

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2009年11月5日(05.11.2009)

PCT

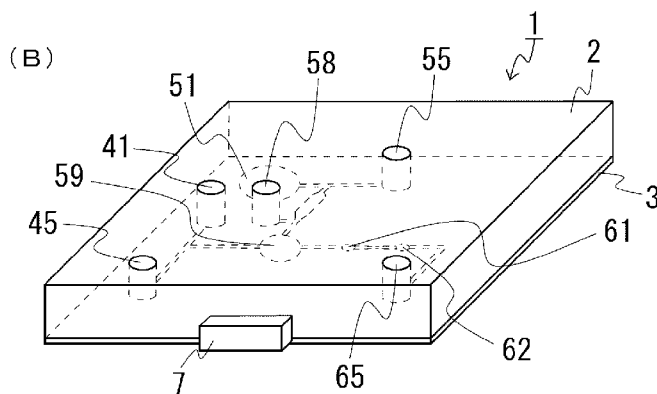
(10) 国際公開番号
WO 2009/133928 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/49 (2006.01)
 - (21) 国際出願番号: PCT/JP2009/058489
 - (22) 国際出願日: 2009年4月30日(30.04.2009)
 - (25) 国際出願の言語: 日本語
 - (26) 国際公開の言語: 日本語
 - (30) 優先権データ:
特願 2008-120248 2008年5月2日(02.05.2008) JP
 - (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について):
アークレイ株式会社 (ARKRAY, Inc.) [JP/JP]; 〒6018045 京都府京都市南区東九条西明田町57番地 Kyoto (JP).
 - (72) 発明者: および
 - (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 福家 博司 (FUKUYA Hiroshi). ▲高▼木 英紀 (TAKAGI Hidenori).
 - (74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外 (TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町134 京都リサーチパーク 1号館 301号室 Kyoto (JP).
 - (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
 - (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: LEUKOCYTE ANALYSIS METHOD AND ANALYSIS REAGENT FOR USE IN THE METHOD

(54) 発明の名称: 白血球の分析方法およびそれに使用する分析試薬

[図1]



(57) Abstract: Disclosed is a leukocyte analysis method which can classify and count leukocytes stably and with high accuracy even when a sample containing the leukocytes is diluted at a low dilution ratio or even when the flow rate of the sample during the analysis is slow. Also disclosed is an analysis reagent for use in the method. The leukocyte analysis method comprises: a mixing step of mixing a sample containing leukocytes and erythrocytes with an analysis reagent containing a surfactant capable of reacting with leukocytes; and a measurement step of allowing the mixed solution of the sample and the analysis reagent to pass through a fine pore, measuring a signal detected at the time of passage, and classifying and counting the leukocytes in the sample. In the method, the analysis reagent additionally contains a nonionic surfactant, and the nonionic surfactant has a sugar residue as a hydrophilic moiety and an aliphatic chain as a hydrophobic moiety.

(57) 要約:

[続葉有]

WO 2009/133928 A1



白血球含有試料の希釈率が低い場合、または、分析時の流速が遅い場合でも、安定して高精度に白血球の分類および計測が可能な白血球の分析方法およびそれに使用する分析試薬を提供する。本発明の分析方法は、白血球および赤血球を含む試料と、白血球に反応する界面活性剤を含む分析試薬とを混合する混合工程と、前記試料と前記分析試薬との混合液を、細孔を通過させ、前記通過時に検出される信号を測定し、前記試料中の白血球を分類および計数する測定工程を含む白血球の分析方法であって、前記分析試薬が、さらに、非イオン性界面活性剤を含み、前記非イオン性界面活性剤が、親水性部として糖残基を有し、疎水性部として脂肪鎖を有することを特徴とする。

明 細 書

発明の名称：白血球の分析方法およびそれに使用する分析試薬 技術分野

[0001] 本発明は、白血球の分析方法およびそれに使用する分析試薬に関する。

背景技術

[0002] 医療診断において、血液分析が一般に行われている。前記血液分析の分析項目には、白血球、赤血球、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値等がある。これらの分析対象の数、濃度、比率等から、例えば、多血症、貧血等の血液疾患、感染症等の疾患を診断可能である。中でも、白血球の数や比率は、感染症等の疾患の診断における重要な指標である。このため、血液中の白血球の分類および計数の精度向上を目的とし、種々の分析方法が開発されている。前記白血球の分析方法として、白血球および赤血球に溶解剤を反応させる方法（例えば、特許文献1）等が提案されている。

[0003] 一方、近年、医療診断における生体試料の分析等において、微小化学分析システム（Micro Total Analysis System、以下、「 μ TAS」という。）が検討されている。前記 μ TASは、シリコン等の基板上に、微小な流路、ポンプ、バルブ、センサ等を集積させた化学分析システムであり、サンプルの少量化、測定用カートリッジのディスポーザブル化、装置の小型化等の利点がある。前記白血球は、集団健診等における分析項目でもあるため、前記 μ TASを使用した分析方法の開発が望まれているが、前記 μ TASでは、微小システムのため、試料の希釈率は低くなり、かつ分析時の流速は遅くなる。従来の白血球の分析方法では、試料の希釈率が低いと、前記試料中の赤血球が、白血球と分析試薬との反応に影響するおそれがあり、赤血球含有率（ヘマトクリット値等）によって、前記白血球の測定結果が変化する場合がある。このため、安定して分析できない。また、前記分析時の流速が遅いと、測定できる白血球数が少ないことから、分析精度が低くなる。このため、分析精度を高めるには、測定時間を長くして総

流量を増やす必要がある。しかし、従来の白血球の分析方法では、前述のように、測定時間を長くすると、前記白血球と前記分析試薬との反応が測定時間内に進行し、安定して分析できない。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特許第3143064号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] そこで、本発明の目的は、例えば、前記白血球および赤血球を含む試料の希釈率が低い場合、または、分析時の流速が遅い場合にも、安定的に白血球の分類および計測が可能な白血球の分析方法およびそれに使用する分析試薬を提供することである。

課題を解決するための手段

[0006] 前記目的を達成するために、本発明の分析方法は、白血球および赤血球を含む試料と、白血球に反応する界面活性剤を含む分析試薬とを混合する混合工程と、前記試料と前記分析試薬との混合液を、細孔を通過させ、前記通過時に検出される信号を測定し、前記試料中の白血球を分類および計数する測定工程とを含む白血球の分析方法であって、前記分析試薬が、さらに、非イオン性界面活性剤を含み、前記非イオン性界面活性剤が、親水性部として糖残基を有し、疎水性部として脂肪鎖を有することを特徴とする。

[0007] 本発明の分析試薬は、本発明の分析方法に使用するための、白血球に反応する界面活性剤を含む分析試薬であって、さらに、非イオン性界面活性剤を含み、前記非イオン性界面活性剤が、親水性部として糖残基を有し、疎水性部として脂肪鎖を有することを特徴とする。

発明の効果

[0008] 本発明によれば、例えば、白血球および赤血球を含む試料の希釈率が低い場合でも、白血球と分析試薬との反応における赤血球の影響が抑制され、白

血球の安定した分析が可能である。また、本発明によれば、例えば、分析時の流速が遅い場合でも、白血球に対する分析試薬の反応が緩慢に起こるため、測定時間を長く設定することが可能であり、分析に十分な流量を得ることができ、安定して分析できる。さらに、本発明は、 μ TASに利用可能なため、例えば、サンプルの少量化、ディスポーザブルなカートリッジの利用、分析装置の小型化が可能である。

図面の簡単な説明

[0009] [図1] 図1 (A) は、本発明の分析方法に使用するカートリッジの一形態を示す平面図である。図1 (B) は、図1 (A) に示すカートリッジの斜視図である。

[図2] 本発明の分析方法に使用する白血球分析装置の一形態を示す断面図である。

[図3] 図3 (A) は、本発明の一例において、反応時間を30秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図3 (B) は、本発明の一例において、反応時間を60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図3 (C) は、本発明の一例において、反応時間を30秒および60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。

[図4] 図4 (A) は、本発明の別の一例において、反応時間を30秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図4 (B) は、本発明の別の一例において、反応時間を60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図4 (C) は、本発明の別の一例において、反応時間を30秒および60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。

[図5] 図5 (A) は、比較例において、反応時間を30秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図5 (B) は、比較例において、反応時間を60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図5 (C) は、比較例において、反応時間を30秒および60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。

[図6] 図6 (A) は、別の比較例において、反応時間を30秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図6 (B) は、別の比較例において、反応時間を60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図6 (C) は、別の比較例において、反応時間を30秒および60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。

[図7] 図7は、本発明の分析方法に使用する白血球分析装置の別の形態を示す断面図である。

[図8] 図8は、本発明の分析方法に使用する白血球分析装置の細孔部分のその他の例を示す断面図である。

[図9] 図9 (A) ~ (C) は、比較例の各種分析試薬を用いた分析による、白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図9 (A) は基本試薬、図9 (B) は塩化ラウリルトリメチルアンモニウム添加分析試薬、図9 (C) はポリオキシエチレンラウリルエーテル添加分析試薬を用いた分析結果を示すヒストグラムである。

[図10] 図10 (A) ~ (D) は、本発明の各種分析試薬を用いた分析による、白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図10 (A) はスクロースラウレート添加分析試薬、図10 (B) はスクロースモノラウレート添加分析試薬、図10 (C) はスクロースモノカプレート添加分析試薬、図10 (D) はドデシルマルトシド添加分析試薬を用いた分析結果を示すヒストグラムである。

[図11] 図11 (A) ~ (F) は、スクロースラウレートを所定濃度で添加した各種分析試薬を用いた分析による、白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図11 (A) は0 w/v%添加分析試薬（無添加）、図11 (B) は0.0125 w/v%添加分析試薬、図11 (C) は0.025 w/v%添加分析試薬、図11 (D) は0.05 w/v%添加分析試薬、図11 (E) は0.1 w/v%添加分析試薬、図11 (F) は0.2 w/v%添加分析試薬を用いた分析結果を示すヒストグラムである。

発明を実施するための形態

- [0010] 本発明の分析方法において、前記非イオン性界面活性剤は、前記糖残基が、二糖の残基であることが好ましい。
- [0011] 本発明の分析方法において、前記非イオン性界面活性剤は、前記脂肪鎖が、脂肪酸残基またはアルキル基であることが好ましい。
- [0012] 本発明の分析方法において、前記非イオン性界面活性剤は、スクロースモノラウレート、スクロースラウレート、スクロースモノカプレートおよびドデシルマルトシドからなる群から選択される少なくとも一つであることが好ましい。
- [0013] 本発明の分析方法において、前記非イオン性界面活性剤が、スクロースモノラウレートまたはスクロースラウレートであることが好ましい。
- [0014] 本発明の分析方法において、前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記非イオン性界面活性剤の濃度が、0.001～5 w/v%の範囲であることが好ましい。
- [0015] 本発明の分析方法において、前記白血球に反応する界面活性剤が、第四級アンモニウム塩であることが好ましい。
- [0016] 本発明の分析方法において、前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記白血球に反応する界面活性剤の濃度が、0.01～5 w/v%の範囲であることが好ましい。
- [0017] 本発明の分析方法において、前記分析試薬が、さらに、赤血球に反応する界面活性剤を含むことが好ましい。
- [0018] 本発明の分析方法において、前記赤血球に反応する界面活性剤が、サポニンであることが好ましい。
- [0019] 本発明の分析方法において、前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記サポニンの濃度が、0.05～5 w/v%の範囲であることが好ましい。
- [0020] 本発明の分析方法は、前記混合工程において、前記試料（X）と前記分析試薬（Y）との混合体積比（X：Y）が、1：0.4～1：99の範囲であることが好ましい。

- [0021] 本発明の分析方法は、前記測定工程において、前記白血球を、その体積により3種類に分類することが好ましい。
- [0022] 本発明の分析方法は、前記測定工程において、前記細孔を有するカートリッジを使用し、前記混合液を、前記カートリッジ内の前記細孔を通過させることが好ましい。
- [0023] 本発明の分析方法において、前記カートリッジが、微小分析システムであることが好ましい。
- [0024] 本発明の分析試薬において、前記糖残基が、二糖であることが好ましい。
- [0025] 本発明の分析試薬において、前記脂肪鎖が、脂肪酸残基またはアルキル基であることが好ましい。
- [0026] 本発明の分析試薬において、前記非イオン性界面活性剤が、スクロースモノラウレート、スクロースラウレート、スクロースモノカプレートおよびドデシルマルトシドからなる群から選択される少なくとも一つであることが好ましい。
- [0027] 本発明の分析試薬において、前記白血球に反応する界面活性剤が、第四級アンモニウム塩であることが好ましい。
- [0028] 本発明の分析試薬において、前記分析試薬が、さらに、赤血球に反応する界面活性剤を含むことが好ましい。
- [0029] 本発明の分析試薬において、前記赤血球に反応する界面活性剤が、サポニンであることが好ましい。
- [0030] つぎに、本発明について、例をあげて説明する。
- [0031] <分析方法>

前述のように、本発明の分析方法は、白血球および赤血球を含む試料と、白血球に反応する界面活性剤を含む分析試薬とを混合する混合工程と、前記試料と前記分析試薬との混合液を、細孔を通過させ、前記通過時に検出される信号を測定し、前記試料中の白血球を分類および計数する測定工程とを含む白血球の分析方法であって、前記分析試薬が、さらに、非イオン性界面活性剤を含み、前記非イオン性界面活性剤が、親水性部として糖残基を有し、

疎水性部として脂肪鎖を有することを特徴とする。なお、本発明の分析方法において使用する前記分析試薬は、本発明の分析試薬に該当する。

[0032] 本発明によれば、例えば、赤血球含有率（ヘマトクリット値等）の影響を受けにくく、安定した分析が可能である。また、本発明によれば、例えば、リンパ球よりも小さなパルスとして検出される血液成分（ノイズ）と、リンパ球との分離精度を向上でき、また、顆粒球の分離精度を向上できる。このため、本発明によれば、例えば、分析精度の向上が可能である。

[0033] 混合工程

前記混合工程では、前記試料と前記分析試薬とを混合し、前記試料中の前記白血球および前記赤血球を、前記分析試薬と反応させる。前記白血球に対する反応としては、例えば、白血球の細胞膜の溶解による裸核化、浸透圧変化による収縮または膨張等があげられる。また、本発明において、前記赤血球に対する反応としては、例えば、溶血、赤血球膜の溶解等があげられる。

[0034] 前記白血球および前記赤血球を含む試料としては、特に限定されず、例えば、血液試料、血液試料を処理した試料等があげられる。前記血液試料としては、例えば、全血、血球等があげられる。前記処理としては、特に制限されないが、例えば、希釈処理等があげられる。前記希釈処理は、特に制限されないが、希釈液として、例えば、生理食塩水、緩衝液等を使用できる。前記希釈倍率は、特に制限されないが、例えば、1～500倍の範囲、好ましくは、5～400倍の範囲であり、より好ましくは、200～300倍の範囲である。また、例えば、全血を希釈する場合、前記希釈試料と前記分析試薬とを混合した際に、結果的に、全血が、5～1000倍に希釈されることが好ましく、より好ましくは、15～400倍である。また、この際、前記希釈試料と前記分析試薬とを混合した前記混合液における、前記分析試薬の各成分の濃度範囲は、後述の範囲となることが好ましい。

[0035] 前記緩衝液としては、特に限定されず、例えば、ADA（N-（2-アセトアミド）イミノ二酢酸）緩衝液、MES（2-モルフォリノエタンスルホン酸）緩衝液、Bis-Tris（ビス-（2-ヒドロキシエチル）イミノ

ートリスー（ヒドロキシメチルメタン）緩衝液、PIPES（ピペラジーン-1, 4-ビス（2-エタンスルホン酸））緩衝液、ACES（N-（2-アセタミド）-2-アミノエタンスルホン酸）緩衝液、MOPSO（2-ヒドロキシ-3-モルフォリノプロパンスルホン酸）緩衝液、BES（N, N-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸）緩衝液、HEPES（2-[4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸）緩衝液、リン酸緩衝液等があげられる。前記緩衝液のpHは、例えば、pH2~12の範囲であり、好ましくは、pH5~7.5の範囲である。

- [0036] 前記試料の動物種は、特に限定されず、例えば、ヒト、ウシ、ウマ、イヌ、ネコ等の哺乳類等があげられる。
- [0037] 本発明において、前記分析試薬は、前記白血球反応性界面活性剤および前記非イオン性界面活性剤を含む。
- [0038] 前記白血球反応性界面活性剤は、特に限定されないが、例えば、第四級アンモニウム塩、サポニン、ポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤、ポリオキシエチレン系アニオン界面活性剤等があげられ、好ましくは、第四級アンモニウム塩である。前記白血球反応性界面活性剤は、例えば、いずれか一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。
- [0039] 前記第四級アンモニウム塩は、特に限定されないが、例えば、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウム、塩化テトラトリメチルアンモニウム、塩化ステアリルトリメチルアンモニウム、塩化ベヘニルトリメチルアンモニウム、塩化ココベンジルジメチルアンモニウム、塩化ジデシルジメチルアンモニウム、臭化ミリスチルトリメチルアンモニウム等があげられ、好ましくは、塩化ラウリルトリメチルアンモニウム、塩化セチルトリメチルアンモニウム、塩化テトラトリメチルアンモニウムである。前記第四級アンモニウム塩は、例えば、いずれか一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。
- [0040] 前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記白血球反応性界面活性剤

