

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3707620号
(P3707620)

(45) 発行日 平成17年10月19日(2005.10.19)

(24) 登録日 平成17年8月12日(2005.8.12)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/49

GO 1 N 33/49

H

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/49

F

GO 1 N 33/48

P

請求項の数 10 (全 21 頁)

(21) 出願番号	特願平6-525660	(73) 特許権者	コールター インターナショナル コーポ レーション
(86) (22) 出願日	平成6年5月10日(1994.5.10)		アメリカ合衆国, フロリダ 33196,
(65) 公表番号	特表平8-510330		マイアミ, サウスウエスト ワンハンドレ ッドフォーティーセブンス アベニュー 1 1800
(43) 公表日	平成8年10月29日(1996.10.29)	(74) 代理人	弁理士 石田 敬
(86) 国際出願番号	PCT/US1994/005209	(74) 代理人	弁理士 鶴田 準一
(87) 国際公開番号	W01994/027146	(74) 代理人	弁理士 下道 晶久
(87) 国際公開日	平成6年11月24日(1994.11.24)	(74) 代理人	弁理士 大関 雅人
審査請求日	平成13年5月8日(2001.5.8)		
(31) 優先権主張番号	08/062,857		
(32) 優先日	平成5年5月14日(1993.5.14)		
(33) 優先権主張国	米国(US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 光散乱技術を使用した網赤血球分析方法と装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

血球計数フローセルの全血液検体の少なくとも一部の網赤血球を分析する方法において、複数の細胞を含む全血液検体の一部と、赤血球細胞を破裂させることなく膨張させて、赤血球からヘモグロピンを除去する赤血球試薬とを組み合わせるステップと、血球計数フローセルを前記の組み合わせられた全血液検体と赤血球試薬の部分標本を通過させるステップであって、前記血球計数フローセルの検出区画を実質的に一回に1つずつ前記細胞を通過させ前記検出区画を少なくとも1本の光ビームを同時に通過させて、前記細胞を横切ることを含むステップと、個々の細胞が前記光ビームを横切るときに個々の細胞により散乱される光を検出するステップと、前記全血液検体中の網赤血球の比率を得るため個々の細胞により散乱された前記光を分析するステップと、からなることを特徴とする方法。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の方法において、中央光散乱角を検出することをさらに特徴とする方法。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の方法において、個々の細胞が前記検出区画を通過するとき、個々の細胞を電子的に検知をすることをさらに特徴とする方法。

【請求項 4】

請求項 3 に記載の方法において、前記検出した光散乱と前記の電子的な検知を組み合わせ、前記網赤血球の比率を得ることをさらに特徴とする方法。

【請求項 5】

請求項 1 に記載の方法において、前記赤血球試薬を加える前に、染色試薬と前記全血液検体とを組み合わせることをさらに特徴とする方法。

【請求項 6】

血球計数フローセルの全血液検体の少なくとも一部の網赤血球を分析する装置において、複数の細胞を含む全血液検体の一部と、赤血球細胞を破裂させることなく膨張させて、赤血球からヘモグロピンを除去する赤血球試薬とを組み合わせる手段と、

血球計数フローセルを前記の組み合わせられた全血液検体と赤血球試薬の部分標本を通過させる手段であって、前記フローセルは、該血球計数フローセルの検出区画を実質的に一回に 1 つずつ前記細胞を通過させる手段と、前記検出区画を少なくとも 1 本の光ビームを同時に通過させて、前記細胞を横切るようにする手段とを含む手段と、
個々の細胞が前記光ビームを横切るときに個々の細胞により散乱された光を検出する手段と、

前記全血液検体中の網赤血球の比率を得るため、個々の細胞により散乱された前記光を分析する手段と、

を具備することを特徴とする装置。

【請求項 7】

請求項 6 に記載の装置において、中央光散乱角を検出する手段を有することをさらに特徴とする装置。

【請求項 8】

請求項 6 に記載の装置において、個々の細胞が前記検出区画を通過するときに、個々の細胞を電子的に検知をする手段を有することをさらに特徴とする装置。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の装置において、前記検出した光散乱と前記の電子的検知とを組み合わせ、前記網赤血球の比率を得る手段をさらに有することを特徴とする装置。

【請求項 10】

請求項 6 に記載の装置において、前記赤血球試薬を加える前に、染色試薬と前記全血液検体とを組み合わせる手段を有することをさらに特徴とする装置。

【発明の詳細な説明】

技術分野

本発明は、一般に、粒子分析装置、特に、蛍光染色技術または材料を用いず、光散乱技術を用いた個々の赤血球細胞型、主として網赤血球の選択、識別、分画分類を行う方法と装置に関する。

背景技術

網赤血球は医学文献では、未熟赤血球（または核が抽出された脱核細胞）と定義されており、この種の細胞は、全赤血球数中に通常、0.7 ~ 2.2 % の比率で存在する。例えば、様々な形態の貧血または急性内部出血などのような疾患の診断の特定を同定または支援しようとする場合、網赤血球の決定は医学的な重要性がある。

人間の血液をスライドガラスの表面に塗抹する顕微鏡による視算検査は、網赤血球決定方法として古くから広く用いられている方法である。この方法は、時間を節約するが、実際の網赤血球数の計数を人間の眼に頼っており、しばしば網赤血球数を誤って計測してしまうことが多く、その結果、誤診につながることも少なくなかった。

顕微鏡を用いて網赤血球を決定する方法の 1 つは、Bjorkman による「Method for Determining Absolute Reticulocyte Count」J. Clin. & Lab. investigation, 435 ~ 436, 1958 に開示されている。ここで用いた方法は、新しいメチレンブルーを用いて毛細血管血液を染色し、希釈液により赤血球細胞を固定する方法を用いている。希釈溶液は硫酸中に希釈したチオシアン酸カリウムからなっている。固定プロセスは、赤血球細胞から

10

20

30

40

50

のヘモグロビンの溶出が伴う。ヘモグロビン数が減少すると、スライドガラスに塗抹した血液中の細胞を顕微鏡で観察したときに、小網の決定を向上させる。

自動化された網赤血球数の計数装置も市販されているが、赤血球数決定の基礎として蛍光を用いた場合周知の機器の使用の信頼性は一般的である。蛍光を用いる装置は、高価で、複雑で、メンテナンス費用も比較的高くつく。

網赤血球は、蛍光染色法と組み合わせたとき、フローサイトメータを用いて識別と分類ができることはよく知られている。このような方法の1つには、90°または大きな角度の光散乱と組み合わせた小さな角度の光散乱を用いる方法が含まれる。

従来技術に関する文献、科学雑誌、および報告書では、光軸に対し、さまざまな角度位置で光散乱技術を用いて検体の照射と検査をする方法を図示、説明、および議論している。しかし、入手可能な文献の多くは、網赤血球の検出に蛍光、蛍光技術、および化学的方法に頼っているのが現状である。

10

この従来技術の例には、染色した検体の網赤血球蛍光の強さを強め、同時に、蛍光を測定したとき、S/N比を高めるため検体のバックグラウンド蛍光を低減する染料を含む試薬について記載したKuroda他による米国特許第4,985,174が含まれる。これは、黄色蛍光色素オラミンOを含む試薬によって達成される。

Gershman他による米国特許第4,325,706には、塩基性蛍光色素アクリジン・オレンジで全血液検体进行处理する方法を記載しており、この方法では、検体を狭い流体力学的集中領域を持つ光学的フローサイトメータを通す。赤い蛍光光と出力散乱光が検出される。閾値との比較に基づき、閾値レベルを発展させて、網赤血球から赤血球細胞を分離する。

20

Lee他による米国特許第4,883,867には、蛍光組成に関して記載している。シアゾール・オレンジを用いることは、網赤血球の染色に効果的な染料であることが分かっている。

発明の開示

本発明は、生物細胞検体中の細胞型を高速、高精度で自動的に分析と分離をする新規かつ有用でこれまで自明でなかった生物細胞のカウント、測定、および分画をする方法と装置を提供する。

概略的に言えば、本発明は、流体力学的に集中した粒子の流状になってヘモグロビンが除去された赤血球細胞の生物検体が、電磁放射ビーム、レーザ光などのような焦点を絞ったビーム光を通過するようにした構造的な組み合わせを提供する。光検出器は、光ビーム軸に対し適切に配置され、個々の細胞の通過を示す光出力パルスを送出する。

30

流動経路中の電氣的導電接点は、個々の細胞の検査結果として、さらに電気パルス出力を送出することができる。適切に配置した光レセプタは、光ビーム軸に対し角度を付けて配置され、移動検体中の網赤血球を示す電気パルスを出力する。適切な電子回路を用いて、光と電子的に生成された出力パルスまたは信号とを、他の周知の細胞型から区別可能に網赤血球の特定および定量をすべく結合することができる。

本発明は、光散乱技術だけを用いておよびCoulter型技術と組み合わせて網赤血球を示すデータを発生する装置と方法に関係するものである。

さらに、本発明は、特に、情報またはレーザ光の軸に対しある角度範囲でマスクしたレーザビームの出力領域に配置されているパルス発生アセンブリから得たデータを用いた新しい装置と方法を提供する。

40

本発明の実施において、赤血球の分離(Lysing)または、赤血球細胞を破裂させることなく、球形に膨張させて、赤血球からヘモグロビンを除去する「赤血球試薬」で処理された網赤血球は、フロー装置中で光散乱により分析され、低出力レーザを照射して、分離した網赤血球の小集団として赤血球の検出と計数を行う。

