



(21)申请号 201680039333.2

(22)申请日 2016.07.06

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107949789 A

(43)申请公布日 2018.04.20

(30)优先权数据  
2015-135064 2015.07.06 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.01.02

(86)PCT国际申请的申请数据  
PCT/JP2016/070010 2016.07.06

(87)PCT国际申请的公布数据  
W02017/006965 JA 2017.01.12

(73)专利权人 富士胶片株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 石坂达也 中津川晴康 大泽进  
杉本晋哉

(74)专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127

代理人 庞东成 张志楠

(51)Int.Cl.

G01N 33/48(2006.01)

G01N 1/00(2006.01)

G01N 1/10(2006.01)

G01N 33/49(2006.01)

G01N 33/96(2006.01)

审查员 于园园

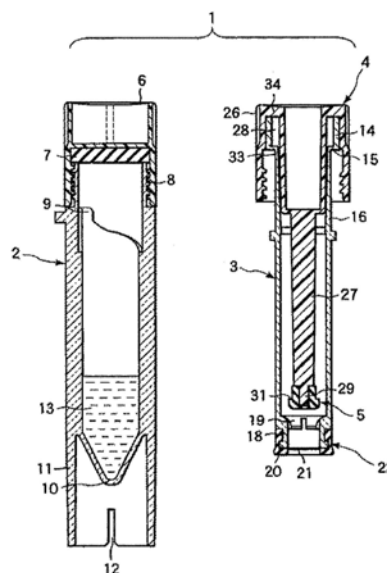
权利要求书2页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

血液分析方法及血液检查试剂盒

(57)摘要

本发明的课题在于提供一种在50  $\mu$ L以下的血液样本中测定值的重复再现性高的血液分析方法及用于在上述血液分析方法中使用的血液检查试剂盒。根据本发明,提供一种血液分析方法,其包括:用稀释液来稀释所采集的血液样本的工序;使用恒久性地存在于血液中的标准成分的标准值来确定稀释倍率的工序;及分析血液样本中的对象成分的浓度的工序,其中,所述血液样本的容量为50  $\mu$ L以下,血液样本中的血浆成分的稀释倍率为14倍以上,稀释液为不含有恒久性地存在于血液中的标准成分的稀释液。



1. 一种血液分析方法,其包括:  
用稀释液来稀释所采集的血液样本的工序;  
使用恒久性地存在于血液中的标准成分的标准值来确定稀释倍率的工序;及  
分析血液样本中的对象成分的浓度的工序,其中,  
所述血液样本的容量为50 $\mu$ L以下,所述血液样本中的血浆成分的稀释倍率为14倍以上,所述稀释液为不含有恒久性地存在于血液中的所述标准成分的缓冲液,  
在所述确定稀释倍率的工序中,使用所述标准成分的测定试剂,测定所述标准成分  
浓度,  
所述标准成分选自包括钠离子及氯离子的组。
2. 根据权利要求1所述的血液分析方法,其在用稀释液来稀释所述所采集的血液样本  
的工序之后,包括从稀释后的血液样本中回收含有血浆成分的试样的工序。
3. 根据权利要求2所述的血液分析方法,其中,  
所述回收工序是使用分离膜的工序。
4. 根据权利要求2或3所述的血液分析方法,其在从所述稀释后的血液样本中回收含有  
血浆成分的试样的工序之后,包括输送所述含有血浆成分的试样的工序。
5. 根据权利要求1至3中任一项所述的血液分析方法,其中,  
恒久性地存在于血液中的所述标准成分是钠离子或氯离子。
6. 根据权利要求1至3中任一项所述的血液分析方法,其中,  
恒久性地存在于血液中的所述标准成分是钠离子或氯离子、和至少另1种标准成分。
7. 根据权利要求6所述的血液分析方法,其中,  
所述至少另1种标准成分是选自总蛋白质或白蛋白的标准成分。
8. 根据权利要求5所述的血液分析方法,其中,  
所述稀释液是不含有钠离子或氯离子的稀释液。
9. 根据权利要求5所述的血液分析方法,其中,  
恒久性地存在于血液中的所述标准成分是钠离子。
10. 根据权利要求9所述的血液分析方法,其中,  
所述稀释液是不含有钠离子的稀释液。
11. 根据权利要求1至3、7至10中任一项所述的血液分析方法,其中,  
所述稀释液是在pH6.5~pH8.0的pH范围具有缓冲作用的缓冲液。
12. 根据权利要求1至3、7至10中任一项所述的血液分析方法,其中,  
所述稀释液包含:选自包括2-氨基-2-甲基-1-丙醇、2-乙基氨基乙醇、N-甲基-D-葡萄糖  
胺、二乙醇胺及三乙醇胺的组中的氨基醇化合物;及选自包括也称作HEPES的2-[4-(2-羟乙  
基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸、也称作TES的N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸、也称作MOPS的  
3-吗啉代丙磺酸及也称作BES的N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸的组中的缓冲剂。
13. 根据权利要求1至3、7至10中任一项所述的血液分析方法,其还包括如下工序:使用  
与所述标准成分不同的标准成分的标准值求出稀释倍率,由该稀释倍率,验证所述对象成  
分浓度的分析。
14. 血液检查试剂盒在权利要求1至3、7至10中任一项所述的血液分析方法中的使用,  
所述血液检查试剂盒包括:

稀释液,用于稀释血液样本;及  
容器,用于容纳稀释后的血液样本。

15. 根据权利要求14所述的试剂盒的使用,其中,  
所述稀释液是不含有钠离子或氯离子的稀释液。

16. 根据权利要求14所述的试剂盒的使用,其中,  
所述稀释液是不含有钠离子的稀释液。

17. 根据权利要求14所述的试剂盒的使用,其中,  
所述稀释液是在pH6.5~pH8.0的pH范围具有缓冲作用的缓冲液。

18. 根据权利要求14所述的试剂盒的使用,其中,  
所述稀释液包含:选自包括2-氨基-2-甲基-1-丙醇、2-乙基氨基乙醇、N-甲基-D-葡萄糖胺、二乙醇胺及三乙醇胺的组中的氨基醇化合物;及选自包括也称作HEPES的2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸、也称作TES的N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸、也称作MOPS的3-吗啉代丙磺酸及也称作BES的N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸的组中的缓冲剂。

## 血液分析及血液检查试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于分析微量的血液样本中的对象成分的血液分析及血液检查试剂盒。

### 背景技术

[0002] 通常,采血中有:普通采血,医生等某些有资格人员使用注射器从静脉采集血液;及自行采血,检查对象将采血针刺入到自身的手指等来采集血液。

[0003] 通过普通采血而采集的血液,以被密封在采集容器中的状态搬运到医疗机构或检查机构,在那里进行检查。在不分离出血球和血浆而搬运血液的情况下,在医疗机构或检查机构,通过离心分离机将血液分离成血球和血浆之后进行检查。并且,在检查对象进行的自行采血中,采集后的血液通过分离膜而分离成血球和血浆,以该分离的状态被输送到检查场所,在那里进行检查。