の濃度は、特に制限されないが、例えば、界面活性剤の種類に応じて適宜設定可能であり、例えば、0.01～5 w/v%の範囲であり、好ましくは、0.075～1 w/v%の範囲である。前記白血球反応性界面活性剤が前記第四級アンモニウム塩の場合、前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の、前記第四級アンモニウム塩の濃度は、特に限定されず、例えば、前述の濃度範囲である。

[0041] 本発明において、前記非イオン性界面活性剤は、前述のように、親水性部として、糖残基を有し、疎水性部として、脂肪鎖を有する。

[0042] 前記糖残基としては、特に限定されず、例えば、単糖、二糖、オリゴ糖等の糖残基があげられる。前記糖残基における単糖の数は、特に限定されないが、例えば、1～20個の範囲であってもよい。前記単糖の糖残基としては、特に限定されないが、例えば、グルコース残基、ガラクトース残基、マンノース残基、チオグルコース残基、アラビノース残基、キシロース残基、グルクロン酸残基、グルコサミン残基等があげられる。前記二糖の糖残基としては、特に制限されないが、例えば、スクロース残基（ショ糖残基）、ラクトース残基、マルトース残基、チオマルトース残基等があげられ、好ましくは、スクロース残基である。

[0043] 前記脂肪鎖としては、特に限定されず、例えば、脂肪酸残基、アルキル基等があげられる。前記脂肪酸残基としては、特に限定されず、例えば、飽和脂肪酸残基であってもよいし、不飽和脂肪酸残基であってもよい。また、前記脂肪酸残基は、例えば、直鎖脂肪酸残基、分岐脂肪酸残基、環状脂肪酸残基等があげられ、特に制限されない。前記脂肪酸残基の炭素数は、特に限定されず、例えば、4～28の範囲であり、好ましくは、10～22の範囲である。前記飽和脂肪酸残基としては、特に制限されないが、例えば、カプリン酸残基、ラウリン酸残基、ミリスチン酸残基、ペンタデシル酸、パルミチン酸残基、ステアリン酸残基、アラキジン酸残基、ベヘニン酸残基等があげられ、好ましくは、カプリン酸残基、ラウリン酸残基であり、これらは、例えば、デカノイル基、ドデカノイル基、テトラデカノイル基、ペンタデカノ

イル基、ヘキサデカノイル基、オクタデカノイル基、イコサノイル基、ドコサノイル基等のアシル基であることが好ましい。前記不飽和脂肪酸残基としては、特に制限されないが、例えば、オレイン酸残基、リノール酸残基等があげられ、これらは、例えば、*c i s*-9-オクタデセノイル基、*c i s*, *c i s*-9, 12-オクタデカジエノイル基等のアシル基が好ましい。

[0044] 前記アルキル基としては、特に限定されず、例えば、直鎖状アルキル基であってもよいし、分岐状アルキル基であってもよい。前記アルキル基の炭素数は、特に限定されず、例えば、1~18個の範囲であってもよい。前記アルキル基の具体例としては、特に限定されず、例えば、メチル基、エチル基、*n*-プロピル基、イソプロピル基、*n*-ブチル基、イソブチル基、*s e c*-ブチル基、*t e r t*-ブチル基、ペンチル基、ヘキシル基、ヘプチル基、オクチル基、ノニル基、デシル基、ウンデシル基、ドデシル基、トリデシル基、テトラデシル基、ペンタデシル基、ヘキサデシル基、ヘプタデシル基、オクタデシル基、ノナデシル基、イコシル基等があげられる。

[0045] 前記非イオン性界面活性剤の具体例としては、特に限定されず、例えば、シヨ糖（スクロース）脂肪酸エステル、アルキルグルコシド、アルキルオリゴ糖等があげられる。

[0046] 前記シヨ糖（スクロース）脂肪酸エステルとしては、特に制限されないが、例えば、スクロースカプレート、スクロースラウレート、スクロースミリステート、スクロースパルミテート、スクロースステアレート、スクロースベヘニレート、スクロースオレエート、スクロースリノレート等があげられ、好ましくは、スクロースカプレート、スクロースラウレートである。前記シヨ糖（スクロース）脂肪酸エステルは、例えば、モノエステル、ジエステル、トリエステル等があげられ、特に制限されない。前記シヨ糖脂肪酸モノエステルとしては、特に制限されないが、例えば、スクロースモノカプレート、スクロースモノラウレート、スクロースモノミリステート、スクロースモノパルミテート、スクロースモノステアレート、スクロースモノベヘニレート、スクロースモノオレエート、スクロースモノリノレート等があげられ

、好ましくは、スクロースモノカプレート、スクロースモノラウレートである。前記シヨ糖脂肪酸ジエステルとしては、特に制限されないが、例えば、スクロースジカプレート、スクロースジラウレート、スクロースジミリステート、スクロースジパルミテート、スクロースジステアレート、スクロースジベヘニレート、スクロースジオレエート、スクロースジリノレート等があげられ、好ましくは、スクロースジカプレート、スクロースジラウレートである。前記シヨ糖脂肪酸トリエステルとしては、特に制限されないが、例えば、スクローストリカプレート、スクローストリラウレート、スクローストリミリステート、スクローストリパルミテート、スクローストリステアレート、スクローストリベヘニレート、スクローストリオレエート、スクローストリリノレート等があげられ、好ましくは、スクローストリカプレート、スクローストリラウレートである。

[0047] 前記シヨ糖脂肪酸エステルは、例えば、モノエステル、ジエステル、トリエステル等のいずれであってもよく、また、これらの混合物であってもよい。前記シヨ糖脂肪酸エステルは、例えば、前記モノエステルを含むことが好ましく、前記シヨ糖脂肪酸モノエステルの割合は、特に制限されないが、例えば、50～100体積%の範囲、好ましくは、70～100体積%の範囲である。

[0048] 前記アルキルグルコシドとしては、特に制限されないが、例えば、 n -オクチル- β -D-グルコシド、 n -ドデシル- β -マルトシド、 n -デシル- β -マルトシド、 n -オクチル- β -D-マルトシド、3-オキサトリデシル- α -D-マンノシド、 n -ヘプチル- β -チオグルコシド、 n -ノニル- β -D-チオマルトシド、 n -オクチル- β -D-チオグルコシド等があげられる。

[0049] 前記非イオン性界面活性剤は、例えば、いずれか一種類でもよいし、二種類以上を併用してもよい。

[0050] 前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記非イオン性界面活性剤の濃度は、特に限定されず、例えば、0.001～5w/v%の範囲であり、

好ましくは、0.001～1 w/v%の範囲であり、より好ましくは、0.01～1 w/v%の範囲である。

[0051] 前記分析試薬は、前述のように、前記白血球反応性界面活性剤および前記非イオン性界面活性剤に加えて、さらに、前記赤血球に反応する界面活性剤（以下、赤血球反応性界面活性剤という。）を含むことが好ましい。

[0052] 本発明において、前記赤血球反応性界面活性剤としては、特に限定されず、例えば、化学合成された界面活性剤でもよく、天然物由来の界面活性剤でもよい。前記化学合成された界面活性剤としては、特に限定されず、例えば、陽イオン性界面活性剤、陰イオン性界面活性剤、両性界面活性剤等があげられる。前記陽イオン性界面活性剤としては、特に制限されないが、例えば、ドデシルピリジニウムブロミド、セチルピリジニウムクロリド等があげられる。前記陰イオン性界面活性剤としては、特に制限されないが、例えば、ドデシル硫酸ナトリウム、テトラデシルスルホン酸ナトリウム等があげられる。前記両性界面活性剤としては、特に制限されないが、例えば、CHAPS（硫酸-3-[(3-コールアミドプロピル)ジメチルアンモニオ]-1-プロパン）、ドデシル-N-ベタイン等があげられる。また、前記天然物由来の界面活性剤は、特に限定されず、例えば、サポニン、カゼイン、レシチン等があげられる。前記赤血球反応性界面活性剤としては、このなかで、サポニンが好ましい。なお、前記サポニンは、前記白血球反応性界面活性剤と前記赤血球反応性界面活性剤とを兼ねてもよい。

[0053] 前記試料と前記分析試薬の前記混合液中の前記赤血球反応性界面活性剤の濃度は、特に限定されず、例えば、使用する界面活性剤に応じて適宜設定できる。前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の、前記赤血球反応性界面活性剤の濃度は、特に限定されず、例えば、0.05～5 w/v%の範囲であり、好ましくは、0.1～0.5 w/v%の範囲である。前記サポニンを使用する場合、前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記サポニンの濃度は、特に限定されず、例えば、前述の濃度範囲である。

[0054] 本発明において、前記分析試薬は、前述の界面活性剤以外の組成は特に限

定されず、例えば、緩衝液、添加剤等を含んでいてもよい。前記緩衝液としては、特に限定されず、例えば、前述の緩衝液等があげられる。前記緩衝液のpHは、特に限定されず、例えば、前述のpH範囲と同様である。

[0055] 前記添加剤としては、特に限定されず、例えば、再凝集防止剤、ヘモグロビン測定用の添加剤等があげられる。

[0056] 前記再凝集防止剤は、例えば、血液試料成分の再凝集を防止するための溶液である。前記再凝集防止剤としては、特に限定されず、例えば、クエン酸ナトリウム、ヘパリン、EDTA（エチレンジアミンテトラ酢酸）、フッ化ナトリウム、ACD（クエン酸-デキストロース液）等があげられる。

[0057] 前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記再凝集防止剤の濃度は、特に限定されず、使用する成分に応じて適宜設定できる。前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記再凝集防止剤の濃度は、特に限定されず、例えば、0.05～5w/v%の範囲であり、好ましくは、0.1～0.5w/v%の範囲である。前記再凝集防止剤として前記クエン酸ナトリウムを使用する場合には、前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記クエン酸ナトリウムの濃度は、特に限定されず、例えば、前述の濃度範囲である。

[0058] 前記ヘモグロビン測定用の添加剤としては、特に限定されず、例えば、亜硝酸ナトリウム、過塩素酸、チオシアン酸、ヨウ化カリウム、臭化カリウム、トリクロロ酢酸、トリフルオロ酢酸等があげられる。前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の、前記ヘモグロビン測定用の添加剤の濃度は、特に限定されず、例えば、0.01～1w/v%の範囲であり、好ましくは、0.01～0.1w/v%の範囲である。前記亜硝酸ナトリウムを使用する場合、前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記亜硝酸ナトリウムの濃度は、特に限定されず、例えば、前述の濃度範囲である。

[0059] 本発明の分析方法では、前記反応工程において、前記試料（X）と前記分析試薬（Y）との混合体積比は、特に限定されず、例えば、 $X : Y = 1 : 0.4 \sim 1 : 99$ の範囲であり、好ましくは、 $X : Y = 1 : 9 \sim 1 : 99$ の範囲であり、より好ましくは、 $X : Y = 1 : 19 \sim 1 : 49$ の範囲である。

[0060] 前記混合液中において、例えば、全血 $1 \mu\text{L}$ あたり、前記白血球反応性界面活性剤は、例えば、 $0.02 \sim 2 \text{ mg}$ の範囲が好ましく、前記非イオン性界面活性剤は、 $0.001 \sim 0.25 \text{ mg}$ の範囲が好ましく、前記赤血球反応性界面活性剤は、 $0.004 \sim 0.4 \text{ mg}$ の範囲が好ましい。

[0061] 前記反応工程において、前記試料と前記分析試薬を混合して、前記白血球および赤血球に前記分析試薬を反応させる時間は、特に制限されないが、例えば、 $10 \sim 300$ 秒の範囲であり、好ましくは、 $30 \sim 120$ 秒の範囲である。前記反応時間を、前記時間の範囲内にすることにより、分類に適切な程度に白血球が分析試薬と反応し、かつその反応状態が一定に保持されるため、白血球を安定して分析できる。

[0062] 本発明の分析試薬の剤形は、特に限定されず、例えば、液剤、粉剤、粒剤等があげられる。前記分析試薬の調製方法としては、例えば、従来公知の製造方法を採用でき、特に制限されない。前記液剤の調製方法としては、特に限定されず、例えば、前述の緩衝液に前述の界面活性剤を混合して調製してもよい。前記粉剤の調製方法としては、特に限定されず、例えば、前記液剤を乾燥させて、調製してもよい。また、前記粒剤の調製方法としては、特に限定されず、例えば、前記粉剤に造粒剤等の助剤を添加し、造粒装置等を使用して調製してもよい。本発明の分析試薬が、例えば、粉剤または粒剤の場合、前記試料と前記分析試薬とを混合することで、前記混合液中に、前記分析試薬の成分を、溶解、懸濁または分散させてもよいし、あらかじめ、緩衝液等に溶解、懸濁または分散してから、前記試料と混合してもよい。

[0063] 測定工程

前記測定工程では、前記試料と前記分析試薬との前記混合液を、細孔を通過させ、前記通過時に発生する信号を測定し、白血球を分類および計数する。なお、本発明は、例えば、前記試料と前記分析試薬との前記混合液について、前記試料中の細胞の大きさに関する情報および形態に関する情報の少なくとも一方を検出することで、白血球を分類および計数する方法ともいえる。これらの情報は、後述するシグナルとして検出できる。

- [0064] 前記混合液の細孔の通過および前記通過時に発生する信号の測定は、特に制限されない。前記細孔は、例えば、流路の一部（一点）であってもよい。すなわち、例えば、流路に前記混合液を通過させた際、前記流路の所望の部位（一点）を前記細孔部とし、この部位を通過する際の信号を測定してもよい。また、前記細孔は、流路の途中がくびれて形成されてもよい。すなわち、流路における「くびれ部分」が細孔となってもよい。このように、前記流路が、前記細孔を有する場合、例えば、前記流路の一端側から前記流路内に、前記試料と前記分析試薬との前記混合液を導入し、充填する。そして、前記試料を前記流路の他端側に移動させる。これにより、前記混合液を、前記細孔を通過させ、前記混合液を前記細孔を通過させる際に発生する信号を測定する。前記混合液を流路内に導入する方法は、特に制限されず、例えば、前記流路の他端側に、減圧ポンプ等を連結してエアを吸引することで導入してもよいし、電極と電極との間に前記細孔を配置し、前記両電極間に電圧を印加することで導入してもよい。後者の場合は、例えば、前記電極間に電気泳動液を充填した後、前記混合液を電気泳動により移動することが好ましい。前記流路は、例えば、カートリッジに設けられていることが好ましく、カートリッジとしては、 μ TAS等のマイクロチップが好ましい。
- [0065] また、前記細孔は、例えば、連結する液槽を隔てる隔壁に設けられた貫通孔（オリフィス）であってもよい。この場合、例えば、一方の前記液槽に、前記試料および前記分析試薬を注入し、他方の前記液槽に生理食塩水を充填する。ついで、前記他方の液槽に連結した減圧ポンプにより、前記液槽内を減圧し、前記試料と前記分析試薬との前記混合液を前記他方の液槽に移動させる。これにより、前記白血球を、前記細孔を通過させ、前記混合液を前記細孔を通過させる際に発生する信号を測定する。
- [0066] 前記細孔の大きさは、特に限定されず、使用する分析装置に応じて、適宜設定できる。例えば、前記分析装置として、前記 μ TASを使用した場合、前記混合液の移動方向に対して垂直方向における、前記細孔の断面形状は、特に限定されず、例えば、矩形、円形等があげられる。前記断面形状が矩形

の場合、前記細孔は、特に限定されないが、例えば、その幅が、 $10\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲であり、その深さが、 $10\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲であり、好ましくは、その幅が、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲であり、その深さが、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲である。前記断面形状が円形の場合、前記細孔の孔径（直径）は、例えば、 $10\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲であり、好ましくは、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲である。また、前記細孔の前記移動方向における長さは、特に限定されないが、例えば、 $10\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲であり、好ましくは、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲である。

[0067] 前記細孔が、例えば、前記隔壁の貫通孔（オリフィス）の場合、前記混合液の移動方向に対して垂直方向における、前記貫通孔の断面形状は、特に限定されず、例えば、矩形、円形等があげられる。前記断面形状が矩形の場合、前記細孔は、特に限定されないが、例えば、その幅が、 $10\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲であり、その高さが、 $10\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲であり、好ましくは、その幅が、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲であり、その高さが、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲である。前記断面形状が円形の場合、前記細孔の孔径（直径）は、例えば、 $10\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲であり、好ましくは、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲である。また、前記細孔の前記移動方向における長さは、特に限定されないが、例えば、 $10\sim 200\ \mu\text{m}$ の範囲であり、好ましくは、 $50\sim 100\ \mu\text{m}$ の範囲である。