効果は、例えば、10°の小さな前方角から約180°を含む角度までの広範囲の光散乱角内で明白である。分析に好ましい角度は、約20°~65°の範囲である。

Coulter容積またはDCとして知られる低周波開口インピーダンスは、全赤血球細胞の識別とカウントをするため、また他の細胞型から網赤血球を分離するため、さらに、

50

平均網赤血球量を得るため、同時に検知できる。

高周波または無線周波開口インピーダンスは、同時に検知して他の細胞型から網赤血球を識別できる。

【図面の簡単な説明】

本発明の好適な実施例は、例と、この明細書に添付した図面を用いて説明する。

図1は、理想化して表現した血球計数フローセルとこれに動作上関連する光検出器アセンブリを含む構成を示す図である。

図1Aは、信号受信領域を示す、本発明を用いた光検出器アセンブリの正面図（一定の尺度ではないが）を示す図である。

図2は、本発明を実現する装置と演算電子回路を示すシステム・ブロック図である。

10

図3A～3Cは、本発明により網赤血球の分画と計数をする3つの方法を示すフローチャートである。

図4A～4Dは、網赤血球を含む血液検体の染色および赤血球細胞を破裂させることなく、球形に膨張させて、赤血球からヘモグロビンを除去することの効果を示すデータプロットである。

図5A～5Dは、網赤血球を含む血液検体についてさまざまな光散乱角で得られた結果を示すデータプロットである。

図6A～6Cと7A～7Gは、光または光と電子的な検知技術を用いた自動集団分類方法で得られた網赤血球分析報告を示すデータプロットである。

図8A～8C、9A～9C、10A～10C、および11A～11Cは、網赤血球の0.0%～約30%までの広範囲にわたり多くの臨床的な人間の血液検体について網赤血球分析報告を示すデータプロットである。

20

図12は、本発明により得た網赤血球の比率対基準方法によって得た網赤血球の比率のプロットを示す図である。

発明の実施態様

多くの図とこの明細書中を通し、本発明により得た結果を得るため、および/または説明するためいくつかの名称と略語を用いる。

「ヒストグラム」は、単一変数に関する周波数分布のグラフであり、X軸上にプロットされた変数とY軸上に「#」としてプロットされた周波数の2次元線グラフとして表示され、また、ヒストグラムは、コンピュータ、あるいは、ある形態の電子回路内にグラフとして表現された抽象的な数値表としても定義されている。

30

「マトリックス」は、X軸上にプロットされた1変数を持つ3次元等高線グラフとして表示された2つの独立変数、Y軸上にプロットされた第2変数、および等カウント等高線として表示された周波数またはカウントの周波数分布グラフとして定義されている。明確にするため、1つの等カウント等高線だけを表示して外形を示す。また、マトリックスは、コンピュータ内に、あるいは、ある形態の電子回路として表現された抽象的な数値表としても定義されている。この明細書中でマトリックスを説明するときは、X軸変数を最初に記載し、次にY軸変数を記載する。

「パラメータ」は、独立変数の同義語であり、以降の明細書中で述べているように本発明では、粒子分析器またはフローサイトメータで分析された細胞から得られた任意の同時的かつ独立測定に関する。ある数学的関数の2つまたはそれ以上の組み合わせは、別のパラメータを生成すると定義される。

40

「ゲーティング」は、フィルタ・プロセスとして定義され、1つまたはそれ以上の他のパラメータの検査中に、複数パラメータ・データから、1パラメータのヒストグラムを作成するのに用いたものである。フローセルを通過する1赤血球細胞の通過およびパラメータ・トランスデューサによる細胞測定の各イベントに対し、ゲーティングに用いられている各パラメータに対応する値または測定は、1つ、または2つの基準値あるいは閾値と比較され、閾値以下か、閾値以上か、または2つの閾値の間にあるのか「テスト」される。もし、このテストにより、考量中の全ゲーティング・パラメータに対して正しい結果が得られるなら、イベントはヒストグラムに含まれている。ゲーティングはまたマトリックス

50

の作成にも用いることができる。従って、ゲーティングを用いることにより、分析と複数パラメータ・データのグラフィック表示とを単純化することが可能である。

「光検出器」は、光を収集し、光検出器で受光した光量に比例して電流を発生する真空または固体の任意の種類のデバイスに関する。

「ビームダンプ」は、一般に、レーザビームとフローセル間の交差の結果、光検出器を横切る水平ラインとして現れる不要なレーザ光を除去する障害物として定義されており、もし、不要なレーザ光を遮断しないと検出した光散乱信号の品質が低下する。

「マスク」は、不要な小さな角度の光散乱情報を除去し光検出器によるこの情報の受信を防ぐ、円形または楕円形状の障害物として定義されている。

「DC」と「RF」は、開口インピーダンス細胞検知のCoulter原理に関する電子的な検知パラメータである。「DC」は、細胞膜を透過しないで、細胞を電流が流れないように、直流または低周波電流を印加して得られたパルス・ピーク情報として定義されている。DCパルスのピーク振幅は細胞容積の関数である。

「RF」は、細胞膜が短絡して、細胞に電流が流れるとき高周波電流を印加して得られた測定から得たパルス・ピーク情報として定義されている。RFは細胞容積と内部導電率の関数である。

「不透明」は、すべての個々の細胞測定、あるいはイベントに対する、DC信号データによりRF信号データを割って得た信号又はデータとして定義されており、細胞容積とは無関係であるが内部導電率の関数である新しい細胞パラメータを生成する。

「LMALS」は、Lower Median Angle Light Scatterの略であり、光ビーム軸、例えば、レーザビーム22の軸30から10°~20°の角度範囲にわたって散乱した光検出器アセンブリ28が受光した光である。

「UMALS」は、Upper Median Angle Light Scatterの略であり、散乱した、または、光ビーム軸、例えば、レーザビーム22の軸30から20°~65°の角度範囲にわたり光検出器アセンブリ28が受光した光である。

「RALS」は、Reverse Angle Light Scatterの略であり、約160°~176°の角度範囲にある光ビーム22に対し、反対方向に位置する光検出器アセンブリで受光した光である。

「SALS」は、Single Angle Light Scatterの略であり、光ビーム軸から約90°~20°の角度範囲に位置する光検出器アセンブリで受光した光である。

「RLS」は、Rotated Light Scatterの略であり、DCで割ったUMALSの対数である。

「RETICとRETIC%」は、全赤血球数の比率として示された網赤血球数を示す。

「REF RETIC」は、NCCLS文書H-16Pに記載された顕微鏡を用いる方法論に従って得た基準網赤血球の比率である。

「RBC」は、通常、 $\text{カウント} \times 10^6 / \mu\text{L}$ で示される絶対的赤血球数、または赤血球数である。

「RETIC - ABS」は、通常、 $\text{カウント} \times 10^6 / \mu\text{L}$ で示される絶対的網赤血球数を示す。

「MRV」は、網赤血球集団の平均DC値を測定して得た平均網赤血球容積として定義されている。

「RMI」と「MI」は、全網赤血球数に対する高密度光散乱網赤血球数の比率として定義された網赤血球の成熟指数を示す。

「LS」は、Light Scatterの略であり、一般に、特定角度または角度範囲を指定しない任意の光散乱を示す。

「LLS」は、「LS」の対数として定義されており、LLSの好ましい角度または角度範囲はLOG UMALSである。

「RLS」は、LLS、好ましくは、上述したようにDCで割ったLOG UMALSである。

10

20

30

40

50

「LSR」は、Low intensity Scatter Reticulocytesの略である。

「HSR」は、High intensity Scatter Reticulocytesの略である。LSRとHSRに関するさらに詳しい説明は、本明細書中の以下の節に記載されている。

以下の説明において、光散乱角は、開口または検知区画内の生物細胞から出力される光の角度として定義されている。後述する光検出器アセンブリに衝突（入射）する散乱光の角度は、検体、希釈液、および／または流体力学的シース流体、空気、フローセル材料の屈折率の差により、またスネルの法則で予測したようなフローセルの構成により、開口内の真の角度から離れるかもしれない。

図1は、本発明の方法とプロセスを用いる粒子分析装置の1形式の一部を示す。図1の装置には、例えば、熔融シリカなどの光学的に透明な物質からなるフローセル10を含む。この例において、血球計数フローセル10の内部は、生物細胞検体がこの図には示されていない周知の方法により、流体力学的に集中した流れ14として通過、または流れる狭い、あるいはくびれた開口を除き、全体的に楕円形状である。フローセル10の外壁表面は、平坦な1側面部18を除き楕円形状である。

レーザ20は、レンズ、または開口あるいは検知区画12の小さな点にビーム22の焦点を結ぶレンズ系24にコヒーレントな光ビーム22を放射する。レーザ20は任意の種類または波長である。

さらに、本発明は、光源としてレーザだけに制限されていない。フローサイトメータ分析に必要な大きさのオーダの点に光を収束できるのであれば、アーク灯などのような他の光源も用いることができる。この例において、レーザ20は、632.8nmで放射する0.8mWの比較的低電力のヘリウム・ネオンレーザを用いている。レンズ系24は、フローセル10の開口12内に水平に配置された細長い点にレーザ光ビーム22の焦点を結ぶように設計されている2つのクロス・シリンドリカル(cross cylindrical)レンズを備えている。レーザビーム22のこのような光学的形状により、細胞や粒子がフローセル10を流れると、細胞または粒子位置への装置の感度を低くし、放射がより一様になり、同じ細胞や粒子への光散乱レベルがより一様になる。

生物細胞が、流体力学的に集中した流れ14を流れると、生物細胞は個々に開口12と焦点を絞った光ビーム22を通過し、図で点線で示されている光散乱光線26を放射する。光検出器アセンブリ28は、光散乱放射レセプタとして動作し、光を放射し、軸30に集中するレーザ光の軸30に直交する平面に位置して、光散乱光線26を収集する。

図1は、光検出器アセンブリ28の斜視図を示す。図1Aは、同じ光検出器アセンブリ28の正平面図を示す。以下の説明は図1と1Aに関するものである。光検出器アセンブリ28は、検出器32の正面に位置し、平行に配置されている光起電力検出器32、ビームダンプ34と、検出器32の正面に置かれ、水平に配置されているマスク36との組み合わせを含む。マスク36は、ビームダンプ34の中心に配置された円形または楕円形状の構造である。マスク36は、レーザ光ビーム軸30と同軸に向けられている。

