

修正
補充
年 月 日

379284

公告本

A4
C4

申請日期	86.3.4
案 號	86/02539
類 別	In. Cl. 6 G 01 N 33/49

(以上各欄由本局填註)

379284

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	網狀紅血球測定用試藥
	英 文	AGENT FOR DETECTING RETICULOCYTE
二、發明 人	姓 名	1. 赤井保正 2. 糸瀨裕司 3. 畑中加代 4. 坂田 孝
	國 籍	日本國
	住、居所	1. 2. 3. 4. 日本國神戶市中央區脇濱海岸通1丁目5番1號 西斯美股份有限公司內
三、申請人	姓 名 (名稱)	西斯美股份有限公司
	國 籍	日本國
	住、居所 (事務所)	日本國神戶市中央區脇濱海岸通1丁目5番1號
	代 表 人 姓 名	家次恒

裝

訂

線

修正
補充
年 月 日

379284

公告本

A4
C4

申請日期	86.3.4
案 號	86/02539
類 別	In. Cl ⁶ 6/1133/49

(以上各欄由本局填註)

379284

發明專利說明書

一、發明 名稱	中 文	網狀紅血球測定用試藥
	英 文	AGENT FOR DETECTING RETICULOCYTE
二、發明 人	姓 名	1. 赤井保正 2. 糸瀨裕司 3. 畑中加代 4. 坂田 孝
	國 籍	日本國
	住、居所	1. 2. 3. 4. 日本國神戶市中央區脇濱海岸通1丁目5番1號 西斯美股份有限公司內
三、申請人	姓 名 (名稱)	西斯美股份有限公司
	國 籍	日本國
	住、居所 (事務所)	日本國神戶市中央區脇濱海岸通1丁目5番1號
	代 表 人 姓 名	家次恒

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大類：
I P C分類：

A6

B6

本案已向：

國(地區) 申請專利，申請日期： 案號： ，☒有 ☐無主張優先權
日本 1996年4月12日 特願平8-91355(主張優先權)

有關微生物已寄存於：

，寄存日期：

，寄存號碼：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

[發明所屬之技術範疇]

本發明係有關網狀紅血球測定用試藥及其測定方法。詳言之，係有關臨床檢查領域中用以測定血液中之網狀紅血球及網狀紅血球成熟指數之試藥及測定方法。

[習知技術及本發明預期解決之問題]

網狀紅血球是骨髓中之紅血球母細胞經脫核而釋出於末梢血液中之幼年紅血球。網狀紅血球是細胞成熟過程之中間體，其細胞內含有成熟紅血球中所無之少量RNA或微脂體、粒腺體等小胞器為其特徵。

在臨床檢查領域中，網狀紅血球之分類計數對患者骨髓內造血狀態之掌握極為重要。骨髓造血功能正常之健康人的網狀紅血球數占全體紅血球之0.5~3%，骨髓造血機能異常時，例如骨髓造血機能呈被抑制狀態時，網狀紅血球數減少，反之，當骨髓造血機能呈亢進狀態時則數目增加。具體而言，再生不良性貧血、對惡性腫瘤進行化學治療等狀況時數目減少；溶血性貧血等狀況時數目增加。

習用之網狀紅血球計數方法係包括將血液樣品與含有新亞甲基藍(NMB)、亮晶藍(BCB)等塩基性色素之染液混合，使網狀紅血球中所含上述殘存物質析出並染色，再用顯微鏡觀察各個細胞以辨別成熟紅血球與網狀紅血球的人工操作法。

但是人工操作法有樣品製備程序煩雜、易發生檢查技師進行細胞判別時之個人間差別，或者因為細胞計數之數目少而導致統計學上發生大誤差等問題。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

始

五、發明說明 (2)

為解決這些問題，可採用螢光性之塩基性色素取代上述塩基性色素對網狀紅血球進行螢光染色，再以流動式細胞計數器測定細胞之前方散射光強度及螢光強度，主要藉由螢光強度之差來辨別及分類計數成熟紅血球與網狀紅血球之方法（流動式細胞計數器法）。使用於此方法之色素為，例如，吖啶橙、噻啞橙、金胺-O (Auramine O) 等，均已廣為人知。

此一方法係藉由網狀紅血球之螢光強度對網狀紅血球之成熟度進行分類計數，也能夠算出網狀紅血球成熟指數。具有高螢光強度之網狀紅血球比率，亦即最幼年網狀紅血球之比率，已知可作為骨髓造血機能回復之指標，其利用性廣受期待。

但是，用來激發螢光色素之光源必需使用非常高價而且大型的氬氣雷射，設備本身有高價而且大型化之問題發生。此外，能夠用於流動式細胞計數器法之上述色素，除了金胺-O以外，對網狀紅血球進行染色都需時5分鐘以上，尤其是 Lee L. G. et. al.: Cytometry; 7:508-517 (1986) 文獻中指出噻啞橙必需要60分鐘以上之染色時間，使得樣品調製之全自動化遭遇困難，就省力化之觀點而言也有問題。樣品調製若由人工進行，則會有因為操作技巧或調製者不同而造成差別，尤其是網狀紅血球成熟指數數據會造成偏差等之缺點。

美國專利第5,360,739號揭示使用較便宜的He/Ne雷射作為光源、採用噁嗪 (Oxazine) 750作為色素、測定散射光

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁）

訂

五、發明說明(3)

強度及吸光度或螢光強度以測定網狀紅血球之流動式細胞計數器法。但是並未觸及後述異常淋巴球等問題。

本案發明人亦針對能夠採用廉價小型光源之流動式細胞計數器法而正確且迅速測定網狀紅血球及網狀紅血球成熟指數之試劑及測定方法進行深入之檢討。尤其是出現異常淋巴球之特殊患者的檢體，由於淋巴球之螢光強度與網狀紅血球的螢光強度大致相同，因而不有不易辨別之問題。目前，在白血球與網狀紅血球之辨別有困難之情況下，能夠正確而且迅速測定之試劑及測定方法仍未能確立。此一事實在于市售之以氬雷射作為光源之流動式細胞計數器法使用之網狀紅血球測定套組 Retic-COUNT™ 之操作說明書中已明白揭示，使用該套組測定白血球數異常增加患者之檢體時，必需再以其他方法確認之事實有詳細記載。

[解決問題之手段]

依照本發明，可提供由至少一種對網狀紅血球具特異染色之色素以及至少一種對白血球具特異染色之色素所構成之網狀紅血球測定用試劑。

此外，亦提供使用上述試劑測定網狀紅血球的方法。

[發明之實施形態]

本發明對上述之特殊患者檢體，亦即異常淋巴球大量出現之患者檢體，提供一種能正確而且迅速測定網狀紅血球之試劑及測定方法。本發明之試劑可配合流動式細胞計數器法使用。歸納言之，對出現多數異常淋巴球之患者檢體使用本發明之試劑時，由於能夠使成熟紅血球及網狀紅

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

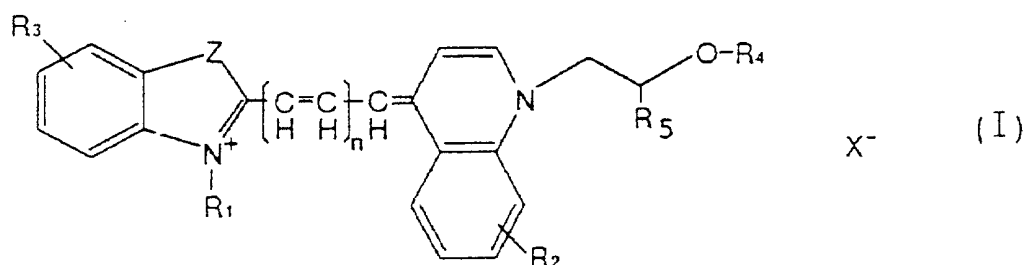
五

五、發明說明(4)

血球之螢光強度不改變而僅強化白血球之螢光強度，因而能夠以高精密度分類計數網狀紅血球。

本發明之試劑是由對網狀紅血球具特異性染色之色素與對白血球具特異性染色之色素所構成。對網狀紅血球具特異性染色之色素意指對網狀紅血球與其他血球具有足以識別程度之染色的色素，例如可舉式(I)之化合物為例。

[化5]



