

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第5657813号
(P5657813)

(45) 発行日 平成27年1月21日 (2015. 1. 21)

(24) 登録日 平成26年12月5日 (2014. 12. 5)

(51) Int. Cl.

F I

GO 1 N 33/49 (2006. 01)

GO 1 N 33/49 A

GO 1 N 33/48 (2006. 01)

GO 1 N 33/49 X

C 1 2 Q 1/02 (2006. 01)

GO 1 N 33/48 P

C 1 2 Q 1/02

請求項の数 13 (全 13 頁)

(21) 出願番号 特願2013-545314 (P2013-545314)
 (86) (22) 出願日 平成23年12月20日 (2011. 12. 20)
 (65) 公表番号 特表2014-506323 (P2014-506323A)
 (43) 公表日 平成26年3月13日 (2014. 3. 13)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2011/073428
 (87) 国際公開番号 W02012/084963
 (87) 国際公開日 平成24年6月28日 (2012. 6. 28)
 審査請求日 平成25年10月31日 (2013. 10. 31)
 (31) 優先権主張番号 102010064131.6
 (32) 優先日 平成22年12月23日 (2010. 12. 23)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)
 (31) 優先権主張番号 102011003101.4
 (32) 優先日 平成23年1月25日 (2011. 1. 25)
 (33) 優先権主張国 ドイツ (DE)

(73) 特許権者 390039413
 シーメンス アクチエンゲゼルシャフト
 Siemens Aktiengesellschaft
 ドイツ連邦共和国 D-80333 ミュンヘン
 ヴィッテルスバッハープラッツ 2
 Wittelsbacherplatz 2, D-80333 Muenchen, Germany
 (74) 代理人 100075166 弁理士 山口 巖
 (74) 代理人 100133167 弁理士 山本 浩

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 プラスモジウム感染の検出方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

患者の血液サンプルにおけるプラスモジウム感染を検出する方法であって、

a) 血液サンプルにおける多形核好中球性顆粒球の示差分析の実行及び細胞体積及び細胞密度の分布の決定ステップ、

b) 血液サンプルにおける血小板数の決定ステップ、

c) 血液サンプルにおける血小板の細胞密度の分布の決定ステップ、

d) ステップ a) ~ c) において実行された決定からのサンプルパラメータの取得ステップ、

e) あらかじめ定められた基準に対するパラメータの評価ステップ

を含み、その基準は 1 つ又は複数のサンプルパラメータに基づいて構築され、感染した血液サンプルを正常な血液サンプルの対応する値と比較することに基づいて決定され、その基準を満たす場合にはプラスモジウム感染が存在する

プラスモジウム感染の検出方法。

【請求項 2】

パラメータの決定が散乱光測定によって行われる請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】

プラスモジウム感染は、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫又はサルマラリア原虫による感染である請求項 1 または 2 記載の方法。

10

20

【請求項 4】

さらに、網赤血球及び赤血球の球形化及び示差分析が、散乱光測定及び吸収測定によって行われる請求項 1 から 3 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 5】

さらに、血液サンプルにおけるすべての白血球の染色後、示差分析が散乱光測定及び吸収によって行われる請求項 1 から 4 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 6】

染色が基質として 4-クロロ-1-ナフトール を用いて実行される請求項 5 記載の方法。

【請求項 7】

さらに、染色後、好中球性顆粒球の体積分布の決定が行われる請求項 5 または 6 記載の方法。 10

【請求項 8】

さらに、パラメータとして、染色後のすべての白血球の体積分布及び吸収分布の標準偏差が用いられる請求項 5 から 7 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

ステップ a) における決定が、少なくとも好酸球および好中球の、しかし好塩基球でない白血球の溶解試薬による溶解後に行われる請求項 1 から 8 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 10】

好塩基球を除くすべての細胞の特異的溶解後に、非特異的成分が散乱光ダイヤグラム（小さい角度及び大きい角度の散乱）から決定される請求項 1 から 9 のいずれか 1 項に記載の方法。 20

【請求項 11】

ステップ a)、b) 及び c) において決定されたパラメータの値が、正常な血液サンプルにおいて得られた標準値に比較して低い場合、その値はプラスモジウム感染の存在を予測する請求項 1 から 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

好中球性顆粒球の体積分布、すべての白血球の体積分布の標準偏差または非特異的成分の値が、正常な血液サンプルにおいて得られた標準値に比較して高い場合、その値はプラスモジウム感染の存在を予測する請求項 7、8 または 10 に記載の方法。 30

【請求項 13】

自動細胞カウンタによって実行される請求項 1 から 12 のいずれか 1 項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、患者の血液サンプルにおけるプラスモジウム感染を検出する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

