

(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  
2015年9月3日(03.09.2015)



(10) 国際公開番号  
**WO 2015/129863 A1**

- (51) 国際特許分類:  
*G01N 33/493* (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)  
*G01N 21/49* (2006.01) *G01N 33/483* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/055883
- (22) 国際出願日: 2015年2月27日(27.02.2015)
- (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 2014-039282 2014年2月28日(28.02.2014) JP
- (71) 出願人: シスメックス株式会社(SYSMEX CORPORATION) [JP/JP]; 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 Hyogo (JP).
- (72) 発明者: 河合 昭典(KAWAI, Akinori); 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP). 糸瀬 裕司(ITOSE, Yuji); 〒6510073 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内 Hyogo (JP).
- (74) 代理人: 野河 信太郎, 外(NOGAWA, Shintaro et al.); 〒5300047 大阪府大阪市北区西天満5丁目16-3 西天満ファイブビル 野河特許事務所 Osaka (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, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, 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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, 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, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, 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, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

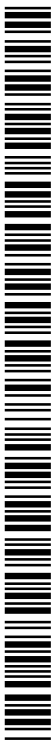
- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD FOR URINE SAMPLE ANALYSIS, REAGENT FOR URINE SAMPLE ANALYSIS, AND REAGENT KIT FOR URINE SAMPLE ANALYSIS

(54) 発明の名称: 尿試料分析方法、尿試料分析用試薬及び尿試料分析用試薬キット

(57) Abstract: The present invention pertains to a method for urine sample analysis, a reagent for urine sample analysis, and a reagent kit for urine sample analysis, which are for detecting at least casts and erythrocytes as physical components of urine.

(57) 要約: 本発明は、尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための尿試料分析方法、尿試料分析用試薬及び尿試料分析用試薬キットに関する。



WO 2015/129863 A1

## 明 細 書

発明の名称：

尿試料分析方法、尿試料分析用試薬及び尿試料分析用試薬キット

### 技術分野

[0001] 本発明は、尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための尿試料分析方法、尿試料分析用試薬及び尿試料分析用試薬キットに関する。

### 背景技術

[0002] 腎・尿路系における感染症、炎症性病変、変性病変、結石症、腫瘍などの疾患では、それぞれの疾患に応じて、尿中に種々の有形成分が出現する。有形成分としては、赤血球、円柱、白血球、上皮細胞、酵母様真菌、精子などが挙げられる。尿中のこれらの成分を分析することは、腎・尿路系の疾患や異常部位の推定をする上で重要である。例えば、赤血球は、腎臓の糸球体から尿道に至る経路における出血の有無を判定するのに有用な尿中有形成分である。

[0003] 円柱は、Tamm-Horsfallムコタンパク質と尿中血漿タンパク質(主にアルブミン)との凝固沈殿物を基質とする固形成分であり、主に遠位尿細管及び集合管で形成される。この基質のみからなる円柱は硝子円柱と呼ばれるが、腎臓や尿細管の状態によっては硝子円柱に細胞などの種々の成分が封入され、さらに変性した円柱が生じることがある。そのため、円柱は、腎臓及び尿細管の病態や障害の程度を把握するのに有用な尿中有形成分である。

[0004] 円柱及び赤血球などの尿中有形成分の分析では、尿を遠心分離して得られる沈殿物(有形成分)を顕微鏡で観察することによる目視検査が広く行われている。また、近年では、フローサイトメータを用いた自動分析法も開発されている。例えば、特許文献1には、染色用試薬及び希釈用試薬で処理した尿試料をフローサイトメータで測定することにより、尿中有形成分を分析する方法が記載されている。

[0005] 一方、尿中には、形状が円柱に極めて類似した成分である粘液糸や、細菌や塩類など凝集体も存在する。尿試料中の円柱の数は臨床的に重要な情報であるので、円柱の検出の際には、円柱と、粘液糸などの円柱に類似した成分とを弁別することが重要となる。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0006] 特許文献1：特開平9-329596号公報

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0007] 特許文献1には、細胞膜損傷剤としての界面活性剤を尿試料中に約50～500 mg/Lの濃度で添加して、白血球を損傷させて強く染色することで、白血球と小型上皮細胞とを弁別することが記載されている。また、特許文献1には、細胞膜損傷剤により赤血球を溶血させた試料の測定結果と、赤血球を溶血させていない試料の測定結果を比較することにより、赤血球と結晶成分や酵母様真菌とを弁別できることが記載されている。

[0008] しかしながら、尿中の赤血球を分析するために、試料を2つ用意して、それぞれ分析することは煩雑である。よって、1つの尿試料から尿中の赤血球を検出できることが望まれる。また、尿中の円柱を検出するためには、上述のとおり、粘液糸との弁別が重要となる。したがって、1つの尿試料から尿中の円柱及び赤血球を正確に検出するためには、赤血球を溶血させずに検出することと、円柱を粘液糸などの夾雑物と区別して検出できることとの両方が求められる。

[0009] 上記のことに鑑みて、本発明は、1つの尿試料から円柱及び赤血球を精度良く検出することを可能にする尿試料分析方法を提供することを目的とする。また、本発明は、その方法に好適に用いられる尿試料分析用試薬及び尿試料分析用試薬キットを提供することを目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0010] 本発明者らは、驚くべきことに、測定試料中の界面活性剤の濃度を 2 mg/L 以上 30 mg/L 以下と極めて低くすることにより、赤血球を実質的に損傷させずに検出し、且つ円柱を夾雑物と区別して検出することができることを見出して、本発明を完成した。

[0011] よって、本発明は、尿試料と、界面活性剤を含む試薬とを混合して測定試料を調製する工程と、調製工程で得られた測定試料に含まれる尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出する工程とを含み、調製工程で得られた測定試料中の界面活性剤の濃度が 2 mg/L 以上 30 mg/L 以下である、尿試料分析方法を提供する。

[0012] また、本発明は、4 mg/L 以上 50 mg/L 以下の界面活性剤を含む、尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための尿試料分析用試薬を提供する。

[0013] さらに、本発明は、4 mg/L 以上 50 mg/L 以下の界面活性剤を含む第 1 試薬と、円柱及び赤血球を染色するための蛍光色素を含む第 2 試薬とを含む、尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための尿試料分析用試薬キットを提供する。

### 発明の効果

[0014] 本発明によれば、赤血球を実質的に損傷させず、かつ円柱及び赤血球を精度良く検出することを可能にする。

### 図面の簡単な説明

[0015] [図1]赤血球を含む尿試料を、種々の濃度の界面活性剤の存在下で処理して得た測定試料に含まれる赤血球の数を示すグラフである。

[図2]赤血球を含む尿試料を、種々の濃度のカチオン性界面活性剤の存在下で処理して得た測定試料から検出された赤血球の数を示すグラフである。

[図3]赤血球を含む尿試料を、種々の濃度のノニオン性界面活性剤又はカチオン性界面活性剤の存在下で処理して得た測定試料から検出された赤血球の数を示すグラフである。

[図4]円柱を含まないが円柱に類似した夾雑物を含む尿試料を、種々の濃度の

カチオン性界面活性剤の存在下で処理して得た測定試料から検出された夾雑物の数を示すグラフである。

[図5]円柱を含まないが円柱に類似した夾雑物を含む尿試料を、種々の濃度のノニオン性界面活性剤又はカチオン性界面活性剤の存在下で処理して得た測定試料から検出された夾雑物の数を示すグラフである。

[図6]尿試料分析用試薬の一例を示す図である。

[図7]尿試料分析用試薬キットの一例を示す図である。

### 発明を実施するための形態

#### [0016] [尿試料分析方法]

本実施形態の尿試料分析方法(以下、単に「方法」ともいう)は、尿中有形成分のうち赤血球、円柱、結晶成分及び粘液糸を分析対象とし、特に円柱及び赤血球の分析に好適である。

[0017] 円柱には様々な種類があり、上記の基質のみからなる硝子円柱、尿細管上皮細胞が封入された上皮円柱、赤血球が封入された赤血球円柱、白血球が封入された白血球円柱、脂肪顆粒が封入された脂肪円柱、顆粒成分(主に変性した上皮細胞)が封入された顆粒円柱、円柱の全体又は一部が均質で蠟のように変性した蠟様円柱が知られている。本実施形態において、円柱の種類は特に限定されない。

[0018] 本実施形態において、赤血球の種類は特に限定されず、正常赤血球及び異常赤血球のいずれであってもよい。

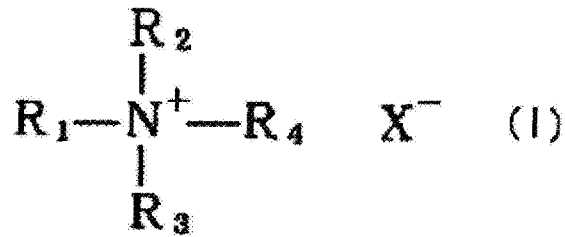
[0019] 本実施形態の方法では、まず、尿試料と、界面活性剤を含む試薬(以下、「第1試薬」ともいう)とを混合して測定試料を調製する工程が行われる。この工程では、得られた測定試料中の界面活性剤の濃度(終濃度)が2 mg/L以上30 mg/L以下となるように尿試料と第1試薬との混合を行う。好ましくは、測定試料中の界面活性剤の濃度が4 mg/L以上22 mg/L以下となるように混合する。

[0020] 本実施形態においては、尿試料は、尿中有形成分を含む液体試料であれば特に限定されないが、好ましくは被験者から採取した尿である。なお、被験

者から採取した尿を試料として用いる場合、時間経過により尿中有形成分が劣化するおそれがあるので、採取後24時間以内、特に3～12時間以内に尿試料を本実施形態の方法に用いることが望ましい。

