



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102016576 A

(43) 申请公布日 2011. 04. 13

(21) 申请号 200980115555. 8

(22) 申请日 2009. 04. 30

(30) 优先权数据

2008-120248 2008. 05. 02 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2010. 10. 29

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2009/058489 2009. 04. 30

(87) PCT申请的公布数据

W02009/133928 JA 2009. 11. 05

(71) 申请人 爱科来株式会社

地址 日本京都府

(72) 发明人 福家博司 高木英纪

(74) 专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事

务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇 李茂家

(51) Int. Cl.

G01N 33/49(2006. 01)

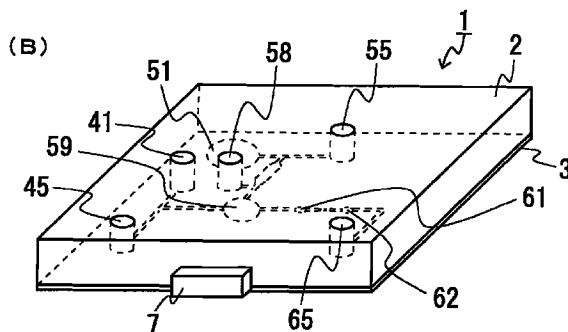
权利要求书 2 页 说明书 23 页 附图 11 页

(54) 发明名称

白细胞的分析方法及其使用的分析试剂

(57) 摘要

提供一种白细胞的分析方法及其使用的分析试剂,该方法即使在含有白细胞试样的稀释率低的情况下,或者在分析时的流速慢的情况下,也可以稳定地以高精度进行白细胞的分类以及计数。本发明的分析方法的特征在于,其是包括如下工序的白细胞分析方法:混合工序,将包含白细胞和红细胞的试样以及包含与白细胞反应的表面活性剂的分析试剂混合;以及测定工序,使所述试样与所述分析试剂的混合液通过微孔,并测定在所述通过时检出的信号,对所述试样中的白细胞进行分类以及计数;其中,所述分析试剂进一步包含非离子表面活性剂,所述非离子表面活性剂具有作为亲水部的糖残基和作为疏水部的脂肪链。



1. 一种白细胞的分析方法，其特征在于，其是包括如下工序的白细胞的分析方法：
混合工序，将包含白细胞和红细胞的试样以及包含与白细胞反应的表面活性剂的分析试剂混合；以及
测定工序，使所述试样与所述分析试剂的混合液通过微孔，测定在所述通过时检出的信号，对所述试样中的白细胞进行分类以及计数；
其中，所述分析试剂进一步包含非离子表面活性剂，
所述非离子表面活性剂具有作为亲水部的糖残基和作为疏水部的脂肪链。
2. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述糖残基为二糖的残基。
3. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述脂肪链为脂肪酸残基或烷基。
4. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述非离子表面活性剂为选自由蔗糖单月桂酸酯、蔗糖月桂酸酯、蔗糖单癸酸酯以及十二烷基麦芽糖苷构成的组中的至少一种。
5. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述非离子表面活性剂的浓度为 0.001 ~ 5w/v% 的范围。
6. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述与白细胞反应的表面活性剂为季铵盐。
7. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的、所述与白细胞反应的表面活性剂的浓度为 0.01 ~ 5w/v% 的范围。
8. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述分析试剂进一步包含与红细胞反应的表面活性剂。
9. 根据权利要求 8 所述的白细胞的分析方法，所述与红细胞反应的表面活性剂为皂角苷。
10. 根据权利要求 9 所述的白细胞的分析方法，所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述皂角苷的浓度为 0.05 ~ 5w/v% 的范围。
11. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述混合工序中，所述试样 (X) 与所述分析试剂 (Y) 的混合体积比 (X : Y) 为 1 : 0.4 ~ 1 : 99 的范围。
12. 根据权利要求 1 所述的白细胞的分析方法，所述测定工序中，所述白细胞按照其体积分类为 3 种。
13. 根据权利要求 1 所述的分析方法，所述测定工序中，
使用具有所述微孔的测试盒，
使所述混合液通过所述测试盒内的所述微孔。
14. 根据权利要求 13 所述的分析方法，所述测试盒为微全分析系统。
15. 一种分析试剂，其特征在于，该分析试剂为用于权利要求 1 所述的分析方法的、包含与白细胞反应的表面活性剂的分析试剂，
其进一步包含非离子表面活性剂，
所述非离子表面活性剂具有作为亲水部的糖残基和作为疏水部的脂肪链。
16. 根据权利要求 15 所述的分析试剂，所述糖残基为二糖。
17. 根据权利要求 15 所述的分析试剂，所述脂肪链为脂肪酸残基或烷基。
18. 根据权利要求 15 所述的分析试剂，所述非离子表面活性剂为选自由蔗糖单月桂酸

酯、蔗糖月桂酸酯、蔗糖单癸酸酯以及十二烷基麦芽糖苷构成的组中的至少一种。

19. 根据权利要求 15 所述的分析试剂，所述与白细胞反应的表面活性剂为季铵盐。

20. 根据权利要求 15 所述的分析试剂，所述分析试剂进一步包含与红细胞反应的表面活性剂。

21. 根据权利要求 20 所述的分析试剂，所述与红细胞反应的表面活性剂为皂角苷。

白细胞的分析方法及其使用的分析试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及一种白细胞的分析方法及其使用的分析试剂。

背景技术

[0002] 医疗诊断中通常进行血液分析。所述血液分析的分析项目中，有白细胞、红细胞、血红蛋白浓度、血细胞比容值等。可以由这些分析对象的数目、浓度、比率等诊断例如红细胞增多症、贫血等血液疾病、感染症等疾病。其中，白细胞的数目、比率是感染症等疾病诊断中的重要指标。因此，以提高血液中白细胞的分类以及计数的精度为目的，开发了各种分析方法。作为所述白细胞的分析方法，提出了使溶解剂与白细胞以及红细胞反应的方法（例如专利文献 1）等。

[0003] 另一方面，近年来在医疗诊断中的生物试样的分析等中，正在研究微全化学分析系统（Micro Total Analysis System，以下称为“ μ TAS”）。所述 μ TAS 是一种将微小的流路、泵、阀、传感器等集成到硅等基板上的化学分析系统，具有试样的少量化、测定用测试盒（Catridge）的一次性化、装置的小型化等优点。所述白细胞是集体体检等中的分析项目，因此期望开发使用所述 μ TAS 的分析方法，但由于所述 μ TAS 为微全系统，因而试样的稀释率变低，并且分析时的流速变慢。现有的白细胞的分析方法中，试样的稀释率低时，所述试样中的红细胞有可能影响白细胞与分析试剂的反应，根据红细胞含有率（血细胞比容值等），所述白细胞的测定结果有时产生变化。因此不能稳定地分析。另外，所述分析时的流速慢时，则由于可以测定的白细胞数少，分析精度变低。因此，为提高分析精度，需要延长测定时间以增加总流量。然而，在现有的白细胞的分析方法中，若如上所述延长测定时间，则所述白细胞与所述分析试剂的反应在测定时间内进行，不能稳定地分析。

[0004] 现有技术文献

[0005] 专利文献

[0006] 专利文献 1：日本专利第 3143064 号公报

发明内容

[0007] 发明要解决的问题

[0008] 因此，本发明的目的为提供一种白细胞的分析方法及其使用的分析试剂，所述分析方法例如即使在所述包含白细胞以及红细胞的试样的稀释率低的情况下，或者在分析时的流速慢的情况下，也可以稳定地进行白细胞的分类以及计数。

[0009] 用于解决问题的方案

[0010] 为达成所述目的，本发明的分析方法，其特征在于，其是包括如下工序的白细胞的分析方法：混合工序，将包含白细胞和红细胞的试样以及包含与白细胞反应的表面活性剂的分析试剂混合；以及测定工序，使所述试样与所述分析试剂的混合液通过微孔，测定在所述通过时检出的信号，对所述试样中的白细胞进行分类以及计数；所述分

析试剂进一步包含非离子表面活性剂，所述非离子表面活性剂具有作为亲水部的糖残基和作为疏水部的脂肪链。

[0011] 本发明的分析试剂，其特征在于，其是用于本发明的分析方法的、包含与白细胞反应的表面活性剂的分析试剂，其进一步包含非离子表面活性剂，所述非离子表面活性剂具有作为亲水部的糖残基和作为疏水部的脂肪链。

[0012] 发明效果

[0013] 利用本发明，例如，即使在包含白细胞以及红细胞的试样的稀释率低的情况下，也可以抑制红细胞对白细胞与分析试剂反应的影响，稳定地分析白细胞。另外，利用本发明，例如，即使在分析时的流速慢的情况下，由于分析试剂对白细胞的反应缓慢发生，因此也可以延长设定测定时间，可以在分析中获得充分的流量，可以稳定地进行分析。进一步，本发明由于可以用于 μ TAS，因而，例如试样的少量化、一次性测试盒的利用、分析装置的小型化成为可能。

附图说明

[0014] 图 1 之 (A) 为表示本发明的分析方法中使用的测试盒的一个实施方式的平面图。

图 1 之 (B) 为图 1 之 (A) 中表示的测试盒的透视图。

[0015] 图 2 是表示本发明的分析方法中使用的白细胞分析装置的一个实施方式的截面图。

[0016] 图 3 之 (A) 为表示本发明的一例中反应时间为 30 秒时白细胞的粒度分布的直方图。图 3 之 (B) 为表示本发明的一例中反应时间为 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图。图 3 之 (C) 为表示本发明的一例中反应时间为 30 秒以及 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图。

[0017] 图 4 之 (A) 为表示本发明的另外一例中反应时间为 30 秒时白细胞的粒度分布的直方图。图 4 之 (B) 为表示本发明的另外一例中反应时间为 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图。图 4 之 (C) 为表示本发明的另外一例中反应时间为 30 秒以及 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图。

[0018] 图 5 之 (A) 为表示比较例中反应时间为 30 秒时白细胞的粒度分布的直方图。图 5 之 (B) 为表示比较例中反应时间为 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图。图 5 之 (C) 为表示比较例中反应时间为 30 秒以及 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图。

[0019] 图 6 之 (A) 为表示另外的比较例中反应时间为 30 秒时白细胞的粒度分布的直方图。图 6 之 (B) 为表示另外的比较例中反应时间为 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图。图 6 之 (C) 为表示另外的比较例中反应时间为 30 秒以及 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图。

[0020] 图 7 为表示本发明的分析方法中使用的白细胞分析装置的另一实施方式的截面图。

[0021] 图 8 为本发明的分析方法中使用的白细胞分析装置的微孔部分的其它例子的截面图。

[0022] 图 9 之 (A) ~ (C) 为表示通过使用比较例的各种分析试剂进行分析而得到的白细胞的粒度分布的直方图。图 9 之 (A) 为表示使用基本试剂的分析结果的直方图，图 9 之

(B) 为表示使用添加有月桂基三甲基氯化铵的分析试剂的分析结果的直方图，图 9 之 (C) 为表示使用添加有聚氧乙烯月桂基醚的分析试剂的分析结果的直方图。

[0023] 图 10 之 (A) ~ (D) 为表示通过使用本发明的各种分析试剂进行分析而得到的白细胞的粒度分布的直方图。图 10 之 (A) 为表示使用添加有蔗糖月桂酸酯的分析试剂的分析结果的直方图，图 10 之 (B) 为表示使用添加有蔗糖单月桂酸酯的分析试剂的分析结果的直方图，图 10 之 (C) 为表示使用添加有蔗糖单癸酸酯的分析试剂的分析结果的直方图，图 10 之 (D) 为表示使用添加有十二烷基麦芽糖苷的分析试剂的分析结果的直方图。

[0024] 图 11 之 (A) ~ (F) 为表示通过使用添加了规定浓度蔗糖月桂酸酯的各种分析试剂进行分析而得到的白细胞的粒度分布的直方图。图 11 之 (A) 为表示使用添加 0w/v% 的分析试剂（无添加）的分析结果的直方图，图 11 之 (B) 为表示使用添加 0.0125w/v% 的分析试剂的分析结果的直方图，图 11 之 (C) 为表示使用添加 0.025w/v% 的分析试剂的分析结果的直方图，图 11 之 (D) 为表示使用添加 0.05w/v% 的分析试剂的分析结果的直方图，图 11 之 (E) 为表示使用添加 0.1w/v% 的分析试剂的分析结果的直方图，图 11 之 (F) 为表示使用添加 0.2w/v% 的分析试剂的分析结果的直方图。

[0025] 附图标记说明

[0026] 1：测试盒；2：上基板；3：下基板；4：试样计量部；41：试样导入部；42：试样导入流路；43：分支部；44：溢出流路；45、55、58、65：排液部；46：试样计量流路；47：节流孔；5：稀释部；51：试剂槽；52：试剂导入流路；53：分支部；54：溢出流路；56：试剂计量流路；57：锥形部；59：稀释槽；6：分析部；61、62：电极、电极配置部；14、63、84：微孔；64：流量测量流路；7：连接器；8、88：白细胞分析装置；9：主槽；10：副槽；11：抽吸部；12、13：电极；15：定量部；16：基板部；17：搅拌槽；18：搅拌管；19：抽吸管；21a、21b：贯通孔、导入口；22a、22b、22c、22d、22e：贯通孔；90：主槽部；100：副槽部；160：搅拌部；91a、91b、101a、101b、161a、161b：基板；840：弹性体；

具体实施方式

[0027] 本发明的分析方法中，所述非离子表面活性剂优选所述糖残基是二糖的残基。

[0028] 本发明的分析方法中，所述非离子表面活性剂优选所述脂肪链是脂肪酸残基或烷基。

[0029] 本发明的分析方法中，优选所述非离子表面活性剂为选自由蔗糖单月桂酸酯、蔗糖月桂酸酯、蔗糖单癸酸酯以及十二烷基麦芽糖苷组成的组中的至少一种。

[0030] 本发明的分析方法中，优选所述非离子表面活性剂为蔗糖单月桂酸酯或蔗糖月桂酸酯。

[0031] 本发明的分析方法中，优选所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述非离子表面活性剂的浓度为 0.001 ~ 5w/v% 的范围。

[0032] 本发明的分析方法中，优选所述与白细胞反应的表面活性剂为季铵盐。

[0033] 本发明的分析方法中，优选所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的、所述与白细胞反应的表面活性剂的浓度为 0.01 ~ 5w/v% 的范围。

[0034] 本发明的分析方法中，优选所述分析试剂进一步包含与红细胞反应的表面活性

剂。

[0035] 本发明的分析方法中，优选所述与红细胞反应的表面活性剂为皂角苷。

[0036] 本发明的分析方法中，优选所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述皂角苷的浓度为 0.05 ~ 5w/v% 的范围。

[0037] 本发明的分析方法的所述混合工序中，优选所述试样 (X) 和所述分析试剂 (Y) 的混合体积比 (X : Y) 为 1 : 0.4 ~ 1 : 99 的范围。

