

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5422390号
(P5422390)

(45) 発行日 平成26年2月19日(2014.2.19)

(24) 登録日 平成25年11月29日(2013.11.29)

(51) Int. Cl.		F I	
GO 1 N 33/49	(2006.01)	GO 1 N 33/49	A
GO 1 N 15/14	(2006.01)	GO 1 N 15/14	C
GO 1 N 33/48	(2006.01)	GO 1 N 33/48	A
CO 9 B 23/00	(2006.01)	CO 9 B 23/00	L

請求項の数 9 (全 39 頁)

(21) 出願番号	特願2009-534424 (P2009-534424)	(73) 特許権者	390014960 シスメックス株式会社 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(86) (22) 出願日	平成20年9月26日(2008.9.26)	(74) 代理人	100065248 弁理士 野河 信太郎
(86) 国際出願番号	PCT/JP2008/067507	(72) 発明者	成川 隆也 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(87) 国際公開番号	W02009/041626	(72) 発明者	辻 智悠 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(87) 国際公開日	平成21年4月2日(2009.4.2)	(72) 発明者	森山 啓子 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
審査請求日	平成22年2月26日(2010.2.26)		最終頁に続く
(31) 優先権主張番号	特願2007-252666 (P2007-252666)		
(32) 優先日	平成19年9月27日(2007.9.27)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		
(31) 優先権主張番号	特願2008-76606 (P2008-76606)		
(32) 優先日	平成20年3月24日(2008.3.24)		
(33) 優先権主張国	日本国(JP)		

(54) 【発明の名称】 試料分析用試薬キット及び試料分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

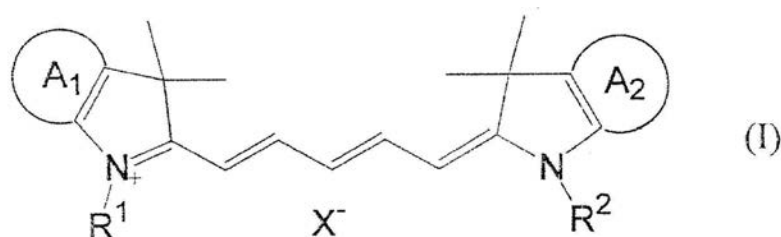
試料中の好塩基球及び/又は有核赤血球を測定するための試料分析用試薬キットであって、

赤血球を溶血させ、白血球の細胞膜に蛍光色素が透過できる程度の損傷を与えるための、カチオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤及び芳香族カルボン酸を含有する第1試薬と、

