

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6518629号  
(P6518629)

(45) 発行日 令和1年5月22日(2019.5.22)

(24) 登録日 平成31年4月26日(2019.4.26)

(51) Int.Cl.	F 1
GO 1 N 33/48	(2006.01)
GO 1 N 33/49	(2006.01)
GO 1 N 33/96	(2006.01)
GO 1 N 1/10	(2006.01)
	GO 1 N 33/48
	GO 1 N 33/49
	GO 1 N 33/96
	GO 1 N 1/10
	GO 1 N 1/10

請求項の数 15 (全 28 頁)

(21) 出願番号	特願2016-133961 (P2016-133961)
(22) 出願日	平成28年7月6日(2016.7.6)
(65) 公開番号	特開2017-15712 (P2017-15712A)
(43) 公開日	平成29年1月19日(2017.1.19)
審査請求日	平成29年9月15日(2017.9.15)
(31) 優先権主張番号	特願2015-135067 (P2015-135067)
(32) 優先日	平成27年7月6日(2015.7.6)
(33) 優先権主張国	日本国(JP)

(73) 特許権者	306037311 富士フィルム株式会社 東京都港区西麻布2丁目26番30号
(73) 特許権者	501341624 株式会社リージャー 東京都中央区日本橋人形町2-33-8
(74) 代理人	浜町アクセスビル2階 110000109 特許業務法人特許事務所サイクス
(72) 発明者	山下 清司 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フィルム株式会社内
(72) 発明者	中津川 晴康 神奈川県足柄上郡開成町宮台798番地 富士フィルム株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液検査キット及び血液分析方法

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

血液検体の成分を希釈するための希釈液と、  
前記血液検体の成分及び前記希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器と、  
を含む血液検査キットであり、

前記血液検査キットが、血液中に恒常に存在する第一の標準成分を用いて血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析するための血液検査キットであり、かつ前記標準成分とは異なる血液中に恒常に存在する第二の標準成分を用いて前記分析を検証するための血液検査キットであって、

前記希釈液が、前記の血液中に恒常に存在する第一の標準成分を含有せず、

前記血液検体の成分及び前記希釈液の液量を測定するための目盛りが、前記血液検査キットに含まれる少なくとも1つの構成要素に付与された、血液検査キット。

## 【請求項2】

前記希釈液が、血液中に存在しない標準成分を含み、前記血液検査キットが、前記血液中に存在しない標準成分を用いて血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析するための血液検査キットである、請求項1に記載の血液検査キット。

## 【請求項3】

血液検体の成分を希釈するための希釈液と、

前記血液検体の成分及び前記希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器と、  
を含む血液検査キットであり、

10

20

前記血液検査キットが、血液中に恒常に存在する標準成分を用いて、及び前記血液中に存在しない標準成分を用いて血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析するための血液検査キットであり、

前記希釈液が、前記血液中に恒常に存在する標準成分を含有せず、かつ血液中に存在しない標準成分を含み、

前記血液検体の成分及び前記希釈液の液量を測定するための目盛りが、前記血液検査キットに含まれる少なくとも1つの構成要素に付与された、血液検査キット。

【請求項4】

前記血液検査キットが、血液中に恒常に存在する標準成分を用いて血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析し、且つ前記分析を検証するための血液検査キットであり、前記希釈液が、前記血液中に恒常に存在する標準成分を含有しない、請求項3に記載の血液検査キット。

10

【請求項5】

前記目盛りが、少なくとも、前記血液検体の成分のない希釈液の液量を測定するための目盛りを含む、請求項1から4の何れか一項に記載の血液検査キット。

【請求項6】

前記構成要素が、前記血液検体の成分及び前記希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器である、請求項1から5の何れか一項に記載の血液検査キット。

20

【請求項7】

前記透明容器が、内部断面積が他の部位より小さい部位を有し、内部断面積が他の部位より小さい前記部位に、前記目盛りが付与されている、請求項6に記載の血液検査キット。

【請求項8】

前記透明容器の内部断面積が最も小さい部位に、前記目盛が付与されている、請求項7に記載の血液検査キット。

【請求項9】

前記血液検体の成分が、分離手段により血液検体から分離された血漿成分である、請求項1から8の何れか一項に記載の血液検査キット。

【請求項10】

前記血液中に恒常に存在する標準成分が、ナトリウムイオン、塩化物イオン、総タンパク、及びアルブミンからなる群から選択される成分である、請求項1から9の何れか一項に記載の血液検査キット。

30

【請求項11】

前記血液中に存在しない標準成分が、グリセロール三リン酸又はリチウムである、請求項3から10の何れか一項に記載の血液検査キット。

【請求項12】

前記希釈液が、pH6.5～pH8.0のpH域で緩衝作用を有する緩衝液である、請求項1から11の何れか一項に記載の血液検査キット。

【請求項13】

前記希釈液が、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、2-エチルアミノエタノール、N-メチル-D-グルカミン、ジエタノールアミン、及びトリエタノールアミンからなる群から選択されるアミノアルコール化合物、並びにHEPESとも称する2-[4-(2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジニル)エタンスルホン酸]、TESとも称するN-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸、MOPSとも称する3-モルホリノプロパンスルホン酸、及びBESとも称する(N,N1-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸からなる群から選択される緩衝剤を含む希釈液である、請求項1から12の何れか一項に記載の血液検査キット。

40

【請求項14】

血液検体の成分を希釈するための希釈液と、前記血液検体の成分及び前記希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器とを含む、血液検査キットを用いる血液分析方法で

50

あって、予め決定された所定量以上の前記血液検体の成分含有試料を分析対象試料として選別し、前記所定量未満の前記血液検体の成分含有試料を分析対象試料から除外する工程、及び前記の選別された前記血液検体の成分含有試料を用いて血液の分析を行う工程を含む、血液分析方法であって、

前記血液検査キットが、請求項 1 から 13 の何れか 1 項に記載の血液検査キットであり、前記目盛を用いて、予め決定された所定量以上の前記血液検体の成分含有試料を選別し、前記血液検体の成分が、分離手段により血液検体から分離された血漿成分であり、10  $\mu\text{L}$  以上 70  $\mu\text{L}$  以下の血液を用いて分析を行う、血液分析方法。

【請求項 15】

前記血液検体の成分の希釈率を、下記式 1 で算出し、希釈液中の分析対象成分の濃度に 10 前記希釈率を乗じて前記血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析する、請求項 14 に記載の血液分析方法。

$$\text{式 1} : (A + C) / (B + D)$$

式中、A は、内部標準物質を含む希釈液の測定吸光度を示し、B は、A から血液検体の成分を希釈した希釈液の吸光度を差し引いた吸光度を示し、C は恒常性物質としてナトリウムイオン濃度が 142 mmol/L である測定された吸光度を示し、D は、血液検体の成分を希釈した希釈液中のナトリウムイオンの吸光度を示す。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液検体中の対象成分を分析するための血液検査キット及び血液分析方法に関する。 20

【背景技術】

【0002】

一般に、採血には、医師等一定の有資格者が注射器を用いて静脈から血液を採取する一般採血と、検査対象者が、自分の手の指等に採血針を刺して血液を採取する自己採血とがある。

【0003】

一般採血により採取された血液は、採取容器に密閉された状態で医療機関又は検査機関に搬送され、そこで検査が行われている。血液を血球と血漿とに分離せずに搬送する場合には、医療機関又は検査機関にて遠心分離機により血液を血球と血漿とに分離した後に検査が行われる。また、検査対象者が行う自己採血では、採血後の血液は分離膜により血球と血漿とに分離され、この分離された状態で検査場所に輸送され、そこで検査が行われる。 30

【0004】

特許文献 1 には、検体中の分析対象成分量を測定し、さらに、これ以外の恒常に検体中に元来存在する標準成分の量を測定し、この標準成分の量と、検体中の標準成分の既知濃度とから検体の量を決定し、この検体量と、分析対象成分量とから、検体中の分析対象成分の濃度を決定する定量分析法が記載されている。

【0005】

特許文献 2 には、自己採血により採取された血液検体の検査方法が記載されている。具体的には、1) 容量を定量することなしに採取した定量すべき成分を含有する未知容量の生体試料と一定量の指示物質を含有する一定量の水性溶液とからなる定量用試料を調製する工程、2) 一定量の指示物質を含有する一定量の水性溶液中の指示物質の濃度 ( $C_1$ ) と定量用試料中の指示物質の濃度 ( $C_2$ ) とから生体試料の希釈倍率 ( $a$ ) を求める工程、3) 定量用試料中の定量すべき成分の濃度 ( $Y$ ) を求める工程、4) 上記 2) で求めた生体試料希釈倍率 ( $a$ ) と上記 3) で求めた定量用試料中の定量すべき物質の濃度 ( $Y$ ) とから生体試料中の定量すべき成分を決定する工程を含む生体試料中の定量すべき成分の定量方法が記載されている。 40

【0006】

10

20

30

40

50

また、特許文献3には、血液希釈定量器具を用いてヒトや動物から微量血液を採取しそのまま又は希釈したのち一定量を他の機器や容器又は直接試薬に供給することが記載されている。さらに特許文献4には、希釈用水溶液中の指示物質の吸光度を利用して、生物学的試料中の定量すべき成分の濃度を定量する方法が記載されている。

【0007】

一方、血液検体を検査対象者が採取する際には、小型ナイフが具備されたランセットにて採取し、血液中の任意成分の濃度の定量に使用されているが、通常100μL以上の血液検体を採取することが必要とされている。

【先行技術文献】

【特許文献】

10

【0008】

【特許文献1】特開2001-330603号公報

【特許文献2】特開2003-161729号公報

【特許文献3】特開2009-122082号公報

【特許文献4】特開2009-109196号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

特許文献1に記載の方法では、分析精度が低下し、結果がばらつき、分析対象成分の安定性の保証が不十分になることがあり、また、ナトリウムイオンや塩化物イオンの濃度を外部標準として利用できない問題もあった。

20

【0010】

特許文献2の方法においても、血液採取量にばらつきがあり、採取量が少ない場合には、希釈後の標準物質の希釈率が小さくなることや、血液成分量そのものが低下するために、検査精度の信頼性が低下するという問題があった。また、緩衝液で希釈する方法は生体成分がpH7.4の生理的条件の緩衝液で保存され、輸送中の安定性にも優れているが、標準物質を添加した緩衝液への試料の添加による標準物質の希釈率が小さく、少ない試料添加では測定誤差が生じ易いという問題がある。

【0011】

上記の通り、微量血液での血液検査を高精度で行うためには、特許文献1又は特許文献2に記載の方法でも検査精度の確保が充分でなかった。

30

【0012】

一方、採血者にとっては、血液採取は皮膚を傷つける侵襲的な行為であり、また血液の赤色を凝視することに不快を感じる場合もあることから、できるだけ早く採血して、傷部から流出している血液を止めたいと考えることが一般的である。このような事情から、採血量は必ずしも常に一定量であるとは限らず、ばらつく場合が多い。血液採取量のばらつきが大きいと希釈倍率の精度低下を招くことから、採血量の可視化及び一定化が望まれている。