[0038] 本发明的分析方法的所述测定工序中，优选将所述白细胞按照其体积分类为 3 种。

[0039] 本发明的分析方法的所述测定工序中，优选使用具有所述微孔的测试盒，并使所述混合液通过所述测试盒内的所述微孔。

[0040] 本发明的分析方法中，优选所述测试盒为微全分析系统。

[0041] 本发明的分析试剂中，优选所述糖残基为二糖。

[0042] 本发明的分析试剂中，优选所述脂肪链为脂肪酸残基或烷基。

[0043] 本发明的分析试剂中，优选所述非离子表面活性剂为选自蔗糖单月桂酸酯、蔗糖月桂酸酯、蔗糖单癸酸酯以及十二烷基麦芽糖苷组成的组中的至少一种。

[0044] 本发明的分析试剂中，优选所述与白细胞反应的表面活性剂为季铵盐。

[0045] 本发明的分析试剂中，优选所述分析试剂进一步包含与红细胞反应的表面活性剂。

[0046] 本发明的分析试剂中，优选所述与红细胞反应的表面活性剂为皂角苷。

[0047] 接下来举例说明本发明。

[0048] < 分析方法 >

[0049] 如上所述，本发明的分析方法，其特征在于，其是包括如下工序的白细胞的分析方法：混合工序，将包含白细胞以及红细胞的试样以及包含与白细胞反应的表面活性剂的分析试剂混合；以及测定工序，使所述试样与所述分析试剂的混合液通过微孔，测定在所述通过时检出的信号，对所述试样中的白细胞进行分类以及计数，所述分析试剂进一步包含非离子表面活性剂，所述非离子表面活性剂具有作为亲水部的糖残基和作为疏水部的脂肪链。另外，本发明的分析方法中使用的所述分析试剂相当于本发明的分析试剂。

[0050] 通过本发明，例如，不易受到红细胞含量（血细胞比容值等）的影响，可以稳定地分析。另外，通过本发明，例如，可以提高比淋巴细胞还要小的脉冲下检出的血液成分（噪音）与淋巴细胞的分离精度，另外可以提高粒细胞的分离精度。因而通过本发明例如可以提高分析精度。

[0051] 混合工序

[0052] 所述混合工序中，混合所述试样与所述分析试剂，使所述试样中的所述白细胞以及所述红细胞与所述分析试剂反应。作为对所述白细胞的反应，例如可以列举出白细胞的细胞膜溶解引起的裸核化，渗透压变化引起的收缩或膨胀等。另外，本发明中，作为对所述红细胞的反应，例如可列举出溶血、红细胞膜的溶解等。

[0053] 作为包含所述白细胞以及所述红细胞的试样，没有特别限定，例如可列举出血液试样、血液试样处理后的试样等。所述血液试样例如可列举出全血、血细胞等。作为

所述处理,没有特别限定,例如可列举出稀释处理等。所述稀释处理没有特别限定,作为稀释液例如可以使用生理盐水、缓冲液等。所述稀释倍率没有特别限定,例如为1~500倍的范围,优选为5~400倍的范围,更优选为200~300倍的范围。另外,例如在稀释全血时,混合所述稀释试样与所述分析试剂时,优选使得全血被稀释至5~1000倍,进一步优选15~400倍。另外,此时混合所述稀释试样与所述分析试剂而得到的所述混合液内所述分析试剂的各成分的浓度范围优选为下述范围。

[0054] 作为所述缓冲液没有特别限定,例如可列举出ADA(N-(2-乙酰胺)亚氨基二乙酸)缓冲液、MES(2-吗啉代乙烷磺酸)缓冲液、Bis-Tris(双-(2-羟乙基)亚氨基-三-(羟甲基甲烷)缓冲液、PIPES(哌嗪-1,4-双(2-乙烷磺酸))缓冲液、ACES(N-(2-乙酰胺)-2-氨基乙烷磺酸)缓冲液、MOPSO(2-羟基-3-吗啉代丙烷磺酸)缓冲液、BES(N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸)缓冲液、HEPES(2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸)缓冲液、磷酸缓冲液等。所述缓冲液的pH例如为pH2~12的范围,优选为pH5~7.5的范围。

[0055] 所述试样的动物种类没有特别限定,例如可列举出人、牛、马、犬、猫等哺乳类等。

[0056] 本发明中,所述分析试剂包含所述白细胞反应性表面活性剂以及所述非离子表面活性剂。

[0057] 所述白细胞反应性表面活性剂没有特别限定,例如可列举出季铵盐、皂角苷、聚氧乙烯系非离子表面活性剂、聚氧乙烯系阴离子表面活性剂等,优选为季铵盐。所述白细胞反应性表面活性剂例如可以为任意一种,也可以两种以上组合使用。

[0058] 所述季铵盐没有特别限定,例如可列举出月桂基三甲基氯化铵、鲸蜡基三甲基氯化铵、四(三甲基)氯化铵、硬脂基三甲基氯化铵、山萘基三甲基氯化铵、椰油基苄基二甲基氯化铵、二癸基二甲基氯化铵、肉豆蔻基三甲基溴化铵等,优选为月桂基三甲基氯化铵、鲸蜡基三甲基氯化铵、四(三甲基)氯化铵。所述季铵盐例如可以为任意一种,也可以两种以上组合使用。

[0059] 所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述白细胞反应性表面活性剂的浓度没有特别限定,例如可以根据表面活性剂的种类适当地设定,例如为0.01~5w/v%的范围,优选为0.075~1w/v%的范围。所述白细胞反应性表面活性剂为所述季铵盐时,所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述季铵盐的浓度没有特别限定,例如为上述的浓度范围。

[0060] 本发明中,如上所述,所述非离子表面活性剂具有作为亲水部的糖残基和作为疏水部的脂肪链。

[0061] 作为所述糖残基没有特别限定,例如可列举出单糖、二糖、寡糖等的糖残基。所述糖残基内单糖数没有特别限定,例如可以为1~20个的范围。作为所述单糖的糖残基,没有特别限定,例如可列举出葡萄糖残基、半乳糖残基、甘露糖残基、硫代葡萄糖残基、阿拉伯糖残基、木糖残基、葡萄糖醛酸残基、葡萄糖胺残基等。作为所述二糖的糖残基,没有特别限定,例如可列举出蔗糖残基(蔗糖残基)、乳糖残基、麦芽糖残基、硫代麦芽糖残基等,优选为蔗糖残基。

[0062] 作为所述脂肪链,没有特别限定,例如可列举出脂肪酸残基、烷基等。作为所

述脂肪酸残基，没有特别限定，例如可以为饱和脂肪酸残基，也可以为不饱和脂肪酸残基。另外，所述脂肪酸残基，例如可列举出直链脂肪酸残基、支链脂肪酸残基、环状脂肪酸残基等，没有特别限定。所述脂肪酸残基的碳原子数没有特别限定，例如为4～28的范围，优选为10～22的范围。作为所述饱和脂肪酸残基，没有特别限定，例如可列举出癸酸残基、月桂酸残基、肉豆蔻酸残基、十五酸残基、棕榈酸残基、硬脂酸残基、花生酸残基、山萘酸残基等，优选为癸酸残基、月桂酸残基，这些例如优选为癸酰基、十二酰基、十四酰基、十五酰基、十六酰基、十八酰基、二十酰基、二十二酰基等酰基。作为所述不饱和脂肪酸残基，没有特别限定，例如可列举出油酸残基、亚油酸残基等，这些例如优选为顺-9-十八碳烯酰基、顺，顺-9，12-十八碳二烯酰基等酰基。

[0063] 作为所述烷基，没有特别限定，例如可以为直链状烷基，也可以为支链状烷基。所述烷基的碳原子数没有特别限定，例如可以为1～18个的范围。作为所述烷基的具体例，没有特别限定，例如可列举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、仲丁基、叔丁基、戊基、己基、庚基、辛基、壬基、癸基、十一烷基、十二烷基、十三烷基、十四烷基、十五烷基、十六烷基、十七烷基、十八烷基、十九烷基、二十烷基等。

[0064] 作为所述非离子表面活性剂的具体例没有特别限定，例如可列举出蔗糖脂肪酸酯、烷基糖苷、烷基寡糖等。

[0065] 作为所述蔗糖脂肪酸酯没有特别限定，例如可列举出蔗糖癸酸酯、蔗糖月桂酸酯、蔗糖肉豆蔻酸酯、蔗糖棕榈酸酯、蔗糖硬脂酸酯、蔗糖山萘酸酯、蔗糖油酸酯、蔗糖亚油酸酯等，优选为蔗糖癸酸酯、蔗糖月桂酸酯。所述蔗糖脂肪酸酯，例如可列举出单酯、二酯、三酯等，没有特别限定。作为所述蔗糖脂肪酸单酯，没有特别限定，例如可列举出蔗糖单癸酸酯、蔗糖单月桂酸酯、蔗糖单肉豆蔻酸酯、蔗糖单棕榈酸酯、蔗糖单硬脂酸酯、蔗糖单山萘酸酯、蔗糖单油酸酯、蔗糖单亚油酸酯等，优选为蔗糖单癸酸酯、蔗糖单月桂酸酯。作为所述蔗糖脂肪酸二酯，没有特别限定，例如可列举出蔗糖二癸酸酯、蔗糖二月桂酸酯、蔗糖二肉豆蔻酸酯、蔗糖二棕榈酸酯、蔗糖二硬脂酸酯、蔗糖二山萘酸酯、蔗糖二油酸酯、蔗糖二亚油酸酯等，优选为蔗糖二癸酸酯、蔗糖二月桂酸酯。作为所述蔗糖脂肪酸三酯，没有特别限定，例如可列举出蔗糖三癸酸酯、蔗糖三月桂酸酯、蔗糖三肉豆蔻酸酯、蔗糖三棕榈酸酯、蔗糖三硬脂酸酯、蔗糖三山萘酸酯、蔗糖三油酸酯、蔗糖三亚油酸酯等，优选为蔗糖三癸酸酯、蔗糖三月桂酸酯。

[0066] 所述蔗糖脂肪酸酯，例如可以为单酯、二酯、三酯等任意一种，还可以为这些的混合物。所述蔗糖脂肪酸酯，例如优选为包含所述单酯的蔗糖脂肪酸酯，所述蔗糖脂肪酸单酯的比例没有特别限定，例如为50～100体积%的范围，优选为70～100体积%的范围。

[0067] 作为所述烷基糖苷，没有特别限定，例如可列举出正辛基-β-D-葡萄糖苷、正十二烷基-β-麦芽糖苷、正癸基-β-麦芽糖苷、正辛基-β-D-麦芽糖苷、3-氧杂十三烷基-α-D-甘露糖苷、正庚基-β-硫代葡萄糖苷、正壬基-β-D-硫代麦芽糖苷、正辛基-β-D-硫代葡萄糖苷等。

[0068] 所述非离子表面活性剂，例如，可以为任意一种，也可以两种以上组合使用。

[0069] 所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述非离子表面活性剂的浓度没有

特别限定，例如为 0.001 ~ 5w/v% 的范围，优选为 0.001 ~ 1w/v% 的范围，更优选为 0.01 ~ 1w/v% 的范围。

[0070] 如上所述，所述分析试剂优选不仅包含所述白细胞反应性表面活性剂以及所述非离子表面活性剂，还包含与所述红细胞反应的表面活性剂（以下称为红细胞反应性表面活性剂）。

[0071] 本发明中，作为所述红细胞反应性表面活性剂，没有特别限定，例如可以为化学合成的表面活性剂，也可以为来自天然物质的表面活性剂。作为所述化学合成的表面活性剂，没有特别限定，例如可列举出阳离子性表面活性剂、阴离子性表面活性剂、两性表面活性剂等。作为所述阳离子性表面活性剂，没有特别限定，例如可列举出十二烷基溴化吡啶、鲸蜡基氯化吡啶等。作为所述阴离子性表面活性剂，没有特别限定，例如可列举出十二烷基硫酸钠、十四烷基磺酸钠等。作为所述两性表面活性剂，没有特别限定，例如可列举出 CHAPS（硫酸-3-[(3-胆酰胺丙基)二甲基铵]-1-丙烷）、十二烷基-N-甜菜碱等。另外，所述来自天然物质的表面活性剂没有特别限定，例如可列举出皂角苷、酪蛋白、卵磷脂等。作为所述红细胞反应性表面活性剂，在其中优选为皂角苷。而且，所述皂角苷可以兼作所述白细胞反应性表面活性剂和所述红细胞反应性表面活性剂。

[0072] 所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述红细胞反应性表面活性剂的浓度没有特别限定，例如可以根据使用的表面活性剂适当地设定。所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述红细胞反应性表面活性剂的浓度没有特别限定，例如为 0.05 ~ 5w/v% 的范围，优选为 0.1 ~ 0.5w/v% 的范围。在使用所述皂角苷时，所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述皂角苷的浓度没有特别限定，例如为前述的浓度范围。

[0073] 本发明中，所述分析试剂的上述表面活性剂以外的组成没有特别限定，例如可以包含缓冲液、添加剂等。作为所述缓冲液，没有特别限定，例如可列举出前述的缓冲液等。所述缓冲液的 pH 没有特别限定，例如与前述的 pH 范围一样。

[0074] 作为所述添加剂，没有特别限定，例如可列举出防再凝集剂、血红蛋白测定用的添加剂等。

[0075] 所述防再凝集剂例如为用于防止血液试样成分的再凝集的溶液。作为所述防再凝集剂，没有特别限定，例如可列举出柠檬酸钠、肝素、EDTA（乙二胺四乙酸）、氟化钠、ACD（柠檬酸-葡萄糖（dextrose）液）等。

[0076] 所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述防再凝集剂的浓度没有特别限定，可以根据所使用的成分适当地设定。所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述防再凝集剂的浓度没有特别限定，例如为 0.05 ~ 5w/v% 的范围，优选为 0.1 ~ 0.5w/v% 的范围。在使用所述柠檬酸钠作为所述防再凝集剂时，所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述柠檬酸钠的浓度没有特别限定，例如为前述的浓度范围。

[0077] 作为所述血红蛋白测定用的添加剂，没有特别限定，例如可列举出亚硝酸钠、高氯酸、硫氰酸、碘化钾、溴化钾、三氯乙酸、三氟乙酸等。所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述血红蛋白测定用的添加剂浓度没有特别限定，例如为 0.01 ~ 1w/v% 的范围，优选为 0.01 ~ 0.1w/v% 的范围。使用所述亚硝酸钠时，所述试样与所述分析试剂的所述混合液中的所述亚硝酸钠的浓度没有特别限定，例如为所述的浓度范围。

[0078] 本发明的分析方法中，在所述反应工序中，所述试样(X)与所述分析试剂(Y)的混合体积比没有特别限定，例如为 $X : Y = 1 : 0.4 \sim 1 : 99$ 的范围，优选为 $X : Y = 1 : 9 \sim 1 : 99$ 的范围，更优选为 $X : Y = 1 : 19 \sim 1 : 49$ 的范围。

[0079] 所述混合液中，例如，相对于 $1 \mu\text{L}$ 全血，所述白细胞反应性表面活性剂例如优选为 $0.02 \sim 2\text{mg}$ 的范围，所述非离子表面活性剂优选为 $0.001 \sim 0.25\text{mg}$ 的范围，所述红细胞反应性表面活性剂优选为 $0.004 \sim 0.4\text{mg}$ 的范围。

[0080] 在所述反应工序中，混合所述试样和所述分析试剂，使所述分析试剂与所述白细胞以及红细胞反应的时间没有特别限定，例如为 $10 \sim 300$ 秒的范围，优选为 $30 \sim 120$ 秒的范围。通过使所述反应时间在所述时间的范围内，从而使白细胞与分析试剂反应至适于分类的程度，且该反应状态保持固定，因而可以稳定地分析白细胞。

[0081] 本发明的分析试剂的剂型没有特别限定，例如可列举出液剂、粉剂、粒剂等。作为所述分析试剂的制备方法，例如，可以采用目前公知的制造方法，没有特别限定。作为所述液剂的制备方法，没有特别限定，例如可以将所述的表面活性剂混合于所述的缓冲液中而制备。作为所述粉剂的制备方法，没有特别限定，例如可以使所述液剂干燥而制备。另外，作为所述粒剂的制备方法，没有特别限定，例如可以将造粒剂等助剂添加到所述粉剂内，使用造粒装置等而制备。本发明的分析试剂为例如粉剂或粒剂时，通过将所述试样与所述分析试剂混合，可以使所述分析试剂的成分溶解、悬浮或分散于所述混合液中，也可以预先溶解、悬浮或分散于缓冲液等中，再与所述试样混合。