[0068] 前記細孔通過時に検出する信号としては、特に限定されず、例えば、DCインピーダンス、RFインピーダンス等のインピーダンス、前方散乱光、側方散乱光、蛍光等があげられる。

[0069] 前記信号を測定する方法としては、特に制限されず、例えば、電圧または電流値を測定する電気化学的方法、光や色素の強度を測定する光学的方法等があげられる。

[0070] 前記インピーダンスは、例えば、前記細孔を、血球を含む溶液が通過する際における、電極間のインピーダンスである。具体的には、例えば、電極と電極との間に配置した細孔に、前記両電極間に電流を流した状態で、前記溶

液を通過させた際に生じるインピーダンスである。前記溶液中に浮遊した白血球等の血球が、前記細孔を通過する際には、インピーダンスが変化するため、インピーダンスを測定し、その変化を検出することで、前記試料中に含まれる白血球を分析できる。電流として直流電流を流した場合のインピーダンスは、DCインピーダンスであり、通常、血球の容積に応じて変化する。また、電流として高周波電流を流した際のインピーダンスは、RFインピーダンスであり、通常、血球の容積および内部状態に応じて変化する。本発明において、前記血球を含む溶液は、本発明の分析試薬と試料とを含む混合液である。前記分析試薬または前記血球を含む溶液（すなわち前記混合液）は、その導電率は、特に限定されないが、例えば、 $11 \sim 20 \text{ mS/cm}$ の範囲、好ましくは、 $13 \sim 18 \text{ mS/cm}$ の範囲である。

[0071] また、前記散乱光および蛍光の検出方法は、特に制限されず、例えば、通常の方法が採用でき、フローサイトメーターを使用して、前記細孔を通過する血球に光を照射し、検出してもよい。前記光の光源としては、特に限定されず、例えば、水冷高出力レーザー、低出力空冷レーザー、ダイオードレーザー、キセノンランプ等があげられる。

[0072] 前記白血球の分類および計数は、特に制限されず、例えば、前記信号の情報から分析可能な方法を用いて、適宜実施できる。前記信号として、例えば、前記DCインピーダンスを測定する場合には、検出されたパルス（インピーダンス変化）の大きさから、白血球をサイズ別に分類し、前記パルスの頻度から、前記白血球のサイズ別の比率を算出できる。前記白血球は、一般に、好中球、好酸球および好塩基球等の顆粒球、リンパ球および単球の単核細胞等があげられる。本発明において、白血球の分類種は、特に制限されないが、例えば、顆粒球と単核細胞の2種類（いわゆる白血球の2分類）、リンパ球、単球および顆粒球の3種類（いわゆる白血球の3分類）、好中球、好酸球、好塩基球、単球およびリンパ球の5種類（いわゆる白血球の5分類）があげられる。本発明の分析方法において、前記白血球の分類は、特に制限されないが、好ましくは、3分類である。

[0073] 本発明の分析方法は、その他の血液分析と同時に実施してもよい。前記その他の血液分析の対象としては、特に限定されず、例えば、赤血球、ヘモグロビン、血小板等があげられる。

[0074] つぎに、本発明の分析方法について、例をあげて説明する。ただし、本発明の分析方法は、下記の例に制限されるものではない。

[0075] (実施形態 1)

以下に、 μ TASであるカートリッジを使用した、本発明の分析方法の一形態を説明する。まず、図 1 に、本形態における前記カートリッジの一例を示す。本例のカートリッジは、分析装置（図示せず）に装着可能な、ディスプレイブルタイプのカートリッジである。図 1 (A) は、前記カートリッジの平面図であり、図 1 (B) は、前記カートリッジの斜視図である。図 1 (A) および (B) において、同一部分には同一符号を付している。両図は、わかりやすくするための概略図であり、各構成要素の大きさや比率等は、これに制限されず、異なってよい。両図に示すように、前記カートリッジ 1 は、下基板 3 と上基板 2 とコネクタ 7 とを有し、前記下基板 3 の上に前記上基板 2 が積層された積層体の一側面に、コネクタ 7 が配置されている。前記下基板 3 には、配線パターン（図示せず）が形成されている。

[0076] 前記上基板 2 には、5 つの貫通孔が形成されている。前記 5 つの貫通孔の底部が、前記下基板 3 により封止されることにより、5 つの液槽が形成されている。前記 5 つの液槽は、それぞれ、試料導入部 4 1、ドレイン 4 5、ドレイン 5 5、ドレイン 5 8 およびドレイン 6 5 である。また、前記上基板 2 の底面には、大小 4 つの凹部が形成されている。前記 4 つの凹部のうち、2 つの凹部の開口面が、前記下基板 3 により封止されることで、2 つの液槽が形成されている。前記 2 つの液槽は、それぞれ、試薬槽 5 1 および希釈槽 5 9 である。前記試薬槽 5 1 には、分析試薬が封入されている。前記希釈槽 5 9 には、攪拌子（図示せず）が封入されている。前記 4 つの凹部のうち、残りの 2 つの凹部の開口面が、前記下基板 3 により封止された空隙には、前記配線パターン中の配線に接続した電極 6 1 および 6 2 が、それぞれ配置され

る。前記空隙は、電極配置部である。同図において、6 1および6 2は、前記電極であり、前記電極配置部でもある。さらに、前記上基板2の底面には、複数の溝が形成されている。前記複数の溝の開口面が、前記下基板3により封止されることで、前記5つの貫通孔および前記2つの凹部により形成された7つの液槽および2つの前記電極配置部を連通する流路が形成されている。

[0077] 前記試料導入部4 1は、試料導入流路4 2、分岐部4 3、オーバーフロー流路4 4を順に介して、前記ドレイン4 5に連通している。また、前記試料導入部4 1は、前記分岐部4 3から、試料計量流路4 6を介して、前記希釈槽5 9にも連通している。前記試料導入部4 1の開口部は、分析対象となる試料をカートリッジに導入するための導入口である。そして、前記試料計量流路4 6の前記希釈槽5 9側の端部には、流路断面積の狭いオリフィス4 7が形成されている。

[0078] 前記カートリッジ1は、例えば、つぎのようにして、前記試料を計量し、希釈槽5 9内に導入することができる。まず、前記試料導入部4 1に試料導入後、前記ドレイン4 5に連結した減圧ポンプ等（図示せず）によりエアを吸引し、前記ドレイン4 5に連通する流路内を減圧して、前記試料導入部4 1から試料を導入する。前記吸引により、前記分岐部4 3および前記オリフィス4 7間の前記試料計量流路4 6の容積を超える前記試料が、オーバーフロー流路4 4に流出する。つづいて、前記ドレイン4 5を閉じ、前記試料導入部4 1に連結した加圧ポンプ等（図示せず）によりエアを吐出して、前記試料導入部4 1に連通する流路内を加圧する。これにより、前記試料計量流路4 6の容積に相当する試料が、前記希釈槽5 9に導入される。このため、前記導入量は、例えば、前記試料計量流路4 6の容積に設定され、計量導入が可能となる。

[0079] 前記試薬槽5 1は、試薬導入流路5 2、分岐部5 3、オーバーフロー流路5 4を順に介して、前記ドレイン5 5に連通している。また、前記試薬槽5 1は、前記分岐部5 3から、試薬計量流路5 6を介して、前記希釈槽5 9に

も連通している。前記試薬槽 5 1 には、分析試薬（図示せず）が封入されている。前記試薬計量流路 5 6 は、その前記希釈槽側の端部と前記希釈槽 5 9 との間で分岐し、その分岐末端に、前記ドレイン 5 8 が形成されている。前記試薬槽 5 1、試薬導入流路 5 2、分岐部 5 3、オーバーフロー流路 5 4、ドレイン 5 5、試薬計量流路 5 6、ドレイン 5 8 および希釈槽 5 9 により、希釈部 5 が構成されている。なお、前記試薬計量流路 5 6 の前記希釈槽側部分には、テーパ部 5 7 が形成されている。

[0080] 前記希釈部 5 では、つぎのようにして、前記分析試薬を計量して、前記希釈槽 5 9 内に導入することができる。まず、前記ドレイン 5 5 およびドレイン 6 5 を閉状態とし、前記ドレイン 5 8 を開状態とし、前記試薬槽 5 1 に連結した加圧ポンプ（図示せず）等によりエアを吐出して、前記試薬槽 5 1 に連通する流路内を加圧する。これにより、前記試薬計量流路 5 6 に前記分析試薬が充填される。さらに、前記ドレイン 5 8 を閉じ、前記ドレイン 6 5 を開状態とし、前記ドレイン 5 5 に連結した加圧ポンプ（図示せず）等によりエアを吐出し、前記ドレイン 5 5 に連通した流路内を加圧する。これにより、前記試薬計量流路 5 6 の容積に相当する分析試薬が、前記希釈槽 5 9 に導入される。このため、前記導入量は、例えば、前記試料計量流路 5 6 の容積に設定され、計量導入が可能となる。さらに、前述のように、前記試料を前記希釈槽 5 9 に導入する。そして、マグネティックスターラー（図示せず）により、前記希釈槽 5 9 内の前記攪拌子（図示せず）を回転させることにより、前記試料と前記分析試薬とを混合することができる。なお、本例において、前記分析試薬は、溶血処理可能なように、界面活性剤が添加されてもよい。

[0081] 前記希釈槽 5 9 と前記ドレイン 6 5 を連通する流路上には、細孔 6 3 が形成されている。そして、前記細孔 6 3 の両端の流路には、前記電極配置部 6 1 および 6 2（2つの凹部）が形成されている。前記電極配置部 6 1 および 6 2（凹部）には、それぞれ、前記電線を介して電気抵抗検出器（図示せず）と接続する前記電極 6 1、6 2 が配置されている。また、前記細孔 6 3 お

よび前記2つの電極61、62を介して、前記ドレイン65側には、流量計測流路64が形成されている。前記電極61および62、細孔63、流量計測流路64およびドレイン65により、分析部6が構成されている。

[0082] 前記カートリッジ1において、前記上基板2の長さおよび幅は、特に限定されず、例えば、10～200mmの範囲であり、好ましくは、20～100mmの範囲である。また、前記上基板2の厚みは、特に限定されず、例えば、0.1～10mmの範囲であり、好ましくは、1～5mmの範囲である。

[0083] 前記カートリッジ1において、前記下基板3の長さおよび幅は、特に限定されず、例えば、前記上基板2の長さおよび幅と同様である。前記下基板3の厚みは、特に限定されず、例えば、0.1～10mmの範囲であり、好ましくは、1～5mmの範囲である。

[0084] 前記カートリッジ1において、前記上基板2および下基板3の材質は、例えば、前記吸光度の測定に支障のないものであれば、特に限定されない。前記上基板2および下基板3の材質としては、例えば、ガラス、ポリマー材料等から形成されたものが使用できる。前記ガラス材料としては、特に制限されないが、例えば、合成石英ガラス、熔融シリカ、ホウケイ酸ガラス等があげられる。前記ポリマー材料としては、特に制限されないが、例えば、ポリメチルメタクリレート（PMMA）等のアクリル樹脂、シクロオレフィンポリマー（COP）、ポリカーボネート（PC）、ポリジメチルシロキサン（PDMS）、ポリスチレン（PS）、ポリ乳酸（PLA）、エポキシ樹脂、ポリエチレン（PE）、ポリテトラフルオロエチレン（PTFE）、ポリエーテルエーテルケトン（PEEK）等があげられる。また、前記下基板3は、前記材質で形成された複数の基板が積層されている。前記複数の基板間には、銅箔等からなる配線パターンが形成されている。

[0085] 前記カートリッジ1において、前記試料導入部41の直径および深さは、特に限定されず、例えば、直径が、0.1～10mmの範囲であり、深さが、0.1～10mmの範囲であり、好ましくは、直径が、1～5mmの範囲

であり、深さが、1～5 mmの範囲である。

[0086] 前記カートリッジ1において、前記試薬槽51の直径および深さは、特に限定されず、例えば、直径が、0.5～50 mmの範囲であり、深さが、0.1～10 mmの範囲であり、好ましくは、直径が、1～20 mmの範囲であり、深さが、1～5 mmの範囲である。

[0087] 前記カートリッジ1において、前記希釈槽59の直径および深さは、特に限定されず、例えば、直径が、0.5～50 mmの範囲であり、深さが、0.1～10 mmの範囲であり、好ましくは、直径が、1～10 mmの範囲であり、深さが、1～5 mmの範囲である。

[0088] 前記カートリッジ1において、前記ドレイン45、55、58および65の直径および深さは、特に限定されず、例えば、それぞれ、直径が、0.1～10 mmの範囲であり、深さが、0.1～10 mmの範囲であり、好ましくは、それぞれ、直径が、1～5 mmの範囲であり、深さが、1～5 mmの範囲である。

[0089] 前記カートリッジ1において、前記試料導入部41、前記試薬槽51、前記希釈槽59ならびに前記ドレイン45、55、58および65の液槽の形状は、円柱状であるが、本発明は、これに限定されない。本発明において、各液槽の形状は、特に制限されず、例えば、円柱状、四角柱状、四角錐状、円錐状等があげられる。前記各液槽の形状は、全て同じであってもよいし、異なってもよく、特に制限されない。

[0090] 前記カートリッジ1において、前記試薬計量流路56の流路の幅および深さは、特に限定されず、断面積の最大部分において、例えば、幅が、0.1～10 mmの範囲であり、深さが、0.1～10 mmの範囲であり、好ましくは、幅が、0.5～5 mmであり、深さが、0.1～5 mmである。

[0091] 前記カートリッジ1において、前記オリフィス47の幅および深さは、特に限定されず、例えば、幅が、1～200 μ mの範囲であり、深さが、0.1～10 mmの範囲であり、好ましくは、幅が、10～100 μ mであり、深さが、0.1～5 mmである。

- [0092] 前記カートリッジ1において、前記細孔63の幅、深さおよび長さは、前述のとおりである。
- [0093] 前記カートリッジ1においては、前記試薬計量流路56、前記オリフィス47および細孔63以外の流路の幅および深さは、特に限定されず、例えば、幅が、10~1000 μm の範囲であり、深さが、0.1~10mmの範囲であり、好ましくは、幅が、100~500 μm であり、深さが、0.1~5mmである。
- [0094] 前記カートリッジ1において、前記カートリッジ全体の最大厚みは、前記上基板2および前記下基板3の厚みの合計となる。前記上基板2および前記下基板3の厚みは、前述の通りである。
- [0095] 前記カートリッジ1の製造方法は、特に限定されず、例えば、従来公知の方法を採用できる。
- [0096] つぎに、前記カートリッジ1を使用した本例の白血球の分析方法について、説明する。
- [0097] まず、前記カートリッジ1を、コネクタ7を介して分析装置（図示せず）に装着する。また、前記試料として、ヒトの全血を、前述と同様にして、前記試料導入部41から導入する。そして、前述のように、前記試料計量流路46の容量相当量のヒト全血を計量し、前記希釈槽59に導入する。さらに、前述と同様にして、前記試薬計量流路56の容量相当量の前記分析試薬を計量し、前記希釈槽59に導入する。導入した前記試料および前記分析試薬を、前記希釈槽59で混合し、前記攪拌子（図示せず）を前記マグネティックスターラー（図示せず）で回転させて攪拌し、前記試料中の前記白血球および赤血球と前記分析試薬とを反応させる。
- [0098] つぎに、前記電極61および62間に電圧を印加し、前記ドレイン65に連結した減圧ポンプ等（図示せず）によりエアを吸引し、前記ドレイン65に連通する流路内を減圧する。これにより、前記試料および前記分析試薬を混合した溶液（混合液）を、前記細孔63を通過させ、さらに前記流量計測流路64に流出させる。前記混合液が前記細孔63を通過する際に発生する

パルス（インピーダンス変化）を、電気抵抗検出器（図示せず）により測定し、前記パルスの大きさおよび頻度を二軸にとったヒストグラムを作成する。作成した前記ヒストグラムの変曲状態から白血球をサイズ別に三分類し、前記分類毎のパルス頻度を積算する。前記積算したパルス頻度を、前記流量計測流路64に流出した流量で除し、前記試料中の前記三分類された白血球の比率を算出する。なお、前記三分類された白血球は、パルスの小さい順に、リンパ球、単球および顆粒球である。

[0099]（実施形態2）

つぎに、本発明の分析方法のその他の形態を説明する。まず、図2に、本形態の分析方法に使用する白血球分析装置の一例を示す。図2は、前記白血球分析装置の断面図である。同図は、わかりやすくするための概略図であり、各構成要素の大きさや比率等は、これに制限されず、異なってよい。

[0100] 図2に示すように、前記白血球分析装置8は、主槽9および副槽10の2つの槽、吸引部11、電極12および電極13の2つの電極および分析部（図示せず）から構成される。前記主槽9と前記副槽10は、隔壁により隔てられて配置されている。前記隔壁には、細孔14となる貫通孔が形成され、前記2つの槽の内部を連通している。前記主槽9は、上面が開口している。前記副槽10は、前記隔壁と異なる側面に貫通孔が形成されており、前記貫通孔を介して、前記吸引部11が連通している。前記吸引部11の他端には、ポンプ（図示せず）が配置されている。また、前記電極12および13は、前記主槽9および前記副槽10に、それぞれ配置されている。前記電極12および13は、前記分析部（図示せず）に連結する電線（一部のみ図示）の末端に配置されている。