核酸を染色可能な蛍光色素を含有する第2試薬と、
を含み、

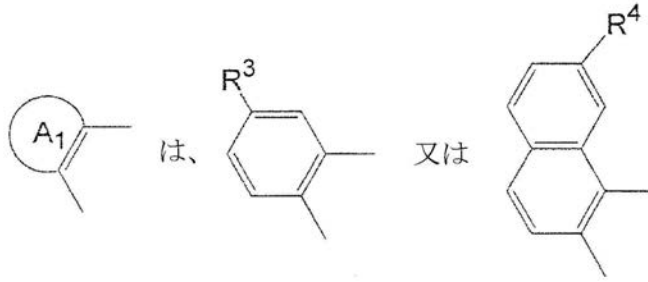
前記蛍光色素が、一般式(I)：

【化1】



(式中、R¹及びR²は互いに同一又は異なってアルキル基であり；

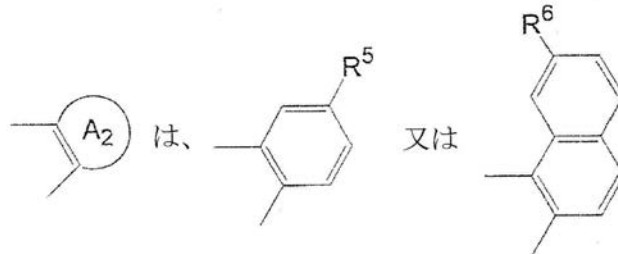
【化2】



であり、

10

【化3】



であり；

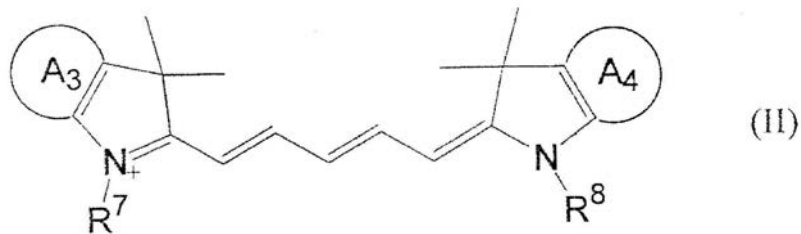
R³、R⁴、R⁵及びR⁶は互いに同一又は異なって、水素原子又はアルキル基であり；

20

X⁻はアニオンである)

の蛍光色素、及び一般式(II)：

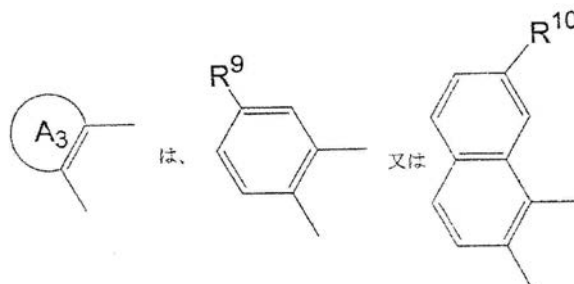
【化4】



30

(式中、R⁷及びR⁸は互いに同一又は異なって酸性基を有していてもよいアルキル基であり；

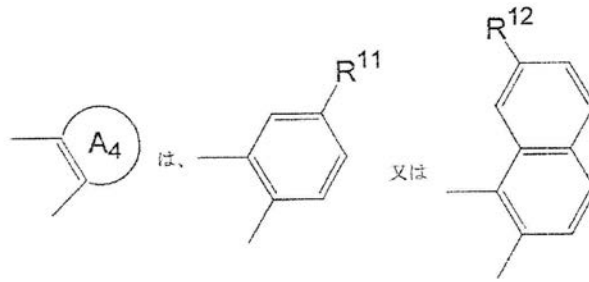
【化5】



40

であり；

【化6】



であり；

R^9 、 R^{10} 、 R^{11} 及び R^{12} は互いに同一又は異なって、水素原子又は酸性基であるが、但し、 $R^7 \sim R^{12}$ のいずれか1つには酸性基が存在し；

$R^7 \sim R^{12}$ に存在し得る酸性基は塩を形成していてもよいが、但し、 $R^7 \sim R^{12}$ に存在し得る酸性基のうちいずれか1つは、プロトンを放出した基である）

の蛍光色素からなる群から選択される少なくとも1である、試料分析用試薬キット。

【請求項2】

前記一般式(II)の $R^7 \sim R^{12}$ に存在し得る酸性基が、スルホン酸基である請求項1に記載の試料分析用試薬キット。

【請求項3】

前記一般式(II)の $R^7 \sim R^{12}$ に存在し得る塩を形成している酸性基が、アルカリ金属塩の基である請求項1又は2に記載の試料分析用試薬キット。

【請求項4】

前記カチオン界面活性剤が、第四級アンモニウム塩又はピリジニウム塩の型である請求項1～3のいずれか1項に記載の試料分析用試薬キット。

【請求項5】

前記ノニオン性界面活性剤が、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンステロール、ポリオキシエチレン水素添加ステロールからなる群から選択される少なくとも1つである請求項1～4のいずれか1項に記載の試料分析用試薬キット。

【請求項6】

前記芳香族カルボン酸が、サリチル酸、フタル酸、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、アミノ安息香酸、及びこれらの塩からなる群より選択される少なくとも1つである請求項1～5のいずれか1項に記載の試料分析用試薬キット。