- [0021] 本実施形態の方法においては、測定試料中の界面活性剤の濃度は2 mg/L以上30 mg/L以下と極めて低いが、界面活性剤の作用により、円柱の正確な検出を阻害する細菌や塩類などの夾雑物の凝集体を分散させ、除去することができる。
- [0022] 第1試薬は、界面活性剤を適切な溶媒に溶解させることにより得ることができる。溶媒は、界面活性剤を溶解させることができれば特に限定されず、例えば、水、水溶性有機溶媒、及びこれらの混合物が挙げられる。水溶性有機溶媒としては、例えば、炭素数1～3の低級アルコール、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド(DMSO)などが挙げられる。本実施形態においては、水が特に好ましい。
- [0023] 第1試薬に用いられる界面活性剤の種類は特に限定されず、カチオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤及び両性界面活性剤から適宜選択することができる。第1試薬に用いられる界面活性剤は、カチオン性界面活性剤及びノニオン性界面活性剤から選択することが好ましく、カチオン性界面活性剤が特に好ましい。第1試薬に含まれる界面活性剤は1種類であってもよいし、2種類以上であってもよい。2種類以上の界面活性剤を含む場合、その組み合わせは任意に選択することができる。
- [0024] 本実施形態においては、カチオン性界面活性剤として、第四級アンモニウム塩型界面活性剤及びピリジニウム塩型界面活性剤から選択される少なくとも1種を用いることができる。第四級アンモニウム塩型界面活性剤としては、例えば、以下の式(I)で表される、全炭素数が4～38の界面活性剤が挙げられる。
- [0025]

[化1]

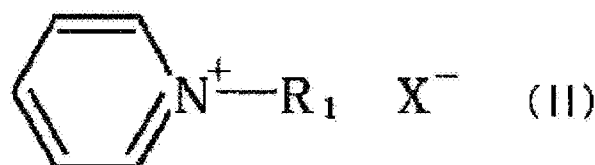


[0026] 上記の式(I)中、 $R_1$ は炭素数1～18のアルキル基又はアルケニル基であり； $R_2$ 及び $R_3$ は互いに同一又は異なって、炭素数1～4のアルキル基又はアルケニル基であり； $R_4$ は炭素数1～12のアルキル基若しくはアルケニル基、又はベンジル基であり； $X^-$ はハロゲンイオン又はヒドロキシイオンである。

[0027] 上記の式(I)中、 $R_1$ としては、炭素数が6、8、10、12及び14のアルキル基又はアルケニル基が好ましく、特に直鎖のアルキル基が好ましい。より具体的な $R_1$ としては、オクチル基、デシル基及びドデシル基が挙げられる。 $R_2$ 及び $R_3$ としては、メチル基、エチル基及びプロピル基が好ましい。 $R_4$ としては、メチル基、エチル基及びプロピル基が好ましい。より好ましくは、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ のそれぞれがメチル基である。上記の式(I)中、 $X^-$ はハロゲンイオンが好ましく、例えば、臭化物イオン、塩化物イオン及びヨウ化物イオンが挙げられる。

[0028] ピリジニウム塩型界面活性剤としては、例えば、以下の式(II)で表される界面活性剤が挙げられる。

[0029] [化2]



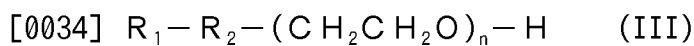
[0030] 上記の式(II)中、 $R_1$ は炭素数6～18のアルキル基又はアルケニル基であり； $X^-$ はハロゲンイオンである。

[0031] 上記の式(II)中、 $R_1$ としては、炭素数が6、8、10、12及び14のアルキル基又はアルケニル基が好ましく、特に直鎖のアルキル基が好ましい。より具

体的なR<sub>1</sub>としてはオクチル基、デシル基及びドデシル基が挙げられる。

[0032] 上記のカチオン性界面活性剤の具体例としては、トリエチルメチルアンモニウムクロライド、ジデシルジメチルアンモニウムブロミド、ジデシルジメチルアンモニウムクロライド、ジドデシルジメチルアンモニウムブロミド、ジドデシルジメチルアンモニウムクロライド、エチルヘキサデシルジメチルアンモニウムブロミド、エチルトリメチルアンモニウムヨージド、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、デシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド、オクチルトリメチルアンモニウムブロミド、オクチルトリメチルアンモニウムクロライド、テトラデシルトリメチルアンモニウムクロライド、トリメチルヘプタデシルアンモニウムブロミド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムクロライド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムヒドロキシド、ヘキシルトリメチルアンモニウムブロミド、トリメチルノニルアンモニウムブロミド、トリメチルステアリルアンモニウムブロミド、トリメチルステアリルアンモニウムクロライド、ドデシルピリジニウムクロライド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミドなどが挙げられる。それらの中でもドデシルトリメチルアンモニウムブロミド(DTAB)、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド(DTAC)、オクチルトリメチルアンモニウムブロミド(OTAB)、及びテトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド(MTAB)が好ましく、DTABが特に好ましい。

[0033] 本実施形態においては、ノニオン性界面活性剤として、以下の式(III)で表されるポリオキシエチレン系ノニオン界面活性剤が好適に用いられる。



[0035] 上記の式(III)中、R<sub>1</sub>は炭素数8~25のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基であり；R<sub>2</sub>は-O-、-COO-又は

[0036] [化3]



であり；nは10～50の整数である。

[0037] 上記のノニオン性界面活性剤の具体例としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンステロール、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレンソルビット脂肪酸エステル、ポリオキシエチレンアルキルアミン、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテルなどが挙げられる。それらの中でも、ポリオキシエチレンアルキルエーテルが好ましく、具体的には、ポリオキシエチレンラウリルエーテル、ポリオキシエチレンセチルエーテル、ポリオキシエチレンステアリルエーテル、ポリオキシエチレンオレイルエーテル、ポリオキシエチレンベヘニルエーテルが特に好ましい。

[0038] 本実施形態においては、アニオン性界面活性剤として、カルボン酸塩型界面活性剤、スルホン酸塩型界面活性剤及び硫酸エステル塩型界面活性剤から選択される少なくとも1種を用いることができる。カルボン酸塩型界面活性剤としては、例えば、以下の式(IV)で表される界面活性剤が挙げられる。

[0039]  $R_1-COO^- Y^+$  (IV)

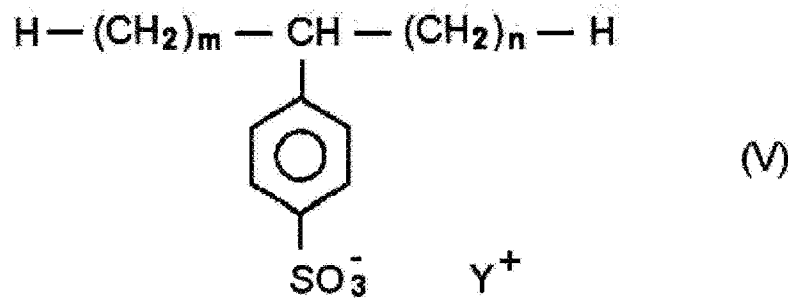
[0040] 上記の式(IV)中、 $R_1$ は炭素数8～25のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基であり； $Y^+$ はアルカリ金属イオンである。

[0041] 上記の式(IV)中、 $R_1$ としては炭素数が12～18の直鎖のアルキル基が好ましい。上記のカルボン酸塩型界面活性剤は、当該技術においてはセッケンとして知られ、例えば、ラウリン酸ナトリウム、ステアリン酸ナトリウム、オレイン酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0042] スルホン酸塩型界面活性剤としては、例えば、以下の式(V)で表される界面活性剤が挙げられる。

[0043]

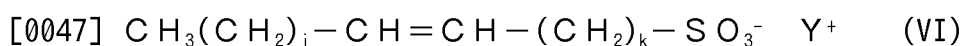
[化4]



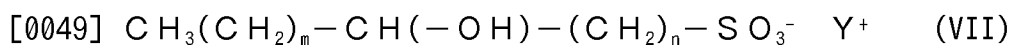
[0044] 上記の式(V)中、 $m$ 及び $n$ は0以上の整数であって、 $m$ と $n$ の和が8~25であり； $\text{Y}^+$ はアルカリ金属イオンである。

[0045] 上記の式(V)中、 $m$ と $n$ の和が9~18であることが好ましい。上記の式(V)で表されるスルホン酸塩型界面活性剤は、当該技術においてはアルキルベンゼンスルホン酸塩として知られ、例えば、直鎖デシルベンゼン硫酸ナトリウム、直鎖ウンデシルベンゼン硫酸ナトリウム、直鎖ドデシルベンゼン硫酸ナトリウム、直鎖トリデシルベンゼン硫酸ナトリウム及び直鎖テトラデシルベンゼン硫酸ナトリウムなどが挙げられる。

[0046] また、スルホン酸塩型界面活性剤として、以下の式(VI)及び(VII)のそれぞれで表される界面活性剤の混合物を用いてもよい。



[0048] 上記の式(VI)中、 $j$ 及び $k$ は0以上の整数であって、 $j$ と $k$ の和が10~25の整数であり； $\text{Y}^+$ はアルカリ金属イオンである。



[0050] 上記の式(VII)中、 $m$ 及び $n$ は0以上の整数であって、 $m$ と $n$ の和が10~25の整数であり； $\text{Y}^+$ はアルカリ金属イオンである。

[0051] 上記の式(VI)中、 $j$ と $k$ の和が11~15の整数であって、上記の式(VII)中、 $m$ と $n$ の和が12~16の整数であることが好ましい。上記の式(VI)及び(VII)でそれぞれ表される界面活性剤は、当該技術においては $\alpha$ -オレフィンスルホン酸塩として知られ、例えば、1-テトラデセンスルホン酸ナトリウム、ヘキサデセンスルホン酸ナトリウム、3-ヒドロキシヘキサデシル-1-スル