【0013】

本発明が解決しようとする課題は、採血量の可視化及び一定化を図ることによって微量血液での血液検査を高精度で行うことができる、血液検査キット及び血液分析方法を提供することである。

40

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、血液検体の成分を希釈するための希釈液と、血液検体の成分及び希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器とを含む血液検査キットにおいて、血液検体の成分及び希釈液の液量を測定するための目盛りを、血液検査キットに含まれる少なくとも1つの構成要素に付与することによって、上記課題を解決できることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明によれば以下の発明が提供される。

50

## 【0015】

- (1) 血液検体の成分を希釈するための希釈液と、  
血液検体の成分及び希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器と、  
を含む血液検査キットであって、  
血液検体の成分及び希釈液の液量を測定するための目盛りが、血液検査キットに含まれ  
る少なくとも1つの構成要素に付与された、血液検査キット。
- (2) 目盛りが、少なくとも、血液検体の成分のない希釈液の液量を測定するための目  
盛りを含む、(1)に記載の血液検査キット。
- (3) 構成要素が、血液検体の成分及び希釈液を収容するための少なくとも1つの透明  
容器である、(1)又は(2)に記載の血液検査キット。
- (4) 透明容器が、内部断面積が他の部位より小さい部位を有し、内部断面積が他の部  
位より小さい部位に、目盛りが付与されている、(3)に記載の血液検査キット。
- (5) 透明容器の内部断面積が最も小さい部位に、目盛が付与されている、(4)に記  
載の血液検査キット。
- (6) 血液検体の成分が、分離手段により血液検体から分離された血漿成分である、(1)  
から(5)の何れかに記載の血液検査キット。
- (7) 血液検査キットが、血液中に恒常に存在する標準成分を用いて血液検体の成分  
中の対象成分の濃度を分析するための血液検査キットであり、希釈液が、標準成分を含有  
しない、(1)から(6)の何れかに記載の血液検査キット。
- (8) 血液検査キットが、血液中に恒常に存在する標準成分を用いて血液検体の成分  
中の対象成分の濃度を分析し、且つ上記分析を検証するための血液検査キットであり、上  
記希釈液が、上記標準成分を含有しない、(1)から(6)の何れかに記載の血液検査キ  
ット。
- (9) 標準成分が、ナトリウムイオン、塩化物イオン、総タンパク、及びアルブミンか  
らなる群から選択される成分である、(7)又は(8)に記載の血液検査キット。
- (10) 希釈液が、血液中に存在しない標準成分を含み、血液検査キットが、血液中に  
存在しない標準成分を用いて血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析するための血液検  
査キットである、(1)から(9)の何れかに記載の血液検査キット。
- (11) 血液中に存在しない標準成分が、グリセロール三リン酸又はリチウムである、  
(10)に記載の血液検査キット。
- (12) 希釈液が、pH6.5～pH8.0のpH域で緩衝作用を有する緩衝液である、(1)から  
(11)の何れかに記載の血液検査キット。
- (13) 希釈液が、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、2-エチルアミノエタノール、  
N-メチル-D-グルカミン、ジエタノールアミン、及びトリエタノールアミンからなる群か  
ら選択されるアミノアルコール化合物、並びにHEPESとも称する2-[4-(2-ヒドロキシエ  
チル-1-ピペラジニル)エタンスルホン酸]、TESとも称するN-トリス(ヒドロキシメチル)  
メチル-2-アミノエタンスルホン酸、MOPSとも称する3-モルホリノプロパンスルホン酸、  
及びBESとも称する(N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸からなる  
群から選択される緩衝剤を含む希釈液である、(1)から(12)の何れかに記載の血液  
検査キット。
- (14) 血液検体の成分を希釈するための希釈液と、血液検体の成分及び希釈液を収容  
するための少なくとも1つの透明容器とを含む、血液検査キットを用いる血液分析方法で  
あって、予め決定された所定量以上の血液検体の成分含有試料を分析対象試料として選別  
し、所定量未満の血液検体の成分含有試料を分析対象試料から除外する工程、及び選別さ  
れた血液検体の成分含有試料を用いて血液の分析を行う工程を含む、血液分析方法。
- (15) 血液検査キットが、(1)から(13)の何れかに記載の血液検査キットであ  
り、目盛を用いて、予め決定された所定量以上の血液検体の成分含有試料を選別する、(1  
4)に記載の血液分析方法。
- (16) 血液検体の成分が、分離手段により血液検体から分離された血漿成分である、  
(14)又は(15)に記載の血液分析方法。

10

20

30

40

50

(17) 血液検体の成分の希釈率を、下記式1で算出し、希釈液中の分析対象成分の濃度に、希釈率を乗じて血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析する、(14)から(16)の何れかに記載の血液分析方法。

式1：  $(A + C) / (B + D)$

式中、Aは、内部標準物質を含む希釈液の測定吸光度を示し、Bは、Aから血液検体の成分を希釈した希釈液の吸光度を差し引いた吸光度を示し、Cは恒常性物質としてナトリウムイオン濃度が142mmol/Lである測定された吸光度を示し、Dは、血液検体の成分を希釈した希釈液中のナトリウムイオンの吸光度を示す。

(18) 10μL以上70μL以下の血液を用いて分析を行う、(14)から(17)の何れかに記載の血液分析方法。

10

【発明の効果】

【0016】

本発明の血液検査キット及び血液分析方法によれば、採血量の可視化及び一定化を図ることによって微量血液での血液検査を高精度で行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

【図1】図1は、希釈された血液検体から回収された血漿成分を収容するための容器の構成の一例を示す。

【図2】図2は、血漿分離及び密閉時のボトルとシリンダー目盛りの概念図を示す。

【図3】図3は、容器の形状と目盛の位置の一例を示す。

20

【図4】図4は、容器の形状と目盛の位置の一例を示す。

【図5】図5は、容器の形状と目盛の位置の一例を示す。

【図6】図6は、ナトリウム酵素的測定法の直線性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0018】

以下、本発明の実施の形態を説明する。

血液中に恒常に存在する標準成分のことを、外部標準物質又は外部標準と言う。

血液中に存在しない標準成分のことを、内部標準物質又は内部標準と言う。

【0019】

病気の治療又は診断あるいは健康管理のために、医療機関又は検診場所においては、患者又は検診者の血液を静脈から採取して検査することが行われている。しかし、検査結果を知るために長時間待つ必要があり、小児にとっては静脈から血液を採血することが負荷となる場合がある。また検査のための移動を含めると半日以上の時間を必要とするために、患者又は検診者にとっては不都合を感じる場合があった。上記に鑑みて、患者又は検診者が、自宅や検査室等で微量の血液を自己採血し、それを安定に保管及び搬送することが知られている。

30

【0020】

微量の血液を採取する方法として濾紙を用いて血液分析を行う方法が特開平10-104226号公報に記載され、また濾紙の代わりに血液保持性の高い多孔質材を用いる方法が特許文献1に開示されている。上記した方法においては、素材に吸収された血液成分を緩衝液などで抽出して測定することを目的として、血液を溶出する際に用いる緩衝液による希釈率を見積るために、血液に恒常に存在するナトリウムイオン、塩化物イオン、カルシウムイオン又はタンパク質などを基準物質として用いている。しかし、特許文献1の方法には、血液の採取量にばらつきがあり、採取した血液の希釈率が高い場合には分析精度が低下して結果がばらつくという問題があり、また血液を凝集させて固化するため分析対象成分の安定性が保証されないという問題もあった。また、乾燥した試料から分析対象成分を抽出する緩衝液には、pH調整や分析対象成分の安定化のためにNaOH、NaCl又はHClを添加する必要があり、このため、血液中の成分で最も恒常性があり個体間差が少ないナトリウムイオンや塩化物イオンの濃度を、対象成分濃度の補正のための外部標準として利用できないという問題がある。

40

50

## 【0021】

一方、採取した微量血液を内部標準入り緩衝液で希釈し、内部標準物質の希釈倍率から希釈血漿中に存在する成分量を定量する方法が特許文献2に開示されている。特許文献2では、内部標準物質としてN-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン・ナトリウム塩(HSDA)、あるいはアシッドブルー9(ブリリアントブルーFCF)が使用されており、HSDAを用いた場合に、希釈後、第二試薬を用いて酵素反応により生成した色素の吸光度を調べることで希釈率を求める方法が、アシッドブルー9を用いた場合に、血清を添加する前後のHEPES緩衝液の吸光度から希釈倍率を求める方法が、開示されている。また、血液を安定に保持するための緩衝剤や防腐剤が用いられている。このような処方は、血液を凝固させないことでその成分の安定性を維持することを実現したが、やはり血液採取量がバラツキ、採取量が少ない場合には、希釈後の内部標準物質の希釈率が小さくなることや、血液成分量そのものが低下する為に、検査精度の信頼性が低下することが問題であった。また、緩衝液で希釈する方法は生体成分がpH7.4の生理的条件の緩衝液で保存され、輸送中の安定性にも優れているが、内部標準添加緩衝液への試料による内部標準の希釈率が小さく、少ない試料添加では測定誤差が生じ易い問題があった。10

## 【0022】

上記の通り、微量血液での血液検査を行う場合には、特許文献1に記載されている外部標準物質の使用や、特許文献2に記載されている内部標準物質を含有する緩衝液の使用だけでは、検査精度の確保が十分ではなかった。20

## 【0023】

血液中の恒常性物質であるナトリウムイオンにおいては、正常値134～146mmol/L/リットルの分布の幅を有するため、より正確な希釈倍率を算出することが必要となってくる。希釈倍率の精度が低下すると検査精度に悪影響を与えて、検査の信頼性を損なってしまうリスクが高まる。また、血液採取は皮膚を傷つける侵襲的な行為であり、採血者にとっては採血行為を早く終わらせたいと考えることもあるため、採血量は必ずしも常に一定量であるとは限らず、ばらついてしまう要因を含んでいる。従って、血液採取量が多かったり少なかったりすると、上記のように希釈倍率の精度低下を招いてしまうため、採血量の可視化、一定化が望まれてきた。30

## 【0024】

特許文献1には、外部標準の記載はあるが、採血量の可視化、一定化に関する記載はない。特許文献2には、内部標準に関する記載はあるが外部標準との併用の記載はない。特許文献2には、希釈液として使用する緩衝液から外部標準物質として好ましいナトリウムやカリウム等の恒常性が高い物質を除去することについての記載はなく、それを達成するための具体的な手段の記載もない。特許文献1及び2には、微量の血液を精度高く自己採血で定量的に採取する手段について開示されていない。40