[0101] 前記主槽9および前記副槽10の材質としては、例えば、前述のカートリッジの上基板と同様の材質等を使用できる。前記主槽9および前記副槽10の形状は、特に限定されず、例えば、直方体、円筒状等があげられる。前記主槽9および前記副槽10の形状は、全く同じであってもよいし、異なってもよく、特に制限されない。また、前記主槽9は、前述のように、例え

ば、上面が開放されていてもよい。

[0102] 前記細孔14は、例えば、直径が、1～500 μ mの範囲であり、長さが、1～200 μ mの範囲であり、好ましくは、直径が、10～100 μ mの範囲であり、長さが、10～100 μ mの範囲の貫通孔である。なお、前記直径は、例えば、前記細孔14の貫通方向に垂直な断面の直径であり、前記長さは、前記細孔14の貫通方向の長さであり、前記主槽9と前記副槽10を隔てる前記隔壁の厚さである。

[0103] 前記吸引部11の材質としては、特に限定されず、例えば、前述の2つの槽と同様の材料等を使用できる。前記吸引部11の形状は、特に限定されず、例えば、円筒状である。

[0104] 本例の白血球分析装置8の製造方法は、特に限定されず、例えば、従来公知の方法を適宜用いればよい。

[0105] つぎに、前記白血球分析装置8を使用した本例の白血球の分析方法について、説明する。

[0106] まず、前記主槽9および前記副槽10に、本発明の分析試薬を注入する。そして、前記試料として、ヒトの全血を、前記主槽9に添加して30秒間混合する。つぎに、2つの前記電極間に電圧を印加し、前記吸引部11に連結した前記ポンプにより吸引し、前記副槽10内を減圧する。これにより、前記混合液を、前記細孔14を通過させ、前記主槽9から前記副槽10へ移動させる。前記混合液が、前記細孔14を通過時に発生するパルス（インピーダンス変化）を、前記分析部（図示せず）を使用して測定する。実施形態1と同様に、ヒストグラムを作成し、白血球を分類および計数し、分類された白血球の比率を算出する。

[0107] （実施形態3）

つぎに、本発明の分析方法のさらにその他の形態を説明する。まず、図7に、本形態の分析方法に使用する白血球分析装置の一例を示す。図7は、前記白血球分析装置の断面図である。同図は、わかりやすくするための概略図であり、各構成要素の大きさや比率等は、これに制限されず、異なってよい。

- 。
- [0108] 図7に示すように、前記白血球分析装置88は、主槽部90、副槽部100、攪拌部160、吸引部11、電極12および13を含む。また、前記攪拌部160は、基板部16および攪拌パイプ18を含む。前記吸引部11は、吸引パイプ19およびシリンジ（図示せず）を含む。
- [0109] 前記主槽部90は、基板91aおよび基板91bの2枚の基板が並列に重ね合わせられた二層体からなり、上方が開口した、液体を収容可能な空隙部9を備える。この空隙部が、主槽9となる。前記主槽部90において、前記主槽9の側面である基板91aと基板91bには、それぞれ、前記主槽9の内部と連通する貫通孔22aと貫通孔22cが形成されている。前記貫通孔22cには、前記攪拌パイプ18の一端が連結されている。前記主槽9内には、電極12が配置されている。前記電極12は、電線を介して、電圧器に連結されている（図示せず）。
- [0110] 前記副槽部100は、基板101aおよび基板101bの2枚の基板が並列に重ね合わせられた二層体からなり、前記主槽部90と隣接して配置されている。前記副槽部100は、その内部に、液体を導入可能な空隙部10を備える。この空隙部が、副槽10となる。前記副槽部100において、前記副槽10の側面である基板101aには、前記副槽10の内部と連通する3つの貫通孔が縦方向に形成されている。前記3つの貫通孔のうち、真ん中の貫通孔22bは、隣接する前記主槽部90の貫通孔22aと連結している。これにより、前記主槽部90の内部と、前記副槽部100の内部とが連通する。なお、本例の白血球分析装置88においては、前記副槽部100の貫通孔22bと前記主槽部90の貫通孔22aとの連結部分が、細孔14となる。前記3つの貫通孔のうち、上方の貫通孔21aおよび下方の貫通孔21bは、それぞれ導入口21aおよび導入口21bとなっている。前記導入口21aには、吸引パイプ（図示せず）の一端が連結されており、前記吸引パイプの他端には、前記シリンジ（図示せず）が連結されている。また、前記導入口21aおよび21bは、開閉可能としてもよいし、前記副槽部100内

に導入された溶液を排出するための溶液槽と連結してもよい。前記空隙部 10 のうち、前記導入口 21 a から前記貫通孔 22 b を連通する空隙部分は、例えば、定量部 15 としても使用できる。前記副槽 10 内には、電極 13 が配置されている。前記電極 13 は、電線を介して、前記電圧器に連結されている（図示せず）。

[0111] 図 8 に、前記白血球分析装置 88 の前記細孔 14 部分のその他の例を示す。図 8 は、図 7 中の点線で囲んだ部分のその他の例を示す拡大図である。図 8 に示すように、前記主槽部 90 の貫通孔 22 a と前記副槽部 100 の貫通孔 22 b とが連通する領域に、貫通孔を有する弾性体 840 が配置されてもよい。この場合、前記弾性体 840 に形成された前記貫通孔が、前記細孔 84 となる。前記弾性体 840 の材質は、特に制限されないが、例えば、シリコーンゴム等があげられる。

[0112] 前記基板部 16 は、基板 161 a および基板 161 b の 2 枚の基板が並列に重ね合わせられた二層体からなり、その内部に液体を収容可能な空隙部 17 を備える。この空隙部が、攪拌槽 17 となる。前記基板部 16 において、前記攪拌槽 17 の側面である基板 161 b には、前記攪拌槽 17 の内部と連通する 2 つの貫通孔 22 d および 22 e が、縦方向に形成されている。前記貫通孔 22 d には、前記吸引パイプ 19 の一端が連結されており、前記吸引パイプ 19 の他端には、前記シリンジ（図示せず）が連結されている。前記貫通孔 22 e には、前記攪拌パイプ 18 の一端が連結されており、前記攪拌パイプ 18 の他端は、前述のように、前記主槽部 90 の前記貫通孔 22 c と連結している。この攪拌パイプ 18 によって、前記基板部 16 と前記主槽部 90 の内部が連通している。

[0113] 本例の白血球分析装置 88 において、前記基板 91 a、91 b、101 a、101 b、161 a および 161 b の材質としては、特に制限されないが、例えば、前述のガラス、ポリマー材料等があげられる。

[0114] 前記主槽部 90 の大きさは、特に制限されず、例えば、その高さは、3～100 mm の範囲、その幅は、3～50 mm の範囲、その厚みは、3～50

mmの範囲である。また、前記主槽9の体積は、特に制限されないが、例えば、10～5000 μ Lの範囲であり、好ましくは、100～1000 μ Lである。

[0115] 前記副槽部100の大きさは、特に制限されず、例えば、その高さは、10～200mmの範囲、その幅は、3～50mmの範囲、その厚みは、3～50mmの範囲である。また、前記副槽10の体積は、特に制限されないが、例えば、10～5000 μ Lの範囲であり、好ましくは、100～1000 μ Lである。また、前記貫通孔22bから前記導入口21aまでの空隙部は、定量部15とすることができ、この場合、前記定量部15は、定量に適した所望の体積に設定することが好ましい。

[0116] 前記基板部16の大きさは、特に制限されず、例えば、その高さは、3～200mmの範囲、その幅は、3～50mmの範囲、その厚みは、3～50mmの範囲である。また、前記攪拌槽17の体積は、特に制限されないが、例えば、100～1000 μ Lが好ましい。

[0117] 前記細孔14の大きさは、例えば、直径が、1～500 μ mの範囲であり、長さが、1～200 μ mの範囲であり、好ましくは、直径が、10～200 μ mの範囲であり、長さが、10～100 μ mの範囲である。なお、前記直径は、例えば、前記細孔14の貫通方向に垂直な断面の直径であり、前記長さは、前記細孔14部分における前記基板91bおよび前記基板101aの厚さの合計である。また、図8においても、細孔84の大きさは、例えば、同様である。

[0118] 前記導入口21aおよび21bの直径は、例えば、0.1～2mmの範囲であり、好ましくは、0.5～1mmの範囲である。前記貫通孔22c、22dおよび22eの直径は、例えば、0.1～2mmの範囲であり、好ましくは、0.5～1mmの範囲である。

[0119] 前記攪拌パイプ18および前記吸引パイプ19の材質としては、特に限定されず、例えば、ステンレス鋼等を使用できる。前記ステンレス鋼としては、特に限定されないが、例えば、SUS等があげられる。前記攪拌パイプ1

8 および吸引パイプ 19 の形状は、特に限定されず、例えば、円筒状である。前記円筒状の場合、前記攪拌パイプおよび前記吸引パイプの内径は、例えば、1~500 μm の範囲であり、好ましくは、10~200 μm の範囲である。前記攪拌パイプおよび前記吸引パイプの長さは、特に制限されないが、例えば、1~500 mm の範囲であり、好ましくは、10~200 mm の範囲である。

[0120] 本例の白血球分析装置 88 の製造方法は、特に限定されず、例えば、従来公知の方法を適宜用いればよい。

[0121] つぎに、前記白血球分析装置 88 を使用した本例の白血球の分析方法について、説明する。

[0122] まず、ヒトの全血を、生理食塩水で希釈し、前記試料を調製する。シリンジ（図示せず）を用いて、前記導入口 21 b から生理食塩水を導入し、前記副槽 10 内の前記電極 13 の上部まで充填し、前記導入口 21 b を閉じる。前記試料を、前記主槽 9 に注入する。前記吸引パイプ 19 に連結した前記シリンジ（図示せず）により、前記主槽 9 に連通する各槽およびパイプを減圧（吸引）する。これにより、前記主槽 9 内の前記試料を前記攪拌槽 17 に導入する。つぎに、前記主槽 9 に、本発明の分析試薬を注入する。前記シリンジにより、前記主槽 9 に連通する槽およびパイプを加圧（吐出）する。これにより、前記攪拌槽 17 内の前記試料を、前記主槽 9 に再度導入する。さらに、前記シリンジにより、前記主槽 9 に連通する槽およびパイプの減圧および加圧を交互に繰り返す。これにより、前記試料と前記分析試薬を混合する。混合終了後、前記試料および前記分析試薬の混合液を、前記主槽 9 内で静置する。前記電極 12 および 13 間に電圧を印加し、前記導入口 21 a に連結したシリンジ（図示せず）により吸引し、前記副槽 10 および前記主槽 9 を減圧する。これにより、前記混合液を、前記細孔 14 を通過させ、前記主槽 9 から前記副槽 10 へ移動させる。前記試料が、前記細孔 14 の通過時に発生するパルス（インピーダンス変化）を、分析部（図示せず）を使用して測定する。実施形態 1 と同様に、ヒストグラムを作成し、白血球を分類およ

び計数し、分類された白血球の比率を算出する。また、前記副槽部 100 の前記空隙部 10 において、前記貫通孔 22 b から前記導入口 21 a の空隙部を定量部 15 とするとき、例えば、前記主槽部 90 から通過した前記混合液を定量できる。

実施例

[0123] つぎに、本発明の実施例について、比較例と併せて説明する。ただし、本発明は、以下の実施例に限定されない。

[0124] (実施例 1)

本例では、試料として、ヘマトクリット値が 31.4% のヒト全血を用い、以下の手順により、白血球を測定した。なお、本例における白血球の測定には、前述の、図 2 に示す白血球分析装置 8 を用いた。前記白血球分析装置 8 において、前記細孔 14 は、直径 50 μm 、長さ 60 μm の貫通孔である。

[0125] まず、下記表 1 に示す組成の分析試薬を調製した。なお、前記分析試薬の導電率は、塩化ナトリウムを用いて、11.33 mS/cm になるように調整した。

[0126] (表 1) 分析試薬

成分	配合濃度
ADA-緩衝液 (pH 7.4)	30 mmol/L
塩化ラウリルトリメチルアンモニウム	0.75 $\text{w}/\text{v}\%$
塩化セチルトリメチルアンモニウム	0.1 $\text{w}/\text{v}\%$
サポニン	0.18 $\text{w}/\text{v}\%$
クエン酸ナトリウム	0.25 $\text{w}/\text{v}\%$
亜硝酸ナトリウム	0.05 $\text{w}/\text{v}\%$
スクロースモノラウレート	0.0125 $\text{w}/\text{v}\%$

[0127] つぎに、前記主槽 9 に、前記分析試薬 2400 μL を入れ、前記副槽 10 を、前記分析試薬で満たした。前記主槽 9 に、全血 100 μL を加えて攪拌し、前記分析試薬と反応させた。本例において、全血の希釈率は 25 倍であ

った。すなわち、本例では、試料希釈率が低希釈率の条件下で、白血球を分析した。つぎに、前記試料と前記分析試薬とを30秒間反応させた後、前記主槽9および前記副槽10に設置配置された電極12および13間を5Vで印加し、吸引部11のポンプにより、 $14\mu\text{L}/30\text{秒}$ の流速で10秒間吸引した。前記10秒間に、前記試料と前記分析試薬との混合液が、前記細孔14を通過するときには発生するパルス、自作の電気的検出器（図示せず）を用いて計測した。得られたパルス高さを横軸とし、パルス数を縦軸とした、白血球の粒度分布を示すヒストグラムを作成した。前記パルスの高さから、小サイズ（リンパ球）、中サイズ（単球）、大サイズ（顆粒球）の3サイズに、白血球を分類した。なお、前記分類において、前記小サイズは、ヒストグラム左端の電気的ノイズの山の次に現れる1番目の山部分とし、前記大サイズは、前記電気的ノイズの山から数えて、2番目の山部分からヒストグラム右端までの部分とし、中サイズは、前記小サイズの山と前記大サイズの山の間に表れる谷部分とした。前記3サイズのパルス数を各々積算して、全パルス数に占める比率（ n ）をそれぞれ算出した。

[0128] さらに、反応開始60秒後から10秒間に得られるパルスを計測する以外は、前述と同様にして、各サイズの白血球の比率（ m ）を算出した。下記式（1）を用いて、反応時間30秒および60秒における各比率の変化率 k （%）を算出した。

$$[0129] \quad k(\%) = m/n \times 100 \quad \dots (1)$$

m = 反応時間を60秒としたときの各サイズの白血球の比率（%）

n = 反応時間を30秒としたときの各サイズの白血球の比率（%）

[0130] （実施例2）

本例では、前記試料として、ヘマトクリット値が39.2%のヒト全血を用いた以外は、実施例1と同様にして、白血球を測定し、前記比率および前記変化率を算出した。

[0131] 実施例1および実施例2における、各白血球の前記比率および前記変化率を、下記表2に示す。また、実施例1における、白血球の粒度分布を示すヒ

ストグラムを、図3に示す。図3(A)は、反応時間を30秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムであり、図3(B)は、反応時間を60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムであり、図3(C)は、前記2つのヒストグラムを重ねて表したヒストグラムである。そして、実施例2における、白血球の粒度分布を示すヒストグラムを、図4に示す。実施例1と同様に、図4(A)は、反応時間を30秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムであり、図4(B)は、反応時間を60秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムであり、図4(C)は、前記2つのヒストグラムを重ねて表したヒストグラムである。図3(C)および図4(C)において、(a)の実線は、反応時間を30秒としたときのヒストグラムであり、(b)の実線は、反応時間を60秒としたときのヒストグラムである。図3および4のヒストグラムにおいて、横軸は、パルス高さであり、縦軸は、パルス数である。また、図3(A)、図3(B)、図4(A)および図4(B)のヒストグラムにおいて、パルス高さがa-b範囲の白血球を前記小サイズ(リンパ球)とし、b-c範囲の白血球を前記中サイズ(単球)とし、c以上(cより右側)の範囲の白血球を前記大サイズ(顆粒球)とした。

[0132] [表2]

	実施例1			実施例2		
	比率(%)		変化率 (%)	比率(%)		変化率 (%)
	反応30秒	反応60秒		反応30秒	反応60秒	
小サイズ	30.1	31.1	103.4	33.8	34.0	100.7
中サイズ	8.1	9.2	113.2	6.3	6.8	107.4
大サイズ	61.8	59.7	96.6	59.9	59.2	98.8
変化率平均	—	—	104.4	—	—	102.3

[0133] 図3(C)および図4(C)に示すように、両実施例共に、反応時間によるヒストグラムの差異は小さく、上記表2に示すように、反応時間による差異を示す前記変化率は、両実施例共に、ほぼ100%であった。このようにスクロースモノラウレートを含む分析試薬を使用すると、試料と分析試薬の反応時間による測定結果の差異が小さく、白血球を安定して測定できた

