



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103460041 B

(45) 授权公告日 2015. 04. 01

(21) 申请号 201280016125. 2

代理人 罗菊华

(22) 申请日 2012. 04. 18

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 33/49(2006. 01)

2011-101595 2011. 04. 28 JP

G01N 15/14(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G01N 21/49(2006. 01)

2013. 09. 25

G01N 21/64(2006. 01)

C12Q 1/02(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

(56) 对比文件

PCT/JP2012/060432 2012. 04. 18

EP 0882983 A2, 1998. 09. 12,

(87) PCT国际申请的公布数据

CN 101097181 A, 2008. 01. 02,

W02012/147578 JA 2012. 11. 01

CN 101750476 A, 2010. 06. 23,

(73) 专利权人 希森美康株式会社

CN 101470108 A, 2009. 07. 01,

地址 日本兵库县

审查员 于园园

(72) 发明人 大塚佐绪里 八町和树 水上利洋
小国振一郎

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

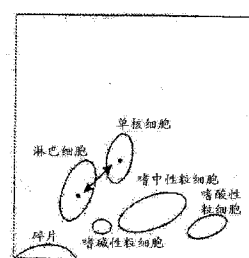
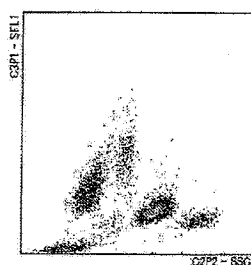
权利要求书2页 说明书13页 附图7页

(54) 发明名称

白细胞的分类计数方法、白细胞分类试剂盒
及白细胞分类试剂

(57) 摘要

本发明提供可分类计数正常白细胞,并且能进行母细胞和非典型淋巴细胞的判别的白细胞的分类计数方法。白细胞的分类计数方法包括,将活体样品,染色核酸的第1试剂,用于使红细胞溶血,给白细胞的细胞膜造成能透过荧光染料的程度的损伤的阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂,以及,含有20mM以上50mM以下的浓度的芳香族的有机酸的第2试剂混合而制备测定样品的步骤;通过给测定样品照射光取得发生的散射光信息及荧光信息的步骤;基于取得到的散射光信息及荧光信息,分类活体样品中的白细胞,区别检测母细胞和非典型淋巴细胞的步骤;其中,当第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是20mM以上、不足30mM时,第2试剂的pH是5.5以上6.4以下,当是30mM以上50mM以下时,pH是5.5以上7.0以下。



1. 白细胞的分类计数方法,其包括:

将活体样品,含有能染色核酸的荧光染料的第1试剂,用于使红细胞溶血,给白细胞的细胞膜造成能透过上述荧光染料的程度的损伤的阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂,以及含有20mM以上50mM以下的浓度的芳香族的有机酸的第2试剂混合而制备测定样品的步骤;

向制备的测定样品照射光,取得这时发生的散射光信息及荧光信息的步骤;及

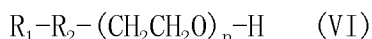
基于取得到的散射光信息及荧光信息,将上述活体样品中的白细胞分类,同时区别检测母细胞和非典型淋巴细胞的步骤;

当上述第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是20mM以上、不足30mM时,上述第2试剂的pH是5.5以上6.4以下,

当上述第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是30mM以上50mM以下时,上述第2试剂的pH是5.5以上7.0以下,

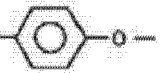
其中,

上述阳离子性表面活性剂是季铵盐型表面活性剂、或者吡啶鎓盐型表面活性剂,上述非离子性表面活性剂是以下的通式(VI)所表示的聚氧乙烯系统非离子表面活性剂:



式中,

R_1 是碳原子数8~25的烷基、烯基或炔基;

R_2 是氧原子、-COO- 或  ;

n 是10~50的整数。

2. 权利要求1所述的方法,其中上述芳香族的有机酸是选自下列的至少一种:芳香族羧酸、芳香族磺酸及它们的盐。

3. 权利要求1或2所述的方法,其中上述第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是40mM以上50mM以下。

4. 权利要求1或2所述的方法,其中上述第2试剂中的pH是5.5以上6.2以下。

5. 权利要求1或2所述的方法,其中上述散射光信息是侧方散射光信息。

6. 白细胞分类试剂盒,其含:

含有能染色核酸的荧光染料的第一试剂,

用于使红细胞溶血,给白细胞的细胞膜造成能透过上述荧光染料的程度的损伤的阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂,以及

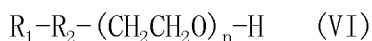
含有20mM以上50mM以下的浓度的芳香族的有机酸的第二试剂,

当上述第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是20mM以上、不足30mM时,上述第2试剂的pH是5.5以上6.4以下,

当上述第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是30mM以上50mM以下时,上述第2试剂的pH是5.5以上7.0以下,

其中,

上述阳离子性表面活性剂是季铵盐型表面活性剂、或者吡啶鎓盐型表面活性剂,上述非离子性表面活性剂是以下的通式(VI)所表示的聚氧乙烯系统非离子表面活性剂:



式中,

R_1 是碳原子数 8 ~ 25 的烷基、烯基或炔基;

R_2 是氧原子、-COO- 或 -O-;

n 是 10 ~ 50 的整数。

7. 权利要求 6 所述的试剂盒,其中上述芳香族的有机酸是选自下列的至少一种:芳香族羧酸、芳香族磺酸及它们的盐。

8. 权利要求 6 或 7 所述的试剂盒,其中上述第 2 试剂中的芳香族的有机酸的浓度是 40mM 以上 50mM 以下。

9. 权利要求 6 或 7 所述的试剂盒,其中上述第 2 试剂中的 pH 是 5.5 以上 6.2 以下。

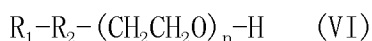
10. 白细胞分类试剂,其特征在于,其是含能染色核酸的荧光染料,阳离子性表面活性剂,非离子性表面活性剂,和芳香族的有机酸的白细胞分类试剂,

上述试剂中含的芳香族的有机酸的浓度是 20mM 以上 50mM 以下,

当上述芳香族的有机酸的浓度是 20mM 以上、不足 30mM 时, pH 是 5.5 以上 6.4 以下,

当上述芳香族的有机酸的浓度是 30mM 以上 50mM 以下时, pH 是 5.5 以上 7.0 以下,

其中上述阳离子性表面活性剂是季铵盐型表面活性剂、或者吡啶鎓盐型表面活性剂,上述非离子性表面活性剂是以下的通式 (VI) 所表示的聚氧乙烯系统非离子表面活性剂:



式中,

R_1 是碳原子数 8 ~ 25 的烷基、烯基或炔基;

R_2 是氧原子、-COO- 或 -O-;

n 是 10 ~ 50 的整数。

白细胞的分类计数方法、白细胞分类试剂盒及白细胞分类试剂

【技术领域】

[0001] 本发明涉及分类计数活体样品中的白细胞的方法。本发明还涉及用于分类计数活体样品中的白细胞的白细胞分类试剂盒及白细胞分类试剂。

【背景技术】

[0002] 正常的白细胞通常被分类为淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞的 5 种。在正常的末梢血中, 这些的血细胞各自以一定的比例存在。但是, 当受试者存在疾病时, 特定的血细胞数增加或减少。所以, 在临床检查的领域, 通过进行白细胞的分类计数, 可得对疾病的诊断极其有用的信息。

[0003] 在造血器肿瘤、病毒感染症等的疾病中, 出现在正常的末梢血液中不存在的细胞。例如, 在急性的白血病中, 在末梢血液中出现作为未成熟的白细胞的“母细胞(成髓细胞: myeloblast、成淋巴细胞: lymphoblast)”。另一方面, 在病毒感染症、药物过敏等中, 由抗原刺激而在末梢血液中出现作为活化的淋巴细胞的“非典型淋巴细胞(atypical lymphocyte)”。从末梢血液中区别检测非典型淋巴细胞和母细胞, 在进行疾病的筛选或诊断中极其有用。

[0004] 近年、市售应用流式细胞术的原理的自动血细胞计数装置。由那样的装置, 可自动进行样品中的血细胞的分类计数。另外, 用于由自动血细胞计数装置测定的血细胞分类试剂也有市售。使用这样的试剂用自动血细胞计数装置测定待测样品, 在各自散点图上的指定的区域出现检测的各血细胞的信号。

[0005] 所述技术中多少知道如上述一样的血细胞分类试剂。例如, 在专利文献 1 中记载了可分类计数异常白细胞和正常白细胞的两方的方法。在该方法中, 使用将特异性地染色 RNA 的染色液, 和含阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂的溶血剂组合而成的试剂盒。另外, 在专利文献 2 记载了分类计数正常白细胞, 并且检测异常白细胞的方法。在该方法中, 使用包含含有指定的荧光染料的染色液, 和含阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂的溶血剂的试剂。