水平ビームダンプ34は、中心よりその外端が大きいまたは広い蝶ネクタイ状の形状をとりえる。水平ビームダンプ34は、水平方向に引伸しあるいは平坦にして、細胞や粒子がフローセル10を流れたとき、細胞または粒子位置に対する装置の感度を低く抑えるため、レーザビームの形状を成形する状態に光学系を適合させるのに用いている。このような光学的形状の採用により、光散乱信号出力を電子的に用いるため、より一様な光出力信号を出力する。

図1と1Aにおいて、光検出器32は、円形帯42によって2つの区画38、40に分割されている。光検出器32の大きさ、区画38と40の大きさ、マスク36の大きさの結果として、およびフローセル10に対する光検出器アセンブリ28の距離の結果として、内部区画38は、約10°～20°の角度範囲で散乱したLMALS光を受光する。外部区画40は、20°～65°の角度範囲で散乱したUMALS光を受光する。

この説明のため、赤血球細胞は、図1に示すフローセル10の開口12を通過して1つずつ

10

20

30

40

50

通過すると見なされる。赤血球細胞または他の粒子がどのようにしてフローセル 10 に入るのか、また細胞の複数パラメータ・データをどのようにして得て、分類、処理するのかという方法に関する装置の詳しい全体な説明は、共有の米国特許第 5, 125, 737 に記載されている。

図 2 は、本発明を実現する粒子分析装置、またはフローサイトメータのブロック図を示しており、この図には図 1 と図 1 A および上述した構成要素を含む。レーザ 20 は、開口またはフローサイトメータ 10 の検知区画 12 の小さな点にビーム 22 の焦点を結ぶレンズまたはレンズ系 24 に、コヒーレントなビーム 22 を放射する。ビーム 22 は血球計数フローセル 10 を透過して、光検出器アセンブリ 28 のマスク 36 とビームダンプ 34 に衝突（入射）する。希釈液中の赤血球細胞は、ライン 44 を通ってフローセル 10 に入り、検体導入管 46 を通って流れる。シース流体 48 は、細胞 50 を流体力学的に集中させられ、開口 12 を個々に通過させる。細胞が開口 12 から放出された後、第 2 シース 52 は、その細胞を検体出力管 54 と廃棄室 56 に導く。細胞 50 が開口 12 にあって、焦点を絞ったレーザビーム 22 で照射されたとき、細胞は多方向に光を散乱する。いくつかの光散乱光線 58、60、62、および 64 が点線で図に示されている。

光検出器アセンブリ 28 の光検出器 32 は、2 つの区画 38 と 40 を含む。2 つの区画 38 と 40 の角度範囲は、光検出器 32 の大きさ、フローセル 10 に対する光検出器 32 の距離と位置、およびマスク 36 の直径によって決定される。内部区画 38 は、約 10° ~ 20° の角度範囲で散乱した L M A L S 光線 58 を収集し、L M A L S パルス 68 を出力するプリアンプ 66 に供給される信号を生成する。外部区画 40 は、約 20° ~ 65° の角度範囲で散乱された U M A L S 光線を収集し、U M A L S パルス 72 を出力するプリアンプ 70 に供給される信号を生成する。光検出器 74 は、レーザビーム 22 の軸 30 に垂直に配置され（図の平面に垂直）、約 90° ~ 20° の角度範囲で散乱された S A L S 光線 62 を収集し、S A L S パルス 78 を出力するプリアンプ 76 に供給される信号を生成する。光検出器対 80 は、レーザビーム 22 の周囲に対称的に配置され、レーザビーム 22 に対し反対方向に散乱された R A L S 光線 64 を収集し、約 160° ~ 176° の角度範囲で R A L S パルス 84 を出力するプリアンプ 82 に供給される信号を生成する。

電子パルス発生装置 86 は、R F と D C 信号の電流発生源、検出、および増幅手段を提供する。発振検出器 88 からの無線周波電流と D C 発生源からの直流は、結合回路 92 で結合され、電極対 94 と 96 に供給される。電極 94 と 96 は、周知の方法で開口 12 の反対側のフローセル 10 に位置している。電流はライン 98 を介して結合され、開口 12 を流れる電流を形成する。開口 12 を横切る粒子または細胞 50 は、開口 12 のインピーダンスを一時的に変化させ、開口を通る電流の R F と D C 成分を変調する。R F 電流の変調はフィルタで除去され、結合回路 92 を通って発振検出器 88 に供給される。発振検出器は、R F パルス 102 を出力する R F プリアンプ 100 へ、検出したパルスを供給する。同時に、インピーダンスの変化による直流電流の変調は、フィルタで除去され、結合回路 92 を通って D C プリアンプ 104 に供給され、D C プリアンプから D C パルス 106 を出力する。電子パルス発生装置 86 の上述した説明は、好ましい形態であり、「Particle Analyzer for Measuring the Resistance and Reactance of a Particle」と題された、共有者の米国特許第 4, 791, 355 に詳細に記載されている。電子パルス発生装置 86 には、実質的に同じ結果をもたらすことができる他の任意の設計を含むことができる。本発明のある実施例では、D C だけを用いて R F 電流を用いていないので、従って、これらの場合、電子パルス発生装置 86 は、D C 発生源 90 と D C プリアンプ 104 だけを含む必要がある。

「パルス・プロセッサ」モジュール 108、110、112、114、116、および 118 はそれぞれ、増幅器、ローパスフィルタ、ハイパスフィルタ、およびベースライン・レストラを含む。「ピーク検出器」モジュール 120、122、124、126、128、および 130 はそれぞれ、パルスピーク振幅に比例している一定電圧「値」を供給する。対数増幅器（ログアンプ）モジュール 132、134、136、および 138 は、切り

10

20

30

40

50

換えて出力として、入力を対数変換した、または変換しない線形入力を供給する回路である。アナログ/デジタル・コンバータ(ADC)140、142、144、146、148、150、152、および154は、さらなる処理のためコンピュータ156にデータを供給する。

DCパルス106は、パルス・プロセッサ110とピーク検出器122に供給され、ADC144に供給されるラインのDC値を生成し、ADC144は、デジタル化したパルス・ピーク値をコンピュータ156に供給する。RFパルス102は、パルス・プロセッサ108とピーク検出器120に供給され、ADC140に供給されるライン160のRF値を生成し、ADC140は、デジタル化したパルス・ピーク値をコンピュータ156に供給する。デバイダ・モジュール162は、RF値をDC値で割って、ADC142に供給されるライン164の不透明値を生成し、ADC142は、デジタル化した値をコンピュータ156に供給する。

10

UMALSパルス72は、パルス・プロセッサ112とピーク検出器124に供給され、ログアンプ132を通してADC148に供給されるライン166のUMALS値を生成し、ADC148は、デジタル化したパルス・ピーク値をコンピュータ156に供給する。デバイダ・モジュール168は、ログUMALS値をDC値で割って、ADC146に供給されるライン170のRLS値を生成し、ADC146は、デジタル化した値をコンピュータ156に供給する。LMALSパルス68は、パルス・プロセッサ114とピーク検出器126に供給され、ログアンプ134を通してADC150に供給されるライン172のLMALS値を生成し、ADC150は、デジタル化したパルス・ピーク値をコンピュータ156に供給する。SALSパルス78は、パルス・プロセッサ116とピーク検出器128に供給され、ログアンプ136を通してADC152に供給されるライン174のSALS値を生成し、ADC152は、デジタル化したパルス・ピーク値をコンピュータ156に供給する。RALSパルス84は、パルス・プロセッサ118とピーク検出器130に供給され、ログアンプ138を通してADC154に供給されるライン176のRALS値を生成し、ADC154は、デジタル化したパルス・ピーク値をコンピュータ156に供給する。

20

網赤血球の計数に用いた試薬装置は、赤血球細胞、チオシアン酸カリウム、および硫酸からなる網赤血球をゴースト化する液を含む。この赤血球をゴースト化する溶液は赤血球細胞を破裂させることなく、球状に効果的に膨張させ、赤血球細胞からヘモグロビンを溶出させる、即ち赤血球をゴースト化する機能を有する溶液のことである。以下ではこのような溶液を単に「赤血球ゴースト化溶液」と呼び、またこのような溶液を用いた赤血球試薬を単に「赤血球ゴースト化試薬」と呼ぶ。さらに、このような赤血球ゴースト化溶液は、固定特性を持っているので、膨張して球状になった細胞をそのままの状態に保持する。生網赤血球は、不規則な形状であり、 $0^{\circ} \sim 90^{\circ}$ の角度範囲で光ビームに曝したとき、フローサイトメータ中で予測し難い光散乱情報を生成する。球状に膨張した赤血球細胞は、検体中の赤血球数を決定する基礎を形成する再生可能な光散乱情報を生成する。膨張した赤血球細胞からのヘモグロビンの除去は本発明の基本的な事柄である。ヘモグロビン数を減少させると、小網の特定を向上させ、網赤血球の流動血球計数を可能にする。赤血球ゴースト化溶液による処理プロセスは温度に影響されることが分かっている。特に、 55°F 以下の温度では赤血球ゴースト化溶液による処理プロセスの進行が遅くなり、赤血球ゴースト化溶液による処理プロセスが開始するのに長い時間を要することが明らかになっている。その結果として、血液検体を約30秒の間約 $55^{\circ} \sim 90^{\circ}\text{F}$ の温度で赤血球ゴースト化溶液と混合することが好ましい。

30

40

赤血球ゴースト化溶液のPHは、約 $1.0 \sim 3.0$ の範囲、好ましくは、 $1.0 \sim 2.0$ の範囲になければならない。さらに、酸性赤血球ゴースト化溶液は、ヘモグロビンを溶解して、赤血球細胞からのヘモグロビンの除去を容易にする。チオシアン酸カリウムを用いるとき、硫酸は混合して用いる好ましい酸であるとが知られている。特に、硫酸のように作用しない他の酸としては、塩酸と硝酸を含む。チオシアン酸カリウムの好ましい濃度は、約 $1.0 \sim 6.0\text{ g/l}$ で、硫酸は約 $0.7 \sim 3.0\text{ g/l}$ である。