。実施例 1 と実施例 2 は、ヘマトクリット値が異なる全血を使用した、両実施例共に、前述のような結果が得られたことから、ヘマトクリット値の影響を回避して、白血球を安定に測定できることがわかった。

[0134] (比較例 1)

本例では、前記実施例 1 の分析試薬からスクロースモノラウレートのみを除いた分析試薬を用いた以外は、実施例 1 と同様にして、白血球を測定し、前記比率および前記変化率を算出した。

[0135] (比較例 2)

本例では、前記試料として、ヘマトクリット値が 39.2% のヒト全血を用いた以外は、比較例 1 と同様にして、白血球を測定し、前記比率および前記変化率を算出した。

[0136] 比較例 1 および比較例 2 における、前記比率および前記変化率を、下記表 3 に示す。また、比較例 1 における、白血球の粒度分布を示すヒストグラムを、図 5 に示す。図 5 (A) は、反応時間を 30 秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムであり、図 5 (B) は、反応時間を 60 秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムであり、図 5 (C) は、前記 2 つのヒストグラムを重ねて表したヒストグラムである。そして、比較例 2 における、白血球の粒度分布を示すヒストグラムを、図 6 に示す。比較例 1 と同様に、図 6 (A) は、反応時間を 30 秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムであり、図 6 (B) は、反応時間を 60 秒としたときの白血球の粒度分布を示すヒストグラムであり、図 6 (C) は、前記 2 つのヒストグラムを重ねて表したヒストグラムである。図 5 (C) および図 6 (C) において、(a) の実線は、反応時間を 30 秒としたときのヒストグラムであり、(b) の実線は、反応時間を 60 秒としたときのヒストグラムである。図 5 および 6 のヒストグラムにおいて、横軸は、パルス高さであり、縦軸は、パルス数である。また、図 5 (A)、図 5 (B)、図 6 (A) および図 6 (B) のヒストグラムにおいて、前述と同様に、パルス高さが a - b 範囲の白血球を前記小サイズ (リンパ球) とし、b - c 範囲の白血球を前記中サイ

ズ（単球）とし、c以上（cより右側）の範囲の白血球を前記大サイズ（顆粒球）とした。

[0137] [表3]

	比較例1			比較例2		
	比率(%)		変化率 (%)	比率(%)		変化率 (%)
	反応30秒	反応60秒		反応30秒	反応60秒	
小サイズ	28.8	19.9	69.2	33.1	33.7	102.0
中サイズ	1.9	3.8	197.8	7.9	7.0	89.0
大サイズ	69.3	76.3	110.1	59.1	59.3	100.3
変化率平均	—	—	125.7	—	—	97.1

[0138] 比較例1では、図5（C）に示すように、試料と分析試薬の反応時間によるヒストグラムの差異が大きく、前記表3に示すように、変化率は、69.2～197.8%とばらつきがみられ、白血球を安定して分析できなかった。一方、比較例2では、比較例1に比べ、図6（C）に示すように、試料と分析試薬の反応時間によるヒストグラムの差異が小さく、前記表3に示すように、変化率は、89.0～102.0%とばらつきが小さく、白血球を安定して分析できた。スクロースモノラウレートを含まない分析試薬を使用した比較例1と比較例2は、このように、試料のヘマトクリット値が異なる場合に、測定結果にばらつきが生じたことから、安定して白血球を分析できなかった。

[0139] 以上の結果より、希釈率が低く、かつ流速が遅い場合でも、実施例1および2のように、スクロースモノラウレートを含む分析試薬を用いると、ヘマトクリット値に影響されず、白血球を安定して分析可能であった。他方、希釈率が低く、かつ流速が遅い場合に、比較例1および2のように、スクロースモノラウレートを含まない分析試薬を用いると、ヘマトクリット値の影響を受け、測定結果にばらつきが生じ、白血球を安定して分析できなかった。

[0140] （実施例3）

本例では、下記表4に示す添加試薬を添加した分析試薬を用い、以下の手順により、白血球を測定した。なお、本例の測定では、図7に示す白血球分析装置88を用いた。前記白血球分析装置88において、細孔を含む領域は

、図8に示すとおりである。なお、前記白血球分析装置88において、前記主槽9の容積は、約700 μ Lであり、前記副槽10の容積は、約100 μ Lであり、前記定量部15の容積は、約300 μ Lであり、前記攪拌槽17の容積は、約400 μ Lであった。また、図8に示す前記細孔84は、直径が、100 μ m、長さが、100 μ mの貫通孔であった。前記電極12および13は、直径1 μ mの白金を用いた。前記電極12および13間には、電圧器を用い、30Vの電圧を印加した。そして、前記試料が、前記細孔84の通過時に発生するパルス（インピーダンス変化）を、30V、5ゲインに設定したアンプを使用して測定した。また、血液試料として、ヘマトクリット値が41.6%のヒト全血を用いた。本例では、前記ヒト全血を、生理食塩水（0.9w/v%、ナカライテスク社製）で100倍希釈し、希釈試料を調製した。

[0141] (表4)

例	添加試薬名	製造会社名
実施例3-1	スクロースラウレート	同仁化学研究所社製
実施例3-2	スクロースモノラウレート	同仁化学研究所社製
実施例3-3	スクロースモノカプレート	同仁化学研究所社製
実施例3-4	ドデシルマルチシド	同仁化学研究所社製
比較例3-1	未添加	
比較例3-2	塩化ラウリルトリメチルアンモニウム	ナカライテスク社製
比較例3-3	ポリオキシエチレンラウリルエーテル（30%溶液） （商品名：Brig 35）	ナカライテスク社製

[0142] まず、下記表5に示す組成の基本試薬を調製した。同表において、配合濃度は、分析試薬における各成分の濃度である。また、同表において、最終濃度は、本例の分析試薬と前記試料とを混合した混合液中における濃度である。なお、前記基本試薬の導電率は、塩化ナトリウムを用いて、18mS/cmになるように調整した。そして、前記基本試薬に、前記表4記載の各添加試薬を0.1w/v%の濃度になるように添加し、実施例3-1~3-4お

よび比較例 3-1~3-3 の各分析試薬を調製した。なお、本例において、実施例 3-1 の分析試薬に添加した前記スクロースラウレートは、スクロースモノラウレート（モノエステル）を約 80~90 体積%含み、スクロースジラウレートまたはスクローストリラウレート（ジエステルまたはトリエステル）を約 10~20 体積%含む混合物であった。

[0143] (表 5) 基本試薬

成分	配合濃度 (mmol/L)	最終濃度 (mmol/L)
リン酸緩衝液 (pH 7.5)	83	25
塩化ラウリルトリメチルアンモニウム	43	12.88
塩化セチルトリメチルアンモニウム	2	0.625

[0144] つぎに、前記主槽 9 に、前記希釈試料 350 μ L を注入した。前記白血球分析装置 88 の前記吸引パイプ 19 に連結した前記シリンジ（図示せず）により、吸引速度 400 μ L/秒で減圧（吸引）し、前記試料を前記攪拌槽 17 に導入した。つぎに、前記主槽 9 に、前記各分析試薬 150 μ L を注入した。前記シリンジにより、吐出速度 400 μ L/秒で加圧（吐出）し、前記試料を前記主槽 9 に導入した。そして、前記シリンジにより、400 μ L/秒の速度で、350 μ L 吸引し、ついで 350 μ L 吐出する操作を、2 回行った。これにより、前記試料と前記分析試薬とを混合した。この混合液を前記主槽 9 内で 1 分間静置した。なお、前記混合液中の前記各添加試薬の濃度（最終濃度）は、それぞれ 0.03 w/v% であった。つぎに、前記電極 12 および 13 間に電圧を印加し、前記シリンジにより吐出し、約 2.8 μ L/秒の速度で前記混合液 300 μ L を、前記主槽 9 から前記副槽 10 に移動させた。前記試料が、前記細孔 84 の通過時に発生するパルス（インピーダンス変化）を、自作の電氣的検出器（図示せず）を用いて計測した。パルスデータを 7 点移動平均し、前記移動平均したパルス高さを横軸とし、前記移動平均したパルス数を縦軸とした、白血球の粒度分布を示すヒストグラムを

作成した。前記パルスの高さから、小サイズ（リンパ球）、中サイズ（単球）、大サイズ（顆粒球）の3サイズに、白血球を分類した。なお、前記分類において、前記小サイズは、ヒストグラム左端の電氣的ノイズの山の次に現れる1番目の山部分とし、前記大サイズは、前記電氣的ノイズの山から数えて、2番目の山部分からヒストグラム右端までの部分とし、中サイズは、前記小サイズの山と前記大サイズの山の間に表れる谷部分とした。前記3サイズのパルス数を各々積算して、全パルス数に占める比率をそれぞれ算出した。

[0145] 図9、10および下記表6に、前記表4記載の添加試薬を添加した各分析試薬を用いた白血球の分析結果を示す。図9（A）～（C）は、前記各比較例の分析試薬を用いた分析による、白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図9（A）は比較例3-1（基本試薬）、図9（B）は比較例3-2（塩化ラウリルトリメチルアンモニウム添加分析試薬）、図9（C）は比較例3-3（ポリオキシエチレンラウリルエーテル添加分析試薬）の分析試薬を用いた分析結果を示すヒストグラムである。また、図10（A）～（D）は、前記各実施例の分析試薬を用いた分析による、白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図10（A）は実施例3-1（スクロースラウレート添加分析試薬）、図10（B）は実施例3-2（スクロースモノラウレート添加分析試薬）、図10（C）は実施例3-3（スクロースモノカプレート添加分析試薬）、図10（D）は実施例3-4（ドデシルマルチド添加分析試薬）の分析試薬を用いた分析結果を示すヒストグラムである。図9および図10のヒストグラムにおいて、横軸は、パルス高さであり、縦軸は、パルス数である。また、前記ヒストグラムにおいて、パルス高さがエリア2の白血球を前記小サイズ（リンパ球）とし、エリア3の白血球を前記中サイズ（単球）とし、エリア4の白血球を前記大サイズ（顆粒球）とした。なお、エリア1は、前記白血球以外の血液成分（ノイズ）であり、主な成分は、例えば、赤血球の溶解物あげられる。また、下記表6は、前記各分析試薬を用いた分析による、前記各エリアのパルス範囲、パルス数およびその比率である。

[0146] 図9 (A) に示すように、比較例3-1の非イオン性界面活性剤未添加の前記基本試薬は、前記エリア1 (ノイズ) および前記エリア2 (リンパ球) 間の谷が小さく、前記エリア1 (ノイズ) と前記エリア2 (リンパ球) の分離精度が低かった。また、図9 (B) に示すように、前記塩化ラウリルトリメチルアンモニウムを添加した比較例3-2の分析試薬は、前記エリア1 (ノイズ) および前記エリア2 (リンパ球) 間の谷が小さく、かつ、前記エリア4 (顆粒球) のピークが、前記基本試薬に比べてさらに小さくなった。図9 (C) に示すように、前記ポリオキシエチレンラウリルエーテルを添加した比較例3-3の分析試薬は、前記エリア1 (ノイズ) および前記エリア2 (リンパ球) 間の谷が小さく、かつ、前記エリア2 (リンパ球) のピークが小さくなった。これに対して、図10 (A) ~ (D) に示すように、前記スクロースラウレート、スクロースモノラウレート、スクロースモノカプレートおよびドデシルマルチシドの非イオン性界面活性剤を添加した実施例3-1~3-4の分析試薬は、前記比較例3-1の基本試薬と比べて、前記エリア1 (ノイズ) および前記エリア2 (リンパ球) 間の谷が大きくなり、前記エリア2 (リンパ球) のピークが減少せず、前記エリア4 (顆粒球) のピークが明確になった。すなわち、前記非イオン性界面活性剤の添加により、前記ノイズと前記リンパ球の分離精度が向上し、かつ、前記顆粒球の分離精度が向上した。

[0147]

[表6]

添加試薬	各エリアのパルス(p)範囲 パルス数 比率			総パルス数
	エリア2(リンパ球)	エリア3(単球)	エリア4(顆粒球)	
比較例3-1 なし(基本試薬)	975 ≤ p < 2000 3735 28.80%	2000 ≤ p < 3200 2160 54.50%	3200 ≤ p < 9925 7061 54.50%	12956
比較例3-2 塩化ラウリル トリメチルアンモニウム	900 ≤ p < 2100 4496 37.50%	2100 ≤ p < 2850 1205 10.10%	2850 ≤ p < 9925 6288 52.40%	11989
比較例3-3 ポリオキシエチレン ラウリルエーテル	1250 ≤ p < 3175 4804 40.60%	3175 ≤ p < 3875 831 7.00%	3875 ≤ p < 9925 6204 52.40%	11839
実施例3-1 スクロースラウレート	1100 ≤ p < 2750 5121 43.60%	2750 ≤ p < 3450 688 5.90%	3450 ≤ p < 9925 5935 50.50%	11744
実施例3-2 スクロース モノラウレート	1025 ≤ p < 2400 4559 40.20%	2400 ≤ p < 3275 1063 9.40%	3275 ≤ p < 9925 5706 50.40%	11328
実施例3-3 スクロース モノカプレート	1000 ≤ p < 2400 4498 39.80%	2400 ≤ p < 3275 1248 11.00%	3275 ≤ p < 9925 5563 49.20%	11309
実施例3-4 ドデシルマルトシド	1000 ≤ p < 2175 4658 40.00%	2175 ≤ p < 2775 885 7.60%	2775 ≤ p < 9925 6112 52.40%	11655

[0148] (実施例4)

本例では、前記基本試薬中の前記塩化ラウリルトリメチルアンモニウムの最終濃度を12.3 mmol/Lとし、前記スクロースラウレートを、前記表5の基本試薬に添加した各分析試薬を用いた以外は、実施例3と同様にし、白血球を測定した。なお、本例の分析試薬における、前記スクロースラウレートの添加濃度を、下記表7に示す。下記表7において、最終濃度は、本例の分析試薬と試料とを混合した混合液中の前記スクロースラウレート濃度である。

[0149] (表7)

例	スクロースラウレート	
	添加濃度 (w/v %)	最終濃度 (w/v %)
比較例4 (基本試薬)	0 (未添加)	0 (未添加)

実施例 4-1	0. 0 1 2 5	0. 0 0 3 8
実施例 4-2	0. 0 2 5	0. 0 0 7 5
実施例 4-3	0. 0 5	0. 0 1 5
実施例 4-4	0. 1	0. 0 3
実施例 4-5	0. 2	0. 0 6

[0150] 図 1 1 および下記表 8 に、比較例 4 および実施例 4-1~4-5 における白血球の分析結果を示す。図 1 1 (A) ~ (F) は、前記スクロースラウレートを前記所定濃度で添加した分析試薬を用いた分析による、白血球の粒度分布を示すヒストグラムである。図 1 1 (A) は比較例 4 (基本試薬)、図 1 1 (B) は実施例 4-1、図 1 1 (C) は実施例 4-2、図 1 1 (D) は実施例 4-3、図 1 1 (E) は実施例 4-4、図 1 1 (F) は実施例 4-5 の分析試薬を用いた分析結果を示すヒストグラムである。図 1 1 (A) ~ (F) のヒストグラムにおいて、横軸は、パルス高さであり、縦軸は、パルス数である。また、前記ヒストグラムにおいて、パルス高さがエリア 2 の白血球を前記小サイズ (リンパ球) とし、エリア 3 の白血球を前記中サイズ (単球) とし、エリア 4 の白血球を前記大サイズ (顆粒球) とした。なお、エリア 1 は、前記白血球以外の血液成分 (ノイズ) である。また、下記表 8 は、前記各分析試薬を用いた分析による、前記各エリアのパルス範囲、パルス数およびその比率である。

[0151] 図 1 1 (A) に示すように、前記比較例 4 の基本試薬は、前記エリア 1 (ノイズ) および前記エリア 2 (リンパ球) 間の谷が小さく、前記エリア 1 (ノイズ) と前記エリア 2 (リンパ球) の分離精度が低かった。これに対して、図 1 1 (B) ~ (F) に示すように、前記スクロースラウレートを含む分析試薬によれば、前記エリア 1 (ノイズ) および前記エリア 2 (リンパ球) 間の谷の高さが低くなり、前記ノイズと前記リンパ球の分離精度が向上した。中でも、前記混合液における前記スクロースラウレートの最終濃度が 0. 0 0 7 5 ~ 0. 0 6 w/v % の場合 (同図 (C) ~ (F)) に、この分離精度はより高くなり、0. 0 3 % の場合 (同図 (E)) に最も高かった。

[0152] [表8]