式中，R₁示氫原子或低級烷基；R₂及R₃為相同或相異，示氫原子、低級烷基、或低級烷氧基；R₄示氫原子、鹵基、或低級烷基；R₅示氫原子、有或無取代基之低級烷基；Z示硫原子、氧原子、或被低級烷基取代之碳原子；n為1或2；X示陰離子。

式(I)R₁位置之低級烷基，意指1~6碳之直鏈或支鏈烷基，例如甲基、乙基、丙基、丁基、異丁基、第二級丁基、第三級丁基、戊基、己基等，其中以甲基及乙基較佳。

R₂及R₃位置之低級烷基與上述相同，低級烷氧基意指1~6碳之烷氧基，例如甲氧基、乙氧基、丙氧基等，其中以甲氧基及乙氧基較佳。然而，R₂及R₃若為氫原子則更佳。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

考

訂

線

五、發明說明(5)

R₄位置之醯基較好為脂肪族羧酸衍生之醯基，例如可舉乙醯基與丙醯基為例，其中以乙醯基較佳。此外，低級烷基與上述相同。

R₅位置之低級烷基與上述相同，有或無取代基之低級烷基意指有1~3個羥基或鹵素原子(例如氟、氯、溴、碘)等取代基或無取代基之低級烷基。其中以羥甲基與羥乙基較佳。

Z位置之低級烷基與上述相同，Z較好為硫原子。

以X⁻代表之陰離子可例舉如鹵素離子(氟、氯、溴、碘等離子)、鹵化硼離子(BF₄⁻、BCl₄⁻、BBr₄⁻等)、磷化物離子、鹵酸離子、氟硫酸離子、甲基硫酸離子、在苯環上具有鹵素原子或鹵烷基作為取代基之四苯基硼化物離子等。其中以溴離子與BF₄⁻較佳。

式(I)之具體化合物可例示如下：

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

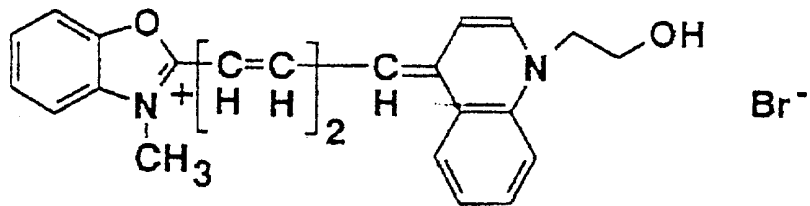
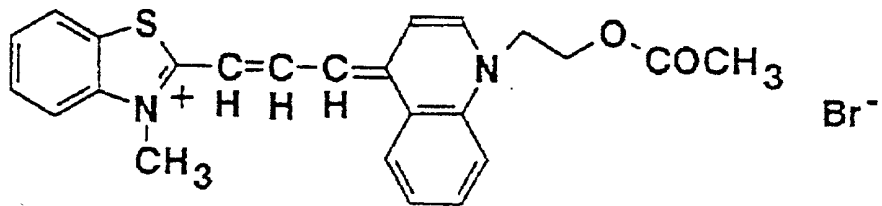
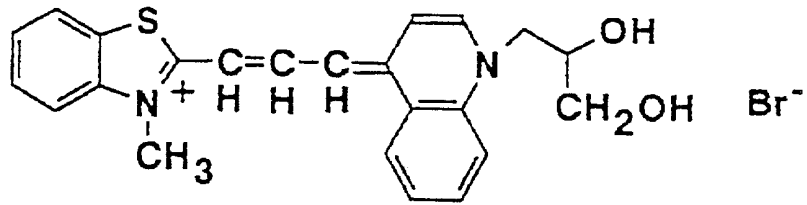
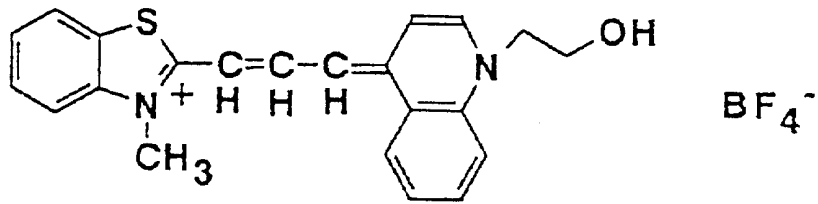
裝

訂

線

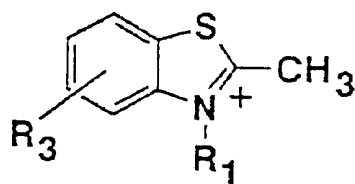
五、發明說明 (6)

[化 6]



上述式 (I) 之化合物中， $n=1$ 可藉下述方法製得，亦即，例如將下式化合物：

[化 7]



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

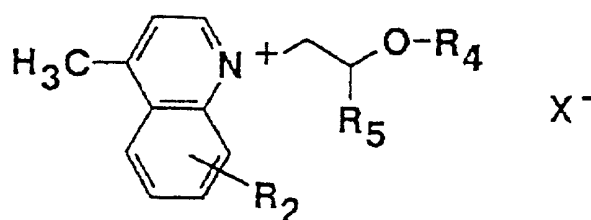
訂

頁

五、發明說明 (7)

與 N,N-雙取代甲脒反應，再將所得生成物與下式所示之喹啉衍生物反應，

[化 8]

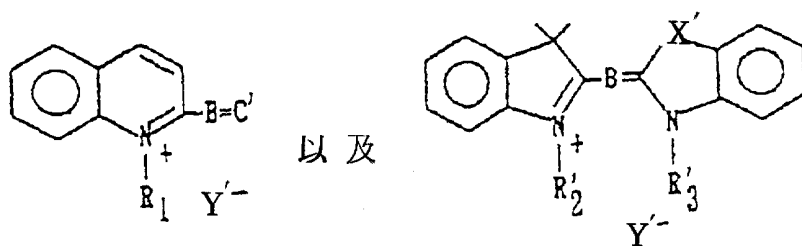


接著再以硼氟化鈉處理，即可順利合成。

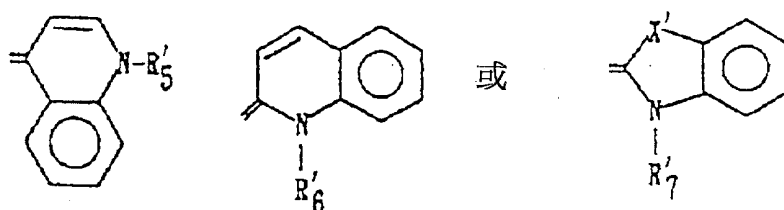
此外，式 (I) 之化合物中，n=2 之化合物可藉例如以丙二醛雙(苯基亞胺)鹽取代上述反應中之 N,N-雙取代甲脒進行反應而順利合成。

其他可使用之色素可例舉如下構造式所示之化合物，

[化 9]



[式中，B 為 $\text{-(CH=CH)-}_n\text{-CH=}$ (n'=0, 1, 2) 或 $\text{-CH=C(R}_4\text{)-CH=}$; C' 為



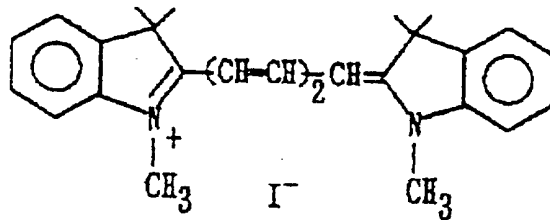
五、發明說明(8)

; X' 為 O、S、Se、或 $C(CH_3)_2$; Y' 為 Cl、Br、或 I;

R'1、R'2、R'3、R'4、R'5、R'6、及 R'7 為相同或相異，
示低級烷基、低級炔基、或鹵化低級烷基]可具體例舉如下：

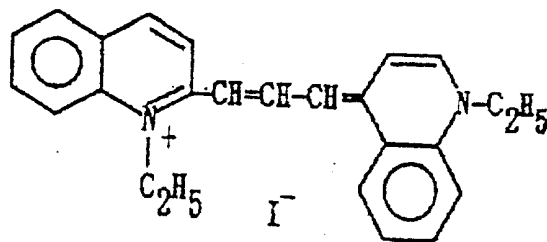
(1) 1,1',3,3,3',3'-六甲基吡啶二碳花青苷碘化物 (HIDC1, 可由 LAMBDA PHYSIK 公司取得)

[化 10]