[0006] 【现有技术文献】

[0007] 【专利文献】

[0008] 专利文献 1: 专利第 4248017 号公报

[0009] 专利文献 2: 美国专利申请第 2009/0023129 号

【发明内容】

[0010] 【发明要解决的技术课题】

[0011] 如上所述, 在从受试者得到的待测样品中, 有除了正常白细胞之外, 还包含母细胞及非典型淋巴细胞等异常白细胞的情况。

[0012] 但是, 在使用专利文献 1 及专利文献 2 的试剂的方法中, 作为异常白细胞的母细胞

及非典型淋巴细胞的信号均出现在散点图上的大致相同的区域,所以有难以区别检测母细胞和非典型淋巴细胞的情况。

[0013] 本发明以提供可分类计数正常白细胞,并且能区别检测母细胞和非典型淋巴细胞的白细胞的分类计数方法作为目的。本发明另外,以提供可分类计数正常白细胞,并且能区别检测母细胞和非典型淋巴细胞的白细胞分类试剂盒及白细胞分类试剂作为目的。

[0014] 【解决课题的技术方案】

[0015] 在由使用以往的白细胞分类试剂的流式细胞仪的测定中,母细胞及非典型淋巴细胞的信号在散点图上出现在出现正常淋巴细胞及正常单核细胞的信号的区域近边或与该区域重复的区域。本发明人考虑了,是否通过将出现正常淋巴细胞的信号的区域和出现正常单核细胞的信号的区域隔开,可分离异常白细胞的信号和正常白细胞的信号,从而可提高异常白细胞的检测灵敏度。

[0016] 从而,本发明人对于能隔开出现正常淋巴细胞的信号的区域和出现正常单核细胞的信号的区域,的白细胞的分类方法进行检查。结果,令人惊讶地发现,通过使芳香族的有机酸的浓度和试剂的 pH 成为指定的组合,能提高异常白细胞的检测精度,区别检测母细胞和非典型淋巴细胞,从而完成本发明。

[0017] 即,本发明提供白细胞的分类计数方法,其包括:

[0018] 将活体样品,染色核酸的第 1 试剂,用于使红细胞溶血,给白细胞的细胞膜造成能透过上述荧光染料的程度的损伤的阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂,以及含有 20mM 以上 50mM 以下的浓度的芳香族的有机酸的第 2 试剂混合而制备测定样品的步骤;

[0019] 向制备的测定样品照射光,取得这时发生的散射光信息及荧光信息的步骤;及

[0020] 基于取得到的散射光信息及荧光信息,将上述活体样品中的白细胞分类,同时区别检测母细胞和非典型淋巴细胞的步骤;

[0021] 其中,

[0022] 当上述第 2 试剂中的芳香族的有机酸的浓度是 20mM 以上、不足 30mM 时,上述第 2 试剂的 pH 是 5.5 以上 6.4 以下,

[0023] 当上述第 2 试剂中的芳香族的有机酸的浓度是 30mM 以上 50mM 以下时,上述第 2 试剂的 pH 是 5.5 以上 7.0 以下。

[0024] 本发明另外提供白细胞分类试剂盒,其包含:含有能染色核酸的荧光染料的第 1 试剂,用于使红细胞溶血,给白细胞的细胞膜造成能透过上述的荧光染料的程度的损伤的阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂,以及含有 20mM 以上 50mM 以下的浓度的芳香族的有机酸的第 2 试剂,其中当该第 2 试剂中的芳香族的有机酸的浓度是 20mM 以上、不足 30mM 时,该第 2 试剂的 pH 是 5.5 以上 6.4 以下,当该第 2 试剂中的芳香族的有机酸的浓度是 30mM 以上 50mM 以下时,该第 2 试剂的 pH 是 5.5 以上 7.0 以下。

[0025] 本发明再提供白细胞分类试剂,其特征在于为含能染色核酸的荧光染料,阳离子性表面活性剂,非离子性表面活性剂,和芳香族的有机酸的白细胞分类试剂,当试剂中含的芳香族的有机酸的浓度是 20mM 以上 50mM 以下,芳香族的有机酸的浓度是 20mM 以上、不足 30mM 时, pH 是 5.5 以上 6.4 以下,当芳香族的有机酸的浓度是 30mM 以上 50mM 以下时, pH 是 5.5 以上 7.0 以下。

[0026] 【发明效果】

[0027] 由本发明的白细胞的分类计数方法、白细胞分类试剂盒及白细胞分类试剂,可分类计数正常白细胞,并且可区别检测母细胞和非典型淋巴细胞。

【附图说明】

[0028] 【图 1】是使用本发明的白细胞分类试剂盒测定正常的血液待测样品时的散点图及其模式图。

[0029] 【图 2】是使用实施例 2 的各试剂测定含形态异常的淋巴细胞的血液待测样品时的散点图。

[0030] 【图 3】是使用实施例 3 的各试剂测定含异常白细胞的血液待测样品时的散点图。

[0031] 【图 4】是使用实施例 3 的各试剂测定含异常白细胞的血液待测样品时的散点图。

[0032] 【图 5】是使用实施例 4 的各试剂测定含异常白细胞的血液待测样品时的散点图。

[0033] 【图 6】是使用实施例 5 的各试剂测定正常的血液待测样品时的散点图。

【实施方式】

[0035] 在本发明的实施方式中,活体样品只要是含白细胞的体液样品,就不特别限定。作为活体样品,可举出例如,由从哺乳动物、优选为人采集的血液、骨髓液、尿、及,成分输血等采集的样品等。另外,活体样品是有含异常白细胞的可能性的样品也可。在本发明中,白细胞包括正常的白细胞和异常白细胞。正常的白细胞,通常被分类为淋巴细胞、单核细胞、嗜酸性粒细胞、及,嗜酸性粒细胞以外的粒细胞、的 4 种、或者被分类为淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、及,嗜碱性粒细胞的 5 种。

[0036] 在本说明书中,异常白细胞通常是指,末梢血中不存在的白细胞。作为那样的异常白细胞,可举出例如,非典型淋巴细胞及母细胞等。非典型淋巴细胞是指,由抗原刺激活化的淋巴细胞,对于刺激反应而形态发生变化的细胞。此非典型淋巴细胞在有病毒感染症、药物过敏等的疾病的患者的末梢血中出现。母细胞是指,成髓细胞(myeloblast)及成淋巴细胞(lymphblast)等的未成熟的白细胞。成髓细胞在急性骨髓性白血病的患者的末梢血中出现,成淋巴细胞在急性淋巴性白血病的患者的末梢血中出现。

[0037] 接下来,对于在本发明的白细胞的分类计数方法中使用的白细胞分类试剂盒进行说明。

[0038] 本发明的白细胞分类试剂盒(以下,有时称作“试剂盒”。)是含第 1 试剂和第 2 试剂的试剂盒。接下来,对于试剂盒的各试剂进行说明。

【第 1 试剂】

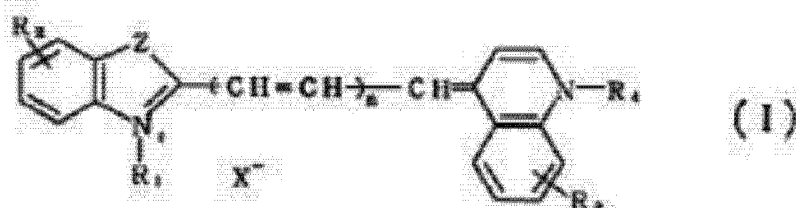
[0040] 本发明的试剂盒中含的第 1 试剂含能染色核酸的荧光染料。在本发明的实施方式中,第 1 试剂是用于将由后述的第 2 试剂处理的活体样品中的有核细胞的核酸荧光染色的试剂。通过将活体样品用第 1 试剂处理,将正常白细胞及上述的异常白细胞等的有核酸的血细胞染色。

[0041] 在本发明的实施方式中,荧光染料只要是可染色核酸的染料就不特别限定,可根据从光源照射的光的波长适宜选择。作为那样的荧光染料,可举出例如,碘化丙啶、溴化乙锭、乙锭-吡啶异源二聚体、乙锭二叠氮基、乙锭同源二聚体-1、乙锭同源二聚体-2、乙锭单叠氮基、三亚甲基双[[3-[[4-[[[(3-甲基苯并噻唑-3-基)-2-基]亚甲基]-1,4-二氢喹啉]-1-基]丙基]二甲基铵]·四碘化物(TOTO-1)、4-[(3-甲基苯并噻唑-2(3H)-亚