## 【0025】

本発明の血液検査キット及び血液分析方法によれば、採血量が常に一定量ではなくばらついている場合であっても、血液を希釈して血漿を回収した容器において採血量を把握することができ、これにより、特許文献1及び特許文献2に記載されている方法と比較してより高い精度で希釈倍率を求めて測定対象成分の分析を行うことが可能である。さらに内部標準を用いて希釈倍率を求める方法を併用することにより、さらに精度を高めることが可能である。上記の通り、採血量が一定の範囲内となるようにして採血量のばらつきの少ない状態で希釈倍率を求めて測定対象成分の分析を行うことによって高精度の測定を行うことができることは従来知られておらず、本発明の構成により精度の高い血液分析が可能となったことは全く予想外なことであった。50

## 【0026】

本発明の血液検査キット及び血液分析方法によれば、患者自らが血液を採血する場合、たとえ採血量が常に一定量ではなくばらついていたとしても、血液を希釈し血漿分離した容器から採血量が判ることで、採血者、分析者にとって、希釈倍率の結果を狭い範囲で

予測することが可能となり、再現性良い希釈率が実現でき、測定対象成分の分析を精度よく行うことができる。本発明の血液検査キットを用いた微量血液採取は、時間と場所に制限がないため、医療機関に出向く時間がない事例、災害時、遠隔医療、健康管理などに応用でき、未病の人を早期発見できることから医療費の節減にも貢献できる。また大量の試料を効率的に市販の生化学自動分析装置で測定できる。測定した検査データは、例えば電子データ化してスマートフォンに送信することで日常的に健康管理や疾病の早期発見へのシステムに利用できる。また本発明によれば、微量の血液(65  $\mu$ L)を用いて生化学検査13項目、腫瘍マーカー、肝炎検査など多くの検査ができる。

### 【0027】

#### [1] 血液検査キット

10

本発明の血液検査キットは、血液検体の成分を希釈するための希釈液と、血液検体の成分及び希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器とを含む血液検査キットであって、血液検体の成分及び希釈液の液量を測定するための目盛りが、血液検査キットに含まれる少なくとも1つの構成要素に付与された血液検査キットである。

### 【0028】

#### (1) 血液検体の成分を希釈するための希釈液

本発明の血液検査キットは、患者が採血した血液を希釈して医療機関又は検査機関に輸送して測定対象成分の分析を行うためのものであり、採血から分析までには長時間放置される可能性がある。その間に、血液の希釈液中において対象成分の分解や変性を防止することが好ましい。血液のpHは、健常者では通常pH 7.30~7.40程度で一定に保たれている。従って、対象成分の分解や変性を防止するために、希釈液は、好ましくはpH 6.5~pH 8.0であり、より好ましくはpH 7.0~pH 7.5であり、更に好ましくはpH 7.3~pH 7.4であり、pHの変動を抑える緩衝成分を含有する緩衝液であることが好ましい。

20

### 【0029】

緩衝液の種類としては、酢酸緩衝液(Na)、リン酸緩衝液(Na)、クエン酸緩衝液(Na)、ホウ酸緩衝液(Na)、酒石酸緩衝液(Na)、Tris(トリス(ヒドロキシメチル)アミノエタン)緩衝液(CL)、HEPES([2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸])緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水(Na)等が知られている。これらの中でpH 7.0~pH 8.0付近の緩衝液としては、リン酸緩衝液、Tris緩衝液、HEPES緩衝液が代表的なものである。しかし、リン酸緩衝液はリン酸のナトリウム塩が含まれている。Tris緩衝液は、解離pKa(Kaは酸解離定数)は8.08であるため、pH 7.0~pH 8.0付近で緩衝能を持たせるためには通常は塩酸と組み合わせて使用される。HEPESのスルホン酸の解離のpKaは7.55であり、イオン強度一定での緩衝溶液を調整するため、通常は水酸化ナトリウムと塩化ナトリウムとHEPESの混合物が用いられる。これらはpHを一定に保つ作用を有する緩衝液としては有用であるが、本発明において外部標準物質として用いることが好ましい物質であるナトリウムイオンあるいは塩化物イオンを含有するため、本発明への適用は好ましくない。そこで、本発明者らは鋭意検討し、ナトリウムイオンや塩化物イオンを含有しない新たな緩衝液を見出した。

30

### 【0030】

本発明で用いることができるナトリウムイオン及び塩化物イオンを含有しない希釈液は好ましくは、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)、2-エチルアミノエタノール、N-メチル-D-グルカミン、ジエタノールアミン、及びトリエタノールアミンからなる群から選択される少なくとも1種のアミノアルコール化合物、並びにGood's緩衝液(グッドバッファー)でpKaが7.4付近の緩衝剤であるHEPESとも称する2-[4-(2-ヒドロキシエチル-1-ピペラジニル)エタンスルホン酸](pKa=7.55)、TESとも称するN-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸(pKa=7.50)、MOPSとも称する3-モルホリノプロパンスルホン酸(pKa=7.20)、及びBESとも称する(N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸(pKa=7.1

40

50

5 ) からなる群から選択される少なくとも 1 種の緩衝剤を含む希釈液である。上記の中でも、 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール ( A M P ) と HEPES 、 TES 、 MOPS 又は B E S の組み合わせが好ましく、さらに、 2 - アミノ - 2 - メチル - 1 - プロパノール ( A M P ) と HEPES の組み合わせが最も好ましい。

【 0031 】

上記緩衝液を作製するためには、アミノアルコールと Good's 緩衝液を 1 : 2 ~ 2 : 1 、好ましくは 1 : 1 . 5 ~ 1 . 5 : 1 、更に好ましくは 1 : 1 の濃度比で混合すればよい。緩衝液の濃度は限定されないが、アミノアルコール又は Good's 緩衝液の濃度は、 0 . 1 ~ 1 0 0 0 m M / L 、好ましくは、 1 ~ 5 0 0 m M / L 、さらに好ましくは 1 0 ~ 1 0 0 m M / L である。

10

【 0032 】

緩衝液中には、分析対象成分を安定に保つことを目的にキレート剤、界面活性剤、抗菌剤、防腐剤、補酵素、糖類等が含有されても良い。キレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩 ( E D T A ) 、クエン酸塩、シウ酸塩等が挙げられる。界面活性剤としては、例えは、陽イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤、両性界面活性剤又は非イオン界面活性剤が挙げられる。防腐剤としては、たとえば、アジ化ナトリウムや抗生物質等が挙げられる。補酵素としては、ピリドキサールリン酸、マグネシウム、亜鉛等が挙げられる。赤血球安定化剤の糖類としては、マンニトール、デキストロース、オリゴ糖等が挙げられる。特に、抗生物質の添加により、手指採血時に手指表面から一部混入する細菌の増殖を抑えることができ、細菌による生体成分の分解を抑制し、生体成分の安定化を図ることができる。

20

【 0033 】

これらの緩衝液で希釈された成分は生化学・免疫自動分析装置での種々の測定法を用いた場合でも測定に干渉しないこと、さらに血球が溶血をしないことや生体成分が 37 でもできるだけ安定に保存できることが好ましい。

【 0034 】

生体試料に全血を使用する場合には、希釈した血液中の血球成分をフィルター濾過する必要から、緩衝液の浸透圧を血液と同等 ( 2 8 5 m O s m / k g ( m O s m / k g : 溶液の水 1 k g が持つ浸透圧で、イオンのミリモル数 ) ) 又はそれ以上とすることにより血球の溶血を防止することができる。浸透圧は、対象成分の測定、および血液中に恒常に存在する標準成分の測定に影響しない塩類、糖類、緩衝剤等により、等張に調整することができる。

30

【 0035 】

血液検体の成分を希釈するための希釈液の第一の例としては、希釈倍率を求める時に使用する血液中に恒常に存在する物質 ( 以下、恒常性物質ともいう ) を含有しない希釈液である。本明細書において「含有しない」とは、「実質的に含有しない」ことを意味する。ここで、「実質的に含有しない」とは、希釈倍率を求める時に使用する恒常性物質をまったく含まないか、あるいは含まれていたとしても、血液検体を希釈した後の希釈液の恒常性物質の測定に影響を及ぼさない程度の極微量の濃度で含まれる場合を意味する。恒常性物質として、ナトリウムイオン又は塩化物イオンを用いる場合には、希釈液としては、ナトリウムイオン又は塩化物イオンを実質的に含有しない希釈液を使用する。

40

【 0036 】

本発明の血液検査キットが、血液中に恒常に存在する標準成分を用いて血液検体中の対象成分の濃度を分析するための血液検査キットである場合には、希釈液は、上記標準成分を含有しない希釈液である。

【 0037 】

血液検体の成分を希釈するための希釈液の第二の例としては、内部標準物質を含有する希釈液である。内部標準物質は、生体試料の希釈に用いる希釈液に所定の濃度になるように添加して用いることができる。内部標準物質としては、血液検体中に全く含まれないか、若しくは含まれていたとしても極微量である物質を使用することができる。内部標準物

50

質としては、血液検体中の対象成分の測定に干渉を与えない物質、血液検体中の生体酵素の作用を受けて分解しない物質、希釈液中で安定な物質、血球膜を透過せず血球中に含まれない物質、希釈液の保存容器に吸着しない物質、精度良く測定できる検出系が利用できる物質を用いることが好ましい。

#### 【0038】

内部標準物質としては、緩衝液である希釈液に添加した状態で長期間保管しても安定な物質が好ましい。内部標準物質の例としては、グリセロール三リン酸、アルカリ金属としてLi、Rb、Cs、又はFr、そしてアルカリ土類金属としてはSr、Ba、又はRaが挙げられ、この中では、グリセロール三リン酸又はLiが好ましい。これらの内部標準試料は、血液希釈後の濃度測定時に第二の試薬を添加することで発色させ、その発色濃度から希釈血液中の濃度を求めることができる。例えば、緩衝液に添加したリチウム内部標準物質の測定は、キレート比色法（ハロゲン化ポルフィリンキレート法：パーフルオロ-5,10,15,20-テトラフェニル-21H,23H-ポルフィリン）を利用して生化学自動分析装置を用いて、微量の試料を数多く容易に測定が可能である。

10

#### 【0039】

本発明の血液検査キットが、血液中に存在しない標準成分を用いて血液検体中の対象成分の濃度を分析するための血液検査キットである場合には、希釈液は、上記の血液中に存在しない標準成分を含む希釈液である。

#### 【0040】

血液検体を希釈するための希釈液の第三の例としては、希釈倍率を求める時に使用する血液中に恒常的に存在する標準成分を含有せず、かつ内部標準物質を含有する希釈液である。

20

#### 【0041】

##### (2) 血液検体の成分及び希釈液を収容するための透明容器及びその他の構成要素

血液検体の成分及び希釈液を収容するための透明容器の形状及び大きさは特に限定されない。なお、本発明で言う透明とは、観測者が内部の液量を確認できる程度に透明であればよく、半透明などを含む概念である。

