する。

【0156】

2. 緩衝液 1 (ゲル溶液) 50 μL を I A R テストのために必要とされる杯状体すべての中に配置する。

3. 杯状体ごとに 3% の B S A を含む L I S S 溶液 60 μL を配置する。

【0157】

4. 分析されるサンプル (血清または血漿) 12 μL を配置する。

5. I A R パネルの磁化された赤血球 (ウェル 1 内の赤血球 1、ウェル 2 内の赤血球 2、ウェル 3 内の赤血球 3) 25 μL を配置する。

【0158】

6. 20 分間 37 でマイクロプレートを定温保持する。

7. マイクロプレートをインキュベーターから取り外す。

8. 本手順書の要請に適合した (図 1 A および 1 B 参照) T e l e s h a k e ^{T M} (H + P L a b .、ドイツ) により提供されるマイクロプレート攪拌器にプレートを設置する。

【0159】

9. 5 分 30 秒間 500 rpm で攪拌する。

10. (H A G で) 被覆されたプレートを配置前後で読み取る (図 2 A および 2 B 参照)。

【0160】

B) 読み取り (上方からの観察による) (図 3 および 4 参照)

1. 整然としてなだらかな中央の残留物は陰性であると読み取られる (図 3 参照)。

2. 中央の残留物がいかなる状態でも開いていれば、陽性であると理解される。

【0161】

3. ウェルの表面上の細胞の層は強度に陽性であると解釈される。

【0162】

C) 反応に必要な要素の組成

10

20

30

40

50

1. 緩衝液 1

1.1. 30%のBSAを調整して、L I S S 緩衝液内の10%の濃度とする。

【0163】

1.2. スーパーファインSephadexTM G-100 (緩衝液1の20mLあたり600mg)を計量する(17.0061.01参照 - Amersham Bioscience)。

【0164】

1.3. そのSephadexTMをあらかじめL I S S 内で10%に調製されたBSAに溶解させる。

1.4. 緩衝液1を使用前に一晩4℃で放置する。

10

【0165】

2. 3%のBSAを有するL I S S 溶液(本記載のL I S S タイプ溶液の組成を参照。)または一般に市場で入手可能なL I S S 溶液。

3. L I S S 緩衝液(本記載の組成を参照。)

【0166】

4. I A R パネルの磁化された赤血球(実施例2参照)。

5. 抗免疫グロブリンで被覆されたマイクロプレート。

1から5µg/mLのヒト単クローン性抗IgG抗グロブリンで被覆された96のウェルを有するMaxisorp NUNC マイクロプレート(被覆条件についてのこれまでの実施例を参照)。

20

【0167】

実施例4: 結果

A) 被提供者の調査

手順書は308の被提供者のサンプルについて試験された。

【0168】

試験の開始に先立って、赤血球パネルは15日間磁化された。

【0169】

【表1】

表1: ゲル遠心分離による標準的な手法(Diamed)との比較

30

I A R		本発明方法			
		陽性	擬陽性	陰性	合計
DIAMED	陽性	4	0	0	4
	陰性	3	2	299	304
合計		7	2	299	308

【0170】

308サンプルのうち5つだけが不一致であり、すなわち98.4%の相関であった。全ての陽性サンプルは本発明方法により読み取られた。

40

【0171】

感度100%(n=4)

304の陰性の結果のうち、5つは不一致であり、すなわち98.3%の相関であった。

【0172】

明らかに間違いの陽性のレベル: 1%

疑陽性の結果のレベル: 0.6%

特異度(n=304): 98.3%

【0173】

B) 陽性のパネルの研究

50

1) 第一の試験されたパネル、22の陽性血清、
- 7つの希釈された血清、抗D抗体を有する2つの血清サンプル、抗Fya抗体を有する2つのサンプル、抗Kell抗体を有する1つのサンプル、抗E抗体を有する1つのサンプル、抗Sを有する一つのサンプル。

結果：誤ったサンプルなし

【0174】

2) 第二のパネル(生体治療)