基) 甲基]-1-[3-(三甲基铵) 丙基] 喹啉鎓·二碘化物(TO-PRO-1)、N,N,N',N'-四甲基-N,N'-双[3-[4-[3-[(3-甲基苯并噻唑-3-基)-2-基]-2-亚丙烯基]-1,4-二氢喹啉-1-基] 丙基]-1,3-丙烷二铵·四碘化物(TOTO-3)、2-[3-[[1-[3-(三甲基铵) 丙基]-1,4-二氢喹啉]-4-亚基]-1-丙烯基]-3-甲基苯并噻唑-3-基]·二碘化物(TO-PRO-3)、及,以下的通式(I)所表示的荧光染料等。在它们之中,通式(I)所表示的荧光染料是优选的。

[0042] 【化 1】

[0043]



[0044] 上述的式(I)中, R_1 及 R_4 互相相同或不同,是氢原子、烷基、有羟基的烷基链、有醚基的烷基链、有酯基的烷基链、或者,也可有取代基的苄基; R_2 及 R_3 互相相同或不同,是氢原子、羟基、卤素、烷基、烯基、炔基、烷氧基、烷基磺酰基、或者,苯基; Z 是硫原子、氧原子、或者,有甲基的碳原子; n 是0、1、2或3; X^- 是阴离子。

[0045] 在本发明的实施方式中,烷基是直链状或分枝链状均可。在本发明的实施方式中,上述的式(I)中, R_1 及 R_4 之任何一方是碳原子数6~18的烷基的时,另一方是氢原子或碳原子数不足6的烷基是优选的。在碳原子数6~18的烷基之中,碳原子数是6、8或10的烷基是优选的。

[0046] 在本发明的实施方式中,上述的式(I)中,作为 R_1 及 R_4 的苄基的取代基,可举出例如碳原子数1~20的烷基、碳原子数2~20的烯基或碳原子数2~20的炔基。在它们之中,甲基或乙基是特别优选的。

[0047] 在本发明的实施方式中,上述的式(I)中,作为 R_2 及 R_3 的烯基,可举出例如碳原子数2~20的烯基。作为 R_2 及 R_3 的烷氧基,可举出碳原子数1~20的烷氧基。在它们之中,特别是甲氧基或乙氧基是优选的。

[0048] 在本发明的实施方式中,上述的式(I)中,作为阴离子 X^- ,可举出如 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 及 I^- 一样的卤素离子、 $CF_3SO_3^-$ 、 BF_4^- 等。

[0049] 在本发明的实施方式中,第1试剂中的荧光染料是1种也可,是2种以上也可。

[0050] 在本发明的实施方式中,第1试剂中的荧光染料的浓度可根据荧光染料的种类适宜设定,通常是0.01~100pg/ μ L、优选为0.1~10pg/ μ L。例如,作为第1试剂的荧光染料使用上述的式(I)所表示的荧光染料时,第1试剂中的该荧光染料的浓度优选为0.2~0.6pg/ μ L,更优选为0.3~0.5pg/ μ L。

[0051] 在本发明的实施方式中,第1试剂可通过将上述的荧光染料在适宜的溶剂中溶解至成上述的浓度而得到。溶剂只要可溶解上述的荧光染料就不特别限定,但可举出例如,水、有机溶剂、及,这些的混合物。

[0052] 作为有机溶剂,可举出例如,醇、乙二醇、二甲基亚砷(DMSO)等。荧光染料有在水溶液中的保存稳定性差的情况,所以在有机溶剂中溶解是优选的。

[0053] 在本发明的实施方式中,作为第1试剂,也可使用市售的白细胞测定用的染色试剂。作为那样的染色试剂,可举出例如 Stomatolyser4DS (Sysmex 株式会社)。Stomatolyser4DS 是含上述的式(I)所示的荧光染料的染色试剂。

[0054] 【第2试剂】

[0055] 本发明的试剂盒中含的第2试剂含有用于使红细胞溶血,给白细胞的细胞膜造成能透过上述的荧光染料的程度的损伤的表面活性剂、即阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂。该第2试剂再含有 20mM 以上 50mM 以下的浓度的芳香族的有机酸。

[0056] 在本发明的实施方式中,第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是 20mM 以上、不足 30mM 的情况,第2试剂的 pH 是 5.5 以上 6.4 以下,更优选为 5.5 以上 6.2 以下。第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是 30mM 以上 50mM 以下,优选为 40mM 以上 50mM 以下时,第2试剂的 pH 是 5.5 以上 7.0 以下。再优选为,第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是 40mM 以上 50mM 以下时,第2试剂的 pH 是 5.5 以上 6.2 以下。

[0057] 在本发明的实施方式中,通过使用第2试剂处理活体样品,可使该活体样品中的红细胞溶血,给白细胞的细胞膜能通过上述的荧光染料的程度的损伤。当活体样品中含异常白细胞时,第2试剂对该异常白细胞的细胞膜也可给可通过上述的荧光染料的程度的损伤。

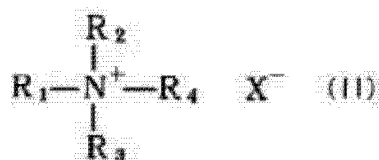
[0058] 由第2试剂细胞膜受损伤的血细胞被上述的第1试剂中的荧光染料染色。通过使第2试剂中含的芳香族的有机酸的浓度及 pH 在上述的范围内,可将由流式细胞仪等检测的正常淋巴细胞的信号的出现区域和正常单核细胞的信号的出现区域,以提高异常白细胞的检测精度,并且能进行母细胞和非典型淋巴细胞的判别的程度隔开。

[0059] 在本说明书中,芳香族的有机酸是指分子中有至少 1 个的芳香环的酸及其盐。作为芳香族的有机酸,可举出例如,芳香族羧酸、芳香族磺酸等。在本发明的实施方式中,作为芳香族的有机酸,可适宜地使用酞酸、安息香酸、水杨酸、马尿酸、p-氨基苯磺酸、苯磺酸及它们的盐。第2试剂中的芳香族的有机酸是 1 种也可,2 种以上也可。当第2试剂中含 2 种以上芳香族的有机酸时,第2试剂中的芳香族的有机酸的浓度是,只要它们的浓度的合计是 20mM 以上 50mM 以下即可。

[0060] 在本发明的实施方式中,作为阳离子性表面活性剂,可使用季铵盐型表面活性剂、或者,吡啶鎓盐型表面活性剂。作为季铵盐型表面活性剂,可举出例如以下的式(II)所表示的,全碳原子数是 9 ~ 30 的表面活性剂。

[0061] 【化 2】

[0062]



[0063] 上述的式(II)中, R_1 是碳原子数 6 ~ 18 的烷基或烯基; R_2 及 R_3 互相相同或不同,是碳原子数 1 ~ 4 的烷基或烯基; R_4 是碳原子数 1 ~ 4 的烷基或烯基、或者苄基; X^- 是卤素离子。

[0064] 上述的式(II)中,作为 R_1 ,碳原子数是 6、8、10、12 及 14 的烷基或烯基是优选的,

特别是直链的烷基是优选的。作为更具体性的 R_1 , 可举出辛基、癸基及十二烷基。作为 R_2 及 R_3 , 甲基、乙基及丙基是优选的。作为 R_4 , 甲基、乙基及丙基是优选的。

[0065] 作为吡啶鎓盐型表面活性剂, 可举出例如以下的式(III)所表示的表面活性剂。

[0066] 【化 3】

[0067]



[0068] 上述的式(III)中, R_1 是碳原子数 6 ~ 18 的烷基或烯基; X^- 是卤素离子。

[0069] 上述的式(III)中, 作为 R_1 , 碳原子数是 6、8、10、12 及 14 的烷基或烯基是优选的, 特别是直链的烷基是优选的。作为更具体性的 R_1 , 可举出辛基、癸基及十二烷基。

[0070] 在本发明的实施方式中, 第 2 试剂中的阳离子性表面活性剂的浓度可根据表面活性剂的种类而适宜调节, 但通常是 10 ~ 10000ppm、优选为 100 ~ 1000ppm。

[0071] 在本发明的实施方式中, 作为非离子性表面活性剂, 以下的式(VI)所表示的聚氧乙烯系统非离子表面活性剂是优选的。

[0072] $R_1-R_2-(CH_2CH_2O)_n-H$ (VI)

[0073] 上述的式(VI)中, R_1 是碳原子数 8 ~ 25 的烷基、烯基或炔基; R_2 是氧原子、 $-COO-$ 或

[0074] 【化 4】

[0075] ; n 是 10 ~ 50 的整数。

[0076] 作为上述的非离子性表面活性剂的具体例, 可举出聚氧乙烯烷基醚、聚氧乙烯甾醇、聚氧乙烯蓖麻子油、聚氧乙烯山梨糖醇脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基胺、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚等。