分析試薬 (w/v%)*	各エリアのパルス(p)範囲 パルス数 比率			総パルス数
	エリア2(リンパ球)	エリア3(単球)	エリア4(顆粒球)	
比較例4-1 (0)	1275 ≤ p < 3500 2015 33.40%	3500 ≤ p < 4225 319 5.30%	4225 ≤ p < 9925 3698 61.30%	6032
実施例4-1 (0.0038)	1250 ≤ p < 2500 1200 24.60%	2500 ≤ p < 3200 452 9.20%	3200 ≤ p < 9925 3235 66.20%	4887
実施例4-2 (0.0075)	1250 ≤ p < 2350 1240 22.80%	2350 ≤ p < 3100 595 10.90%	3100 ≤ p < 9925 3604 66.30%	5439
実施例4-3 (0.015)	1575 ≤ p < 3300 1392 23.60%	3300 ≤ p < 3825 349 5.90%	3825 ≤ p < 9925 4169 70.50%	5910
実施例4-4 (0.03)	1325 ≤ p < 3250 2268 35.00%	3250 ≤ p < 4000 453 7.00%	4000 ≤ p < 9925 3758 58.00%	6479
実施例4-5 (0.06)	1475 ≤ p < 3300 2194 35.80%	3300 ≤ p < 3825 490 8.00%	3825 ≤ p < 9925 3437 56.20%	6121

* 混合液中のスクロースラウレット最終濃度

[0153] このように、親水性部として糖残基を有し、疎水性部として脂肪鎖を有する非イオン性界面活性剤を含む本発明の分析試薬を用いることにより、例えば、試料の希釈率が低い場合や分析時の試料の流速が遅い場合であっても、前記白血球を安定的に測定可能である。また、本発明の分析試薬を用いることにより、例えば、前述の場合であっても、高精度に測定可能である。

産業上の利用可能性

[0154] 本発明の分析方法は、例えば、 μ TAS等のように、希釈率が低い場合、または、流速が遅い分析条件下の場合でも、白血球を安定して分析可能である。本発明は、臨床検査、生化学検査、医学研究等の白血球を分析する全ての分野に適用することができ、その用途は限定されず、広い分野に適用可能である。

符号の説明

[0155] 1 カートリッジ

2	上基板	
3	下基板	
4	試料計量部	
4 1	試料導入部	
4 2	試料導入流路	
4 3	分岐部	
4 4	オーバーフロー流路	
4 5、5 5、5 8、6 5		ドレイン
4 6	試料計量流路	
4 7	オリフィス	
5	希釈部	
5 1	試薬槽	
5 2	試薬導入流路	
5 3	分岐部	
5 4	オーバーフロー流路	
5 6	試薬計量流路	
5 7	テーパー部	
5 9	希釈槽	
6	分析部	
6 1、6 2	電極、電極配置部	
1 4、6 3、8 4		細孔
6 4	流量計測流路	
7	コネクタ	
8、8 8	白血球分析装置	
9	主槽	
1 0	副槽	
1 1	吸引部	
1 2、1 3	電極	

15	定量部	
16	基板部	
17	攪拌槽	
18	攪拌パイプ	
19	吸引パイプ	
21a、21b		貫通孔、導入口
22a、22b、22c、22d、22e		貫通孔
90	主槽部	
100	副槽部	
160	攪拌部	
91a、91b、101a、101b、161a、161b		基板
840	弾性体	

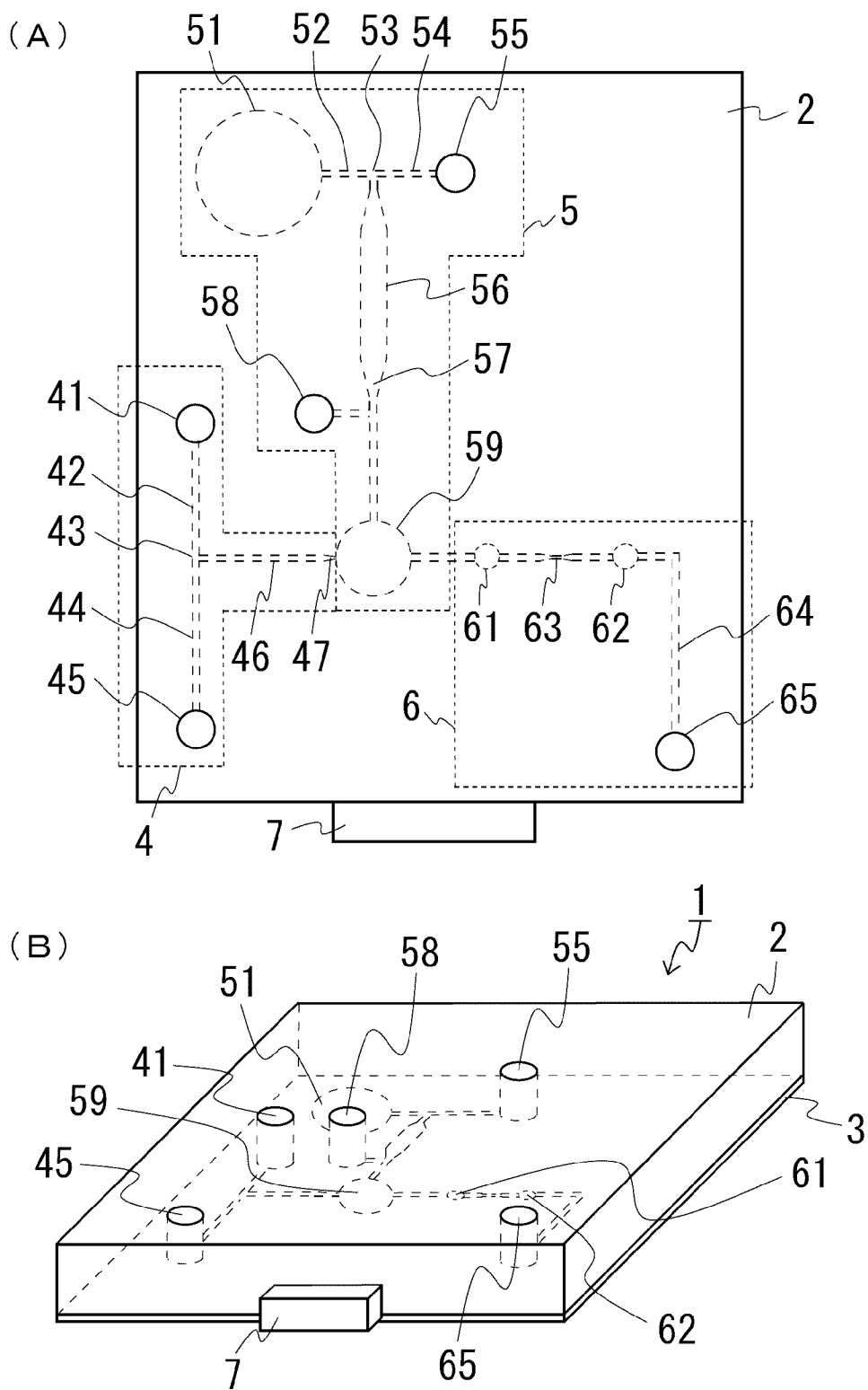
請求の範囲

- [請求項1] 白血球および赤血球を含む試料と、白血球に反応する界面活性剤を含む分析試薬とを混合する混合工程と、
前記試料と前記分析試薬との混合液を、細孔を通過させ、前記通過時に検出される信号を測定し、前記試料中の白血球を分類および計数する測定工程とを含む白血球の分析方法であって、
前記分析試薬が、さらに、非イオン性界面活性剤を含み、
前記非イオン性界面活性剤が、親水性部として糖残基を有し、疎水性部として脂肪鎖を有することを特徴とする白血球の分析方法。
- [請求項2] 前記糖残基が、二糖の残基である、請求の範囲1記載の白血球の分析方法。
- [請求項3] 前記脂肪鎖が、脂肪酸残基またはアルキル基である、請求の範囲1記載の白血球の分析方法。
- [請求項4] 前記非イオン性界面活性剤が、スクロースモノラウレート、スクロースラウレート、スクロースモノカプレートおよびドデシルマルトシドからなる群から選択される少なくとも一つである、請求の範囲1記載の白血球の分析方法。
- [請求項5] 前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記非イオン性界面活性剤の濃度が、
0.001～5 w/v %の範囲である、請求の範囲1記載の白血球の分析方法。
- [請求項6] 前記白血球に反応する界面活性剤が、第四級アンモニウム塩である、請求の範囲1記載の白血球の分析方法。
- [請求項7] 前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の、前記白血球に反応する界面活性剤の濃度が、0.01～5 w/v %の範囲である、請求の範囲1記載の白血球の分析方法。
- [請求項8] 前記分析試薬が、さらに、赤血球に反応する界面活性剤を含む、請求の範囲1記載の白血球の分析方法。

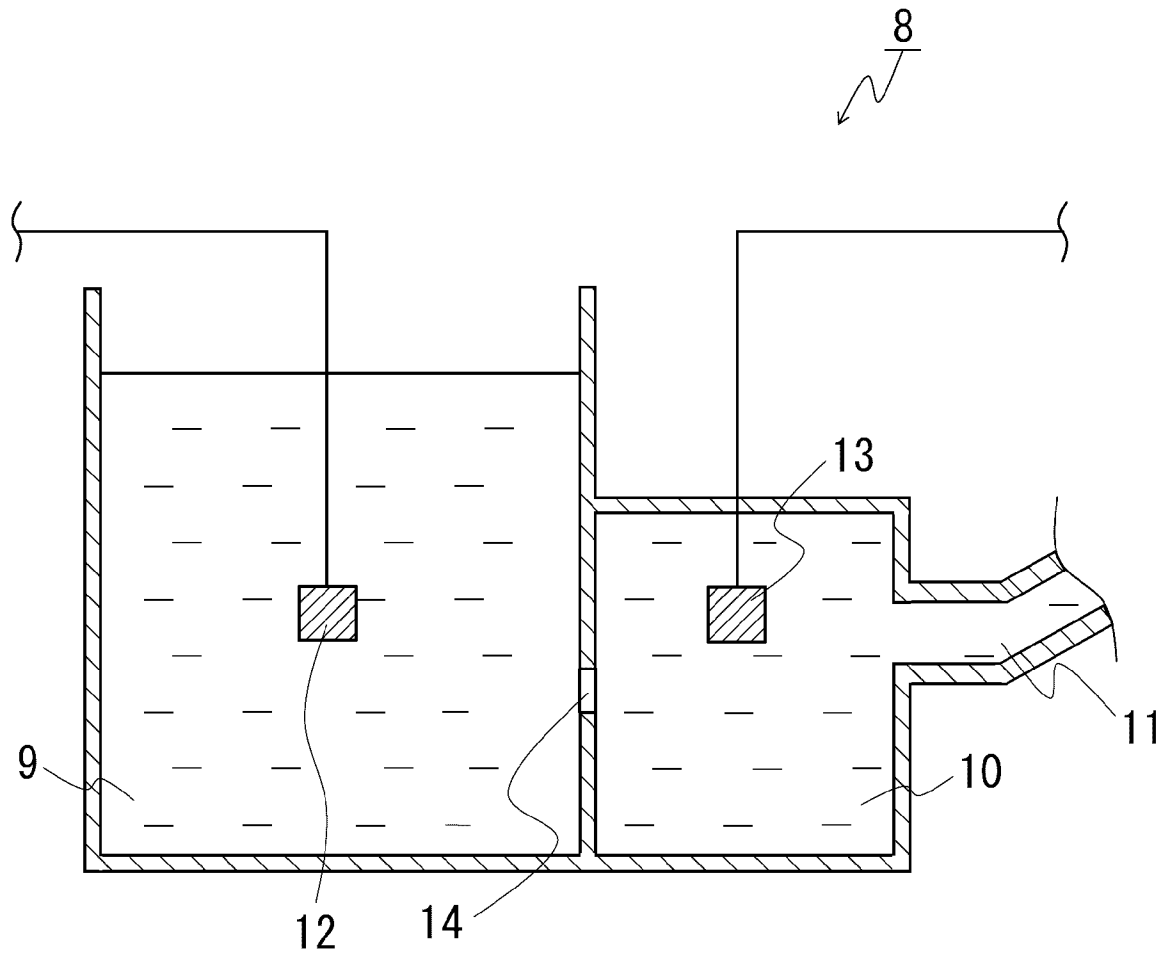
- [請求項9] 前記赤血球に反応する界面活性剤が、サポニンである、請求の範囲 8 記載の白血球の分析方法。
- [請求項10] 前記試料と前記分析試薬との前記混合液中の前記サポニンの濃度が、 $0.05 \sim 5 \text{ w/v} \%$ の範囲である、請求の範囲 9 記載の白血球の分析方法。
- [請求項11] 前記混合工程において、前記試料 (X) と前記分析試薬 (Y) との混合体積比 (X : Y) が、 $1 : 0.4 \sim 1 : 99$ の範囲である、請求の範囲 1 記載の白血球の分析方法。
- [請求項12] 前記測定工程において、前記白血球を、その体積により 3 種類に分類する請求の範囲 1 記載の白血球の分析方法。
- [請求項13] 前記測定工程において、
前記細孔を有するカートリッジを使用し、
前記混合液を、前記カートリッジ内の前記細孔を通過させる、請求の範囲 1 記載の分析方法。
- [請求項14] 前記カートリッジが、微小分析システムである、請求の範囲 1 3 記載の分析方法。
- [請求項15] 請求の範囲 1 記載の分析方法に使用するための、白血球に反応する界面活性剤を含む分析試薬であって、
さらに、非イオン性界面活性剤を含み、
前記非イオン性界面活性剤が、親水性部として糖残基を有し、疎水性部として脂肪鎖を有することを特徴とする分析試薬。
- [請求項16] 前記糖残基が、二糖である、請求の範囲 1 5 記載の分析試薬。
- [請求項17] 前記脂肪鎖が、脂肪酸残基またはアルキル基である、請求の範囲 1 5 記載の分析試薬。
- [請求項18] 前記非イオン性界面活性剤が、スクロースモノラウレート、スクロースラウレート、スクロースモノカプレートおよびドデシルマルトシドからなる群から選択される少なくとも一つである、請求の範囲 1 5 記載の分析試薬。

- [請求項19] 前記白血球に反応する界面活性剤が、第四級アンモニウム塩である、請求の範囲 1 5 記載の分析試薬。
- [請求項20] 前記分析試薬が、さらに、赤血球に反応する界面活性剤を含む、請求の範囲 1 5 記載の分析試薬。
- [請求項21] 前記赤血球に反応する界面活性剤が、サポニンである、請求の範囲 2 0 記載の分析試薬。

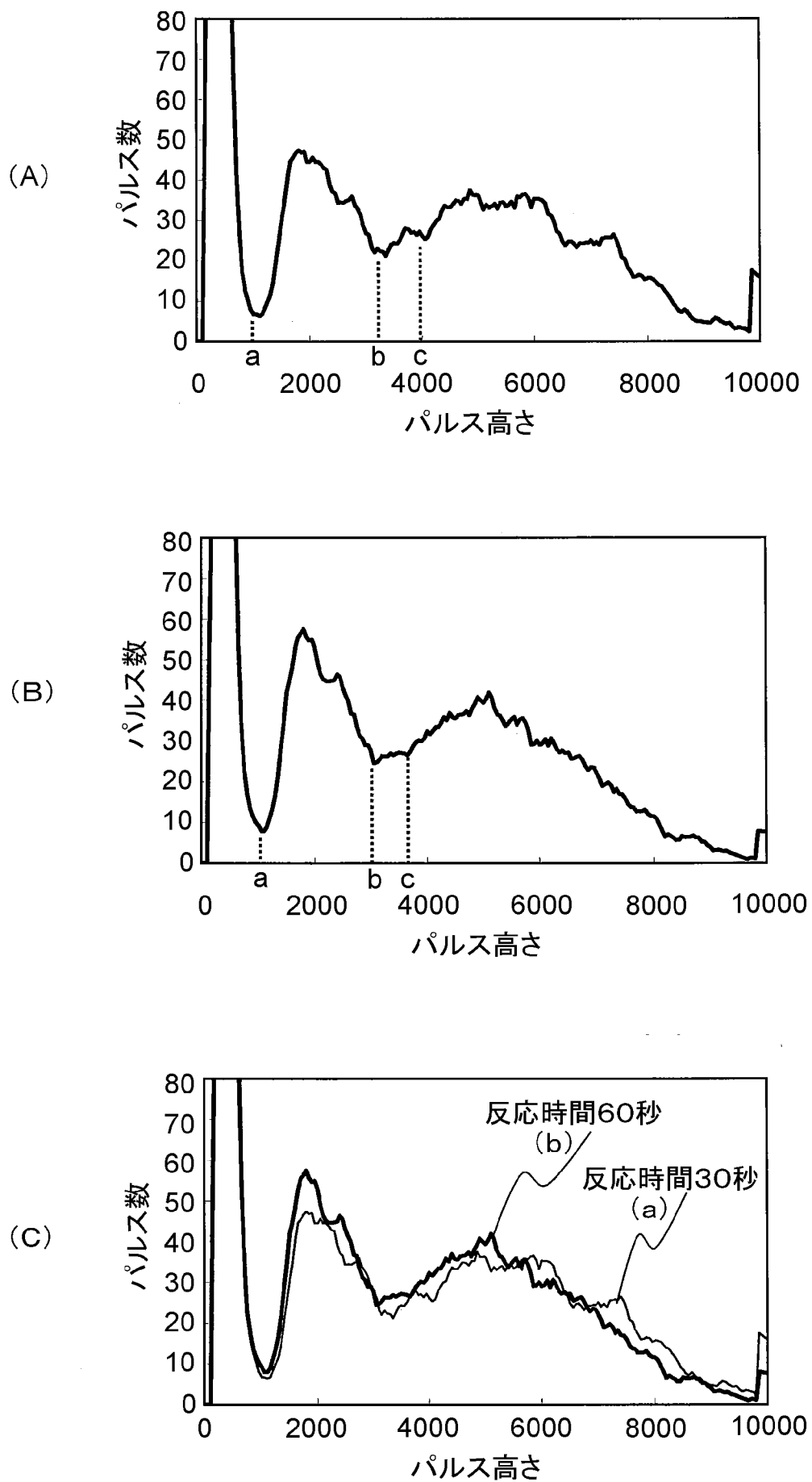
[図1]