【請求項7】

前記第1試薬のpHが酸性である請求項1～6のいずれか1項に記載の試料分析用試薬キット。

【請求項8】

前記第1試薬が、pH2.0～4.5の範囲にpKaを有する緩衝剤を含む請求項1～7のいずれか1項に記載の試料分析用試薬キット。

【請求項9】

前記緩衝剤が、リンゴ酸、クエン酸、酒石酸、ジグリコール酸、マロン酸、コハク酸からなる群より選択される少なくとも1つである請求項8に記載の試料分析用試薬キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、生体から採取された試料中の血球を分析するための試料分析用試薬キット及び試料分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

10

20

30

40

50

臨床検査分野において、試料中の血球成分の分析は、被験者の循環器等における様々な疾患を診断する上で非常に有用である。疾患によっては、特定の血球数が増加又は減少したり、通常では存在しない血液細胞が末梢血に出現したりすることがある。

近年、フローサイトメトリの原理を応用した種々の自動血球計数装置が市販されている。これらの自動血球計数装置を用いると、試料中の血球の分類・計数を自動で行うことができる。

【0003】

白血球は、通常、リンパ球、単球、好中球、好酸球及び好塩基球の5種類に分類される。このうち好塩基球は、通常、血液試料に含まれる数が少ない。そのため、一度の測定で白血球を5種類に分類する方法で好塩基球を測定するよりも、血液試料に好塩基球測定専用 10
の処理を行って好塩基球を測定する方が、より正確に分類を行うことができる。好塩基球には、酸性条件下では他の白血球に比べて破壊されにくいといった特性がある。特許文献1及び特許文献2には、その特性を利用した好塩基球測定専用の処理を行うことにより、好塩基球を他の白血球から弁別することが記載されている。

【0004】

なお、白血球の測定において、しばしば問題になるのは有核赤血球の出現である。有核赤血球は、核を有する。このため、白血球の測定において赤血球を溶解する処理を行っても有核赤血球の核が残存し、それが白血球に近い信号を示し、これが白血球数の測定時にプラスの誤差を与える。この影響を排除するには、血液試料に有核赤血球測定専用 20
の処理を行って有核赤血球数の測定を行い、別の方法で該血液試料の白血球数を測定し、得られた白血球数から有核赤血球を差し引くことで正確な白血球数を得ることができる。特許文献3には、血液試料に有核赤血球測定専用の処理を行うことにより、有核赤血球を白血球から弁別することが記載されている。

【0005】

しかしながら、好塩基球や有核赤血球の分類を行うために、特許文献1～3に記載されているような各々の血球専用の処理が必要になると、手間がかかる上に、装置が複雑化或いは大型化するおそれがある。また、各々の血球測定専用試薬を複数使用することにより、血液検査全体のコストが高くなる。このような観点から、血球専用の処理はできるだけ 30
少ない方が好ましい。

【0006】

ところで、好塩基球も有核赤血球も、血液試料を酸性条件下で処理することによって測定を行うことができる。従って、血液試料を酸性条件下で処理すれば、一回の測定で好塩基球と有核赤血球の両方を測定できる可能性がある。このような試みの1つとして、特許文献4には、白血球及び異常細胞を染色に好適な状態にする赤血球溶解剤と界面活性剤とを含む水溶液を試料と混合し、蛍光色素を含む染色液を加えて染色し、フローサイトメータで測定して蛍光強度及び散乱光強度を測定することにより、好塩基球及び赤芽球（有核赤血球）を測定できることが記載されている。

【特許文献1】特開昭61-88896号公報

【特許文献2】特開平7-294518号公報

【特許文献3】特開平10-339729号公報

【特許文献4】特開2002-148261号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

しかしながら、上記特許文献4に記載の方法では、採血後時間が経過した試料などでは、好塩基球と好塩基球以外の白血球との分離がよくないことがある。

本発明の目的は、試料中の有核赤血球及び好塩基球を他の白血球から、より明確に弁別し、計数することができる試料測定用試薬キット及び試料測定方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