- 32の血清

【0175】

【表2】

10

抗体	サンプル数	抗体	サンプル数	抗体	サンプル数
CDE	2	Jkb	3	Lub	1
C	3	Fyb	2	E	3
Dスライド	5	Jka	1	Jsa	1
e	2	Kpb	2	Lua	1
Fya	4	S	2		

【0176】

本発明の(実施例に示された)手順で試験されたパネル

結果：誤った陽性血清なし

スクリーニングで試験された3つの赤血球のうち2つのサンプルだけが完全な一致を示さなかった。

二つの赤血球が誤った陽性であった。

【0177】

3) Lille地域教育病院(CHR&U de Lille, France)における被提供者テスト

Lille CHR&Uの4つの被提供者のサンプルが、本方法によって陽性と検出され、DIAMEDの参照用方法により確認された。

【0178】

4) 検出しきい値

本発明の手順

記載された方法の検出しきい値を試験するために、CNRGS(French National Reference Centre for Blood Group)からの20ng/mLの抗Dおよび対照用品質の抗Fya抗体であって、いずれもポリコントロールで希釈されたものを使用した。

【0179】

- CNRGS抗D

ポリコントロールによる希釈：2.5ng/mLでのホモ接合性の赤血球における1クロスで擬陽性。

図5参照。

【0180】

- AB血漿での希釈：2.5ng/mLでのホモ接合性の赤血球における1クロス。

図6参照。

【0181】

- AB血清中の品質管理された抗Dおよび抗Fyaの滴定

図7参照。

【0182】

5) 再現性および再産生能

40

50

本発明の手順

手順を試験するため、8つの陰性サンプルと4つの陽性サンプル(抗D)が2つの異なったプレートおよび同じプレートを3回通過した。

【0183】

- 同じプレート上を3回(プレート内テスト)(図8参照)。

- 他のプレート(プレート間テストであって、図8と比較されるべきものである)(図9参照)。

得られた結果は、本発明の優れた再現性および再産生能を証明する。

【0184】

実施例5: DiaMedTM技術および標準的な抗グロブリンLISチューブ法(《LISチューブ》)との比較による本発明に係るIAR方法(QwalysTMと称される。)の感度の評価

A) 赤血球の磁化

赤血球の磁性粒子に対する受動的な吸着による結合

方法:

500nmから1 μ mの直径で平均的には約30から70%のフェライトを有することができる機能化されていない磁性ポリスチレン粒子がここでは使用された(形式、EstaporTM、Merck-Chimie S.A.S/Setapor Microspheres, Fontenay-Sous-Bois, France、またはAdemtech, Parc Scientifique Unitec 1, 4 Allée du Doyen Georges Brus 33600 Pessac, France)。

【0185】

これらのポリスチレン粒子は、提案されたモデルに依存して、例えばEstaporTMまたはAdemtechの範囲において、10から70%のフェライトまたは酸化鉄を有し、選択されたモデルに依存して300nmから1300nmにわたる直径を有する。

【0186】

一般的には10%(w/v)で提供される磁性粒子は、赤血球用希釈緩衝液、好ましくはLIS(低イオン強度)タイプの緩衝液のような吸着緩衝液によって1%(10mg/mL)に調整される。

【0187】

粒子は、必要に応じ、赤血球との接触前に洗浄剤の痕跡を完全に取り除くように、希釈に先立ってこの緩衝液またはPBS緩衝液で予備的な洗浄がなされていてもよい。

LIS中の1%のテスト用赤血球懸濁液は1%の磁性粒子懸濁液と接触され、その混合物は穏やかに攪拌される(このようにして得られた、使用準備ができた磁化された赤血球の電子顕微鏡画像についての図10参照)。