[0004] 专利文献1中记载有通过自行采血而采集的血液样本的检查方法。具体而言,记载有包括如下工序的活体试样中的应定量成分的定量方法:1) 制备包括含有未定量容量而采集的应定量成分的未知容量的活体试样和含有一定量的指示物的一定量的水性溶液的定量用试样的工序;2) 由含有一定量的指示物的一定量的水性溶液中的指示物浓度( $C_1$ )和定量用试样中的指示物的浓度( $C_2$ )来求出活体试样的稀释倍率( $a$ )的工序;3) 求出定量用试样中的应定量成分的浓度( $Y$ )的工序;及4) 根据由上述2)求出的活体试样稀释倍率( $a$ )和由上述3)求出的定量用试样中的应定量物质的浓度( $Y$ )来确定活体试样中的应定量成分的工序。

[0005] 在专利文献2中记载有如下定量分析法:测定样本中的分析对象成分量,进而,测定除此以外的原本恒久性地存在于样本中的标准成分的量,由该标准成分的量 and 样本中的标准成分的已知浓度来确定样本的量,由该样本量和分析对象成分量来确定样本中的分析对象成分的浓度。

[0006] 并且,在专利文献3中记载有如下方法:使用血液稀释定量器具,从人和动物采集微量血液,将其原样或者在稀释之后将一定量供给到其他机器和容器,或者直接供给到试剂。而且,在专利文献4中记载有如下方法:利用稀释用水溶液中的指示物的吸光度来对生物学的试样中的应定量成分的浓度进行定量。

[0007] 另一方面,当检查对象采集血液样本时,通过具备小型刀的柳叶刀而进行采集,使用于血液中任意成分浓度的定量中,通常,需要采集100 $\mu$ L以上的血液样本。

[0008] 以往技术文献

[0009] 专利文献

[0010] 专利文献1:日本特开2003-161729号公报

[0011] 专利文献2:日本特开2001-330603号公报

[0012] 专利文献3:日本特开2009-122082号公报

[0013] 专利文献4:日本特开2009-109196号公报

## 发明内容

[0014] 发明要解决的技术课题

[0015] 在专利文献1中记载的方法中,血液样本为微量的情况下,需要提高对血液样本量的稀释液的比例。然而,该情况下,由于在稀释血液样本前后稀释液的体积变化率非常小,因此内部标准物质的浓度的变化率小,存在测定值的重复再现性降低的问题。

[0016] 在专利文献2中,将健全者的总血量约100 $\mu$ L滴加于多孔质膜,分离出血球而展开了血清之后,添加150 $\mu$ L的生理等渗PBS (Phosphate-buffered saline (磷酸盐缓冲盐水): pH7.4),将所得到的液体进行离心分离而得到的上清液作为分析试样进行了分析,但关于小于100 $\mu$ L的采血却未记载。

[0017] 在专利文献3的方法中,用微量吸移管准确地采集10 $\mu$ L的血液量进行了分析,但不习惯于采血的患者进行采集的情况下,难以准确地采集一定量,通过包括误差的采血而进行了检查的情况下,其结果,在测定值中包括误差。

[0018] 专利文献4中所记载的测定方法是稀释倍率为10倍左右的测定,在进一步提高稀释倍率而充分地确保稀释血液量的情况下,与专利文献1同样,存在测定值的重复再现性降低的问题。

[0019] 如上所述,关于使用微量的血液样本的情况,正在期待测定值的重复再现性高的血液分析方法。本发明应解决的课题在于提供一种在50 $\mu$ L以下的血液样本中测定值的重复再现性高的血液分析方法和用于在上述血液分析方法中使用的血液检查试剂盒。

[0020] 用于解决技术课题的手段

[0021] 本发明人等为了解决上述课题而经过深入研究的结果,发现在用稀释液来稀释所采集的血液样本,使用恒久性地存在于血液中的标准成分的标准值来确定稀释倍率,分析血液样本中的对象成分的浓度的血液分析方法中,通过构成为,血液样本的容量为50 $\mu$ L以下,血液样本中的血浆成分的稀释倍率为14倍以上,作为稀释液使用不含有恒久性地存在于血液中的上述标准成分的稀释液,能够解决上述课题,并完成了本发明。即,根据本发明可提供以下发明。

[0022] (1) 一种血液分析方法,其包括:

[0023] 用稀释液来稀释所采集的血液样本的工序;

[0024] 使用恒久性地存在于血液中的标准成分的标准值来确定稀释倍率的工序;及

[0025] 分析血液样本中的对象成分的浓度的工序,其中,

[0026] 血液样本的容量为50 $\mu$ L以下,血液样本中的血浆成分的稀释倍率为14倍以上,稀释液为不含有恒久性地存在于血液中的标准成分的稀释液。

[0027] (2) 根据(1)所述的血液分析方法,其在用稀释液来稀释所采集的血液样本的工序之后,包括从稀释后的血液样本中回收含有血浆成分的试样的工序。

[0028] (3) 根据(2)所述的血液分析方法,其中,回收工序是使用分离膜的工序。

[0029] (4) 根据(2)或(3)所述的血液分析方法,其在从稀释后的血液样本中回收含有血浆成分的试样的工序之后,包括输送含有血浆成分的试样的工序。

[0030] (5) 根据(1)至(4)中任一项所述的血液分析方法,其中,恒久性地存在于血液中的标准成分是钠离子或氯离子。

[0031] (6) 根据(1)至(5)中任一项所述的血液分析方法,其中,恒久性地存在于血液中的

标准成分是钠离子或氯离子、和至少另1种标准成分。

[0032] (7) 根据(6)所述的血液分析方法,其中,上述至少另1种标准成分是选自总蛋白质或白蛋白的标准成分。

[0033] (8) 根据(5)所述的血液分析方法,其中,稀释液是不含有钠离子或氯离子的稀释液。

[0034] (9) 根据(5)所述的血液分析方法,其中,恒久性地存在于血液中的标准成分是钠离子。

[0035] (10) 根据(9)所述的血液分析方法,其中,稀释液是不含有钠离子的稀释液。

[0036] (11) 根据(1)至(10)中任一项所述的血液分析方法,其中,稀释液是在pH6.5~pH8.0的pH范围具有缓冲作用的缓冲液。

[0037] (12) 根据(1)至(11)中任一项所述的血液分析方法,其中,稀释液包含:选自包括2-氨基-2-甲基-1-丙醇、2-乙基氨基乙醇、N-甲基-D-葡萄糖胺、二乙醇胺及三乙醇胺的组中的氨基醇化合物;及选自包括也称作HEPES的2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸、也称作TES的N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸、也称作MOPS的3-吗啉代丙磺酸及也称作BES的N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸的组中的缓冲剂。