ホン酸ナトリウム、オクタデセン-1-スルホン酸ナトリウム及び3-ヒドロキシ-1-オクタデカンスルホン酸ナトリウムなどが挙げられる。

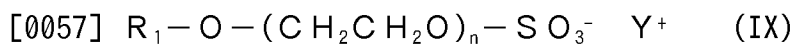
[0052] 硫酸エステル塩型界面活性剤としては、例えば、以下の式(VIII)で表される界面活性剤が挙げられる。



[0054] 上記の式(VIII)中、 $\text{R}_1$ は炭素数10~25のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基であり； $\text{Y}^+$ はアルカリ金属イオンである。

[0055] 上記の式(VIII)中、 $\text{R}_1$ としては、炭素数が10~18の直鎖のアルキル基が好ましく、特に炭素数が12の直鎖のアルキル基が好ましい。上記の式(VIII)で表される硫酸エステル塩型界面活性剤は、当該技術においては高級アルコール硫酸エステル塩として知られ、例えば、デシル硫酸ナトリウム、ウンデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸ナトリウム、トリデシル硫酸ナトリウム及びテトラデシル硫酸ナトリウムなどが挙げられる。

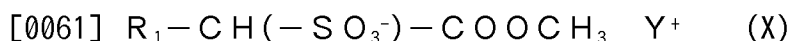
[0056] また、硫酸エステル塩型界面活性剤として、以下の式(IX)で表される界面活性剤を用いてもよい。



[0058] 上記の式(IX)中、 $\text{R}_1$ は炭素数10~25のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基であり； $n$ は1~8の整数であり； $\text{Y}^+$ はアルカリ金属イオン又はアンモニウムイオンである。

[0059] 上記の式(IX)中、 $\text{R}_1$ としては、炭素数が12~18の直鎖のアルキル基が好ましく、特に炭素数が12の直鎖のアルキル基が好ましい。上記の式(IX)で表される硫酸エステル塩型界面活性剤は、当該技術においてはポリオキシエチレンアルキル硫酸エステル塩として知られ、例えば、ドデシルエーテル硫酸エステルナトリウムなどが挙げられる。

[0060] また、硫酸エステル塩型界面活性剤として、以下の式(X)で表される界面活性剤を用いてもよい。



[0062] 上記の式(X)中、 $\text{R}_1$ は炭素数8~25のアルキル基、アルケニル基又はアルキ

ニル基であり；Y<sup>+</sup>はアルカリ金属イオンである。

[0063] 上記の式(X)中、R<sub>1</sub>としては、炭素数が10～18の直鎖のアルキル基が好ましく、特に炭素数が12の直鎖のアルキル基が好ましい。上記の式(X)で表される硫酸エステル塩型界面活性剤は、当該技術においてはα-スルホ脂肪酸エステルとして知られ、例えば、2-スルホテトラデカン酸-1-メチルエステルナトリウム塩及び2-スルホヘキサデカン酸-1-メチルエステルナトリウム塩などが挙げられる。

[0064] 本実施形態において、両性界面活性剤として、アミノ酸型両性界面活性剤及びベタイン型両性界面活性剤から選択される少なくとも1種を用いることができる。アミノ酸型両性界面活性剤としては、例えば以下の式(XI)で表される界面活性剤が挙げられる。

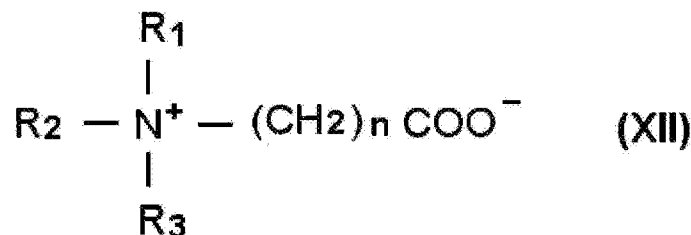
[0065]  $R_1-N^+H_2-CH_2CH_2COO^-$  (XI)

[0066] 上記の式(XI)中、R<sub>1</sub>は炭素数8～25のアルキル基、アルケニル基又はアルキニル基である。

[0067] 上記の式(XI)中、R<sub>1</sub>としては、炭素数が12～18の直鎖のアルキル基が好ましい。上記のアミノ酸型両性界面活性剤としては、例えば、3-(ドデシルアミノ)プロパン酸及び3-(テトラデカ-1-イルアミノ)プロパン酸などが挙げられる。

[0068] ベタイン型両性界面活性剤としては、例えば、以下の式(XII)で表される界面活性剤が挙げられる。

[0069] [化5]



[0070] 上記の式(XII)中、R<sub>1</sub>は炭素数6～18のアルキル基又はアルケニル基であり；R<sub>2</sub>は炭素数1～4のアルキル基又はアルケニル基であり；R<sub>3</sub>は炭素数1～

4のアルキル基若しくはアルケニル基、又はベンジル基であり；nは1又は2である。

[0071] ベタイン型両性界面活性剤としては、例えば、ドデシルジメチルアミノ酢酸ベタイン及びステアリルジメチルアミノ酢酸ベタインなどが挙げられる。

[0072] 第1試薬中の界面活性剤の濃度は、調製した測定試料中の該界面活性剤の濃度を2 mg/L以上30 mg/L以下、好ましくは4 mg/L以上22 mg/L以下とすることが可能な濃度であれば特に限定されない。

[0073] 本実施形態においては、pH変化による赤血球の溶血を防止するために、第1試薬のpHを5以上9以下、好ましくは6.5以上8.6以下、より好ましくは7.0以上7.8以下の範囲とすることができる。よって、第1試薬は、pHを一定に保つために緩衝剤を含んでいてもよい。そのような緩衝剤としては、上記のpH範囲にて緩衝作用を有する緩衝剤であれば特に限定されず、例えば、Tris、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPS、MOPSO、BES、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPSなどのグッド緩衝剤などが挙げられる。

[0074] 尿試料には、リン酸アンモニウム、リン酸マグネシウム、炭酸カルシウムなどの無晶性塩類が含まれている場合がある。本実施形態においては、これらの無晶性塩類の影響を低減させるために、第1試薬はキレート剤を含んでいてもよい。キレート剤は、無晶性塩類を除去可能なキレート剤であれば特に限定されず、当該技術において公知の脱カルシウム剤、脱マグネシウム剤などから適宜選択することができる。具体的には、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA塩)、CyDTA、DHEG、DPTA-OH、EDDA、EDDP、GEDTA、HDTA、HIDA、Methyl-EDTA、NTA、NTP、NTP0、EDDP0などが挙げられ、それらの中でもEDTA塩が特に好ましい。

[0075] 第1試薬中のキレート剤の濃度は、上記のようにして調製した測定試料中において、無晶性塩類の影響を低減できるような終濃度で該キレート剤が含まれるように設定することが望ましい。測定試料中の終濃度は、上記のキレート剤の種類に応じて適宜設定される。例えば、キレート剤としてEDTA 2カ

リウム(EDTA-2K)を用いる場合、測定試料中の終濃度は0.1 mM以上500 mM以下、好ましくは1 mM以上100 mM以下である。

[0076] 尿中に酵母様真菌及び赤血球が存在する場合、フローサイトメータによる分析では、酵母様真菌と赤血球との分画があまり良好ではない場合があることが知られている。したがって、第1試薬は、酵母様真菌の細胞膜を損傷させる物質を含んでいてもよい。そのような物質としては、2-フェノキシエタノール、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、1-フェノキシ-2-プロパノール、フェノール、酢酸フェニル、ベンゾチアゾールなどが挙げられ、それらの中でも2-フェノキシエタノールが特に好ましい。このような物質を含む第1試薬を用いることにより、酵母様真菌の染色性が変化して、赤血球と酵母様真菌との分画が改善される。

[0077] 尿の浸透圧は、50~1300 mOsm/kgと広範囲に分布していることが知られているが、測定試料において浸透圧が低すぎるか又は高すぎる場合、赤血球が損傷するおそれがある。測定試料における適切な浸透圧は100 mOsm/kg以上600 mOsm/kg以下、好ましくは150 mOsm/kg以上500 mOsm/kg以下である。尿の浸透圧が高すぎる場合は、水又は第1試薬で希釈することにより浸透圧を適宜調節することができる。反対に、尿の浸透圧が低すぎる場合は、第1試薬は浸透圧補償剤を含んでいてもよい。そのような浸透圧補償剤としては、無機塩類、有機塩類、糖類などが挙げられる。無機塩類としては、塩化ナトリウム、臭化ナトリウムなどが挙げられる。有機塩類としては、プロピオン酸ナトリウム、プロピオン酸カリウム、プロピオン酸アンモニウムシュウ酸塩などが挙げられる。糖類としては、ソルビトール、グルコース、マンニトールなどが挙げられる。

[0078] 本実施形態では、調製工程において、円柱及び赤血球を染色するための蛍光色素を含む試薬（以下、「第2試薬」ともいう）をさらに混合することが好ましい。第2試薬に含まれる蛍光色素は、少なくとも細胞膜、好ましくはタンパク質及び赤血球の細胞膜を染色することができる蛍光色素が好ましい。第2試薬に用いる蛍光色素としては、縮合ベンゼン誘導体が挙げられ、

該誘導体の中でもシアニン系蛍光色素が特に好ましい。シアニン系蛍光色素としては、例えば、3,3'-ジエチルオキサカルボシアニンアイオダイド(DiOC2(3))、3,3'-ジプロピルオキサカルボシアニンアイオダイド(DiOC3(3))、3,3'-ジブチルオキサシアニンアイオダイド(DiOC4(3))及び3,3'-ジペンチルオキサカルボシアニンアイオダイド(DiOC5(3))が挙げられる。

