

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2010-169436

(P2010-169436A)

(43) 公開日 平成22年8月5日(2010.8.5)

| | | |
|-------------------------------|--------------|-------------|
| (51) Int.Cl. | F I | テーマコード (参考) |
| GO 1 N 33/49 (2006.01) | GO 1 N 33/49 | Z |
| GO 1 N 33/53 (2006.01) | GO 1 N 33/53 | K |
| | | 2GO45 |

審査請求 未請求 請求項の数 9 O L (全 10 頁)

| | | | |
|-----------|----------------------------|----------|---|
| (21) 出願番号 | 特願2009-10137 (P2009-10137) | (71) 出願人 | 510005889 |
| (22) 出願日 | 平成21年1月20日 (2009.1.20) | | ベックマン・コールター・インコーポレーテッド アメリカ合衆国・カリフォルニア・92821・ブレア・サウス・クレーマー・ブルバード・250 |
| | | (74) 代理人 | 100058479 弁理士 鈴江 武彦 |
| | | (74) 代理人 | 100108855 弁理士 蔵田 昌俊 |
| | | (74) 代理人 | 100091351 弁理士 河野 哲 |
| | | (74) 代理人 | 100088683 弁理士 中村 誠 |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複数種類の血球試薬の識別標識方法

(57) 【要約】

【課題】血球試薬を、試薬としての性質を損なうことなく簡便に識別標識する方法を提供すること。

【解決手段】 n 種類 (n は2以上の整数)の血球試薬を識別標識する方法であって、血球試薬に添加した際に互いの血球試薬を肉眼で識別可能にする n 種類の色素または ($n - 1$)種類の色素を、 n 種類の血球試薬のそれぞれまたは ($n - 1$)種類の血球試薬のそれぞれに対応づけて添加する工程を含む、方法。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

n 種類 (n は 2 以上の整数) の血球試薬を識別標識する方法であって、
血球試薬に添加した際に互いの血球試薬を肉眼で識別可能にする n 種類の色素または (n - 1) 種類の色素を、 n 種類の血球試薬のそれぞれまたは (n - 1) 種類の血球試薬のそれぞれに対応づけて添加する工程を含む、方法。

【請求項 2】

前記色素が、水溶性色素である、請求項 1 に記載の血球試薬の識別標識方法。

【請求項 3】

前記色素が、蛍光色素である、請求項 1 に記載の血球試薬の識別標識方法。

10

【請求項 4】

前記色素が、顔料である、請求項 1 に記載の血球試薬の識別標識方法。

【請求項 5】

前記色素が、青～緑系の色を有する、請求項 2 または 4 に記載の血球試薬の識別標識方法。

【請求項 6】

前記色素が、 OD_{405nm} (405 nm における吸光度) = 0.5 以下の濃度で血球試薬に添加されたときに、目視で色素添加を確認することが可能な色素である、請求項 5 に記載の血球試薬の識別標識方法。

【請求項 7】

前記血球が赤血球である、請求項 1 に記載の血球試薬の識別標識方法。

20

【請求項 8】

識別標識された n 種類 (n は 2 以上の整数) の血球試薬の調製方法であって、
血球試薬に添加した際に互いの血球試薬を肉眼で識別可能にする n 種類の色素または (n - 1) 種類の色素を、 n 種類の血球試薬のそれぞれまたは (n - 1) 種類の血球試薬のそれぞれに対応づけて添加する工程を含む、方法。

【請求項 9】

請求項 8 に記載の方法を用いて調製された血球試薬を用いて血液検査を行う工程を含む、血液検査方法。

【発明の詳細な説明】

30

【技術分野】

【0001】

本発明は、複数種類の血球試薬の識別標識方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液型検査、抗体スクリーニング検査等の血液検査において、血球試薬は検査試薬として不可欠なものであり、複数種類の血球試薬が使用される。たとえば、A B O 血液型のウラ試験では、A 型赤血球試薬と B 型赤血球試薬が必ずペアで使用される。また、通常、抗体スクリーニングでは、3 種類の O 型赤血球が使用される。