[0077] 在本发明的实施方式中, 第 2 试剂中的非离子性表面活性剂的浓度通常是 10 ~ 100000ppm, 优选为 100 ~ 10000ppm, 更优选为 1000 ~ 5000ppm。

[0078] 在本发明的实施方式中, 第 2 试剂为了一定地保持 pH 而含缓冲剂也可。作为那样的缓冲剂, 可举出例如, 柠檬酸盐、HEPES 及磷酸盐等。再有, 上述的芳香族的有机酸有示缓冲作用时。当使用那样的芳香族的有机酸时, 可任意向第 2 试剂添加缓冲剂。

[0079] 在本发明的实施方式中, 第 2 试剂的渗透压不特别限定, 但从使红细胞有效溶血的观点来看, 20 ~ 150mOsm/kg 是优选的。

[0080] 在本发明的实施方式中, 第 2 试剂可通过将上述的表面活性剂及芳香族的有机酸或其盐, 和根据期望上述的缓冲剂溶解于适宜的溶剂至成为上述的芳香族的有机酸浓度, 将 pH 使用 NaOH、HCl 等调节而得到。

[0081] 作为溶剂, 只要可溶解上述的成分就不特别限定, 可举出例如水、有机溶剂、及, 它们的混合物。作为有机溶剂, 可举出例如, 醇、乙二醇、DMSO 等。

[0082] 再有, 上述的试剂盒被分为第 1 试剂和第 2 试剂, 本发明不限于此, 只要是含第 1 试剂及第 2 试剂的组成的试剂就不特别限定。

[0083] 【白细胞的分类计数方法】

[0084] 使用本发明的白细胞分类试剂盒或上述的试剂, 则可分类计数活体样品中的白

细胞。接下来,对使用本发明的试剂盒时的白细胞的分类计数方法(以下,有时简称为“方法”。)进行说明。

[0085] 本发明的方法,首先,将活体样品和上述的试剂盒的第1试剂及第2试剂混合,通过使该活体样品中的红细胞溶解的同时染色白细胞的核酸而制备测定样品(制备步骤)。

[0086] 在本发明的实施方式中,活体样品和第1试剂或第2试剂的混合是,活体样品:第1试剂或第2试剂的体积比是1:1~1:1000、更优选为1:10~1:100。对活体样品的第1试剂和第2试剂的混合液的比率是,活体样品:混合液的体积比是1:5~1:1000、更优选为1:10~1:100。通过以这样的比将活体样品,第1试剂及第2试剂混合,可快速进行红细胞的溶血,染色白细胞的核酸。另外,当活体样品中存在异常白细胞时,在此步骤中该异常白细胞的核酸也被染色。测定中使用的活体样品的量在5~500 μ L左右就充分。

[0087] 在上述的制备步骤中,将活体样品和第1试剂及第2试剂混合的顺序不特别限定。例如,将第1试剂和第2试剂先混合,将此混合液和活体样品混合也可。另外,将第2试剂和活体样品先混合,将此混合液和第1试剂混合也可。在本发明的实施方式中,以任何的顺序混合都可得同等的结果。

[0088] 在本发明的实施方式中,将活体样品和第1试剂及第2试剂混合后,以15~50℃、优选为30~45℃的温度温育5~120秒钟、优选为5~30秒钟是优选的。

[0089] 在本发明的方法中,以上述的步骤向制备的测定样品照射光而取得散射光信息及荧光信息(测定步骤)。

[0090] 在本发明的实施方式中,测定步骤由流式细胞仪进行是优选的。在由流式细胞仪的测定中,通过染色的白细胞通过流式细胞仪的流动池之时向该白细胞照射光,作为从该白细胞发出的信号,可得散射光信息及荧光信息。

[0091] 在本发明的实施方式中,散射光信息只要是一般而言可用市售的流式细胞仪测定的散射光就不特别限定。作为散射光信息,可举出例如前方散射光(例如,光接收角度0~20度附近)、侧方散射光(光接收角度90度附近)等的散射光的脉宽、散射光强度等。

[0092] 在所述技术中已知,侧方散射光反映细胞的核及颗粒等的内部信息,前方散射光反映细胞的大小的信息。在本发明的实施方式中,作为散射光信息使用侧方散射光强度是优选的。

[0093] 荧光信息是指,给染色的白细胞照射适当的波长的激发光,测定激发的荧光而得到的信息。此荧光从由第1试剂中含的荧光染料染色的细胞内的核酸等发出。光接收波长可根据第1试剂中含的荧光染料适宜选择。

[0094] 在本发明的实施方式中,流式细胞仪的光源不特别限定,选择适宜于荧光染料的激发的波长的光源。作为光源,使用例如,红色半导体激光器、蓝色半导体激光器、氩激光器、He-Ne激光器、水银弧光灯等。特别是半导体激光器由于比气体激光器非常地廉价而适宜。

[0095] 在本发明的方法中,基于上述的散射光信息及荧光信息,将活体样品中的白细胞分类计数(分类计数步骤)。

[0096] 在本发明的实施方式中,白细胞的分类计数通过制成以侧方散射光信息和荧光信息作为二轴的散点图,将得到的散点图使用适当的解析软件解析来进行是优选的。例如,当将X轴设为侧方散射光强度、Y轴设为荧光强度描绘散点图时,如示于图1之右图,白细胞

被分类为淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞的 5 种的集团(组集)。然后,可由解析软件,在散点图上设包围各集团的窗,计数其中的细胞数。

[0097] 再有,在图 1 中,将白细胞分类为 5 种的集团,但本发明不限于此。例如,通过将嗜中性粒细胞和嗜碱性粒细胞分类为 1 个集团,也可将白细胞分类为 4 种的集团。

[0098] 在本发明的实施方式中,上述的活体样品是有含异常白细胞的可能性的样品也可。如上所述,使用本发明的试剂盒,则可将由流式细胞仪检测的正常淋巴细胞的信号的出现区域和正常单核细胞的信号的出现区域在散点图上隔开。从而,在本发明的方法中,在活体样品中含异常白细胞时,在分类计数白细胞的步骤中,那样的异常白细胞之中,可区别检测母细胞和非典型淋巴细胞。此母细胞和非典型淋巴细胞的区别通过例如,将散点图上的母细胞的信号出现区域和非典型淋巴细胞的信号出现区域在散点图上预先设定来进行。母细胞及非典型淋巴细胞的检测通过,例如,在预先设定的母细胞的信号出现区域检测到信号时,判断为在活体样品中含母细胞,在预先设定的非典型淋巴细胞的信号出现区域检测到信号时,判断为在活体样品中含非典型淋巴细胞来进行。

[0099] 在本发明的实施方式中,作为母细胞,可举出例如成髓细胞。

[0100] 接下来,根据实施例详细地说明本发明,本发明不限于这些实施例。

【实施例】

[0101] 【实施例 1】

[0102] 在本实施例中,为了将正常淋巴细胞的信号出现的位置和正常单核细胞的信号出现的位置在散点图上分离,检查第 2 试剂中的芳香族的有机酸的浓度和第 2 试剂的 pH。

[0103] 作为第 1 试剂,使用 Stomatolyser4DS(Sysmex 株式会社)。将十二烷基三甲基铵氯化物(LTAC:东京化成工业株式会社)、聚氧乙烯(30)鲸蜡基醚(BC30TX:日光 Chemicals 株式会社)、酞酸氢钾(以下,称为酞酸;和光纯药工业株式会社)及 EDTA-2K(中部 Chelest 株式会社)混合成以下的表 1 所示的组成而制备第 2 试剂。另外,在 pH 的调节中使用 NaOH 溶液。

[0104] 再有,LTAC 是阳离子性表面活性剂,BC30TX 是非离子性表面活性剂,酞酸是芳香族的有机酸。

[0105] 【表 1】

[0106]

试剂的名称	LTAC (ppm)	BC30TX (ppm)	酞 酸 (mM)	EDTA-2K (g/dL)	HEPES (mM)	pH
第 2 试剂 A	685	1850	20	0.2	10	7.2
第 2 试剂 B	685	1850	20	0.2	10	7.0
第 2 试剂 C	685	1750	20	0.2	-	7.0
第 2 试剂 D	685	1750	20	0.2	-	6.8
第 2 试剂 E	685	1750	20	0.2	-	6.4
第 2 试剂 F	685	1750	20	0.2	-	6.2
第 2 试剂 G	685	1750	20	0.2	-	6.0
第 2 试剂 H	685	1750	20	0.2	-	5.5
第 2 试剂 I	685	1750	30	0.2	-	7.0
第 2 试剂 J	685	1750	30	0.2	-	6.8
第 2 试剂 K	685	1750	30	0.2	-	6.0
第 2 试剂 L	685	1750	30	0.2	-	5.5
第 2 试剂 M	685	1750	40	0.2	-	7.0
第 2 试剂 N	685	1750	40	0.2	-	6.8
第 2 试剂 O	685	1750	40	0.2	-	6.0
第 2 试剂 P	685	1750	40	0.2	-	5.5
第 2 试剂 Q	685	1750	50	0.2	-	6.0