[0038] (13) 根据(1)至(12)中任一项所述的血液分析方法,其还包括由使用与上述标准成分不同的标准成分的标准值来求出的稀释倍率,验证上述对象成分浓度的分析的工序。

[0039] (14) 一种血液检查试剂盒,其用于在(1)至(13)中任一项所述的血液分析方法中使用,所述血液检查试剂盒包括:稀释液,用于稀释血液样本;及容器,用于容纳稀释后的血液样本。

[0040] 发明效果

[0041] 根据本发明的血液分析方法及血液检查试剂盒,即使血液样本的量少,也能够进行测定值的重复再现性高的分析。

## 附图说明

[0042] 图1表示用于容纳稀释后的血液样本的容器的结构的一例。

## 具体实施方式

[0043] 以下,关于本发明进行详细说明。

[0044] 在进行血液检查的情况下,通过以下方法而获得血液:将采血针插入到受检者的静脉中而采集血液的方法;及在指尖等皮肤上制造伤口,采集向皮肤外部流出的血液的方法。任意的的方法都是损伤皮肤的侵袭性行为,因此会伴有患者的疼痛感。因此,很多患者期待着通过减小对皮肤的损伤以极力抑制侵袭性而减轻患者的疼痛感的方法来进行采血并分析的方法。该情况下,通过减小伤口而减少疼痛感,但是采血量为微量,因此存在导致限制可以检查的对象成分的种类的弊端。欲在专利文献1的检查方法中适用这种方式而解决上述弊端的情况下,通过提高稀释液量相对于采血量的比例,确保足以可以对稀释了血液的稀释液检查需要检查的所有分析对象成分的量。然而,在采血量少的情况下,稀释血液前后稀释液的体积变化率非常小,作为内部标准物质而使用的物质的变化率也非常小,因此测量时的测量误差、测定时的测定误差相对大,因测定精度的劣化、重复再现性的降低等而

有可能损害检查的可靠性。从而,为了测定值的再现性高的检查,需要确保一定程度的血液样本的量,需要对受检者进行伴有一定程度的疼痛感的采血方法。

[0045] 在专利文献2中,采集了约100 $\mu$ L的血液量,但在患者自行采血100 $\mu$ L的血液的情况下,指尖等皮肤上的伤口需要较大,患者会伴有疼痛感,也会有某些人会感觉到较强的疼痛感的情况。并且,因伤口深,而也会有止血缓慢的忧患。而且,在专利文献2中,作为恒定性成分量,使用血液中的恒定性的中心值为0.9mmol/L的镁离子、4.65mmol/L的钙离子、7.5g/100mL的总蛋白质来测定稀释倍率。然而,若患者采集的血液量变少,则稀释液中的恒定性成分的浓度降低,导致在测定恒定性成分时成为包括无法忽视的测定误差的结果。其结果,在稀释倍率的测定值中也包括误差,会损害测定的可靠性。

[0046] 在专利文献3的方法中,对10 $\mu$ L的少量的血液量,用微量吸移管准确地采集一定量进行了分析,但在患者进行采集的情况下,不习惯采血的患者也较多,因此难以始终准确地采集一定量。在患者进行采集的情况下,由于重复进行采血,因此将导致大量的血液量向皮肤外部流出,或者通过包括误差的采血进行了检查的情况下测定值中会包括误差的结果。

[0047] 在专利文献4中公开了利用2波长的光来补正乳糜的影响以提高测定精度的技术,是稀释倍率为10倍左右的测定。专利文献4的方法对所稀释的血液量为100 $\mu$ L以下的分析是有效的,但分析对象成分少,无法应对以获取各种大量的分析对象成分的信息而使用于器官的状态、生活习惯的预测等为目的的检查。该情况下,进一步提高稀释倍率而充分确保稀释血液量的情况下,会面临与专利文献1相同的课题。

[0048] 本发明考虑到上述问题点而进行了研究。根据本发明的血液分析方法及血液检查试剂盒,即使在为了减小采血时的侵袭性来缓解患者的负担而将采集的血液量设为微量的情况下,通过提高稀释倍率也能够实现充分确保了应分析的稀释液量时的再现性良好的稀释倍率,并能够以高精度进行对象成分的分析。在进行采集的血液量为微量,稀释倍率高的情况下,作为稀释液而使用不含有恒久性地存在于血液中的标准成分的稀释液,通过使用上述标准成分的标准值来确定稀释倍率而能够进行测定值的重复再现性高的分析,这是完全无法由现有技术文献所预测到的意外的效果。

[0049] [1]血液分析方法

[0050] 本发明的血液分析方法包括:

[0051] 用稀释液来稀释所采集的血液样本的工序;

[0052] 使用恒久性地存在于血液中的标准成分的标准值来确定稀释倍率的工序;及

[0053] 分析血液样本中的对象成分的浓度的工序,其中,

[0054] 血液样本的容量为50 $\mu$ L以下,血液样本中的血浆成分的稀释倍率为14倍以上,稀释液为不含有恒久性地存在于血液中的上述标准成分的稀释液。

[0055] 在本发明中,对血液样本进行采集,分析血液样本中的对象成分。本发明的血液分析方法,可以通过对象者自身采集血液的自行采血而实施,也可以在医生等有资格人员使用注射器采集血液的普通采血中实施。

[0056] 作为优选的方式,患者本人使用柳叶刀等带刀具的器具对指尖等制造伤口,在皮肤外部采集血液。为了减轻患者的负担,优选降低侵袭性而采集血液,期待在采集血液时能够以无疼痛或疼痛感非常少的状态进行采血,该情况下,优选伤口的深度及大小较小,能够采集的血液也非常少。从而,在本发明的血液分析方法中使用的血液样本的容量(即,采血

量)为50 $\mu$ L以下,优选为40 $\mu$ L以下,更优选为30 $\mu$ L以下,进一步优选为20 $\mu$ L以下,下限并无特别的限定,但通常为了进行血液分析而所需要的血液量优选为5 $\mu$ L以上。在本发明中,即使在血液样本为微量的情况下,也可以以高测定精度来进行对象成分的分析。