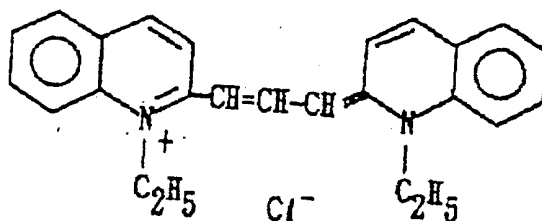
(2) 1,1'-二乙基-2,4'-奎諾碳花青苷碘化物 (NK-138, 可由日本感光色素研究所取得)

[化 11]



(3) 頻那氰醇氯化物 (pinacyanol chloride)

[化 12]



(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

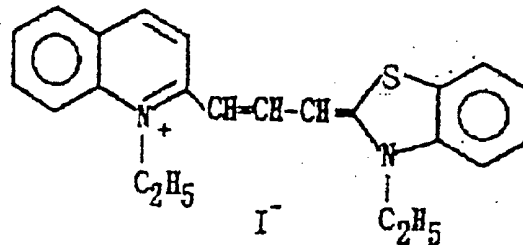
訂

治

五、發明說明(9)

(4) 1,3'-二乙基-2,2'-奎諾硫代碳花青苷碘化物

[化 13]

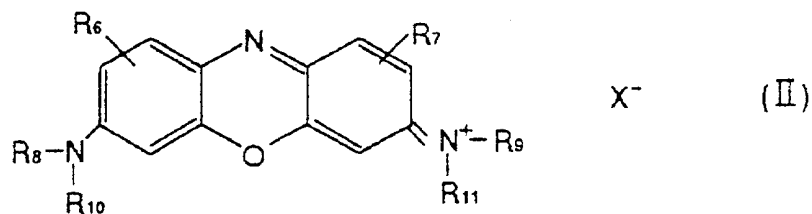


此外，其他習知之作為網狀紅血球檢出用之色素，例如噁嗪 750 等亦可使用。

本發明之試劑中，上述色素之用量應為可充分對網狀紅血球染色之量，可依照色素之種類及試劑之組成加以適當調整。例如為 0.1~100 mg/l 左右，以 0.3~30 mg/l 左右較佳，0.3~3 mg/l 更佳。

對白血球具特異染色之色素可例舉如式 (II) 及式 (III) 所示之色素。

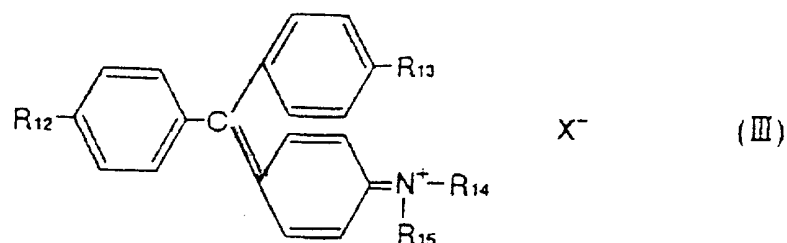
[化 14]



式中， R_6 及 R_7 為相同或相異，示氫原子、低級烷基、低級烷氧基、或苯基； $R_8 \sim R_{11}$ 為相同或相異，示氫原子或低級烷基； X^- 示陰離子。

[化 15]

五、發明說明(10)



式中， R_{12} 及 R_{13} 為相同或相異，示氫原子、低級烷基、低級烷氧基、或具有低級烷基取代之胺基； R_{14} 及 R_{15} 為相同或相異，示氫原子或低級烷基； X^- 示陰離子。

上述式(II)及(III)之低級烷基及低級烷氧基係與上述者相同。

本發明之試劑中，上述色素之用量應為可以充分對白血球染色但不妨碍網狀紅血球測定用色素對網狀紅血球染色之濃度。可依照色素種類及試劑組成加以適當調整。例如為 $0.001 \sim 200 \text{ mg/l}$ 左右、以 $0.003 \sim 3 \text{ mg/l}$ 左右較佳、 $0.003 \sim 0.03 \text{ mg/l}$ 更佳。

在本發明試劑之組成中，對網狀紅血球具特異染色之色素能夠迅速滲透至紅血球中對細胞內之RNA進行染色，因此僅使用此種對網狀紅血球具特異染色之色素也能夠對網狀紅血球進行分類計數。但是在急性淋巴性白血病等淋巴球系之異常細胞大量出現之特別情況下，淋巴球與未成熟網狀紅血球之螢光強度幾乎相等，兩者之辨別會有困難。

另一方面，在本發明之試劑中，對白血球具有特異染

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (11)

色之色素在上述濃度下能夠僅針對白血球進行特異染色。對白血球具特異染色之色素雖然隨色素種類而有差異，但大致上均能夠對白血球中之網狀紅血球所無之顆粒成分或細胞核進行特異性染色而使白血球之螢光強度增強，因此使得網狀紅血球與白血球之螢光強度產生明顯差別，亦即白血球之螢光強度變得比網狀紅血球之螢光強度更強而網狀紅血球之螢光強度則未改變，因而縱使在上述異常情況下，兩者也能順利辨別。

此處雖然以能夠被紅光之波長激發之色素為例，但是本發明並不受此限制，也能夠組合應用可被例如青光之波長等其他波長激發之色素，在此種情況下也能實現提昇網狀紅血球與白血球之辨別能力的目的。

本發明之試劑中亦能進一步含有抑制紅血球之非特異性染色之多價陰離子、緩衝劑、滲透壓補償劑、及/或染色促進劑等。

本案發明人在檢討試劑組成時，發現以一般染色液中使用之 NaCl (特別是 Cl^-) 作為滲透壓補償劑之主成分時，紅血球之非特異性螢光較強而網狀紅血球之特異性螢光較弱，結果使紅血球與網狀紅血球之辨別愈形困難。另外亦發現以多價陰離子取代染色液中之 Cl^- 時，成熟紅血球之非特異性螢光被顯著抑制，紅血球與網狀紅血球之辨別更為容易。因此，本發明之試劑中以含有多價陰離子較佳。多價陰離子中特別是以硫酸離子、磷酸離子、碳酸離子、以及多價羧酸離子為較佳。能夠供給這些離子之化合物，

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

可例舉如檸檬酸、硫酸、磷酸、EDTA、或此等酸之鹼金屬鹽等。多價陰離子之濃度以占試劑中全部陰離子成分之50%以上為佳，以70%以上為更佳。

本發明之試劑中，亦可含有用來保持固定pH條件之緩衝劑。緩衝劑保持固定pH而能保持網狀紅血球染色結果之安定，因而常使用數mM~100mM左右之濃度。緩衝劑之種類並無特別限制，只要是通常使用者均可使用，例如羧酸鹽類、磷酸鹽、古德氏緩衝液(Good's buffer)、胺基乙磺酸、三羥三乙胺等均能配合預定之pH適當使用。本發明試劑之適當pH隨使用之色素而異，一般為6.0~11.0之範圍，以7.0~10.0較佳，8.0~9.5之範圍更佳。pH低於上述範圍時，紅血球呈脆弱化而易溶血，難以正確測定網狀紅血球。pH太高時，紅血球膜上之酸性官能基發生解離，呈現容易與陽離子性色素結合狀態，使紅血球之非特異性螢光增強，使得成熟紅血球與網狀紅血球之辨別更趨困難而不佳。上述多價陰離子若具有將pH調整於適當pH範圍之緩衝能力，則能兼作緩衝劑使用。

此外，本發明之試劑中亦可含有滲透壓補償劑。為了防止紅血球在低張溶液中發生溶血現象而希望將滲透壓調節於生理學上的適當範圍，通常調整為150~600mOsm/kg之範圍。滲透壓補償劑並無特殊限制，例如丙酸等之鹼金屬鹽、葡萄糖、甘露糖等糖類都適用。用量若未超過試劑中全部陰離子成分之50%，則亦能使用NaCl等鹼金屬鹵化物或鹼土金屬鹵化物。然而，上述之多價陰離子及緩衝劑

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

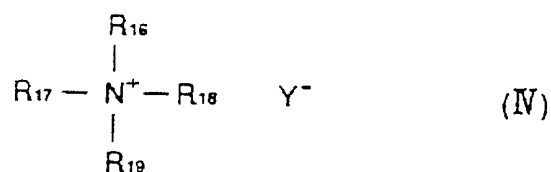
線

五、發明說明 (13)

若能將滲透壓調整於適當範圍時，則不必要含有滲透壓補償劑。

本發明之試劑中，亦可含有如式 (IV) 所示之陽離子性界面活性劑作為染促進劑。

[化 16]



