



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103076311 B

(45) 授权公告日 2016.07.06

(21) 申请号 201210411029. X

(22) 申请日 2012.10.25

(30) 优先权数据

2011-234176 2011.10.25 JP

(73) 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

(72) 发明人 河野麻理 高木由里

(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

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 21/47(2006.01)

(56) 对比文件

CN 102016577 A, 2011.04.13,

US 6004816 A, 1999.12.21,

CN 101988082 A, 2011.03.23,

Deng G. Hafeman. Neutrophil activation

monitored by flow cytometry: stimulation by
phorbol diester is an all-or-none event.
《Science》. 1982, 673-675.

David A. Bass. Flow Cytometric studies of
oxidative product formation by neutrophils
a graded response to membrane stimulation.
《Journal of Immunology》. 1983, 第 130 卷 (第
4 期), 1910-1917.

审查员 蒋超

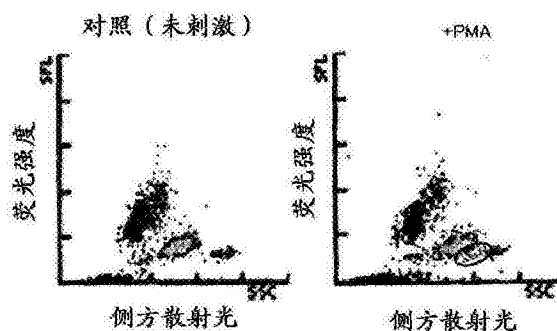
权利要求书2页 说明书14页 附图8页

(54) 发明名称

活化嗜中性粒细胞的检测方法及装置

(57) 摘要

活化嗜中性粒细胞的检测方法及装置为了提
供使正常白细胞的分类及活化嗜中性粒细胞的检
测成为可能的活化嗜中性粒细胞的检测方法,制
备活体样品中的红细胞被溶血,白细胞的核酸被
核酸染色性的荧光染料染色的测定样品,向此样
品照射光,基于测定从该样品中的粒子发生的散
射光强度及荧光强度而得到的散射光强度及荧光
强度,将上述活体样品中的白细胞分类为至少含
嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团,
将在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的
集团之间存在的粒子检测为活化嗜中性粒细胞。



1. 血液中的活化嗜中性粒细胞的检测方法,其包括:

(a)制备测定样品,其中所述血液中的红细胞被溶血,白细胞的核酸被核酸染色性的荧光染料染色,

(b)向制备的测定样品照射光,测定从该样品中的粒子发生的散射光强度及荧光强度,

(c)基于取得的散射光强度及荧光强度,将上述测定样品中的白细胞分类为至少含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团,

(d)将在上述含嗜中性粒细胞的集团和上述含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子检测为活化嗜中性粒细胞,

其中在上述(d)中,将荧光强度在上述含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在上述含嗜中性粒细胞的集团和上述含嗜酸性粒细胞的集团之间的粒子检测为上述活化嗜中性粒细胞。

2. 权利要求1所述的方法,其中

上述含嗜中性粒细胞的集团再含嗜碱性粒细胞。

3. 权利要求1所述的方法,其中

上述活化嗜中性粒细胞在细胞质中发生空胞变性。

4. 权利要求1所述的方法,其中

对在上述含嗜中性粒细胞的集团和上述含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子进行计数。

5. 权利要求4所述的方法,其中

在上述(d)中,当上述计数的值比指定的值更大时,将上述粒子检测为活化嗜中性粒细胞。

6. 权利要求1所述的方法,其中

上述测定样品中的红细胞被表面活性剂溶血。

7. 权利要求6所述的方法,其中

上述表面活性剂是选自下列的至少一种:非离子性表面活性剂及阳离子性表面活性剂。

8. 权利要求1所述的方法,其中

上述散射光强度是侧方散射光强度。

9. 血液中的活化嗜中性粒细胞的检测装置,其包括:

将下列物质混合而制备测定样品的样品制备部:

血液,

用于对核酸进行染色的荧光染料,以及

含有用于对红细胞进行溶血,给白细胞的细胞膜可透过上述荧光染料的程度的损伤的表面活性剂的溶血剂;

向制备的测定样品照射光,测定从该样品中的粒子发生的散射光强度及荧光强度的测定部;及

用于实施操作的控制部,其包含:

(a)基于取得的散射光强度及荧光强度,将上述测定样品中的白细胞分类为至少含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团;及

(b)将在上述含嗜中性粒细胞的集团和上述含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子检测为活化嗜中性粒细胞，

其中在上述(b)中，将荧光强度在上述含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在上述含嗜中性粒细胞的集团和上述含嗜酸性粒细胞的集团之间的粒子检测为上述活化嗜中性粒细胞。

活化嗜中性粒细胞的检测方法及装置

【技术领域】

[0001] 本发明涉及检测活体样品中的活化嗜中性粒细胞的方法及装置。

【背景技术】

[0002] 正常的白细胞,通常被分类为:包括嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞的颗粒细胞、以及淋巴细胞及单核细胞。在它们之中,嗜中性粒细胞占白细胞的50~60%,在对细菌、真菌等的病原微生物的活体防御中发挥重要的作用。例如,由细菌感染等而在活体中侵入异物之时,嗜中性粒细胞由于由活体的炎症反应等所致的刺激而被活化,迁移到感染部位而吞食异物。被嗜中性粒细胞吞食的异物被作为在嗜中性粒细胞内产生的各种的分解酶及强力的毒性物质的活性氧种(ROS)而被杀菌。

[0003] 在另一方面,由刺激而活化的嗜中性粒细胞(以下,也称之为“活化嗜中性粒细胞”)有在活体内伤害正常组织的情况。例如,由活化嗜中性粒细胞产生的过量的ROS已知在缺血再灌注障碍、自身免疫疾病等的炎症反应中,伤害活体的自身组织。由活化嗜中性粒细胞产生的ROS已知与急性呼吸窘迫综合征、溃疡性大肠炎、急性胃粘液膜病变等的病变形成相关。输血关联急性肺障碍也已知与活化嗜中性粒细胞相关。

[0004] 如此,由于活化嗜中性粒细胞与各种的疾病及障碍相关,在血液检查中,不仅是白细胞的分类计数,也通过检测活化嗜中性粒细胞,可得对于疾病的诊断、病态的掌握、治疗监测等极其有用的信息。

[0005] 近年,在临床检查的领域中,待测样品中的白细胞的分类计数通过应用流式细胞术的原理的自动血细胞计数装置进行。另外,用于通过那样的装置的测定的血细胞分类用试剂也在市售。使用此试剂将待测样品用自动血细胞计数装置测定,则检测的各血细胞的信号在各散点图上的指定的区域出现。

[0006] 使用如上述一样的试剂对白细胞进行分类计数的方法在所述技术中有所耳闻。例如,在日本专利第4248017号公报中公开了使用包含将RNA特异性地染色的染色液,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组合的试剂盒对异常白细胞和正常白细胞二者进行分类计数的方法。另外,在美国专利申请第2009/0023129号及美国专利申请第2011/0027788号中公开了使用含有含指定的荧光染料的染色液和含阳离子性表面活性剂及/或非离子性表面活性剂的溶血剂的试剂而将白细胞分类为4种或5种的计数方法。但是,这些的专利文献之任何中均未公开对活化嗜中性粒细胞的检测。

[0007] 作为测定可含活化嗜中性粒细胞的待测样品的例,可举出J.Linssen等的文献(J.Linssen等,Cytometry Part B(ClinicalCytometry),74B,295-309(2008))。J.Linssen等报告,以由刺激物质活化处理的全血作为待测样品而在自动血细胞计数装置XE-2100(Sysmex株式会社制)进行测定,则在白细胞分类—计数通道(DIFF-channel)中,作为嗜中性粒细胞分类的集团的平均侧方散射光强度(NEUT-X)及平均荧光强度(NEUT-Y)比未处理的待测样品降低。

[0008] 【发明概述】

[0009] 本发明的范围仅由随附的权利要求定义,且不得以任何方式受此发明概述部分的影响。

[0010] 本发明的目的是提供可分类计数正常白细胞,并且可检测活化嗜中性粒细胞的活化嗜中性粒细胞的检测方法及装置。

[0011] 本发明人,对被活化刺激,并且产生活性氧种的嗜中性粒细胞,在使用自动血细胞计数装置的测定中,检查了其信号如何变化。结果,令人惊讶地发现,与上述的J.Linssen等的报告不同,产生活性氧种的嗜中性粒细胞在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在,再者,其荧光强度在通常的嗜中性粒细胞以下、并且散射光强度相比通常的嗜中性粒细胞更高,即散射光强度在通常的嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞之间,从而完成本发明。