【0003】

試薬赤血球は、献血者等から集めて抗原性を調べた上で、適当な保存液に浮遊させて製品化される。しかし、異なる種類の血球試薬は、外見上は何の違いもなく、肉眼で識別することはできず、識別は試薬のボトルに書かれているラベルによってなされる。これら複数種類の血球試薬を、それぞれ試験管等の容器に分取して試験を行うが、ここで検査者は、一般に、試験管を油性インキ等でマーキングして複数種類の血球試薬を識別する。この際に、血球試薬を試験管に入れ間違えると、逆の結果を導き出すことになり、誤判定につながる。また、近年は、自動分析機を使用することが多くなったが、血球試薬が所定のサンプルに分注されたかどうかを確認する手段はない。

40

【0004】

赤血球試薬を標識した従来例として、赤血球自体に蛍光色素を取り込ませて、赤血球試

50

薬を蛍光標識し、FCM法で使用することが知られている（非特許文献1）。しかし、血球を直接蛍光標識することは、細胞にダメージを与え、血球試薬の保存性を損なったり、血球上の抗原を失活させてしまったりする恐れがある。また、赤血球自体の標識は、標識/洗浄等の作業が必要で、高価になるという問題を有する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Sigma-Aldrich, PKH26 Red fluorescent Cell Linker kit, Technical Bulletin

【発明の概要】

10

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

上記事情に鑑み、本発明は、血球試薬を、試薬としての性質を損なうことなく簡便に識別標識する方法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】

【0007】

本発明者は、赤血球自体に色素を結合させた従来例（非特許文献1）では赤血球の試薬としての性質を損なうのに対し、色素を赤血球懸濁液に添加して赤血球試薬を標識した場合、赤血球の試薬としての性質を損なうことなく、赤血球試薬を、肉眼で識別可能なように標識できることを見出し、本発明を完成させるに至った（後述の実施例参照）。

20

【0008】

すなわち、本発明は、以下の手段を提供する。

【0009】

[1] n種類（nは2以上の整数）の血球試薬を識別標識する方法であって、血球試薬に添加した際に互いの血球試薬を肉眼で識別可能にするn種類の色素または（n-1）種類の色素を、n種類の血球試薬のそれぞれまたは（n-1）種類の血球試薬のそれぞれに対応づけて添加する工程を含む、方法。

【0010】

[2] 前記色素が、水溶性色素である、上記[1]に記載の血球試薬の識別標識方法。

30

【0011】

[3] 前記色素が、蛍光色素である、上記[1]に記載の血球試薬の識別標識方法。

【0012】

[4] 前記色素が、顔料である、上記[1]に記載の血球試薬の識別標識方法。

【0013】

[5] 前記色素が、青～緑系の色を有する、上記[2]または[4]に記載の血球試薬の識別標識方法。

【0014】

[6] 前記色素が、 OD_{405nm} （405nmにおける吸光度）=0.5以下の濃度で血球試薬に添加されたときに、目視で色素添加を確認することが可能な色素である、上記[5]に記載の血球試薬の識別標識方法。

40

【0015】

[7] 前記血球が赤血球である、上記[1]に記載の血球試薬の識別標識方法。

【0016】

[8] 識別標識されたn種類（nは2以上の整数）の血球試薬の調製方法であって、血球試薬に添加した際に互いの血球試薬を肉眼で識別可能にするn種類の色素または（n-1）種類の色素を、n種類の血球試薬のそれぞれまたは（n-1）種類の血球試薬のそれぞれに対応づけて添加する工程を含む、方法。

【0017】

[9] 上記[8]に記載の方法を用いて調製された血球試薬を用いて血液検査を行う工程を含む、血液検査方法。

50

【発明の効果】

【0018】

本発明によれば、血球試薬を、試薬としての性質を損なうことなく簡便な手法により識別標識することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0019】

【図1】水溶性色素を用いて赤血球試薬を識別標識した結果を示す写真（実施例1）。

【図2】エバンスブルーの吸収曲線を示す図。

【図3】ヘモグロビンの吸収曲線を示す図。

【図4】蛍光色素を用いて赤血球試薬を識別標識した結果を示す写真（実施例2）。

10

【発明を実施するための形態】

【0020】

以下、本発明について詳細に説明する。なお、以下の記載は、本発明を説明するためのものであって、本発明を限定するためのものではない。

【0021】

本発明は、一つの側面によれば、

n種類（nは2以上の整数）の血球試薬を識別標識する方法であって、

血球試薬に添加した際に互いの血球試薬を肉眼で識別可能にするn種類の色素または（n-1）種類の色素を、n種類の血球試薬のそれぞれまたは（n-1）種類の血球試薬のそれぞれに対応づけて添加する工程を含む、方法である。