[0082] 测定工序

[0083] 所述测定工序中，使所述试样与所述分析试剂的所述混合液通过微孔，测定在所述通过时产生的信号，对白细胞进行分类以及计数。另外，本发明例如也可以说是如下方法：对所述试样与所述分析试剂的所述混合液，检出与所述试样中的细胞的大小相关的信息以及与形态相关的信息中的至少一者，由此对白细胞进行分类以及计数。这些信息可以作为下述的信号检出。

[0084] 所述混合液的微孔的通过以及所述通过时产生的信号的测定，没有特别限定。所述微孔，例如，可以为流路的一部分（一点）。即，例如，在使所述混合液通过流路时，可以将所述流路需要的部位（一点）作为所述微孔部，测定通过该部位时的信号。另外，所述微孔也可以为流路途中变细而形成。即，可以使流路上的“变细部分”成为微孔。这样，所述流路在具有所述微孔时，例如，从所述流路的一端侧向所述流路内导入、填充所述试样与所述分析试剂的所述混合液。然后，使所述试样向所述流路的另一端侧移动。由此，使所述混合液通过所述微孔，测定使所述混合液通过所述微孔时产生的信号。将所述混合液导入流路内的方法没有特别限定，例如，可以通过在所述流路的另一端侧连接减压泵等抽吸空气而导入，也可以通过在电极和电极之间配置所述微孔，并在所述两电极间施加电压而导入。在后者的情况下，例如，优选在所述电极间填充电泳溶液后，通过电泳使所述混合液移动。所述流路例如优选设置于测试盒中，作为测试盒，优选为 μTAS 等微芯片。

[0085] 另外，所述微孔例如也可以为设置于用于隔开相连的液槽的隔壁上的贯通孔（节流孔）。这种情况下，例如，向一方的所述液槽内注入所述试样以及所述分析试剂，向另一方的所述液槽内填充生理盐水。接着，通过与所述另一方的液槽相连的减压泵，

对所述液槽内部进行减压，使所述试样与所述分析试剂的所述混合液向所述另一方的液槽移动。由此，使所述白细胞通过所述微孔，测定使所述混合液通过所述微孔时产生的信号。

[0086] 所述微孔的大小没有特别限定，可以根据所使用的分析装置适当地设定。例如，使用所述 μ TAS 作为所述分析装置时，在与所述混合液的移动方向垂直的方向上，所述微孔的截面形状没有特别限定，例如可列举出矩形、圆形等。所述截面形状为矩形时，所述微孔没有特别限定，例如其宽度为 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，其深度为 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，优选其宽度为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围，其深度为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围。所述截面形状为圆形时，所述微孔的孔径（直径）例如为 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，优选为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围。另外，所述微孔的在所述移动方向上的长度没有特别限定，例如为 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，优选为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围。

[0087] 所述微孔例如为所述隔壁的贯通孔（节流孔）的情况下，在与所述混合液的移动方向垂直的方向上，所述贯通孔的截面形状没有特别限定，例如可列举出矩形、圆形等。所述截面形状为矩形时，所述微孔没有特别限定，例如其宽度为 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，其高度为 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，优选其宽度为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围，其高度为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围。所述截面形状为圆形时，所述微孔的孔径（直径）例如为 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，优选为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围。另外，所述微孔的在所述移动方向上的长度没有特别限定，例如为 $10 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，优选为 $50 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围。

[0088] 作为通过所述微孔时检出的信号，没有特别限定，例如可列举出 DC 电阻 (impedance)、RF 电阻等电阻、前向散射光、侧向散射光、荧光等。

[0089] 作为测定所述信号的方法，没有特别限定，例如可列举出测定电压或电流值的电化学方法，测定光、染料的强度的光学方法等。

[0090] 所述电阻，例如为在含有血细胞的溶液通过所述微孔时电极间的电阻。具体地，例如，在所述两电极之间通有电流的状态下，所述溶液通过配置在电极和电极之间的微孔时产生的电阻。所述溶液中悬浮的白细胞等血细胞通过所述微孔时电阻发生变化，因此通过测定电阻检出该变化，可以分析所述试样中含有的白细胞。通直流电流作为电流时的电阻为 DC 电阻，通常，根据血细胞的容积而变化。另外，通高频电流作为电流时的电阻为 RF 电阻，通常，根据血细胞的容积以及内部状态而变化。本发明中，所述包含血细胞的溶液为包含本发明的分析试剂和试样的混合液。包含所述分析试剂或所述血细胞的溶液（即所述混合液）的电导率没有特别限定，例如为 $11 \sim 20\text{mS/cm}$ 的范围，优选为 $13 \sim 18\text{mS/cm}$ 的范围。

[0091] 另外，所述散射光以及荧光的检出方法没有特别限定，例如可以采用常规的方法，可以使用流式细胞仪，对通过所述微孔的血细胞照射光而检出。作为所述光的光源，没有特别限定，例如可列举出水冷高功率激光、低功率风冷激光、二极管激光、氙灯等。

[0092] 所述白细胞的分类以及计数没有特别限定，例如可以使用能够由所述信号的信息进行分析的方法适当地实施。作为所述信号，例如，在测定所述 DC 电阻时，从检出的脉冲（电阻变化）的大小，按尺寸大小将白细胞分类，从所述脉冲的频率，可以算出所述白细胞的按尺寸大小的比率。所述白细胞一般可列举出嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞

以及嗜碱性粒细胞等粒细胞、淋巴细胞以及单核细胞这类无颗粒白细胞等。本发明中，白细胞的分类类别没有特别限定，例如可列举出分为粒细胞和无颗粒白细胞 2 种（即白细胞的 2 分类），分为淋巴细胞、单核细胞以及粒细胞 3 种（即白细胞的 3 分类），分为嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞以及淋巴细胞 5 种（即白细胞的 5 分类）。本发明的分析方法中，所述白细胞的分类没有特别限定，但优选为 3 分类。

[0093] 本发明的分析方法可以与其它的血液分析同时实施。作为所述其它血液分析的对象，没有特别限定，例如可列举出红细胞、血红蛋白、血小板等。

[0094] 下面针对本发明的分析方法举例说明。但是，本发明的分析方法并不限于下述的例子。

[0095] （实施方式 1）

[0096] 以下说明使用 μ TAS 测试盒的本发明的分析方法的一个实施方式。首先图 1 所示为本实施方式的所述测试盒的一例。本例的测试盒是可以安装于分析装置（未图示）的一次性的测试盒。图 1 之 (A) 为所述测试盒的平面图。图 1 之 (B) 为所述测试盒的透视图。图 1 之 (A) 以及 (B) 中，同一部分附加同一标记。两图为为了便于理解的简图，各构成元素的大小、比率等，不限于此，可以不同。如两图所示，所述测试盒 1 具有下基板 3、上基板 2 和连接器 7，在所述下基板 3 上层叠有所述上基板 2 而形成的层叠体的一个侧面上配置了连接器 7。在所述下基板 3 上形成了布线图案（未图示）。

[0097] 在所述上基板 2 上形成了 5 个贯通孔。所述 5 个贯通孔的底部被所述下基板 3 密封而形成 5 个液槽。所述 5 个液槽分别为试样导入部 41、排液部 45、排液部 55、排液部 58 和排液部 65。另外，所述上基板 2 的底面上形成有大小 4 个凹部。在所述 4 个凹部中 2 个凹部的开口面被所述下基板 3 密封而形成 2 个液槽。所述 2 个液槽分别为试剂槽 51 和稀释槽 59。在所述试剂槽 51 中封入有分析试剂。在所述稀释槽 59 中封入有搅拌子（未图示）。在所述 4 个凹部中剩余的 2 个凹部的开口面被所述下基板 3 密封所得的空隙内，分别配置了连接所述布线图案中线路的电极 61 和 62。所述空隙为电极配置部。上述图中，61 和 62 为所述电极，也为所述电极配置部。进而，在所述上基板 2 的底面形成多条沟。所述多条沟的开口面被所述下基板 3 密封而形成流路，连通由所述 5 个贯通孔和所述 2 个凹部形成的 7 个液槽以及 2 个所述电极配置部。

[0098] 所述试样导入部 41 依次通过试样导入流路 42、分支部 43、溢出流路 44 连通到所述排液部 45。另外，所述试样导入部 41 还从所述分支部 43 经由试样计量流路 46 连通到所述稀释槽 59。所述试样导入部 41 的开口部为用于将作为分析对象的试样导入到测试盒中的导入口。而且，所述试样计量流路 46 的所述稀释槽 59 侧的端部形成了流路截面积狭小的节流孔 47。

[0099] 所述测试盒 1，例如，可以如下所述计量所述试样并导入到稀释槽 59 内。首先，将试样导入所述试样导入部 41 中后，通过连接到所述排液部 45 的减压泵等（未图示）抽吸空气，对连通于所述排液部 45 的流路内部减压，从所述试样导入部 41 导入试样。通过所述抽吸使超过所述分支部 43 和所述节流孔 47 之间的所述试样计量流路 46 的容积的所述试样流出到溢出流路 44。接着，关闭所述排液部 45，通过连接到所述试样导入部 41 的加压泵等（未图示）喷出空气，对连通于所述试样导入部 41 的流路内部加压。由此，将与所述试样计量流路 46 的容积相当的试样导入到所述稀释槽 59 中。因此，所

述导入量例如设定为所述试样计量流路 46 的容积，可以计量导入。

[0100] 所述试剂槽 51 依次通过试剂导入流路 52、分支部 53、溢出流路 54 连通到所述排液部 55。另外，所述试剂槽 51 还从所述分支部 53 通过试剂计量流路 56 连通到所述稀释槽 59。在所述试剂槽 51 中封入有分析试剂（未图示）。所述试剂计量流路 56 在该所述稀释槽侧的端部与所述稀释槽 59 之间分支，在该分支末端形成所述排液部 58。由所述试剂槽 51、试剂导入流路 52、分支部 53、溢出流路 54、排液部 55、试剂计量流路 56、排液部 58 和稀释槽 59 构成稀释部 5。另外，在所述试剂计量流路 56 的所述稀释槽侧的部分形成有锥形部 57。

[0101] 在所述稀释部 5 中可以如下所述计量所述分析试剂并导入到所述稀释槽 59 内。首先，使所述排液部 55 和排液部 65 为关闭状态，使所述排液部 58 为打开状态，通过连接到所述试剂槽 51 的加压泵（未图示）等喷出空气，对连通到所述试剂槽 51 的流路内部加压。由此，将所述分析试剂填充到所述试剂计量流路 56 中。进而，关闭所述排液部 58，使所述排液部 65 为打开状态，通过连接于所述排液部 55 的加压泵（未图示）等喷出空气，对连通到所述排液部 55 的流路内部加压。由此，将与所述试剂计量流路 56 的容积相当的分析试剂导入到所述稀释槽 59 中。因此，所述导入量例如设定为所述试样计量流路 56 的容积，可以计量导入。进而，如前所述将所述试样导入到所述稀释槽 59 中。然后，利用磁力搅拌器（未图示）使所述稀释槽 59 内的所述搅拌子（未图示）旋转，从而可以混合所述试样和所述分析试剂。另外，本例中为了能够进行溶血处理，所述分析试剂中可以添加表面活性剂。

[0102] 在连通所述稀释槽 59 和所述排液部 65 的流路上形成微孔 63。并且，在所述微孔 63 两端的流路上形成所述电极配置部 61 和 62（2 个凹部）。所述电极配置部 61 和 62（凹部）中分别配置了通过所述电线与电阻检测仪（未图示）相连的所述电极 61、62。另外，通过所述微孔 63 和所述 2 个电极 61、62，在所述排液部 65 侧形成流量测量流路 64。由所述电极 61 和 62、微孔 63、流量测量流路 64 和排液部 65 构成分析部 6。

[0103] 所述测试盒 1 中，所述上基板 2 的长度和宽度没有特别限定，例如为 10 ~ 200mm 的范围，优选为 20 ~ 100mm 的范围。另外，所述上基板 2 的厚度没有特别限定，例如为 0.1 ~ 10mm 的范围，优选为 1 ~ 5mm 的范围。

[0104] 所述测试盒 1 中，所述下基板 3 的长度和宽度没有特别限定，例如为与所述上基板 2 同样的长度和宽度。所述下基板 3 的厚度没有特别限定，例如为 0.1 ~ 10mm 的范围，优选为 1 ~ 5mm 的范围。

[0105] 所述测试盒 1 中所述上基板 2 以及下基板 3 的材质，例如只要为不妨碍所述吸光度测定的材质就没有特别限定。作为所述上基板 2 以及下基板 3 的材质，例如可以使用由玻璃、聚合物材料等形成的材质。作为所述玻璃材料没有特别限定，例如可列举出合成石英玻璃、熔融二氧化硅、硼硅酸玻璃等。作为所述聚合物材料没有特别限定，例如可列举出聚甲基丙烯酸甲酯（PMMA）等丙烯酸类树脂、环烯烃聚合物（COP）、聚碳酸酯（PC）、聚二甲基硅氧烷（PDMS）、聚苯乙烯（PS）、聚乳酸（PLA）、环氧树脂、聚乙烯（PE）、聚四氟乙烯（PTFE）、聚醚醚酮（PEEK）等。另外，所述下基板 3 层叠有由所述材质形成的多个基板。所述多个基板之间形成由铜箔等构成的布线图案。

[0106] 所述测试盒 1 中所述试样导入部 41 的直径和深度没有特别限定，例如为直径

0.1 ~ 10mm 的范围、深度 0.1 ~ 10mm 的范围，优选为直径 1 ~ 5mm 的范围、深度 1 ~ 5mm 的范围。

[0107] 所述测试盒 1 中所述试剂槽 51 的直径和深度没有特别限定，例如为直径 0.5 ~ 50mm 的范围、深度 0.1 ~ 10mm 的范围，优选为直径 1 ~ 20mm 的范围、深度 1 ~ 5mm 的范围。

[0108] 所述测试盒 1 中所述稀释槽 59 的直径和深度没有特别限定，例如为直径 0.5 ~ 50mm 的范围、深度 0.1 ~ 10mm 的范围，优选为直径 1 ~ 10mm 的范围、深度 1 ~ 5mm 的范围。

[0109] 所述测试盒 1 中所述排液部 45、55、58 以及 65 的直径以及深度没有特别限定，例如分别为直径 0.1 ~ 10mm 的范围、深度 0.1 ~ 10mm 的范围，优选分别为直径 1 ~ 5mm 的范围、深度 1 ~ 5mm 的范围。

[0110] 所述测试盒 1 中，所述试样导入部 41、所述试剂槽 51、所述稀释槽 59 和所述排液部 45、55、58 以及 65 的液槽的形状为圆柱状，但本发明不限于此。本发明中各液槽的形状没有特别限定，例如可列举出圆柱状、四棱柱状、四棱锥状、圆锥状等。所述各液槽的形状可以完全相同也可以不同，没有特别限定。

[0111] 所述测试盒 1 中所述试剂计量流路 56 的流路的宽度和深度没有特别限定，截面积的最大部分处例如宽度为 0.1 ~ 10mm 的范围、深度为 0.1 ~ 10mm 的范围，优选宽度为 0.5 ~ 5mm、深度为 0.1 ~ 5mm。

[0112] 所述测试盒 1 中所述节流孔 47 的宽度和深度没有特别限定，例如宽度为 1 ~ 200 μm 的范围、深度为 0.1 ~ 10mm 的范围，优选宽度为 10 ~ 100 μm 、深度为 0.1 ~ 5mm。