[0012] 从而,本发明提供以下的活化嗜中性粒细胞的检测方法及检测装置。

[0013] (1)活化嗜中性粒细胞的检测方法,其包括:

[0014] (a)制备活体样品中的红细胞被溶血,白细胞的核酸被核酸染色性的荧光染料染色的测定样品,

[0015] (b)向制备的测定样品照射光,测定从该样品中的粒子发生的散射光强度及荧光强度,

[0016] (c)基于取得的散射光强度及荧光强度,将活体样品中的白细胞分类为至少含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团,

[0017] (d)将在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子检测为活化嗜中性粒细胞。

[0018] (2)(1)所述的方法,其中

[0019] 在(d)中,将荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间的粒子检测为活化嗜中性粒细胞。

[0020] (3)(1)或(2)所述的方法,其中

[0021] 含嗜中性粒细胞的集团再含嗜碱性粒细胞。

[0022] (4)(1)或(2)所述的方法,其中

[0023] 活化嗜中性粒细胞在细胞质中发生空胞变性。

[0024] (5)(1)或(2)所述的方法,其中

[0025] 在(d)中,对在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子进行计数。

[0026] (6)(5)所述的方法,其中

[0027] 在(d)中,当计数的值比指定的值更大时,将粒子检测为活化嗜中性粒细胞。

[0028] (7)(1)或(2)所述的方法,其中

[0029] 测定样品中的红细胞被表面活性剂溶血。

[0030] (8)(7)所述的方法,其中

[0031] 表面活性剂是选自下列的至少一种:非离子性表面活性剂及阳离子性表面活性剂。

[0032] (9)(1)或(2)所述的方法,其中

[0033] 散射光强度是侧方散射光强度。

[0034] (10)活化嗜中性粒细胞的检测装置,其包括:

[0035] 将活体样品,用于对核酸进行染色的荧光染料,以及含有用于对红细胞进行溶血,给白细胞的细胞膜可透过荧光染料的程度的损伤的表面活性剂的溶血剂混合而制备测定样品的样品制备部;

[0036] 向制备的测定样品照射光,测定从该样品中的粒子发生的散射光强度及荧光强度的测定部;及

[0037] 用于实施操作的控制部,其包含:

[0038] (a)基于取得的散射光强度及荧光强度,将活体样品中的白细胞分类为至少含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团;及

[0039] (b)将在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子检测为活化嗜中性粒细胞。

[0040] 由上述的(1)及(10),使对活体样品中的正常白细胞进行分类计数,并且检测活化嗜中性粒细胞变得可能。另外,由上述的(2),可更确实地检测活化嗜中性粒细胞。再者,由上述的(5)及(6),可防活化嗜中性粒细胞的误检测。再者,由上述的(7)及(8),由于红细胞被确实地溶血,可以更好的精度进行正常白细胞的分类系数及活化嗜中性粒细胞的检测。

【附图说明】

[0041] 图1是将正常的白细胞由流式细胞仪测定之时的散点图。

[0042] 图2是示本发明的测定装置之外观的图。

[0043] 图3是测定部的功能框图。

[0044] 图4是检测部的构成图。

[0045] 图5是示将测定样品用检测部测定的流的图。

[0046] 图6是数据处理部的功能框图。

[0047] 图7是数据处理部的处理的流程图。

[0048] 图8是示由数据处理部表示的结果表示画面之一例的图。

[0049] 图9是示由数据处理部表示的结果表示画面的变形例的图。

[0050] 图10是由实施例1的测定得到的散点图。

[0051] 图11是示参考例1的结果的显微镜照片。

[0052] 图12是示参考例2的结果的电子显微镜照片。

[0053] 图13是由实施例2的测定得到的散点图。

[0054] 【发明详述】

[0055] 以下参照附图描述本发明的优选的实施方式。

[0056] 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,可举出例如,从哺乳动物、优选人采集的血液、骨髓液、尿、成分输血等采集的样品等。活体样品为有含活化嗜中性粒细胞的可能性的样品也可。

[0057] 在本说明书中,“活化嗜中性粒细胞”所指的用语是指由刺激活化的嗜中性粒细胞,作为示与正常的白细胞中含的通常的(未刺激的)嗜中性粒细胞可区别的血细胞的词语被使用。

[0058] 在本发明的实施方式中,作为活化嗜中性粒细胞,可举出例如,产生活性氧种

(ROS)的嗜中性粒细胞。在所述技术中,作为由活化嗜中性粒细胞产生的ROS,已知超氧化物、羟基自由基、过氧化氢、单态氧等。

[0059] 另外,已知在吞食异物的活化嗜中性粒细胞中,异物进入吞食空胞,然后,含分解酶及ROS的颗粒融合到此空胞而形成吞噬溶酶体,在形态学观察中,确认在活化嗜中性粒细胞的细胞质空胞变性。从而,在本发明的实施方式中,在细胞质中发生空胞变性的嗜中性粒细胞也包括在活化嗜中性粒细胞中。

[0060] 【活化嗜中性粒细胞的检测方法】

[0061] 接下来,说明本发明的活化嗜中性粒细胞的检测方法(以下,也简单称之为“检测方法”)。

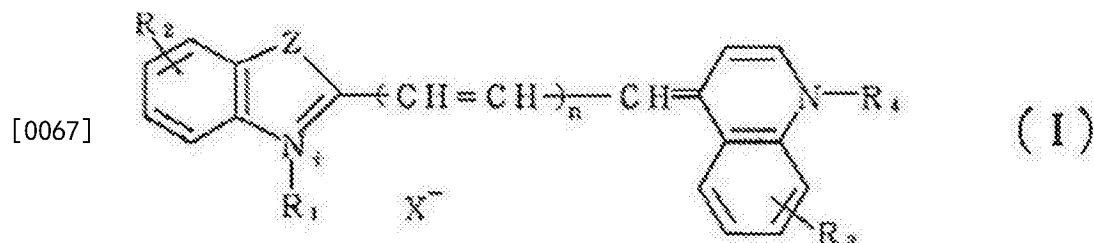
[0062] 在本发明的检测方法中,首先,制备活体样品中的红细胞被溶血,白细胞的核酸被核酸染色性的荧光染料染色的测定样品(制备步骤)。具体而言,将活体样品,用于对核酸进行染色的荧光染料,以及含有用于对红细胞进行溶血,给白细胞的细胞膜可透过荧光染料的程度的损伤的表面活性剂的溶血剂混合而制备测定样品。

[0063] 在此制备步骤中,由上述的溶血剂的作用而导致活体样品中含的红细胞被快速溶血,并且给白细胞的细胞膜可透过荧光染料的程度的损伤。然后,通过上述的荧光染料进入受损伤的白细胞的细胞膜,白细胞的核酸被染色。活体样品中存在活化嗜中性粒细胞时,活化嗜中性粒细胞的核酸也被染色。

[0064] 【荧光染料】

[0065] 本发明的检测方法中使用的荧光染料只要是可染色核酸的荧光染料,就不特别限定,可根据从光源照射来的光的波长而适宜选择。作为那样的荧光染料,可举出例如,碘化丙锭、溴化乙锭、乙锭-吡啶异源二聚体、二叠氮化乙锭、乙锭同源二聚体-1、乙锭同源二聚体-2、单叠氮化乙锭、三亚甲基双[[3-[[4-[(3-甲基苯并噻唑-3-鎓)-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-(三甲基铵基)丙基]氢喹啉鎓·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-鎓)-2-基]-2-亚丙基]-1,4-二氢喹啉-1-基]丙基]-1,3-丙烷二铵]四碘化物(TOTO-3)、或者2-[3-[1-[3-(三甲基铵基)丙基]-1,4-二氢喹啉]-4-亚基]-1-丙烯基]-3-甲基苯并噻唑-3-鎓·二碘化物(TO-PRO-3)及以下的式(I)所表示的荧光染料。在它们之中,也优选式(I)所表示的荧光染料。

[0066] 【化1】



[0068] 上述的式(I)中,R₁及R₄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、或者有取代基也可的苄基;R₂及R₃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。

[0069] 在本发明的实施方式中,烷基是直链状或支链状之任何也可。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的烷基之时,另一方面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。

[0070] 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。

[0071] 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。另外,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。

[0072] 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。

[0073] 在本发明的实施方式中,制备步骤中使用的荧光染料是1种也可,2种以上也可。

[0074] 在本发明的实施方式中,用于对核酸进行染色的荧光染料为溶液的形态也可。用于溶解荧光染料的溶剂不特别限定,但可举出例如,水、有机溶剂及这些的混合物。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,因此溶解在有机溶剂中是优选的。

[0075] 在制备步骤中,在使用荧光染料的溶液之时,荧光染料的浓度可适宜设定,但通常是0.01~100 $\mu g/L$ 、优选是0.1~10 $\mu g/L$ 。例如,作为荧光染料使用上述的式(I)所表示的荧光染料之时,在该溶液中荧光染料的浓度优选是0.2~0.6 $\mu g/L$,更优选是0.3~0.5 $\mu g/L$ 。