【0188】

受動的な吸着は本質的に数分間で発生するが、接触は30分まで延長されてもよく、4

から37の範囲の温度で1から2時間としてもよく、必要であれば使用に先立って、4で一晩またはそれ以上としてもよい。

【0189】

B) 使用準備のできた磁化された赤血球を有するヒト抗グロブリンで被覆された杯状体マイクロプレート内で洗浄または遠心分離をしないIAR手順

1 - LISに10%のアルブミンを含む溶液内にスーパーファインSephadexTM G-100を3%有するゲル溶液(《緩衝液1》であってNanolysTMとも称される。)50 μ Lを、ヒト抗グロブリンで被覆された各U字マイクロプレート杯状体に加える。抗グロブリンで被覆されたマイクロプレートはScreenLysTMと称される。

【0190】

2 - BSAを3%有するLIS溶液(ScreenDiluentTMと称される

10

20

30

40

50

。) 60 μ L を加える。

3 - 分析されるサンプル (血清または血漿) 12 μ L および赤血球 25 μ L を加える。

【0191】

4 - IAR パネル (HemascreenTM と称される。) 上での Screen DiluentTM を超えて磁化される。こうして得られた Screen LysTM マイクロプレートを 20 分間 37 °C での定温保持する。

【0192】

5 - 定温保持の後、マイクロプレートを磁気攪拌器の上に 5 分間配置する。

6 - 裸眼または自動化された読取装置を用いて結果を読み取る (3つの赤血球 1, 2, および 3 の HemascreenTM パネル上で得られた典型的な結果および読み取りについて図 11 および 12 参照)。

【0193】

C) 結果

【0194】

【表 3】

表 3 : 特定の抗体の検出力価 (2 in 2 dilution) で示された 3 手法の比較感度

抗体感度	QWALYS TM 力価	DiaMed TM 力価	《LISSチューブ》力価
抗 D	8	4	4
抗 D	4	4	16
抗 c	8	4	8
抗 c	16	8	8
抗 E	16	64	16
抗 e	8	4	4
抗 K	2	2	2
抗 Fy ^a	16	8	4
抗 Fy ^a	8	2	8
抗 JK ^a	8	16	8
抗 JK ^a	4	?	4
抗 S	4	8	2
抗 S	8	8	4

【0195】

10

20

30

【表 4】

表 4：特定の抗体パネルに関する 2 つの手法（Q w a l y sTMおよびD i a M e dTM）の比較感度の調査

特異度	数	QWALYS TM	DiaMed TM
抗 D	26	26	22
抗 E	10	8	9
抗 c	6	6	6
抗 e	1	1	1
抗 K	12	10	12
抗 F y ^a	10	10	10
抗 J K ^a	5	5	5
抗 J K ^b	1	1	0
抗 S	1	1	1
抗 s	1	1	1
抗 L u ^b	2	2	2
抗体の混合物を有するサンプル	16	16	16
合計	91	87	85
陽性率		95.6	93.4

10

20

【 0 1 9 6 】

【表 5】

表 5：ドナーまたは妊婦のサンプルパネルにおける 3 つの手法（Q w a l y sTM、D i a M e dTMおよび《L I S S チューブ》）の比較感度の調査

サンプル数	QWALYS TM 陽性	DiaMed TM 陽性
1590	32 (2.01%)	24 (1.51%)
(抗グロブリンを用いた) L I S S チューブによる陽性数	16	16
特異度	98.99%	99.5%

30

【 0 1 9 7 】

実施例 6：国際標準テストサンプルについての D i a M e dTM 技術との比較による本発明の方法に係る I A R 手法（Q w a l y sTM）の感度の評価

I A R 手法の感度の評価のために国際標準がここでは使用される。

40

【 0 1 9 8 】

これは、（英国の 15 の国立生物学的製剤研究所からの）抗 R h 1 抗体サンプルである。

見出された検出しきい値は、磁化された赤血球を用いた本発明に係る Q w a l y sTM 技術では 0.014 IU/mL に近く、感度は D i a M e dTM 手法で見出されたものと同ーである（図 13 参照）。