[0113] 所述测试盒 1 中所述微孔 63 的宽度、深度以及长度如前所述。

[0114] 所述测试盒 1 中所述试剂计量流路 56、所述节流孔 47 以及微孔 63 以外的流路的宽度和深度没有特别限定，例如宽度为 10 ~ 1000 μm 的范围、深度为 0.1 ~ 10mm 的范围，优选宽度为 100 ~ 500 μm 、深度为 0.1 ~ 5mm。

[0115] 所述测试盒 1 中，所述测试盒总体的最大厚度为所述上基板 2 以及所述下基板 3 的厚度的总和。所述上基板 2 以及所述下基板 3 的厚度如前所述。

[0116] 所述测试盒 1 的制造方法没有特别限定，例如可采用目前公知的方法。

[0117] 接下来，针对使用所述测试盒 1 的本例的白细胞的分析方法进行说明。

[0118] 首先，将所述测试盒 1 通过连接器 7 安装到分析装置（未图示）中。另外，与上述同样地从所述试样导入部 41 导入作为所述试样的人类全血。并且，如上所述计量与所述试样计量流路 46 的容量相当的量的人类全血并导入到所述稀释槽 59 中。进而，如上所述计量与所述试剂计量流路 56 的容量相当的量的所述分析试剂并导入到所述稀释槽 59 中。在所述稀释槽 59 中混合所导入的所述试样以及所述分析试剂，用所述磁力搅拌器（未图示）使所述搅拌子（未图示）旋转、搅拌，使所述试样中的所述白细胞和红细胞与所述分析试剂反应。

[0119] 接下来，在所述电极 61 和 62 之间施加电压，通过连接到所述排液部 65 的减压泵等（未图示）抽吸空气，对连通到所述排液部 65 的流路内部减压。由此，使混合了所述试样和所述分析试剂的溶液（混合液）通过所述微孔 63，进而流出到所述流量测量流路

64。通过电阻检测仪（未图示）测定所述混合液通过所述微孔 63 时产生的脉冲（电阻变化），制作以所述脉冲的大小以及频率为两轴的直方图。根据所制作的所述直方图的弯曲状态将白细胞按尺寸大小分为三类，累加每种所述分类的脉冲频率。用所述累加的脉冲频率除以流出到所述流量测量流路 64 的流量，算出所述试样中的所述三类白细胞的比率。另外，所述三类白细胞以脉冲小的顺序依次为淋巴细胞、单核细胞以及粒细胞。

[0120] （实施方式 2）

[0121] 接下来说明本发明分析方法的其它实施方式。首先，图 2 表示本实施方式的分析方法中使用的白细胞分析装置的一例。图 2 为所述白细胞分析装置的截面图。图 2 为为了便于理解的简图，各构成元素的大小、比率等，不限于此，可以不同。

[0122] 如图 2 所示，所述白细胞分析装置 8 由主槽 9 和副槽 10 这 2 个槽、抽吸部 11、电极 12 和电极 13 这 2 个电极以及分析部（未图示）构成。所述主槽 9 和所述副槽 10 通过隔壁隔开配置。在所述隔壁上形成作为微孔 14 的贯通孔而连通所述两槽的内部。所述主槽 9 的上面处于开口状态。所述副槽 10 在与所述隔壁相异的侧面上形成贯通孔，通过所述贯通孔连通所述抽吸部 11。所述抽吸部 11 的另一端配置泵（未图示）。另外，所述电极 12 以及 13 分别配置在所述主槽 9 以及所述副槽 10 上。所述电极 12 以及 13 配置在连接到所述分析部（未图示）的电线（仅图示一部分）的末端。

[0123] 作为所述主槽 9 以及所述副槽 10 的材质，例如可以使用与前述测试盒的上基板同样的材质等。所述主槽 9 以及所述副槽 10 的形状没有特别限定，例如可列举出长方体、圆筒状等。所述主槽 9 以及所述副槽 10 的形状可以完全相同也可以不同，没有特别限定。另外，所述主槽 9 如上所述例如上面可以处于开放状态。

[0124] 所述微孔 14 是例如直径为 $1 \sim 500 \mu\text{m}$ 的范围、长度为 $1 \sim 200 \mu\text{m}$ 的范围，优选为直径 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围、长度 $10 \sim 100 \mu\text{m}$ 的范围的贯通孔。另外，所述直径例如为垂直于所述微孔 14 贯通方向的截面直径，所述长度为所述微孔 14 贯通方向的长度，并且为隔开所述主槽 9 和所述副槽 10 的所述隔壁的厚度。

[0125] 作为所述抽吸部 11 的材质没有特别限定，例如可以使用与所述的两槽相同的材料等。所述抽吸部 11 的形状没有特别限定，例如为圆筒状。

[0126] 本例的白细胞分析装置 8 的制造方法没有特别限定，例如可以适当地使用目前公知的方法。

[0127] 接下来，针对使用所述白细胞分析装置 8 的本例白细胞分析方法进行说明。

[0128] 首先，向所述主槽 9 和所述副槽 10 注入本发明的分析试剂。并且，将人类的全血作为所述试样添加到所述主槽 9 中混合 30 秒钟。接下来，在两个所述电极之间施加电压，通过连接于所述抽吸部 11 的所述泵抽吸，对所述副槽 10 内部减压。由此，使所述混合液通过所述微孔 14 从所述主槽 9 向所述副槽 10 移动。使用所述分析部（未图示）测定所述混合液通过所述微孔 14 时产生的脉冲（电阻变化）。与实施方式 1 同样地制作直方图，对白细胞进行分类并计数，算出被分类的白细胞的比率。

[0129] （实施方式 3）

[0130] 接下来，说明本发明的分析方法的另一实施方式。首先，图 7 表示本实施方式的分析方法中使用的白细胞分析装置的一例。图 7 为所述白细胞分析装置的截面图。图 7 为为了便于理解的简图，各构成元素的大小、比率等不限于此，可以不同。

[0131] 如图7所示,所述白细胞分析装置88包含主槽部90、副槽部100、搅拌部160、抽吸部11、电极12和13。另外,所述搅拌部160包含基板部16和搅拌管18。所述抽吸部11包含抽吸管19和注射筒(未图示)。

[0132] 所述主槽部90由使基板91a和基板91b这2个基板并列重叠而成的两层体构成,并具备在上方开口且可以容纳液体的空隙部9。该空隙部成为主槽9。所述主槽部90中,在所述主槽9的侧面即基板91a和基板91b上分别形成了连通所述主槽9内部的贯通孔22a和贯通孔22c。所述搅拌管18的一端与所述贯通孔22c连接。所述主槽9内配置有电极12。所述电极12通过电线与电压器连接(未图示)。

[0133] 所述副槽部100由使基板101a和基板101b这2个基板并列重叠而成的两层体构成,与所述主槽部90邻接配置。所述副槽部100内部具备可以导入液体的空隙部10。该空隙部成为副槽10。所述副槽部100内,在所述副槽10的侧面即基板101a上,在纵向上形成与所述副槽10的内部连通的3个贯通孔。所述3个贯通孔中,正中的贯通孔22b与邻接的所述主槽部90的贯通孔22a连接。由此,连通所述主槽部90内部和所述副槽部100内部。另外,本例白细胞分析装置88中,所述副槽部100的贯通孔22b与所述主槽部90的贯通孔22a的连接部分成为微孔14。所述3个贯通孔中,上方的贯通孔21a以及下方的贯通孔21b分别成为导入口21a以及导入口21b。抽吸管(未图示)的一端与所述导入口21a连接,所述抽吸管的另一端与所述注射筒(未图示)连接。另外,所述导入口21a和21b可以能够开关,也可以与用于将导入到所述副槽部100内的溶液排出的溶液槽连接。所述空隙部10中,从所述导入口21a连通所述贯通孔22b的空隙部分例如可以作为定量部15使用。所述副槽10内配置有电极13。所述电极13通过电线连接到所述电压器(未图示)。

[0134] 图8表示所述白细胞分析装置88的所述微孔14部分的其他例子。图8是表示图7中虚线围住部分的其他例子的放大图。如图8所示,在连通所述主槽部90的贯通孔22a和所述副槽部100的贯通孔22b的区域,可以配置具有贯通孔的弹性体840。在这种情况下,在所述弹性体840上形成的所述贯通孔成为所述微孔84。所述弹性体840的材质没有特别限定,例如可列举出硅橡胶等。

[0135] 所述基板部16由基板161a和基板161b这2个基板并列重叠而成的两层体构成,其内部具备可以容纳液体的空隙部17。该空隙部成为搅拌槽17。所述基板部16中所述搅拌槽17的侧面即基板161b上,在纵向上形成有连通所述搅拌槽17内部的两个贯通孔22d和22e。所述抽吸管19的一端连接于所述贯通孔22d,所述抽吸管19的另一端连接所述注射筒(未图示)。所述搅拌管18的一端连接于所述贯通孔22e,所述搅拌管18的另一端如上所述与所述主槽部90的所述贯通孔22c连接。通过该搅拌管18连通所述基板部16和所述主槽部90的内部。

[0136] 本例的白细胞分析装置88中,作为所述基板91a、91b、101a、101b、161a以及161b的材质没有特别限定,例如可列举出所述的玻璃、聚合物材料等。

[0137] 所述主槽部90的大小没有特别限定,例如其高度为3~100mm的范围、其宽度为3~50mm的范围、其厚度为3~50mm的范围。另外,所述主槽9的体积没有特别限定,例如为10~5000 μ L的范围,优选为100~1000 μ L。

[0138] 所述副槽部100的大小没有特别限定,例如其高度为10~200mm的范围、其宽

度为 3 ~ 50mm 的范围、其厚度为 3 ~ 50mm 的范围。另外, 所述副槽 10 的体积没有特别限定, 例如为 10 ~ 5000 μ L 的范围, 优选为 100 ~ 1000 μ L。另外, 从所述贯通孔 22b 至所述导入口 21a 的空隙部, 可以作为定量部 15, 在这种情况下, 所述定量部 15, 优选设定为适于定量的所期望的体积。

[0139] 所述基板部 16 的大小没有特别限定, 例如其高度为 3 ~ 200mm 的范围、其宽度为 3 ~ 50mm 的范围、其厚度为 3 ~ 50mm 的范围。另外, 所述搅拌槽 17 的体积没有特别限定, 例如优选为 100 ~ 1000 μ L。

[0140] 所述微孔 14 的大小例如直径为 1 ~ 500 μ m 的范围、长度为 1 ~ 200 μ m 的范围, 优选直径为 10 ~ 200 μ m 的范围、长度为 10 ~ 100 μ m 的范围。另外, 所述直径例如为垂直于所述微孔 14 的贯通方向的截面的直径, 所述长度为所述微孔 14 部分中的所述基板 91b 和所述基板 101a 厚度的总和。另外, 例如图 8 中微孔 84 的大小也相同。

[0141] 所述导入口 21a 和 21b 的直径, 例如为 0.1 ~ 2mm 的范围, 优选为 0.5 ~ 1mm 的范围。所述贯通孔 22c、22d 和 22e 的直径, 例如为 0.1 ~ 2mm 的范围, 优选为 0.5 ~ 1mm 的范围。

[0142] 作为所述搅拌管 18 和所述抽吸管 19 的材质没有特别限定, 例如可以使用不锈钢等。作为所述不锈钢没有特别限定, 例如可列举出 SUS 等。所述搅拌管 18 和抽吸管 19 的形状没有特别限定, 例如为圆筒状。在为所述圆筒状时, 所述搅拌管和所述抽吸管的内径, 例如为 1 ~ 500 μ m 的范围, 优选为 10 ~ 200 μ m 的范围。所述搅拌管和所述抽吸管的长度没有特别限定, 例如为 1 ~ 500mm 的范围, 优选为 10 ~ 200mm 的范围。

[0143] 本例白细胞分析装置 88 的制造方法没有特别限定, 例如可以适当地使用目前公知的方法。

[0144] 接下来, 针对使用所述白细胞分析装置 88 的本例白细胞分析方法进行说明。

[0145] 首先, 用生理盐水稀释人类全血以配制所述试样。使用注射筒(未图示)从所述导入口 21b 导入生理盐水并填充至所述副槽 10 内的所述电极 13 的上部, 关闭所述导入口 21b。将所述试样注入到所述主槽 9。通过连接于所述抽吸管 19 的所述注射筒(未图示), 对连通于所述主槽 9 的各槽和管减压(抽吸)。由此, 将所述主槽 9 内的所述试样导入到所述搅拌槽 17。接下来, 在所述主槽 9 中注入本发明的分析试剂。通过所述注射筒对连通于所述主槽 9 的槽和管加压(喷出)。由此, 使所述搅拌槽 17 内的所述试样再次导入到所述主槽 9 内。进而, 通过所述注射筒对连通于所述主槽 9 的槽和管交替反复进行减压以及加压。由此, 混合所述试样和所述分析试剂。混合完成后, 在所述主槽 9 内静置所述试样与所述分析试剂的混合液。在所述电极 12 和 13 间施加电压, 通过连接于所述导入口 21a 的注射筒(未图示)抽吸, 对所述副槽 10 和所述主槽 9 减压。由此, 使所述混合液通过所述微孔 14 从所述主槽 9 向所述副槽 10 移动。使用分析部(未图示)测定所述试样通过所述微孔 14 时产生的脉冲(电阻变化)。与实施例 1 同样地制作直方图, 对白细胞进行分类以及计数, 算出所分类的白细胞的比率。另外, 在所述副槽部 100 的所述空隙部 10 中, 将从所述贯通孔 22b 到所述导入口 21a 的空隙部作为定量部 15 时, 例如可以对从所述主槽部 90 通过的所述混合液进行定量。

[0146] 实施例

[0147] 接下来结合比较例对本发明的实施例进行说明。但是, 本发明并不限于以下的

实施例。

[0148] (实施例 1)

[0149] 本例中, 使用血细胞比容值为 31.4% 的人类全血作为试样, 按照以下的步骤测定白细胞。另外, 本例的白细胞的测定中, 使用所述的图 2 所示的白细胞分析装置 8。在所述白细胞分析装置 8 中所述微孔 14 为直径 50 μm 、长度 60 μm 的贯通孔。

[0150] 首先, 配制如下表 1 所示组成的分析试剂。另外, 使用氯化钠将所述分析试剂的电导率调整为 11.33mS/cm。

[0151] (表 1) 分析试剂

	成分	配合浓度
	ADA-缓冲液 (pH7.4)	30mmol/L
	月桂基三甲基氯化铵	0.75w/v%
[0152]	鲸蜡基三甲基氯化铵	0.1w/v%
	皂角苷	0.18w/v%
	柠檬酸钠	0.25w/v%
	亚硝酸钠	0.05w/v%
	蔗糖单月桂酸酯	0.0125w/v%

[0153] 接下来, 在所述主槽 9 内加入所述分析试剂 2400 μL , 用所述分析试剂充满所述副槽 10。在所述主槽 9 内加入全血 100 μL 并搅拌, 使其与所述分析试剂反应。本例中全血的稀释率为 25 倍。即本例中在试样稀释率为低稀释率的条件下分析白细胞。接下来, 使所述试样和所述分析试剂反应 30 秒后, 在配设于所述主槽 9 和所述副槽 10 中的电极 12 和 13 之间施加 5V 电压, 通过抽吸部 11 的泵以 14 $\mu\text{L}/30$ 秒的流速抽吸 10 秒钟。所述 10 秒钟内用自制的电子检测仪 (未图示) 测量所述试样与所述分析试剂的混合液通过所述微孔 14 时产生的脉冲。将所得的脉冲高度作为横轴, 将脉冲数作为纵轴, 制作表示白细胞的粒度分布的直方图。从所述脉冲的高度, 根据小尺寸 (淋巴细胞)、中尺寸 (单核细胞)、大尺寸 (粒细胞) 3 种尺寸将白细胞分类。另外, 所述分类中所述小尺寸为接着直方图左端的电噪音峰出现的第一个峰部分, 所述大尺寸为从所述电噪音峰开始计数, 从第二个峰部分到直方图右端为止的部分, 中尺寸为在所述小尺寸峰和所述大尺寸峰之间出现的谷部分。分别累加所述 3 尺寸的脉冲数, 分别算出占全脉冲数的比率 (n)。