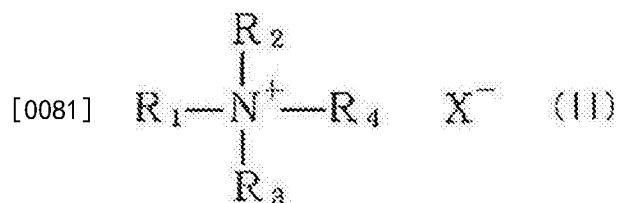
[0076] 在本发明的实施方式中,作为荧光染料,使用市售的白细胞测定用的染色试剂也可。作为那样的染色试剂,可举出例如ストマトライザー4DS(Sysmex株式会社)。ストマトライザー4DS是含上述的式(I)所示的荧光染料的染色试剂。

[0077] 【溶血剂】

[0078] 本发明的检测方法中使用的溶血剂含用于对红细胞进行溶血,给白细胞的细胞膜可透过上述的荧光染料的程度的损伤的表面活性剂。作为那样的表面活性剂,可举出阳离子性表面活性剂及非离子性表面活性剂。

[0079] 在本发明的实施方式中,作为阳离子性表面活性剂,可举出季铵盐型表面活性剂及吡啶鎓盐型表面活性剂。作为季铵盐型表面活性剂,例如以下的式(II)所表示的,全碳原子数是9~30的表面活性剂被适宜地使用。

[0080] 【化2】



[0082] 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 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^- 是卤素原子。

[0083] 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。

[0084] 作为吡啶鎓盐型表面活性剂,例如以下的式(III)所表示的表面活性剂被适宜地使用。

[0085] 【化3】



[0087] 上述的式(III)中, R₁是碳原子数6~18的烷基或烯基; X⁻是卤素原子。

[0088] 上述的式(III)中, 作为R₁, 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。作为更具具体性的R₁, 可举出辛基、癸基及十二烷基。

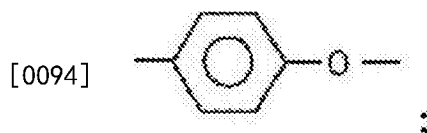
[0089] 在本发明的实施方式中, 作为非离子性表面活性剂, 以下的式(VI)所表示的聚氧乙烯系非离子表面活性剂被适宜地使用。

[0090] 【化4】



[0092] 上述的式(VI)中, R₁是碳原子数8~25的烷基、烯基或炔基; R₂是-O-、-COO-或

[0093] 【化5】



[0095] n是10~50的整数。

[0096] 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、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯、聚氧乙烯烷基胺、聚氧乙烯聚氧丙烯烷基醚等。

[0097] 在本发明的实施方式中, 溶血剂中含的表面活性剂是1种也可, 2种以上也可。含2种以上的表面活性剂之时, 该组合是阳离子性表面活性剂和非离子性表面活性剂的组合也可, 阳离子性表面活性剂之间的组合也可, 阴离子性表面活性剂之间的组合也可。

[0098] 在本发明的实施方式中, 表面活性剂为溶液的形态也可。用于溶解表面活性剂的溶剂不特别限定, 但可举出例如水、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。

[0099] 在制备步骤中, 使用表面活性剂的溶液之时, 其浓度可根据表面活性剂的种类适宜设定, 但阳离子性表面活性剂的情况通常是10~10000ppm、优选是100~1000ppm, 非离子性表面活性剂的情况通常是10~100000ppm、优选100~10000ppm、更优选是1000~5000ppm。

[0100] 在本发明的实施方式中, 溶血剂含芳香族的有机酸也可。作为芳香族的有机酸, 例如, 酞酸、安息香酸、水杨酸、马尿酸、p-氨基苯磺酸、苯磺酸及它们的盐被适宜地使用。溶血剂中含的芳香族的有机酸是1种也可, 2种以上也可。

[0101] 在本发明的实施方式中, 对于溶血剂, 为了将pH保持在一定水平而含缓冲剂也可。作为那样的缓冲剂, 可举出例如, 柠檬酸盐、HEPES及磷酸盐等。上述的芳香族的有机酸示缓冲作用之时, 可任意向溶血剂添加缓冲剂。

[0102] 在本发明的实施方式中, 溶血剂的pH及渗透压不特别限定, 但从对红细胞进行有

效溶血的观点来看,pH是5.0~9.0,渗透压是20~150mOsm/kg是优选的。溶血剂的pH,可通过添加氢氧化钠、盐酸等的pH调节剂而调节。溶血剂的渗透压可通过添加糖、氨基酸、有机溶剂、氯化钠等的渗透压调节剂而制备。作为糖,可举出例如葡萄糖、木糖醇、甘露糖醇、阿拉伯糖、核糖醇等。作为氨基酸,可举出丙氨酸、脯氨酸、甘氨酸、缬氨酸等。作为有机溶剂,可举出乙二醇、甘油等。

[0103] 在本发明的实施方式中,作为溶血剂,使用市售的白细胞测定用试剂也可。作为那样的试剂,可举出例如ストマトライザー4DL(Sysmex株式会社)。ストマトライザー4DL是含上述的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,pH及渗透压是上述范围内的溶血剂。

[0104] 【测定样品的制备】

[0105] 在上述的制备步骤中,将活体样品,荧光染料,和溶血剂混合的顺序不特别限定。例如,将荧光染料和溶血剂先混合,将此混合液和活体样品混合也可。或者,将溶血剂和活体样品先混合,将此混合液和荧光染料混合也可。在本发明的实施方式中,以任何的顺序混合均可得同等的结果。

[0106] 在本发明的实施方式中,活体样品、荧光染料和溶血剂的混合是,活体样品:荧光染料及溶血剂的混合物的体积比是1:5~1:1000、优选混合到1:10~1:100是优选的。此时,在该混合物中荧光染料和溶血剂的比是1:1~1:1000、优选1:10~1:100是优选的。通过以这样的比将活体样品、荧光染料和溶血剂混合,红细胞的溶血快速进行,可染色白细胞的核酸。活体样品的量以5~500 μ L左右测定即充分。

[0107] 在本发明的实施方式中,将活体样品、荧光染料和溶血剂混合之后,于15~50℃、优选30~45℃的温度温育5~120秒钟、优选5~30秒钟是优选的。

[0108] 【散射光强度及荧光强度的测定】

[0109] 在本发明的方法中,在上述的步骤中,向制备的测定样品照射光,测定从该样品中的粒子发生的散射光强度及荧光强度(测定步骤)。

[0110] 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,通过在测定样品通过流式细胞仪的流动池之时照射光,对从该样品中的粒子、例如染色的白细胞等发出的信号可得散射光强度及荧光强度。

[0111] 在本发明的实施方式中,散射光强度只要是可用一般市售的流式细胞仪测定的散射光的强度,就不特别限定,可举出例如前方散射光(例如,光接收角度0~20度附近)及侧方散射光(光接收角度90度附近)的强度。

[0112] 在所述技术中,已知侧方散射光反映细胞的核或颗粒等的内部信息,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,作为散射光强度测定侧方散射光强度是优选的。

[0113] 荧光强度是向测定样品照射适当的波长的激发光之时,从由荧光染料染色的细胞内的核酸等发出的,测定激发的荧光而得到的信息。激发光波长及光接收波长可根据使用的荧光染料的种类而适宜选择。

[0114] 在本发明的实施方式中,流式细胞仪的光源不特别限定,选择对于荧光染料的激发适宜的波长的光源。作为那样的光源,使用例如红色半导体激光、蓝色半导体激光、氩激光、He-Ne激光、水银弧光灯等。特别是,由于半导体激光比气体激光非常地廉价而适宜。

[0115] 【白细胞的分类及活化嗜中性粒细胞的检测】

[0116] 在本发明的方法中,基于取得的散射光强度及荧光强度,将上述的活体样品中的白细胞分类为至少含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团的同时(分类步骤)、检测活化嗜中性粒细胞(检测步骤)。

[0117] 在分类步骤中,当测定的粒子是正常的白细胞之时,该粒子基于散射光强度及荧光强度,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颗粒细胞的4种的集团(群集)。其中,嗜酸性粒细胞以外的颗粒细胞表示嗜中性粒细胞及嗜碱性粒细胞。嗜中性粒细胞及嗜碱性粒细胞的集团中含的嗜碱性粒细胞极其少,因此嗜中性粒细胞及嗜碱性粒细胞的集团可看作嗜中性粒细胞的集团。然后,在检测步骤中,测定的粒子之中,在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子被检测为活化嗜中性粒细胞。优选,测定的粒子之中,荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间的粒子被检测为活化嗜中性粒细胞。