[0107] 如表 1 所示,仅第 2 试剂 A 及 B,作为缓冲液含 HEPES(株式会社同仁化学研究所)。第 2 试剂 A 及 B 相当于以往的白细胞分类试剂的溶血剂。

[0108] 本实施例中使用的活体样品是从 18 名的健康人采集的血液待测样品(18 待测样品)。以下,各待测样品各自称为待测样品 No. 1 ~ 18。

[0109] 将待测样品 20 μ L、第 1 试剂 20 μ L 及第 2 试剂 1000 μ L 混合,于 40℃温育 20 秒钟而制备测定用样品。再有,对于待测样品 No. 1 ~ 10 使用第 2 试剂 A ~ D 及 G ~ Q,对于待测样品 No. 11 ~ 18 使用第 2 试剂 B 及 E ~ G 而制备测定用样品。

[0110] 向各测定用样品由流式细胞仪(以下,称为 FCM)照射光,检测从该样品中的细胞发出的侧方散射光信号、前方散射光信号及荧光信号。解析得到的信号而测定测定用样品中的正常白细胞。再有,作为 FCM 的光源,使用激发波长 633nm 的红色半导体激光器。荧光信号检测 600nm 以上的波长的荧光(赤荧光)。

[0111] 对于各测定用样品,制成将侧方散射光强度作为 X 轴,将荧光强度作为 Y 轴的散点图时,各白细胞以每细胞形成集团。通过将此集团用适当的解析软件解析,将各白细胞集团特定,算出各白细胞集团中含的细胞数和全细胞数中占的各白细胞集团中含的细胞数的比例,和各白细胞集团的重心位置。算出各白细胞集团的重心位置,重心间的距离(以下,称为重心距离)。

[0112] 作为对重心距离的参考,示图 1。再有,图 1 之左图是使用健康人的待测样品测定上述的第 1 试剂及第 2 试剂 0 得到的散点图。从图 1 之左图示,待测样品中的正常白细胞

被分类为淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞的 5 种。图 1 之右图示将分类的各血细胞的集团特定, 淋巴细胞的集团及单核细胞的集团的重心(●)。2 个●之间的距离是重心距离。

[0113] 使用第 2 试剂 A (酞酸浓度 20mM、pH7.2) 测定 10 个待测样品(待测样品 No. 1 ~ 10)时的重心距离的平均值是 36.4。使用第 2 试剂 B (酞酸浓度 20mM、pH7.0)测定 18 个待测样品(待测样品 No. 1 ~ 18)时的重心距离的平均值是 38.3。

[0114] 将使用第 2 试剂 C、D 及 H ~ Q 测定 10 个待测样品(待测样品 No. 1 ~ 10)时的重心距离的平均值、使用第 2 试剂 G 测定 18 个待测样品(待测样品 No. 1 ~ 18)时的重心距离的平均值、及, 使用第 2 试剂 E 及 F 测定 8 个待测样品(待测样品 No. 11 ~ 18)时的重心距离的平均值示于以下的表 2。将作为示于表 2 的结果的重心距离的平均值由各第 2 试剂的酞酸浓度及 pH 分类的结果示于以下的表 3。

[0115] 【表 2】

[0116]

试剂的名称	重心距离
第 2 试剂 C	35.0
第 2 试剂 D	35.5
第 2 试剂 E	40.4
第 2 试剂 F	42.9
第 2 试剂 G	45.1
第 2 试剂 H	45.4
第 2 试剂 I	41.3
第 2 试剂 J	40.5
第 2 试剂 K	44.3
第 2 试剂 L	45.8
第 2 试剂 M	50.7
第 2 试剂 N	47.7
第 2 试剂 O	52.7
第 2 试剂 P	48.0
第 2 试剂 Q	52.3

[0117] 【表 3】

[0118]

pH	酞酸浓度			
	20mM	30mM	40mM	50mM
7.0	35.0	41.3	50.7	-
6.8	35.5	40.5	47.7	-
6.4	40.4	-	-	-
6.2	42.9	-	-	-
6.0	45.2	44.3	52.7	52.3
5.5	45.4	45.8	48.0	-

[0119] 由表 3 知,通过使第 2 试剂的酞酸浓度及 pH 成为特定的组合,相比作为以往的试剂的第 2 试剂 A 及 B,使单核细胞的信号出现的区域和淋巴细胞的信号出现的区域大大得离开。那样的酞酸浓度和 pH 的组合是,酞酸的浓度是 20mM 以上、不足 30mM,并且 pH 是 5.5 以上 6.4 以下的组合,或者,酞酸的浓度是 30mM 以上 50mM 以下,并且 pH 是 5.5 以上 7.0 以下的组合。

[0120] 【实施例 2】

[0121] 在本实施例中,使用实施例 1 的第 1 试剂和第 2 试剂 B、G 或 O,测定含形态异常的淋巴细胞的血液待测样品(以下,称为异常待测样品 1)。再有,由 FCM 的测定及重心距离的算出如同实施例 1 进行。

[0122] 将从由使用各试剂的 FCM 的测定制成的散点图(X 轴:侧方散射光强度、Y 轴:荧光强度)示于图 2。

[0123] 使用第 2 试剂 B(酞酸浓度 20mM、pH7.0)测定异常待测样品 1 时的重心距离是 62.9。使用第 2 试剂 G(酞酸浓度 20mM、pH6.0)测定异常待测样品 1 时的重心距离是 69.7。使用第 2 试剂 O(酞酸浓度 40mM、pH6.0)测定异常待测样品 1 时的重心距离是 80.6。

[0124] 本实施例中使用的异常待测样品 1 是形态异常的淋巴细胞的信号与正常淋巴细胞的信号出现在相同的区域的待测样品。所以,在散点图上淋巴细胞的集团非常大地膨胀。将异常待测样品 1 使用作为以往的溶血剂的第 2 试剂 B 测定,则含形态异常的淋巴细胞的集团和单核细胞的集团重叠,难以精确检测形态异常的淋巴细胞。

[0125] 对此,在使用本发明的试剂盒的第 2 试剂 G 或 O 的测定中,淋巴细胞的集团和单核细胞的集团大大得离开,所以即便如本实施例一样测定异常待测样品时,也可精确分升含形态异常的淋巴细胞的集团和单核细胞的集团。由此,可相比以往试剂更精确检测形态异常的淋巴细胞。

[0126] 【实施例 3】

[0127] 在本实施例中,使用实施例 1 的第 1 试剂和第 2 试剂 B、G、M 或 O,测定含形态异常的淋巴细胞的活体样品(以下,称为异常待测样品 2)及含成髓细胞的活体样品(以下,称为异常待测样品 3)。

[0128] 本实施例中使用的活体样品是由以往的试剂的测定无法判别异常白细胞是形态异常的淋巴细胞或是成髓细胞的 2 个血液待测样品。这是因为形态异常的淋巴细胞及成髓细胞的各信号均出现在散点图上的大致相同的区域。再有,由 FCM 的测定及重心距离的算

出如同实施例 1 进行。

[0129] 将从由使用各试剂的 FCM 的测定制成的散点图(X 轴 :侧方散射光强度、Y 轴 :荧光强度)示于图 3 及图 4。

[0130] 由图 3 知,使用作为以往试剂的第 2 试剂 B 测定异常待测样品 2,则该待测样品中含的,形态异常的淋巴细胞的集团出现在跨从淋巴细胞的集团和单核细胞的集团之间的区域到其区域之上方(荧光强度高的方)。另外,由图 4 知,使用第 2 试剂 B 测定异常待测样品 3,则该待测样品中含的成髓细胞的集团也与异常待测样品 2 中含的,形态异常的淋巴细胞的集团出现在同样的区域。

[0131] 即,异常待测样品 2 及 3 中含的异常白细胞的集团均与淋巴细胞及单核细胞的集团一部分重叠。另外,异常待测样品 2 及 3 中含的异常白细胞的集团在散点图上的分布的样式相类似。