[0154] 进而, 测量反应开始 60 秒后的 10 秒钟所得的脉冲, 此外与前述同样地算出各尺寸的白细胞的比率 (m)。用下述式 (1) 算出反应时间 30 秒和 60 秒的各比率的变化率 k(%)。

$$[0155] \quad k(\%) = m/n \times 100 \cdots (1)$$

[0156] m = 反应时间为 60 秒时各尺寸白细胞的比率 (%)

[0157] n = 反应时间为 30 秒时各尺寸白细胞的比率 (%)

[0158] (实施例 2)

[0159] 本例中, 使用血细胞比容值为 39.2% 的人类全血作为所述试样, 除此以外与实施例 1 同样地测定白细胞, 算出所述比率以及所述变化率。

[0160] 下述表 2 中示出实施例 1 和实施例 2 中的各白细胞的所述比率以及所述变化率。另外, 表示实施例 1 中的白细胞的粒度分布的直方图用图 3 表示。图 3 之 (A) 为表示反应时间为 30 秒时白细胞的粒度分布的直方图, 图 3 之 (B) 为表示反应时间为 60 秒时白

细胞的粒度分布的直方图，图 3 之 (C) 为表示将所述 2 个直方图重叠的直方图。而且，表示实施例 2 中的白细胞的粒度分布的直方图用图 4 表示。与实施例 1 同样地，图 4 之 (A) 为表示反应时间为 30 秒时白细胞的粒度分布的直方图，图 4 之 (B) 为表示反应时间为 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图，图 4 之 (C) 为表示将所述 2 个直方图重叠的直方图。图 3 之 (C) 和图 4 之 (C) 中，(a) 的实线为反应时间为 30 秒时的直方图、(b) 的实线为反应时间为 60 秒时的直方图。图 3 和 4 的直方图中，横轴为脉冲高度，纵轴为脉冲数。另外，图 3 之 (A)、图 3 之 (B)、图 4 之 (A) 以及图 4 之 (B) 的直方图中，脉冲高度在 a-b 范围的白细胞为所述小尺寸（淋巴细胞），在 b-c 范围的白细胞为所述中尺寸（单核细胞），在 c 以上（c 右侧）的范围的白细胞为所述大尺寸（粒细胞）。

[0161] [表 2]

	实施例 1			实施例 2		
	比率 (%)		变化率 (%)	比率 (%)		变化率 (%)
	反应 30 秒	反应 60 秒		反应 30 秒	反应 60 秒	
[0162] 小尺寸	30.1	31.1	103.4	33.8	34.0	100.7
中尺寸	8.1	9.2	113.2	6.3	6.8	107.4
大尺寸	61.8	59.7	96.6	59.9	59.2	98.8
平均变化率	-	-	104.4	-	-	102.3

[0163] 如图 3 之 (C) 和图 4 之 (C) 所示，两实施例中，反应时间引起的直方图的差异均小，如上述表 2 所示，表示反应时间引起的差异的所述变化率在两实施例中均约为 100%。这样使用含有蔗糖单月桂酸酯的分析试剂时，试样与分析试剂的反应时间引起的测定结果的差异小，可以稳定地测定白细胞。实施例 1 与实施例 2 虽然使用了血细胞比容值不同的全血，但两实施例均得到如上所述的结果，由此可知避免了血细胞比容值的影响，可以稳定地测定白细胞。

[0164] (比较例 1)

[0165] 本例中，使用从所述实施例 1 的分析试剂仅除去蔗糖单月桂酸酯的分析试剂，除此以外与实施例 1 同样地测定白细胞，算出所述比率和所述变化率。

[0166] (比较例 2)

[0167] 本例中，使用血细胞比容值为 39.2% 的人类全血作为所述试样，除此以外与比较例 1 同样地测定白细胞，算出所述比率和所述变化率。

[0168] 比较例 1 和比较例 2 中的所述比率以及所述变化率用下述表 3 表示。另外，表示比较例 1 中白细胞的粒度分布的直方图用图 5 表示。图 5 之 (A) 为表示反应时间为 30 秒时白细胞的粒度分布的直方图，图 5 之 (B) 为表示反应时间为 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图，图 5 之 (C) 为表示将所述 2 个直方图重叠的直方图。而且，表示比较例 2 中白细胞的粒度分布的直方图用图 6 表示。同比较例 1 同样地，图 6 之 (A) 为表示反应时间为 30 秒时白细胞的粒度分布的直方图，图 6 之 (B) 为表示反应时间为 60 秒时白细胞的粒度分布的直方图，图 6 之 (C) 为表示将所述 2 个直方图重叠的直方图。图 5 之 (C) 和图 6 之 (C) 中，(a) 的实线为反应时间为 30 秒时的直方图，(b) 的实线为反应时间为 60 秒时的直方图。图 5 和 6 的直方图中，横轴为脉冲高度、纵轴为脉冲数。另外，图 5

之(A)、图5之(B)、图6之(A)以及图6之(B)的直方图中,与所述同样地,脉冲高度在a-b范围的白细胞为所述小尺寸(淋巴细胞),在b-c范围的白细胞为所述中尺寸(单核细胞),在c以上(c右侧)的范围的白细胞为所述大尺寸(粒细胞)。

[0169] [表3]

	比较例1			比较例2		
	比率(%)		变化率 (%)	比率(%)		变化率 (%)
	反应30秒	反应60秒		反应30秒	反应60秒	
[0170] 小尺寸	28.8	19.9	69.2	33.1	33.7	102.0
中尺寸	1.9	3.8	197.8	7.9	7.0	89.0
大尺寸	69.3	76.3	110.1	59.1	59.3	100.3
平均变化率	-	-	125.7	-	-	97.1

[0171] 比较例1中,如图5之(C)所示,试样和分析试剂的反应时间引起的直方图的差异大,如所述表3所示,变化率不规则地显示为69.2~197.8%,不能稳定地分析白细胞。另一方面,在比较例2内,与比较例1比较,如图6之(C)所示,试样和分析试剂的反应时间引起的直方图的差异小,如所述表3所示,变化率为89.0~102.0%,偏差小,可以稳定地分析白细胞。使用不包含蔗糖单月桂酸酯的分析试剂的比较例1和比较例2在这样的、试样的血细胞比容值不同的情况下,测定结果产生偏差,因此不能稳定地分析白细胞。

[0172] 根据以上结果,即使在稀释率低且流速慢时,如实施例1和2所示,如果使用包含蔗糖单月桂酸酯的分析试剂,则不受血细胞比容值影响,可以稳定地分析白细胞。另一方面,稀释率低且流速慢时,如比较例1和2所示,如果使用不包括蔗糖单月桂酸酯的分析试剂,则受血细胞比容值的影响,测定结果产生偏差,不能稳定地分析白细胞。

[0173] (实施例3)

[0174] 本例中,使用添加了如下表4所示的添加试剂的分析试剂,按照以下步骤,测定白细胞。另外,本例的测定中,使用如图7所示的白细胞分析装置88。所述白细胞分析装置88内包含微孔的区域如图8所示。另外,所述白细胞分析装置88中,所述主槽9的容积约为700 μ L,所述副槽10的容积约为100 μ L,所述定量部15的容积约为300 μ L,所述搅拌槽17的容积约为400 μ L。另外,如图8所示的所述微孔84为直径100 μ m、长度100 μ m的贯通孔。所述电极12和13使用直径1 μ m的白金。所述电极12和13之间使用电压器施加30V的电压。而且,使用设定为30V、5倍增益的放大器,测定所述试样在通过所述微孔84时产生的脉冲(电阻变化)。另外,作为血液试样,使用血细胞比容值为41.6%的人类全血。本例中,用生理盐水(0.9w/v%, Nacalai Tesque制造)将所述人类全血稀释100倍,配制稀释试样。

[0175] (表4)

例	添加试剂名	制造公司名
实施例3-1	蔗糖月桂酸酯	同仁化学研究所公司制造
实施例3-2	蔗糖单月桂酸酯	同仁化学研究所公司制造
实施例3-3	蔗糖单癸酸酯	同仁化学研究所公司制造
[0176] 实施例3-4	十二烷基麦芽糖苷	同仁化学研究所公司制造
比较例3-1	未添加	
比较例3-2	月桂基三甲基氯化铵	Nacalai Tesque制造
比较例3-3	聚氧乙烯月桂基醚 (30%溶液)	
	(商品名: Brig35)	Nacalai Tesque制造

[0177] 首先, 配制如下表 5 所示组成的基本试剂。该表中配合浓度为分析试剂内各成分的浓度。另外, 该表中最终浓度为本例的分析试剂与所述试样混合而成的混合液中的浓度。另外, 使用氯化钠调整所述基本试剂的电导率为 18mS/cm。而且, 向所述基本试剂中添加所述表 4 记载的各添加试剂到 0.1w/v% 的浓度, 配制实施例 3-1 ~ 3-4 以及比较例 3-1 ~ 3-3 的各分析试剂。另外, 本例中实施例 3-1 的分析试剂中添加的所述蔗糖月桂酸酯为包含约 80 ~ 90 体积% 的蔗糖单月桂酸酯 (单酯)、约 10 ~ 20 体积% 的蔗糖二月桂酸酯或蔗糖三月桂酸酯 (二酯或三酯) 的混合物。

[0178] (表 5) 基本试剂

	成分	配合浓度 (mmol/L)	最终浓度 (mmol/L)
[0179]	磷酸缓冲液 (pH7.5)	83	25
	月桂基三甲基氯化铵	43	12.88
	鲸蜡基三甲基氯化铵	2	0.625

[0180] 接下来, 向所述主槽 9 内注入所述稀释试样 350 μ L。通过与所述白细胞分析装置 88 的所述抽吸管 19 连接的所述注射筒 (未图示) 以抽吸速度 400 μ L/秒进行减压 (抽吸), 将所述试样导入到所述搅拌槽 17 内。接下来, 向所述主槽 9 内注入所述各分析试剂 150 μ L。通过所述注射筒, 以喷出速度 400 μ L/秒进行加压 (喷出), 将所述试样导入到所述主槽 9 内。接着, 通过所述注射筒以 400 μ L/秒的速度进行抽吸 350 μ L 接着喷出 350 μ L 的操作共 2 次。由此, 混合所述试样和所述分析试剂。在所述主槽 9 内静置此混合液 1 分钟。另外, 所述混合液中的所述各添加试剂的浓度 (最终浓度) 分别为 0.03w/v%。接下来, 在所述电极 12 和 13 之间施加电压, 通过所述注射筒喷出, 以约 2.8 μ L/秒的速度使所述混合液 300 μ L 从所述主槽 9 向所述副槽 10 移动。用自制的电子检测仪 (未图示), 检测所述试样通过所述微孔 84 时产生的脉冲 (电阻变化)。对脉冲数据进行 7 点移动平均, 将所述移动平均的脉冲高度作为横轴, 将所述移动平均的脉冲数作为纵轴, 制作表示白细胞的粒度分布的直方图。从所述脉冲的高度, 按照小尺寸 (淋巴细胞)、中尺寸 (单核细胞)、大尺寸 (粒细胞) 3 种尺寸将白细胞分类。另外, 所述分类中, 所述小尺寸为接着直方图左端的电噪音峰出现的第一个峰部分, 所述大尺寸为从所述电噪音峰开始计数, 从第二个峰部分到直方图右端为止的部分, 中尺寸为在所述小尺寸峰和所述大尺寸峰之间出现的谷部分。分别累加所述 3 尺寸的脉冲数, 分别算出各自占全脉冲数的比率。

[0181] 图 9、10 以及下表 6 表示使用添加所述表 4 记载的添加试剂的各分析试剂的白细胞的分析结果。图 9 之 (A) ~ (C) 为表示通过使用所述各比较例的分析试剂进行分析得

到的白细胞的粒度分布的直方图。图 9 之 (A) 为表示使用比较例 3-1 (基本试剂) 的分析试剂的分析结果的直方图, 图 9 之 (B) 为表示使用比较例 3-2 (添加有月桂基三甲基氯化铵的分析试剂) 的分析试剂的分析结果的直方图, 图 9 之 (C) 为表示使用比较例 3-3 (添加有聚氧乙烯月桂基醚的分析试剂) 的分析试剂的分析结果的直方图。另外, 图 10 之 (A) ~ (D) 为表示通过使用所述各实施例的分析试剂进行分析得到的白细胞粒度分布的直方图。图 10 之 (A) 为表示使用实施例 3-1 (添加有蔗糖月桂酸酯的分析试剂) 的分析试剂的分析结果的直方图, 图 10 之 (B) 为表示使用实施例 3-2 (添加有蔗糖单月桂酸酯的分析试剂) 的分析试剂的分析结果的直方图, 图 10 之 (C) 为表示使用实施例 3-3 (添加有蔗糖单癸酸酯的分析试剂) 的分析试剂的分析结果的直方图, 图 10 之 (D) 为表示使用实施例 3-4 (添加有十二烷基麦芽糖苷的分析试剂) 的分析试剂的分析结果的直方图。图 9 以及图 10 的直方图中, 横轴为脉冲高度, 纵轴为脉冲数。另外, 所述直方图中脉冲高度在区域 2 的白细胞为所述小尺寸 (淋巴细胞), 在区域 3 的白细胞为所述中尺寸 (单核细胞), 在区域 4 的白细胞为所述大尺寸 (粒细胞)。另外, 区域 1 为所述白细胞以外的血液成分 (噪音), 主要成分例如可列举出红细胞的溶解物。另外, 下述表 6 为通过使用所述各分析试剂进行分析得到的所述各区域的脉冲范围、脉冲数及其比率。

[0182] 如图 9 之 (A) 所示, 比较例 3-1 即未添加非离子表面活性剂的所述基本试剂的所述区域 1 (噪音) 和所述区域 2 (淋巴细胞) 之间的谷小, 所述区域 1 (噪音) 和所述区域 2 (淋巴细胞) 的分离精度低。另外, 如图 9 之 (B) 所示, 添加所述月桂基三甲基氯化铵的比较例 3-2 的分析试剂的所述区域 1 (噪音) 和所述区域 2 (淋巴细胞) 之间的谷小, 且所述区域 4 (粒细胞) 的峰与所述基本试剂相比更小。如图 9 之 (C) 所示, 添加所述聚氧乙烯月桂基醚的比较例 3-3 的分析试剂的所述区域 1 (噪音) 和所述区域 2 (淋巴细胞) 之间的谷小, 且所述区域 2 (淋巴细胞) 的峰小。与此相对, 如图 10 之 (A) ~ (D) 所示, 添加所述蔗糖月桂酸酯、蔗糖单月桂酸酯、蔗糖单癸酸酯以及十二烷基麦芽糖苷的非离子表面活性剂的实施例 3-1 ~ 3-4 的分析试剂, 与所述比较例 3-1 的基本试剂相比, 所述区域 1 (噪音) 和所述区域 2 (淋巴细胞) 之间的谷变大, 所述区域 2 (淋巴细胞) 的峰不减少, 所述区域 4 (粒细胞) 的峰更明确。即通过添加所述非离子表面活性剂, 提高了所述噪音和所述淋巴细胞的分离精度, 且提高了所述粒细胞的分离精度。