50

赤血球ゴースト化溶液の浸透圧は、迅速になるように制御しなければならないが、赤血球細胞の膨張は制御される。赤血球ゴースト化溶液の浸透圧は、75～110ミリオスモル、好ましくは82～105ミリオスモルの範囲にある。浸透圧により、赤血球細胞を膨張させ、赤血球ゴースト化溶液との混合液から30秒間でヘモグロビンが溶出する。もし、浸透圧が75ミリオスモル以下である場合、赤血球細胞は、完全な細胞膜を保持しないで崩壊する。特に、浸透圧が低いと赤血球細胞に損傷を与え、その結果、網赤血球数の計数が信頼性のないものになる。もし、浸透圧が十分でないと、赤血球細胞は網赤血球の区別をしにくくするヘモグロビンを溶出しない。

本発明の好適な実施例において、赤血球ゴースト化溶液による処置の前に網赤血球の染色を行う。網赤血球染色の機能は、フローサイトメータの光散乱計数用の網赤血球の輪郭をよりくっきりとさせることである。網赤血球染色は、網赤血球のリボ核酸(RNA)細胞内に沈澱する非蛍光染料である。適切な染料の例としては、新しいメチレン・ブルーとブリリアント・クレシル・ブルーが含まれる。網赤血球の測定に非蛍光染料を用いると、蛍光染料を用いる他の成分の分析に血液検体を用いることができるようになる。特に、網赤血球の計数に沈澱RNA染料を用いると、適合性のある蛍光染料を同じアッセイに用いて、網赤血球染色の蛍光を妨害することなく、血液検体の他の成分を調べることができる。好ましい網赤血球染料は、新しいメチレン・ブルーの水溶液からなる。水溶性の新しいメチレン・ブルー溶液は、アルカリPHが約7.0～8.5の範囲、好ましくは7.0～8.0の範囲である。水溶性の新しいメチレン・ブルー溶液は、染色濃度が0.2～2.0 g/l、好ましくは、0.4～1.2 g/lである。さらに、染色溶液の浸透圧は、約120～160ミリオスモルの範囲、好ましくは130～150ミリオスモルの範囲である。

高い温度では染色反応時間が短くなり、低い温度では長い染色時間を要することが分かっている。反応の好ましい温度範囲は、60°～90°Fの間である。この温度範囲を用いれば、染料が赤血球細胞と十分に反応するのに必要とする時間は、少なくとも5分である。

網赤血球の血液検体を分析する好適な方法では、抗凝固性の血液を用いる。使用した抗凝固薬は、リン酸二水素カリウム塩、リン酸三水素カリウム塩、および二ナトリウム塩などのようなEDTA塩である。

細胞の染色は、血液検体のアルカリ度を上げ、染料混合液のPHを7.0～7.5の範囲にすると向上することが分かっている。しかし、染色部位を指定することはできず、網赤血球の区別を向上させない。むしろ、染色は光散乱信号を高いチャネルにオフセットする。

その上、網赤血球染色は、防腐剤として抗菌剤を含まなければならない。好ましい抗菌剤は、プロピルパラベン、メチルパラベン、およびその混合剤である。特に、好ましい抗菌剤は、0.3 g/lの濃度のプロピルパラベンと0.5 g/lの濃度のメチルパラベンの混合剤である。

以下の染色試薬と赤血球ゴースト化試薬の特殊な例は、図4～12に示す結果を得るのに用いている。

染色試薬	# 1	K ₃ EDTA	10 g/L
		新しいメチレン・ブルー	0.6 g/L
		NaCl	2 g/L
赤血球ゴースト化試薬	# 1	KSCN	3 g/L
		1N H ₂ SO ₄	30 mL/L

図3A～3Cは、網赤血球の分類と計数をするための、血液検体の調合と分析装置または方法の各種動作を示す。

図3Aは、網赤血球の分類と計数を行う2つの方法または装置の動作をステップまたはフローチャートで示す。両動作において、ステップ180の全血液検体は、赤血球ゴースト化試薬182で処理される。赤血球ゴースト化混合液は、ステップ184で孵置され、ステップ186でフローサイトメータで分析される。第1オプションにおいて、フローサイトメータからのデータは、ステップ188で少なくともLSを用いて分類され、RETIC%とRMIを生成する。第2オプションにおいて、フローサイトメータからのデータは、ステップ190でDCを持つ少なくともLSを用いて分類され、RETIC%、MRVおよびRMIを生成する。両オプションによって、ステップ192と194でRETIC-ABSはRETIC%にRBCを掛けて得られる。

図3Bは、網赤血球の分類と計数をする2つの他の方法または装置の動作を示す。両動作において、全血液検体すなわち部分200は、染色試薬202によって処理される。染色した血液混合液は、ステップ204でゆっくりと攪拌され、ステップ206で孵置される。ステップ208の染色した血液混合液は、ステップ210で赤血球ゴースト化試薬で処理される。赤血球ゴースト化混合液はステップ212で孵置され、ステップ214でフローサイトメータで分析される。再び、第1オプションとして、フローサイトメータからのデータは、ステップ216で少なくともLSを用いて分類され、RETIC%とRMIを生成する。第2オプションにおいて、フローサイトメータからのデータは、ステップ218でDCを持つ少なくともLSを用いて分類され、RETIC%、MRVおよびRMIを生成する。両オプションによって、RETIC-ABSは、ステップ220と222でRETIC%にRBCを掛けて得られる。

図3Cは、網赤血球の分類と計数をするさらに他の2つの方法または装置の動作を示す。両方の場合において、ステップ230の50 μ Lの全血液をステップ232の100 μ Lの染色試薬#1で処理する。染色した血液混合液をステップ234で5秒間静かに攪拌して、ステップ236で5分間孵置する。ステップ238の染色した血液混合液の2 μ L部分を、ステップ240の2mLの赤血球ゴースト化試薬#1で処理する。赤血球ゴースト化混合液をステップ242で30秒間孵置して、ステップ244にてフローサイトメータで分析する。第1オプションにおいて、ステップ246でフローサイトメータからのデータを少なくともUMALSを用いて分類し、RETIC%とRMIを生成する。第2オプションにおいて、ステップ248でフローサイトメータからのデータは、DCを持つ少なくともUMALSを用いて分類して、RETIC%、MRVおよびRMIを生成する。両方のオプションによって、RETIC-ABSは、RETIC%にRBCを掛けて得られる。

図4A~4Dは、図2に示すような粒子分析器またはフローサイトメータで分析された赤血球の染色および赤血球ゴースト化の効果を示す。4つの図のそれぞれは、マトリックス、すなわち染色試薬と赤血球ゴースト化試薬をいろいろに組み合わせて調合した、同じ全血液検体のUMALS対DC(X軸のLOG UMALSとY軸のDC)の2次元ドットプロットである。LMALS、SALS、およびRALSなどのような他の光散乱角測定も用いることができるが、UMALSが好ましい。図4Aは、染色試薬または赤血球ゴースト化試薬を含むどのような処理を施すことなく、本発明の共有者により販売された血液分析の希釈液として広く用いられている平衡電解溶液中に全血液検体を希釈させて得られたデータ・パターンを示す。この溶液の1つが本発明の共有者によりISOTON[▲]R[▼]IIの名称で販売されている。

図4Aにおいて明らかなように、LOG UMALSで識別可能な1つの集団260だけがあり、一塊まりの成熟赤血球と網赤血球から構成される。図4Bは、全血液検体を赤血球ゴースト化試薬を用いないで、染色試薬だけと用いて得たデータ・パターンを示す。図4Bのデータ・パターンは、LOG UMALSによって識別されたように、成熟赤血球と網赤血球の1つの集団262を示す図4Aのデータ・パターンに酷似している。図4Cは、全血液検体を染色試薬を用いないで、赤血球ゴースト化試薬でのみ処理して得たデータ・パターンを示し、網赤血球の集団264を右側に示す。すなわち成熟赤血球266より高いレベルのLOG UMALSを示す。図4Dは、全血液検体を染色試薬と赤血球ゴ

10

20

30

40

50

ーghost化試薬両方で処理して得られたデータ・パターンであり、網赤血球の集団268を右側に示す。すなわち成熟赤血球270より高いレベルのLOG UMALSと図4Cの網赤血球集団264よりよく分離されたLOG UMALSを示す。

図4A～4Dに示すデータとその説明から、蛍光を用いずに光散乱を用いて網赤血球の識別と計数をする最少要件は、血液検体を赤血球ghost化試薬で処理することだと結論できる。また、血液検体を染色試薬と赤血球ghost化試薬で処理すると、蛍光を用いずに光散乱を用いて網赤血球の識別と計数をする最適な構成が得られると結論できる。

図5A～5Dは、染色試薬と赤血球ghost化試薬で処理して、図2の粒子分析器またはフローサイトメータを用いさまざまな光散乱角で分析して得た結果を示す。4つの図のそれぞれは、網赤血球集団280を成熟赤血球集団282の右側に持つX軸の光散乱測定対Y軸のDCのデータ・マトリックスを示す。図5Aは、LOG LAMALS対DCのデータ・マトリックスを示す。図5Bは、LOG UMALS対DCのデータ・マトリックスを示す。図5Cは、LOG SALS対DCのデータ・マトリックスを示す。図5Dは、LOG RALS対DCのデータ・マトリックスを示す。図5A～5Dに示すデータとその説明から、少なくとも赤血球ghost化試薬で処理された網赤血球は、光散乱を分析することにより、識別と計数ができ、光散乱は、蛍光を用いることなしに、任意のさまざまな角度で収集できることが示されている。UMALSは好ましい光散乱角であり、本明細書の残り全体を通して用いられる。