[0118] 再有,在本发明的实施方式中,正常的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种的集团也可。

[0119] 在本发明的优选的实施方式中,白细胞的分类是,制成以散射光强度和荧光强度作为二轴的散点图,基于得到的散点图而进行。在所述技术中,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各集团所出现的散点图上的区域由对正常的白细胞蓄积的数据预先确认。从而,通过例如,制成横轴取侧方散射光强度,纵轴取荧光强度的散点图,是正常的白细胞的粒子如图1所示被分类为4种的集团。再者,可通过使用适当的解析软件,在散点图上设包围各集团的窗,对其中的细胞数进行计数,取得各集团的细胞数。

[0120] 在上述的活化嗜中性粒细胞的检测中,在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子、优选,荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间的粒子(在图1中圆圈所包围的粒子)只要存在1个,则将该粒子检测为活化嗜中性粒细胞也可。

[0121] 在本发明的别的实施方式中,活化嗜中性粒细胞的检测如下进行也可。首先,基于测定结果,检测在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子、优选,荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间的粒子,计数。接下来,当该粒子的计数值比指定的值更大时,将该粒子检测为活化嗜中性粒细胞。再有,指定的值可基于从含活化嗜中性粒细胞的活体样品的测定蓄积的数据而适宜设定。

[0122] 【测定装置】

[0123] 本发明的测定装置是用于对活体样品中的白细胞进行分类的同时,检测活化嗜中性粒细胞的装置。

[0124] 对于本发明的测定装置,图2示其一实施方式之外观。本实施方式的测定装置1作为多项目自动血细胞分析装置而构成,有测定部2和数据处理部3。测定部2有:将活体样品和上述的荧光染料及溶血剂混合而制备测定样品的装置,和对得到的测定样品测定散射光强度及荧光强度的装置。数据处理部3有分析从测定部2输出的测定结果,进行白细胞的分类和活化嗜中性粒细胞的检测的装置。

[0125] 再有,在图2中,测定部2和数据处理部3作为个别的装置构成,但两者作为一体的

装置而构成也可。

[0126] 图3示测定部2的框图。如此图所示,测定部2具备:血细胞的检测部4、对该检测部4的输出的模拟处理部5、微计算机部6、显示一操作部7、及装置结构部8。

[0127] 检测部4具备检测白细胞的白细胞检测部。另外,检测部4,除了白细胞检测部之外,还具备:测定红细胞数及血小板数的RBC/PLT检测部、测定血液中的血染料量的HGB检测部、检测幼稚细胞的IMI检测部。检测部4作为光学式检测部、更具体而言由流式细胞术的检测部而构成。

[0128] 图4示检测部4的光学系统的构成。在此图中,从激光二极管401出射的光束经照射透镜系统402而照射到通过停止流动池403内的粒子(白细胞等)。在此检测部4中,检测从照射了光的停止流动池内的粒子发出的前方散射光、侧方散射光及侧方荧光。

[0129] 如图4所示,从通过停止流动池403的粒子(白细胞等)发出的前方散射光经集光透镜404和针孔部405而被发光二极管(前方散射光接收部)406接收。侧方散射光经集光透镜407、分色镜408、滤光器409、及针孔部410而被光电倍增管(侧方散射光接收部)411接收。侧方荧光经集光透镜407及分色镜408而被光电倍增管(侧方荧光接收部)412接收。

[0130] 从各光接收部406、411及412输出的光接收信号,各自,被有放大器51、52及53的模拟处理部5实施扩增一波形处理等的模拟处理,送到微计算机部6。

[0131] 如图3所示,微计算机部6具备:A/D变换部61,对从该A/D变换部61输出的数字信号进行指定的计算处理的计算部62,和包含用于控制用处理器及控制用处理器动作的存储器的控制部64。再者,微计算机部6具备:介于显示一操作部7之间的界面部66,和介于装置结构部8之间的界面部67。

[0132] 再有,计算部62经界面部63及总线68连接到控制部64。另外,控制部64经界面部66、67及总线68连接到检测部4及装置结构部8,经界面部65及总线69连接到数据处理部3。

[0133] A/D变换部61将从模拟处理部5输出的光接收信号变换为数字信号,输出到计算部62。计算部62对从A/D变换部61输出的数字信号进行指定的计算处理。然后,计算部62将计算结果(测定结果)经界面部63及总线68输出到控制部64。

[0134] 控制部64可经外部界面部65连接到数据处理部3,将从计算部62输出的计算结果发送到数据处理部3。另外,控制部64进行自动供给样品容器的采样机(图示省略)、包含用于样品的制备一测定的流体系统等的装置结构部8的控制及其他控制。

[0135] 图5示,在测定部2中,将活体样品和荧光染料及溶血剂混合而制备测定样品,将得到的测定样品在检测部4测定的样式。

[0136] 在图5中,样品容器11内的活体样品从吸引移液器吸吐(图示省略)吸引到采样阀12。在采样阀12定量的活体样品与指定量的溶血剂混合,得到的混合物被运到反应室13。在反应室13,供给指定量的荧光染料,与上述的混合物混合。通过将活体样品和荧光染料及溶血剂的混合物在反应室13反应指定时间,得到活体样品中的红细胞被溶血,白细胞被染色的测定样品。

[0137] 得到的测定样品与停止液(例如,セルパック(II)、Sysmex株式会社制)一同被送到检测部4,在该检测部4中由流式细胞术测定。

[0138] 图6示数据处理部3的构成。数据处理部3以本体301,显示部302,和输入装置303为主而构成。在本体301中,CPU301a,ROM301b,RAM301c,硬盘301d,读取装置301e,输入输出接

口301f,和图像输出接口301g由总线301h以互相数据通信可能的方式连接。

[0139] CPU301a可实行ROM301b中存储的计算机程序及RAM301c中装载的计算机程序。CPU301a通过实行后述的应用程序305a,实现后述的各功能块,计算机作为数据处理部3而发挥功能。

[0140] ROM301b由掩模型ROM、PROM、EPROM、EEPROM等构成,记录由CPU301a实行的计算机程序及其中使用的数据。

[0141] RAM301c由SRAM或DRAM等构成。RAM301c用于ROM301b及硬盘301d中记录的计算机程序的读取。另外,RAM301c作为CPU301a实行这些计算机程序之时的作业区域而被利用。

[0142] 在硬盘301d中安装有操作系统及应用系统程序等的,用于令CPU301a实行的各种的计算机程序及计算机程序的实行中使用的数据。后述的应用程序305a(活化嗜中性粒细胞的检测用计算机程序)及活化嗜中性粒细胞的检测中使用的指定的值也安装在硬盘301d中。

[0143] 读取装置301e由软盘驱动器、CD-ROM驱动器、或者DVD-ROM驱动器等构成。读取装置301e可读取记录到可移动型存储介质305的计算机程序或数据。另外,在可移动型存储介质305中储存用于计算机实行操作的应用程序305a。CPU301a从可移动型存储介质305读取应用程序305a,将该应用程序305a安装到硬盘301d也可能。

[0144] 应用程序305a不仅由可移动型记录介质305提供,从由电通信线路(无论有线、无线)与数据处理部3以通信可能的方式连接的外部机器通过上述的电通信线路而提供也可能。例如,该应用程序305a储存在互联网上的子计算机的硬盘内,数据处理部3接入此子计算机,下载该计算机程序,将其安装到硬盘301d也可能。

[0145] 另外,在硬盘301d中,安装有例如美国微软公司制备销售的Windows(注册商标)等的提供图形用户界面环境的操作系统。在以下的说明中,本发明的实施方式中涉及的应用程序305a在该操作系统上运行。

[0146] 输入输出接口301f由例如USB、IEEE1394、RS-232C等的串行接口、SCSI、IDE、IEEE1284等的并行接口、及包含D/A变换器、A/D变换器等模拟接口等构成。在输入输出接口301f中,连接包括键盘及鼠标的输入装置303。因此,通过用户使用该输入装置303,可向计算机本体301输入数据。

[0147] 图像输出接口301h连接到由LCD或CRT等构成的显示部302,根据由CPU301a给出的图像数据将映像信号输出到显示部302。显示部302根据输入的映像信号表示图像数据(画面)。

[0148] 接下来,图7示由本发明的实施方式中涉及的活化嗜中性粒细胞的检测用计算机程序的数据处理部3的处理流程。

[0149] 首先,由用户的操作等,从数据处理部3向测定部2发送测定开始指示(步骤S101)。数据处理部3的CPU301a待机至从测定部2接收测定结果(在步骤S102中NO)。

[0150] 测定部2对接收的测定开始指示应答,进行测定样品的制备及测定,将测定结果发送到数据处理部3。数据处理部3的CPU301a经输入输出接口301f从测定部2接收测定结果(在步骤S102中YES),则将接收的测定结果存储到RAM301c中,对测定结果进行白细胞的分类处理(步骤S103)。