[0057] 在本发明中,用稀释液来稀释所采集的血液样本。

[0058] 作为血液检查,在检查肝功能、肾功能、新陈代谢等特定的器官、特定的疾病的情况下,获取器官和疾病所特有的多个测定对象成分的信息,为了进行器官的状态、生活习惯的预测等,通常,同时进行多个对象成分的分析。例如,为了检查肝的状态,通常,测定ALT(丙氨酸氨基转移酶)、AST(门冬氨酸氨基转移酶)、 $\gamma$ -GTP( $\gamma$ -谷氨酰转肽酶)、ALP(碱性磷酸酶)、总胆红素、总蛋白质、白蛋白等几种以上成分在血液中的浓度。如此,若为了由一个血液样本测定多个对象成分而也考虑再次测定的可能性,则需要一定程度的量的被稀释的血液。从而,作为稀释所采集的血液的稀释液,需要使用一定程度的量的稀释液。为了测定多个对象成分,与所采集的血液量无关地,所使用的稀释液的量,优选为250 $\mu$ L以上,更优选为300 $\mu$ L以上,进一步优选为350 $\mu$ L以上,最优选为400 $\mu$ L以上,稀释液的量的上限并无特别的限定,但为了实现测定有效的稀释率,通常,优选为1000 $\mu$ L以下。

[0059] 采集的血液中包含血浆成分和血球成分,但为了测定血浆成分中的对象成分的浓度,优选将从血液中除去血球成分的血浆成分和稀释液进行混合。可以预先从血液中分离出血球成分之后与稀释液进行混合,也可以用稀释液来混合所采集的血液之后,使用分离膜等来分离出血球成分。

[0060] 血液在被稀释的状态下放置长时间的情况下,例如若引起红血球的溶血,则血球内的浓度高的物质和酶等在血浆或血清中溶出,有可能对检查结果造成影响,或者通过色调而测定对象成分的情况下,血红蛋白成分有可能对检查造成影响。从而,在本发明中,也能够在进行从患者所采集的血液中分离出血球而回收血浆的工序之后进行稀释。并且,在本发明中,优选在用稀释液来稀释所采集的血液样本的工序之后,从已稀释后的血液样本中回收含有血浆成分的试样。含有血浆成分的试样是指包含血浆成分和稀释液的试样。该情况下,能够将上述所回收的含有血浆成分的试样输送至例如检查场所。

[0061] 从血液分离出血球而回收血浆的方法、以及从已稀释的血液分离出血球而回收含有血浆成分的试样的方法并无特别的限制。可以,用放入抗凝血剂的采血管进行采血之后进行离心分离,从而将血液分离成血球成分和血浆成分,也可以对血液成分施加压力,使其通过过滤膜等分离膜,使分离膜捕捉到血球成分,从而从血液中分离出血球成分。该情况下,可以使用抗凝血剂。回收血浆成分的工序在上述中也优选为使用分离膜的工序。并且,为了确保测定精度,优选与除去血球成分的血液的溶液部分进行物理隔离,该情况下,具体而言,能够使用在日本特开2003-270239号公报中记载的具有防反流构件的活体试样分离器具等。

[0062] 在本发明中,优选采集侵袭性低的血液,重要的是由微量的血液样本制备血液的稀释液,要求用稀释液来稀释所采集的血液时的、血液样本中的血浆成分的稀释倍率高。在此,所谓的稀释倍率是从血液成分中除去血球成分的血浆成分的稀释倍率,本发明中的稀释倍率为14倍以上,优选为17倍以上,更优选为21倍以上,进一步优选为25倍以上,尤其优选为30倍以上,最优选为40倍以上,上限并无特别限定,但为了可以进行高精度的测定,通常,优选为100倍以下。在用稀释液来稀释实际的血液时的血液的稀释倍率中,即使为从6倍



以上的高倍率,用稀释液进行了稀释的情况下的稀释倍率测定的重复再现性也良好,为了减少患者进行采血时的疼痛感而减少采血量,因此作为血液的稀释倍率,优选为8倍以上,更优选为10倍以上,进一步优选为13倍以上,最优选为18倍以上,上限并无特别的限定,但为了可以进行高精度的测定,通常,优选为50倍以下。

[0063] 如上所述,关于血浆成分的稀释倍率高的稀释血浆的稀释后的对象成分,为了准确地分析在稀释前的血液的血浆中存在的浓度,在由预先存在于稀释液中的物质的浓度的变化率求出的方法中,因浓度变化的比例非常小而测定误差大,并且存在测定的再现性变差的弊端。从而,在本发明中,为了提高测定精度,使用恒久性地存在于血液中的标准成分的标准值来确定稀释倍率。另外,恒久性地存在于血液中的标准成分也称作外部标准物质。

[0064] 恒久性地存在于血液中的标准成分,可以举出钠离子、氯离子、钾离子、镁离子、钙离子、总蛋白质及白蛋白等。血液样本的血清及血浆中所包含的这些标准成分的浓度为如下:钠离子浓度为134~146mmol/升(平均值:142mmol/升)、氯离子浓度为97~107mmol/升(平均值:102mmol/升)、钾离子浓度为3.2~4.8mmol/升(平均值:4.0mmol/升)、镁离子浓度为0.75~1.0mmol/升(平均值:0.9mmol/升)、钙离子浓度为4.2~5.1mmol/升(平均值:4.65mmol/升)、总蛋白质浓度为6.7~8.3g/100mL(平均值:7.5g/100mL)、白蛋白浓度为4.1~5.1g/100mL(平均值:4.6g/100mL)。在本发明中,用于使在为了缓解患者的疼痛感而采集的血液量非常少的情况下的对象成分的测定成为可能,在用稀释液来稀释微量的血液时,需要以高精度测定存在于稀释液中的“恒久性地存在于血液中的标准成分”的浓度。若稀释倍率变高,则原来血液中所存在的成分的稀释液中的浓度降低,根据稀释倍率,在测定浓度时有可能包括测定误差。从而,在这些“恒久性地存在于血液中的标准成分”中,将微量的血液成分稀释成稀释倍率高时,能够以充分高的精度检测上述标准成分,因此优选测定在微量的血液中以高浓度存在的标准成分。在本发明中,恒久性地存在于血液样本中的成分中,优选使用以高浓度存在的钠离子( $\text{Na}^+$ )或氯离子( $\text{Cl}^-$ )。在本发明中,上述恒久性地存在于血液中的标准成分中,最优选测定存在于血液中的量最高的钠离子。钠离子的平均值表示标准值(基准范围的中央值),该值为142mmol/升,占血浆中的总阳离子的90%以上。

[0065] 在作为患者的受检者的血液中血浆成分的占有率以容积的比率计约为55%,但因受检者的盐分摄取量的变化等变动,并且,按每一个受检者也不同。因此,在本发明中,使用恒久性地存在于血液中的标准成分的标准值来确定稀释倍率,并使用所确定的稀释倍率来分析血液样本中的对象成分的浓度。作为确定稀释倍率的方法,由血浆的稀释液中的外部标准物质(例如钠离子等)的测定值(浓度X)和血浆中的上述外部标准物质(例如钠离子等)已知浓度值(浓度Y;钠离子的情况下为142mmol/升)来算出血液样本中的血浆成分的稀释倍率( $Y/X$ ),从而能够求出稀释倍率。使用该稀释倍率来测定血浆的稀释液中的对象成分的测定值(浓度Z),通过在该测定值上乘以稀释倍率而可以测定实质上包含于血液样本中的分析对象成分的浓度 $[Z \times (Y/X)]$ 。