【 0 1 9 9 】

まとめ

磁化された赤血球および磁場の存在下での攪拌ステップ（磁氣的攪拌）を用いる本発明に係る I A R のための洗浄不要かつ遠心分離不要な技術である Q w a l y sTM の比較調査

50

は、この新しい技術が、標準的な I A R 手法の一つである《遠心分離を用いたゲル》技術 (D i a M e d TM) のものと同等の特異度および感度を示すこと確認する。

【 0 2 0 0 】

本発明に係る新しい Q w a l y s TM 技術の、とりわけ遠心分離ステップを必要とする D i a M e d TM 技術と比較しての、大きな強みの一つは、洗浄ステップ (それゆえサンプル移動) または (完全な自動化の可能性を制限するステップである) 遠心分離ステップを含まないため、他の手法に比べて容易に自動化できることである。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 2 0 1 】

【 図 1 】 マイクロプレートの下の軟鉄板からなる攪拌プラットフォーム t e l e s h a k e TM を上方から見た (図 1 A) および側方から見た (図 1 B) 略図であり、各マイクロプレート杯状体の下方において各磁石は積層形状で磁氣的に固定されている。 (1) 磁石間の良好な間隙を得ることを可能とするプラスチックスペーサー ; (2) T e l e s h a k e 上のマイクロプレートを楔止めすることを可能とする要素 ; (3) マイクロプレートを楔止めしうる T e l e s h a k e の楔 ; (4) 積層磁石 ; (5) マイクロプレート ; (6) プラスチックスペーサー ; (7) 磁石がその上に磁氣的に固定される軟鉄板 ; (8) T e l e s h a k e を磁石積層体の磁場から隔離するボール紙の板 ; (9) T e l e s h a k e 回転トレイ。

10

【 図 2 】 丸い底部の (または U 字型の) 反応器の杯状体であって、ゲル溶液 (緩衝液 1) ならびに様々な溶液および試薬の添加に先立って、杯状体の傾斜壁 (が部分的に) および底部が抗免疫グロブリンで被覆された後の略図である。

20

【 図 3 】 赤血球によって保有される抗原との免疫接着反応が陰性の (特定の複合体が形成されていない) 像を示す写真である。

【 図 4 】 赤血球によって保有される抗原との免疫接着反応が陽性の (抗免疫グロブリンで被覆された傾斜壁に対して接着する特定の複合体が形成されている) 像を示す写真である。

【 図 5 】 C N R G S 抗 D の滴定、多制御希釈、 2 . 5 n g / m L のホモ結合性赤血球における 1 クロスでの擬陽性。

【 図 6 】 C N R G S (フランス国立 血液型リファレンスセンター)、抗 D の滴定、 A B 血漿内での希釈、 2 . 5 n g / m L のホモ結合性赤血球における 1 クロス。

30

【 図 7 】 A B 血清 * 内の品質制御された抗 D および抗 F Y A の滴定。

【 図 8 】 再現性および再産生能 5 8 の陰性のサンプルと 4 つの陽性のサンプル (抗 D) が同じプレート上を 3 度通過した。

【 図 9 】 再現性および再産生能。 8 の陰性のサンプルと 4 つの陽性のサンプル (抗 D) が他のプレート上を通過した。

【 図 1 0 】 平均直径 5 0 0 から 7 5 0 n m の磁性粒子を用いている H a m a s c r e e n TM の磁化赤血球であって使用可能なものの電子顕微鏡写真である。

【 図 1 1 】 マイクロプレート杯状体内で、テスト用の抗 R h 1 サンプル (国際基準品) について Q w a l y s TM I A R 法の感度を評価して得られた結果である。

【 図 1 2 】 本発明の Q w a l y s TM 手法に従って 3 つの赤血球によるパネルを用いた患者の血漿または血清サンプルの I A R のためのマイクロプレート杯状体で得られた典型的な結果である。

40

【 図 1 3 】 マイクロプレート杯状体内で、テスト用の抗 R h 1 サンプル (国際基準品) について Q w a l y s TM I A R 法の感度を評価して得られた結果である。