図3A～3Cに示す方法および本明細書中を通して、RBCを取得するステップは、2つの異なった方法で実現できる。図2を参照すると、第1の方法には、網赤血球の分類と計数をするために処理および分析された同じ血液検体の絶対的成熟赤血球数のカウントと、開口または検出区画12を横切るときの赤血球細胞50の計数が含まれる。DC、RF、LAMALS、UMALS、SALSおよびRALSなどのような任意の同時に測定されたパラメータは、絶対的成熟赤血球数RBCを得るのに用いることができる。DCはRBCを得るのに好ましいパラメータである。RBCを得る第2の方法は、他の装置、粒子分析器、またはフローサイトメータ（例えば、本発明の共有者により販売されているCOUNTER[®] STKSなど）を用いることであり、これらの装置は、例えば、図2の網赤血球細胞分析器、または他の機器の一部かも知れない装置に物理的に接続できる。第1または第2の方法のいずれかを用いて得たRBC、RBCおよびRETIC%の結果は、RETIC-ABSを計算するため結合される。

図6A～6Cと図7A～7Gは、図3A～3Cのいずれかの方法で生成されるデータに適用可能なデータ分類方法を示す。図3Cの方法には、血液検体の染色試薬#1と赤血球ghost化試薬#1による処理と、例えば、図2に示すような粒子分析器の少なくともUMALSにより処理した試料の分析を含み、本発明を実施する最適な構成と図6A～12に示す網赤血球データを提供する。

図6A、6Bおよび6Cは、少なくともLLSとDCの組み合わせを用いて網赤血球の分類と計数を行う数多くのデータ分類方法を示す。図6Aに示す分類方法により、境界290は、成熟赤血球集団294、296、298およびDCを用いる白血球300から、血小板集団292を分離する。LLSを用いると、境界302は、網赤血球296、298から、成熟赤血球294を分離する。境界304は、白血球300から網赤血球296、298を分離する。境界306はHSR298からLSR296を分離する。従って、図6Aから、LLSとDCの組み合わせを用いて、および血液検体を染色試薬と赤血球ghost化試薬で処理すると、血小板292、白血球300、成熟赤血球294および網赤血球296、298の分類ができ、網赤血球296、298をLSR296とHSR298に小分類できることが結論できた。

ここに説明した分類を行う他の方法は、1次元ヒストグラムを一度に1つずつ分析し、上述した「ゲーティング」技術を適用することである。

1. 図6CのDCヒストグラムを用い、成熟赤血球と白血球を含む1つのピーク308から血小板集団292を分離する谷、すなわち境界290を見つける。

2. 連続した分析から血小板292を効果的に除去する図6Cの境界290より大きいD

10

20

30

40

50

C 値のゲーティングをし、図 6 B の L L S ヒストグラムを作成し、このヒストグラムを用いて以下のステップを実行する。

a) 網赤血球 296、298 から成熟赤血球 294 を分離する境界 302 を見つけ、ヒストグラムの始まり (一番左) から境界 302 までの間の成熟赤血球 294 の数をカウントする。

b) 白血球 300 から網赤血球 296、298 を分離する境界 304 を見つけ、境界 302 から境界 304 の範囲の網赤血球 296、298 をカウントする。

c) H S R 298 から L S R 296 を分離する境界 306 を見つけ、境界 302 から境界 306 の範囲の L S R 296 をカウントし、境界 306 から境界 304 の範囲の H S R 298 をカウントする。

3. 図 6 C の境界 290 より大きい D C 値をゲーティングし、境界 302 より大きい L L S 値と図 6 B の境界 304 より小さい L L S 値をゲーティングし、網赤血球の D C ヒストグラム (図示せず) だけを作成し、これらの網赤血球の統計的分析をして、平均 D C 値を得る。

4. 次の結果を計算する。

a) 全赤血球 = 成熟赤血球 + 網赤血球を計算する

b) $RETIC\% = (網赤血球 / 全赤血球) * 100$ を計算する

c) $MRV = 平均DC * キャリブレーション係数$ を計算する

d) $RMI = HSR / 網赤血球$ を計算する

5. 上述したように R C B を得て、 $RETIC - ABS = RETIC\% * RBC$ を計算する

網赤血球の分類と計数をする他の方法は L L S の使用だけを含む。

1. 図 6 B に示すような L L S ヒストグラムを作成し、このヒストグラムを用いて次のステップを実行する。

a) 赤血球 296、298 から成熟赤血球 294 を分離する境界 302 を見つけ、ヒストグラムの始まり (一番左) から境界 302 の範囲の成熟赤血球 294 をカウントする

b) 白血球 300 から赤血球 296、298 を分離する境界 304 を見つけ、境界 302 から境界 304 の範囲の網赤血球 296、298 をカウントする

c) H S R 298 から L S R 296 を分離する境界 306 を見つけ、境界 302 から境界 306 の範囲の L S R 296 をカウントし、境界 306 から境界 304 の範囲の H S R 298 をカウントする

2. 次の結果を計算する

a) $RETIC\% = (網赤血球 / 全赤血球) * 100$ を計算する

b) $RMI = HSR / 網赤血球$ を計算する

3. 上述したように R B C を得て、 $RETIC - ABS = RETIC\% * RBC$ を計算する

ここに説明した方法の欠点は、血小板は分析から除外されておらず、RETIC% と他の結果を歪めさせる結果になるかも知れないことである。好ましい方法は、個々の血液細胞の光散乱測定で得た D C または細胞容積の他の同等の測定を必要とし、これにより小網を、赤血球分析から血小板を識別して除去することができる。

図 7 A ~ 7 G は、少なくとも L L S と D C の組み合わせ、好ましくは、L L S、D C、R L S、および不透明の略語である「O P」の組み合わせを用いて、網赤血球の分類と計数をする数多くのデータ分類方法を示す。適用可能であれば、図 6 A ~ C に用いているように同じ参照番号を用いる。

図 7 A の分類方法により、境界 290 は、血小板 292 を網赤血球集団 294、310、および D C を用いている白血球 300 から分離する。L L S を用いて、斜めの境界 312 は、網赤血球 310 から成熟した赤血球 294 を分離する。境界 304 は、白血球 300 から網赤血球 310 を分離する。従って、図 7 A から、L L S と D C の組み合わせを用いて、および血液検体を染色試薬と赤血球ゴースト化試薬で処理すると、血小板 292、白血球 300、成熟赤血球 294、および網赤血球 310 の分類と計数が行えることが結論

10

20

30

40

50

できた。さらに、次のような結果が報告できた。RETIC%、MRV、およびRBCを得ることによりRETIC-ABSが得られた。

図7Bに示した分類方法は、得られた結果を拡張、洗練するため図7Aに示した今説明した方法と組み合わせられる。図7Bに示すデータ・パターンは、RLSがX軸に表示されデータが回転し、および図7Aの白血球300が分析からゲーティングで阻止または除外されるという例外を除き、図7Aのパターンと同じである。図7Bにおいて、境界290は成熟赤血球314、316、318から血小板292を分離する。境界320は網赤血球316、318から成熟赤血球314を分離する。境界322はHSR318からLSR316を分離する。RLSパラメータと共に動作する利点は、見つけた境界320、322は、X軸とY軸に完全に直交していることである。図7Bの境界320は、図7Aに投影されたとき、斜めのライン312として現れる。従って、LLSとDCと一緒に用い、染色試薬と赤血球ゴースト化試薬で処理した血液検体を分析するのに用いる回転パラメータRLSは、網赤血球の分類と計数の好ましい方法を提供し、次のような結果を得る。RETIC%、MRV、RMI、およびRBC、RETIC-ABSを得るとにより得られた。

図7Cに示す分類方法は、得られた結果をさらに洗練するため、図7A～7Bに示す今説明した方法と組み合わせられる。図7Cは、OP対DCのマトリックスを示す。境界290は、DCで分離された他のすべての細胞集団324、326からなる血小板292を分離する。境界328は、血小板または血小板の塊まり326から赤血球と白血球を含む集団を分離する。血小板の塊まり326は容易に識別され阻止される。すなわち図7Cに示すように不透明を用いて行われる引き続く分析から除去される。図7Aを参照すると、血小板の塊まりは、識別されず不透明によりゲーティングにより阻止されない場合、成熟赤血球294と網赤血球310に重なって、RETIC%と他の結果をゆがめてしまう。血小板の塊まりは滅多に現れることはないが、網赤血球の分析に影響を与えてはいけな。このため、DC、LLS、およびRLSと共に用いられ、染色試薬と赤血球ゴースト化試薬で処理された血液検体の分析に用いられるOPパラメータは、網赤血球の分類と計数の好ましい方法を提供し、次のような結果が得られる。RETIC%、MRV、RMI、およびRBC、RETIC-ABSを得ることにより得られる。

図7A～7Cに示された今説明した分類を行う別の方法は、図7D～7Gの1次元ヒストグラムを一度に1つずつ分析し、上述した「ゲーティング」技術を適用することである。

1. 図7EのDCヒストグラムを用いて、赤血球、白血球、および血小板の塊まりを含む単一のピーク330から血小板292を分離する境界290を見つける。

2. 連続した分析から効果的に血小板292を除去する図7Eの境界290より大きいDC値をゲーティングし、図7GのOPヒストグラムを作成し、このヒストグラムを用いて、血小板の塊まり326から赤血球と白血球324を分離する境界328を見つける。

3. 連続した分析から効果的に血小板298を除去する図7Eの境界290より大きいDC値のゲーティングと、連続した分析から効果的に血小板の塊326を除去し、図7DのLLSヒストグラムを作成し、このヒストグラムを用いて、白血球300から赤血球294、310を分離する境界304を見つける。