[0066] 并且,为了验证血液中的分析对象成分的浓度分析是否正常地进行,优选将恒久性地存在于血液中的不同的2种以上的成分作为标准成分而使用,分别独立地求出血液样本中的血浆成分的稀释倍率,确认其值是否一致。一致是指在2个测定值(a,b)中,其差值相对于其平均值的比例,即 $|a-b|/\{(a+b)/2\} \times 100$ 为20%以下,优选为10%以下,更优选为5%以下。作为优选方式之一,确认由除了钠离子以外恒久性地存在于血浆中的标准成分求

出的稀释倍率与由钠离子浓度求出的稀释倍率是否一致,由此可以验证使用由血浆的稀释液中的钠离子浓度的测定值求出的稀释倍率来进行的血液中的分析对象成分的浓度分析是否正常地进行。氯离子的测定法有使用了离子选择电极的电极法(Ion Selective Electrode:ISE)、使用淀粉酶等酶的酶法、硝酸银滴定法等,根据测定试样的特性和灵敏度、试样量等能够适当地选择所使用的方法。并且,作为除了钠离子及氯离子以外的恒久性地存在于血浆中的标准成分的例子,优选选自总蛋白质或白蛋白,更优选选自总蛋白质,作为总蛋白质的测定法,有双缩脲法、紫外吸收法、考马斯亮蓝法(Bradford法)、劳里法、二辛可宁酸法(Bicinchoninic Acid:BCA)法、荧光法等公知的方法,根据测定试样的特性和灵敏度、试样量等,能够适当地选择使用方法。

[0067] 钠离子浓度及氯离子浓度能够通过例如火焰光度法、玻璃电极法、滴定法、离子选择电极法及酶活性法等而测定。

[0068] 在本发明中,分析血液样本中的对象成分的浓度是指,包含:确定对象成分的浓度(即,对于对象成分进行定量);或者确定对象成分的浓度为规定的基准值以上,还是规定的基准值以下;及进行检测是否包含一定程度的浓度的定性等,分析方式并无特别的限定。

[0069] 在本发明中,用稀释液来稀释恒久性地存在于血液中的标准成分(以下,也称作恒定性物质)之后进行测定,如上所述确定稀释倍率,从而能够分析血液样本中的对象成分的浓度。用于稀释血液样本的稀释液是不含有为了求出稀释倍率而使用的“恒久性地存在于血液中的标准成分”的稀释液。在本说明书中,“不含有”是指“实质上不含有”。在此,“实质上不含有”是指完全不含有求出稀释倍率时使用的恒定性物质,或者即使含有,也以对稀释了血液样本之后的稀释液的恒定性物质的测定不带来影响的程度的极微量的浓度含有的情况。作为恒定性物质而使用钠离子或氯离子的情况下,作为稀释液,使用实质上不含有钠离子或氯离子的稀释液。

[0070] 在本发明中,在将患者所采集的血液样本进行稀释之后,能够输送到医疗机构或检查机构而分析对象成分的浓度。从采血到分析可能需要长时间,因此,该期间,优选在血液的稀释液中防止对象成分进行分解和改性。健全者的血液的pH通常以pH7.30~7.40程度保持为恒定。从而,为了防止对象成分进行分解和改性,稀释液优选为在pH6.5~pH8.0、优选在pH7.0~pH7.5、进一步优选在pH7.3~pH7.4的pH范围具有缓冲作用的缓冲液,稀释液优选为含有抑制pH的变动的缓冲成分缓冲液。

[0071] 作为缓冲液的种类,已知有乙酸缓冲液(Na)、磷酸缓冲液(Na)、柠檬酸缓冲液(Na)、硼酸缓冲液(Na)、酒石酸缓冲液(Na)、Tris(三(羟甲基)氨基乙烷)缓冲液(C1)、HEPES([2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸])缓冲液、磷酸缓冲生理盐水(Na)等。其中,作为pH7.0~pH8.0附近的缓冲液,具代表性的有磷酸缓冲液、Tris缓冲液、HEPES缓冲液。然而,磷酸缓冲液含有磷酸的钠盐,Tris缓冲液的解离pKa(Ka为酸解离常数)为8.08,因此为了使其在pH7.0~pH8.0附近具有缓冲能力,通常,与盐酸组合而进行使用,HEPES的磺酸的解离的pKa为7.55,但为了调整离子强度恒定的缓冲溶液,通常,使用氢氧化钠、氯化钠及HEPES的混合物,由此,它们作为具有将pH保持为恒定的作用的缓冲液是有用的,但由于含有优选作为外部标准物质而使用的物质的钠离子或氯离子,因此不优选适用于本发明。

[0072] 作为在本发明中使用的稀释液,优选使用不含有钠离子或氯离子的缓冲液。在本发明中使用的稀释液,优选包含:选自包括2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)、2-乙基氨基乙醇、

N-甲基-D-葡萄糖胺、二乙醇胺及三乙醇胺的组中的至少1种氨基醇化合物；及选自包括Good's缓冲液(Good's buffer)中pKa为7.4附近的缓冲剂即也称作HEPES的2-[4-(2-羟乙基)-1-哌嗪基]乙烷磺酸(pKa=7.55)、也称作TES的N-三(羟甲基)甲基-2-氨基乙烷磺酸(pKa=7.50)、也称作MOPS的3-吗啉代丙磺酸(pKa=7.20)及也称作BES的N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙烷磺酸(pKa=7.15)的组中的缓冲剂。上述中优选2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)与HEPES、TES、MOPS或BES的组合,而且,最优选2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP)与HEPES的组合。

[0073] 为了制备上述缓冲液,将氨基醇和Good's缓冲液以1:2~2:1、优选以1:1.5~1.5:1、进一步优选以1:1的浓度比进行混合即可。缓冲液的浓度不受限定,但氨基醇或Good's缓冲液的浓度为0.1~1000mmol/L,优选为1~500mmol/L,进一步优选为10~100mmol/L。

[0074] 在缓冲液中,以稳定地保持分析对象成分为目的可以含有螯合剂、表面活性剂、抗菌剂、防腐剂、辅酶、糖类等。作为螯合剂,可以举出乙二胺四乙酸盐(EDTA)、柠檬酸盐、草酸盐等。作为表面活性剂,可以举出例如阳离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、两性表面活性剂或非离子表面活性剂。作为防腐剂,例如可以举出叠氮化钠和抗生物质等。作为辅酶,可以举出磷酸吡哆醛、镁及锌等。作为红血球稳定剂的糖类,甘露糖醇、葡萄糖、低聚糖等。尤其,通过添加抗生物质,能够抑制手指采血时从手指表面混入的一部分细菌的增殖,并能够抑制因细菌而产生的活体成分的分解,从而实现活体成分的稳定化。