容器の材料は、破損しにくさ、衛生面、価格等の観点から、合成樹脂であることが好ましい。例えば、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、ポリ塩化ビニリデン、ポリスチレン、ポリ酢酸ビニル、ポリウレタン、ポリエチレンテレフタレート、ポリ乳酸、アクリロニトリルブタジエンスチレン樹脂（ABS樹脂）、アクリロニトリルスチレン樹脂（AS樹脂）、アクリル樹脂（PMMA）、ポリカーボネート、シリコーン樹脂、シリコーンゴム等が挙げられる。

30

#### 【0042】

本発明の血液検査キットの一例としては、血液検体の成分を希釈するための希釈液、希釈液が収容された第一の収容器具、希釈液で希釈された血液検体から血漿を分離回収するための分離手段としての分離器具、分離器具を保持するための保持器具、回収した血漿を収容するための第二の収容器具、及び収容した血漿を第二の収容器具内に維持するための封止器具、皮膚に傷をつけて血液を皮膚外に染み出させる針や、ランセット、傷に貼る絆創膏又は消毒部材（例えば、イソプロパノール（70質量%イソプロパノールなど）又はエタノールなどを含浸させた不織布）、取扱説明書等、を備えることができる。

40

#### 【0043】

希釈された血液検体から血漿成分を回収するための分離手段としては、分離膜である態様が好ましく、血球成分を分離可能な細孔を有するフィルタがより好ましい。本発明においては、血液検体の成分としては、分離手段により血液検体から分離された血漿成分を用いる態様が好ましい。

#### 【0044】

第一の収容器具、及び第二の収容器具は、1つの器具を第一の収容器具及び第二の収容器具として兼用してもよいし、別々の器具を備える態様であってもよい。収容器具内にある血液を希釈した希釈液を、患者、あるいは、希釈倍率の測定や分析対象成分の分析を行

50

う測定者に確認可能とするために、第一の収容器具、及び第二の収容器具は、透明な素材でできていることが好ましい。

【0045】

分離器具を保持する保持器具は、ガスケットである態様が好ましい。また、封止器具としては、収容器具が筒状の形状をした器具などの場合には、開口に蓋をすることが可能なキャップや、螺旋状の溝を有する蓋、あるいはゴム栓などを使用することができる。

【0046】

上記の構成により、希釈液により血液を希釈した後に、直ちに血漿血球分離する機能を血液と希釈液の混合容器に付与することにより、血液成分の安定性と 血球細胞からの溶血による成分の変動の影響を排除し、血液採取後の試料の安定性を付与できる。

10

【0047】

希釈液が収容された第一の収容器具、希釈液で希釈された血液検体から血漿を分離回収するための分離器具、分離器具を保持するための保持器具、回収した血漿を収容するための第二の収容器具、及び収容した血漿を第二の収容器具内に維持するための封止器具についての具体的な構成例としては、例えば、特許第3597827号公報の図1から図13に記載された器具を使用することができる。特許第3597827号公報の図1を、本願の図1として援用する。

【0048】

血液分離器具1は採血容器2（希釈液が収容された第一の収容器具）と、採血容器2に嵌挿可能な筒体3（回収した血漿を収容するための第二の収容器具）と、筒体3に冠着可能なキャップピストン4と、キャップピストン4の下端に設けられた密閉蓋5（封止器具）とを備え、使用前は、図1に示すように、採血容器2の上端開口部はキャップ6によりパッキン7を介して密閉されている。本発明における希釈された血液検体を収容するための容器は、図1の構成においては、採血容器2と筒体3の組み合わせに対応する。即ち、希釈された血液検体を収容するための容器は1個でも2個以上の組み合わせでもよい。

20

【0049】

採血容器2は透明な材質製で円筒状を成し、その上端部には、外面に螺子部8が形成され、内面に係止部9が突設されている。また、採血容器2の下端部には、逆円錐状の底部10が形成され、底部10の周囲に円筒状の脚部11が形成されている。脚部11は、血液の分析検査時に使用するサンプルカップと同一外径を有しており、好ましくは、その下端の対向する位置にそれぞれ鉛直方向にスリット溝12が形成されている。さらに、採血容器2内には、図1に示されているように、所要量、例えば、500mm<sup>3</sup>の希釈液13が予め入れられていてもよい。

30

【0050】

筒体3は透明な材質製で円筒状を成し、その上端部には拡径部14が形成されている。拡径部14は薄肉部15を介して本体部16と接続されている。筒体3の下端部には、縮径部18が形成され、縮径部18の内面には係止突起部19が形成されている。さらに、縮径部18の下端部には外鍔部20（保持器具）が形成され、外鍔部20の下端開口部は濾過膜21（分離器具）により覆われ、濾過膜21は血液中の血漿の通過を許容し、血球の通過を阻止するようになっている。

40

【0051】

縮径部18の外周にはシリコンゴム製のカバー22が装着されている（図1）。

【0052】

キャップピストン4は、略円筒状の摘み部26と、摘み部26と同心で下方に延びる心棒部27とで構成されている。摘み部26の内側上端部には筒体3の拡径部14が嵌合可能な円筒状の空間28が形成され、また、その下方は螺刻され、螺子に螺合可能となっている。心棒部27はその下端部29がピン状に形成され、下端部29に密閉蓋5が着脱可能に設けられている（図1参照）。密閉蓋5はシリコンゴム製である。

【0053】

上記した器具による血液分離方法の詳細は、特許第3597827号公報の段落番号0

50

023～0026並びに図12及び図13に記載されており、その内容は本明細書に引用される。

#### 【0054】

##### (3) 目盛り

本発明においては、血液検体の成分及び希釈液の液量を測定するための目盛りが、血液検査キットに含まれる少なくとも1つの構成要素に付与されている。上記目盛りにより、採血者又は検査者は、採血量が一定量以上であることを確認することができる。目盛りの数は一本でもよいし、二本以上の複数でもよい。例えば、最低限必要とされる一定量を示す一本の目盛りを付与する場合、下限量と上限量とを示す二本の目盛りを付与する場合、並びに下限量と上限量とその中間の標準量とを示す三本の目盛りを付与する場合などが可能である。さらに目盛りには色を区別することで目盛りに意味を持たせることが可能である。また、目盛りは、少なくとも、血液検体の成分のない希釈液の液量を測定するための目盛りを含んでいてもよい。希釈液の計量時及び血液採取時に液量の目標値を目盛りにより示すことで、希釈液の成分設計に関し適切な血液量と希釈液量を再現良く設計できる。

10

#### 【0055】

目盛りは、採血者又は検査者は、採血量が一定量以上であることを確認することができる限り、血液検査キットの任意の構成要素に付与することができるが、目盛りは、好ましくは、血液検体の成分及び希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器に付与することができる。上記透明容器に目盛りをつける場合、液を挟むように目盛りを付けることが可能であり、液量の把握が容易となるため、好ましい。

20

#### 【0056】

血液検体の成分及び希釈液を収容するための透明容器以外の構成要素に目盛りを付与する場合の上記構成要素としては、逆流防止のための密閉キャップの心棒部、などが挙げられる。

#### 【0057】

血液検査キットが、血液を希釈する希釈液を収納したボトル（容器）と、血液の血球成分と血漿成分とに分離する分離膜と、分離膜を保持するガスケットと分離後の血漿成分を収納するシリンダー（容器）を有する構成について説明する。この構成においては、血液採取なしの状態でボトルにシリンダーを差し込んで分離し、さらに分離液の逆流防止のための密閉キャップの心棒部が挿入された状態での液面からの液量増分が計測可能な目盛が付与されていることで、採血量の血漿成分量を把握することができる。ボトル及びシリンダーがともに透明であれば、目盛はいずれにあってもよい。また、ボトルにシリンダーを差し込んだとき、ボトル底面に接触するまでシリンダーを押し込むことになるが、ボトル、シリンダーのいずれにも基準線が記されていて、シリンダーを十分に押し込んだ時、各々の基準線位置が一致するようにすると、押し込み不足により血漿成分量を正確に計測できないといったことを防止できる。

30

#### 【0058】

血液検体の成分及び希釈液を収容するための透明容器の内径は、希釈後に分離された希釈された血漿液量が、目盛り位置と一致していることが好ましい。その際の容器内径は、検出感度を上げるために5mm以下が好ましく、3mm程度がより好ましい。例えば原理的に3mmの場合目盛りの位置±0.5mmを視認できれば±約14μLの差異を検出でき、5mmの場合±約40μLの差異を検出できる。

40

#### 【0059】

さらに血漿分離後に逆流防止弁を押し込むための心棒部の直径を2mmとし、液量検出領域を5mmの幅として、その領域でのシリンダー内壁の径を3mmとするならば目盛りの位置精度が±1.0mmでも心棒部によるシリンダー内の容積低減効果により±12μL程度の精度で液量差異を検出できる。この様な場合、目盛り線を目標の液量±1.0mmの幅で3本以上入れること液量不足の程度は12μL以下に低減可能である。この様子を図2に示す。

#### 【0060】

50

図2は、血漿分離及び密閉時のボトルとシリンダー目盛りの概念図を示す。透明ボトル101の下部に設置された血液を、血漿分離膜を含むガスケット102中の血漿分離膜でろ過することにより、透明ボトル101の下部には血球103が主として存在し、透明ボトルの内部に装着された透明シリンダ104の内部には主として血漿105が存在するようになる。血球と血漿とを分離した後、一方の先端に逆流防止弁106を有し、他方の先端に封止キャップ107を有する心棒部108を、透明シリンダ104の内部に挿入し、逆流防止弁106を血漿分離膜を含むガスケット102中に装着する。これにより、透明シリンダ104内の血漿105が、透明ボトルの下部の血球が存在する場所に逆流しなくなる。図2において、目盛り109は、透明ボトルに一本、透明シリンダに三本付与されている。透明ボトルの目盛りと透明シリンダの真ん中の目盛りは標準量を示す。透明シリンダの下の目盛り及び上の目盛りはそれぞれ下限量と上限量を示す。また、希釀液の目盛り110は、血漿で希釀しない希釀液のみの場合の目盛りを示す。この目盛りから増加した体積分が、希釀される前の血漿成分の体積に相当する。

#### 【0061】

血液検体の成分及び希釀液の混合液を収容するための少なくとも1つの透明容器に目盛りを付与する場合、透明容器は、内部断面積が他の部位より小さい部位を有し、内部断面積が他の部位より小さい上記部位に、目盛りが付与されていることが好ましい。透明容器の内部断面積が最も小さい部位に、目盛が付与されていることがさらに好ましい。内部断面積とは、透明容器の内側の空間を、一水平面で切断した際の断面積を意味する。目盛を有する部位は液体量を正確に計測する部分であるので、上記の通り、内部断面積が小さい部位に目盛りを付与することにより、高精度の計測が可能となる。

容器が円柱状の場合には、内径が小さい部位を設けることにより、内部断面積が小さい部位を設けることができる。例えば、シリンダの一部が細くくびれていて、上記くびれた部分に目盛を付与することによって血漿成分量を正確に計測できる。但し、その後に、分離液の逆流防止のための密閉キャップの心棒部を挿入する場合には、シリンダのくびれた部分は心棒部が挿入できる程度の太さを有し、心棒部の容量も考慮して、血漿成分量が正確に計測できるようにくびれ部分に目盛が付与されていることが好ましい。