4. 連続した分析から効果的に血小板292を除去する図7Eの境界290より小さいDC値のゲーティングと、連続した分析から効果的に血小板の塊まり326を除去する図7Gの境界328より小さいOP値のゲーティングと、連続した分析から効果的に白血球300を除去する図7Dの境界304より小さいLLS値をゲーティングして、図7FのRLSヒストグラムを作成し、このヒストグラムを用いて、次のステップを実行する。

a) 成熟赤血球集団314のピークを見つける

b) 正規確率関数曲線を成熟赤血球ピーク314にあてはめる

c) あてはめた曲線と残りのデータが等しい確率で重なるチャネルを計算して、網赤血球316、318から成熟赤血球314を分離する境界320を見つけ、ヒストグラムの始まり(一番左)から境界320までの範囲の成熟赤血球314をカウントする

d) HSR318からLSR316を分離する境界322を見つけ、境界320から境界

10

20

30

40

50

328の範囲のLSR316をカウントし、境界318からヒストグラムの最大(一番右)の範囲のHSR318をカウントする

5. 図7Eの境界292より大きいDC値をゲーティングし、図7Gの境界328より小さいOP値をゲーティングし、図7Dの境界304より小さいLLS値をゲーティングし、図7Fの境界320より大きいRLS値をゲーティングして、網赤血球だけのDCヒストグラム(図示せず)を作成し、これらの赤血球の統計的分析を行い、平均DCを得る。

6. 次の結果を計算する。

a) 全赤血球 = 成熟赤血球 + 網赤血球を計算する

b) $RETIC\% = (網赤血球 / 全赤血球) * 100$ を計算する

c) $MRV = 平均DC * キャリブレーション係数$ を計算する

d) $RMI = HSR / 網赤血球$ を計算する

7. 上述したようにRBCを得て、 $RETIC - ABS = RETIC\% * RBC$ を計算する。

図8A~8C、図9A~9C、図10A~10C、および図11A~11Cは、図3Cの赤血球処理方法により調合し、図2に示すように装置により、少なくともUMALSとDCで分析し、図7A~7Gに示す方法により分類した人間の血液検体の例を示す。図8~11のそれぞれのプロットは、境界と集団の数を除き7Aと同じように描かれている。実際の網赤血球分類は、図6A~11Cに示されている。

図12は、X軸にプロットされた「基準%」とY軸にプロットされた「RETIC%」の人間の血液検体に対する相関について検討した結果研究を示す。「基準%」は、提案したNCCLS規格H16-Pに略述した基準方法によって得た網赤血球の比率である。「RETIC%」は、上述したように好ましい方法と装置によって得られた結果である。点線の45°の線332は、完全に適合したデータ、すなわち1.0の相関係数を示す。実際に最適したデータは実線334で示されている。線間の差は0.95の相関係数を示す。