[0075] 血液样本中使用全部血的情况下,需要用过滤器对稀释血液中的血球成分进行过滤,因此将缓冲液的渗透压设为与血液相等(285mOsm/kg(mOsm/kg为在溶液的水1kg所具有的渗透压,表示离子的毫摩尔数))或血液以上,由此能够防止血球的溶血。渗透压能够通过不影响对象成分的测定、及恒久性地存在于血液中的标准成分的测定的盐类、糖类或缓冲剂等而调整为等渗。

[0076] 本发明中的分析对象成分并无限定,血液中所包含的所有物质成为对象。例如可以举出临床诊断中使用的血液中的生物化学检查项目、肿瘤标志和肝炎的标志等各种疾病的标志等,可以举出蛋白质、糖、脂质、低分子化合物等。并且,测定时不仅物质浓度成为对象,而且酶等具有活性的物质的活性也成为对象。各对象成分的测定能够通过公知的方法而进行。

[0077] [2]血液检查试剂盒

[0078] 本发明的血液检查试剂盒是包括用于稀释血液样本的稀释液和用于容纳被稀释后的血液样本的容器的、用于在上述本发明的血液分析方法中使用的血液检查试剂盒。

[0079] 从不易破损、卫生方面及价格等观点考虑,容器的材料优选为合成树脂。可以举出例如聚乙烯、聚丙烯、聚氯乙烯、聚偏氯乙烯、聚苯乙烯、聚乙酸乙烯酯、聚氨酯、聚乙烯对苯二甲酸酯、聚乳酸、丙烯腈丁二烯苯乙烯树脂(ABS树脂)、丙烯腈-苯乙烯树脂(AS树脂)、丙烯酸树脂(PMMA)、聚碳酸酯、硅酮树脂及硅橡胶等。

[0080] 作为本发明的血液检查试剂盒的一例,能够具备:用于稀释血液样本的稀释液;容纳有稀释液的第一容纳器具;用于从通过稀释液而被稀释后的血液样本中分离并回收血浆的分离器具;用于保持分离器具的保持器具;用于容纳已回收血浆的第二容纳器具;及用于使已容纳血浆维持在第二容纳器具内的密封器具;在皮肤上制造伤口以使血液渗出到皮肤外部的针或柳叶刀、贴在伤口上的创可贴或消毒部件(例如浸渍异丙醇(70质量%异丙醇等)或乙醇等的无纺布)、操作说明书等。

[0081] 作为用于稀释血液样本的稀释液,在本说明书中能够使用上述稀释液。

[0082] 第一容纳器具及第二容纳器具可以将1个器具兼用作第一容纳器具及第二容纳器具,也可以是具备不同的器具的方式。为了使患者或进行稀释倍率的测定和分析对象成分的分析的测定者,可以确认稀释了容纳器具内的血液的稀释液,第一容纳器具及第二容纳器具优选由透明的原材料来制成。另外,本发明中所说的透明,只要是以观测人员能够确认内部液体量的程度透明即可,是包括半透明等的概念。

[0083] 作为用于分离血浆的分离器具,优选为分离膜的方式,更优选具有可以分离出血球成分的细孔的过滤器。保持分离器具的保持器具,优选为垫圈的方式。并且,作为密封器具,在容纳器具为筒形状的器具等的情况下,能够使用可以盖住开口的顶盖、具有螺旋状槽的盖或者橡胶塞子等。

[0084] 在本发明中,优选如下试剂盒:即使为微量的血液即50 $\mu$ L以下的采血量,也可以实现能够以较高的测定精度来分析分析对象的方法,且包括记载有即使是50 $\mu$ L以下的较少的采血量,也可以对患者以高精度进行测定的信息的操作说明书。

[0085] 关于容纳有稀释液的第一容纳器具、用于从用稀释液来稀释后的血液样本中分离并回收血浆的分离器具、用于保持分离器具的保持器具、用于容纳已回收血浆的第二容纳器具及用于使已容纳血浆维持在第二容纳器具内的密封器具,作为其具体的结构例,能够使用例如日本专利第3597827号公报的图1至图13中所记载的器具。将日本专利第3597827号公报的图1作为本申请的图1而引用。

[0086] 血液分离器具1具备采血容器2(容纳有稀释液的第一容纳器具)、可嵌插于采血容器2中的筒体3(用于容纳已回收血浆的第二容纳器具)、可以盖装于筒体3上的顶盖活塞4、设置于顶盖活塞4的下端的密封盖5(密封器具),使用之前,如图1所示,采血容器2的上端开口部通过顶盖6隔着密封件7而被封闭。本发明中的用于容纳被稀释后的血液样本的容器在图1的结构中对应于采血容器2和筒体3的组合。即,用于容纳被稀释后的血液样本的容器可以是1个,也可以是2个以上的组合。

[0087] 采血容器2以透明的材质制成且呈圆筒状,其上端部在外表面形成有螺纹部8,内表面上突出设置有卡止部9。并且,在采血容器2的下端部形成有倒圆锥状底部10,在底部10的周围形成有圆筒状腿部11。腿部11具有与分析 and 检查血液时使用的样品杯相同的外径,优选在其下端的对置的位置分别沿铅垂方向形成有狭缝槽12。而且,如图1所示,在采血容器2内也可以预先放入有所需要量例如500mm<sup>3</sup>的稀释液13。

[0088] 筒体3由透明的材质制成且呈圆筒状,其上端部上形成有扩径部14。扩径部14经由薄壁部15而与主体部16连接。筒体3的下端部形成有缩径部18,在缩径部18的内表面形成有卡止突起部19。而且,在缩径部18的下端部形成有外锲部20(保持器具),外锲部20的下端开口部通过过滤膜21(分离器具)而被覆盖,过滤膜21容许血液中的血浆的通过,并阻止血球的通过。

[0089] 缩径部18的外周装配有硅橡胶制罩22(图1)。

[0090] 顶盖活塞4由大致呈圆筒状的握持部26、与握持部26为同心且向下方延伸的芯棒部27构成。在握持部26的内侧上端部形成有筒体3的扩径部14可以嵌合的圆筒状的空间28,并且,其下方被螺刻,可以与螺纹螺合。芯棒部27其下端部29形成为销状,在下端部29可装卸地设置有密封盖5(参考图1)。密封盖5为硅橡胶制密封盖。

[0091] 基于上述器具的血液分离方法的详细内容记载于日本专利第3597827号公报的0023~0026段落以及图12及图13中,该内容被引用于本说明书中。

[0092] 本发明的血液检查试剂盒中所包含的各要件的个数并无特别的限定,可以为1个,也可以是2个以上的多个。

[0093] 本发明的血液检查试剂盒,作为能够将用于稀释血液样本的稀释液、用于容纳被稀释后的血液样本的容器及还根据期望将上述任意的要件收纳于收纳它们的收纳容器的方式而提供。