例えば、病原体の、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫及びサルマラリア原虫によって生じるマラリア発病のようなプラスモジウム感染は、世界的に 1 年当たり何億という新たな発病の原因である。世界保健機構（WHO）の数値によれば、3 億から 5 億の範囲の新たな発病が予想される。 40

【0003】

それ故、プラスモジウム感染を処置するための現存の薬剤に対する耐性の発生が増加することを考慮して、信頼性があり、安価で迅速に実行可能であり、しかも偽陽性及び偽陰性の結果をほぼ完全に排除し得る診断方法の要求が増している。例えば、マラリア感染の低い有病率の地域においては少ない発病者を事実発病者であると見きわめるため、高感度の診断方法が必要であろう。

【0004】

それに対して、高い有病率 / 発病率の世界地域においては、それは通常世界の比較的貧 50

困の地域の一部と見なされるが、偽陽性の結果を排除するため（即ち健康者を事実健康であると見きわめる）、高い特異度を持った検査方法に対する高い要求がある。

【 0 0 0 5 】

通例、さらに、極度に多数の患者サンプルが検査されなければならないのみならず、それが上述のように迅速に行われなければならないという問題がある。何故なら、診断の結果は2時間以内にすぐに使用可能でなければならないからである。このことが可能でないと、患者は場合によっては表面的な臨床的評価に基いて処置されなければならない。

【 0 0 0 6 】

不正確な又は偽陰性 / 偽陽性のマラリア診断の結果は多様である。すなわち、偽陽性診断の場合には、健康保険制度に対する財政的負担は全く問わないとしても、薬剤の（無意味の）使用は避けられるはずの副作用を必然的に伴うことがあり、またプラスモジウムによる耐性形成の可能性をも伴い得る。2006年来の研究において、それぞれ95%の感度及び特異度を持ち、最小のインフラストラクチャのみを必要とする診断検査が、10万以上の死亡及び4億以上の不必要な処置を免れ得ることが推論された（非特許文献1参照）。

【 0 0 0 7 】

実務上においては、寄生虫疾患、例えばマラリア熱の診断の際の主要な問題は、実験室での診断は臨床上の疑いが生じたとき始めて行われること、患者が実際にこのような感染に苦しめられることによって生じる。このことは特に、低い有病率 / 発病率の地域において、病気になった人びとが処置されないか又は時機を失しない処置をされないことに導く可能性がある。例えば、カナダの研究で、マラリアに感染して戻ってきたすべての旅行者の59%に最初は正しい診断が行われなかったことが報告された（非特許文献2参照）。正しい診断が行われ治療が開始される前に、平均して、熱帯熱マラリア原虫に対しては7.6日が経過し、三日熱マラリア原虫に対しては5.1日が経過した。このような遅れは極めて重大な合併症に導き死亡率を高めることになる（非特許文献3参照）。

【 0 0 0 8 】

プラスモジウム感染の診断のために複数の方法が使用されている。その最も確実な方法は顕微鏡による血液検査であるが、この方法は人、時間及び機器に費用がかかる。一般に行われている顕微鏡的方法によれば、訓練された専門員は感染の種類及び段階を確実に決定することができる。

【 0 0 0 9 】

それに加えていわゆる迅速診断テスト(Rapid Diagnostic Test = RDT)が存在する。例えばその場合寄生虫抗原を検出するための単クローン抗体が用いられる。このテストは通常、熱帯熱マラリア原虫感染を検出するために用いられる。

【 0 0 1 0 】

マラリア診断のための明らかにより鋭い感度の方法は、ポリメラーゼ連鎖反応にあるが、この方法は材料及び時間に多くを必要とするため緊急の場合にはあまり適していない。

【 0 0 1 1 】

迅速診断テスト(RDT)のグループには、そうこうするうち自動化方法もその一つと見なされ、それらはその高いスループットのため広域にわたる検出方法に対し卓越して適している（非特許文献4参照）。

【 0 0 1 2 】

自動化された利用のためにいわゆる「自動細胞カウンタ」が用いられ、成果を高めつつある。その例として、Advia 2120、Sysmex XE-2100及びCellavision DM96の機器がある。これらの自動化機器は、それらの高いスループットは別として、例えば高い客観性（観察者に依存する可変性がない）、通常手作業により数をカウントすること（大きい細胞数を数えること）と結び付く統計的変動の除去、及び手作業による集計では処分できないであろう多数のパラメータの決定、そして上述のように効率がよく費用的に有利な操作、といった若干の利点を備える。これらの機器の若干のものは、1時間あたり120～150の患者サンプルを処理することができる。