[0151] 在本发明的优选的实施方式中,在步骤S103中,数据处理部3制成横轴取侧方散射

光强度,纵轴取荧光强度的散点图(粒子分布图)。数据处理部3的CPU301a读取,预先存储在硬盘301d中的,与预测出现淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞及嗜碱性粒细胞的各集团的散点图上的区域相关的数据,基于该数据分析制成的散点图。由此,将散点图上的各集团分类,识别为:“淋巴细胞的粒子集团”、“单核细胞的粒子集团”、“嗜中性粒细胞及嗜碱性粒细胞的粒子集团”及“嗜酸性粒细胞的粒子集团”的4种。另外,在此步骤中,数据处理部3由所述分析进行在各集团中粒子的计数也可。

[0152] 数据处理部3,基于步骤S103的分类结果,当在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子、优选,荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间的粒子存在时,将该粒子检测—计数,将其识别为活化嗜中性粒细胞(步骤S104)。此时,“嗜中性粒细胞及嗜碱性粒细胞的粒子集团”看作“嗜中性粒细胞的粒子集团”。

[0153] 在本发明的实施方式中,在此步骤S104中,数据处理部3的CPU301a读取预先存储到硬盘301d的与活化嗜中性粒细胞的检测中使用的指定的值相关的数据,当荧光强度相比嗜中性粒细胞更低,并且散射光强度在嗜中性粒细胞和嗜酸性粒细胞之间的粒子的检测数相比该指定的值更大时,识别为样品中存在活化嗜中性粒细胞也可。

[0154] 在本发明的别的实施方式中,在此步骤S104中,数据处理部3的CPU301a,当检测至少1个在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的粒子、优选,荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间的粒子时,识别为样品中存在活化嗜中性粒细胞也可。

[0155] 数据处理部3的CPU301a将上述的分类结果及检测结果存储到硬盘301d的同时,经图像输出接口301g输出到显示部302(步骤S105)。图8示由数据处理部3表示在显示部302的结果表示画面SC1之一例。在结果表示画面SC1中包括:用于表示对于各测定项目的数值数据的表示区域SC1a,和用于表示在指定的项目(WBC,RBC,PLT,DIFF等)中的粒子的数、大小等的分布的散点图等的表示区域SC1b。

[0156] 在步骤S104中,当检测到活化嗜中性粒细胞时,在结果表示画面SC1中,表示注释SC1c。注释SC1c示,活体样品中存在活化嗜中性粒细胞。图9是表示区域SC1b中表示注释SC1c的例。

[0157] 接下来,通过实施例详细地说明本发明,本发明不受这些的实施例的限定。

【实施例】

[0158] 【实施例1】

[0159] 从健康人,使用血液学检查用的肝素采血管采集末梢血。将得到的血液,通过于室温使用单聚分离溶液(大日本住友制药)的离心分离,得到纯度90%以上的多核细胞样品。再有,此操作根据厂商(大日本住友制药)的使用说明进行。然后,将得到的多核细胞(2×10^5 个)悬浮于1mL的0.1%牛血清白蛋白(磷酸缓冲生理盐水)。为了对多核细胞之中嗜中性粒细胞进行染色,向得到的悬浮液添加用藻红蛋白(PE)荧光标记的CD16(抗人CD16Fc γ 受体III(克隆:DJ130c)·小鼠单克隆抗体/RPE标记流式细胞术用嗜中性粒细胞特异性抗体;ダコ公司)(终浓度750 μ g/L),于室温温育10分钟。接下来,添加作为ROS检测用试剂的APF(氨基苯基荧光素;积水医疗)(终浓度10 μ M),于室温静置30分钟。最后,添加作为用于活化嗜中性

粒细胞的刺激物质的PMA(佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯;Sigma-Aldrich公司)(终浓度0.32nM)或fMLP(N-甲酰基-Met-Leu-Phe;Sigma-Aldrich公司)(终浓度50nM),于室温静置10分钟,制备含活化嗜中性粒细胞的样品。

[0160] 另外,作为对照样品,不添加PMA及fMLP之任何以外,制备与上述同样地处理的样品。

[0161] 将上述的样品9 μ L,白细胞分类用试剂ストマトライザー4DL(442 μ L),和ストマトライザー4DS(9 μ L)(均为Sysmex公司制)混合,于室温温育2分钟而得到测定样品。其中,ストマトライザー4DL是含用于对红细胞进行溶血,给白细胞的细胞膜可透过荧光染料的程度的损伤的表面活性剂的稀释液。ストマトライザー4DS是含核酸染色性荧光染料的溶液。

[0162] 将测定样品用常用流式细胞仪FACSCalibur(Becton-Dickinson公司制)测定,取得“CD16来源荧光强度(CD16-PE、585nm)-前方散射光强度(FSC)”、“ストマトライザー4DS中的核酸染色性荧光染料来源荧光强度(4DS、665nm)-侧方散射光强度(SSC)”及“APF来源荧光强度(APF、515nm)-前方散射光强度(FSC)”的散点图。

[0163] 得到的散点图示于图10(A)及图10(B)。在图10(A)示以CD16来源荧光强度和FSC作为二轴的散点图(以下,称之为“CD16-FSC”)、及,以ストマトライザー4DS中的核酸染色性荧光染料来源荧光强度和SSC作为二轴的散点图(以下,称之为“4DS-SSC”)。在图10(B)示4DS-SSC、及,以APF来源荧光强度和FSC作为二轴的散点图(以下,称之为“APF-FSC”)。

[0164] 参照图10(A),将在CD16-FSC中确认为CD16阳性细胞的粒子识别为嗜中性粒细胞(在CD16-FSC及4DS-SSC中被圆圈包围的粒子)。由4DS-SSC更,在PMA及fMLP的面板中,不仅对照(无刺激)的面板所示的通常的嗜中性粒细胞出现区域,在别的区域也知嗜中性粒细胞出现(在图10(B)中被点线包围的粒子)。这样的嗜中性粒细胞在通常的嗜中性粒细胞出现区域之右下侧(含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间)的区域出现。即,该嗜中性粒细胞是荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间。

[0165] 对于这样的在通常的嗜中性粒细胞出现区域之右下侧出现的嗜中性粒细胞,由APF-FSC,确认作为活化嗜中性粒细胞的指标的ROS产生。参照图10(B),在APF-FSC中被点线包围的粒子是在4DS-SSC中在通常的嗜中性粒细胞出现区域之右下侧出现的嗜中性粒细胞。由APF-FSC知,被点线包围的嗜中性粒细胞比通常的嗜中性粒细胞ROS产生高。

[0166] 基于以上实验知,在4DS-SSC的散点图中,在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在的嗜中性粒细胞、即,荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间的嗜中性粒细胞是被刺激活化而ROS产生能亢进的嗜中性粒细胞。

[0167] 【参考例1】

[0168] 为了验证上述的实施例1的结果,检查被刺激活化的嗜中性粒细胞是否在显微镜观察中也示ROS产生能的亢进。

[0169] 与实施例1同样,从健康人的末梢血制备含活化嗜中性粒细胞的样品。但是,作为嗜中性粒细胞的刺激物质仅使用PMA。另外,作为对照样品,制备未使用APF及刺激物质处理的样品(-APF)、及未使用刺激物质处理的样品(+APF)。

[0170] 将制备的各样品移到用聚-L-赖氨酸包被的玻璃底皿,对该样品中的细胞用共聚

焦激光显微镜(I×81(Olympus公司制)、CSU-X1(横河电机制)、ImagEM(浜松フオトニクス制))观察嗜中性粒细胞。

[0171] 结果示于图11。在图11中,在添加PMA的样品中观察到发出APF来源的强的荧光的嗜中性粒细胞。从而知,用PMA刺激的嗜中性粒细胞的ROS产生能明显亢进。从而,由此共聚焦激光显微镜的观察结果与上述的实施例1的结果一致。

[0172] 【参考例2】

[0173] 已知活化嗜中性粒细胞,作为其特征,示被称为脱颗粒及空胞变性的形态的变化。检查在上述的实施例1中制备的样品中是否存在示对于活化嗜中性粒细胞特征性的变化的细胞。

[0174] 与实施例1同样,从健康人的末梢血制备含活化嗜中性粒细胞的样品。另外,作为对照样品,制备未使用刺激物质处理的样品。

[0175] 将此样品用2.5%戊二醛固定,根据发明人的文献(Mari Kono et al.(2009), 'Morphological definition of CD71positive reticulocytes by various staining techniques and electron microscopy compared to reticulocytes detected by an automated hematology analyzer', Clinica Chimica Acta, Vol. 404, p105-110.)中记载的方法,制备电子显微镜样品。将得到的样品使用透过型电子显微镜(日立H-7500)进行解析。