[0079] 第2試薬中の蛍光色素は1種類であってもよいし、2種類以上であってもよい。第2試薬中の蛍光色素の濃度は、調製した測定試料中において、少なくとも円柱及び赤血球を適切に染色することができるような終濃度で該蛍光色素が含まれるように設定することが望ましい。測定試料中の終濃度は、上記の蛍光色素の種類に応じて適宜設定される。例えば、蛍光色素としてDiOC3(3)を用いる場合、測定試料中の終濃度は0.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下、好ましくは1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下である。

[0080] 第2試薬は、上記の蛍光色素を適切な溶媒に溶解させることにより得ることができる。溶媒は、上記の蛍光色素を溶解させることができる水性溶媒であれば特に限定されず、例えば、水、水溶性有機溶媒、及びこれらの混合物が挙げられる。それらの中でも、水溶性有機溶媒が特に好ましい。水溶性有機溶媒としては、例えば、炭素数1～3の低級アルコール、エチレングリコール、DMSOなどが挙げられる。

[0081] 本実施形態においては、尿試料と、第1試薬と、第2試薬とを混合する順序は特に限定されず、これらを同時に混合することもできる。好ましくは、尿試料と第2試薬とを先に混合し、ここへ第1試薬をさらに混合する。あるいは、第1試薬と第2試薬とを先に混合し、ここへ尿試料をさらに混合してもよい。

[0082] 本実施形態において、尿試料と、第1試薬と、第2試薬との混合割合は特に限定されず、各試薬に含まれる成分濃度に応じて適宜決定すればよい。例えば、尿試料と第1試薬との混合割合は、体積比で1 : 0.5～10の範囲から決定することができる。また、尿試料と第2試薬との混合割合は、体積比で1 : 0.01～1の範囲から決定することができる。なお、尿試料の量は、第1試

薬と第2試薬に応じて適宜決定すればよい。尿試料の量は測定時間が長くなり過ぎないようにする観点から1000 $\mu$ L以下が好ましい。尿試料の量は10~1000 $\mu$ L程度で測定に十分である。

- [0083] 調製工程における温度条件は、10~60 $^{\circ}$ C、好ましくは35~45 $^{\circ}$ Cである。各試薬を予めこれらの温度となるように加温していてもよい。また、尿試料と、第1試薬及び／又は第2試薬とを混合した後、1秒~5分間、好ましくは5~60秒間インキュベーションしてもよい。
- [0084] 本実施形態の方法では、上記の調製工程で得られた測定試料に含まれる尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出する工程が行われる。
- [0085] 調製工程で第2試薬を用いなかった場合は、光学顕微鏡を用いて、測定試料中の各成分の形状や内部構造などを観察することにより、円柱及び赤血球を含む有形成分を検出することができる。また、第2試薬により尿試料中の有形成分を染色した場合は、蛍光顕微鏡を用いて、測定試料中の各有形成分の形状及び染色の程度などを観察することにより、有形成分を検出することができる。
- [0086] 好ましい実施形態においては、上記の検出工程の前に、測定試料に含まれる尿中有形成分に光を照射して光学的情報を取得する工程をさらに行う。この光学的情報の取得工程は、フローサイトメータにより行われることが望ましい。フローサイトメータによる測定では、染色された尿中有形成分がフローセルを通過する際に該有形成分に光を照射することにより、該有形成分から発せられるシグナルとして光学的情報を得ることができる。取得した光学的情報は、少なくとも散乱光情報を含むことが好ましい。第2試薬を用いて測定試料を調製した場合は、光学的情報として、散乱光情報及び蛍光情報を取得することが好ましい。
- [0087] 散乱光情報は、一般に市販されるフローサイトメータで測定できる散乱光の情報であれば特に限定されず、例えば、前方散乱光(例えば、受光角度0~20度付近)や側方散乱光(受光角度90度付近)などの散乱光の強度及び波形情報などが挙げられる。より具体的には、散乱光情報として、散乱光強度、散乱

光パルス幅及び散乱光積分値などが挙げられる。当該技術においては、側方散乱光は、細胞の核や顆粒などの内部情報を反映し、前方散乱光は、細胞の大きさの情報を反映することが知られている。実施形態においては、前方散乱光の情報を用いることが好ましい。

- [0088] 蛍光情報は、適当な波長の励起光を染色された尿中有形成分に照射して、励起された蛍光を測定して得られる情報であれば特に限定されず、例えば、蛍光の強度及び波形情報が挙げられる。より具体的には、蛍光情報として、蛍光強度、蛍光パルス幅及び蛍光積分値などが挙げられる。なお、蛍光は、第2試薬に含まれる蛍光色素によって染色された有形成分内の核酸などから発せられる。また、受光波長は、第2試薬に含まれる蛍光色素に応じて適宜選択することができる。
- [0089] 本実施形態においては、フローサイトメータの光源は特に限定されず、蛍光色素の励起に好適な波長の光源を適宜選択することができる。例えば、赤色半導体レーザ、青色半導体レーザ、アルゴンレーザ、He-Neレーザ、水銀アークランプなどが使用される。特に半導体レーザは、気体レーザに比べて非常に安価であるので好適である。
- [0090] 本実施形態の方法において上記の取得工程を行う場合、検出工程では、該取得工程で得られた光学的情報に基づいて、尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出する。なお、「検出」には、測定試料中に尿中有形成分の存在を見出すことだけではなく、尿中有形成分を分類及び計数することも含まれる。
- [0091] 本実施形態において、尿中有形成分の検出は、散乱光情報と蛍光情報とを二軸とするスキッタグラムを作成し、得られたスキッタグラムを適当な解析ソフトを用いて解析することにより行われることが好ましい。例えば、X軸を蛍光強度とし、Y軸を前方散乱光強度としてスキッタグラムを描いた場合、各尿中有形成分の粒子サイズ及び染色性(核酸含有量)に応じて、それぞれの集団(クラスター)がスキッタグラム上に出現する。本実施形態の方法においては、少なくとも円柱及び赤血球を、それぞれ異なる領域に出現

する2種類の集団として検出することができる。また、解析ソフトによって、スキャッタグラム上にて各集団を囲むウィンドウを設け、各ウィンドウ中の粒子数を計数することができる。

[0092] [尿試料分析用試薬]

本実施形態の尿試料分析用試薬(以下、単に「試薬」ともいう)は、尿試料中の有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための試薬である。本実施形態の試薬は、4 mg/L以上50 mg/L以下の濃度で界面活性剤を含む。本実施形態の試薬は、尿試料と当該試薬とを混合して調製された測定試料中の界面活性剤の濃度(終濃度)が2 mg/L以上30 mg/L以下、好ましくは4 mg/L以上22 mg/L以下となるように、尿試料との混合が行われる試薬である。なお、本実施形態の試薬については、本実施形態の尿試料分析方法に用いた第1試薬について述べたことと同じである。図6に、本実施形態の試薬11の一例を示した。

[0093] 本発明の範囲には、尿試料中の有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための、4 mg/L以上50 mg/L以下の界面活性剤を含む試薬の使用も含まれる。

[0094] [尿試料分析用試薬キット]

本実施形態の尿試料分析用試薬キット(以下、単に「試薬キット」ともいう)は、尿試料中の有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための試薬キットである。本実施形態の試薬キットは、4 mg/L以上50 mg/L以下の界面活性剤を含む第1試薬と、円柱及び赤血球を染色するための蛍光色素を含む第2試薬とを含む。本実施形態の試薬キットは、尿試料、第1試薬、及び第2試薬を混合して調製された測定試料中の界面活性剤の濃度(終濃度)が2 mg/L以上30 mg/L以下、好ましくは4 mg/L以上22 mg/L以下となるように、尿試料との混合が行われる試薬キットである。

[0095] 本実施形態の試薬キットに含まれる第1試薬及び第2試薬については、本実施形態の尿試料分析方法に用いた第1試薬及び第2試薬について述べたことと同じである。

[0096] 本実施形態においては、第1試薬と第2試薬とを別々の容器に収容し、これらを備えた2試薬型の試薬キットとすることが好ましい。図7に、容器に収容された第1試薬22及び容器に収容された第2試薬33を含む本実施形態の試薬キットの一例を示した。

[0097] 本発明の範囲には、尿試料中の有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための、4 mg/L以上50 mg/L以下の界面活性剤を含む第1試薬と、円柱及び赤血球を染色するための蛍光色素を含む第2試薬とを含む試薬キットの使用も含まれる。

[0098] 以下に、本発明を実施例により詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

## 実施例

### [0099] 実施例1

実施例1では、尿試料から調製した測定試料中の界面活性剤の濃度と、尿中赤血球に及ぼす影響との関係を検討した。

### [0100] (1)尿試料

尿試料として、尿沈残渣検査で赤血球を認めた臨床検体を用いた。

### [0101] (2)試薬

#### ・希釈用試薬

希釈用試薬として、下記の組成の希釈液1及び2を調製した。なお、希釈液1及び2には、逆浸透膜で濾過した水を溶媒として用いた。

希釈液1：HEPES-OH(100 mM、pH7)(株式会社同仁化学研究所)、EDTA-2K(25 mM)(中部キレスト株式会社)及びDTAB(50 mg/L)(東京化成工業株式会社)

希釈液2：HEPES-OH(100 mM、pH7)、EDTA-2K(25 mM)及びDTAB(10 mg/L)

### [0102] ・染色用試薬

シアニン系蛍光色素のDioC3(3)(株式会社林原生物化学研究所)を、1 mg/mLの濃度となるようにエチレングリコール(ナカライテスク株式会社)に溶解して、染色用試薬を調製した。