【 0 0 1 3 】

個別細胞の数の自動カウントの技術的原理は、インピーダンス（抵抗）測定または光学系（散乱光または吸収測定）に基づく。

【 0 0 1 4 】

そのインピーダンス法においては、細胞数の確認及びその大きさの決定は、導電率（抵抗）における変化の検出及び測定に基いて行われ、その変化は小さな開口を通過して移動する粒子によって引き起こされる。例えば血球（血液細胞）のような粒子は、それ自体伝導性ではないが、導電性の希釈剤中に懸濁される。このような血球の懸濁が開口を通して導かれると、各個々の血球が通り抜ける際に、開口の各側にある両電極間の電氣的通路のインピーダンス（抵抗）が一時的に増加する。

10

【 0 0 1 5 】

例えば、マラリア及び他の寄生虫感染をこのようなインピーダンス測定によって検出する方法が記述されたものがある（特許文献 1 の実験部分、非特許文献 5 参照）。

【 0 0 1 6 】

インピーダンス法とは異なり、光学的方法是、希釈された血液サンプルにレーザ光ビームを通すことを含み、その血液サンプルは連続的な流れにおいてレーザビームによって検出される。通過細胞の検出領域を通り抜ける各細胞は集束された光を散乱させる。散乱した光は、次いで光検出器によって検出され、電気パルスに変換される。ここで生じたパルス数は、特異な時間で検出領域を通過する細胞数に正比例する。

20

【 0 0 1 7 】

光学的方法においては、検出領域を通過する個々の細胞の光散乱が異なる角度で測定される。これによって、細胞構造、形状及び反射能についての情報が把握される。これらの特性は、血球の異なる種類を識別し、導き出されたパラメータを血球の規準からのずれの診断に用いるのに使用される。

【 0 0 1 8 】

両測定法によって得られた値は、鑑別診断学を用いて説得力のある診断結果に結び付けられる。

【 0 0 1 9 】

診断方法の感度及び特異度は、鑑別診断学において主要な役割を果たし、それに応じてこれらの特性の改善に不断の研究がなされている。

30

【 0 0 2 0 】

例えば、リンパ球及び単球の細胞体積に関する測定値が検出され、マラリア疾病に対するパラメータとして関与させられることを記載したものがある（特許文献 1）。より正確にいうならば、ここでは単球及びリンパ球集団の体積の標準偏差、すなわちそれらの不等質性が評価される。しかしながら、他のどのような感染症（例えば感冒）の場合にもリンパ球及び単球の体積変化に至ることがあり得るので、これらのパラメータは寄生虫感染の診断に対して特効的に十分ではないことが判明した。さらに、血液サンプルのインピーダンス測定は誤りを生じやすいことが照明されており、例えば測定結果が（例えば検査すべき懸濁の粘性が変化することにより）粗悪なものになり得る。

40

【 0 0 2 1 】

同じように、マラリア感染が存在する場合には、リンパ球及び単球の体積の標準偏差が基準値より著しくずれることを記載したものがある（非特許文献 5 参照）。

【 0 0 2 2 】

自動血液検査機器を使用して異なる感度及び特異度を模範的に描いたものが表 3 に存在し、それによれば感度は部分的には 48 . 6 ないし 52 パーセントの値に過ぎない。したがって、よく行われている検査方法では、高い感度及び特異度を備えた方法、すなわち発病した患者を事実発病者として識別し、他方健康な患者を健康者として識別し得るプラスモジウム感染の検出方法を提供することを十分には達成できない。

【 0 0 2 3 】

さらに新しい調査に従えば、現存の自動検査システム（及び従ってまた提示された感度

50

／特異度)の説得力はその上疑わしく、改善の余地が認められる(非特許文献6参照)。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0024】

【特許文献1】国際公開第2005/088301号

【非特許文献】

【0025】

【非特許文献1】ラファエル(Rafael) M E、テイラ(Taylor) T、マギル(Magill) A 等著「アフリカにおける初期マラリア熱の負担の低減(Reducing the burden of childhood malaria in Africa)、改善された診断の役割(The role of improved diagnosis)」Natu 10
re. 2006年; 444(suppl 1) 39~48頁

【非特許文献2】カイン(Kain)等著「感染症における診療(Clinics in Infectious Diseases) 1998年、27、142~149頁

【非特許文献3】フメア(Humare)等著「カナダ医学会誌(Canadian Medical Association Journal) 1997年、156、1165~1167頁

【非特許文献4】ハンシャイト(Hanschaid) T、ピント(Pinto) B G、ペライラ(Pereira) I、クリスティーノ(Christino) J M、バレイダス(Valadas) E 著「マラリアの誤診回避(Avoiding misdiagnosis of malaria)、新種の自動化法は、臨床上の疑惑が存在しないときでも明確な診断を可能にする(a novel automated method allows specific diagnosis, even in the absence of clinical suspicion)」、新生感染症(Emerging Infectious diseases) 1999年、5(6)、836~838頁 20