式中， R_{16} 為 8~12 碳之烷基； R_{17} 、 R_{18} 、及 R_{19} 為相同或相異，示低級烷基； Y^- 示鹵素離子。

式中，8~12 碳之烷基包括直鏈及支鏈之烷基，例如辛基、癸基、月桂基等。其中以辛基與癸基較佳。

此外，低級烷基與前述者相同。

陽離子性界面活性劑之具體例可例舉如溴化辛基三甲基銨 (OTAB)、溴化癸基三甲基銨 (DTAB)、氯化月桂基三甲基銨 (LTAC) 等。

作為染色促進劑之陽離子性界面活性劑的濃度隨總碳數增加而其有效用量減少。例如 OTAB 為 300~20000 mg/l、DTAB 為 500~3000 mg/l、LTAC 為 50~250 mg/l 較佳。陽離子性界面活性劑之作用機制尚不明確，一般認為與紅血球細胞膜進行某種相互作用而使色素透過性亢進之故。因此試劑中含多量染色促進劑時會對紅血球造成傷害，某些情況下甚至引起溶血而不佳。

陽離子性界面活性劑尚有使紅血球細胞呈球狀化之作

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

海

五、發明說明 (14)

用，可使紅血球集團之前方散射光強度分布較為集中，結果使血小板與紅血球系細胞之辨別較為容易。此外，例如缺鐵性貧血等小球性紅血球症之治療過程中，血液中有疾病造成的小球性紅血球與正球性紅血球混雜存在，本發明之試劑基於對前方散射光強度之影響而能夠順利分辨兩者，對於僅少量發生之橢圓紅血球也同樣能夠分辨。藉由陽離子性界面活性劑的此種紅血球球狀化作用，於測定網狀紅血球之同時，也能夠檢出小球性紅血球或橢圓紅血球等紅血球之形態異常現象。

本發明之試劑除了上述構成成分外，亦可含有例如 2-吡啶基硫-1-氧化鈉等防腐劑。

若本發明之試劑中使用之色素在水溶液中不安定時，可將色素溶解保存於例如乙醇、二甲亞砜、乙二醇等適當的水溶性非水溶劑中，使用時再與含有其他成分之水溶液混合使用。各色素可溶解於同一種非水溶劑中，亦可分別溶解於各種非水溶劑中。

本發明之試劑配合使用流動式細胞計數器測定網狀紅血球時特別有效。

首先，步驟(1)係將本發明之網狀紅血球測定試劑與血液樣品混合調製成測定用樣品。血液樣品只要是含有測定對象之血液成分的樣品都適用，例如經抗凝劑處理的末梢血液或骨髓液等。關於測定樣品之調製，以將網狀紅血球測定用試劑與血液樣品依照 100:1~1000:1 之比例混合反應為宜，此時之反應溫度以 25~50℃ 左右為宜，以 35~

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

五

五、發明說明 (15)

45℃較佳。適當之反應時間隨試劑中所含之色素而異，以10秒～5分鐘左右為宜，以20秒～2分鐘左右較佳、20～60秒左右更佳。

步驟(2)係將步驟(1)製得之測定用樣品導入具有紅色波長光源之流動式細胞計數器之流體系中。關於作為紅色波長之光源，只要是能夠發射所使用色素(螢光色素)之激發波長附近之光線的光源，例如600～680nm左右波長光線之光源都能採用而無特別限制。可例舉如He/Ne雷射、紅色波長範圍之半導體雷射等。此處使用具有紅色波長光源之流動式細胞計數器之光學部分示如第1圖。半導體雷射1之前方有集光透鏡系2，其後配置流體槽3。流體槽3之前方有光束遮斷器4，其後配置前方散射光使用之受光透鏡5以及光二極體6。流體槽3之側方配置有側方螢光使用之受光透鏡7，其後配置板狀通路濾波器8以及光電子擴增管9。至於流體部、數據處理部等其他裝置之構成部分可採用習知之構成經改良後使用。

步驟(3)係以上述紅色波長之光線照射順流中流動之細胞，步驟(4)係測定由細胞發生之散射光及螢光。此情況之散射光可能是前方散射光或側方散射光之任一者，前方散射光又可能為前方低角度散射光(1～5°)或前方高角度散射光之任一種。散射光是能夠反映豐富細胞資訊之參數，其他能夠測定豐富細胞資訊的方法可例舉如電阻法。視情況亦能夠以電阻法測定電阻信號來取代散射光之測定。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (16)

步驟 (5) 係由散射光強度或散射光強度與螢光強度之散射圖形分辨血小板與其他細胞。

步驟 (6) 係由螢光強度或螢光強度與散射光強度之散射圖形分辨紅血球、網狀紅血球，以及白血球。

步驟 (7) 係進行紅血球及網狀紅血球之分類計數，算出這些細胞數及細胞比率。

再依照網狀紅血球之成熟度差別，具體而言係依據螢光強度之差異進行分類計數，亦可算出全部網狀紅血球所占之比例。

[實施例]

實施例 1

調製下列組成之網狀紅血球測定用試劑。	3 mg
對網狀紅血球具特異性染色之色素 A	0.03 mg
對白血球具特異性染色之色素 B	1.79 g
Tricine 緩衝劑 [N-三(羥甲基)甲基甘胺酸]	29.4 g
檸檬酸三鈉鹽 · 2H ₂ O (多價陰離子)	150 mg
LTAC (陽離子性界面活性劑、染色促進劑)	1 g
純水	
(以氫氧化鈉調整 pH9.0)	

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

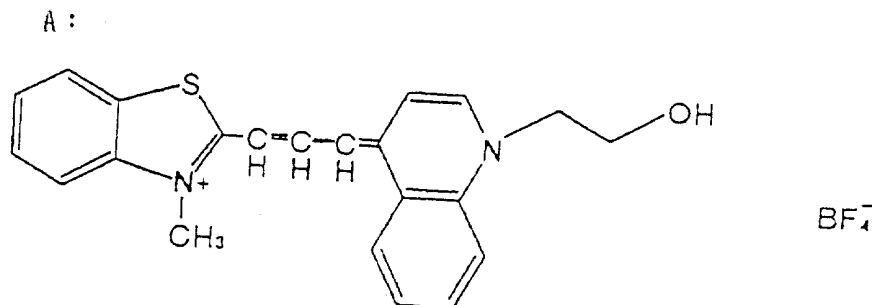
裝

訂

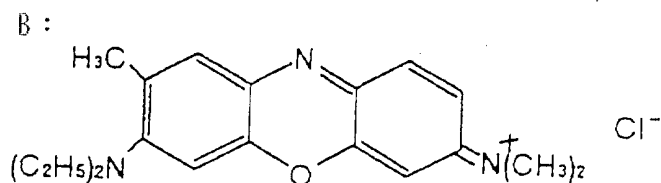
線

五、發明說明 (17)

[化 17]



[化 18]



噁 嗟 170

將經過抗凝劑處理之正常人血液 $10\ \mu\text{L}$ 加至 2ml 試劑中，於 40°C 反應 120 秒後作為測定用樣品，使用第 1 圖所示之光學部件測定前方散射光強度及螢光強度。第 2 圖所示之散射圖形中網狀紅血球之比率為 2.0%。另外以東亞醫用電子公司製備之 R-2000 儀器作為對照，測定結果亦為 2.0%。

對有淋巴系異常細胞出現之血液同樣進行測定，得到第 3 圖之散射圖形。該散射圖形能夠明白辨別網狀紅血球集團與白血球集團。

實施例 2

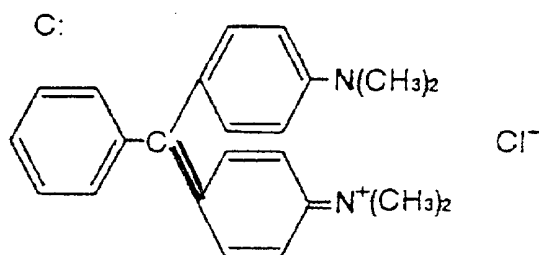
五、發明說明 (18)

調製下列組成之網狀紅血球測定用試劑。

對網狀紅血球具特異性染色之色素 A	3 mg
對白血球具特異性染色之色素 C	30 mg
Tricine 緩衝劑	1.79 g
檸檬酸三鈉鹽 · 2H ₂ O	29.4 g
LTAC	150 mg
純水	1 l

(以氫氧化鈉調整 pH9.0)

[化 19]