#### 【0062】

内部断面積が他の部位より小さい部位としては、例えば、内径が細くなっている場合には、細くなった部位の内径が、細くなっていない内径に対して、2分の1以下となる部位を設けることが好ましい。

#### 【0063】

シリンダの一部が細くくびれている形態を図3及び図4に示す。図3及び図4において、シリンダ201の上部の細い部分に目盛り202が付与されている。また、希釀液の目盛り206が付与されている。

図3は、容器の太さが他の部位より小さい部位を有する形態（容器外壁の厚さは同じ）を示し、図3（a）はある部位で容器の太さが変わる形態を示し、図3（b）は容器の太さが連続的に変わる形態を示す。図4は、容器の内径が他の部位より小さい部位を有する形態（容器の太さは同じ）を示し、図4（a）はある部位で容器の内径が変わる形態を示し、図4（b）は容器の内径が連続的に変わる形態を示す。

#### 【0064】

また、図2に示す構成のように逆流防止弁を有する心棒部を押し込む場合には、心棒部の太さに太い部分を設けることによって、内部断面積が小さい部位を設けることもできる（図5）。図5において、シリンダ201の上部に目盛り202が付与されている。また、希釀液の目盛り206が付与されている。逆流防止弁203を有する心棒部は、細い部分204と太い部分205とを有し、太い部分205に相当する位置に目盛が付与されている。

#### 【0065】

##### （4）血液検査キットの提供形態

本発明の血液検査キットに含まれる各々の要素の個数は特に限定されず、各々1個でも

10

20

30

40

50

よいし、2個以上の複数でもよい。

本発明の血液検査キットは、血液検体の成分を希釈するための希釈液と、血液検体の成分及び希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器と、所望により他の構成要素とを、これらを収納する収納容器に収納した形態として提供することができる。

#### 【0066】

##### [2] 血液分析方法

本発明の血液分析方法は、血液検体の成分を希釈するための希釈液と、血液検体の成分及び希釈液を収容するための少なくとも1つの透明容器とを含む、血液検査キットを用いる血液分析方法であって、予め決定された所定量以上の血液検体の成分含有試料を分析対象試料として選別し、所定量未満の血液検体の成分含有試料を分析対象試料から除外する工程、及び選別された血液検体の成分含有試料を用いて血液の分析を行う工程を含む方法である。

10

#### 【0067】

本発明の血液分析方法で用いる血液検査キットの構成は、本明細書の上記[1]に記載した通りであり、ただし、血液検体の成分及び希釈液の液量を測定するための目盛りは、血液検査キットに含まれる少なくとも1つの構成要素に付与されていてもよいし、付与されていてもよい。好ましくは、目盛りが血液検査キットに含まれる少なくとも1つの構成要素に付与されている血液検査キットを用いることができる。上記目盛りを使用することにより、予め決定された所定量以上の血液検体の成分含有試料を分析対象試料として選別し、所定量未満の血液検体の成分含有試料を分析対象試料から除外することが容易に可能となる。

20

#### 【0068】

本発明の血液分析方法は、対象者自身が血液を採取する自己採血で実施してもよいし、医師等の有資格者が注射器を使用して血液を採取する一般採血においても実施してもよい。

#### 【0069】

本発明において、分析対象となる生体試料は血液であり、血液とは血清又は血漿を含む概念である。好ましくは、被検者より微量の血液を採取し、希釈液で希釈した後、フィルタや遠心分離により血球を分離することにより得られた血漿又は血清を用いることができる。血液検体の成分としては、分離手段により血液検体から分離された血漿成分であることが好ましい。

30

#### 【0070】

血液検体の起源はヒトに限定されず、ヒト以外の動物（哺乳類、鳥類、魚類など）などであっても良い。ヒト以外の動物としては、例えば、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、イヌ、ネコ、マウス、クマ、パンダ等が挙げられる。好ましくは、生体試料の起源はヒトである。

#### 【0071】

好ましい態様としては、患者本人が、ランセットなどのナイフ付の器具を用いて指先などを傷つけて皮膚外にでた血液を採取する。患者の負担を減らすために、侵襲性低く血液を採取することが好ましく血液を採取するときに無痛、あるいは、痛みが非常に少ない状態で採血できることが望ましく、その場合、傷の深さ、大きさは小さいことが望ましく、従って、本発明の分析方法に用いられる患者からの採血量は100μL以下であることが好ましく、10μL以上70μL以下の血液を用いて分析を行うことがより好ましい。このように少ない採血量領域でも、本発明では、採血量が少ないと採血者が気づき、補填・補償することができ。採血量が少なくなってしまっても血液を希釈し血漿分離した容器から採血量の不足を知ることや採血しなおすことができ、採血者、分析者にとって、希釈倍率の結果を狭い範囲で予測することが可能となり、測定精度よく分析対象物を測定するための方法を提供することが可能となる。

40

#### 【0072】

本発明の血液分析方法の第一の態様としては、血液検体中に恒常に含有されている成

50

分を標準成分として使用する。具体的には、ナトリウムイオン (Na<sup>+</sup>)、塩化物イオン (Cl<sup>-</sup>)、カリウムイオン (K<sup>+</sup>)、マグネシウムイオン (Mg<sup>2+</sup>)、カルシウムイオン (Ca<sup>2+</sup>)、総タンパク (「TP」)、アルブミン等が挙げられる。血液検体中に含まれるこれらの標準成分の濃度は、Na濃度は、134～146 mmol / リットル (平均値: 142 mmol / リットル)、Cl濃度は、97～107 mmol / リットル (平均値: 102 mmol / リットル)、K濃度は、3.2～4.8 mmol / リットル (平均値: 4.0 mmol / リットル)、Mg濃度は、0.75～1.0 mmol / リットル (平均値: 0.9 mmol / リットル)、Ca濃度は、4.2～5.1 mmol / リットル (平均値: 4.65 mmol / リットル)、総タンパク濃度は、6.7～8.3 g / 100 mL (平均値: 7.5 g / 100 mL)、アルブミン濃度は、4.1～5.1 g / 100 mL (平均値: 4.6 g / 100 mL) である。これらの中で、微量な血液成分を5倍以上の高い希釈率で希釈したときにこれらの恒常性のある標準成分を十分に精度高く検出できるためには、血液中に高い濃度で存在する標準物質を測定することが好ましく、また、血液中に高い濃度で存在する標準物質は、血液以外からの意図しない成分が仮に希釈液中に混入してしまった場合においても、混入影響への耐性が高く、検査精度の低下を抑制できると考えられる。このような標準成分としては、ナトリウムイオン又は塩化物イオンが好ましく、さらには、血液中に恒常的に存在する標準成分の中でも血液中に存在する量が一番高いナトリウムイオンが最も好ましい。Naイオンは、標準値 (正常値) で142 mmol / リットルで血漿中の総陽イオンの90%以上を占める。

## 【0073】

10

上記の第一の態様の血液分析方法においては、血液中に恒常的に存在する標準成分を含有しない希釈液を含む血液検査キットを用いて、血液検体から血漿を回収し、回収した血漿を希釈液で希釈し、希釈した血漿中の、血液中に恒常的に存在する上記標準成分を用いて血漿の希釈倍率を決定し、血液検体中の対象成分の濃度を分析することができる。

## 【0074】

20

ナトリウムイオン濃度、塩化物イオン濃度は、たとえば、炎光光度法、原子吸光法、ガラス電極法、滴定法、イオン選択電極法、酵素活性法等により測定することができる。

## 【0075】

本発明では微量な血液を手指から採取して希釈液で希釈した試料は僅か 150 μL 程度であり、生化学成分や免疫検査項目を 10 項目以上測定することから外部標準物質の測定は数 μL の微量で測定できることが好ましい。また、多数の試料を分析する必要から、市販の生化学・免疫自動分析装置に適応できることが好ましい。

30

## 【0076】

本発明では、好ましい標準物質はナトリウムイオンであり、血液希釈後の希釈液中のナトリウムイオンの測定値 (濃度 X) と、血液検体中の標準成分であるナトリウムイオンの既知濃度値 (濃度 Y; 142 mmol / リットル)、とから、血液検体の希釈倍率 (Y / X) を算出する。この希釈倍率を、希釈した血液検体中の分析対象成分の測定値 (濃度 Z) に乘することにより、実際に血液検体の血漿中に含まれる分析対象成分の濃度 [Z × (Y / X)] を求めることができる。

## 【0077】

40

また、血液の希釈と血漿の分離回収が正常に行われているか検証するために、2つ以上の血漿中に恒常的に含有されている異なる標準成分からそれぞれ独立に希釈倍率を求めて、その値が一致することを確認することが好ましい。一致するとは、2つの測定値 (a, b) において、それらの差のそれらの平均値に対する割合、すなわち |a - b| / { (a + b) / 2 } × 100 が、20%以下であることであり、好ましくは 10% 以下であることであり、より好ましくは 5% 以下であることである。好ましい一態様としては、ナトリウムイオン濃度の、希釈液の測定値及び血漿中の既知濃度値 (142 mmol / リットル) とから求めた希釈倍率を使用した血液検体中の対象成分の濃度の分析が、ナトリウムイオン以外の血漿中に恒常的に含有されている標準成分から求めた希釈倍率が、ナトリウムイオン濃度から求めた希釈倍率と一致することを確認することで、血液検体の血漿中に含

50

まれる成分の分析が正常に行われていることの検証が可能となる。ここで、対象成分の濃度の分析に用いる標準成分としては、ナトリウムイオン又は塩化物イオンから選択されることが好ましく、分析を検証するために用いる標準成分としては、総タンパク又はアルブミンから選択されることが好ましく、総タンパクから選択されることがより好ましい。総タンパクの測定法は、ビューレット法や、紫外吸収法、ブレッドフォード法、ローリー法、ビシンコニン酸 (Bicinchoninic Acid: BCA) 法、蛍光法など公知の方法があり、測定試料の特性や感度、試料量などに応じて適宜使用する方法を選択することができる。

【0078】

本発明の血液分析方法の第二の態様としては、血液中に存在しない標準成分を用いて希釈濃度を決定する。この場合、血液中に存在しない標準成分を含む希釈液を含む血液検査キットを用いて、血液検体から血漿を回収し、回収した血漿を希釈液で希釈し、希釈した血漿中の、血液中に存在しない上記標準成分を用いて血漿の希釈倍率を決定し、血液検体中の対象成分の濃度を分析することができる。

10

【0079】

血液中のナトリウムは非常に高い恒常性があり、個体間の変動も小さいことが知られている。また、その中央値濃度も  $142 \text{ mmol/L}$  と生体濃度としては濃いため、希釈液で希釈しても、その濃度を精度良く測定できる。また、希釈用の希釈液中の内部標準は高い濃度に設定できるため、濃度を精度良く測定できる。