【非特許文献5】ブリッグス(Briggs) C 等著「VCS技術を使用した自動マラリア判別因子の開発(Development of an Automated Malaria Discriminant Factor Using VCS Technology)」Am J Clin Pathol 2006年

【非特許文献6】最近公表された論文「マラリアを診断するための自動血液学分析(Automated haematology analysis to diagnose malaria)」マラリア誌(Malaria Journal)、2010年、9、346頁

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0026】

それ故本発明の課題は、高い感度及び特異度を有する検査結果をもたらす血液サンプルのプラスモジウム感染を検出する方法を提供することである。本発明の別の課題は、複数の独立したパラメータを使用することにより、マラリアに対する高い感度及び特異度を他の感染または患者の種々の健康状態に左右されることなく可能にするマラリア感染の検出方法を提供することである。本発明のさらに別の課題は、自動血液分析機器を用いて実行し得る上述のような方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0027】

この課題は、本発明によれば、

患者の血液サンプルにおけるプラスモジウム感染を検出する方法であって、

a) 血液サンプルにおける多形核好中球性顆粒球の示差分析を実行し、細胞体積及び細胞密度の分布を決定するステップ、

b) 血液サンプルにおける血小板数を決定するステップ、

c) 血液サンプルにおける血小板の細胞密度の分布を決定するステップ、

d) ステップa) ~ c)において実行された決定からサンプルパラメータを取得するステップ、

e) あらかじめ定められた基準に比べてパラメータを評価するステップ

を含み、その基準は1つ又は複数のサンプルパラメータに基づいて構築され、感染した血液サンプルを正常な血液サンプルの対応する値と比較することに基づいて決定され、その基準を満たす場合にはプラスモジウム感染が存在する

10

20

30

40

50

プラスモジウム感染の検出方法によって解決される（請求項１）。

本発明によるプラスモジウム感染の検出方法の有利な実施態様は次の通りである。

- ・パラメータの決定が散乱光測定によって行われる（請求項２）。
- ・プラスモジウム感染は、熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、卵形マラリア原虫、四日熱マラリア原虫又はサルマラリア原虫による感染である（請求項３）。
- ・さらに、網赤血球及び赤血球の球形化及び示差分析が、散乱光測定及び吸収測定によって行われる（請求項４）。
- ・さらに、血液サンプルにおけるすべての白血球の染色後、示差分析が散乱光測定及び吸収によって行われる（請求項５）。
- ・染色が基質として４-クロロ-１-ナフトールを用いて実行される（請求項６）。
- ・さらに、染色後、好中球性顆粒球の体積分布の決定が行われる（請求項７）。
- ・さらに、パラメータとして、染色後のすべての白血球の体積分布及び吸収分布の標準偏差が用いられる（請求項８）。
- ・ステップ a) における決定が、少なくとも好酸球および好中球の、しかし好塩基球でない白血球の適切な溶解試薬による溶解後に行われる（請求項９）。
- ・好塩基球を除くすべての細胞の特異的溶解後に、非特異的成分が散乱光ダイヤグラム（小さい角度及び大きい角度の散乱）から決定される（請求項１０）。
- ・ステップ a) 、 b) 及び c) において決定されたパラメータの値が、正常な血液サンプルにおいて得られた標準値に比較して低い場合、その値はプラスモジウム感染の存在を予測する（請求項１１）。
- ・好中球性顆粒球の体積分布、すべての白血球の体積分布の標準偏差または非特異的成分の値が、正常な血液サンプルにおいて得られた標準値に比較して高い場合、その値はプラスモジウム感染の存在を予測する（請求項１２）。
- ・自動細胞カウンタによって実行される（請求項１３）。

【００２８】

本発明は、患者の血液サンプルにおけるプラスモジウム感染を検出する方法を創造するものであり、以下を含む。

- a) サンプルにおける多形核好中球性顆粒球の示差分析（differential analysis）の実行及び細胞体積及び細胞密度の分布の決定、
- b) サンプルにおける血小板数の決定、
- c) サンプルにおける血小板の細胞密度の分布の決定、
- d) a) ~ c) において実行された決定からのサンプルパラメータの取得、
- e) 前もって定められた基準に対するパラメータの評価。その基準を満たす場合にはプラスモジウム感染が存在する。

【００２９】

本発明に従い検査される患者の血液サンプルは通常人間の血液サンプルである。しかしながら、哺乳類の血液サンプルを検査することも可能である。

【００３０】

ここで使用された用語「示差分析（differential analysis）」は、患者の血液サンプルの成分の複数の測定可能な個々の値の取得を意味し、それらの値は実行すべき診断のため最終的に組み合わせられ評価されるものである。