基底線 4 (Cl No. 42,000)

將經過抗凝劑處理之正常人血液 10 μ l 加至 2 ml 試劑中，於 40℃ 反應 120 秒後作為測定用樣品，使用第 1 圖所示之光學部件測定前方散射光強度及螢光強度。第 4 圖所示之散射圖形中網狀紅血球之比率為 1.8%。另外以東亞醫用電子公司製備之 R-2000 儀器作為對照，測定結果為 1.7%。

比較例 1

調製下列組成之網狀紅血球測定用試劑。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

檢

五、發明說明 (19)

對網狀紅血球具特異性染色之色素 A	3 mg
Tricine 緩衝劑	1.79 g
檸檬酸三鈉鹽 + 2H ₂ O	29.4 g
LTAC	150 mg
純水	1 l

(以氫氧化鈉調整 pH9.0)

將經過抗凝劑處理之正常人血液 10 μ l 加至 2ml 試劑中，於 40℃ 反應 120 秒後作為測定用樣品，使用第 1 圖所示之光學部件測定前方散射光強度及螢光強度。第 5 圖所示之散射圖形中網狀紅血球之比率為 2.1%。另外以東亞醫用電子公司製備之 R-2000 儀器作為對照，測定結果為 2.0%。

對有淋巴系異常細胞出現之血液同樣進行測定，得到第 6 圖之散射圖形。該散射圖形不能夠明白辨別網狀紅血球集團與白血球集團。

[發明之效果]

依照本發明之試劑及測定方法，配合使用配備廉價小型光源之流動式細胞計數器法，對即使有異常淋巴球等出現之特殊檢體亦能正確而迅速地測定網狀紅血球。亦即，依照本發明之試劑及測定方法因為能夠使成熟紅血球及網狀紅血球之螢光強度不發生變化而僅增強白血球之螢光強度，因此對於即使是有異常淋巴球等出現之患者檢體，亦能以高精密度進行網狀紅血球之分類計數。

[附圖之簡單說明]

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (20)

第 1 圖表示本發明之測定方法中使用具有紅色波長光源之流動式細胞計數器之光學部分之概略圖。

第 2 圖表示使用本發明含有對網狀紅血球具特異性染色之色素 A 以及對白血球具特異性染色之色素 B 之網狀紅血球測定用試劑對正常人末梢血液樣品測定前方散射光強度及螢光強度時之散射圖形。

第 3 圖表示使用本發明含有對網狀紅血球具特異性染色之色素 A 以及對白血球具特異性染色之色素 B 之網狀紅血球測定用試劑對有異常淋巴球出現之患者的末梢血液樣品測定前方散射光強度及螢光強度時之散射圖形。

第 4 圖表示使用本發明含有對網狀紅血球具特異性染色之色素 A 以及對白血球具特異性染色之色素 C 之網狀紅血球測定用試劑對正常人末梢血液樣品測定前方散射光強度及螢光強度時之散射圖形。

第 5 圖表示使用僅含有本發明之對網狀紅血球具特異性染色之色素 A 之網狀紅血球測定用試劑對正常人末梢血液樣品測定前方散射光強度及螢光強度時之散射圖形。

第 6 圖表示使用僅含有本發明之對網狀紅血球具特異性染色之色素 A 之網狀紅血球測定用試劑對有異常淋巴球出現之患者的末梢血液樣品測定前方散射光強度及螢光強度時之散射圖形。

[符號之說明]

1 半導體雷射

2 集光透鏡系

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

五、發明說明 (21)

- 3 流體槽
- 4 光束遮斷器
- 5 前方散射光使用之受光透鏡
- 6 光二極體
- 7 側方螢光使用之受光透鏡
- 8 板狀通路濾波器
- 9 光電擴增管

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

泉

32 年 月 日 修正 補充

379284

A5
B5

四、中文發明摘要(發明之名稱:

網狀紅血球測定用試藥)

本發明係有關一種網狀紅血球測定用試藥及其測定方法。該試藥係由至少一種對網狀紅血球具特異性染色之色素以及至少一種對白血球具特異性染色之色素所構成。該試藥若與採用廉價小型光源之流動式細胞計數器法配合應用，則對即使有異常淋巴球等出現之特殊檢體亦能正確而迅速地測定其中之網狀紅血球。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

英文發明摘要(發明之名稱:AGENT FOR DETECTING RETICULOCYTE)

A reagent for measuring reticulocytes comprising at least one dye which specifically stains reticulocytes and at least one dye which specifically stains leukocytes.

32 年 月 日 修正 補充

379284

A5
B5

四、中文發明摘要(發明之名稱:

網狀紅血球測定用試藥)

本發明係有關一種網狀紅血球測定用試藥及其測定方法。該試藥係由至少一種對網狀紅血球具特異性染色之色素以及至少一種對白血球具特異性染色之色素所構成。該試藥若與採用廉價小型光源之流動式細胞計數器法配合應用，則對即使有異常淋巴球等出現之特殊檢體亦能正確而迅速地測定其中之網狀紅血球。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

英文發明摘要(發明之名稱:AGENT FOR DETECTING RETICULOCYTE)

A reagent for measuring reticulocytes comprising at least one dye which specifically stains reticulocytes and at least one dye which specifically stains leukocytes.

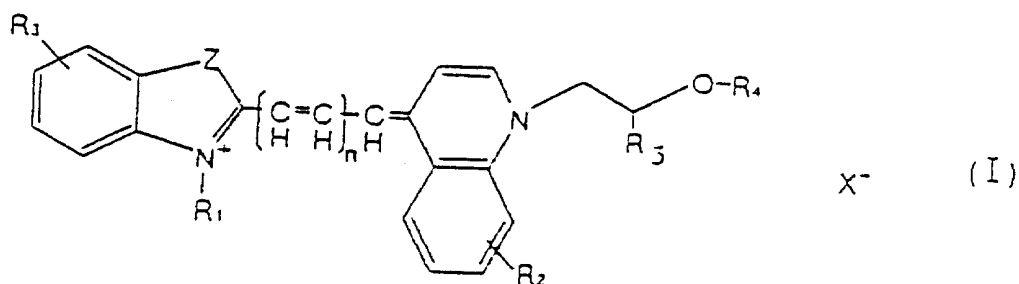
附件
—

第 86102539 號 專 利 申 請 案

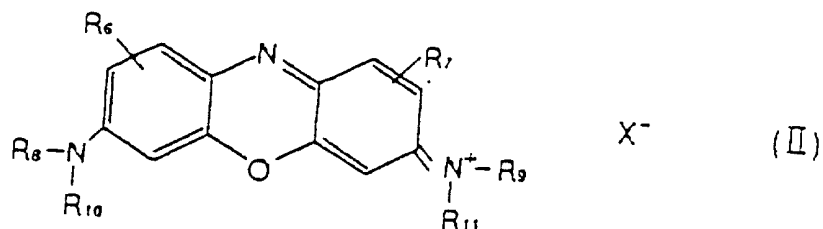
申 請 專 利 範 圍 修 正 本

(88年 3月 19日)

1. 一種網狀紅血球測定用試劑，係由至少一種對網狀紅血球具特異性染色之色素以及至少一種對白血球具特異性染色之色素所構成，其中，對網狀紅血球具特異性染色之色素係下列式(I)所示之化合物者：



(式中，R₁示氫原子或C₁-4烷基；R₂及R₃為相同或相異，示氫原子或C₁-4烷基；R₄示氫原子、或C₁-4烷基；R₅示氫原子，可被取代之C₁-4烷基；Z示硫原子、氧原子或被C₁-4烷基取代之碳原子；n為1或2；X⁻示陰離子)；其中，對白血球具特異性染色之色素係下列式(II)或式(III)所示之化合物者：