10

20

30

40

50

【 0 0 0 8 】

本発明は、試料中の好塩基球及びノ又は有核赤血球を測定するための試料分析用試薬キットであって、赤血球を溶血させ、白血球の細胞膜に蛍光色素が透過できる程度の損傷を与えるための、カチオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤及び芳香族カルボン酸を含有する第1試薬と、核酸を染色可能な蛍光色素を含有する第2試薬とを含む試料分析用試薬キットである。

【 0 0 0 9 】

また、本発明は、上記の第1試薬により、試料中の赤血球を溶血させ、血球の細胞膜に蛍光色素が透過できる程度の損傷を与え、上記の第2試薬により、損傷を受けた血球を染色する工程と、前記染色された血球に光を照射して散乱光情報及び蛍光情報を取得する工程と、前記散乱光情報及び前記蛍光情報に基づいて、前記試料中の好塩基球及びノ又は有核赤血球を分類して計数する工程とを含む試料分析方法である。

10

【 発明の効果 】

【 0 0 1 0 】

本発明により、採血後時間が経過した試料であっても、有核赤血球と好塩基球を他の血球からより明確に弁別し、計数することが可能になり、疾患の検査・診断をより正確に行うことが可能になる。本発明では、一度の測定で有核赤血球と好塩基球を計数できるが、検査目的によっては、有核赤血球と好塩基球の何れか一方のみを測定すればよい場合もある。そのような場合でも、何れか一方のみを測定できる。

【 図面の簡単な説明 】

20

【 0 0 1 1 】

【 図 1 】 本発明の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムの模式図を示す。

【 図 2 】 本発明の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムの模式図を示す。

【 図 3 】 実施例 1 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 4 】 実施例 1 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 5 】 実施例 2 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

30

【 図 6 】 実施例 2 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 7 】 実施例 3 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 8 】 実施例 3 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 9 】 実施例 3 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 1 0 】 実施例 3 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

40

【 図 1 1 】 実施例 4 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 1 2 】 実施例 4 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 1 3 】 実施例 4 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 1 4 】 実施例 4 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【 図 1 5 】 実施例 5 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

50

す。

【図 1 6】実施例 5 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【図 1 7】実施例 5 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【図 1 8】実施例 6 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【図 1 9】実施例 6 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【図 2 0】実施例 6 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

10

【図 2 1】実施例 7 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【図 2 2】実施例 7 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【図 2 3】実施例 8 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムを示す。

【図 2 4】本発明の試薬キットの一例を示した図である。第 1 試薬は B、第 2 試薬は A である。

【図 2 5】実施例 9 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムの一例を示す。

20

【図 2 6】実施例 9 の試料分析用試薬を用いて試料を分析する際のスキヤッタグラムの一例を示す。

【図 2 7】実施例 9 の試料分析用試薬を用いて試料を分析した結果と、従来の試料分析方法により試料を分析した結果との相関関係を示すグラフである。(A) 全白血球数の相関関係；(B) 好塩基球比率の相関関係；(C) 有核赤血球比率の相関関係。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

好塩基球は、塩基性色素により染色される大型の酸性顆粒を有する白血球の一種である。また、有核赤血球は、一般的に赤芽球とも呼ばれ、前赤芽球、好塩基性赤芽球、多染性赤芽球及び正染性赤芽球を含む。

30

本明細書において、「試料」とは、哺乳動物、好ましくはヒトから採取された血液、骨髓液、尿、アフエーシスなどで採取した試料などの体液試料をいう。

【0013】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、カチオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤及び芳香族カルボン酸を含有する第 1 試薬と核酸を染色可能な蛍光色素を含む第 2 試薬を用いることにより、有核赤血球及び好塩基球を他の白血球から、より明確に弁別することが可能であることを見出した。