[0183] [表 6]

添加试剂	各区域的脉冲(p)的范围 脉冲数 比率			总脉冲数
	区域2 (淋巴细胞)	区域3 (单核细胞)	区域4 (粒细胞)	
比较例 3-1 无 (基本试剂)	975 ≤ p < 2000 3735 28.80%	2000 ≤ p < 3200 2160 54.50%	3200 ≤ p < 9925 7061 54.50%	12956
比较例 3-2 月桂基三甲基 氯化铵	900 ≤ p < 2100 4496 37.50%	2100 ≤ p < 2850 1205 10.10%	2850 ≤ p < 9925 6288 52.40%	11989
比较例 3-3 聚氧乙烯月桂基醚	1250 ≤ p < 3175 4804 40.60%	3175 ≤ p < 3875 831 7.00%	3875 ≤ p < 9925 6204 52.40%	11839
实施例 3-1 蔗糖月桂酸酯	1100 ≤ p < 2750 5121 43.60%	2750 ≤ p < 3450 688 5.90%	3450 ≤ p < 9925 5935 50.50%	11744
实施例 3-2 蔗糖单月桂酸酯	1025 ≤ p < 2400 4559 40.20%	2400 ≤ p < 3275 1063 9.40%	3275 ≤ p < 9925 5706 50.40%	11328
实施例 3-3 蔗糖单癸酸酯	1000 ≤ p < 2400 4498 39.80%	2400 ≤ p < 3275 1248 11.00%	3275 ≤ p < 9925 5563 49.20%	11309
实施例 3-4 十二烷基麦芽糖苷	1000 ≤ p < 2175 4658 40.00%	2175 ≤ p < 2775 885 7.60%	2775 ≤ p < 9925 6112 52.40%	11655

[0184] (实施例 4)

[0186] 本例中, 所述基本试剂中的所述月桂基三甲基氯化铵最终浓度为 12.3mmol/L, 使用在所述表 5 的基本试剂中添加有所述蔗糖月桂酸酯的各分析试剂, 除此以外与实施例 3 同样地测定白细胞。另外, 本例的分析试剂内所述蔗糖月桂酸酯的添加浓度如下表 7 所示。下表 7 中, 最终浓度为所述蔗糖月桂酸酯在混合本例的分析试剂与试样而得到的混合液中的浓度。

[0187] (表 7)

例	蔗糖月桂酸酯	
	添加浓度 (w/v%)	最终浓度 (w/v%)
比较例 4 (基本试剂)	0 (未添加)	0 (未添加)
实施例 4-1	0.0125	0.0038
实施例 4-2	0.025	0.0075
实施例 4-3	0.05	0.015
实施例 4-4	0.1	0.03
实施例 4-5	0.2	0.06

[0188] 图 11 以及下表 8 表示比较例 4 和实施例 4-1 ~ 4-5 中白细胞的分析结果。图 11 之 (A) ~ (F) 为表示通过使用添加了所述规定浓度的所述蔗糖月桂酸酯的分析试剂进行分析而得到的白细胞粒度分布的直方图。图 11 之 (A) 为表示使用比较例 4 (基本试剂) 的分析试剂的分析结果的直方图, 图 11 之 (B) 为表示使用实施例 4-1 的分析试剂的分析结果的直方图, 图 11 之 (C) 为表示使用实施例 4-2 的分析试剂的分析结果的直方图, 图

11 之 (D) 为表示使用实施例 4-3 的分析试剂的分析结果的直方图, 图 11 之 (E) 为表示使用实施例 4-4 的分析试剂的分析结果的直方图、图 11 之 (F) 为表示使用实施例 4-5 的分析试剂的分析结果的直方图。图 11 之 (A) ~ (F) 的直方图中, 横轴为脉冲高度, 纵轴为脉冲数。另外, 所述直方图中, 脉冲高度在区域 2 的白细胞为所述小尺寸 (淋巴细胞), 在区域 3 的白细胞为所述中尺寸 (单核细胞), 在区域 4 的白细胞为所述大尺寸 (粒细胞)。另外, 区域 1 为所述白细胞以外的血液成分 (噪音)。另外, 下述表 8 为通过使用所述各分析试剂进行分析而得到的所述各区域的脉冲范围、脉冲数及其比率。

[0190] 如图 11 之 (A) 所示, 所述比较例 4 的基本试剂的所述区域 1 (噪音) 和所述区域 2 (淋巴细胞) 之间的谷小, 所述区域 1 (噪音) 和所述区域 2 (淋巴细胞) 的分离精度低。与此相对, 如图 11 之 (B) ~ (F) 所示, 利用包含所述蔗糖月桂酸酯的分析试剂, 所述区域 1 (噪音) 和所述区域 2 (淋巴细胞) 之间的谷的高度变低, 所述噪音和所述淋巴细胞的分离精度提高。其中, 所述混合液中所述蔗糖月桂酸酯的最终浓度为 0.0075 ~ 0.06w/v% 时 (该图的 (C) ~ (F)), 该分离精度变得更高, 在 0.03% 时 (该图的 (E)) 最高。

[0191] [表 8]

[0192]

分析试剂 (w/v%)*	各区域的脉冲 (p) 的范围 脉冲数 比率			总脉冲数
	区域 2 (淋巴细胞)	区域 3 (单核细胞)	区域 4 (粒细胞)	
比较例 4-1 (0)	1275 ≤ p < 3500 2015 33.40%	3500 ≤ p < 4225 319 5.30%	4225 ≤ p < 9925 3698 61.30%	6032
实施例 4-1 (0.0038)	1250 ≤ p < 2500 1200 24.60%	2500 ≤ p < 3200 452 9.20%	3200 ≤ p < 9925 3235 66.20%	4887
实施例 4-2 (0.0075)	1250 ≤ p < 2350 1240 22.80%	2350 ≤ p < 3100 595 10.90%	3100 ≤ p < 9925 3604 66.30%	5439
实施例 4-3 (0.015)	1575 ≤ p < 3300 1392 23.60%	3300 ≤ p < 3825 349 5.90%	3825 ≤ p < 9925 4169 70.50%	5910
实施例 4-4 (0.03)	1325 ≤ p < 3250 2268 35.00%	3250 ≤ p < 4000 453 7.00%	4000 ≤ p < 9925 3758 58.00%	6479
实施例 4-5 (0.06)	1475 ≤ p < 3300 2194 35.80%	3300 ≤ p < 3825 490 8.00%	3825 ≤ p < 9925 3437 56.20%	6121

[0193] * 混合液中的蔗糖月桂酸酯最终浓度

[0194] 这样, 通过使用包含具有作为亲水部的糖残基和作为疏水部的脂肪链的非离子表面活性剂的本发明的分析试剂, 例如即使在试样的稀释率低的情况下、或者分析时试样的流速慢的情况下, 也可以稳定地测定所述白细胞。另外, 通过使用本发明的分析试剂, 例如即使为上述的情况, 也能够以高精度进行测定。