[0132] 从而,从使用作为以往试剂的第 2 试剂 B 的测定的结果无法判别待测样品中含形态异常的淋巴细胞及成髓细胞之任何。再者,形态异常的淋巴细胞的集团之一部分与淋巴细胞及单核细胞的集团重叠,所以难以精确分类计数正常的淋巴细胞及单核细胞。

[0133] 由图 3 及 4 知,在使用作为本发明的试剂盒的第 2 试剂的第 2 试剂 I、K、M 或 O 的测定中,淋巴细胞的集团和单核细胞的集团在散点图上分离出现。由此,异常待测样品 2 中含的,形态异常的淋巴细胞偏向淋巴细胞的集团的方而出现,无法精确分开单核细胞的集团。另外,异常待测样品 3 中含的成髓细胞偏向单核细胞的集团的方而出现,从而可精确分开淋巴细胞的集团。

[0134] 从而,使用本发明的试剂盒的第 2 试剂测定,在形态异常的淋巴细胞的出现位置和成髓细胞的出现位置上呈现明确的差,所以可正确地判断待测样品中是否含任何的异常白细胞。再者,异常白细胞的集团无法被精确分成淋巴细胞的集团或单核细胞的集团,所以相比以往的试剂,可更正确地分类计数正常单核细胞或正常淋巴细胞。

[0135] 【实施例 4】

[0136] 在本实施例中,使用实施例 1 的第 1 试剂和第 2 试剂 A 或 O,测定含形态异常的淋巴细胞的活体样品。其中,本实施例的活体样品中含的形态异常的淋巴细胞是由形态学检查被确认为非典型淋巴细胞的淋巴细胞。

[0137] 本实施例中使用的活体样品是在由以往的试剂的测定中无法判别异常白细胞是非典型淋巴细胞还是母细胞的 2 个血液待测样品(以下,各自称为异常待测样品 4 及异常待测样品 5)。这是由于,如上所述,非典型淋巴细胞母细胞的各信号均出现在散点图上的大致相同的区域。再有,由 FCM 的测定如同实施例 1 进行。

[0138] 将从由使用各试剂的 FCM 的测定制成的散点图(横轴 :侧方散射光强度、纵轴 :荧光强度)示于图 5。知道使用作为以往的试剂的第 2 试剂 A 测定异常待测样品 4 及 5,则待测样品中含的非典型淋巴细胞的集团出现在跨从淋巴细胞的集团和单核细胞的集团之间的区域到其区域之上方(荧光强度高的方)。但是,由于母细胞的集团也出现在大致相同的区域(未图示),无法区别检测非典型淋巴细胞的集团和母细胞的集团。

[0139] 对此,使用第 2 试剂 O 测定异常待测样品 4 及 5,则单核细胞的集团和淋巴细胞的集团分离,同时非典型淋巴细胞的集团偏向淋巴细胞的集团出现。如上述的实施例 3 的图 4 所示,使用第 2 试剂 O 测定含母细胞的异常待测样品时,母细胞偏向单核细胞的集团出现。

由此,可区别检测非典型淋巴细胞的集团和母细胞的集团。

[0140] 【实施例 5】

[0141] 本实施例中使用实施例 1 的第 1 试剂,和作为第 2 试剂,第 2 试剂 A 或 G、或者,作为芳香族的有机酸含酞酸及安息香酸的第 2 试剂 R 或 S 测定活体样品。再有,将 LTAC、BC30TX、酞酸、安息香酸及 EDTA-2K 混合成以下的表 4 所示的组成而制备第 2 试剂 R 及 S。

[0142] 【表 4】

[0143]

试剂的名称	LTAC (ppm)	BC30TX (ppm)	酞酸 (mM)	安息香酸 (mM)	EDTA-2K (g/dL)	pH
第 2 试剂 R	685	1850	20	20	0.2	6.0
第 2 试剂 S	685	1850	20	30	0.2	6.0

[0144] 本实施例中使用的活体样品是从健康人采集的血液待测样品。由 FCM 的测定及重心距离的算出如同实施例 1 进行。

[0145] 将从由使用各试剂的 FCM 的测定制成的散点图(横轴:侧方散射光强度、纵轴:荧光强度)示于图 6。另外,将使用各试剂测定待测样品时的重心距离以及各试剂的芳香族的有机酸的浓度及 pH 示于以下的表 5。

[0146] 【表 5】

[0147]

试剂的名称	重心距离	酞酸(mM)	安息香酸(mM)	pH
第 2 试剂 A	37.9	20	0	7.2
第 2 试剂 G	44.7	20	0	6.0
第 2 试剂 R	46.3	20	20	6.0
第 2 试剂 S	47.0	20	30	6.0