【0014】

本発明の一実施形態である試料分析用試薬キットは、カチオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤及び芳香族カルボン酸を含有する第 1 試薬と、核酸を染色可能な蛍光色素を含有する第 2 試薬とを含む試薬キットである。カチオン性界面活性剤、ノニオン性界面活性剤及び芳香族カルボン酸を含有する第 1 試薬で試料を処理することにより、試料中の赤血球を溶血させ、白血球及び有核赤血球の細胞膜に蛍光色素が通過できる程度の損傷を与えることができる。これにより、好塩基球以外の白血球及び有核赤血球は、細胞膜に損傷を受け、収縮又は裸核化する。一方、好塩基球は細胞膜に損傷を受けるものの、好塩基球以外の白血球及び有核赤血球に比べて損傷の程度が軽い。ゆえに、好塩基球は、好塩基球以外の白血球及び有核赤血球と比べて収縮の度合いが小さいと考えられる。ゆえに、細胞の大きさや形態の差から、好塩基球と、好塩基球以外の白血球や有核赤血球とを弁別することができる。さらに、核酸を染色可能な蛍光色素を含有する第 2 試薬で試料を処理する

40

50

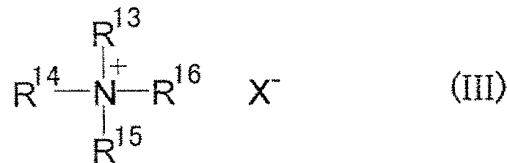
ことにより、蛍光色素の染色性の差から、有核赤血球と、好塩基球以外の白血球や好塩基球とを弁別することができる。

【0015】

カチオン性界面活性剤は、赤血球を溶血させ、白血球及び有核赤血球の細胞膜に損傷を与えることができる。カチオン性界面活性剤としては、第四級アンモニウム塩又はピリジニウム塩の型のものが好ましい。第四級アンモニウム塩の型のカチオン性界面活性剤としては、次の一般式(III)で表される第四級アンモニウム塩がより好ましい。

【0016】

【化1】



10

【0017】

上記式(III)中の R^{13} 、 R^{14} 及び R^{15} は同一又は異なってもよく、水素原子、炭素数1~8のアルキル基又は炭素数6~8のアラルキル基である。 R^{16} は、炭素数8~18のアルキル基、炭素数8~18のアルケニル基又は炭素数6~18のアラルキル基である。 X^- はアニオンである。

R^{13} 、 R^{14} 及び R^{15} としての炭素数1~8のアルキル基としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシル、ヘプチル、オクチルなどを挙げるができる。 R^{13} 、 R^{14} 及び R^{15} としての炭素数6~8のアラルキル基としては、ベンジル、フェネチルなどを挙げるができる。好ましくは、 R^{13} 、 R^{14} 及び R^{15} は、メチル、エチルなどの炭素数1~8のアルキル基である。

20

R^{16} としての炭素数8~18のアルキル基としては、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシルなどを挙げることができる。 R^{16} としての炭素数8~18のアルケニル基としては、オクテニル、デセニル、オレイルなどを挙げることができる。 R^{16} としての炭素数6~18のアラルキル基としては、ベンジル、フェネチルなどを挙げるができる。好ましくは、 R^{16} は、デシル、ドデシル、テトラデシルなどの炭素数10~18の直鎖のアルキル基である。

30

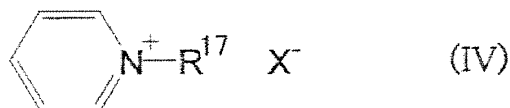
アニオン X^- としては、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 及び I^- のようなハロゲンイオン、 CF_3SO_3^- 、 BF_4^- 、 ClO_4^- などが挙げられる。

【0018】

ピリジニウム塩の型のカチオン性界面活性剤としては、次の式(IV)で表されるピリジニウム塩がより好ましい。

【0019】

【化2】



40

【0020】

上記式(IV)中の R^{17} は、炭素数8~18のアルキル基である。 X^- はアニオンである。

なお、炭素数8~18のアルキル基としては、デシル、ドデシル、テトラデシルなどの炭素数10~18の直鎖のアルキル基を挙げることができる。アニオン X^- としては、 F^- 、 Cl^- 、 Br^- 及び I^- のようなハロゲンイオン、 CF_3SO_3^- 、 BF_4^- 、 ClO_4^- などが挙げられる。