20

【0022】

本発明の方法は、血液検査で使用される複数種類の血球試薬を肉眼で区別可能なように、検査前に識別標識しておく際に使用することができる。たとえばABO血液型のウラ試験で使用されるA型赤血球試薬とB型赤血球試薬を識別標識するため、および抗体スクリーニング検査で使用される複数種類のO型赤血球試薬を識別標識するために使用することができる。

【0023】

本発明において、血球試薬は、血液検査で使用される任意の血球試薬を意味し、具体的には赤血球試薬等を意味する。

【0024】

本発明において、色素は、それを血球試薬（血球懸濁液）に添加することにより、血球試薬を色の違いまたは蛍光の有無により肉眼で識別可能なものであれば、任意の色素を使用することができる。たとえば、水溶性色素、蛍光色素、顔料等を使用することができる。ここで、識別は、色素の種類に応じて、自然光の下で行われてもよいし、蛍光を放射させるための特定の波長の光（たとえばブラックライト、特定波長の光源）の照射下で行われてもよい。

30

【0025】

本発明において、n種類（nは2以上の整数）の血球試薬を互いに識別標識するためには、n種類の色素または（n-1）種類の色素が使用される。すなわち、本発明では、n種類の色素を用いて、n種類の血球試薬をそれぞれ標識して血球試薬を識別標識してもよいし、（n-1）種類の色素を用いて、（n-1）種類の血球試薬をそれぞれ標識して、残りの1種類の血球試薬を標識しないで血球試薬を識別標識してもよい。本発明においてnは、血液検査で使用される血球の種類の数に相当し、一般的には2～5であり、たとえば2または3である。

40

【0026】

たとえば、2種類の血球試薬を識別標識する場合、2種類の血球試薬のそれぞれに異なる色素を添加して識別標識してもよいし、何れか一方の血球試薬の懸濁液のみに色素を添加して、他方の血球試薬に色素を添加しないで識別標識してもよい。

【0027】

n種類または（n-1）種類の色素は、異なるタイプの色素を組合せて使用してもよく

50

、たとえば水溶性色素と蛍光色素を組み合わせ使用してもよく、たとえば2種類の血球試薬のうち、一方を水溶性色素で標識し、他方を蛍光色素で標識してもよい。

【0028】

水溶性色素としては、たとえばブリリアントブルーFCF、エバンスブルー、ブリリアントグリーン等が挙げられる。赤色の赤血球懸濁液を識別標識する場合には、水溶性色素として青～緑系の色を有するものが好ましく使用され、たとえばブリリアントブルーFCF、エバンスブルーを使用することができる。

【0029】

蛍光色素としては、たとえばウラニン、リボフラビン、ウンベリフェロン、FITC、ローダミン等が挙げられる。

10

【0030】

顔料としては、たとえば青色顔料、墨汁等が挙げられる。赤色の赤血球懸濁液を識別標識する場合には、顔料として青～緑系の色を有する任意の顔料を使用することができる。

【0031】

赤血球試薬の劣化度は溶血の程度で確認することが多いため、水溶性色素および顔料の選択の際には、色素添加により溶血を確認しにくくなることをないように考慮することが望ましい。すなわち、水溶性色素および顔料としては、405nmにおける吸光度(OD)が約0.5以下になるような濃度で血球試薬に添加したときに、上述の方法で色素添加の有無が確認できる色素を使用することが好ましい。従って、405nm近辺に極大吸収をもつオレンジや赤系統の色素を使用することは、溶血の確認を妨害するため好ましくない。