[0148] 从表 5 及图 6 知,通过使用作为芳香族的有机酸向酞酸再加安息香酸的第 2 试剂测定,可使单核细胞的集团和淋巴细胞的集团的重心距离变得更大。

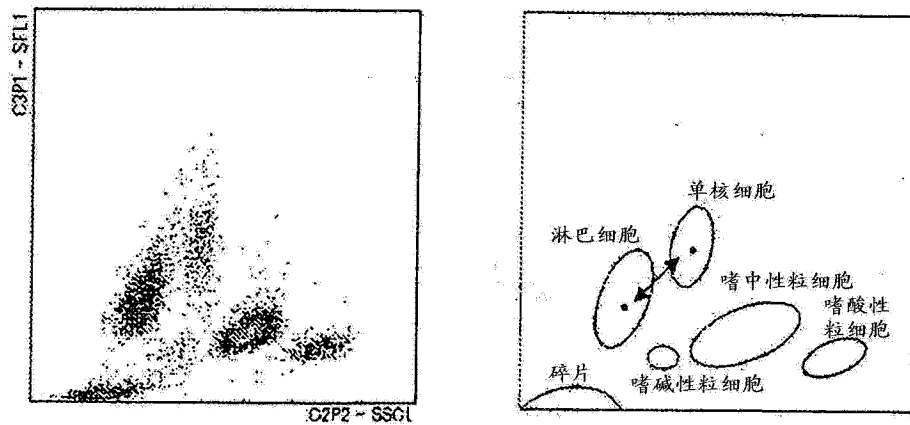


图 1

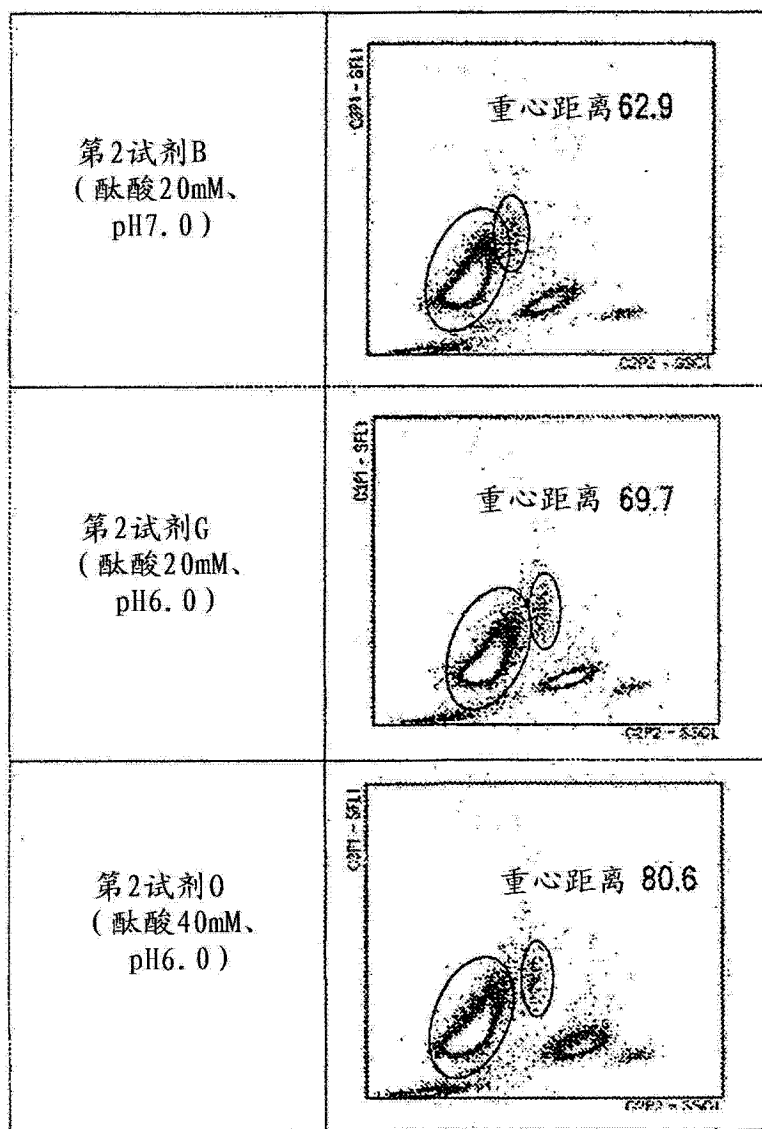


图 2

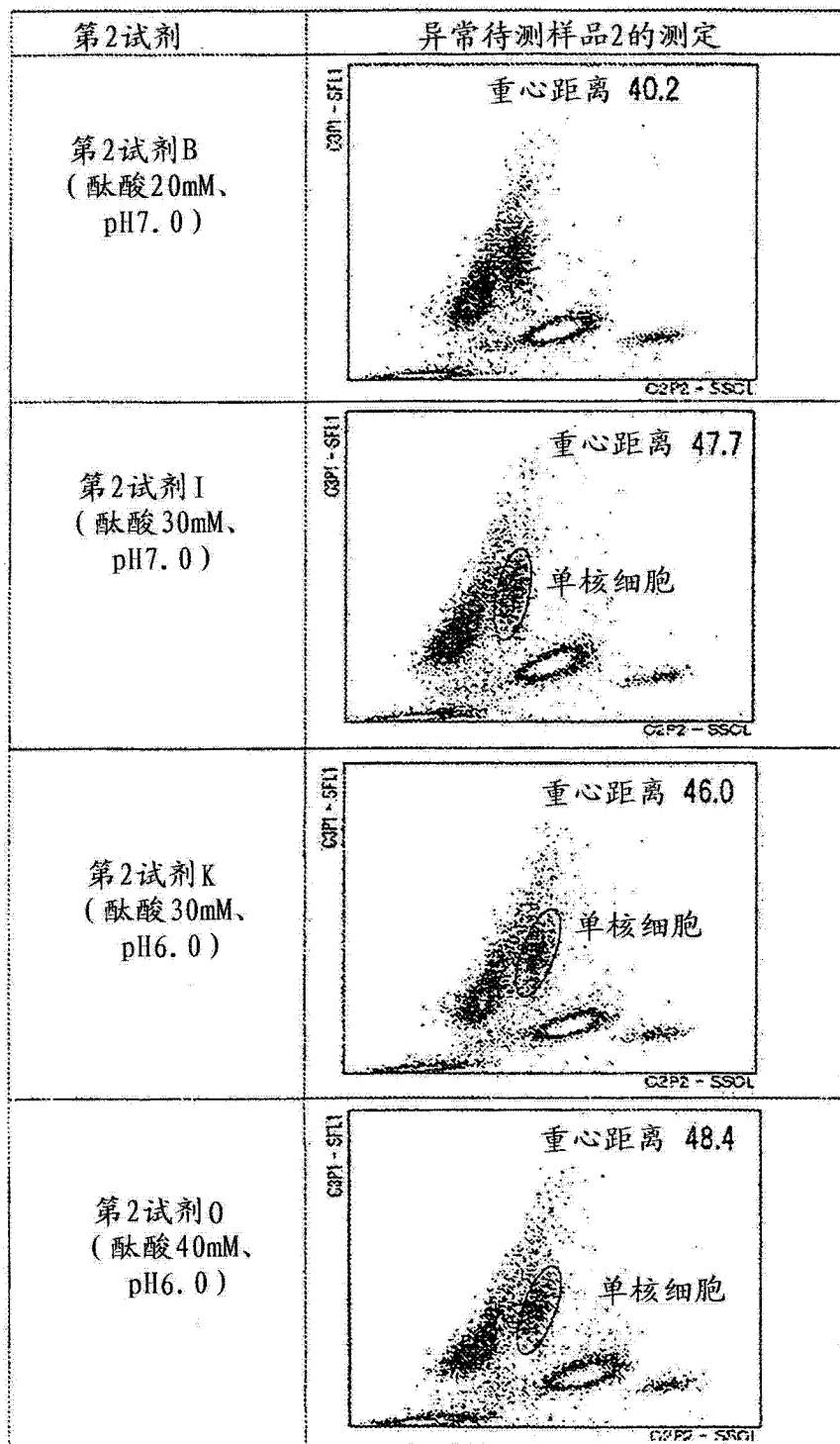


图 3

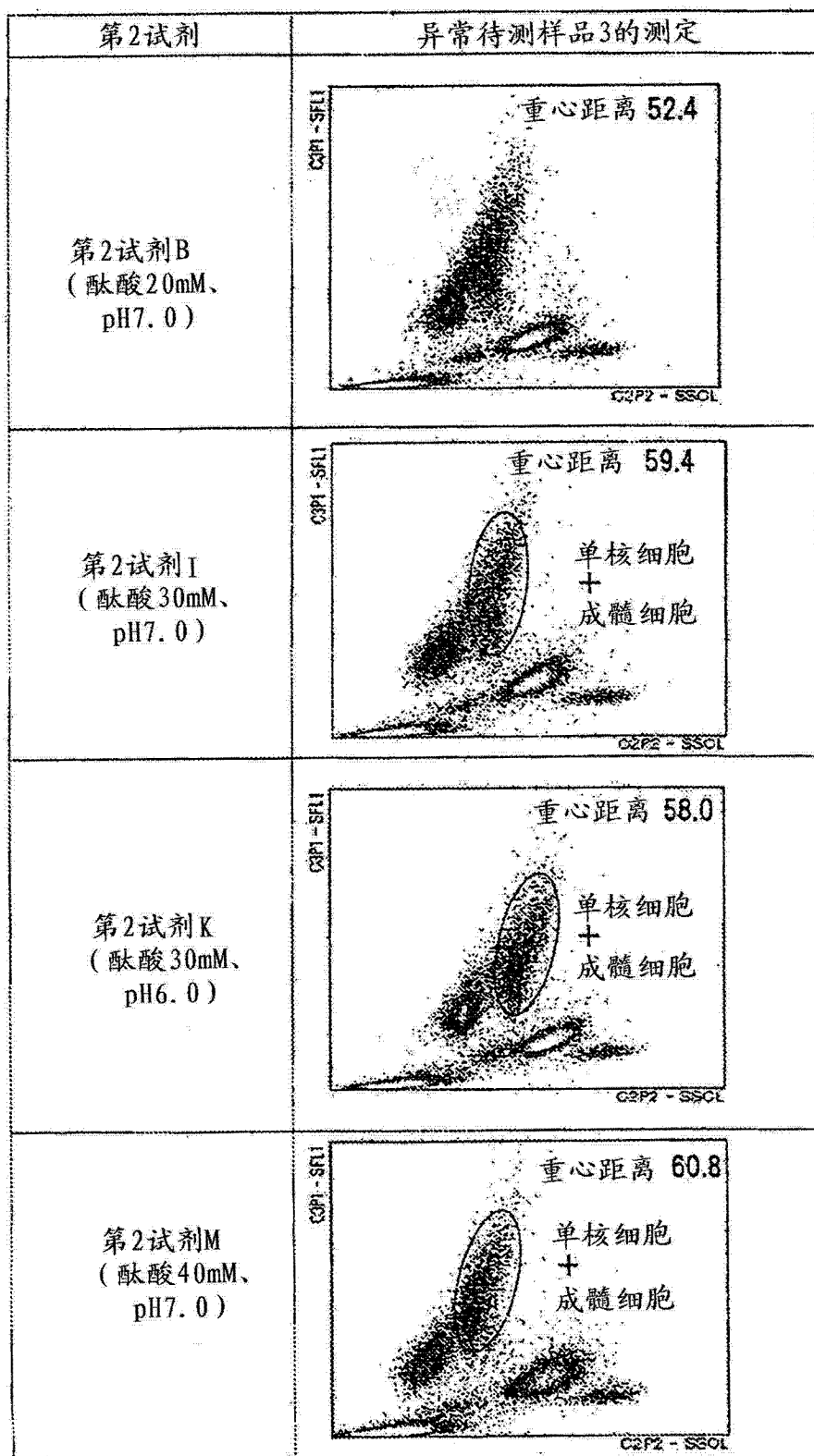