[0176] 观察的结果示于图12。由图12看出,在添加PMA或fMLP的样品中多见在细胞质中发生脱颗粒和空胞的嗜中性粒细胞。

[0177] 由上述的实施例1、参考例1及2的结果知,通过由刺激物质的处理,样品中的嗜中性粒细胞的确活化。再者知,在细胞质中见到空胞的形成而ROS产生能亢进的活化嗜中性粒细胞,在使用白细胞分类试剂和流式细胞仪的测定中,在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间存在,即,其荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间。

[0178] 【实施例2】

[0179] 在将全血作为活体样品的测定中,也检查是否可与实施例1同样地检测活化嗜中性粒细胞。

[0180] 使用血液学检查用的EDTA-2K进入采血管从健康人采集末梢血。向得到的血液添加PMA(Sigma-Aldrich公司制)(终浓度0.32nM),于室温静置10分钟。作为对照样品,使用未添加PMA的全血。

[0181] 将制备的样品供到自动血液分析装置XE-2100(Sysmex株式会社制)而进行测定,取得4DS-SSC的DIFF散点图。再有,自动血液分析装置XE-2100使用ストマトライザー4DL及ストマトライザー4DS(Sysmex公司制),如上述一样自动地处理制备的样品,从而制备测定样品。

[0182] 结果示于图13。由图13知,作为活体样品使用全血之时,也与实施例1同样地,在4DS-SSC的散点图中,在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间、即,其荧光强度在含嗜中性粒细胞的集团以下、并且散射光强度在含嗜中性粒细胞的集团和含嗜酸性粒细胞的集团之间的活化嗜中性粒细胞出现(被圆圈包围的粒子)。其中出现的被认为是,由PMA的刺激而在细胞质中形成空胞,ROS产生能亢进的活化嗜中性粒细胞。