[0094] 通过以下实施例对本发明进行说明,但本发明并不受实施例的限定。

[0095] 实施例

[0096] (参考例1)

[0097] 1. 稀释了微量血液样本的稀释液的制备

[0098] 由作为志愿者的患者进行知情同意之后,采血管中获取了用注射器从静脉采集的7mL的血液。从该所采集的血液,分别各10次用微量吸移管准确地称量80 $\mu$ L、60 $\mu$ L、40 $\mu$ L、30 $\mu$ L、20 $\mu$ L,分别混合到如下制备的360 $\mu$ L的稀释液-1中。使所得到的混合物通过过滤器而分离出血球成分,从而得到了稀释血浆。将所得到的稀释血浆作为试样,使用生物化学自动分析装置测定了活体成分的各浓度。

[0099] (稀释液-1的组成)

[0100] 按以下组成制备了稀释液-1。渗透压表示使用OSMOATAT OM-6040 (ARKRAY, Inc. 制造)而测定的值。渗透压的单位是溶液的水1kg所具有的渗透压,表示离子的毫摩尔数。

[0101] HEPES 50mmol/L

[0102] 2-氨基-2-甲基-1-丙醇(AMP) 50mmol/L

[0103] D-甘露糖醇 284mmol/L

[0104] 氯化锂 1mmol/L

[0105] EDTA-2K 0.8mmol/L

[0106] PALP(磷酸吡哆醛) 0.05mmol/L

[0107] 噻苯达唑 0.0001质量%

[0108] 阿米卡星硫酸盐 0.0003质量%

[0109] 硫酸卡那霉素 0.0005质量%

[0110] 美罗培南三水合物 0.0005质量%

[0111] 渗透压 355mOsm/kg

[0112] pH 7.4

[0113] 2. 钠离子浓度的测定

[0114] 关于1.中制备的各稀释液进行了钠离子浓度的测定。测定中通过利用 $\beta$ -半乳糖酶通过钠而进行活性化的情况,且利用各稀释液中的钠离子浓度与 $\beta$ -半乳糖酶活性成比例关系的情况的酶活性法而进行了测定。具体而言,用不含钠离子的纯净水,将血液的稀释液稀释成5倍之后称量3 $\mu$ L,添加如下制备的第一试剂52 $\mu$ L,在37 $^{\circ}$ C下加热了5分钟。该混合物中添加如下制备的第二试剂26 $\mu$ L,通过用JCA-BM6050型生物化学自动分析装置(JEOL Co., Ltd. 制造),在主波长410nm、副波长658nm下测定吸光度,由此求出了1分钟的吸光度的变化。由预先制成的校准曲线测定出钠离子浓度。

[0115] (钠离子测定试剂的制备)

[0116] 制备出以下组成的钠离子测定试剂。

[0117] 第一试剂

[0118] HEPES • LiOH (pH8.0) 100mmol/L

[0119] D-甘露糖醇 60mmol/L

[0120] N-乙酰半胱氨酸 30mmol/L

[0121] 硫酸镁 1.52mmol/L

[0122]  $\beta$ -半乳糖酶 1.1kU/L

[0123] Triton (注册商标) X-100 0.05质量%

[0124] 第二试剂

[0125] HEPES • LiOH (pH8.0) 100mmol/L

[0126] 邻硝基苯基- $\beta$ -D-半乳糖苷 15mmol/L

[0127] 由如上求出的稀释液中的钠离子浓度(X)和血液的血浆中的钠离子浓度的标准值(Y),求出各稀释液的稀释倍率(Y/X),针对每一所采集的血液(80 $\mu$ L、60 $\mu$ L、40 $\mu$ L、30 $\mu$ L、20 $\mu$ L)求出了各制成10个的试样的稀释倍率的平均值和稀释倍率的变动系数即CV(coefficient of variation)(%)。将结果示于表1中。

[0128] [表1]

[0129]	采血量 ( $\mu$ L)	稀释液-1的量 ( $\mu$ L)	稀释倍率(10次测 定的平均值)	稀释倍率的CV (%) (10次测定)
	80	360	9.1	3.3
	60	360	11.5	3.5
	40	360	17.3	3.9
	30	360	22.8	4.3
	20	360	33.7	4.7

[0130] (稀释液中的锂离子的测定)

[0131] 添加到稀释液中的锂离子的测定通过螯合比色法(卤化吡啶螯合法:全氟-5,10,15,20-四苯基-21H,23H-吡啶)而进行。具体而言,用不含锂离子的纯净水,将血液的稀释液稀释成4.5倍之后称量5 $\mu$ L,添加如下制备的第三试剂55 $\mu$ L,在37℃下加热了10分钟。关于该混合物,通过使用JCA-BM6050型生物化学自动分析装置(J EOL Co.,Ltd.制造),并在主波长545nm、副波长596nm下测定吸光度,由此求出了1分钟的吸光度的变化。由预先制成的校准曲线测定出锂离子的浓度。

[0132] (锂离子用测定试剂的制备)

[0133] 制备出以下组成的锂离子用测定试剂。

[0134] 第三试剂

[0135] 全氟-5,10,15,20-四苯基-21H,23H-吡啶 0.05质量%

[0136] 二甲基亚砷 5质量%

[0137] 三乙醇胺 2质量%

[0138] 聚乙二醇-叔辛基苯基醚 2质量%

[0139] 十二烷基硫酸钠 2质量%

[0140] 由如上求出的稀释了血液样本的稀释后的稀释液中的锂离子浓度(A)、及稀释血

液之前的稀释液中的锂离子浓度(B),求出各稀释液的稀释倍率 $[B/(B-A)]$ ,针对每一所采集的血液(80 $\mu$ L、60 $\mu$ L、40 $\mu$ L、30 $\mu$ L、20 $\mu$ L),求出了各制成10个的试样的稀释倍率的平均值和稀释倍率的变动系数即CV(%).将结果示于表2中。

[0141] [表2]

[0142]	采血量 ( $\mu$ L)	稀释液-1的量 ( $\mu$ L)	稀释倍率(10次测 定的平均值)	稀释倍率的CV (%) (10次测定)
	80	360	9.2	2.9
	60	360	11.2	3.9
	40	360	18.5	6.1
	30	360	21.9	8.7
	20	360	34.2	11.3

[0143] 由表1及表2的结果可知,在使用存在于稀释液中的标准物质来测定稀释倍率的情况下,若采血量为40 $\mu$ L以下,且稀释倍率为14倍以上,则重复再现性的偏差增大,而将作为存在于血液中的具有恒定性的成分的钠离子用作标准物质的情况下,即使在从采血量为80 $\mu$ L且稀释倍率为9.1倍至采血量20 $\mu$ L且稀释倍率33.7倍中,稀释倍率的测定值的重复再现性非常良好。