图 4-1

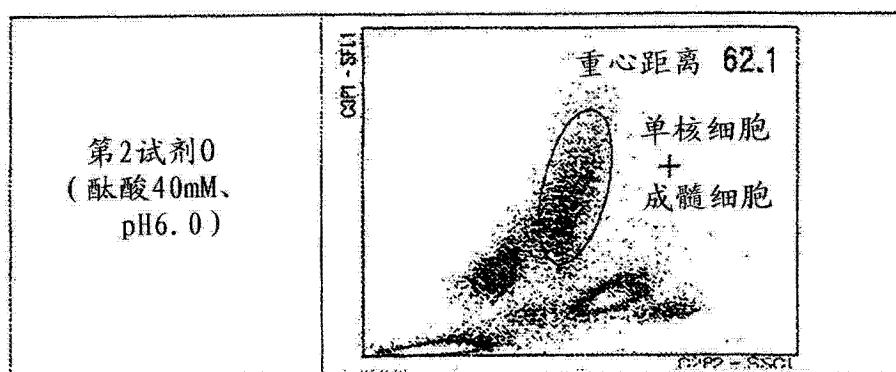


图 4-2

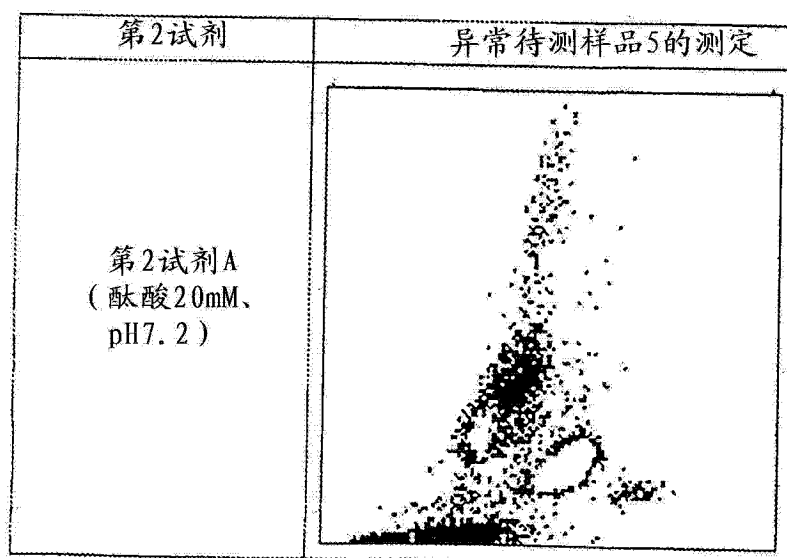
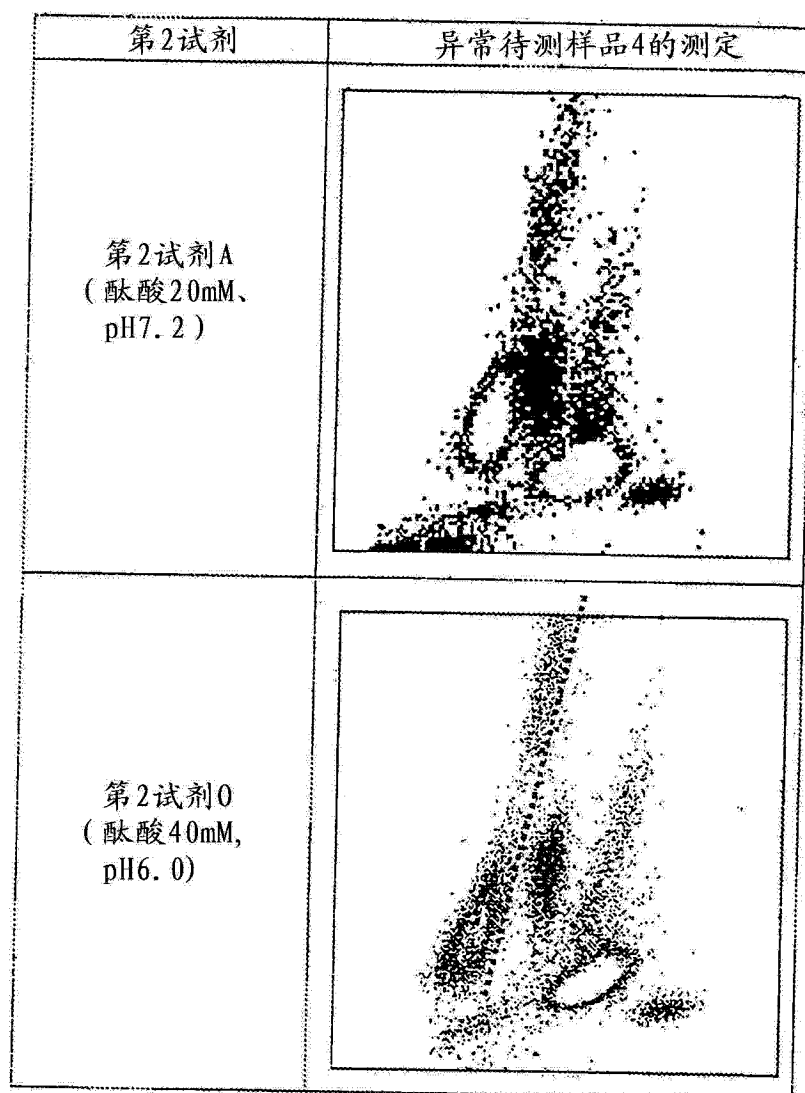


图 5-1

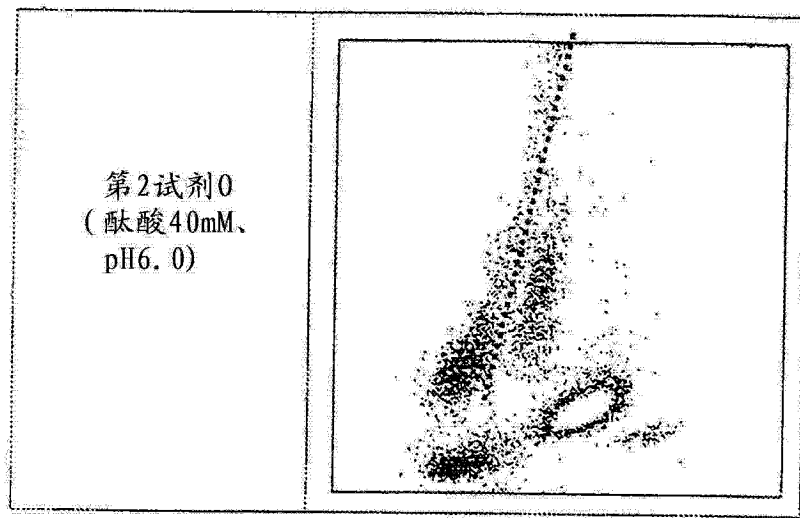


图 5-2

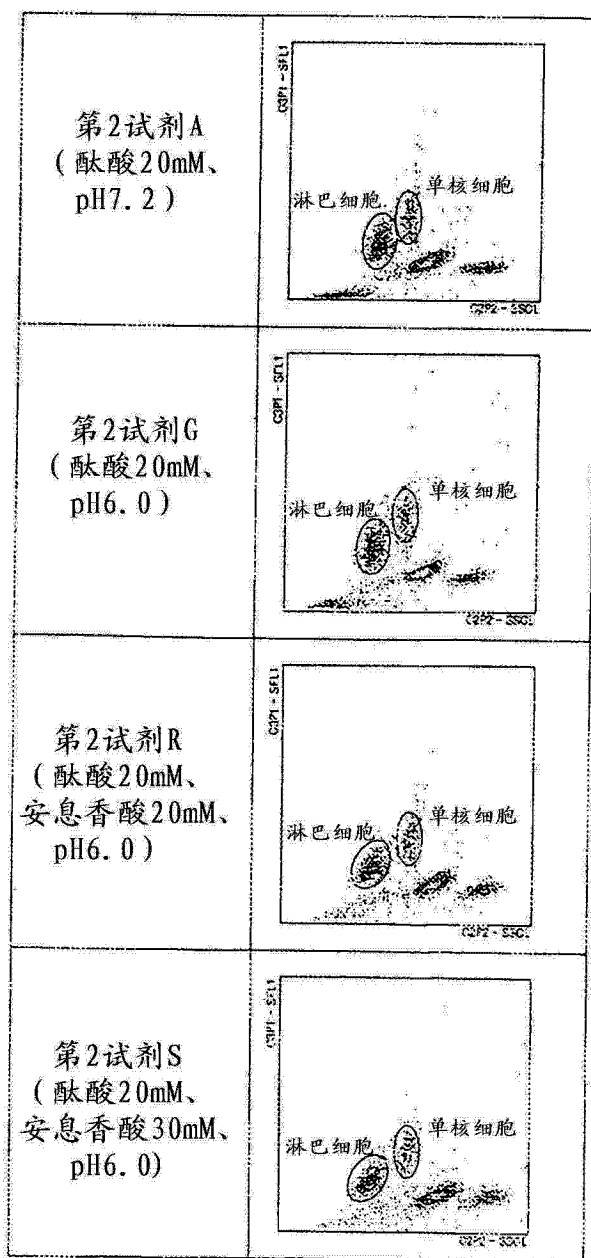


图 6