【００３１】

本発明に従う方法のステップ a) においては、そのため先ず細胞体積及び細胞密度の分布の決定に関してサンプルにおける多形核好中球性顆粒球の示差分析が実行される。このことはしかしながら、それ以外の白血球種、例えば好酸球性または好塩基球性の顆粒球が同様に検査に含められることを排除するものではない。

【００３２】

細胞体積及び細胞密度の分布の規準からのずれは、通例病的状態を示す。この場合、通常測定される普通の値に比べて低い値はプラスモジウム感染を示す。プラスモジウム感染に伴う細胞体積及び細胞密度の減少は、感染の進行中に現れる白血球の防御機構によって

説明することができる。例えば好中球性顆粒球は血管から組織中へ移動し、そこでタンパク質分解酵素を分離させ、その結果細胞間の結合を解きそこで細菌を取り込む。これによって、細胞体積及び細胞密度の変化になる。

【0033】

驚くべきことに、プラスモジウム感染の検出方法の感度及び特異度は、上述の決定と並んで（すなわち逐次的または同時に）、患者血液サンプルにおける血小板数及びサンプルにおける血小板の細胞密度の分布が決定される場合には明らかに高められることが判明した。この場合も、規準から下方へずれる値はプラスモジウム感染の存在を予測する。このことは、本発明に従えば現存の方法に比べて検出方法の明らかに高められた感度及び特異度に通じる。

10

【0034】

ステップa)～c)で獲得される測定結果からサンプルパラメータが得られ、あらかじめ定められた判断基準に比べて評価され、その判断基準を満たす場合にはプラスモジウム感染が存在する。

【0035】

パラメータは導出された量であり、例えば用語「細胞体積パラメータ」は、細胞体積分布と関係があるパラメータ、例えば標準の細胞体積または与えられた細胞部分集団の細胞体積分布の標準偏差のようなパラメータを代表している。

【0036】

ここで用いられる用語「あらかじめ定められた判断基準」は、1つ又は複数のサンプルパラメータに基いて、本発明の場合特に細胞体積パラメータ、細胞数パラメータ及び細胞密度パラメータに基いて、構築された基準に関係する。この基準は、感染した血液サンプルを正常な血液サンプルの対応する値と比較することに基いて決定され、例えば本発明に基礎を置く実験に基く検査のために204個の熱帯熱マラリア原虫に感染した血液サンプルと3240個の正常な血液サンプルの対応する値との比較が実施された。

20

【0037】

多形核好中球性顆粒球のサンプルパラメータ（細胞体積及び細胞密度）の組合せ及び評価によって、また加えて、サンプルにおける血小板数及び血小板の細胞密度の分布を考慮することにより、本発明によれば検出方法の感度及び特異度について予期しない高い値を得ることができた。例において述べられるように、この場合99%の特異度値及び98%の感度値を得ることに成功した。このことは、全面的な、自動血液検査において、偽陽性ないし偽陰性の診断結果の数が従来知られていなかった程度に減少し得たこと、そしてほとんど無視し得ることを意味する。このことは、保障されたプラスモジウム感染診断、特にマラリア診断に関する一大進歩を意味し、マラリア感染の高い有病率/発病率に見舞われている国々において、時機を失しない有効な医療処置を介して全体的な健康状態の明らかな改善に導くであろう。

30

【0038】

本発明に従う方法の一実施形態においては、パラメータの決定は散乱光測定によって行われる。散乱光測定は先に説明されたように（「光学的方法」）、インピーダンス測定と異なりレーザ光が用いられる方法であり、血液サンプルが（細胞毎に）レーザ光を通して導かれ、レーザビームの偏向が適切な装置によって検出される。レーザビームの使用のもとに実施される方法は添付された図1に説明されている。その際個々の細胞によって散乱された光線は異なる角度範囲（低い角度/low angle及び大きい角度/high angle）で検出され、それらの角度範囲はそれぞれ体積（低い角度）及び密度（大きい角度）への指示を与える。本発明に従えば、レーザ光軸からのずれが約2°～3°の角度を「小さな角度」といい、約5°～15°の角度を「大きな角度」という。散乱光測定は、インピーダンス測定より測定結果の妨害され易さが少ないため優れていることが明らかになった。

40

【0039】

一実施形態に従えば、プラスモジウム感染は卵形マラリア原虫、三日熱マラリア原虫、四日熱マラリア原虫、または熱帯熱マラリア原虫による感染である。本発明に従う検出方

50

法は、これらのプラスモジウム感染に対し同じように用いることができる。

【 0 0 4 0 】

一実施形態においては、上述の方法ステップに加えてさらに、患者血液サンプルにおける網赤血球及び赤血球の球形化及び示差分析が散乱光測定によって実施される。ここでも示差分析が関係しており、最終的に評価すべきパラメータは、細胞体積、細胞密度、並びに細胞のヘモグロビン含有量及び網赤血球成分に関係する。網赤血球は若い赤血球であり、それらは赤血球そのものと異なりなおRNAを含み、それによって示差分析が可能である。