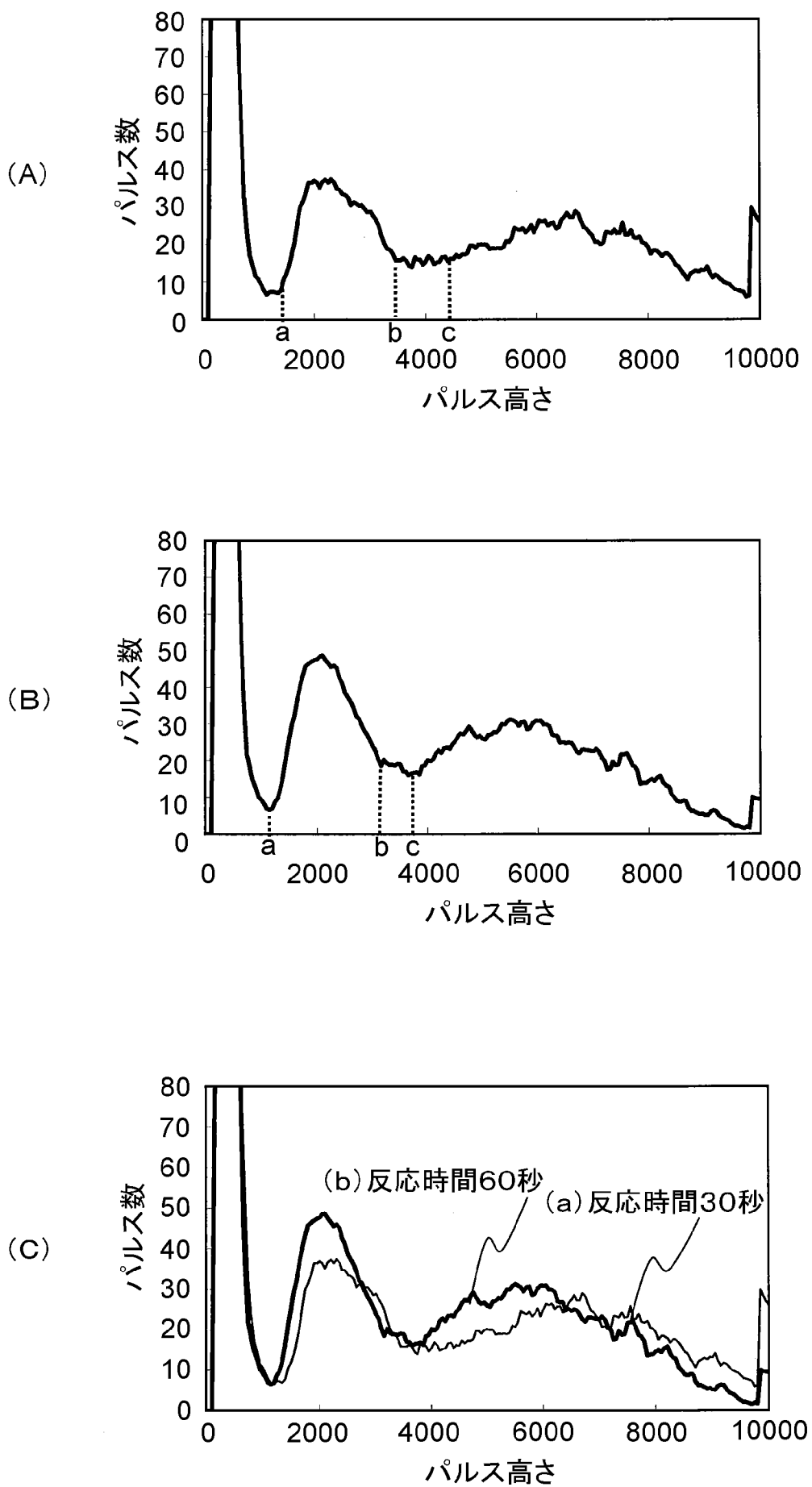
[図2]



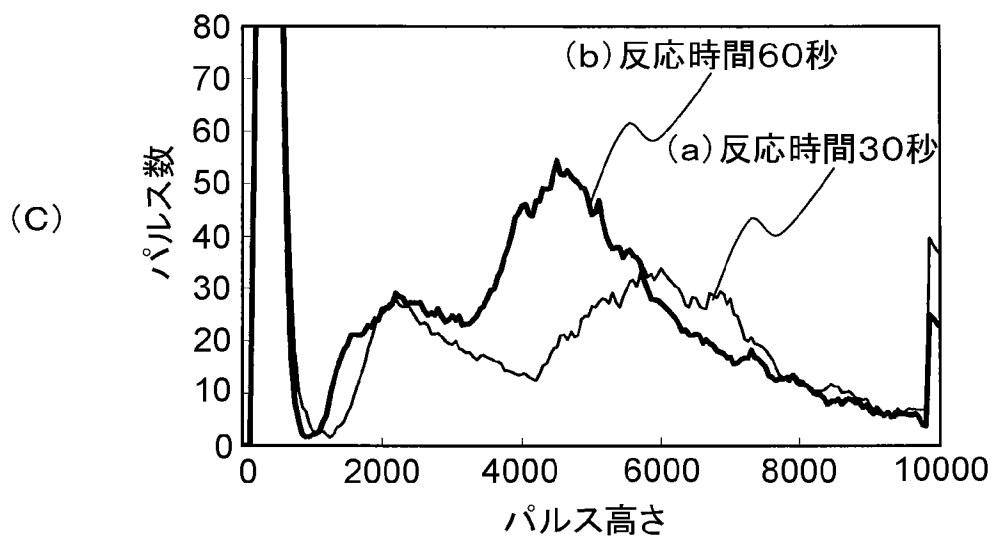
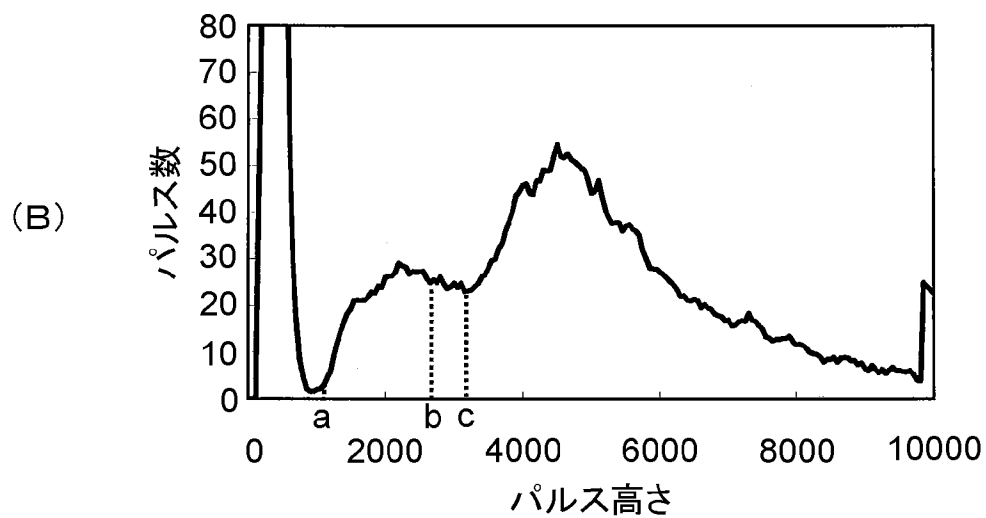
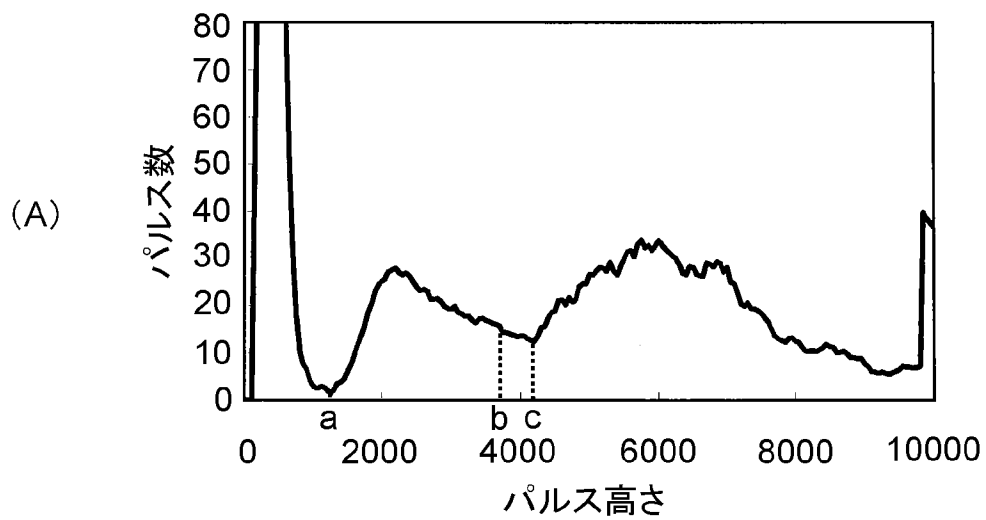
[図3]



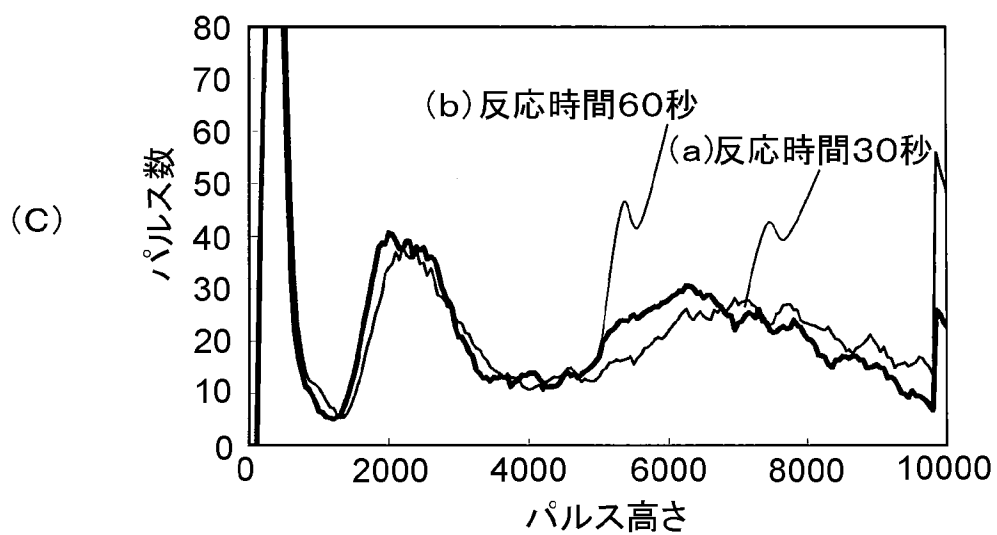
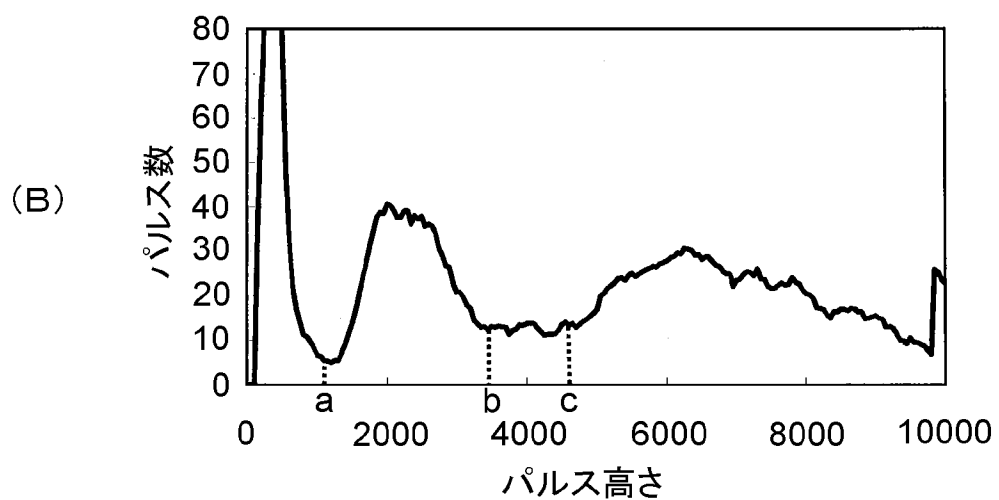
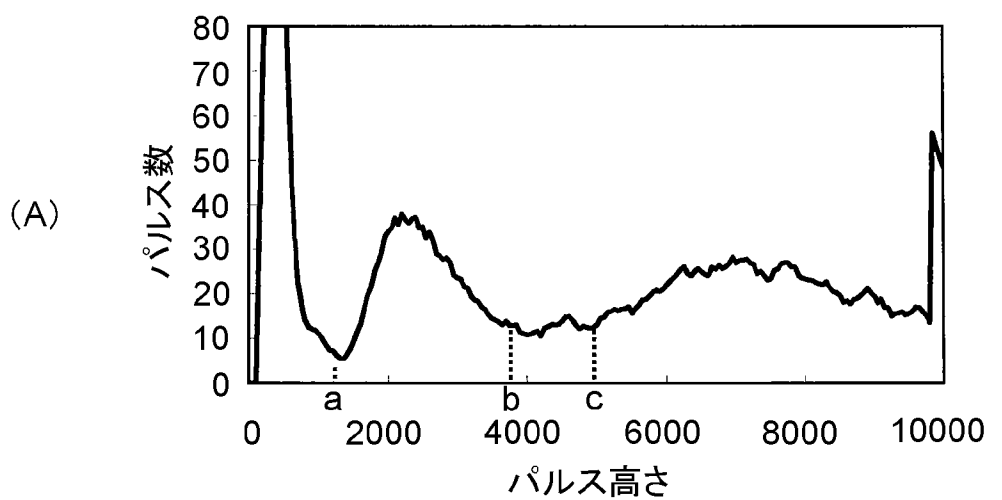
[図4]



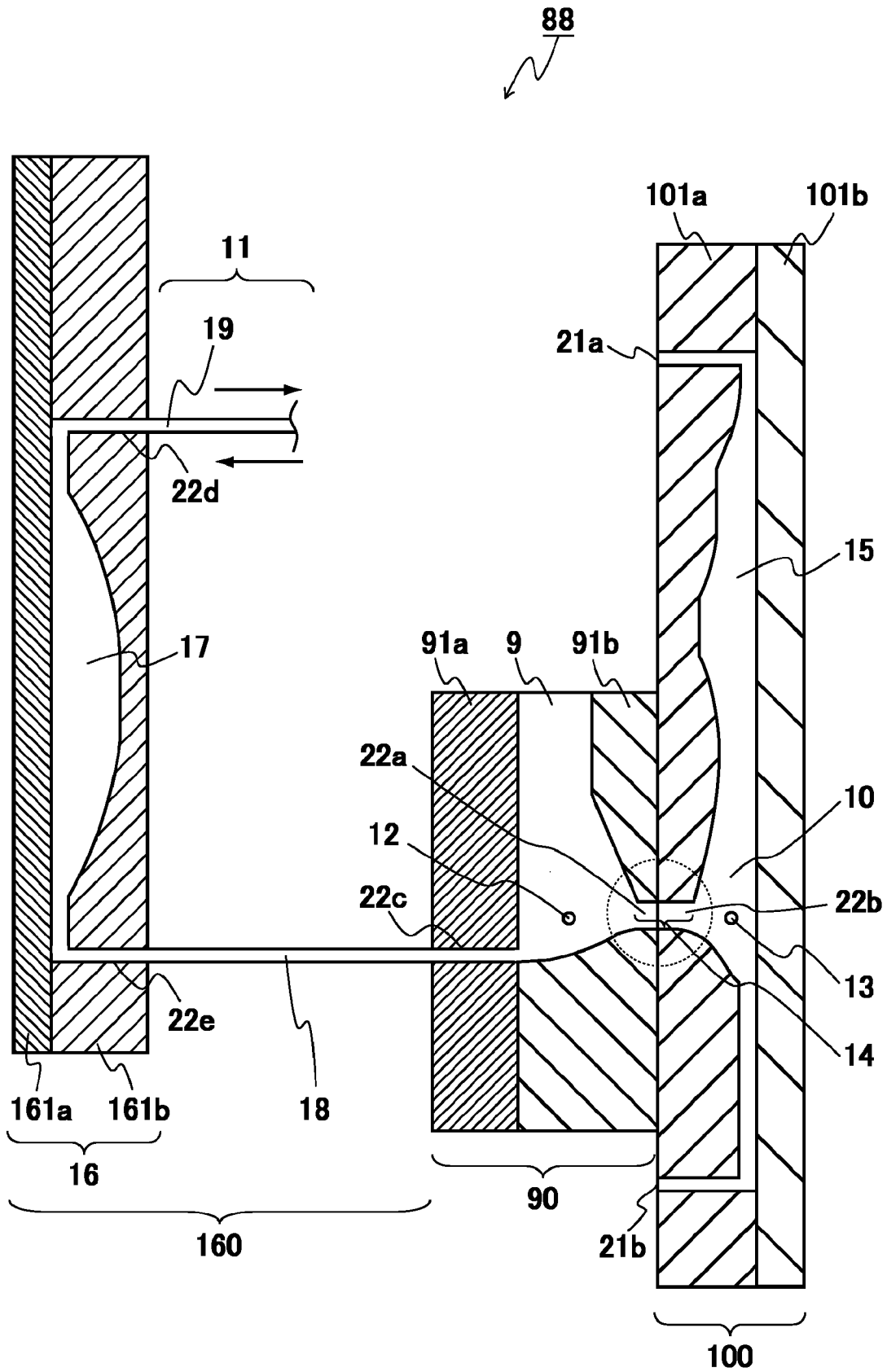
[図5]