【 1 A 】

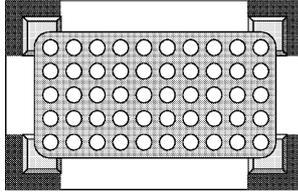


FIGURE 1A

【 1 B 】

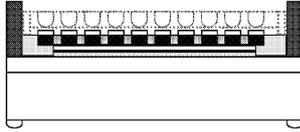


FIGURE 1B

【 2 A 】

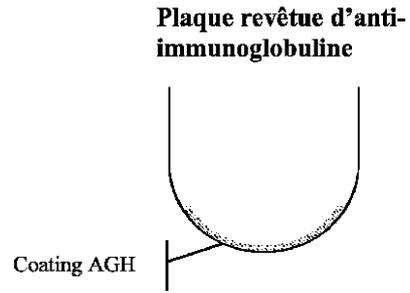


FIGURE 2A

【 2 B 】

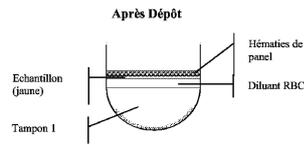


FIGURE 2B

【 3 】

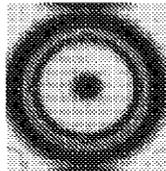


FIGURE 3

【 4 】

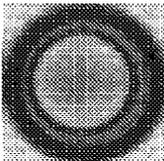


FIGURE 4

【 5 】

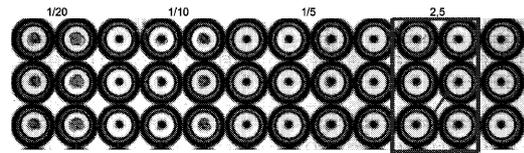


FIGURE 5

【 6 】

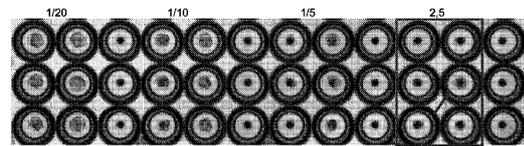


FIGURE 6

【 7 】

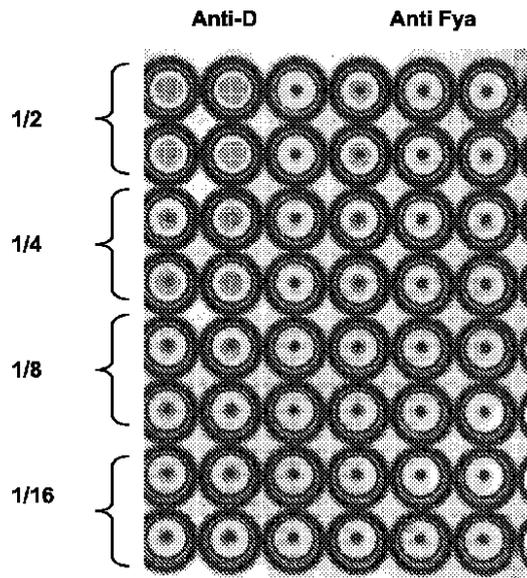


FIGURE 7

【 8 】

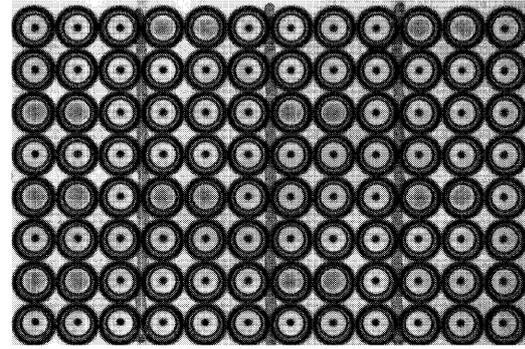


FIGURE 8

【 9 】

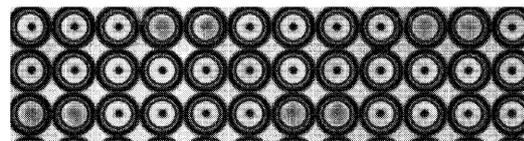


FIGURE 9

【 1 0 】

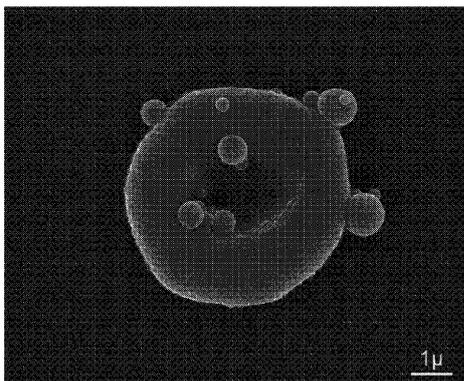