【 0 0 4 1 】

赤血球又は網赤血球の球形化は、血球をその元の形に左右されないで散乱光測定の際に評価可能な形へ変えるために必要である。このために、血液サンプルは網赤血球及び赤血球の球形化に導く試薬と混合される。模範的な試薬は、米国特許第5045472号明細書、米国特許第5284771号明細書、米国特許第5633167号明細書及び米国特許第6114173号明細書に開示されている。例えば米国特許第5045472号明細書は、等張水溶液、球形化剤（例えばアルキル硫酸塩のアルカリ金属塩）並びに球形化剤を可逆的に結合するタンパク質を含む試薬混合物を明らかにしている。

【 0 0 4 2 】

網赤血球及び赤血球を本発明に従う検出方法に取り入れることによって、特異度及び感度をさらに高めることができる。網赤血球の赤血球に対する比は、血液内のプラスモジウム感染の存在への重要な手がかりである。網赤血球の比が高いほど、すなわち成熟した赤血球に対する未熟の赤血球の比が高いほど、プラスモジウム感染の存在の可能性は高い。

【 0 0 4 3 】

別の実施形態においては、血液サンプルにおけるすべての白血球のペルオキシダーゼ染色後散乱光測定及び吸収による示差分析が実施される。

【 0 0 4 4 】

ペルオキシダーゼ染色は、通常、4-クロロ-1-ナフトールとの反応後の細胞のペルオキシダーゼ活性によって行われる。4-クロロ-1-ナフトールはここでは過酸化水素をして、白血球の顆粒におけるペルオキシダーゼ活性の内生位置に暗色の沈殿物が生成するのを可能にする基質として用いられる。その結果、散乱光測定においては、僅かな又は温和なペルオキシダーゼ活性をもった細胞は、より少なく光を吸収し、一方高いペルオキシダーゼ活性を有する細胞はより多く光を吸収することになる。

【 0 0 4 5 】

別の実施形態においては、上述のようなペルオキシダーゼ染色後に加えて、好中球性顆粒球の体積分布が測定される。この場合も、好中球性顆粒球の体積分布が大きいほど、患者血液サンプルのプラスモジウム感染の存在の可能性は大きい。

【 0 0 4 6 】

別の実施形態においては、さらにパラメータとしてペルオキシダーゼ染色後のすべての白血球の体積分布の標準偏差が用いられる。すべての白血球の体積分布の標準偏差が大きいほど、プラスモジウム感染の存在の可能性は大きい。

【 0 0 4 7 】

一実施形態においては、ステップa)における決定、すなわちサンプルにおける多形核好中球性顆粒球の示差分析の実行が、少なくとも好酸球及び好中球の、しかし好塩基球でない白血球の適切な溶解試薬による溶解後に行われる(BASO溶解試薬)。この場合も広範な体積ないし密度分布の存在はプラスモジウム感染の存在の間接証拠である。溶解試薬としては、フタル酸及び洗浄薬を基礎とする混合物が有利であることが判明しており、例えばそのような試薬は塩酸、フタル酸、界面活性剤及び自由選択で保存料を含むことができる。この場合フタル酸と塩酸との比はほぼ2:5:1である(mmol/l中のそれらの濃度に基く)。この試薬によって、赤血球、血小板及びすべての白血球(好塩基球性顆粒球は除く)は溶解される。この付加の方法によってもマラリア原虫特有の予測値を高めることができる。

【 0 0 4 8 】

別の実施形態においては、好塩基球の白血球を除くすべての細胞の特異的溶解後、散乱光ダイヤグラム（小さい角度及び大きい角度の散乱）から非特異性の成分が決定される。この成分が高いほど、プラスモジウム感染が存在する可能性は高い。

【 0 0 4 9 】

本発明に従う検出方法において実行される決定ステップ a)、b) 及び c) は、上述のように、プラスモジウム感染の存在に対し予測性を持っている。本発明の文脈における用語「低い」値は、個々の場合に実行された決定の値が正常な患者サンプル（すなわち感染していない患者サンプル）において得られた標準値に比較して低い値を意味する。

【 0 0 5 0 】

これに対し、ペルオキシダーゼ染色並びに好中球性顆粒球の体積分布及びすべての白血球の体積分布の標準偏差の決定によって達成されるパラメータの付加的利用、並びにすべての細胞の特異的溶解後の散乱光ダイヤグラムからの非特異的成分の決定は、それらの値が高いほど、プラスモジウム感染の存在の可能性が高いことを意味する。