【図1】

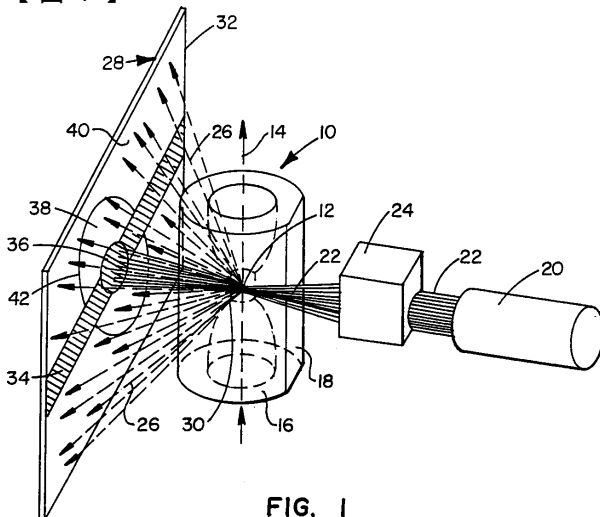


FIG. 1

【図1A】

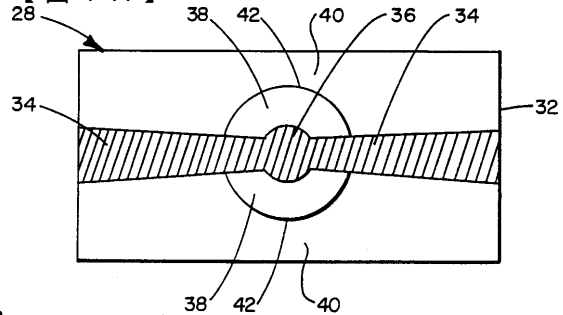


FIG. 1A

【図 2】

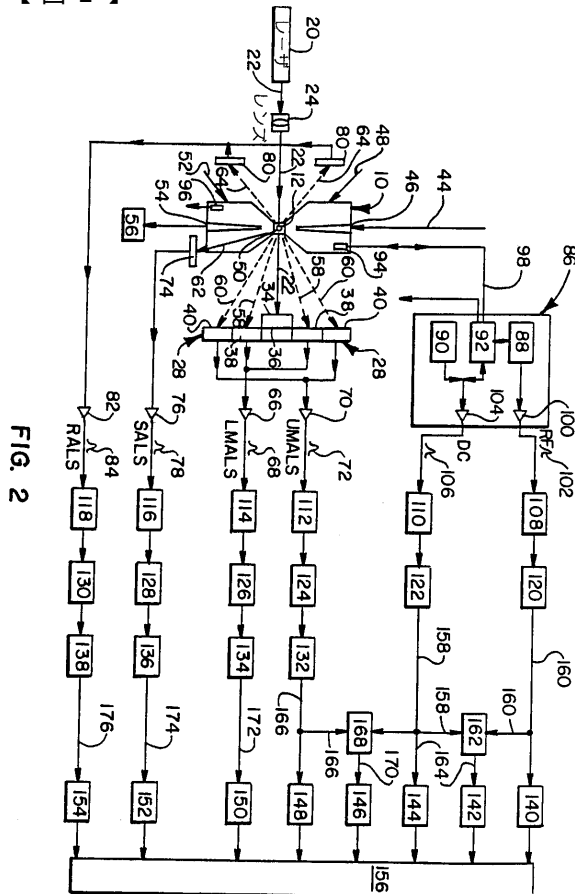


FIG. 2

【図 3 A】

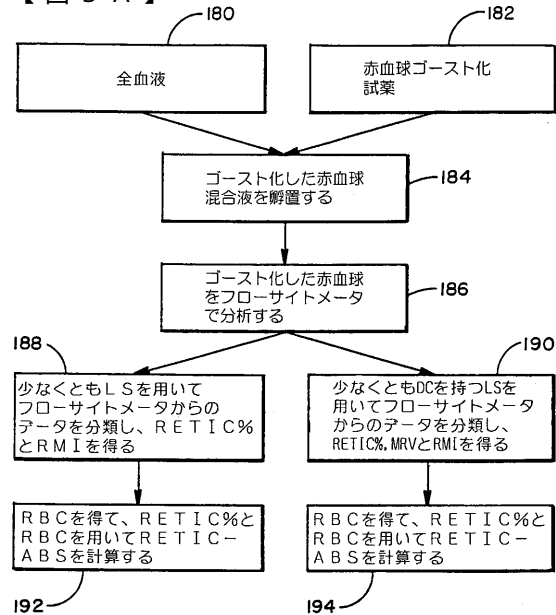


FIG. 3A

【図 3 B】

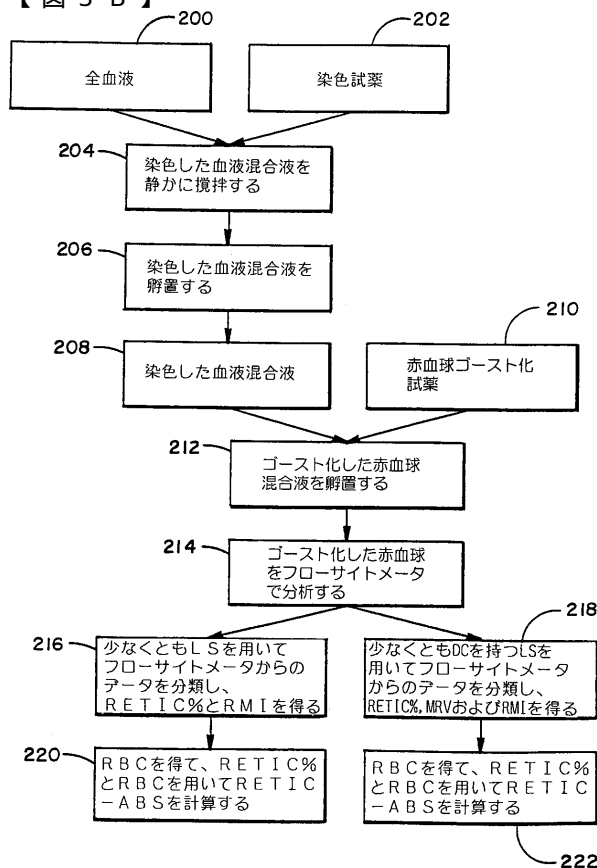


FIG. 3B

【図 3 C】

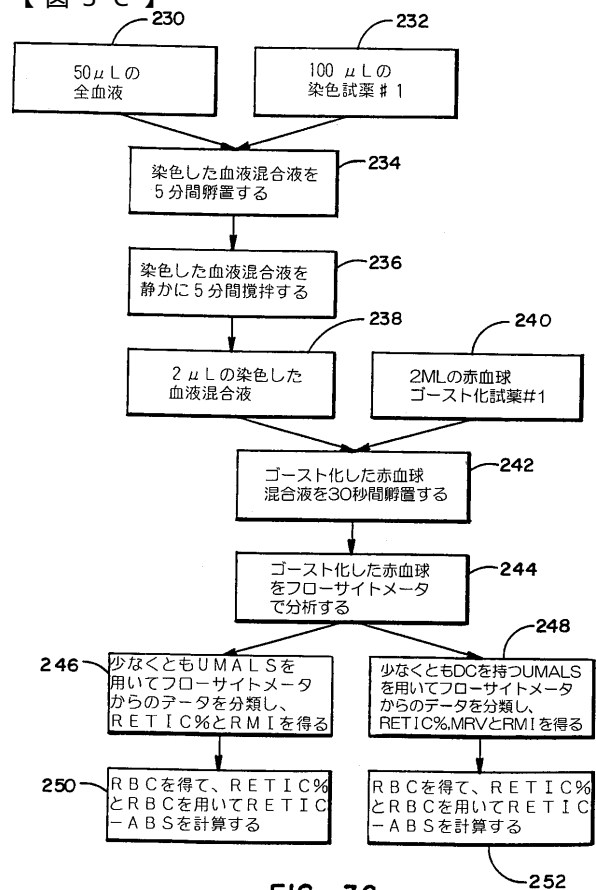


FIG. 3C

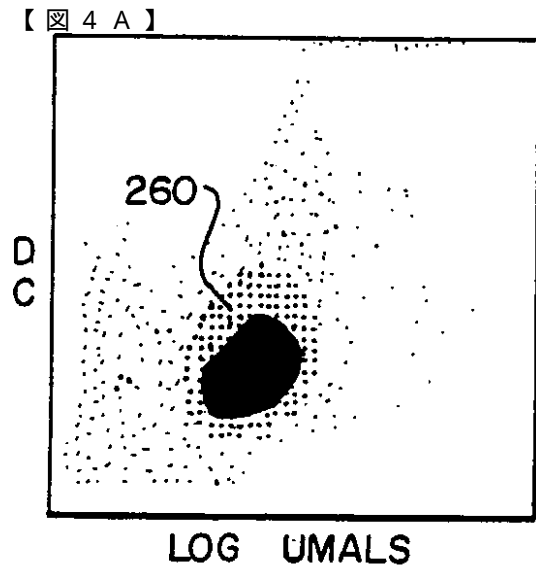


FIG. 4A

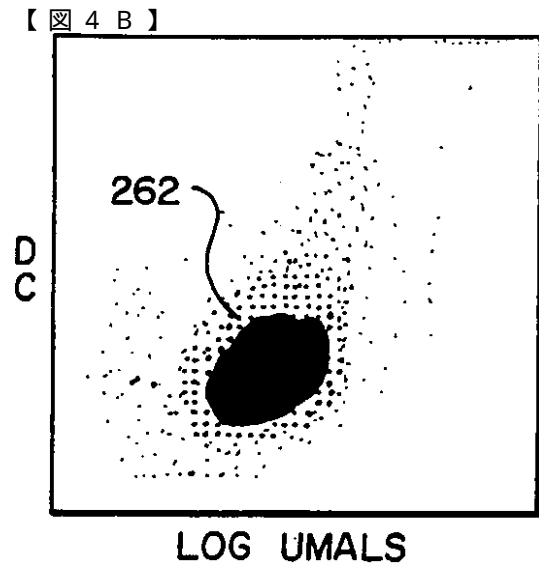


FIG. 4B

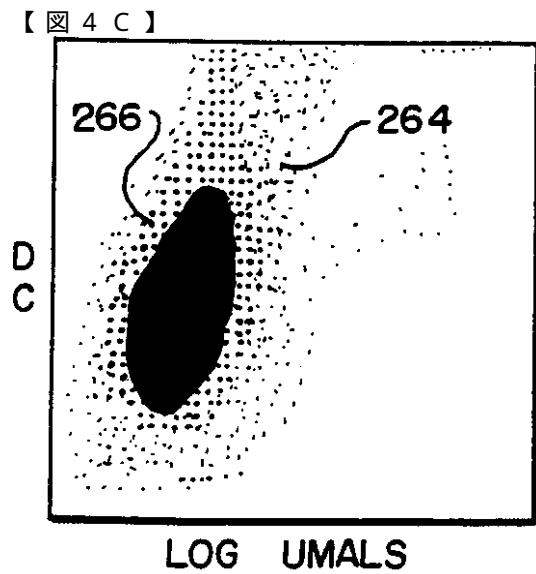


FIG. 4C

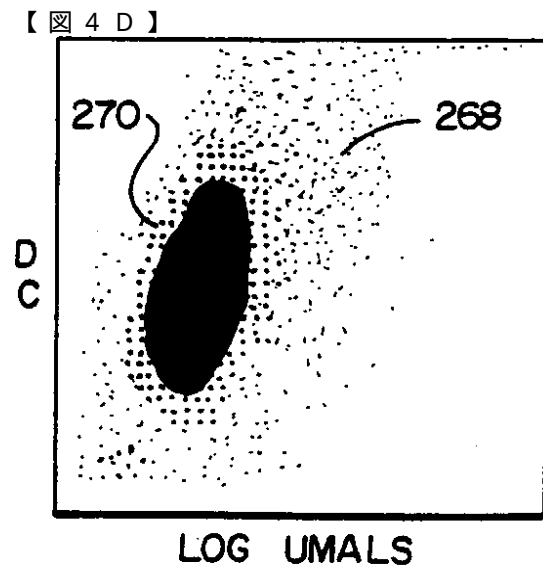
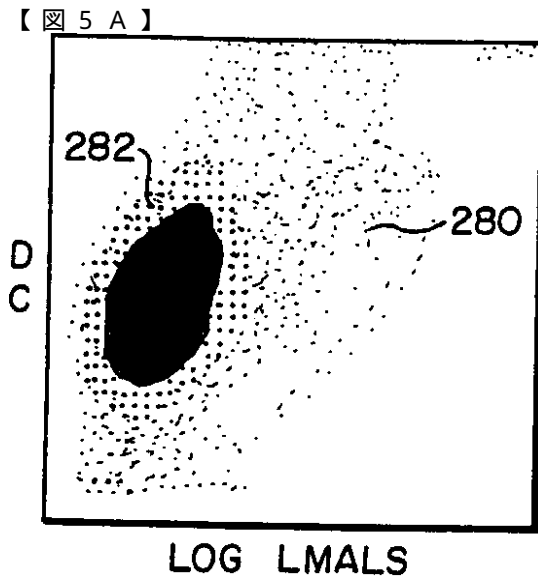
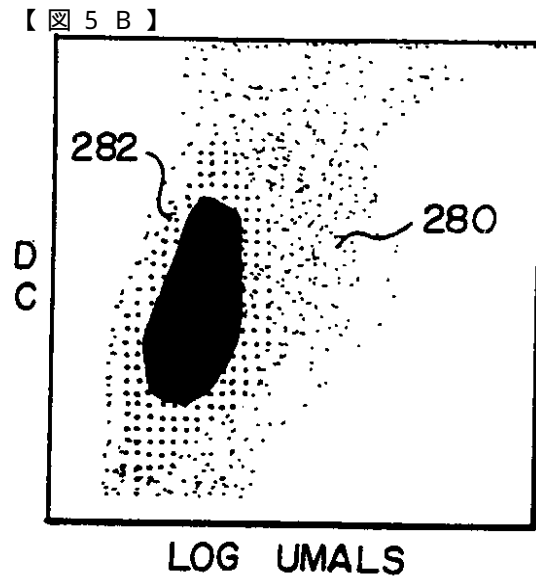
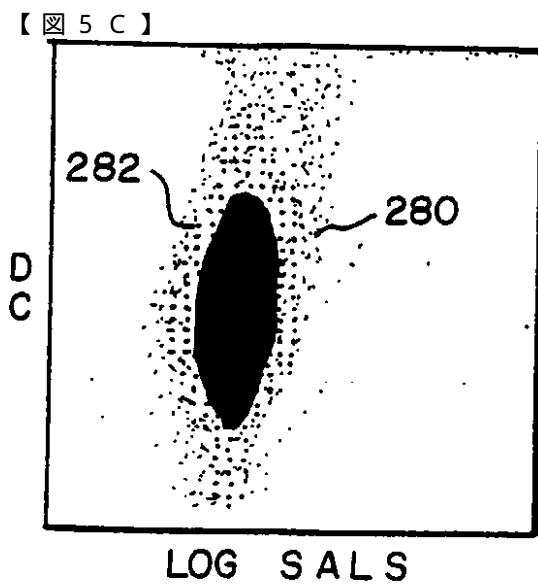
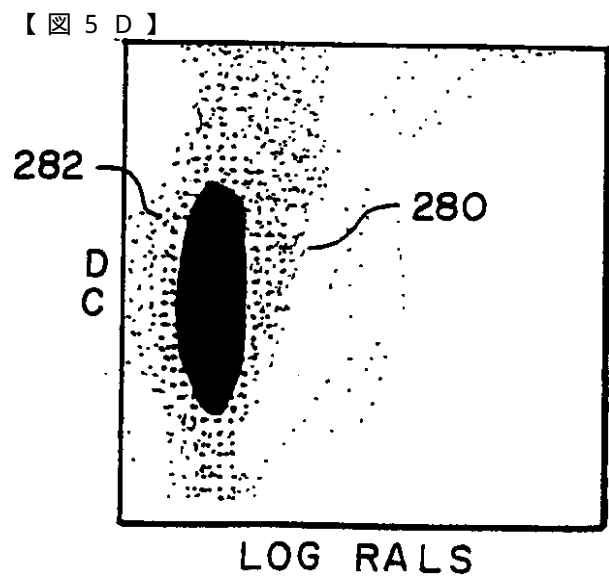