[0183] 再有,将在上述实施例2中将全血作为活体样品的测定,使用向自动血液分析装置

XE-2100(Sysmex株式会社制)集成了基于实施例1的结果制成的活化嗜中性粒细胞检测用计算机程序而改造的装置进行之时,也可得与上述的实施例2同样的结果。

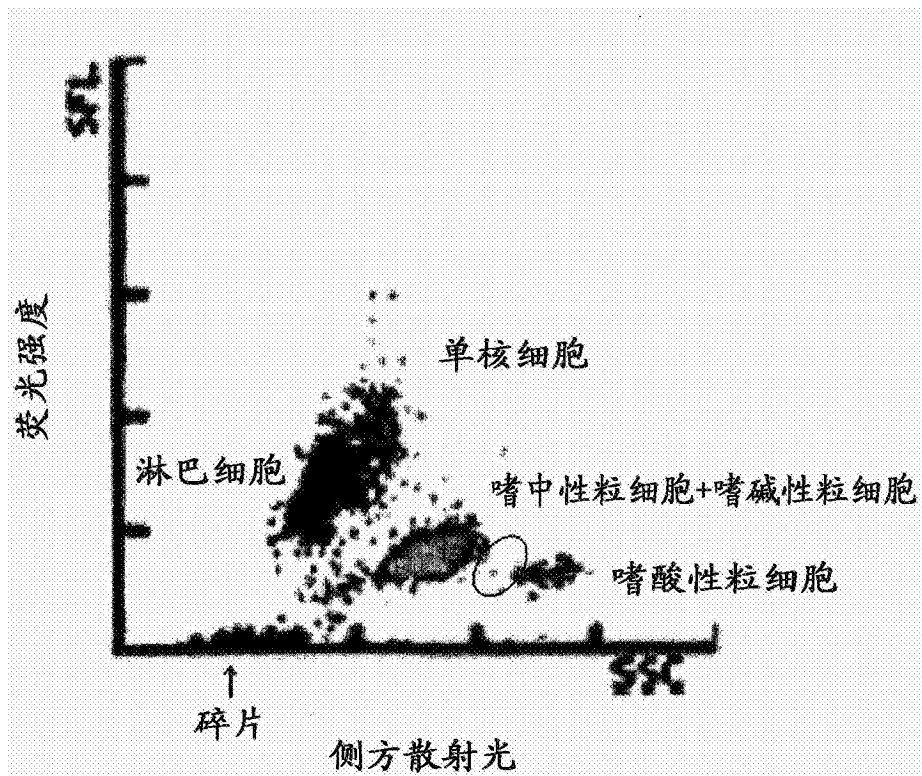


图1

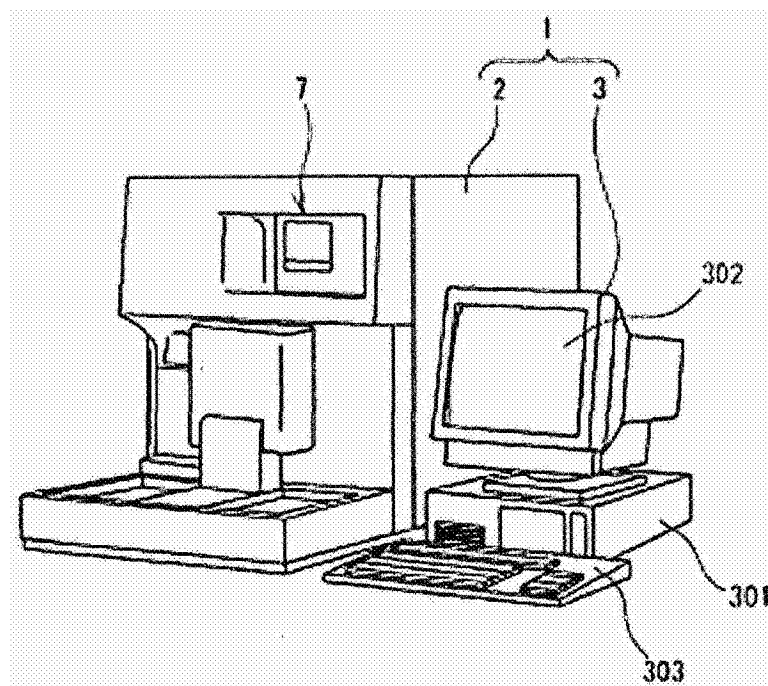


图2

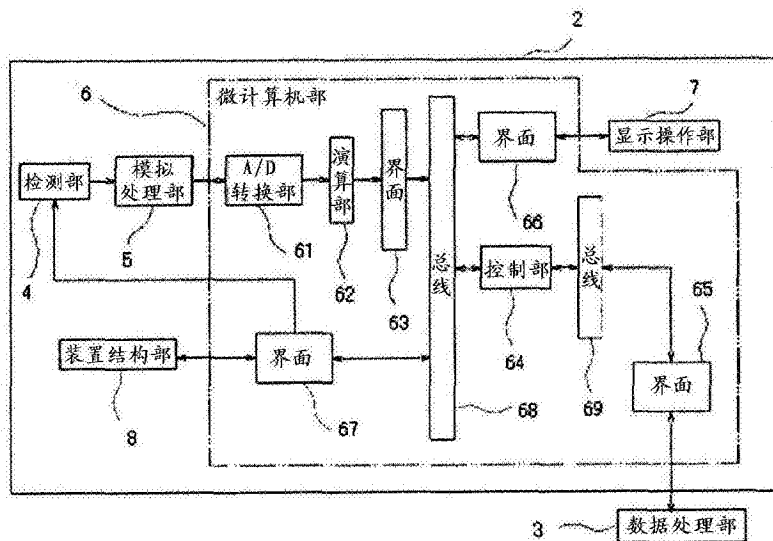


图3

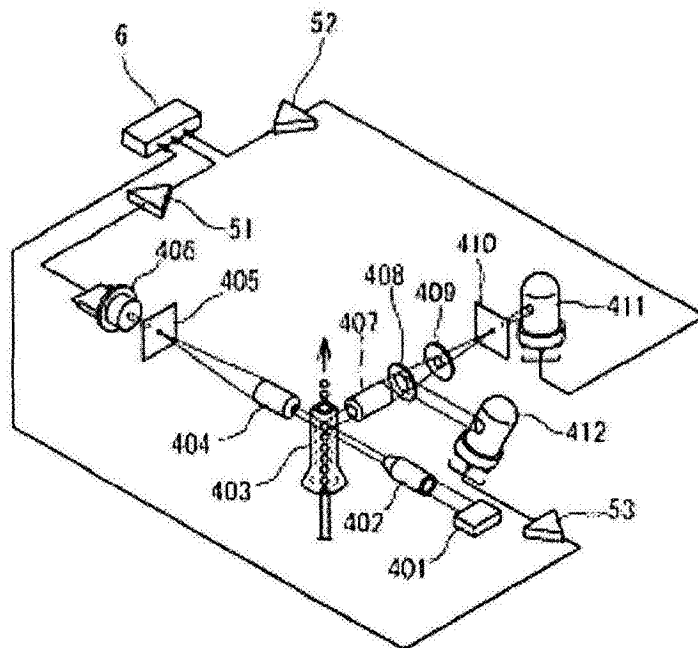


图4

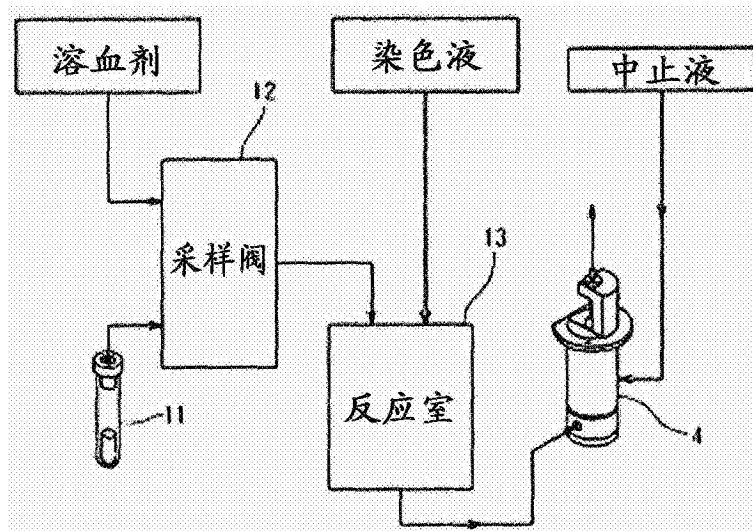


图5

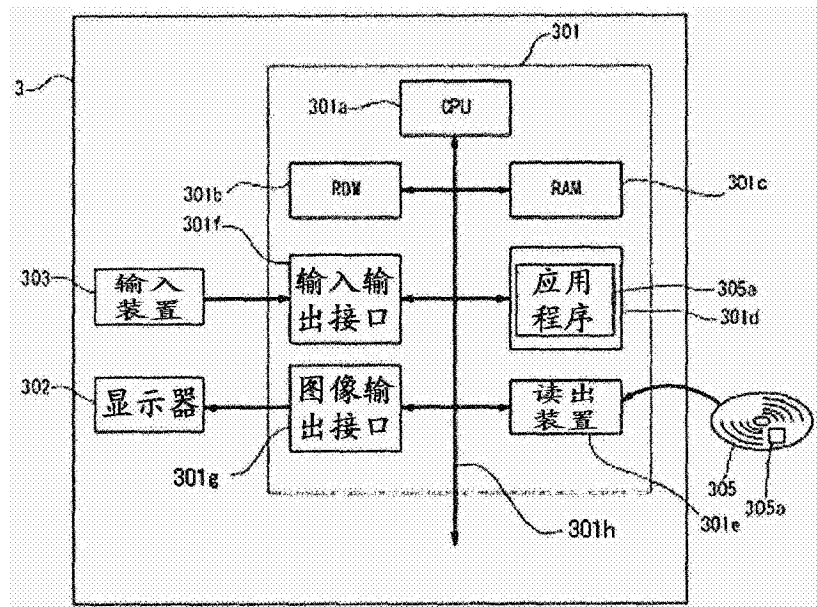