[0144] (实施例1)

[0145] 1. ALT (丙氨酸氨基转移酶) 及AST (门冬氨酸氨基转移酶) 的测定

[0146] 在参考例1中,使用注射器刚从静脉进行采血之后,立即从已进行采血的同一患者的指尖,使用柳叶刀使血液渗出到指尖的皮肤外部之后,使用能够吸收20 $\mu$ L~40 $\mu$ L左右的液体的海绵从患者吸取血液,在与参考例1中所使用的稀释液相同组成的稀释液360 $\mu$ L中,浸渍吸收了血液的海绵,从海绵将血液充分地提取到稀释液中,用过滤器进行过滤而分离出血球成分,得到了血液样本的血浆成分的稀释液。密封稀释液并向可进行检查的另一设备进行搬送,之后,取出稀释液,以与使用了参考例1的血液中的钠离子的稀释倍率的测定方法相同的方式测定稀释倍率的结果为22.3倍的稀释倍率。由此可知采血量略少于30 $\mu$ L。使用市售的测定试剂盒(Transaminase CII-Test Wako:Wako Pure Chemical Industries,Ltd.制造)测定该稀释样本中的ALT、AST浓度的结果,得到了与ALT、AST的测定值大致一致的结果,所述ALT、AST的测定值根据在参考例1的采血量30 $\mu$ L的样品中使用钠离子浓度来测定的稀释倍率进行了分析。

[0147] (实施例2)

[0148] 在实施例1中,使用稀释液并通过下述中示出的方法测定出氯离子的浓度,所述稀释液进行了使用钠离子的血液样本中的血浆成分的稀释倍率的测定。

[0149] (稀释液中的氯离子浓度的测定)

[0150] 使用离子选择电极(ISE)进行了氯离子的测定。使活体试样在与氯离子选择性地响应的离子选择电极与参照电极之间流过,由生成于两个电极之间的感应电压来算出了氯离子浓度。

[0151] 得出了如下结果:相对于由血浆的稀释液中的钠离子浓度的测定求出的血液样本中的血浆成分的稀释倍率,由稀释液中的氯离子浓度的测定值和恒久性地存在于血液中的氯离子浓度的平均值102mmol/L求出的稀释倍率为相同的值。由此,可知正在正常地进行由实施例1的钠离子浓度求出的稀释倍率的测定,并可知可进行测定的验证。

[0152] 符号说明

[0153] 1-血液分离器具,2-采血容器,3-筒体,4-顶盖活塞,5-密封盖,6-顶盖,7-密封件,8-螺纹部,9-卡止部,10-底部,11-腿部,12-狭缝槽,13-稀释液,14-扩径部,15-薄壁部,16-主体部,18-缩径部,19-卡止突起部,20-外锲部,21-过滤膜,22-罩,26-握持部,27-芯棒部,28-空间,29-下端部,31-高低差部,33-上端部,34-顶部。



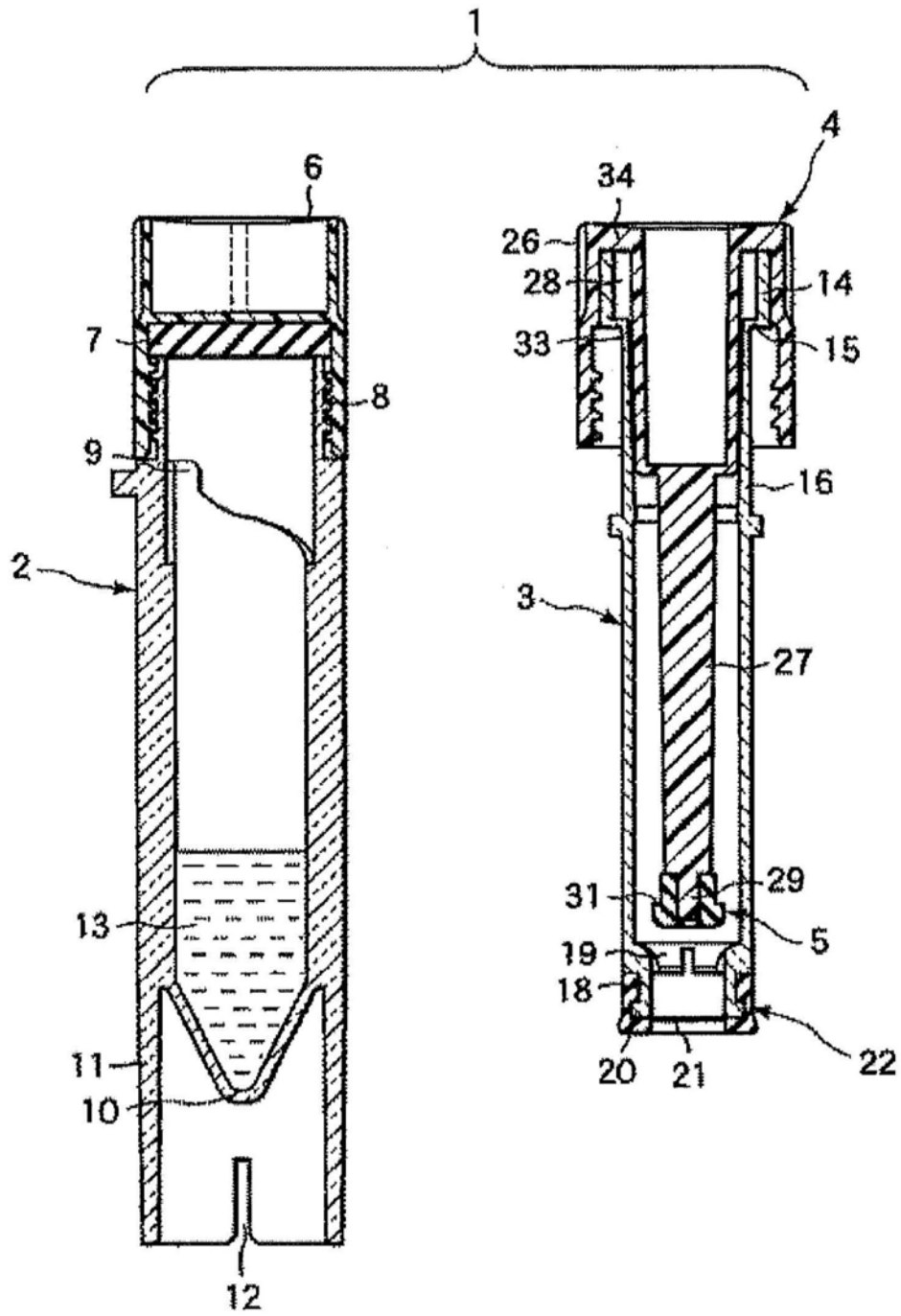


图1