【0080】

20

本発明の血液分析方法の第三の態様としては、血液中に存在しない標準成分を含む希釈液を含む血液検査キットを用いて、血液検体から血漿を回収し、回収した血漿を希釈液で希釈し、希釈した血漿中の、血液中に恒常に存在する上記標準成分及び血液中に存在しない標準成分を用いて、血漿の希釈倍率を決定し、血液検体中の対象成分の濃度を分析することができる。上記の通り内部標準液の測定吸光度と試料の恒常性の高い成分の外部標準の測定吸光度を組み合わせることで、測定精度の高い定量法として前述の 2 つの定量法の欠点を補完して信頼性の高い希釈成分定量法とすることができます。

【0081】

血液検体の成分の希釈率を、下記式 1 から 4 のいずれかの式で算出し、希釈液中の分析対象成分の濃度に、上記希釈率を乗じて血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析することが好ましい。

30

【数 1】

$$\text{式 1 : } X = (A + C) / (B + D)$$

$$\text{式 2 : } X = \{(A^2 + C^2)^{1/2}\} / \{(B^2 + D^2)^{1/2}\}$$

$$\text{式 3 : } X = a \times (B + D) \pm b$$

(ここで、a 及び b は係数であり、あらかじめ  $(B + D)$  と希釈倍率のデータを取得し、式 3 であらわされる標準曲線を作成しておく。)

$$\text{式 4 : } X = A / B'$$

(ここで、 $B' = (A \times D) / C$  である。)

上記式において、A、B、C、D、 $B'$  及び X は、以下のように定義される。

A : 内部標準物質を含む希釈液の測定吸光度

40

B : A から血液検体の成分を希釈した希釈液の吸光度を差し引いた吸光度

C : 恒常性物質としてナトリウムイオン濃度が  $142 \text{ mmol/L}$  である、測定された吸光度

D : 血液検体の成分を希釈した希釈液のナトリウムイオンの吸光度

$B'$  : 血漿ナトリウムの吸光度から算出した希釈倍率による、希釈血漿中の血液中に存在しない標準成分の吸光度の補正值

X : 血漿希釈倍数

【0082】

希釈率を求める際のもう一つの算出方法として、二乗平均法を用いた式 5 で算出し、希釈液中の分析対象成分の濃度に、式 5 で算出した希釈率を乗じて血液検体の成分中の対象

50

成分の濃度を分析する態様も好ましい。

【0083】

【数2】

$$\text{式5: } X = [\{(A/B)^2 + (C/D)^2\} / 2]^{1/2}$$

【0084】

血液検査として、肝機能、腎機能、メタボリズムなど、特定の臓器、特定の疾患を検査する場合には、臓器や疾患に特有の複数の測定対象成分の情報を入手して、臓器の状態、生活習慣の予測などを行うために、一般的には、複数の測定対象成分の分析が同時に行われる。例えば、肝臓の状態を検査するためには、一般的には、ALT (アラニントランスアミナーゼ)、AST (アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)、GTP (グルタミルトランスペプチダーゼ)、ALP (アルカリホスファターゼ)、総ビリルビン、総タンパク、アルブミン等、数種類以上の物質の血液中の濃度が測定される。このように、複数の対象成分を一つの血液検体から測定するためには、再測定の可能性も考慮して、希釈された血液の量はある程度必要となる。従って、採取した血液を希釈する希釈液はある程度の量を確保することが重要である。侵襲性を少しでも低くした血液採取を考慮すると、採血量は100 μL以下である態様が好ましく、この場合、血液検体の成分である血漿の希釈倍率は7倍程度以上となる。

【0085】

本発明は、患者が採血し、医療機関又は検査機関に、採血した血液を搬送して、検査を行うための血液検査キット、及び上記血液検査キットを用いた血液分析方法に関する。従って、採血後、検査までには、希釈された状態で長時間放置される可能性があり、その間に、たとえば赤血球の溶血が起こると、血球内の濃度が高い物質や酵素などが血漿あるいは血清中に溶出し、検査結果に影響を与えること、色調により分析対象成分を測定する場合には、ヘモグロビンが検査に影響を与える可能性がある。従って、搬送中に溶血、血液の凝固等を防止する必要があり、本発明においては、患者が採取した血液を希釈液で希釈後に、血液から血球を分離する工程を含むことが好ましい。

【0086】

血液から血球を分離して血漿を回収する方法は、特に制限はない。ただし採血後の血漿分離は、希釈液により血液を希釈した後に直ちに行なうことが好ましい。抗凝固剤入り採血管で採血した後に遠心分離を行って血液を血球と血漿成分に分離し、分離した状態で搬送するか、血液成分に圧力を加えて濾過膜などの分離膜を通過させて、血球成分を分離膜に捕捉させて血液から血球成分を分離する方法、などが用いられる。この場合、抗凝固剤を用いることが好ましい。また、測定の精度を確保するために、血球成分を除いた血液の溶液部分と物理的に隔離することが好ましく、この場合、具体的には、特開2003-270239号公報に記載の逆流防止手段を有する生体試料分離器具等を用いることが好ましい。

【0087】

本発明において、血液検体の成分中の対象成分の濃度を分析するとは、対象成分の濃度を決定すること（即ち、対象成分を定量すること）、又は対象成分の濃度が所定の基準値以上であるか所定の基準値以下であるかを決定すること、ある程度の濃度を含むことを検出する定性を行うこと、などを包含し、分析の形態は特に限定されない。

【0088】

分析の対象成分は限定されず、生体試料中に含まれるあらゆる物質が対象となる。例えば臨床診断に用いられる血液中の生化学検査項目、腫瘍マーカーや肝炎のマーカー等各種疾患のマーカー等が挙げられ、タンパク質、糖、脂質、低分子化合物等が挙げられる。また、測定は物質濃度だけでなく、酵素等の活性を有する物質の活性も対象となる。各対象成分の測定は、公知の方法で行なうことができる。

【0089】

本発明の血液分析方法の一例について、以下に説明する。

10

20

30

40

50

微量血液試料 6.5  $\mu\text{L}$ を内部標準添加希釈液 280  $\mu\text{L}$ に添加して混合し、フィルターで血球を濾過して、希釈血漿を試料として生化学自動分析装置で内部標準と外部標準及び生体成分の各濃度を測定する。

#### 【0090】

本発明の一つの実施形態によれば、採取した血液中の未知濃度の希釈血漿生体試料成分の定量及び酵素活性を市販の生化学・免疫自動分析装置で効率的に多数の試料を分析する方法である。生体試料中に一定の濃度を維持している血漿ナトリウム等を用いる外部標準物質、また血漿中に全く含まれない若しくはほとんど含まれない成分であって、血球膜を通過しない内部標準物質としてリチウムを用意し、これを緩衝液中に添加する。一般的に、有機化合物を内部標準にした場合には、有機化合物の種類によっては生体酵素の作用を受けて保存安定性に影響を受ける場合があるため、安定性の確認が必要であるが、このリチウムを内部標準物質として使用する場合は希釈液中で長期間安定であり、容易に定量することができる。また測定試料の外部標準であるナトリウムも元素であるため安定である。

10

#### 【0091】

希釈液で希釈された血漿ナトリウムを外部標準として測定する方法には炎光光度計、原子吸光法、そしてイオン選択電極法がある。本発明では微量な血液を手指、踵から採取して希釈液で希釈し血漿と血球分離後の血漿試料は僅か 300  $\mu\text{L}$ 程度であり、生化学成分や免疫検査項目を 10 項目以上測定することから外部標準ナトリウム測定では数  $\mu\text{L}$ の微量で測定する必要がある。また、大量の試料を分析する必要から、市販の生化学・免疫自動分析装置に適応できる必要がある。

20

#### 【0092】

本発明では、ナトリウム測定を行う場合には、ナトリウムイオンにより酵素ガラクトシダーゼは酵素活性が活性化することを利用して、希釈液で希釈された非常に低濃度ナトリウム (24 mmol/L 以下) の試料を数  $\mu\text{L}$ で測定することが可能な酵素的測定法を使用することが好ましい。この方法は生化学・免疫自動分析装置に適応でき、ナトリウム測定を目的とした別の測定機器を必要としない点で効率性が高く経済的であるため、特に好ましい測定方法である。

#### 【0093】

希釈液に添加したリチウム内部標準物質の測定は、キレート比色法 (ハロゲン化ポルフィリンキレート法: パーフルオロ-5,10,15,20-テトラフェニル-21H,23H-ポルフィリン) を利用することで、生化学自動分析装置を用いて、微量の試料を数多く容易に測定が可能である。

30

#### 【0094】

血液中の血漿希釈率を求めるためにナトリウムとリチウムの濃度を測定することから、希釈液にはこれらの成分や類似したアルカリ金属類に近似した物質が含まれないことが好ましく、また、血漿の pH である 7 pH 7.4 付近に調整できることが好ましい。このため、アルカリ金属類 (NaOH など) を含まないアルカリ性を示す化合物としては、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール、2-エチルアミノエタノール、N-メチル-D-グルカミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミンなどのアミノアルコール化合物を利用することが好ましい。これらのアルカリ性を示す化合物を含む希釈液を pH 7.4 付近に調整するために、生化学用として優れた性能を持つ Good's 緩衝液で pKa が pH 7.4 付近の緩衝液である、HEPE S (2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸), TES (N-トリス(ヒドロキシメチル)メチル-2-アミノエタンスルホン酸), MOPS (3-モルホリノプロパンスルホン酸), BES (N,N-ビス(2-ヒドロキシエチル)-2-アミノエタンスルホン酸) を酸として希釈液中に使用することが好ましい。

40

#### 【0095】

これらの希釈液は外部標準のナトリウムや内部標準のリチウムなどのアルカリ金属やアルカリ金属土類を含まず、測定対象のナトリウムやリチウムの測定系に干渉を与えないことから、本発明の希釈液として使用することが好ましい。また、これらの希釈液で希釈さ

50

れた成分は生化学・免疫自動分析装置での種々の測定法でも干渉しないこと、さらに血球が溶血をしないことや生体成分が37℃でも安定に保存することが可能であり、希釈液として好ましい態様である。

【0096】

希釈液で希釈された血漿中の生体成分を測定するため、希釈液中の成分が血漿中の生体成分を変性させたり、安定性に実質的に影響を与えないことが好ましい。この一例として2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)とHEPESを混合してpH7.4に調整した緩衝性能を有する希釈液は生体成分に変性を与えず、血漿成分を希釈した場合でも各成分は安定しており、これら生体成分の測定試薬にも干渉しない緩衝液である。