【0021】

上記のカチオン性界面活性剤の具体例としては、デシルトリメチルアンモニウムプロミ

50

ド、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド、オクチルトリメチルアンモニウムブロミド、オクチルトリメチルアンモニウムクロライド、ラウリルトリメチルアンモニウムブロミド、ラウリルトリメチルアンモニウムクロライド、ミリスチルトリメチルアンモニウムブロミド、ミリスチルトリメチルアンモニウムクロライド、ラウリルピリジニウムクロライドなどが挙げられる。

【 0 0 2 2 】

カチオン性界面活性剤は、赤血球を溶血し、白血球及び有核赤血球の細胞膜に損傷を与えるのに十分な濃度で使用される。この濃度は、例えば、通常の光学顕微鏡で細胞膜等の状態を観察することによって、好適な濃度が簡単に決定される。カチオン性界面活性剤の濃度としては、具体的には、300～9000mg/Lが好ましく、400～8000mg/Lがより好ましく、500～7000mg/Lが最も好ましいが、使用するカチオン性界面活性剤の種類により適宜調製することができる。

10

なお、カチオン性界面活性剤の濃度が低すぎると、好塩基球と好塩基球以外の白血球との正確な弁別ができなくなる場合がある。これは、カチオン性界面活性剤の濃度が低すぎると白血球に十分な損傷を与えることができず、その結果として、好塩基球と好塩基球以外の白血球との間の大きさや形態の差が小さくなってしまいうためと考えられる。一方、カチオン性界面活性剤の濃度が高すぎると、有核赤血球と好塩基球以外の白血球との正確な弁別ができなくなる場合がある。これは、カチオン性界面活性剤の濃度が高すぎると、特に好塩基球以外の白血球及び有核赤血球の細胞膜に過度の損傷が与えられ、その結果として、有核赤血球と好塩基球以外の白血球との正確な弁別ができなくなるためと考えられる。従って、上記の範囲の濃度であれば、白血球や有核赤血球の細胞膜には過度の損傷を与えずに、赤血球を効率よく溶血させることができる。また、カチオン性界面活性剤の溶血力は、その主鎖の長さに依存している。主鎖の長いものは、溶血力が強く、従って主鎖の短いものに比べて少量で効果が得られる。

20

【 0 0 2 3 】

採血後時間が経過した試料では、白血球などの血球が形態変化などにより損傷を受けやすくなる。そして、カチオン性界面活性剤を使用すると、特に好塩基球以外の白血球や有核赤血球の細胞膜に過度の損傷が与えられてしまい、有核赤血球と好塩基球以外の白血球との正確な弁別ができない場合がある。しかしながら、このような場合に、カチオン性界面活性剤と共にノニオン性界面活性剤を使用すると、白血球などへの過度の損傷が抑えられ、有核赤血球と好塩基球以外の白血球とをより正確に弁別することができる。ノニオン性界面活性剤としては、ポリオキシエチレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル、ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレンステロール、又はポリオキシエチレン水素添加ステロールが好ましい。

30

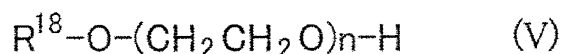
【 0 0 2 4 】

ポリオキシエチレンアルキルエーテルの型のノニオン性界面活性剤としては、以下の式(V)で表されるものが好ましい。

【 0 0 2 5 】

【化3】

40



【 0 0 2 6 】

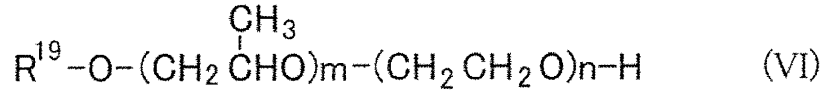
上記式中のR¹⁸は、炭素数12～22のアルキル基又は炭素数12～22のアルケニル基である。nは10～30である。