### [0103] (3)測定及び結果

試料の測定はフローサイトメータUF-1000i(シスメックス株式会社製)を用いて行った。このフローサイトメータによる測定の具体的な工程は、次のとおりである。まず、尿試料(200  $\mu$ L)と、希釈用試薬(580  $\mu$ L)と、染色用試薬(20  $\mu$ L)とを混合し、40°Cにて10秒間反応させて測定試料を調製した。測定試料中のDTABの濃度(DTAB終濃度)は、希釈液1を用いた場合は36.25 mg/Lであり、希釈液2を用いた場合は7.25 mg/Lであった。そして、測定試料に光を照射して、前方散乱光強度及び蛍光強度を取得した。なお、フローサイトメータの光源として、励起波長488 nmの半導体レーザを用いた。これらの測定値に基づいて、測定試料中の赤血球数をカウントした。結果を、試薬による処理をしていない尿試料に含まれる赤血球数に対する測定試料中の赤血球数の割合(%)として、図1に示す。

[0104] 図1に示されるように、測定試料中のDTABの終濃度が36.25 mg/Lとなる希釈液1を用いた場合、測定試料中の赤血球の数が顕著に減少していた。したがって、DTABの終濃度が36.25 mg/Lとなる条件では、尿試料中の赤血球を正確に計数することは難しい。これに対して、測定試料中のDTABの終濃度が7.25 mg/Lとなる希釈液1を用いた場合は、赤血球に及ぼす影響が極めて小さかった。よって、DTABの終濃度が7.25 mg/Lとなる条件は、尿試料中の赤血球の測定に適していることがわかる。

#### [0105] 実施例2

実施例2では、フローサイトメータを用いる本実施形態の尿試料分析方法による、円柱に類似する尿中有形成分である粘液糸と、円柱との弁別性能を検討した。

#### [0106] (1)尿試料

尿試料として、粘液糸を含む尿(尿沈残渣検査で粘液糸を認めた臨床検体。以下、「偽陽性検体」とも呼ぶ)と、円柱及び粘液糸を含む尿(尿沈残渣検査で円柱及び粘液糸を認めた臨床検体。以下、「円柱検体」とも呼ぶ)を用いた。

#### [0107] (2)試薬

・希釈用試薬

希釈用試薬として、下記の組成の希釈液3及び4を調製した。なお、希釈液3及び4には、逆浸透膜で濾過した水を溶媒として用いた。

希釈液3：HEPES-OH(100 mM、pH7)及びEDTA-2K(25 mM)

希釈液4：HEPES-OH(100 mM、pH7)、EDTA-2K(25 mM)及びDTAB(10 mg/L)

・染色用試薬

染色用試薬として、実施例1と同じ染色用試薬を用いた。

[0108] (3)測定及び結果

尿試料(200  $\mu$ L)と、希釈用試薬(580  $\mu$ L)と、染色用試薬(20  $\mu$ L)とを混合し、40°Cにて10秒間反応させ測定試料を調製した。そして、得られた測定試料を蛍光顕微鏡BX51(オリンパス株式会社)で目視観察して円柱を計数した。また、同様にして測定試料を調製し、得られた測定試料をフローサイトメータUF-1000i(シスメックス株式会社製)でも測定した。具体的には、測定試料に光を照射して、前方散乱光強度、側方散乱光強度及び蛍光強度を取得した。なお、フローサイトメータの光源として、励起波長488 nmの半導体レーザを用いた。これらの測定値に基づいて、測定試料中の円柱の数を算出した。結果を表1に示す。なお、蛍光顕微鏡での目視による結果は、希釈液3で処理した試料の円柱の数である。

[0109] [表1]

	円柱数(particles/ $\mu$ L)		
	目視	FCM, 希釈液3 (DTAB 終濃度 0 mg/L)	FCM, 希釈液4 (DTAB 終濃度 7.25 mg/L)
偽陽性検体	0.4	2.8	0.5
円柱検体	10	14.5	9.4

[0110] 表1に示されるように、DTABを含まない希釈液3で処理した尿試料では、フローサイトメータ(FCM)による測定では、円柱の算出数が、目視によるカウント数より多かった。これは、試料中の粘液糸凝集などの円柱に類似した夾雑物を、円柱としてカウントしてしまったことによると考えられる。一方、D

TABを含む希釈液4で処理した尿試料では、目視による結果とFCMの測定結果とが近似することが明らかとなった。これは、DTABの作用により、円柱に類似した夾雑物が低減されたことによると考えられる。

[0111] 実施例3

実施例3では、フローサイトメータを用いる本実施形態の尿試料分析方法の臨床性能を、目視検査の結果と比較して評価した。

[0112] (1)尿試料

尿試料として、顕微鏡観察により円柱が出現していないと判断された陰性尿検体(42検体)を用いた。

[0113] (2)試薬

希釈用試薬として、実施例2と同じ希釈液3及び4を用いた。染色用試薬として、実施例1と同じ染色用試薬を用いた。

[0114] (3)測定及び結果

試料の測定は、フローサイトメータUF-1000i(シスメックス株式会社製)を用いて行った。このフローサイトメータによる測定の具体的な工程は、次のとおりである。まず、試料(200 $\mu$ L)と、希釈用試薬(580 $\mu$ L)と、各染色液(20 $\mu$ L)とを混合し、40 $^{\circ}$ Cにて10秒間反応させて測定試料を調製した。そして、得られた測定試料に光を照射して、前方散乱光強度、側方散乱光強度及び蛍光強度を取得した。なお、フローサイトメータの光源として、励起波長488 nmの半導体レーザを用いた。これらの測定値に基づいて測定試料中の円柱の数を算出し、フローサイトメータ(FCM)により陰性と判断された検体数を求めた。また、目視(顕微鏡観察)による陰性検体数をリファレンスとして、FCMによる円柱の分析の特異度を求めた。結果を表2に示す。

[0115] [表2]

	希釈液3 (DTAB 終濃度 0 mg/L)	希釈液4 (DTAB 終濃度 7.25 mg/L)
目視による陰性検体数	42	42
FCMによる陰性検体数	30	36
特異度(%)	71.4	85.7

[0116] 表2に示されるように、シアニン系蛍光色素を含む染色用試薬と、分散剤を含まない希釈液とを用いて尿試料を処理した場合、FCM測定による分析の特異度は71.4%であった。これに対して、分散剤としてカチオン性界面活性剤のDTABを含む希釈液で尿試料を処理することにより、分析の特異度が向上した。これは、DTABの作用により、円柱に類似した夾雑物が低減されたことによると考えられる。

[0117] 実施例4

実施例4では、尿試料から調製した測定試料中の界面活性剤の濃度と、尿中赤血球に及ぼす影響との関係を検討した。

[0118] (1)尿試料

尿試料として、尿沈残渣検査で赤血球を認めた臨床検体を用いた。

[0119] (2)試薬

・希釈用試薬

希釈用試薬として、各種の界面活性剤を様々な濃度で含む希釈液のシリーズを調製した。組成は以下のとおりである。なお、各希釈液には、逆浸透膜で濾過した水を溶媒として用いた。

[0120] (i)下記のカチオン性界面活性剤を1種含む希釈液のシリーズ：HEPES-OH(50 mM、pH7)(株式会社同仁化学研究所)、EDTA-2K(25 mM)(中部キレスト株式会社)及びカチオン性界面活性剤(0、5、10、15、20又は30 mg/L)

\*カチオン性界面活性剤

オクチルトリメチルアンモニウムブロミド(OTAB)(東京化成工業)

ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド(DTAB)(東京化成工業)

テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド(MTAB)(東京化成工業)

ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド(DTAC)(東京化成工業)

(ii)下記ノニオン性界面活性剤を1種含む希釈液のシリーズ：HEPES-OH(50 mM、pH7)、EDTA-2K(25 mM)、及びノニオン性界面活性剤(0、5、10、15、20又は30 mg/L)

\*ノニオン性界面活性剤

ポリオキシエチレンセチルエーテル(BC-7(日光ケミカルズ))

[0121] ・染色用試薬

シアニン系蛍光色素のDiOC3(3)(株式会社林原生物化学研究所)を、1 mg/mLの濃度となるようにエチレングリコール(ナカライテスク株式会社)に溶解して、染色用試薬を調製した。

[0122] (3)測定及び結果

(3-1)カチオン性界面活性剤を1種含む希釈液について

試料の測定はフローサイトメータUF-1000i(シスメックス株式会社製)を用いて行った。このフローサイトメータによる測定の具体的な工程は、次のとおりである。まず、尿試料(200  $\mu$ L)と、希釈用試薬(580  $\mu$ L)と、染色用試薬(20  $\mu$ L)とを混合し、40°Cにて10秒間反応させて測定試料を調製した。測定試料中の界面活性剤の濃度(終濃度)は、0、3.6、7.3、10.9、14.5及び21.8 mg/Lであった。そして、測定試料に光を照射して、前方散乱光強度及び蛍光強度を取得した。なお、フローサイトメータの光源として、励起波長488 nmの半導体レーザを用いた。これらの測定値に基づいて、測定試料中の赤血球数をカウントした。結果を図2に示す。

[0123] (3-2)ノニオン性界面活性剤を1種含む希釈液について

希釈用試薬として、BC-7を含む希釈液のシリーズを用いたこと以外は上記と同様にして、測定試料を調製した。測定試料中の界面活性剤の濃度(終濃度)は、0、3.6、7.3、10.9、14.5及び21.8 mg/Lであった。これらの試料を上記と同様にして測定した。また、比較のため、DTABを含む希釈液のシリーズを用いて、同様に測定試料を測定した。そして、得られた測定値に基づいて、測定試料中の赤血球数をカウントした。結果を図3に示す。

[0124] 図2に示されるように、DTAB以外のカチオン性界面活性剤を用いた場合でも、測定試料中の赤血球数は減少せず、正確に測定できることがわかる。図3に示されるように、ノニオン界面活性剤を用いた場合でも、DTABを用いた場合と同様に、測定試料中の赤血球数は減少せず、正確に測定できることがわかる。