【0097】

採取した血液検体を希釈液で希釈した後に、血液中の血球成分をフィルター濾過する態様も本発明では好ましい態様であり、希釈液の浸透圧を血液と同等(285 mOsm/kg : 溶液の水1kgが持つ浸透圧で、イオンのミリモル数)又はそれ以上とすることで血球の溶血を防ぐことが可能となる。さらに血球膜や酵素の安定化のために、マンニトールやピリドキサールリン酸を希釈液に添加することも好ましい態様である。また手指採血時に手指表面から一部混入する細菌の増殖による血液成分の分解を抑えるために3~4種類の抗生物質を添加して、生体成分の細菌による分解の安定化を図ることも好ましい態様である。

【0098】

希釈血漿の微量ナトリウム測定は、-ガラクトシダーゼがナトリウムで活性化することを利用し、希釈液で希釈された試料のナトリウム濃度とガラクトシダーゼ活性が比例関係にあることを利用した酵素的測定法により行なうことが好ましい。

【0099】

以下の実施例により本発明を説明するが、本発明は実施例の記載によって限定されるものではない。

【実施例】

【0100】

(実施例1)

シリンダー、及び血液を採取するスponジ状のチップ以外は、デメカル(登録商標)血液検査キット(株式会社リージャー社)を用いて血液採取と血漿分離並びに血液分析を行った。シリンダーに血漿分離後の液量の目安となる目盛を入れた場合(本発明)と目盛を入れない場合(比較例)との比較を行った。

【0101】

目盛りを入れたシリンダー:

仕様-1: 分離血漿の量変動が30μL差を検出できる様に内壁の厚みと目盛りの幅を調整した。

仕様-2: 分離血漿の量変動が15μL差を検出できる様に内壁の厚みを仕様-1のシリンダーから変更して目盛りを付与する部分の断面積を小さくし、目盛りの幅を調整した。

【0102】

目盛を入れ血漿分離を行なった場合には、シリンダーが最後まで押し下げられて希釈された血漿が最大量取りだした時に、血液採取量が不足していないことが確認できる。血液採取量の不足に気づいた場合は、血液を再度採取した。目盛り付与のために設定した希釈液量は300μLであり、血液採取量は65μLを目標とした。

【0103】

ボランティアの患者から、インフォームドコンセントを行った後に静脈から注射器で採取した約10mLの血液を採血管に得た。希釈液300μLを入れた目盛りなしのシリンダー又は目盛りありのシリンダー(仕様-1、及び仕様-2)をそれぞれ10個ずつ準備した。その後、スponジ状のチップで65μL程度の血液を採取し、それぞれのシリンダーの希釈液に採取した血液を混合させて希釈し、フィルタを用いて混合液から血球を分離して血漿の希釈液を採取した。目盛り有りのシリンダーから、希釈した血漿のおおよその

10

20

30

40

50

量の情報を取得した。実験は各 10 回繰り返すことで、測定値の繰り返し精度を求めた。希釈率は、以下の方法に従って決定した。

【0104】

(方法1) 目盛りなしのシリンダーを用いた場合には、血液量を  $65 \mu\text{L}$  、ヘマトクリット値(血液中に占める血球の体積の割合を示す数値)を 40 % で一定と仮定し、希釈液  $300 \mu\text{L}$  として希釈倍率を計算した。目盛りありのシリンダーを使用した場合には目盛りから血漿の量を推測し、その値を用いて希釈倍率を求めた。

【0105】

上述の実験に用いた希釈液の成分を以下に記す。希釈液は、不純物を含め Na を含有する物質を用いていないことに留意して設計する以外は、非特許文献 1 に記載のものを用いた。浸透圧は、OSMOATAT OM-6040 (アーカレイ(株)社製) を用いて測定した値を表示した。

【0106】

【表1】

表1

物質名	濃度
HEPES	50 mmol/L
2-アミノ-2-メチル 1-プロパノール (AMP)	50 mmol/L
D-マンニトール	284 mmol/L
グルセロール三リン酸	5 mmol/L
EDTA-2K	0.8 mmol/L
PALP (ピリドキサールリン酸)	0.05 mmol/L
チアベンダゾール	0.0001 質量%
ピペラシンナトリウム	0.0003 質量%
アミカシン硫酸塩	0.0003 質量%
硫酸カナマイシン	0.0005 質量%
メロペネム三水和物	0.0005 質量%
浸透圧	355 mOsm/Kg
pH 7.4	

【0107】

日本電子(株)社製 JCA-BM6050 を用いて、採取した血漿の希釈液中の ALT の濃度を求めた。この濃度に対して、上記の(方法1)に記載した方法により計算した希釈倍率を乗することで、もとの血漿中の値を求めた。この ALT の測定最大値(U/L)、ALT の測定最小値(U/L)、並びに測定最大値と測定最小値の差(U/L)を表2に示す。ここで、U/L は、至適条件下で、試料 1 L 中に、温度 30 °C で 1 分間に  $1 \mu\text{mol}$  の基質を変化

10

20

30

40

50

させることができる酵素量を表す。結果を表 2 にまとめた。

【 0 1 0 8 】

【表 2 】

	目盛り	ALTの測定最大値(U/L)	ALTの測定最小値(U/L)	測定最大値と測定最小値の差(U/L)	
方 法 1	なし	19.7	12.3	7.4	比較例1
	あり 仕様-1	16.5	13.4	3.1	実施例1
	あり 仕様-2	15.9	13.3	2.6	実施例2

【 0 1 0 9 】

表 2 の結果から、シリンダーに目盛りがあると、測定の最大値と測定の最小値との差が小さくなることがわかり、本発明の効果が確認された。

【 0 1 1 0 】

( 実施例 2 )

実施例 1 と同様にして希釀血漿液を調製し、方法 1 に加えて、以下の方法 2 、方法 3 、方法 4 に従って、希釀倍率を求めた。

【 0 1 1 1 】

( 方法 2 )

採取した血液の血漿成分と、の希釀液との混合液を調製し、その混合液中のナトリウムイオン濃度を測定し、その値と恒常性物質として通常評価されているナトリウムイオン濃度  $142 \text{ mmol/L}$  に対する濃度値から希釀倍率を割り出した。具体的には、血漿成分と希釀液との混合液の一部を精製水で 5 倍希釀した後に  $3 \mu\text{L}$  を秤量し、これに対して、下記の表 3 に示したナトリウムイオン測定試薬の第 1 試薬を  $52 \mu\text{L}$  加えて、 5 分間  $27$

で保温し、次に、基質液であるナトリウムイオン測定試薬の第 2 試薬を  $26 \mu\text{L}$  加えた後、 1 分間にわたって吸光度の変化を主波長  $410 \text{ nm}$  、副波長  $658 \text{ nm}$  において日本電子(株) JCA-BM6050 型生化学自動分析装置で測定した。図 6 にナトリウム濃度と吸光度変化量を示した検量線を示す。  $24 \text{ mmol/L}$  まで原点を通る直線性が得られナトリウムの定量性を確認した。この方法 2 では、表 1 で示した希釀液、及び以下の表 3 で示した、ナトリウム測定試薬の第 1 試薬、第 2 試薬とともに、ナトリウムイオンを含有しないことに留意して調製した。

【 0 1 1 2 】

## 【表3】

## ナトリウムイオン測定試薬の組成

第1試薬	試薬	濃度
	pH8.0, HEPES・LiOH	100 mmol/L
	D-マンニトール	60 mmol/L
	N-アセチルシステイン	30 mmol/L
	硫酸マグネシウム	1.52 mmol/L
	$\beta$ -ガラクトシダーゼ	1.1 kU/L
	Triton(登録商標) X-100	0.05質量%
第2試薬	pH8.0, HEPES・LiOH	100 mmol/L
	o-ニトロフェニル- $\beta$ -D-ガラクトピラノシド	15 mmol/L

10

## 【0113】

## (方法3)

「臨床病理 第56巻 第7号(平成20年7月)別冊 577-583」(非特許文献1)に記載の方法に従い、希釈液中に添加したグリセロール三リン酸の濃度の指標となる吸光度を用いて、(非特許文献1)に記載の方法に従い血液の希釈倍率を求めた。グリセロール三リン酸を発色させるために用いた試薬も方法2と同様に、非特許文献1に記載の液からナトリウムイオンを含有しないことに留意して設計した。

20

## 【0114】

## (方法4)

方法2及び方法3を用いて得られた値を使用して、以下の式(1)により、血漿の希釈液による希釈倍率を求めた。

$$X = (A + C) / (B + D) \quad (1)$$

A: 方法3において測定したグリセロール三リン酸を含む希釈液の測定吸光度

B: Aの吸光度から血漿成分を希釈した希釈液の吸光度を差し引いた吸光度

30

C: 恒常性物質としてナトリウムイオン濃度が142 mmol/Lである溶液の、測定された吸光度

D: 血漿成分を希釈した希釈液のナトリウムイオン濃度の吸光度

X: 血漿希釈倍率

## 【0115】

日本電子(株)社製JCA-BM6050を用いて求めた希釈血漿中のASTの濃度に対して、上記の通り求めた希釈倍率を乗じることで、血漿中に存在するASTを求めた。

10回同じ測定を繰り返し行い、ASTの測定最大値(U/L)、ASTの測定最小値(U/L)、並びに測定最大値と測定最小値の差(U/L)を求めた。結果を表4に示す。ここで、U/Lは、至適条件下で、試料1L中に、温度30度で1分間に1μmolの基質を変化させることができる酵素量を表す。結果を表2に示した。

40

## 【0116】

【表4】

	目盛り	ASTの測定最大値 (U/L)	ASTの測定最小値 (U/L)	測定最大値と測定最小値の差 (U/L)	
方法1	なし	45	23.1	21.9	比較例1
方法2	なし	38.9	30.3	8.6	比較例2
	あり 仕様-1	36.9	32.4	4.5	実施例3
	あり 仕様-2	35.5	31.8	3.7	実施例4
方法3	なし	38.7	30.8	7.9	比較例3
	あり 仕様-1	36.0	31.7	4.3	実施例5
	あり 仕様-2	35.6	32.1	3.5	実施例6
方法4	なし	38.6	31.0	7.6	比較例4
	あり 仕様-1	34.6	31.1	3.5	実施例7
	あり 仕様-2	35.1	32.1	3.0	実施例8

## 【0117】

この結果から、シリンダーに目盛りが有る場合に、測定最大値と測定最小値の差が小さくなることがわかり、本発明の効果が確認された。さらに、内部標準、外部標準を使用して希釈倍率を算出して測定値を補正した場合には、有意に最大値と最小値の差が小さくなることが確認された。また、方法4において、式2を用いて希釈倍率を求めて測定値を補正した場合でも、方法4と同等の結果が得られた。

## 【0118】

## (実施例3)

実施例1の仕様-2で使用したシリンダーから血漿分離後の液量の目安となる目印(目盛り)を省略し、代わりに分離液の逆流防止のための密閉キャップの心棒部に、仕様-2と同様な、液量増分が計測可能な目盛りを付与した以外は、実施例1と同様に測定を行い、実施例1と同様の効果が確認できた。