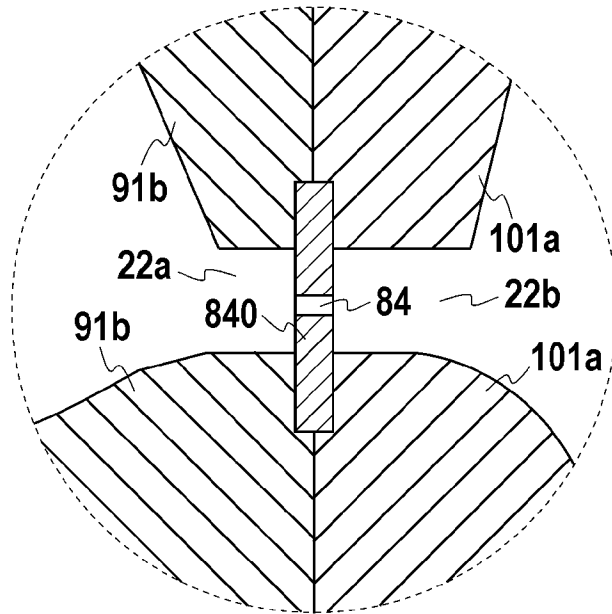
[図6]



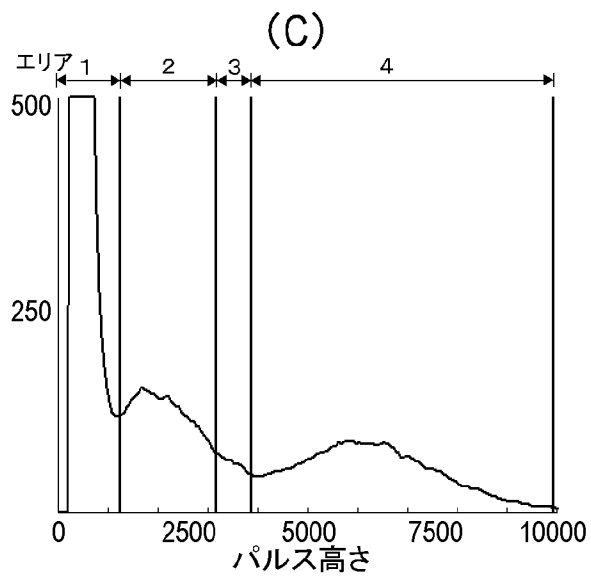
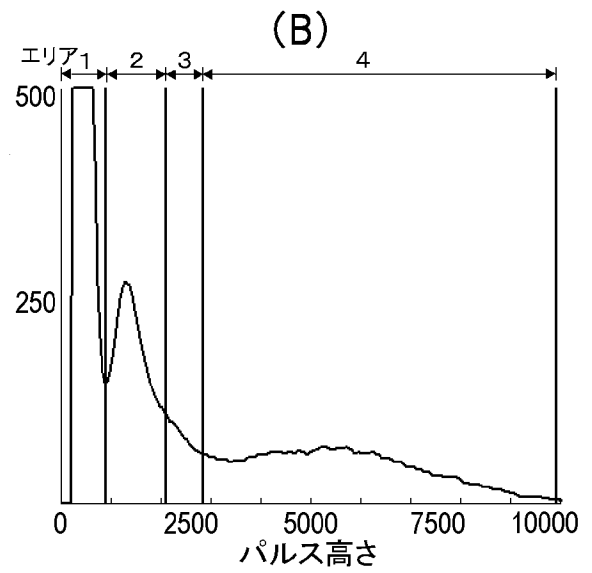
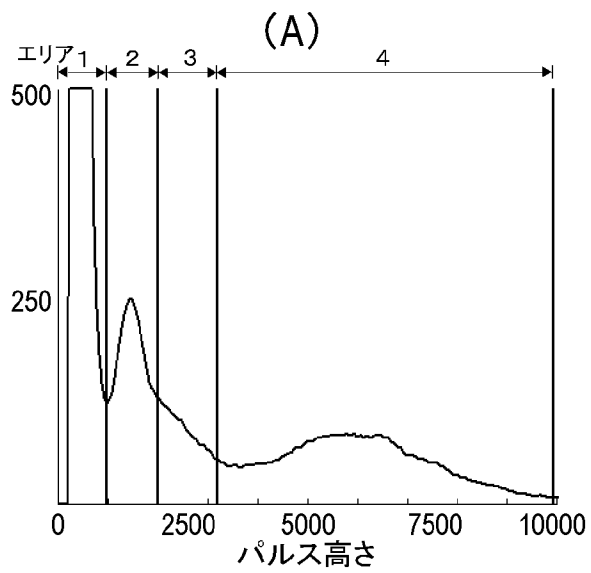
[図7]



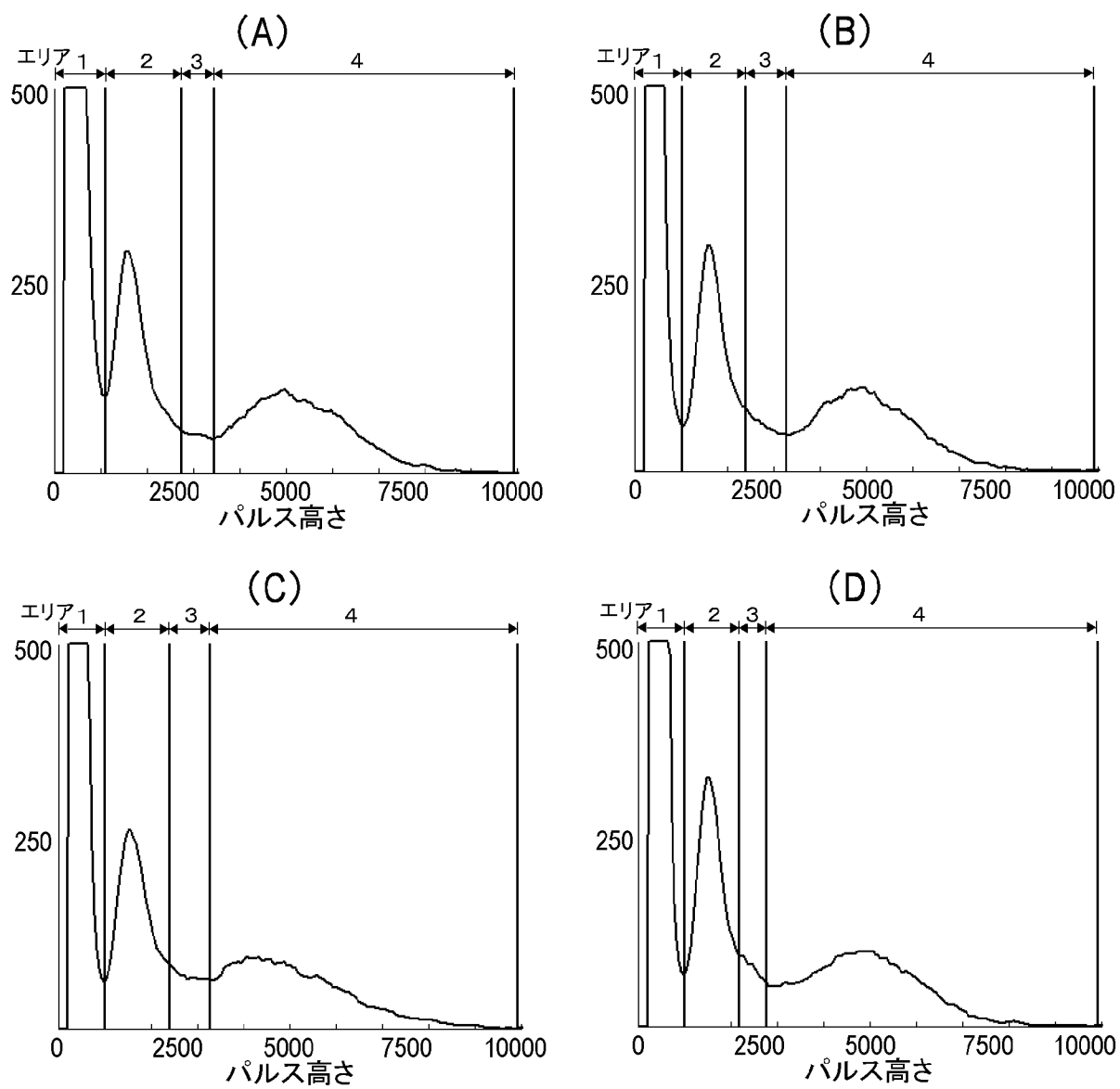
[図8]



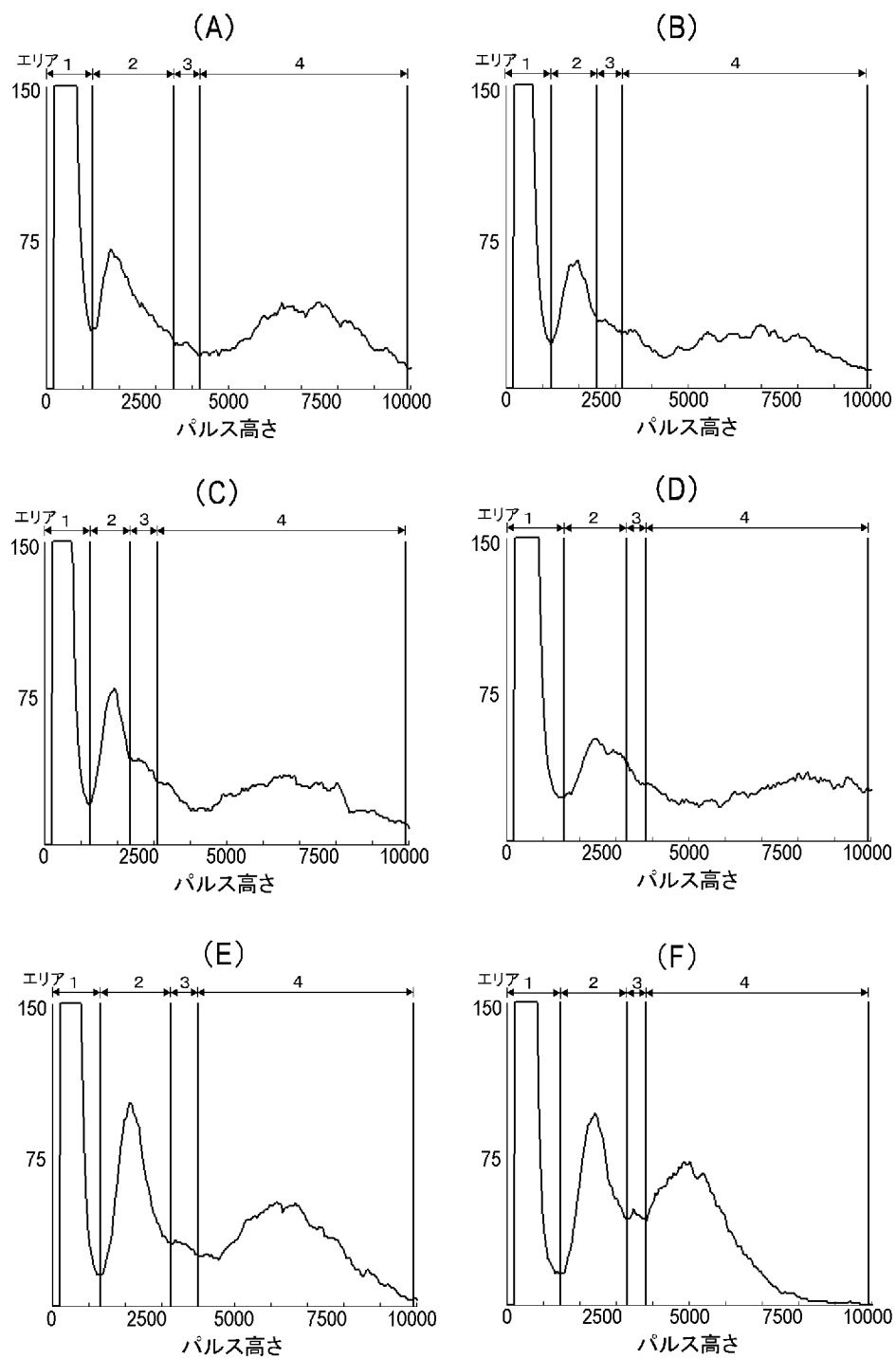
[図9]



[図10]



[図11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2009/058489

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
G01N33/49 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
G01N33/49

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2009
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2009	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2009

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	JP 06-273413 A (Toa Medical Electronics Co., Ltd.), 30 September, 1994 (30.09.94), Claims; Par. Nos. [0005], [0031] & US 5413938 A & EP 617281 A3 & DE 69419053 C & ES 2132352 T & CA 2119390 A & CN 1095481 A	1-5, 15-18/ 6-14, 19-21
Y	JP 10-160730 A (Abbot Laboratories), 19 June, 1998 (19.06.98), Par. No. [0071] & US 5656499 A & US 5631165 A & WO 1996/004542 A1 & DE 69527292 D & AU 3071895 A & CA 2193510 A & ES 2180650 T	6-14, 19-21

Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 08 July, 2009 (08.07.09)	Date of mailing of the international search report 21 July, 2009 (21.07.09)
---------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------

Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2009/058489

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2002-277380 A (Horiba, Ltd.), 25 September, 2002 (25.09.02), Claims; Par. No. [0002]; Figs. 1, 3 (Family: none)	12-14
A	JP 61-502277 A (Coulter Electronics Inc.), 09 October, 1986 (09.10.86), & US 4751179 A & EP 185048 A & WO 1985/005684 A1 & DE 3587036 A	1-21
A	JP 2003-329668 A (Sysmex Corp.), 19 November, 2003 (19.11.03), & US 2003/0219850 A1	1-21

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/49(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/49

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2009年
日本国実用新案登録公報	1996-2009年
日本国登録実用新案公報	1994-2009年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X/Y	JP 06-273413 A (東亜医用電子株式会社) 1994. 09. 30, 【特許請求の範囲】、【0005】、【0031】 & US 5413938 A & EP 617281 A3 & DE 69419053 C & ES 2132352 T & CA 2119390 A & CN 1095481 A	1-5, 15-18/ 6-14, 19-21
Y	JP 10-160730 A (アボット・ラボラトリーズ) 1998. 06. 19, 【0071】 & US 5656499 A & US 5631165 A & WO 1996/004542 A1 & DE 69527292 D & AU 3071895 A & CA 2193510 A & ES 2180650 T	6-14, 19-21

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献
 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

08.07.2009

国際調査報告の発送日

21.07.2009

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
 郵便番号100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

白形 由美子

2 J

3 4 9 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2002-277380 A (株式会社堀場製作所) 2002. 09. 25, 【特許請求の範囲】、【0002】、【図1】、【図3】 (ファミリーなし)	12-14
A	JP 61-502277 A (クールター・エレクトロニクス・インコーポレーテッド) 1986. 10. 09, & US 4751179 A & EP 185048 A & WO 1985/005684 A1 & DE 3587036 A	1-21
A	JP 2003-329668 A (シスメックス株式会社) 2003. 11. 19, & US 2003/0219850 A1	1-21