## [0125] 実施例 5

実施例 5 では、尿試料から調製した測定試料中の界面活性剤の濃度と、円柱に類似した夾雑物を低減する効果との関係を検討した。

## [0126] (1) 尿試料

尿試料として、円柱を含まないが円柱に類似した夾雑物を含む正常検体を用いた。

## [0127] (2) 試薬

## ・ 希釈用試薬

希釈用試薬として、各種の界面活性剤を様々な濃度で含む希釈液のシリーズを調製した。組成は以下のとおりである。なお、各希釈液には、逆浸透膜で濾過した水を溶媒として用いた。

[0128] (iii) 下記のカチオン性界面活性剤を 1 種含む希釈液のシリーズ：HEPES-0H(50 mM、pH7)(株式会社同仁化学研究所)、EDTA-2K(25 mM)(中部キレスト株式会社)及びカチオン性界面活性剤(0、1、3、5、8、10、20又は50 mg/L)

## \*カチオン性界面活性剤

オクチルトリメチルアンモニウムブロミド(OTAB)(東京化成工業)

ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド(DTAB)(東京化成工業)

テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド(MTAB)(東京化成工業)

ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド(DTAC)(東京化成工業)

(iv) 下記のノニオン性界面活性剤を 1 種含む希釈液のシリーズ：HEPES-0H(50 mM、pH7)、EDTA-2K(25 mM)、及びノニオン性界面活性剤(0、1、3、5、8、10、20又は50 mg/L)

## \*ノニオン性界面活性剤

ポリオキシエチレンセチルエーテル(BC-7(日光ケミカルズ))

## [0129] ・ 染色用試薬

染色用試薬として、実施例 4 と同じ染色用試薬を用いた。

## [0130] (3) 測定及び結果

(3-1) カチオン性界面活性剤を 1 種含む希釈液について

試料の測定はフローサイトメータUF-1000i(シスメックス株式会社製)を用いて行った。このフローサイトメータによる測定の具体的な工程は、次のとおりである。まず、尿試料(200 $\mu$ L)と、希釈用試薬(580 $\mu$ L)と、染色用試薬(20 $\mu$ L)とを混合し、40 $^{\circ}$ Cにて10秒間反応させて測定試料を調製した。測定試料中の界面活性剤の濃度(終濃度)は、0、0.7、2.2、3.6、5.8、7.3、14.5及び36.3 mg/Lであった。そして、測定試料に光を照射して、前方散乱光強度及び蛍光強度を取得した。なお、フローサイトメータの光源として、励起波長488 nmの半導体レーザを用いた。これらの測定値に基づいて、測定試料中の円柱類似夾雑物の数をカウントした。結果を図4に示す。

[0131] (3-2)ノニオン性界面活性剤を1種含む希釈液について

希釈用試薬として、BC-7を含む希釈液のシリーズを用いたこと以外は上記と同様にして、測定試料を調製した。測定試料中の界面活性剤の濃度(終濃度)は、0、0.7、2.2、3.6、5.8、7.3、14.5及び36.3 mg/Lであった。これらの試料を上記と同様にして測定した。また、比較のため、DTABを含む希釈液のシリーズを用いて、同様に測定試料を測定した。そして、得られた測定値に基づいて、測定試料中の円柱類似夾雑物の数をカウントした。結果を図5に示す。

[0132] 図4に示されるように、測定試料中のカチオン性界面活性剤の濃度が2.2 mg/L以上であるとき、0及び0.7 mg/Lの場合に比べ、検出される夾雑物の数が減少した。図5に示されるように、ノニオン性界面活性剤BC-7を用いた場合でも、DTABを用いた場合と同様に、測定試料中の界面活性剤の濃度が2.2 mg/L以上であるとき、検出される夾雑物の数が減少した。これらの結果より、測定試料中の界面活性剤の濃度を2.2 mg/L以上とすることにより、誤って円柱として検出されるおそれのある夾雑物を低減できることがわかる。

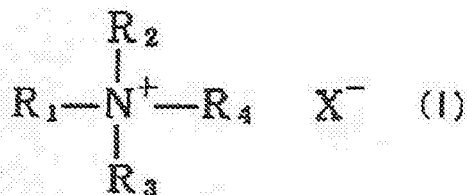
[0133] 本出願は、2014年2月28日に出願された日本国特許出願特願2014-039282号に関し、これらの特許請求の範囲、明細書及び要約書の全ては本明細書中に参照として組み込まれる。

## 符号の説明

- [0134] 1 1 尿試料分析用試薬
- 2 2 第1試薬
- 3 3 第2試薬

## 請求の範囲

- [請求項1] 尿試料と、界面活性剤を含む試薬とを混合して測定試料を調製する工程と、  
調製工程で得られた測定試料に含まれる尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出する工程と  
を含み、調製工程で得られた測定試料中の界面活性剤の濃度が 2 mg/L 以上 30 mg/L 以下である、  
尿試料分析方法。
- [請求項2] 調製工程で得られた測定試料中の界面活性剤の濃度が 4 mg/L 以上 22 mg/L 以下である、請求項 1 に記載の尿試料分析方法。
- [請求項3] 界面活性剤が、カチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤、両性界面活性剤及びノニオン性界面活性剤から選択される少なくとも 1 つである請求項 1 又は 2 に記載の尿試料分析方法。
- [請求項4] カチオン性界面活性剤が、4級アンモニウム塩型界面活性剤及びピリジニウム塩型界面活性剤から選択される少なくとも 1 つであり、アニオン性界面活性剤が、カルボン酸塩型界面活性剤、スルホン酸塩型界面活性剤及び硫酸エステル塩型界面活性剤から選択される少なくとも 1 つであり、両性界面活性剤が、アミノ酸型両性界面活性剤及びペプチン型両性界面活性剤から選択される少なくとも 1 つであり、ノニオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤である請求項 3 に記載の尿試料分析方法。
- [請求項5] カチオン性界面活性剤が、4級アンモニウム塩型界面活性剤である請求項 4 に記載の尿試料分析方法。
- [請求項6] 4級アンモニウム塩型界面活性剤が、以下の式(I)：



(式中、 $R_1$ は炭素数1～18のアルキル基又はアルケニル基であり； $R_2$ 及び $R_3$ は互いに同一又は異なって、炭素数1～4のアルキル基又はアルケニル基であり； $R_4$ は炭素数1～12のアルキル基若しくはアルケニル基、又はベンジル基であり； $X^-$ はハロゲンイオン又はヒドロキシイオンである。)

で表される、全炭素数が4～38の界面活性剤である請求項5に記載の尿試料分析方法。

[請求項7] 前記式(I)において、 $R_2$ 、 $R_3$ 及び $R_4$ のそれぞれがメチル基である請求項6に記載の尿試料分析方法。

[請求項8] 前記式(I)において、 $X^-$ がハロゲンイオンであり、臭化物イオン、塩化物イオン及びヨウ化物イオンから選択される少なくとも1つである請求項6又は7に記載の尿試料分析方法。

[請求項9] 4級アンモニウム塩型界面活性剤が、ドデシルトリメチルアンモニウムブロミド、オクチルトリメチルアンモニウムブロミド、テトラデシルトリメチルアンモニウムブロミド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド、オクチルトリメチルアンモニウムクロライド、及びテトラデシルトリメチルアンモニウムクロライドから選択される少なくとも1つである請求項5～8のいずれか1項に記載の尿試料分析方法。

[請求項10] ポリオキシエチレン系ノニオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルエーテルである請求項4に記載の尿試料分析方法。

[請求項11] 調製工程において、円柱及び赤血球を染色するための蛍光色素を含む試薬をさらに混合する請求項1～10のいずれか1項に記載の尿試料分析方法。

[請求項12] 円柱及び赤血球を染色するための蛍光色素が、シアニン系蛍光色素である請求項11に記載の尿試料分析方法。

[請求項13] 調製工程で得られた測定試料に含まれる尿中有形成分に光を照射して光学的情報を取得する工程をさらに含み、

検出工程が、取得した光学的情報に基づいて、尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出する工程である請求項1～12のいずれか1項に記載の尿試料分析方法。

[請求項14] 前記光学的情報が、少なくとも散乱光情報を含む請求項13に記載の尿試料分析方法。

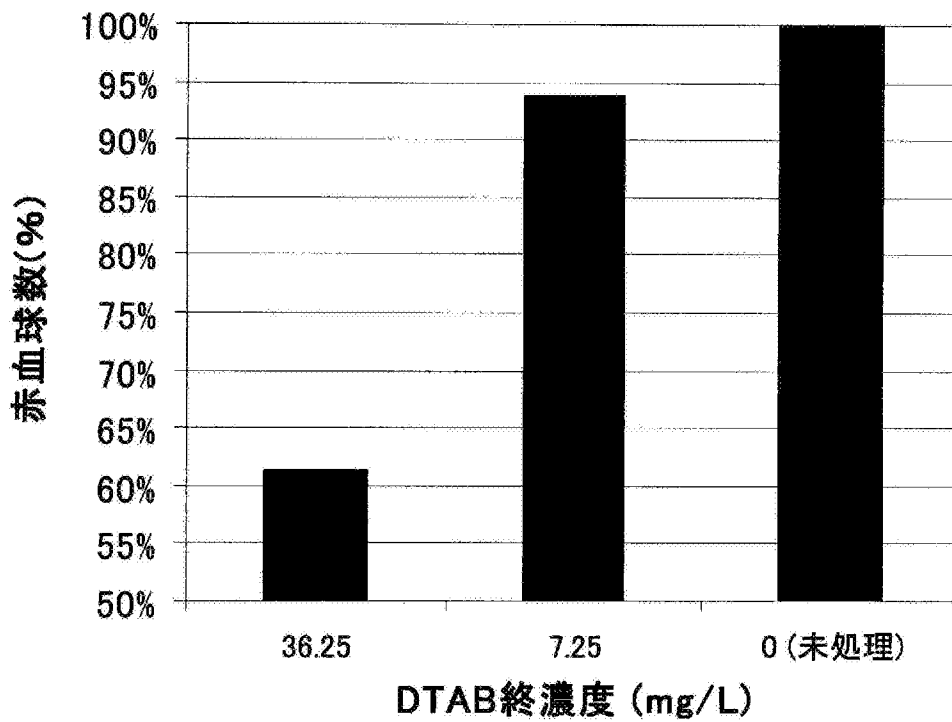
[請求項15] 界面活性剤を含む試薬が、キレート剤をさらに含む請求項1～14のいずれか1項に記載の尿試料分析方法。