## 【0119】

## (実施例4)

実施例2の方法2において採取した血漿成分の希釈液との混合液に対して、ナトリウムイオン濃度測定に加えて、下記に示す方法により、総タンパクの濃度を測定した。

## 【0120】

## (血漿希釈混合液中の総タンパク濃度の測定)

ビューレット法を測定原理とする測定を行った。ビューレット試薬: 3.0 mmol/L 硫酸銅 400 μL、酒石酸カリウムナトリウム 21.3 mmol/L、NaOH 0.75 mol/Lを準備し、希釈した血漿と混合した。混合後、37℃で10分間放置して、アルカリ性下で血漿中のタンパクと銅イオンによる540~560 nmの青紫色を呈する錯体が形成されるまで待ち、545 nmで吸光度を測定し、標準溶液の吸光度から得た検量線を用いて血漿希釈混合液中の総タンパク濃度を定量した。

## 【0121】

10

20

30

40

50

血液希釈後の希釈液中のナトリウムイオン濃度の測定値（濃度X）と、血液検体中の標準成分であるナトリウムイオンの既知濃度値（濃度Y；142mmol/L）、とから求めた、血液検体の希釈倍率（Y/X）に対して、血液希釈後の希釈液中の、総タンパクの測定値と、血液検体中の標準成分である総タンパクの既知濃度値（濃度；7.5g/100mL）とから求めた希釈倍率が、同じ値であるとの結果が得られた。これにより、ナトリウムイオン濃度から求めた希釈倍率の測定が正常に行われていることの検証が可能であることが分かった。

#### 【0122】

##### （実施例5）

実施例1と全く同様にして以下の血液検査項目に関し本発明のバラツキの少ない特徴が 10 確認できた。

##### ＜検査項目＞

総タンパク、アルブミン、-グルタミルトランスフェラーゼ、総コレステロール、中性脂肪、善玉コレステロール、尿素窒素、クレアチニン、尿酸、血糖、グリコヘモグロビン、p53抗体（腫瘍マーカー）、CEA（癌胎児性抗原）、CA125（がん抗原125：卵巣癌腫瘍マーカー）、ペプシノゲン、AFP（フェトプロテイン：肝癌腫瘍マーカー）、CA19-9（carbohydrate antigen 19-9；膵臓・胆嚢癌マーカー）、ピロリ菌、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）抗体、HBs抗原（B型肝炎ウイルスの外側のタンパク質）、HCV（C型肝炎ウイルス）抗原。

#### 【0123】

##### （実施例6）

表1の組成において、グルセロール三リン酸を塩化リチウム 1mmol/L に変更したナトリウムイオンを含有しない内部標準添加希釈液を準備した。緩衝液に添加したリチウム内部標準物質の測定は、キレート比色法（ハロゲン化ポルフィリンキレート法：パーフルオロ-5,10,15,20-テトラフェニル-21H,23H-ポルフィリン）を利用して吸光度を測定することで求めることができる。

#### 【0124】

複数の患者から採取した血液に対して、血液凝固を阻止するためにEDTAを添加した。実施例1で使用した仕様-2のシリンダーおよびスポンジ状チップを使用して採取した微量の血液を希釈液で希釈した。その後、分離膜で血球を分離して得られた希釈血漿中の生化学成分を測定した。別途、実施例1の方法4で、Aをリチウム緩衝液の吸光度、Bを血漿と希釈液を混合した後のリチウムの吸光度変化量とし、他は実施例1の方法4と同様にして血漿の希釈倍数を求め、別途求めた希釈血漿中の生化学成分の値に乘じることにより、もとの血漿中に存在する生化学成分の値（A）を取得した。別途、EDTAを添加して採取した同じ血液試料を遠心分離により血球を分離して得た希釈していない血漿の生化学成分の値（B）を取得した。それぞれ患者から取得した2つの値の相関係数を以下の式を用いて計算した。

#### 【0125】

相関係数 = ( 値 (A) と 値 (B) の 共分散 ) / { ( 値 (A) の 標準偏差 ) × ( 値 (B) の 標準偏差 ) }

$$\dots \dots \dots \quad (2)$$

#### 【0126】

相関係数は1.000に近いほど2つのデータが一致していることを示し、通常0.800以上は良好な相関性を示す。また、2つのデータから散布図を作成し、その分布から最小二乗法を用いて統計的な数式として回帰式( $y = ax \pm b$ )を求めた。aは回帰式の傾きで、0.95～1.05の範囲内にあると、二つのデータの比例性が良好であることを示している。またbは回帰式の切片で、0に近い数値であると誤差が少ないと示している。結果を表2に示した。

#### 【0127】

10

20

30

40

## 【表5】

表5: Li 内部及び外部標準法による希釈血漿と血漿の生化学検査の相関性

内部及び外部標準法における血漿と希釈血漿の相関性		
項目	相関係数	回帰式( $y=ax\pm b$ )
総タンパク	0.751	$y = 0.98x + 1.4$
アルブミン	0.822	$y = 0.97x + 0.6$
AST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)	0.990	$y = 0.98x + 0.5$
ALT(アラニントランスアミナーゼ)	0.998	$y = 1.00x - 0.1$
$\gamma$ -GTP( $\gamma$ グルタミルトランスペプチダーゼ)	0.998	$y = 1.02x - 0.6$
総コレステロール	0.973	$y = 0.97x + 5.6$
HDL(高比重リポタンパク)-コレステロール	0.987	$y = 0.97x + 1.5$
LDL(低比重リポタンパク)-コレステロール	0.990	$y = 0.98x + 3.3$
中性脂肪	0.999	$y = 1.05x - 3.8$
尿素窒素	0.993	$y = 0.99x + 0.1$
クレアチニン	0.966	$y = 0.98x + 0.0$
尿酸	0.994	$y = 1.01x + 0.0$
グルコース	0.994	$y = 0.97x + 2.0$

## 【0128】

表5の結果より、本発明の血液検査キットを用いて希釈した血漿から得た値と、希釈しない血漿から得た値の相関性は良好な結果であることがわかった。

## 【符号の説明】

## 【0129】

- 1 血液分離器具
- 2 採血容器
- 3 筒体
- 4 キャップピストン
- 5 密閉蓋
- 6 キャップ
- 7 パッキン
- 8 螺子部
- 9 係止部
- 10 底部
- 11 脚部
- 12 スリット溝
- 13 希釈液

10

20

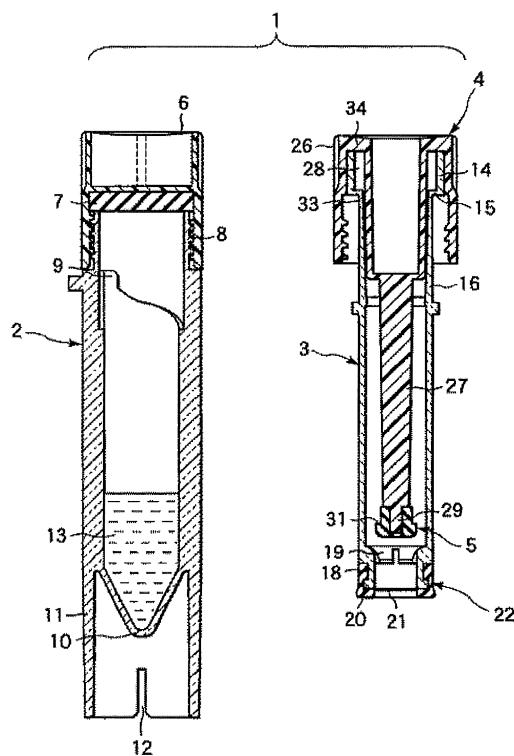
30

40

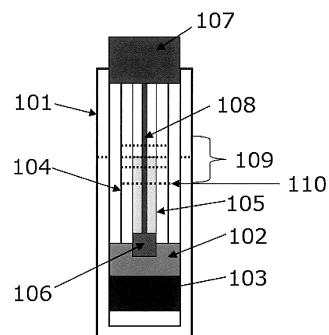
50

1 4	拡径部	
1 5	薄肉部	
1 6	本体部	
1 8	縮径部	
1 9	係止突起部	
2 0	外鍔部	
2 1	濾過膜	
2 2	カバー	
2 6	摘み部	
2 7	心棒部	10
2 8	空間	
2 9	下端部	
3 1	段差部	
3 3	上端部	
3 4	頂部	
1 0 1	透明シリンド	
1 0 2	ガスケット	
1 0 3	血球	
1 0 4	透明シリンド	
1 0 5	血漿	20
1 0 6	逆流防止弁	
1 0 7	封止キャップ	
1 0 8	心棒部	
1 0 9	目盛り	
1 1 0	希釀液の目盛り	
2 0 1	シリンド	
2 0 2	目盛り	
2 0 3	逆流防止弁	
2 0 4	細い部分	
2 0 5	太い部分	30
2 0 6	希釀液の目盛り	

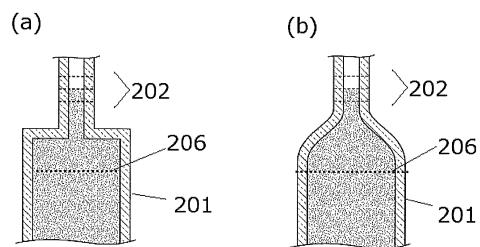
【図1】



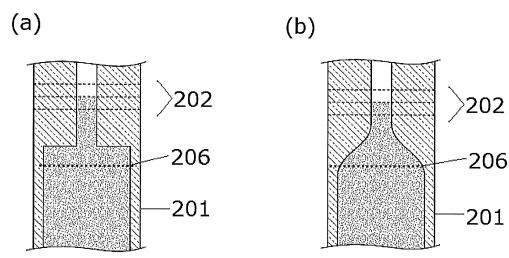
【図2】



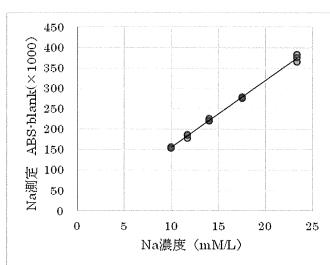
【図3】



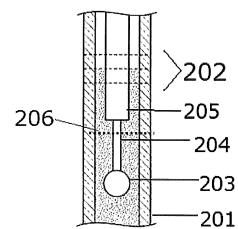
【図4】



【図6】



【図5】



---

フロントページの続き

(72)発明者 大澤 進

東京都中央区日本橋人形町二丁目33番8号 株式会社リージャー内

(72)発明者 杉本 晋哉

東京都中央区日本橋人形町二丁目33番8号 株式会社リージャー内

審査官 大瀧 真理

(56)参考文献 特開2001-330603(JP,A)

特表2002-538458(JP,A)

特開2000-046825(JP,A)

実開昭52-057688(JP,U)

特開2003-270239(JP,A)

大澤進 他, 在宅医療革命, 臨床検査, 2015年 5月15日, Vol.59, No.5, pp.397-404

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 01 N 33/48 - 33/98

G 01 N 1/10