FIG. 4D

**FIG. 5A****FIG. 5B****FIG. 5C****FIG. 5D**

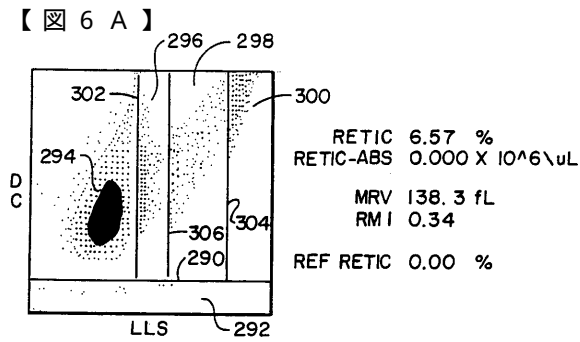


FIG. 6A

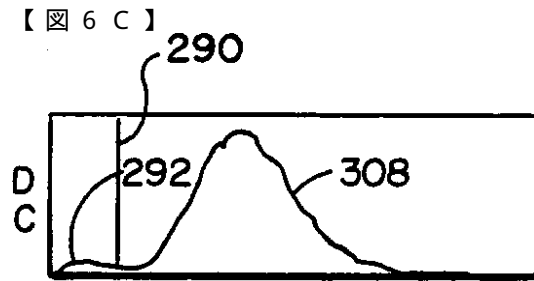


FIG. 6C

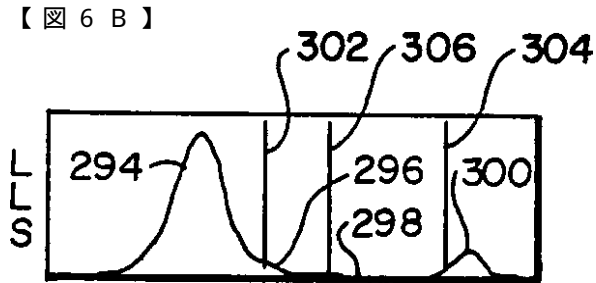


FIG. 6B

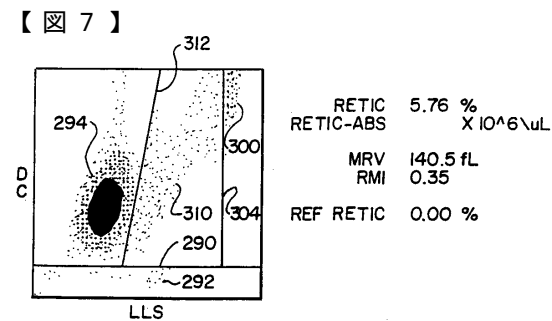


FIG. 7A

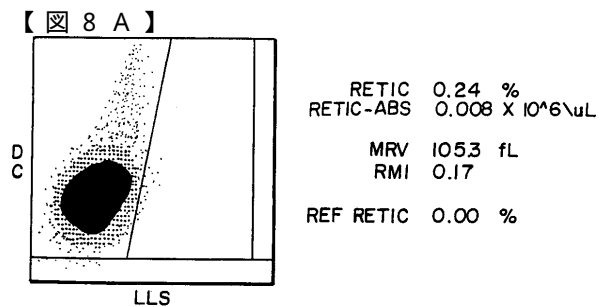


FIG. 8A

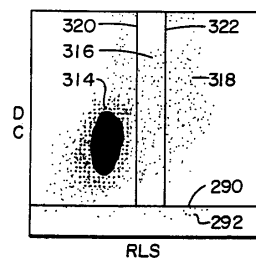


FIG. 7B

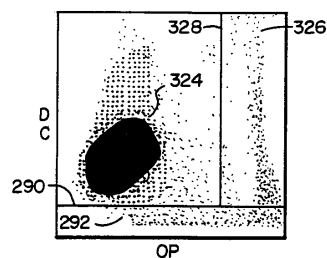


FIG. 7C

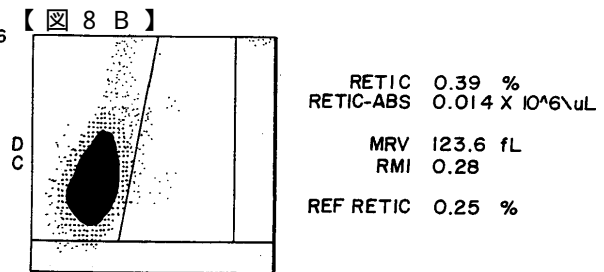


FIG. 8B

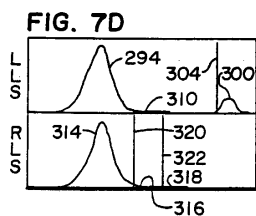


FIG. 7F

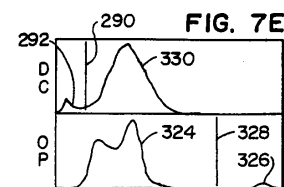


FIG. 7G

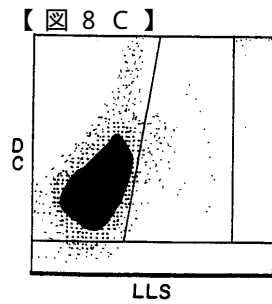


FIG. 8C

RETIC 0.68 %
 RETIC-ABS 0.029 X 10⁶ \uL
 MRV 119.3 fL
 RMI 0.18
 REF RETIC 0.55 %

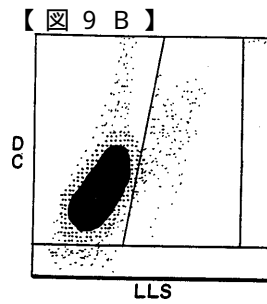


FIG. 9B

RETIC 1.73 %
 RETIC - ABS 0.067 X 10⁶ \uL
 MRV 116.8 fL
 RMI 0.36
 REF RETIC 1.52 %

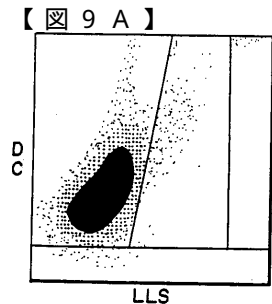


FIG. 9A

RETIC 1.46 %
 RETIC-ABS 0.044 X 10⁶ \uL
 MRV 132.5 fL
 RMI 0.22
 REF RETIC 1.70 %

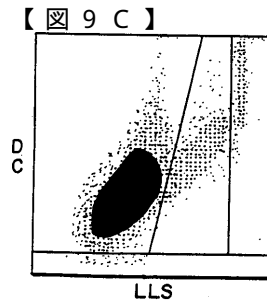


FIG. 9C

RETIC 2.30 %
 RETIC-ABS 0.087 X 10⁶ \uL
 MRV 109.5 fL
 RMI 0.38
 REF RETIC 2.63 %

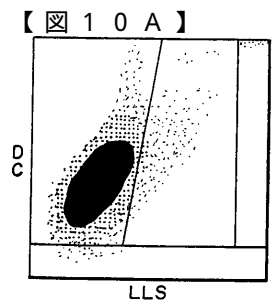


FIG. 10A

RETIC 3.74 %
 RETIC-ABS 0.120 X 10⁶ \uL
 MRV 139.6 fL
 RMI 0.20
 REF RETIC 3.92 %

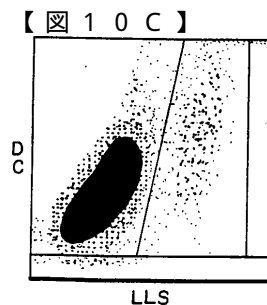


FIG. 10C

RETIC 5.25 %
 RETIC-ABS 0.126 X 10⁶ \uL
 MRV 161.4 fL
 RMI 0.92
 REF RETIC 5.90 %

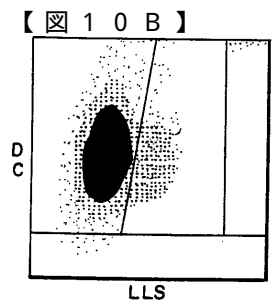


FIG. 10B

RETIC 5.31 %
 RETIC-ABS 0.146 X 10⁶ \uL
 MRV 130.2 fL
 RMI 0.44
 REF RETIC 6.35 %

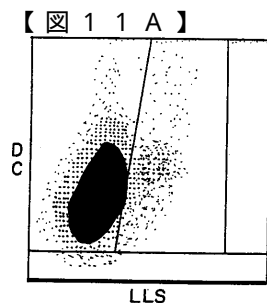


FIG. 11A

RETIC 10.30 %
 RETIC-ABS 0.146 X 10⁶ \uL
 MRV 122.0 fL
 RMI 0.41
 REF RETIC 11.55 %

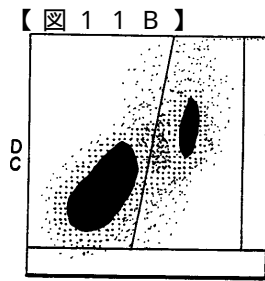


FIG. 11B

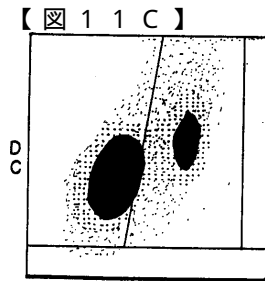


FIG. 11C

RETIC 25.00 %
 RETIC-ABS 0.703 $\times 10^6 \mu\text{L}$
 MRV 151.0 fL
 RMI 0.88
 REF RETIC 28.00 %

RETIC 34.21 %
 RETIC-ABS 0.657 $\times 10^6 \mu\text{L}$
 MRV 139.8 fL
 RMI 0.75
 REF RETIC 30.10 %

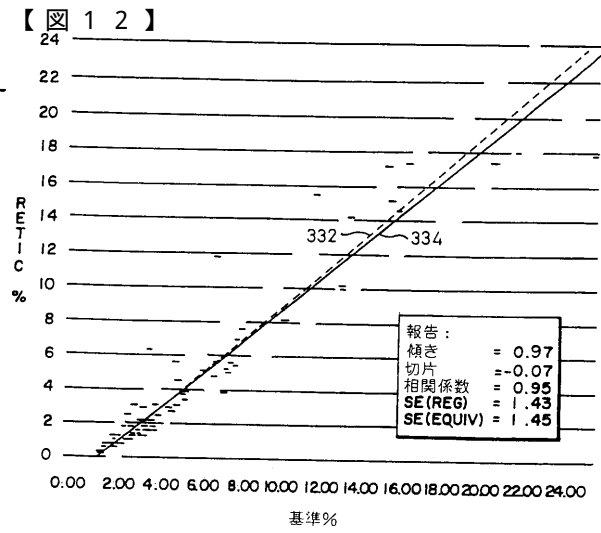


FIG. 12

フロントページの続き

(74)代理人

弁理士 西山 雅也

(74)代理人

弁理士 樋口 外治

(72)発明者 ロドリゲツ, カルロス エム.

アメリカ合衆国, フロリダ 33165, マイアミ, サウス ウェスト サーティサード ストリート 10010

(72)発明者 レディス, スティーブン エル.

アメリカ合衆国, フロリダ 33013, ヒアレー, イースト フィフティシックス ストリート 759

審査官 竹中 靖典

(56)参考文献 特開昭61-079163(JP, A)

特開平06-180316(JP, A)