[0195] 产业上的可利用性

[0196] 本发明的分析方法, 例如即使在像 μ TAS 等这样稀释率低时、或流速慢的分析

条件下时，也可以稳定地分析白细胞。本发明可以适用于临床检查、生化检查、医学研究等白细胞分析的全部领域，其用途没有限定，可以适用于广泛的领域。

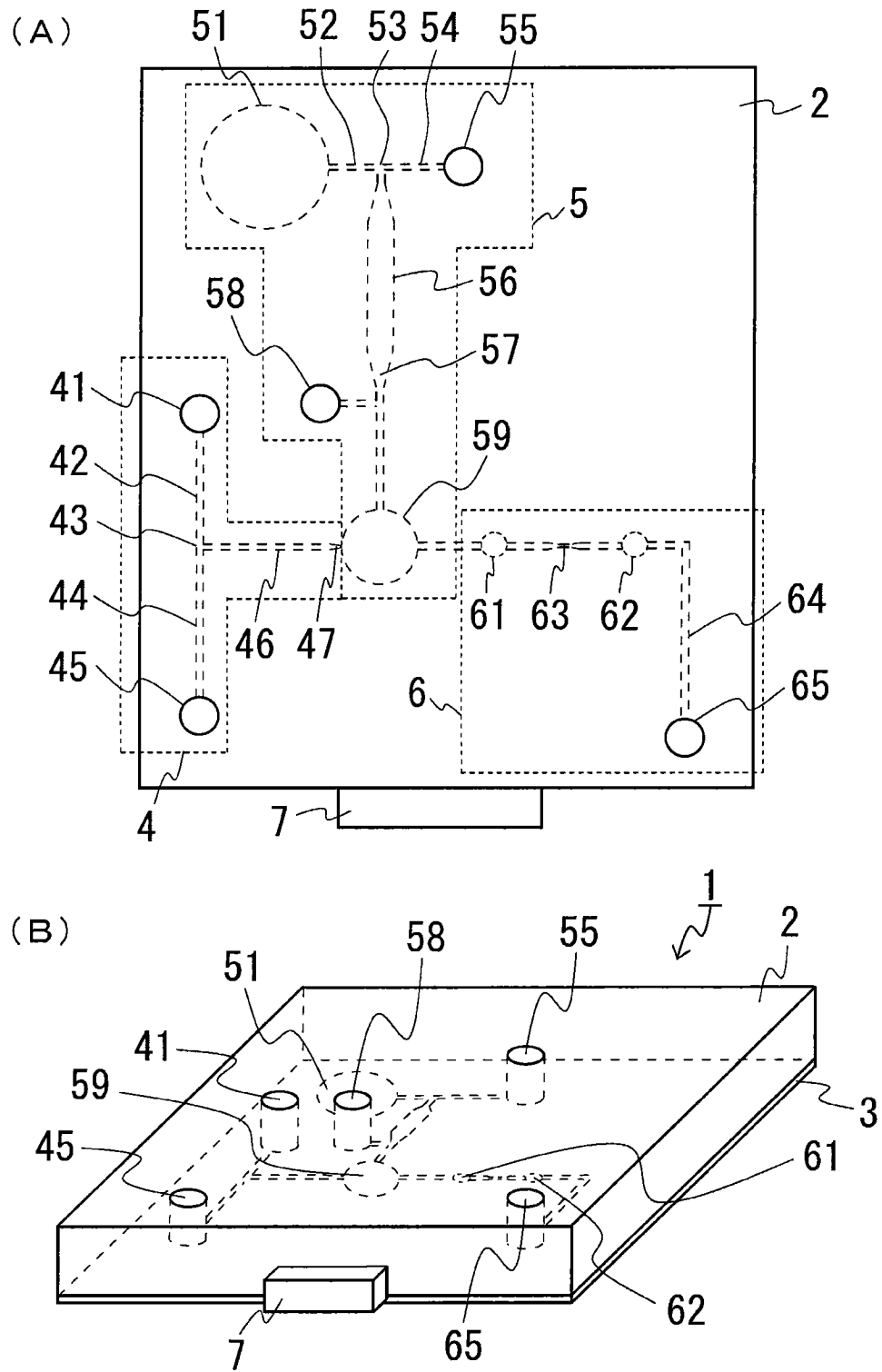


图 1

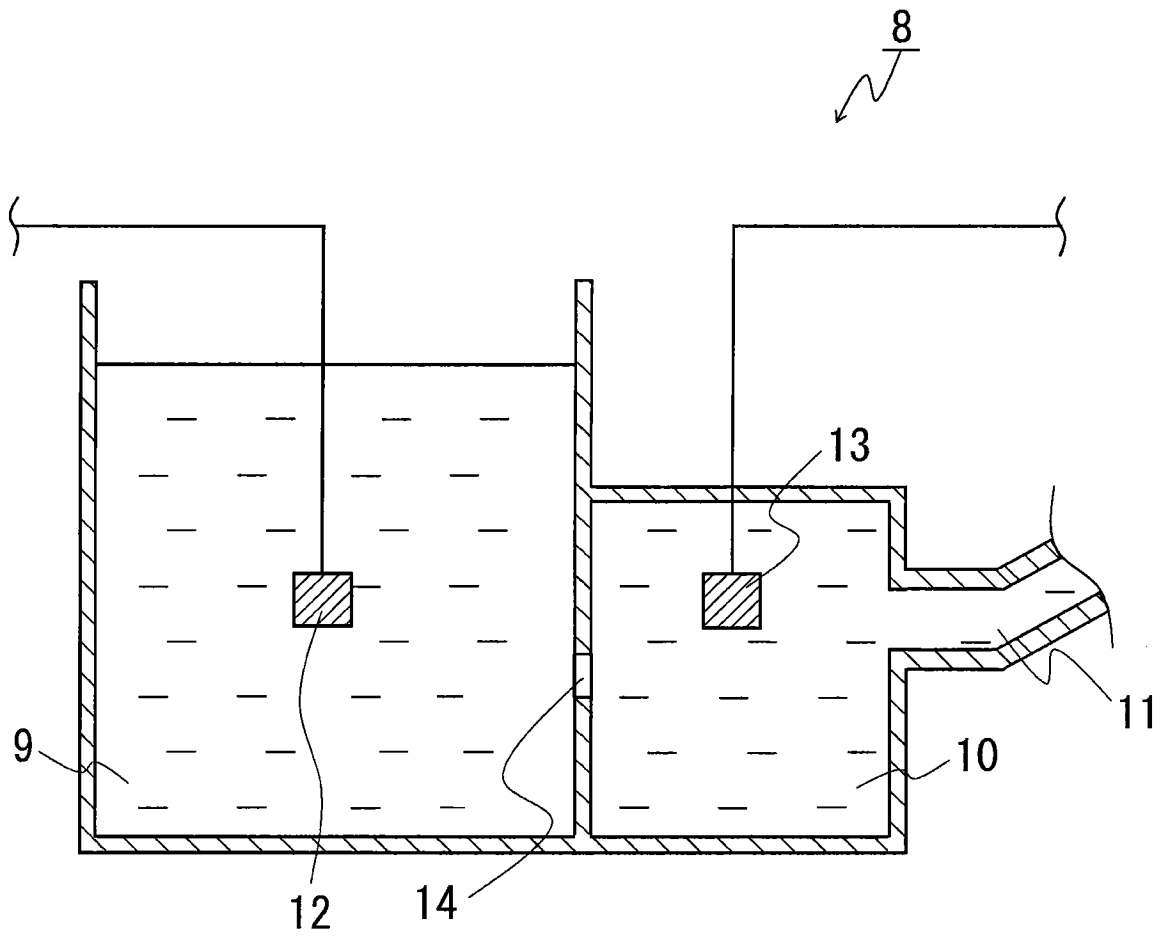


图 2

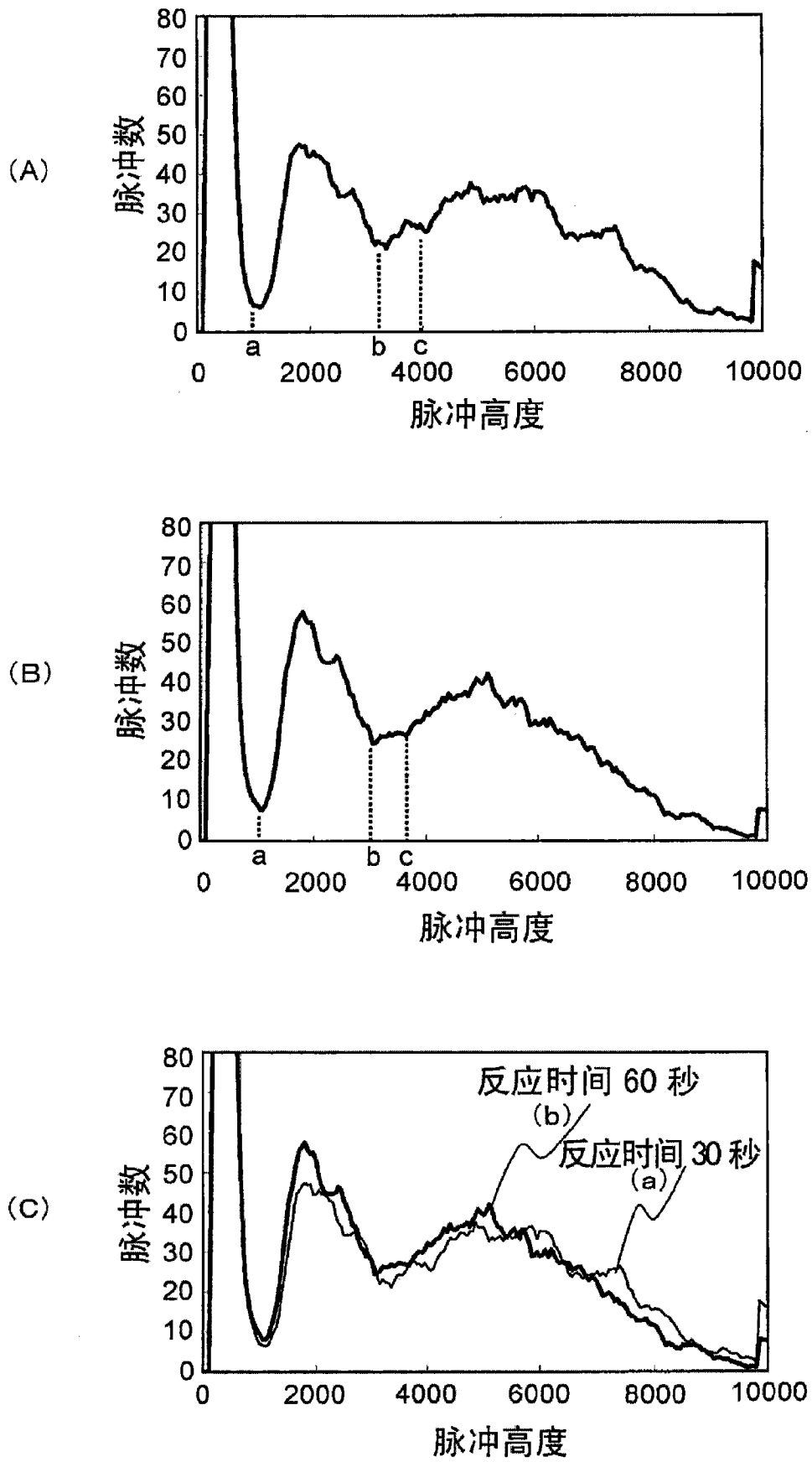


图 3

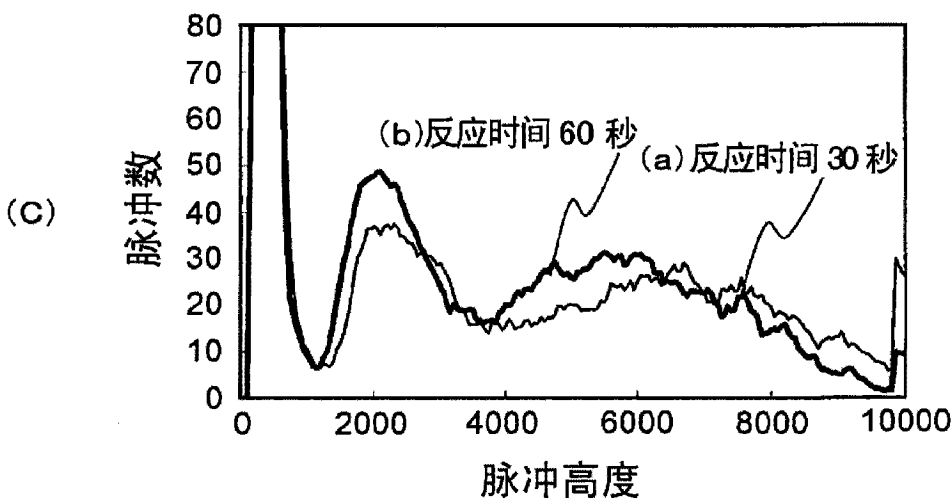
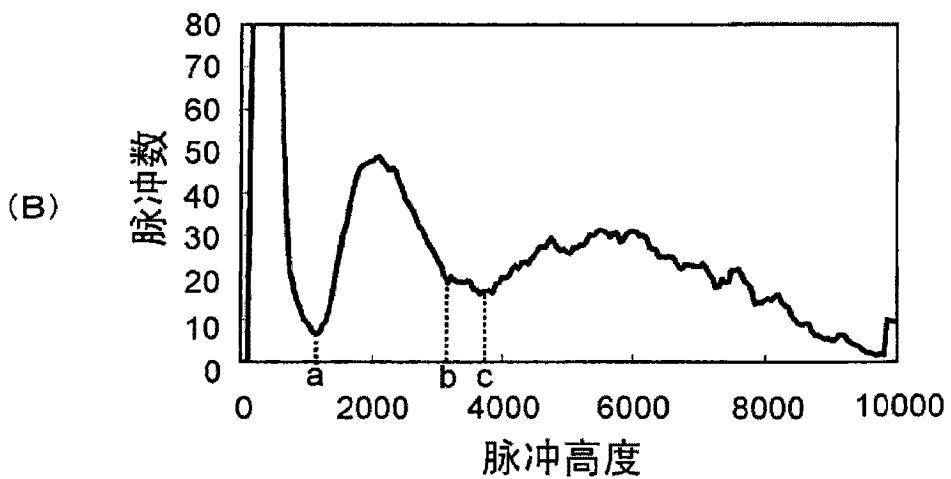
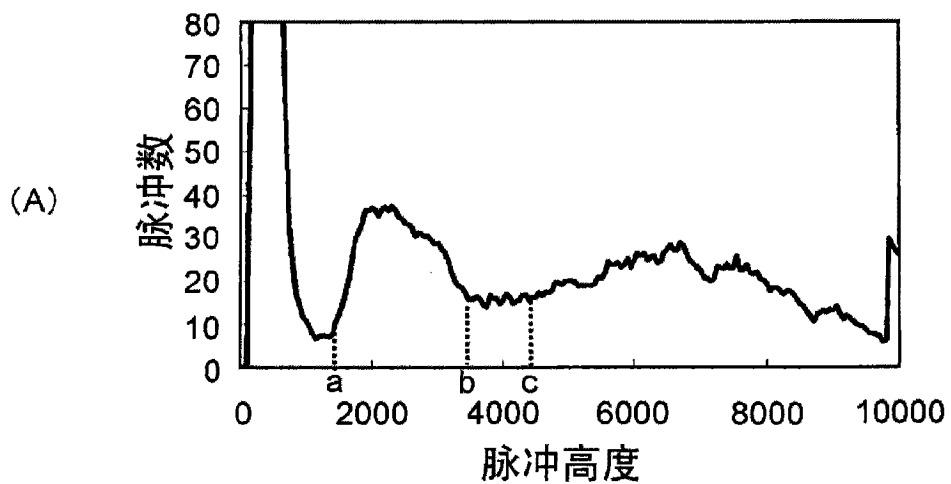