20

【0032】

本発明において、「血球試薬に添加した際に互いの血球試薬を肉眼で識別可能にする2種類の色素の組み合わせ」は、たとえば、エバンスブルーとブリリアントグリーンの組み合わせ、または青～緑系の水溶性色素と蛍光色素の組み合わせが挙げられ、3種類の色素の組合せは、たとえば、エバンスブルーとブリリアントグリーンとブリリアントブルーFCFの組み合わせ、または青～緑系の水溶性色素と蛍光色素と黒色顔料(墨汁)の組み合わせが挙げられる。ただし、上述の2～3種類の水溶性色素の組み合わせを使用した場合、これらを、赤血球が浮遊している状態の赤血球懸濁液に添加すると、いずれも紫のような色になり、互いを明確に識別することは難しい。この場合、検査前もしくは検査後の赤血球と上清が分離している状態のときに赤血球試薬の識別を行うことにより、明確に識別することが可能である。なお、このような識別の困難性は、上述のとおり水溶性色素と蛍光色素を組合せて使用したり、あるいは水溶性色素と蛍光色素と顔料を組合せて使用したりすることにより、回避することができる。

30

【0033】

血球試薬への色素の添加濃度は、添加により色または蛍光が血球試薬の懸濁液に付与される濃度であればよく、たとえばエバンスブルーを使用する場合、最終濃度で、3%血球試薬に対し、最大0.002%(v/v)添加できる。目視での視認性を確認するのに好ましいエバンスブルーの濃度は0.0005%(v/v)以上0.002%(v/v)以下である(後述の実施例1参照)。

【0034】

色素の添加濃度の上限についても、色素添加で溶血を確認しにくくなることをないように考慮することが望ましい。溶血は、OD405nmが0.5を超えると、着色を目視で確認することが可能であり、溶血の確認のためには、405nmにおける色素由来の吸光度が高くなると好ましくないことから、色素の添加濃度(最終濃度)の上限は、405nmにおける吸光度(OD)=0.5とすることが好ましい。

40

【0035】

本発明の方法に従って血球試薬を標識した場合、血球の試薬としての性質を損なうことなく、特定種類の血球試薬を、他の血球試薬と肉眼で識別可能なように標識することが可能である(後述の実施例3参照)。

【0036】

50

上記方法により識別標識された複数種類の血球試薬を用いて、複数種類の血球試薬を使用する血液検査を行うことが可能である。たとえば、A B O血液型のウラ試験、抗体スクリーニング検査、抗体同定検査等を行うことが可能である。

【0037】

本発明の方法により識別標識された血球試薬を血液検査に使用した場合、その標識により、複数の血球試薬を容易に区別することが可能である。たとえば、血液検査の際に誤った血球試薬を試験管に入れてしまっても容易にみつけることが可能であり、自動分析機で血球試薬が所定のサンプルに分注されたかどうかを確認することも可能である。

【実施例】

【0038】

実施例1：水溶性色素を用いた例

本実施例では、青～緑系の水溶性色素を用いて赤血球試薬を識別標識した。

【0039】

血球試薬としては、アファーマジエン(Ortho Clinical Diagnostics)を使用した。

【0040】

エバンスブルー(和光純薬)、プリリアントブルーFCF(和光純薬)、プリリアントグリーン(和光純薬)を1%(v/v)濃度水溶液とした。これらを更に希釈して分光光度計で405nmにおけるODを測定し、ODが0.5になる濃度を算出した。ODが0.5になる色素の濃度は以下のとおりであった。

【0041】

エバンスブルー 0.002%(v/v)
 プリリアントブルーFCF 0.00125%(v/v)
 プリリアントグリーン 0.001%(v/v)。

【0042】

各色素の最終濃度が上記濃度になるように3%赤血球浮遊液に各色素を添加した。

【0043】

その結果を図1に示す。図1は、左から順に、「色素非添加」、「エバンスブルー0.002%添加」、「プリリアントブルーFCF 0.00125%添加」、「プリリアントグリーン0.001%添加」を示す。

【0044】

いずれの色素を添加した赤血球試薬も「色素非添加」の赤血球試薬との識別が可能であった。すなわち、いずれの色素も、 OD_{405nm} (405nmにおける吸光度)=0.5以下の濃度で赤血球試薬に添加されたときに、目視で色素添加を確認することが可能な色素であった。特にエバンスブルーを添加した赤血球試薬とプリリアントブルーFCFを添加した赤血球試薬は、「色素非添加」の赤血球試薬と明瞭に識別することが可能であった。