[請求項16] キレート剤が、エチレンジアミン四酢酸塩(EDTA塩)である請求項15に記載の尿試料分析方法。

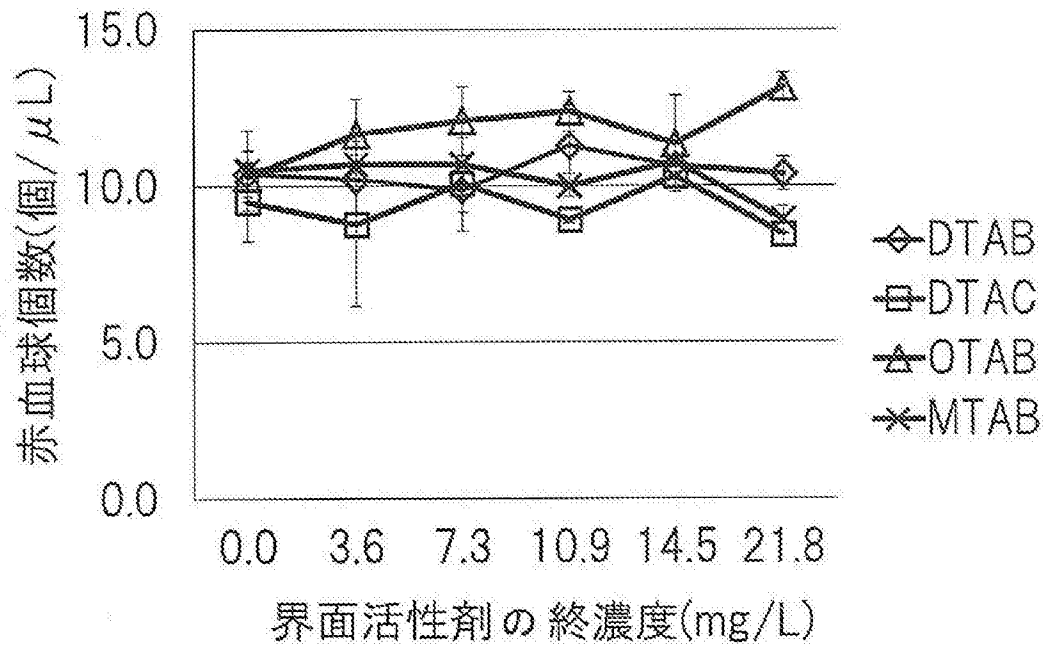
[請求項17] 4 mg/L以上50 mg/L以下の界面活性剤を含む、尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための尿試料分析用試薬。

[請求項18] 4 mg/L以上50 mg/L以下の界面活性剤を含む第1試薬と、  
円柱及び赤血球を染色するための蛍光色素を含む第2試薬と、  
を含む、尿中有形成分として少なくとも円柱及び赤血球を検出するための尿試料分析用試薬キット。

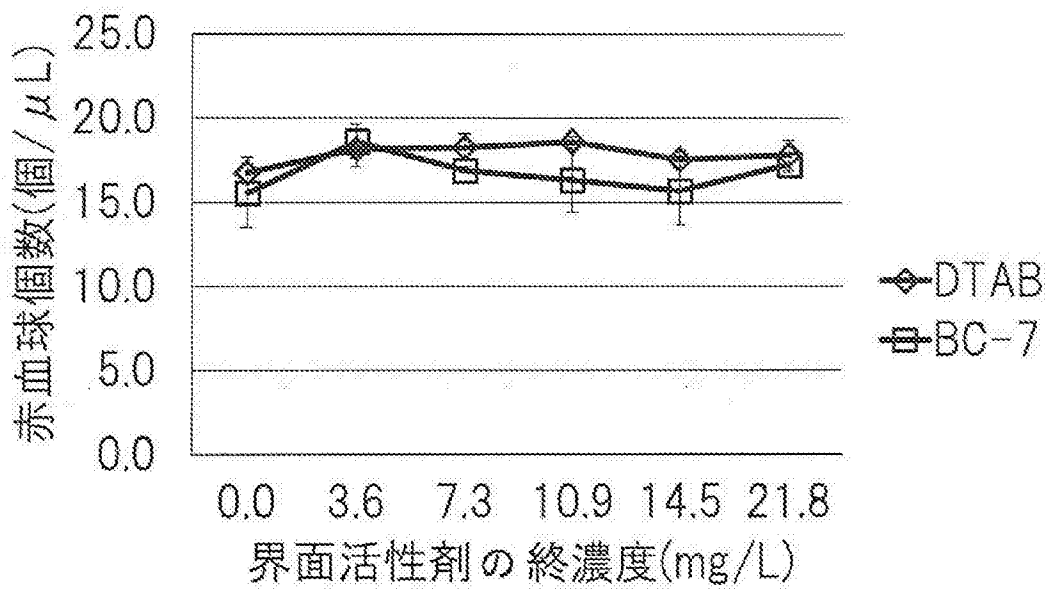
[図1]



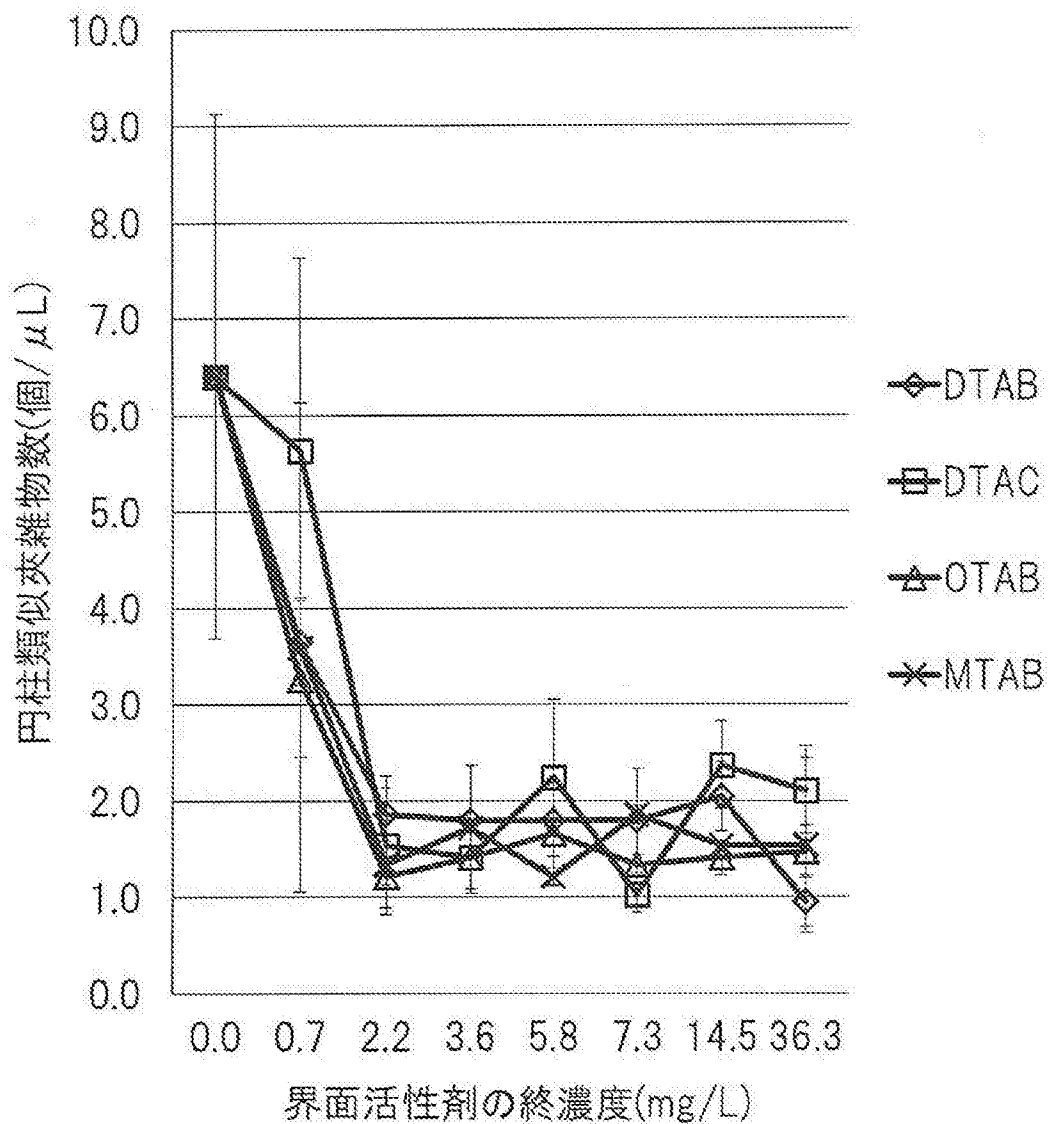
[図2]