FIGURE 10

【 1 1 】

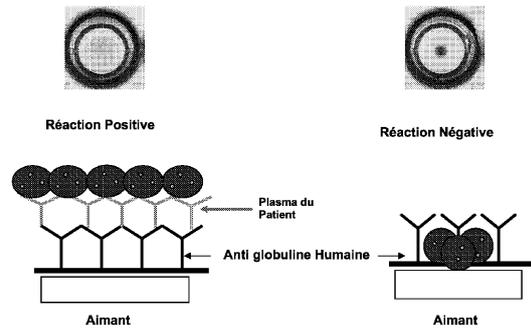


FIGURE 11

【 1 2 】

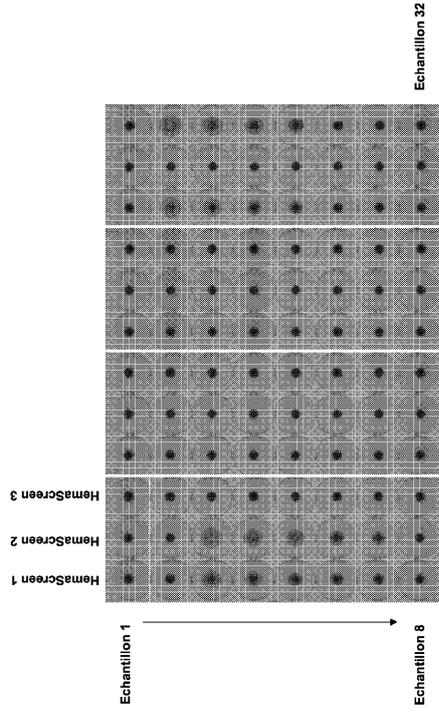


FIGURE 12

【 1 3 】

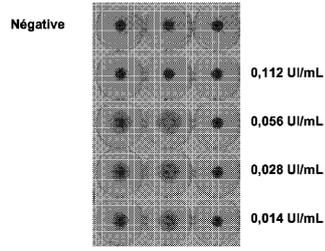


FIGURE 13

フロントページの続き

- (72)発明者 ブーレ、アルノー
フランス国、F - 6 2 0 0 0 アラス、アレ・デ・ベルディエ、3
- (72)発明者 デラネ、アレクシス
フランス国、F - 5 9 1 1 0 ラ・マドレーヌ、アブニュー・フベール、5 6
- (72)発明者 フォコニエ、ローランス
フランス国、F - 5 9 4 9 1 ビルヌーブ・ダスク、リユー・ドゥ・ラ・コンコルド、1 8
- (72)発明者 エルベール、ファピアン
フランス国、F - 5 9 0 0 0 リール、リユー・ジャン・サン・プール、5 0
- (72)発明者 プロザン、ジャン・マルク
フランス国、F - 5 9 1 3 0 ランベルサール、アブニュー・ポティエ、4 6
- (72)発明者 スーフレ、ローラン
フランス国、F - 5 9 2 3 0 サン・アマン・レ・オー、リユー・デュ・コレージュ、4 1

審査官 吉田 将志

- (56)参考文献 特開平05 - 203651 (JP, A)
特開平08 - 201391 (JP, A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 9 8