图 4

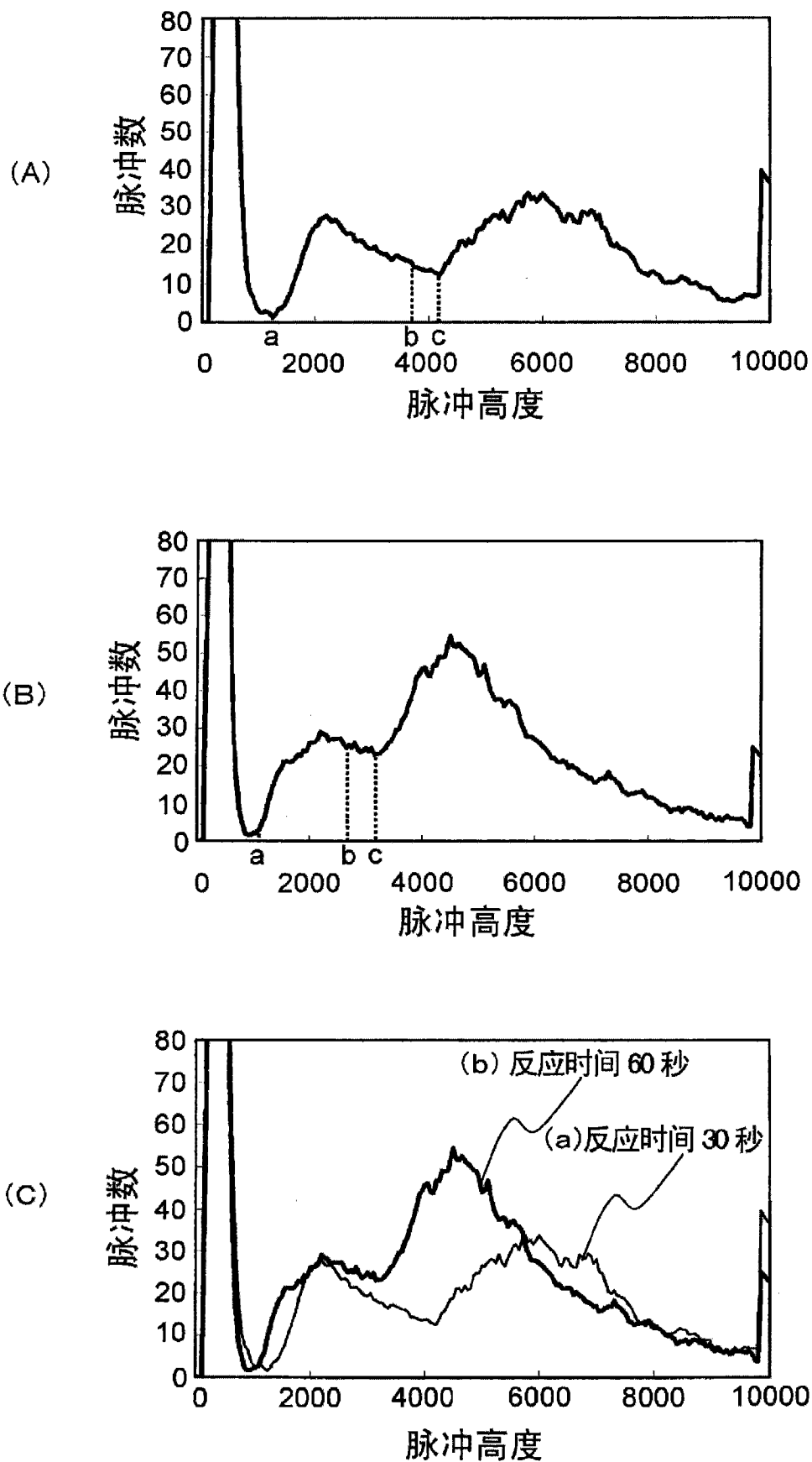


图 5

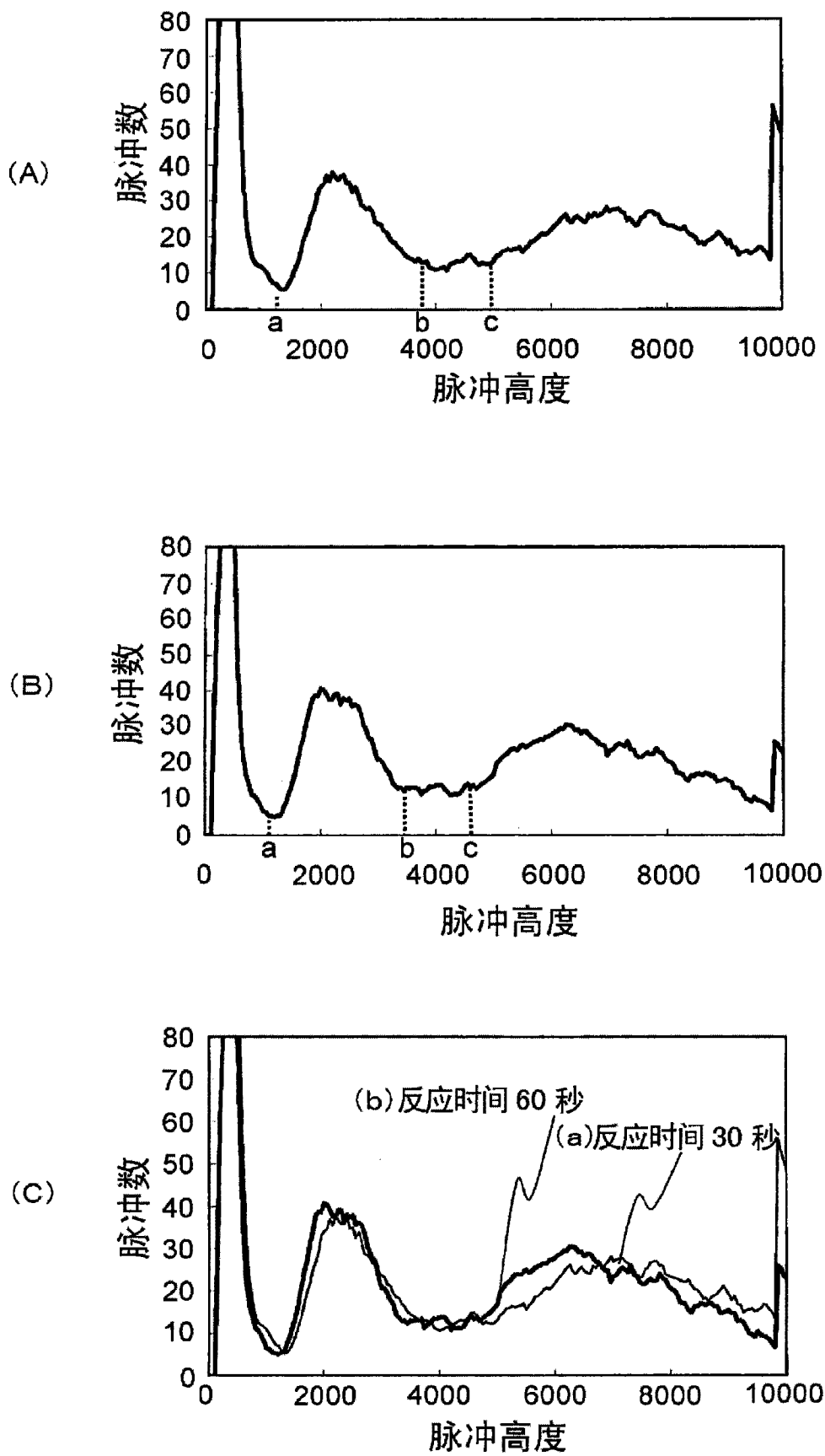


图 6

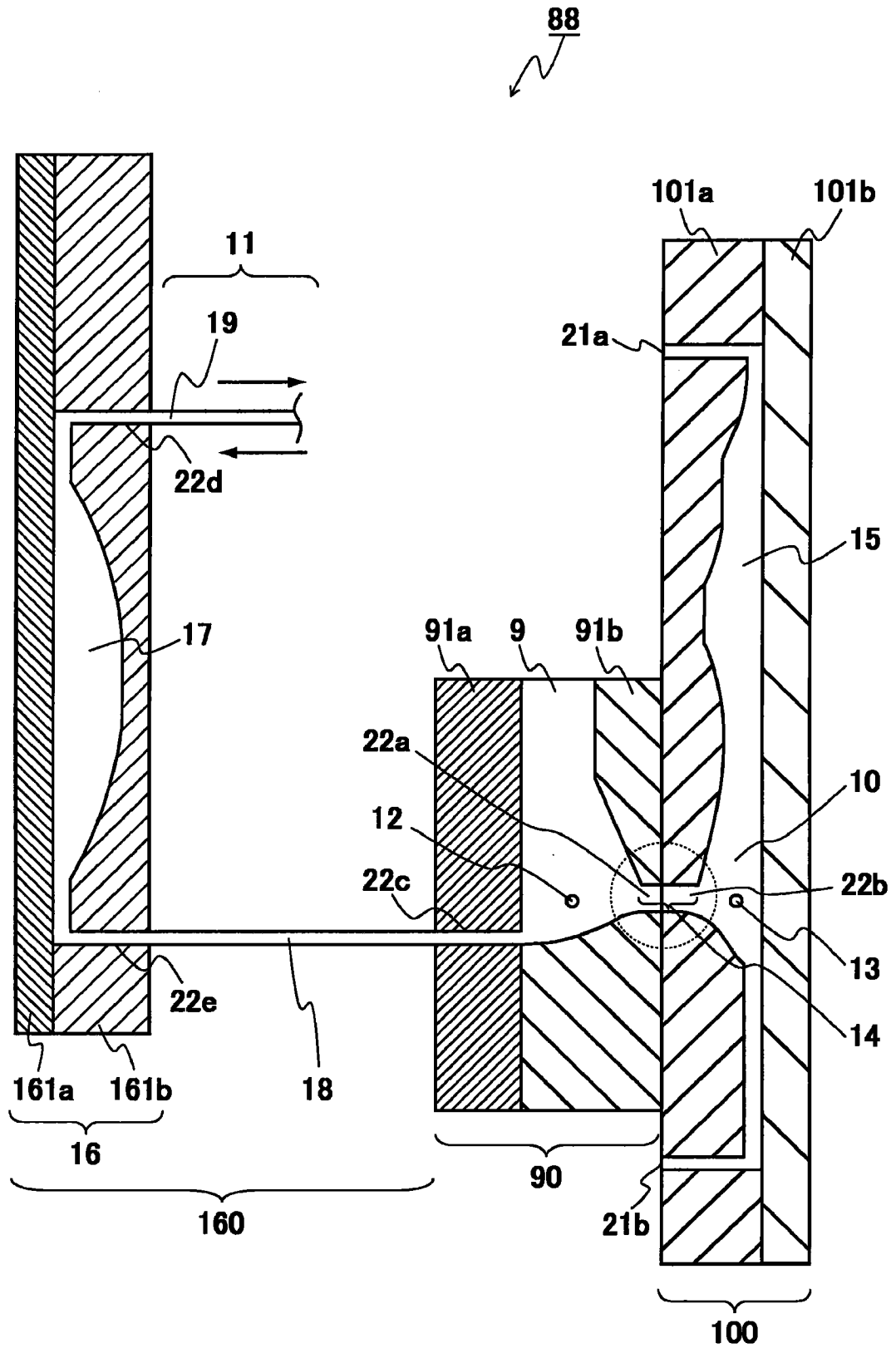


图 7

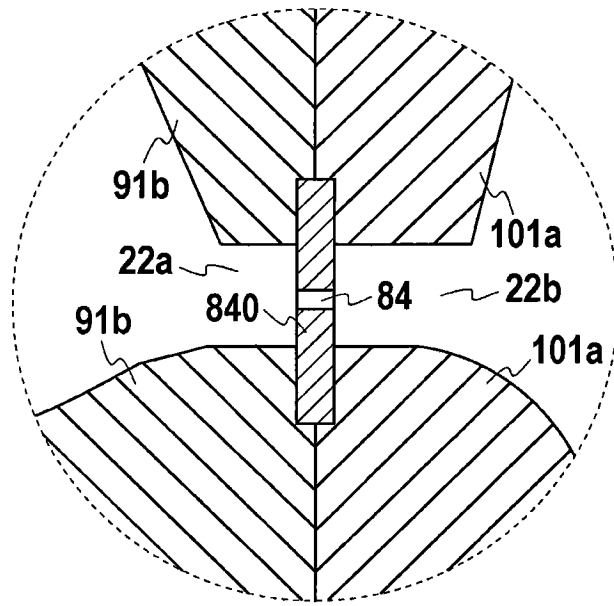


图 8

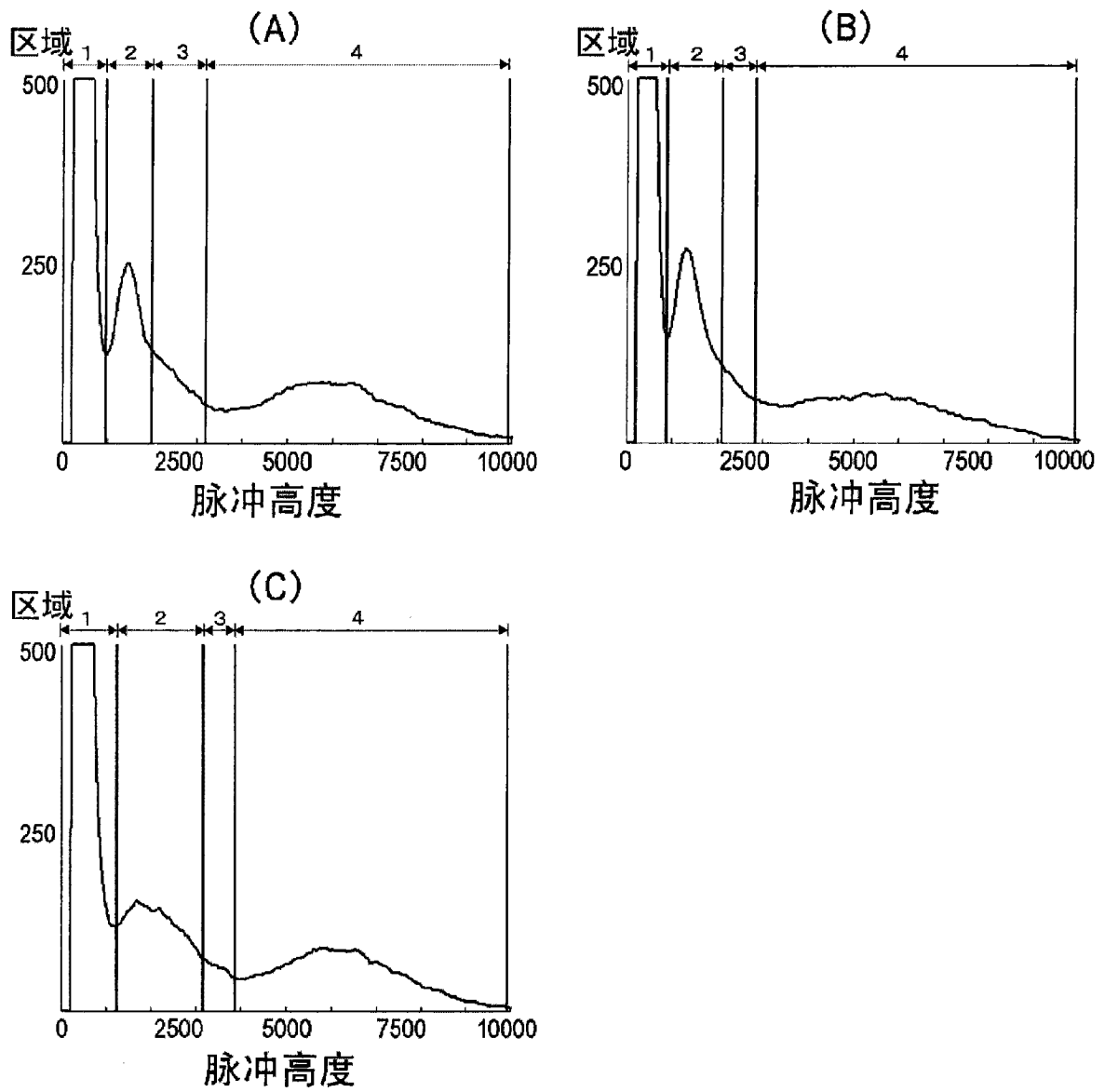


图 9

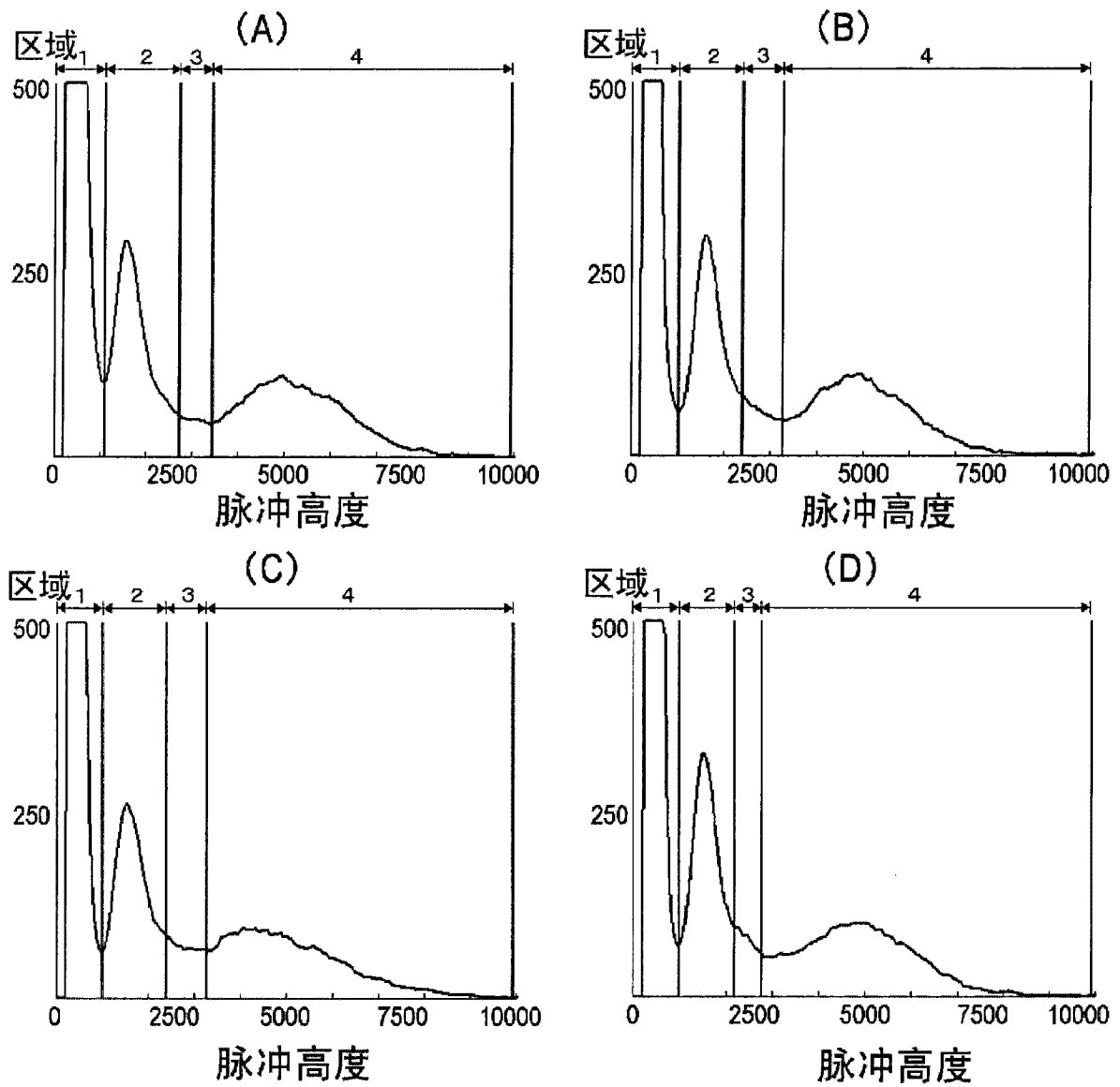


图 10

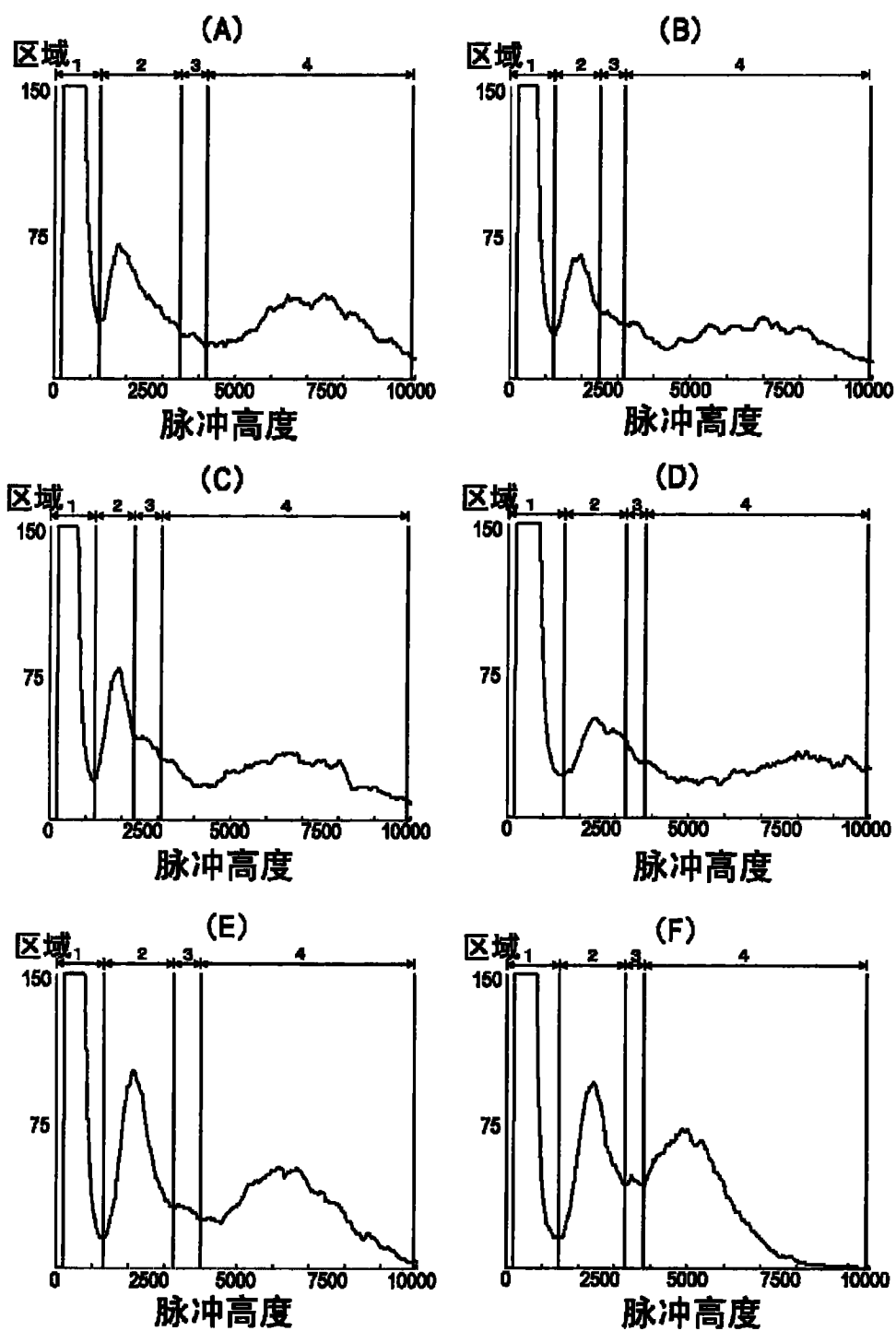


图 11