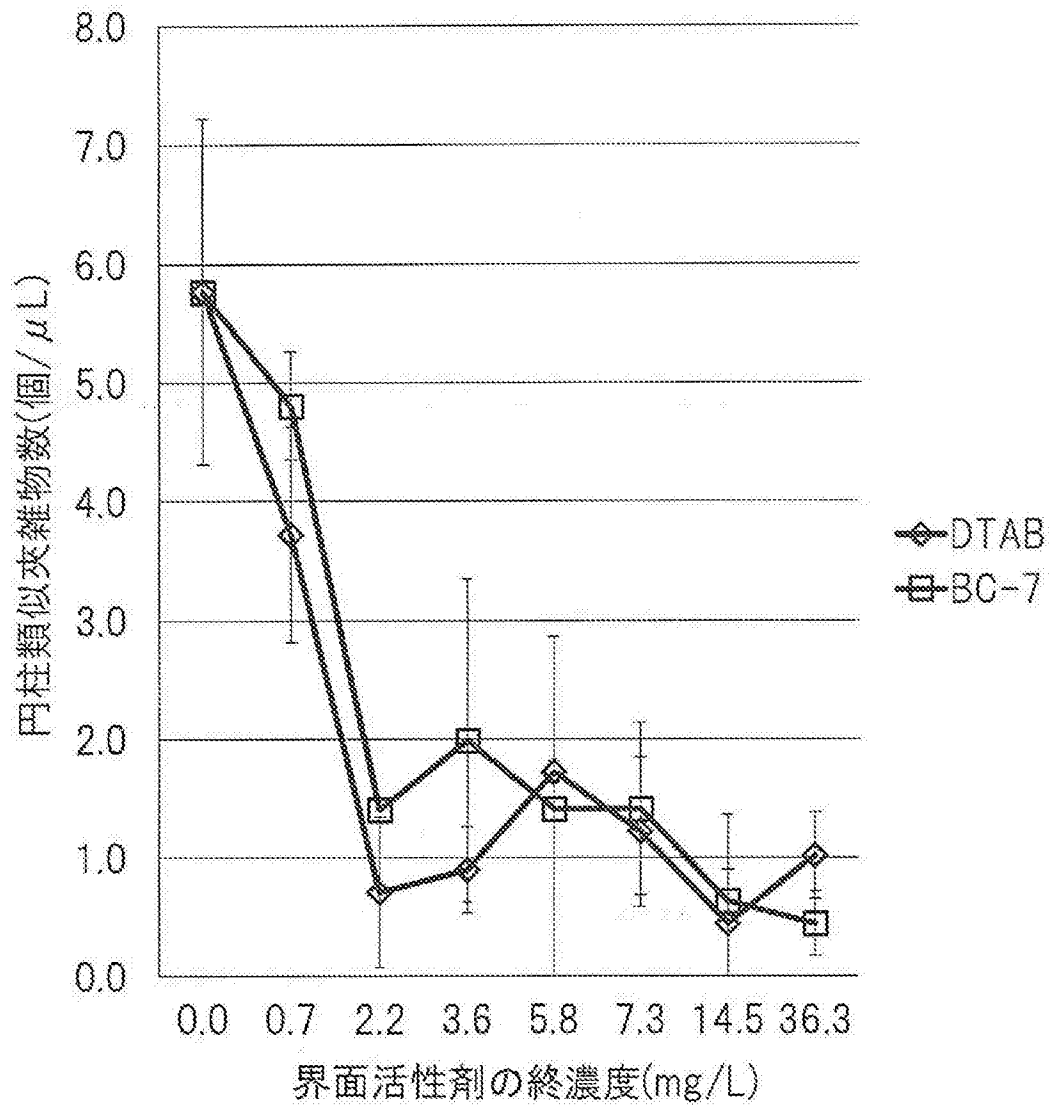
[図3]



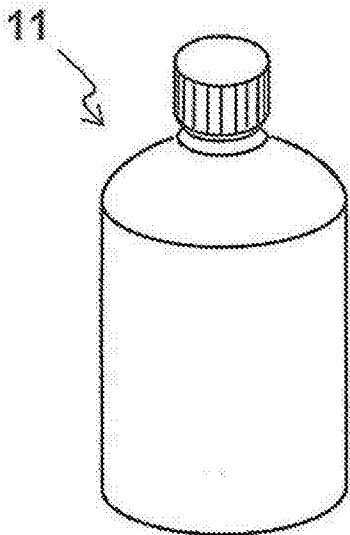
[図4]



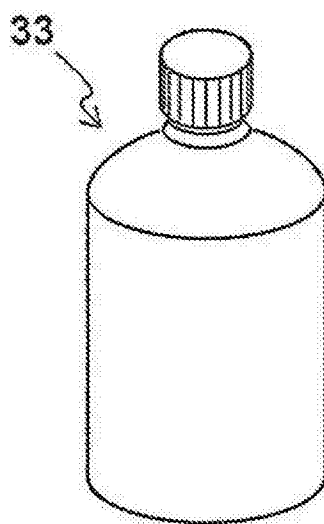
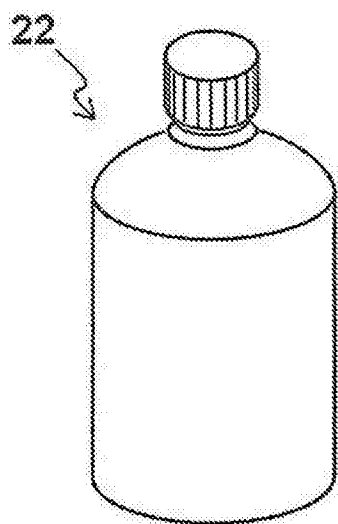
[図5]



[図6]



[図7]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2015/055883

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
G01N33/493(2006.01)i, G01N21/49(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i,  
G01N33/483(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)  
G01N33/493, G01N21/49, G01N21/64, G01N33/483

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	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 04-337459 A (Toa Medical Electronics Co., Ltd.), 25 November 1992 (25.11.1992), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0015], [0016], [0020]; fig. 7 & US 5693484 A & EP 513762 A1 & DE 69213315 C & DE 69213315 T & AU 1622692 A & CA 2068471 A & CA 2068471 A1	1-18

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 13 May 2015 (13.05.15)	Date of mailing of the international search report 26 May 2015 (26.05.15)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/055883

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 05-322883 A (Toa Medical Electronics Co., Ltd.), 07 December 1993 (07.12.1993), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0010], [0022] to [0046] & US 5325169 A & EP 514178 A1 & DE 69209886 C & DE 69209886 D & AU 1622492 A & CA 2068490 A & CA 2068490 A1	1-18
Y	JP 2006-105625 A (Sysmex Corp.), 20 April 2006 (20.04.2006), entire text; all drawings; particularly, paragraphs [0002], [0020] to [0026], [0049] & US 2006/0073601 A1 & EP 1643247 A1 & DE 602005014835 D & CN 1755348 A & AT 433572 T	1-18
A	JP 2006-098233 A (Sysmex Corp.), 13 April 2006 (13.04.2006), entire text; all drawings; particularly, claims; paragraphs [0034] to [0041], [0066], [0068]; fig. 1, 13 & US 2006/0073606 A1	1-18
A	JP 2007-309765 A (Sysmex Corp.), 29 November 2007 (29.11.2007), entire text; all drawings & US 2007/0269897 A1 & EP 1857805 A2 & CN 101074914 A	1-18
A	JP 04-278460 A (Yugen Kaisha Shima Kenkyusho), 05 October 1992 (05.10.1992), entire text (Family: none)	1-18
A	JP 08-005543 A (Hitachi, Ltd.), 12 January 1996 (12.01.1996), entire text & US 5728582 A & EP 678742 A2 & DE 69527465 D & DE 69527465 T	1-18

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））  
 Int.Cl. G01N33/493(2006.01)i, G01N21/49(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i, G01N33/483(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. G01N33/493, G01N21/49, G01N21/64, G01N33/483

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 1971-2015年  
 日本国実用新案登録公報 1996-2015年  
 日本国登録実用新案公報 1994-2015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）

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
Y	JP 04-337459 A（東亜医用電子株式会社）1992.11.25, 全文・全図、特に、 [特許請求の範囲]、段落 [0015]、[0016]、[0020]、[図7] 等参照 & US 5693484 A & EP 513762 A1 & DE 69213315 C & DE 69213315 T & AU 1622692 A & CA 2068471 A & CA 2068471 A1	1-18

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	の日の後に公表された文献
「A」特に関連のある文献ではなく、一般的な技術水準を示すもの	「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
「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	「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
「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）	「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
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献	「&」同一パテントファミリー文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願	

国際調査を完了した日 13.05.2015	国際調査報告の発送日 26.05.2015
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） 草川 貴史 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 05-322883 A (東亜医用電子株式会社) 1993.12.07, 全文・全図、特に、 [特許請求の範囲]、段落 [0010]、[0022] - [0046] 等参照 & US 5325169 A & EP 514178 A1 & DE 69209886 C & DE 69209886 D & AU 1622492 A & CA 2068490 A & CA 2068490 A1	1-18
Y	JP 2006-105625 A (シスメックス株式会社) 2006.04.20, 全文・全図、特 に、段落 [0002]、[0020] - [0026]、[0049] 等参照 & US 2006/0073601 A1 & EP 1643247 A1 & DE 602005014835 D & CN 1755348 A & AT 433572 T	1-18
A	JP 2006-098233 A (シスメックス株式会社) 2006.04.13, 全文・全図、特 に、[特許請求の範囲]、段落 [0034] - [0041]、[0066]、[0 068]、[図1]、[図13] 等参照 & US 2006/0073606 A1	1-18
A	JP 2007-309765 A (シスメックス株式会社) 2007.11.29, 全文・全図等参 照 & US 2007/0269897 A1 & EP 1857805 A2 & CN 101074914 A	1-18
A	JP 04-278460 A (有限会社シマ研究所) 1992.10.05, 全文等参照 (ファミ リーなし)	1-18
A	JP 08-005543 A (株式会社日立製作所) 1996.01.12, 全文等参照 & US 5728582 A & EP 678742 A2 & DE 69527465 D & DE 69527465 T	1-18