【0045】

更にエバンスブルー濃度を変えて3%血球試薬に添加し、これら赤血球試薬が「色素非添加」の赤血球試薬と肉眼で明確に識別可能であるか確認した。その結果を以下の表に示す。識別の対照として、色素を添加しない血球試薬を使用した。

【表1】

| エバンスブルー濃度 (v/v%) | 0.002 | 0.001 | 0.0005 | 0.00025 | 0.000125 | 0 (対照) |
|------------------|-------|-------|--------|---------|----------|--------|
| 識別結果 | 明確 | 明確 | 明確 | やや不明確 | 不明確 | |

【0046】

また、エバンスブルー(濃度0.0015%)の吸収曲線を図2に示し、血液の溶血物(ヘモグロビン)の吸収曲線を図3に示す。

【0047】

これら結果は、赤血球試薬の溶血を確認することを保証するために、エバンスブルーの添加濃度（最終濃度）は0.002%（v/v）以下であることが好ましいこと、並びに色素非添加の赤血球試薬との識別を可能にするために、エバンスブルーの添加濃度（最終濃度）は、0.0005%（v/v）以上であることが好ましいことを示す。また、図2および3は、少なくとも0.0015%（v/v）濃度のエバンスブルーは、赤血球試薬の溶血の確認を妨害しないことを示す。

【0048】

実施例2：蛍光色素を用いた例

本実施例では、蛍光色素を用いて赤血球試薬を識別標識した。

【0049】

血球試薬としては、アフーマジエン（Ortho Clinical Diagnostics）を使用した。

【0050】

蛍光色素としてウラニン（和光純薬）を、0.002 g/ml以下の種々の濃度（表2および3に記載の濃度）になるように3%血球浮遊液に添加した。識別の対照として、色素を添加しない血球試薬を使用した。

【0051】

ウラニンを添加した血球試薬と添加しなかった血球試薬とを一般照明下で識別した結果を表2に示す。これらサンプルの写真を図4に示す。図4は左から順に、0.002 g/ml、0.001 g/ml、0.0005 g/ml、0.0025 g/ml、0.00125 g/mlの濃度のウラニンを添加したサンプル、およびウラニンを添加しなかったサンプルを示す。また、同じサンプルをブラックライトで暗室内で識別した結果を表3に示す。

【表2】

| 濃度 (g/ml) | 0.002 | 0.001 | 0.0005 | 0.0025 | 0.00125 |
|-----------|-------|-------|--------|--------|---------|
| 結果 | ○ | ○ | ○ | × | × |

○…識別可能、×…識別不能

【0052】

【表3】

| 濃度 (g/ml) | 0.002 | 0.001 | 0.0005 | 0.0025 | 0.00125 |
|-----------|-------|-------|--------|--------|---------|
| 結果 | ○ | ○ | ○ | ○ | ○ |

○…識別可能、×…識別不能

【0053】

表2および図4の結果は、所定の濃度以上のウラニンを添加した血球試薬と非添加の血球試薬とが肉眼で識別され得ることを示し、表3の結果は、ブラックライトの下で識別した場合、低濃度のウラニンも識別のために使用可能であることを示す。

【0054】

実施例3：赤血球懸濁液に色素を添加した例（本発明の例）と赤血球自体を色素標識した例（従来例）の間の試薬の劣化度の対比

非特許文献1に示す方法で血球試薬（アフーマジエン）に蛍光色素を導入したものと導入しなかったものを赤血球保存液（アルセパー液・自家調整）に1%になるように浮遊したものを冷蔵保存して、時々攪拌して溶血の程度を確認した。蛍光色素の赤血球への導入は、非特許文献1に記載されるとおり、PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Kitを用いて行った。その結果を表4に示す。

【0055】

蛍光色素を導入したものでは、導入しなかったものに比べて上清への溶血が早く観察された。このことから、蛍光色素導入したものは導入しないものに比べて保存性が劣ると考えられた。これは、蛍光色素導入操作でアルコール等を添加するため、脂質膜の安定性が

10

20

30

40

50

減弱したものと考えられる。

【 0 0 5 6 】

一方、本発明の方法により、血球試薬（アフーマジェン）にプリリアントブルーFCFを0.0004%濃度になるように添加したものと非添加のものを調製し、同様に溶血の程度を確認した。色素添加すると目視による正確な溶血の確認が困難なため、OD405nmで確認した。その結果を表5に示す。色素非添加の場合に対する、色素添加による溶血の上昇は見られなかった。