(式中，R₆及R₇為相同或相異，示氫原子或C₁-4烷基；R₈至R₁₁為相同或相異，示氫原子、或C₁-4烷基；X⁻示陰離子)，

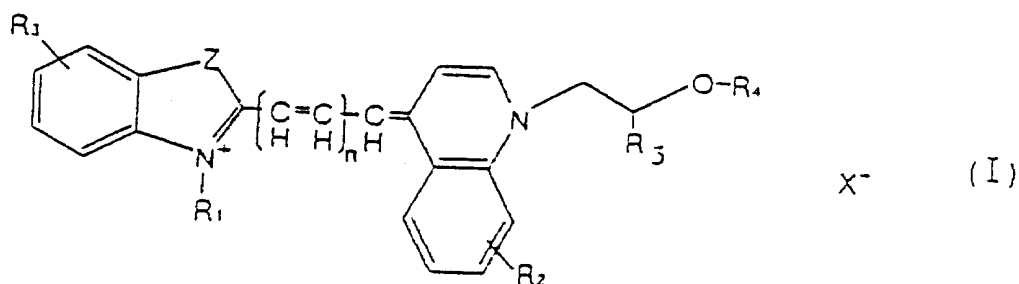
附件
—

第 86102539 號 專 利 申 請 案

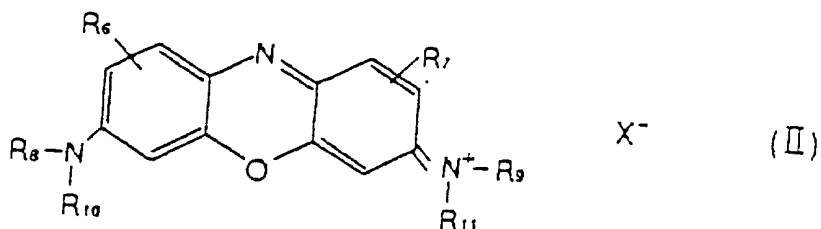
申 請 專 利 範 圍 修 正 本

(88年 3月 19日)

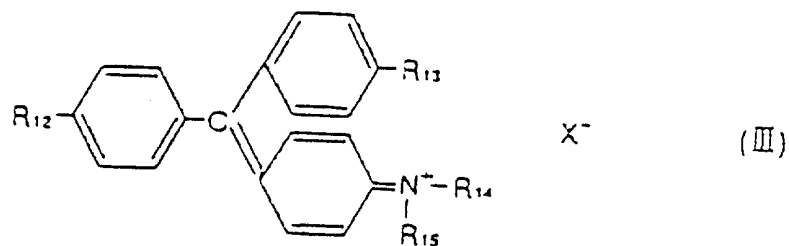
1. 一種網狀紅血球測定用試劑，係由至少一種對網狀紅血球具特異性染色之色素以及至少一種對白血球具特異性染色之色素所構成，其中，對網狀紅血球具特異性染色之色素係下列式(I)所示之化合物者：



(式中，R₁示氫原子或C₁-4烷基；R₂及R₃為相同或相異，示氫原子或C₁-4烷基；R₄示氫原子、或C₁-4烷基；R₅示氫原子，可被取代之C₁-4烷基；Z示硫原子、氧原子或被C₁-4烷基取代之碳原子；n為1或2；X⁻示陰離子)；其中，對白血球具特異性染色之色素係下列式(II)或式(III)所示之化合物者：

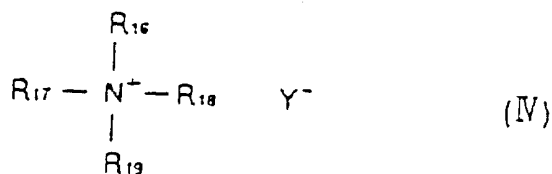


(式中，R₆及R₇為相同或相異，示氫原子或C₁-4烷基；R₈至R₁₁為相同或相異，示氫原子、或C₁-4烷基；X⁻示陰離子)，



(式中， R_{12} 及 R_{13} 為相同或相異，示氫原子、 C_1-4 烷基、或被 C_1-4 烷基取代之胺基； R_{14} 及 R_{15} 為相同或相異，示氫原子、或 C_1-4 烷基； X^- 示陰離子)。

2. 如申請專利範圍第1項之網狀紅血球測定用試劑，其中，係另外含有為了抑制紅血球之非特異性螢光之多價陰離子者。
3. 如申請專利範圍第2項之網狀紅血球測定用試劑，其中，係另外含有為了保持固定pH值之緩衝劑者。
4. 如申請專利範圍第3項之網狀紅血球測定用試劑，其中，係另外含有為了將滲透壓調整為生理學上之滲透壓之滲透壓補償劑者。
5. 如申請專利範圍第4項之網狀紅血球測定用試劑，其中，係另外含有式(4)所示陽離子界面活性劑作為染色促進劑者：



(式中， R_{16} 示8至12碳之烷基； R_{17} 、 R_{18} 、及 R_{19} 為相同或相異，示 C_1-4 烷基； Y^- 示鹵素離子)。

6. 如申請專利範圍第5項之網狀紅血球測定用試劑，其

中，陽離子性界面活性劑係氯化月桂基三甲基銨、溴化癸基三甲基銨及溴化辛基三甲基銨中之至少一種者。

7. 如申請專利範圍第1至6項中任一項之試劑，係使用作為網狀紅血球之測定方法中所用之一種試藥者。
8. 如申請專利範圍第7項之方法，其中，使用流動式細胞計數器者。

附件四

88.3.19 修正
年 月 日 補正

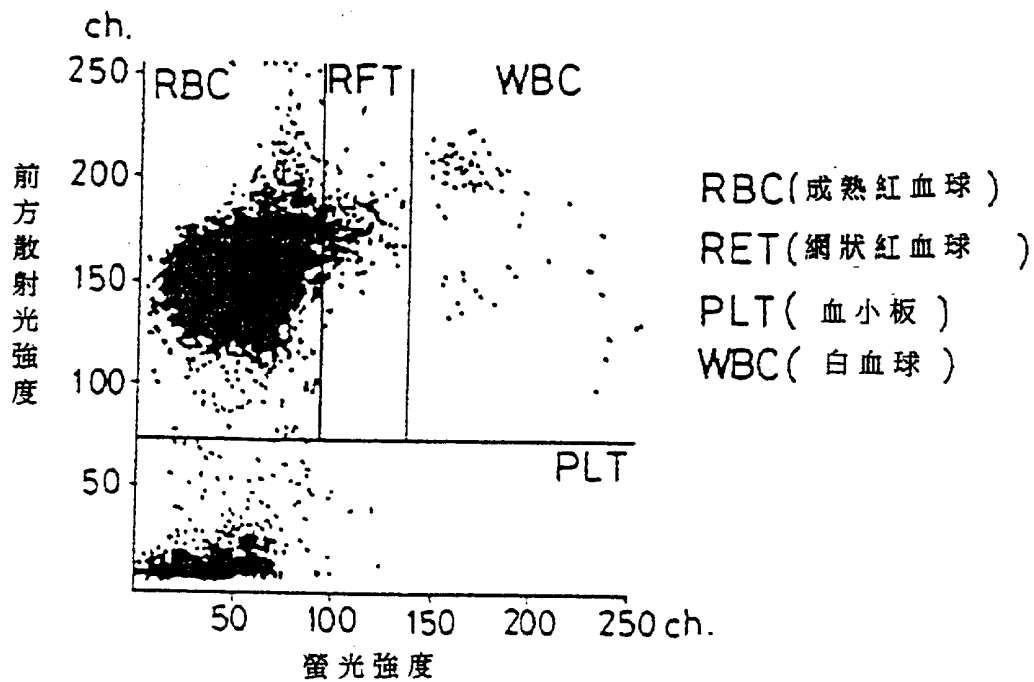
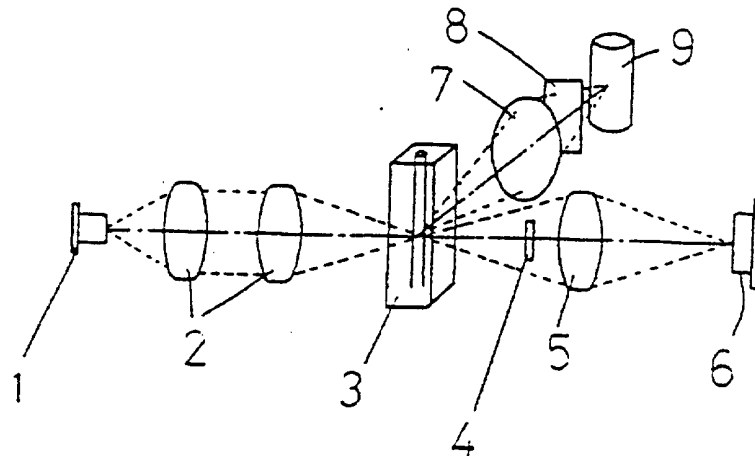
379284

第 86/02539 號專利申請案

中文圖式修正本

(88年3月19日)