【 0 0 5 1 】

さらに本発明に従う方法の実施形態が添付図面に関連して詳細に説明される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 2 】

【図 1】図 1 は、本発明に従う方法を実施するための通流式細胞測定装置 1 を図式によって示す。

【図 2】図 2 は、赤血球 1 1 に基き、細胞の顆粒性及び密度に関係し $5^{\circ} \sim 15^{\circ}$ の特徴的な範囲で測定される大きい角度の散乱光を図式によって示す。これは細胞密度の決定に相当する。

【図 3】図 3 は、小さい角度の散乱光範囲（ $2^{\circ} \sim 3^{\circ}$ ）における細胞 1 1 の細胞体積（ないし細胞の大きさ）の決定を示す。

【図 4】図 4 は、機器 ADVIA 2120 i によって実施された散乱光ダイヤグラムを示し、マラリアに感染した血液サンプルにおける、血小板及び多形核の白血球（PMN x）に対する体積 1 6 及び密度 1 7 の模範的な変位を示す。

【図 5】図 5 は、機器 ADVIA 2120 i によるペルオキシダーゼ染色後の分析の結果を示し、マラリアに感染したサンプル 2 4 と正常なサンプル 2 5 との間の体積及び密度の分布（PEROX Y 2 6 ないし PEROX X 2 7）を模範的に表わす。「PEROX Y」2 6 は Y 軸に沿ったペルオキシダーゼ陰性の集団の幅を示す。この幅は、マラリアサンプルにおいては正常なサンプルに比較して長く現れる。マラリアサンプル 2 4 に対する結果は、正常なサンプル 2 5 より拡散しているように見られ、このことは体積分布 2 6 及び密度分布 2 7 がより大きいことに帰せられる。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 3 】

以下には、模範的に本発明に従う方法の実施、並びにおなじく本発明に従う方法に基づいて得られたパラメータの評価及びプラスモジウム感染の予測を高い特異度及び感度でもって可能にする 2 つのアルゴリズムが提示される。測定はシーメンス社の ADVIA 2120 i システムによって実施された。

【 0 0 5 4 】

以下の略記が用いられる。

【 0 0 5 5 】

10

20

30

40

【表 1】

パラメータ	説明
PMN x	多形核白血球の密度分布
MPC	血小板の細胞密度の分布
PLT	血液サンプルにおける血小板の総数
PLTモード	ADVIA 2120 i の機器設定
%Basoノイズ	BASO溶解試薬による特有の溶解後の散乱光ダイヤグラム（小さい角度及び大きい角度散乱）からの非特異性の成分
%異常	すべての白血球のクラスタ分布の標準偏差
PEROX Y シグマ	ペルオキシダーゼ染色後の好中球性顆粒球の体積分布

10

【0056】

本発明に従う第一の評価によれば、高い特異度を持ったマラリア感染のための検出方法に対し次のアルゴリズム 1 が明らかになった。

$PLT \times MPC / 100 < 47$ 及び

$PMN x + 0.1635 \times (PLT \times MPC / 100) < 33$

20

【0057】

このアルゴリズムに基いて、サンプルにおける血小板数による細胞密度の分布（PMN x）と血小板の細胞密度の分布とに関する多形核好中球性顆粒球の示差分析の互いに関係する結果は、場合によって別のサブアルゴリズム（1b及び1c）を付加して非常に高い特異度に導くことが明らかになった（以下参照）。

【0058】

別のサブアルゴリズム

$PLT \text{モード} - 30 \times \%Baso \text{ノイズ} < 27$ 及び

$Perox Y \text{シグマ} + 12/70 \times \%異常 > 12$

を付加して、マラリアに対し99%のテスト特異度及び76.5%の感度が明らかになった。

30

【0059】

アルゴリズム 1 はそのかぎりではマラリアの高い有病率を有する国々で有利に用いることができる。

【0060】

低いマラリア有病率の国々に対しては、次のアルゴリズム 2 が勧められよう。

2a. $PMN \text{ピーク} + 14/140 \times (PLT \times MPC) / 100 < 34$

2b. $Baso \text{ノイズ} > 0.074$

2c. $PLT \text{モード} + 25 \times \%Baso \text{ノイズ} < 45$

2d. $Perox Y \text{シグマ} > 6.6$

40

【0061】

観察された特異度は90.2%、感度は98.9%の値であった。言い換えれば、アルゴリズム 2 によって極度に高い感度が達成され得る。

【0062】

それとともに、アルゴリズム 1 によって、大きなサンプル集団においてほとんどすべてのマラリアが陽性のサンプルと識別されることが可能であり、他方アルゴリズム 2 は特にスクリーニング検査に適している。両アルゴリズムの組合せも必然的に追加の利点を伴うことができる。