图6

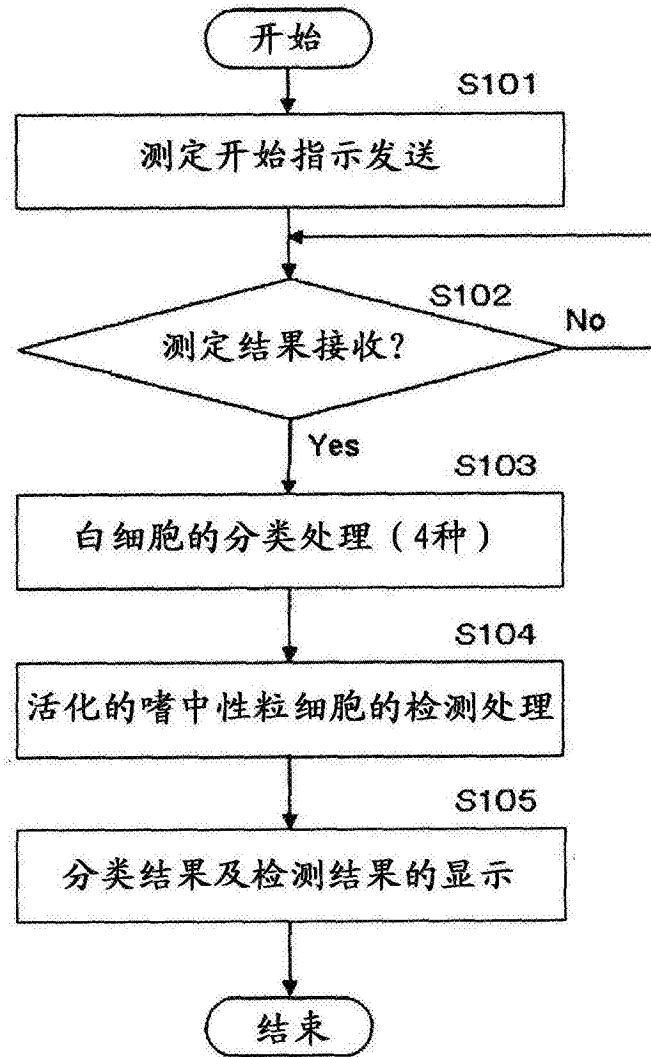


图7

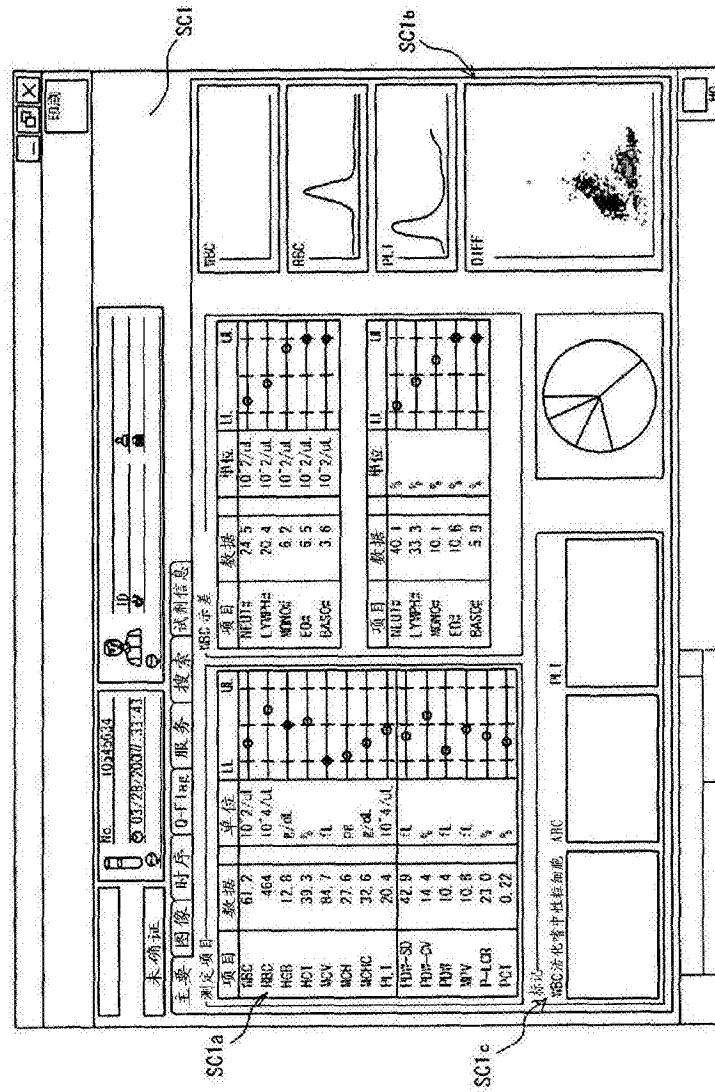


图8

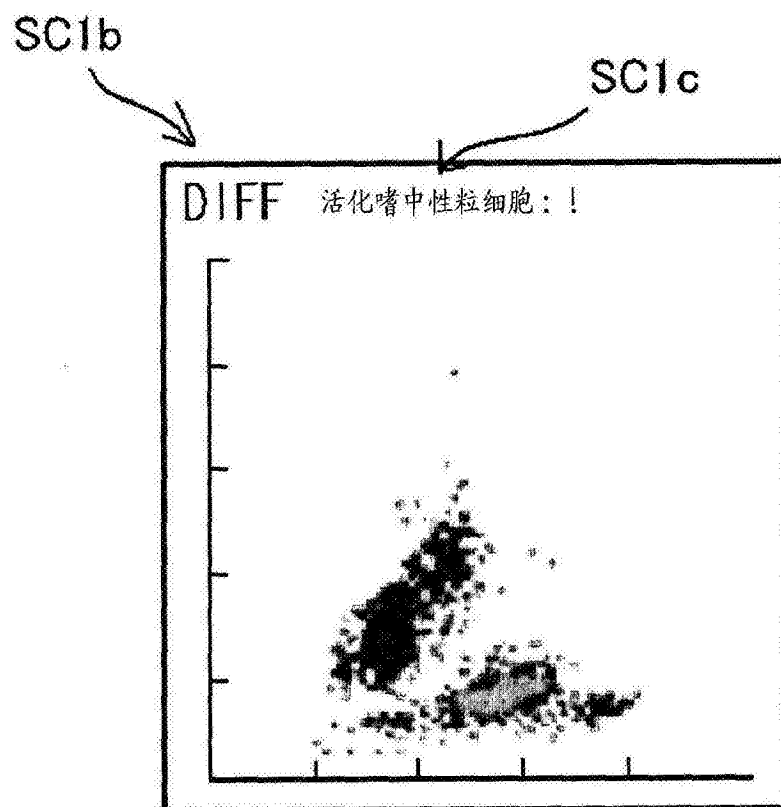


图9

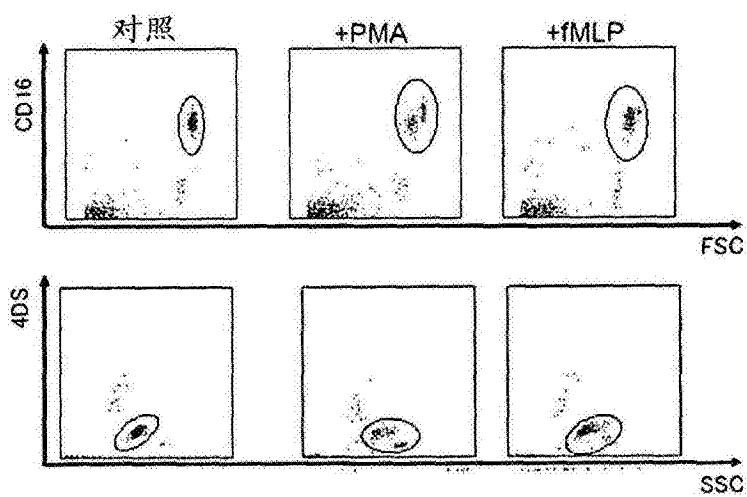


图10(A)

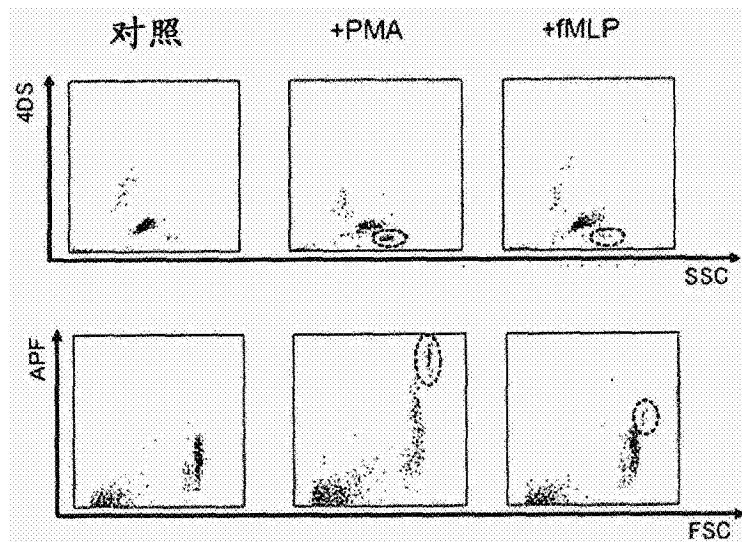


图10(B)

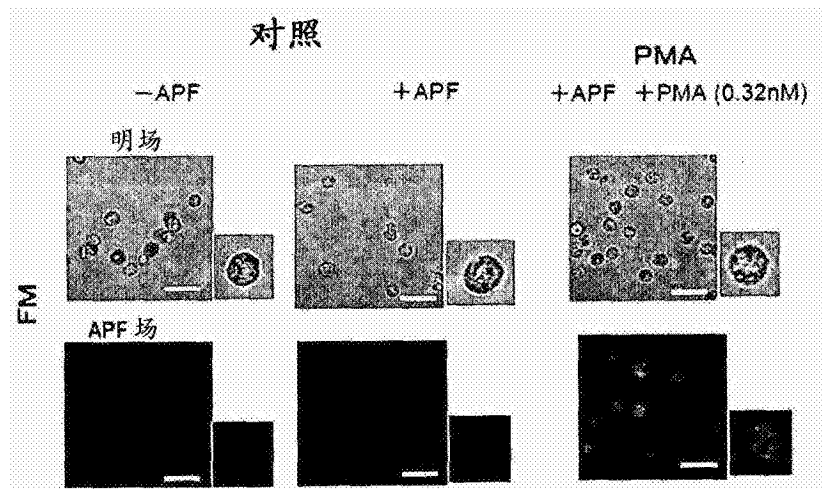


图11

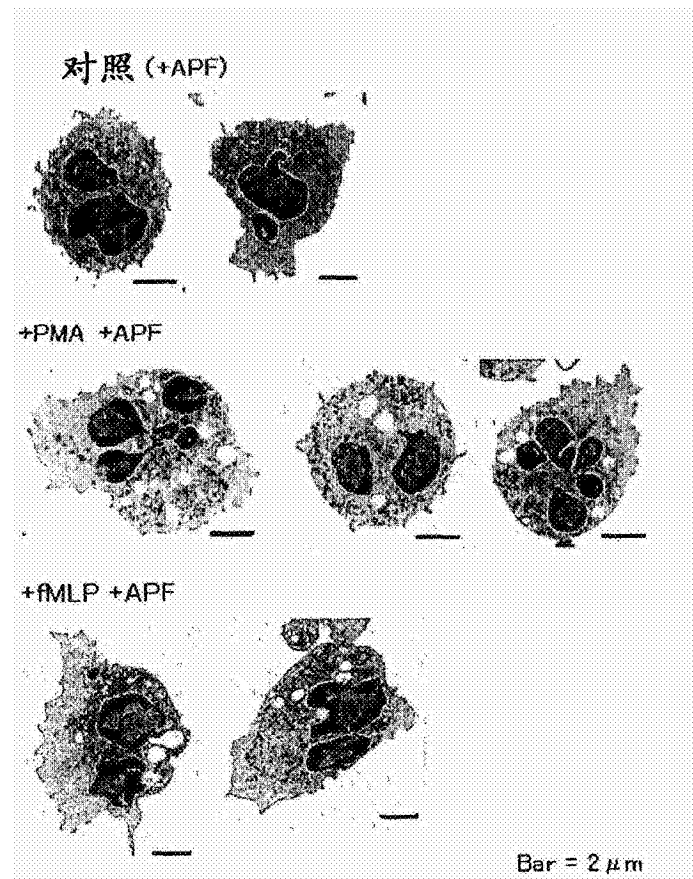


图12

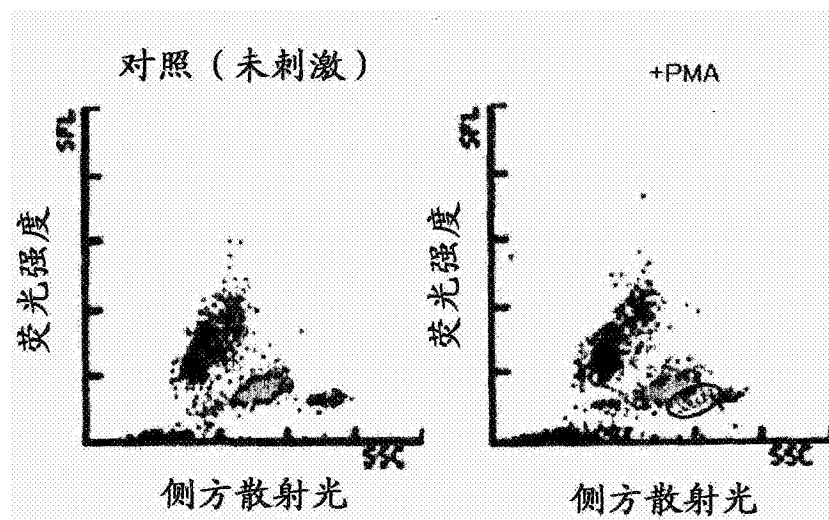


图13