【表4】

| | 1週 | 2週 | 3週 | 4週 |
|-------------|------|-------|------|------|
| 蛍光色素導入 | やや赤い | 赤みが強い | 赤い | 強く赤い |
| 対照 (非導入) | 透明 | 透明 | やや赤い | 赤い |

10

【 0 0 5 7 】

【表5】

| | 0週 | 1週 | 2週 | 3週 |
|-------------|----|------|------|------|
| 色素添加 | 0 | 0.01 | 0.1 | 0.15 |
| 対照 (非添加) | 0 | 0.02 | 0.05 | 0.10 |

20

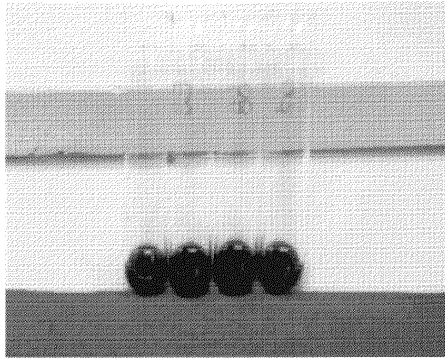
0週のOD405nmをゼロとした。

【 0 0 5 8 】

上記結果は、赤血球自体に色素を結合させた従来例では、色素導入により赤血球の試薬としての性質が劣化するのに対し、本発明に従って赤血球懸濁液に色素を添加した例では、赤血球の試薬としての性質を標識操作により劣化させることなく、赤血球試薬を識別標識できることを示す。

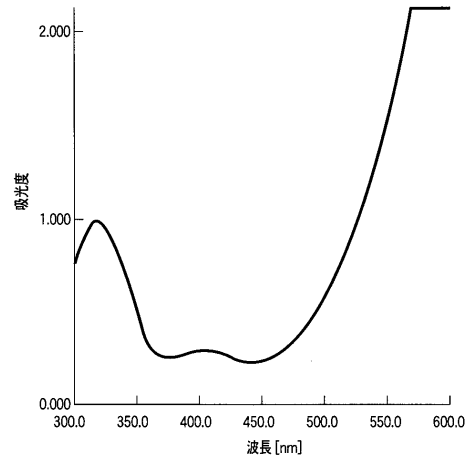
【 図 1 】

図 1



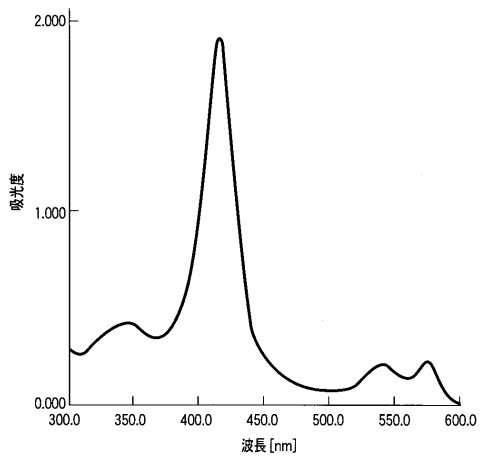
【 図 2 】

図 2



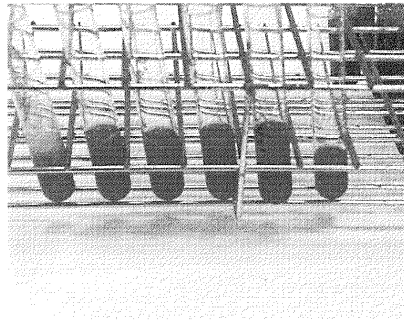
【 図 3 】

図 3



【 図 4 】

図 4



フロントページの続き

- (74)代理人 100109830
弁理士 福原 淑弘
- (74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
- (74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100101812
弁理士 勝村 紘
- (74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290
弁理士 竹内 将訓
- (74)代理人 100127144
弁理士 市原 卓三
- (74)代理人 100141933
弁理士 山下 元
- (72)発明者 玉井 豊廣
東京都渋谷区幡ヶ谷 2 丁目 4 3 番 2 号 オリパス株式会社内
F ターム(参考) 2G045 AA01 AA09 BB24 BB25 CA25 FA18