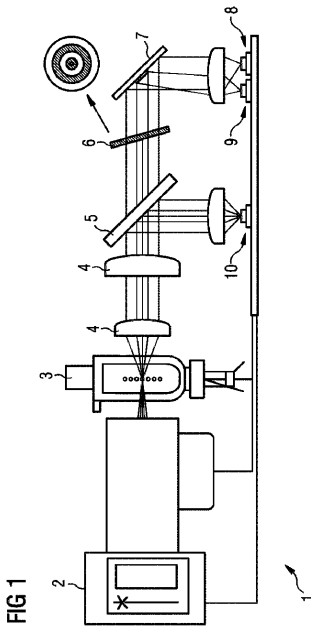
【符号の説明】

【0063】

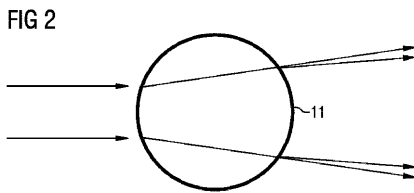
50

1	通流式細胞測定のための装置	
2	レーザー	
3	センサモジュール	
4	光学レンズ	
5	半透過鏡	
6	絞り	
7	鏡	
8	センサ	
9	センサ	
10	センサ	10
11	細胞	
12	B a s o 体積	
13	B a s o 構成	
14	大きい角度の P L T 散乱	
15	小さい角度の P L T 散乱	
16	血小板体積	
17	血小板成分	
18	散乱光ダイヤグラムからの非特異性の成分	
19	リンパ球	
20	大きい染色されない細胞	20
21	単球	
22	好中球性白血球	
23	好酸球性白血球	
24	マラリアサンプル	
25	正常なサンプル	
26	ペルオキシ - シグマ	
27	吸収	

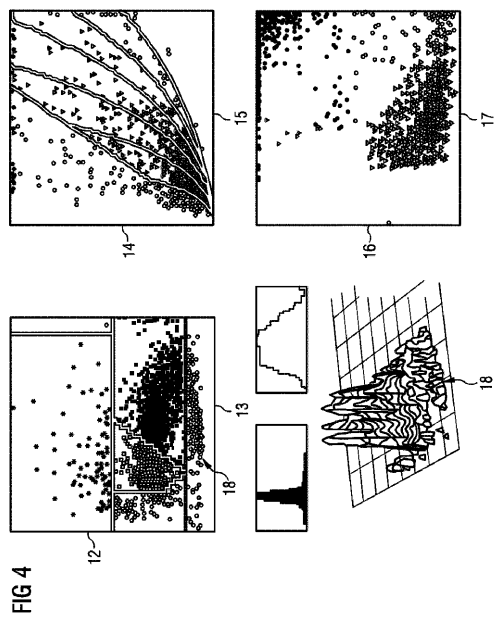
【図 1】



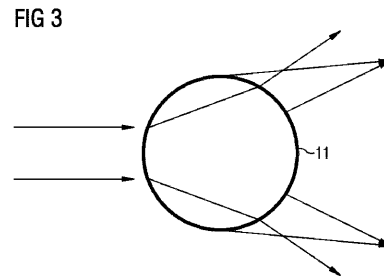
【図 2】



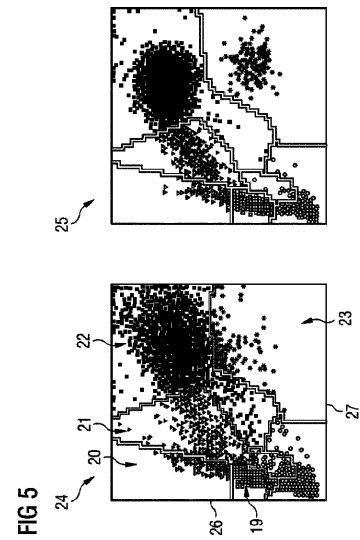
【図 4】



【図 3】



【図 5】



フロントページの続き

- (72)発明者 ヴァン デン ボーガルト、ヤン
オランダ国 エンエル 5711アーヘー ソメレン トゥインストラート 29
(72)発明者 ハイデン、オリファー
ドイツ連邦共和国 91074 ヘルツォーゲンアウラッハ ダクスヴェーク 4

審査官 長谷 潮

- (56)参考文献 特表2007-525674(JP,A)
国際公開第2005/088301(WO,A1)
特開平06-180316(JP,A)
欧州特許出願公開第00545313(EP,A1)
国際公開第2009/136570(WO,A1)
特開2006-313151(JP,A)
米国特許出願公開第2006/0250604(US,A1)
特開平08-313518(JP,A)
米国特許第05888752(US,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/49
G01N 33/48
C12Q 1/02