第 1 圖



第 2 圖

附件四

88. 3. 19 修正
年 月 日 補正

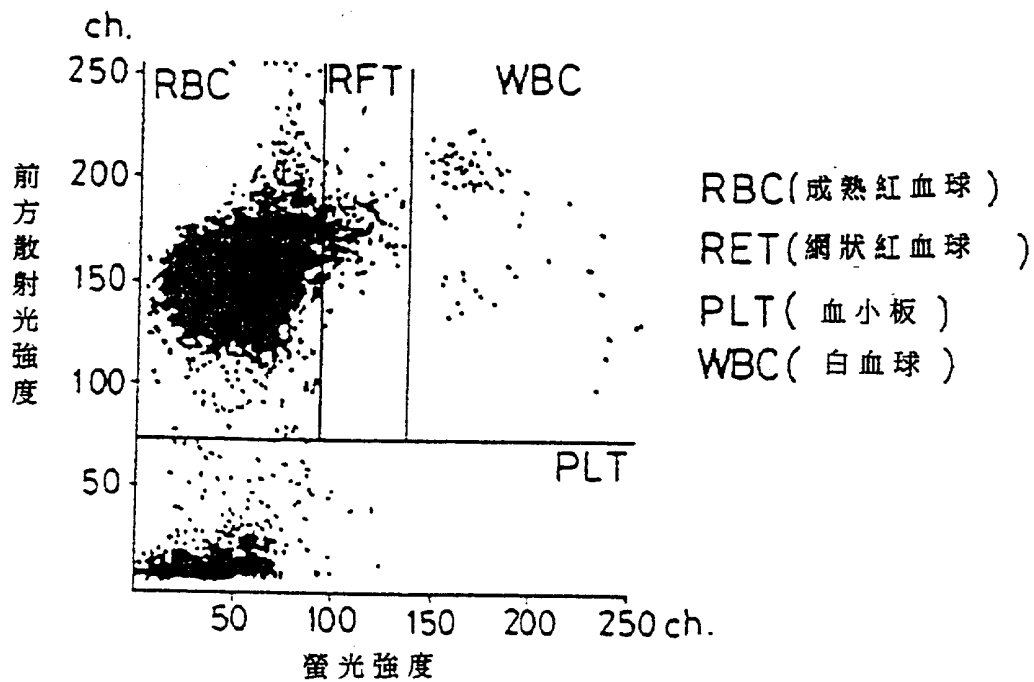
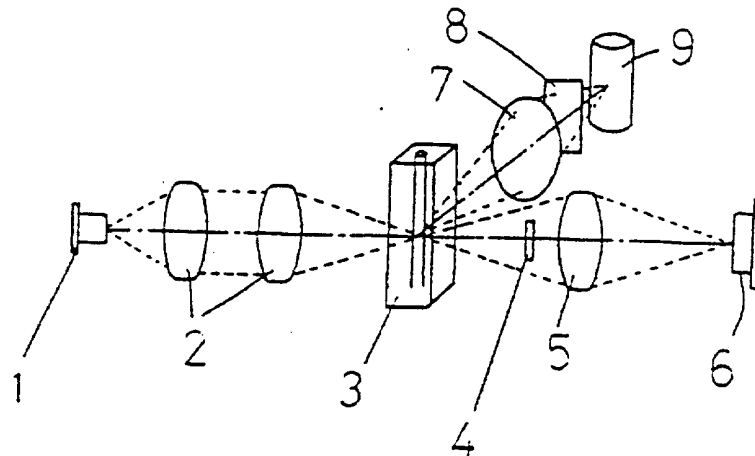
379284

第 86/02539 號專利申請案

中文圖式修正本

(88年3月19日)

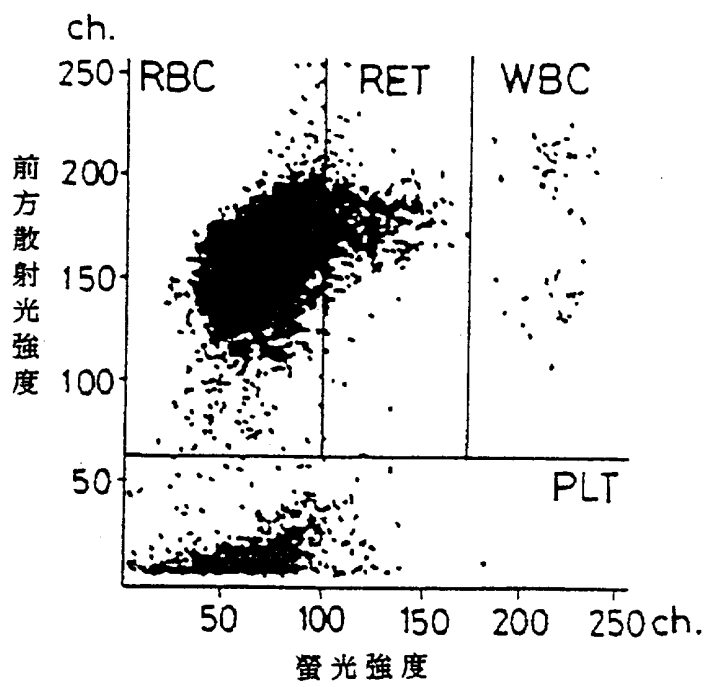
第 1 圖



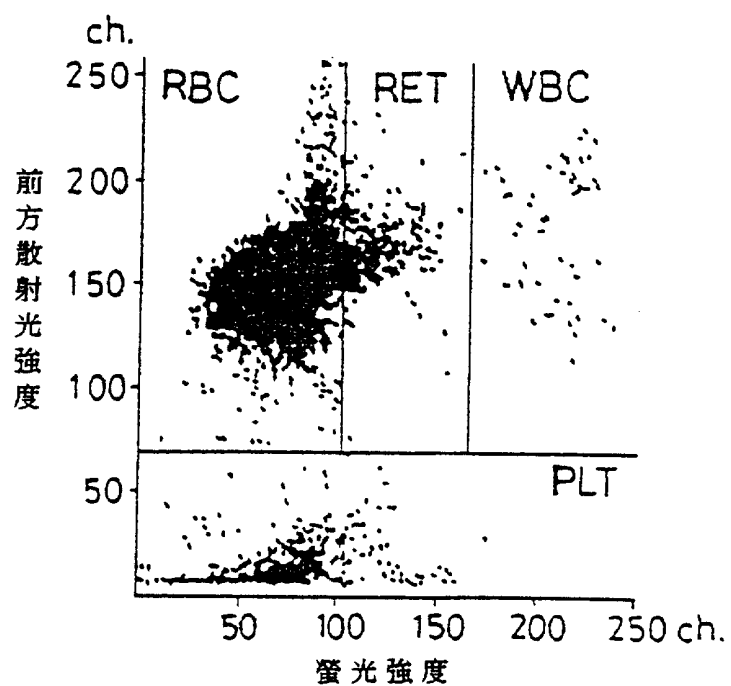
第 2 圖

88. 3. 19
第 3 圖

379284



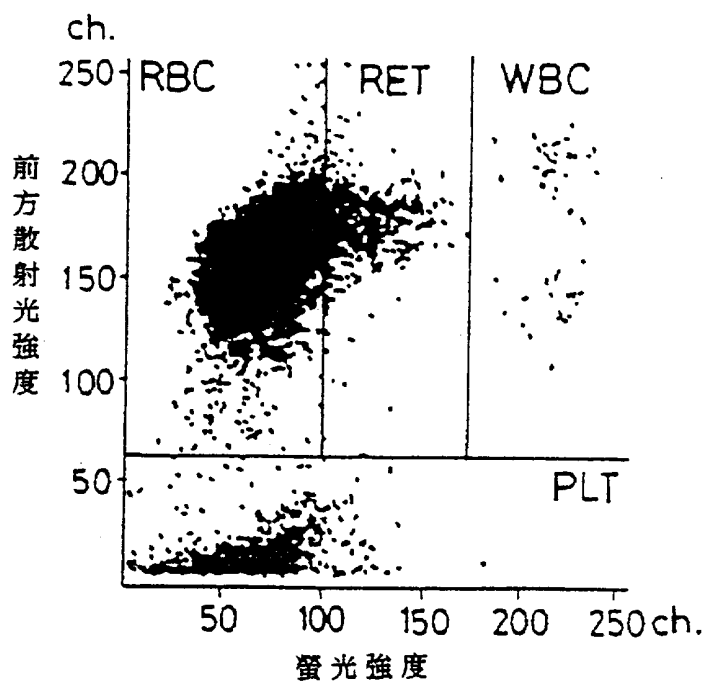
第 3 圖



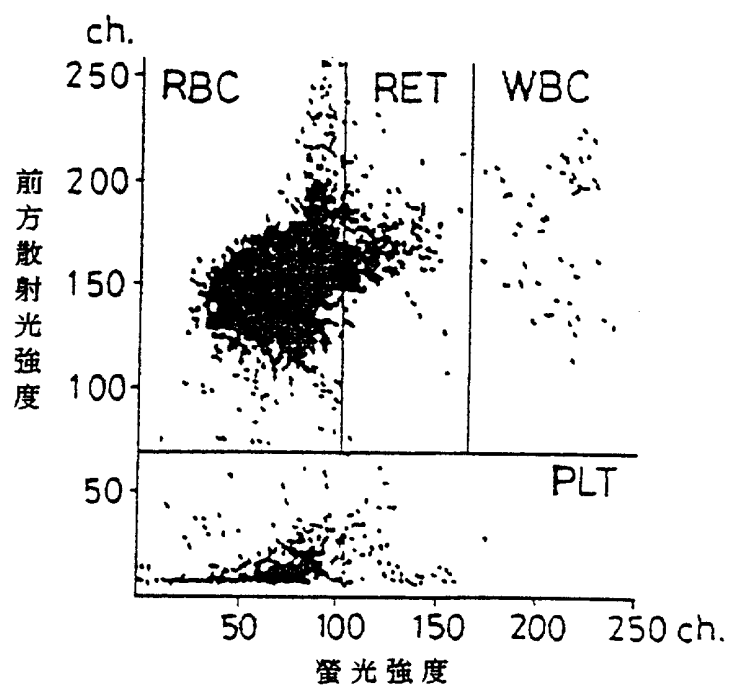
第 4 圖

88. 3. 19
第 3 圖

379284

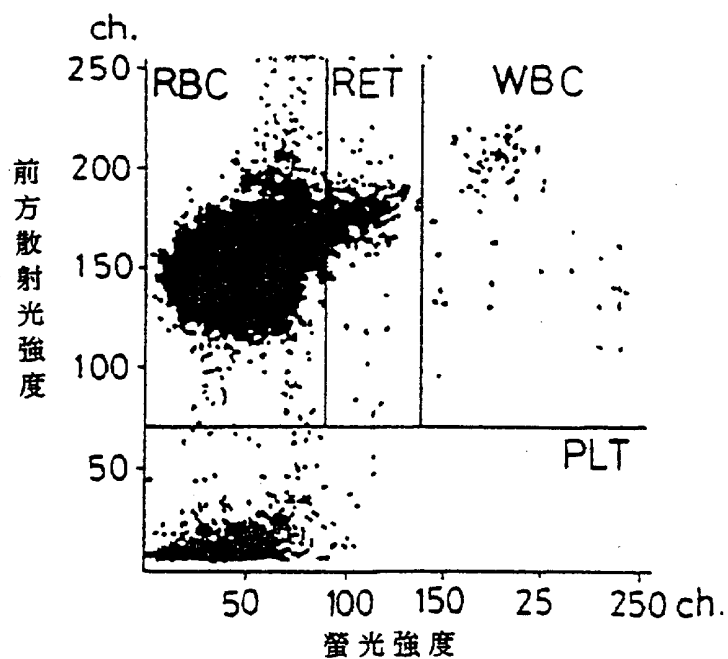


第 3 圖

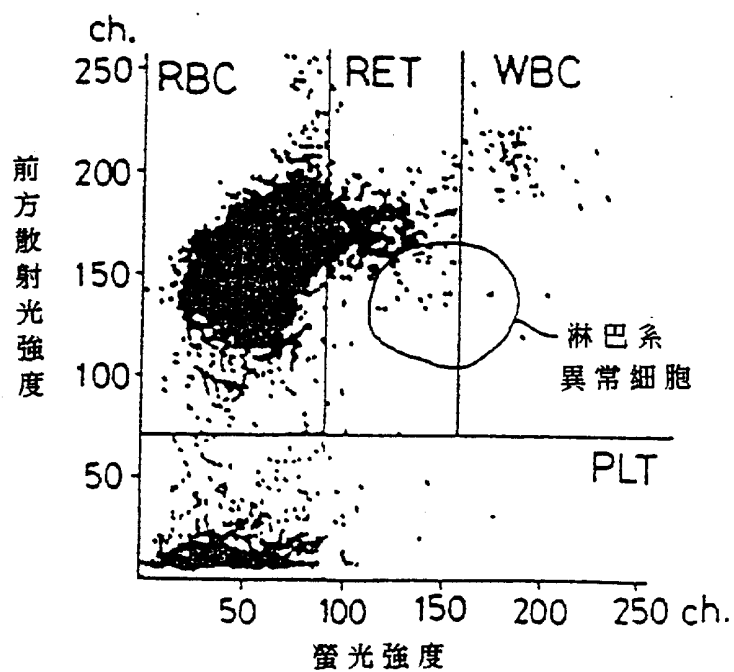


第 4 圖

379284

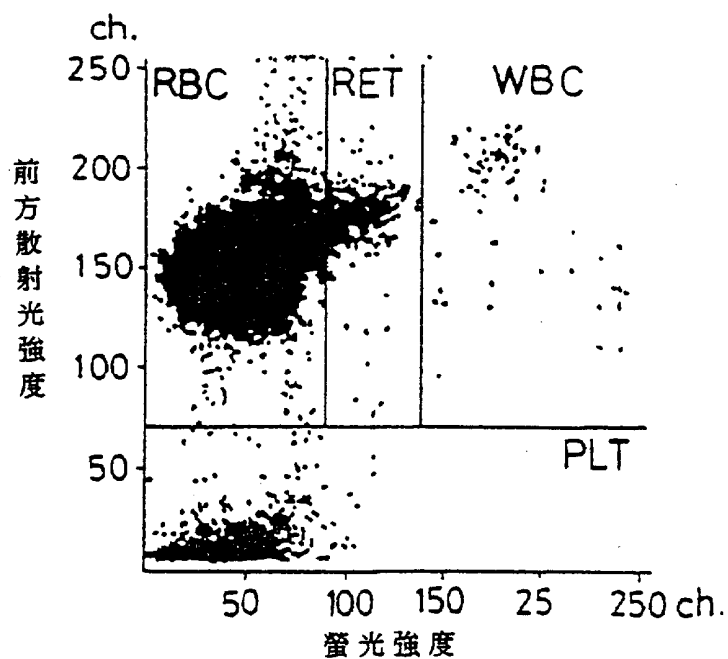


第 5 圖

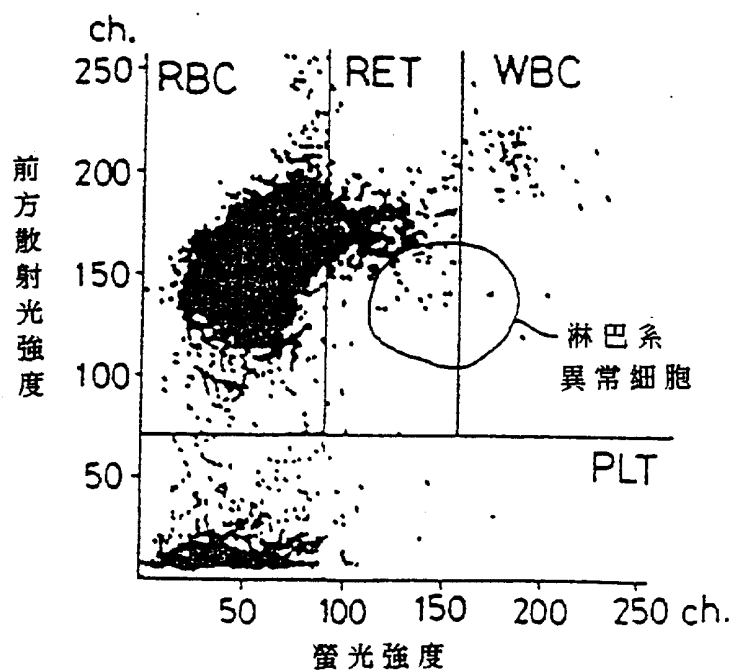


第 6 圖

379284



第 5 圖



第 6 圖