【 0 0 2 7 】

ポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテルの型のノニオン性界面活性剤としては、以下の式(VI)で表されるものが好ましい。

【 0 0 2 8 】

【化4】



【0029】

上記式中の R^{19} は、炭素数10～30のアルキル基又は炭素数～アルケニル基である。
 m は1～10である。 n は10～30である。

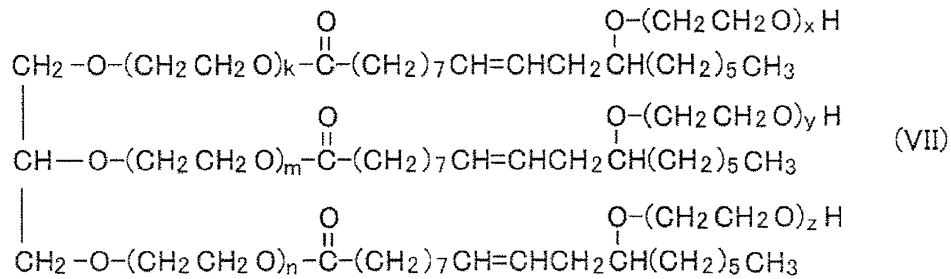
【0030】

ポリオキシエチレンヒマシ油の型のノニオン性界面活性剤としては、以下の式(VII)で表されるものが好ましい。

10

【0031】

【化5】



20

【0032】

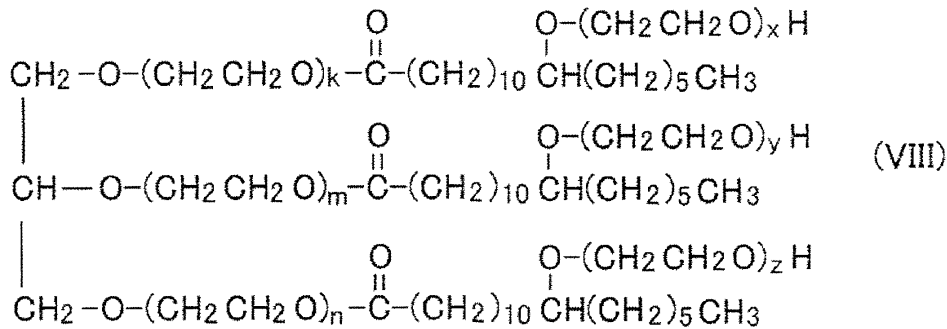
上記式中の k 、 n 、 m 、 x 、 y 及び z の合計は、10～60である。

【0033】

ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油の型のノニオン性界面活性剤としては、以下の式(VIII)で表されるものが好ましい。

【0034】

【化6】



30

【0035】

上記式中の k 、 n 、 m 、 x 、 y 及び z の合計は、10～60である。

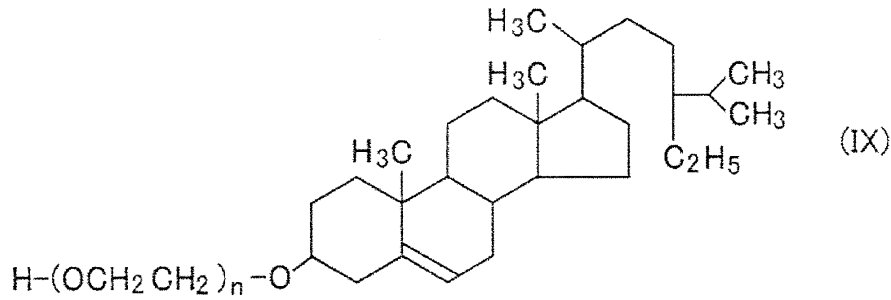
【0036】

ポリオキシエチレンステロールの型のノニオン性界面活性剤としては、以下の式(IX)で表されるものが好ましい。

40

【0037】

【化7】



【0038】

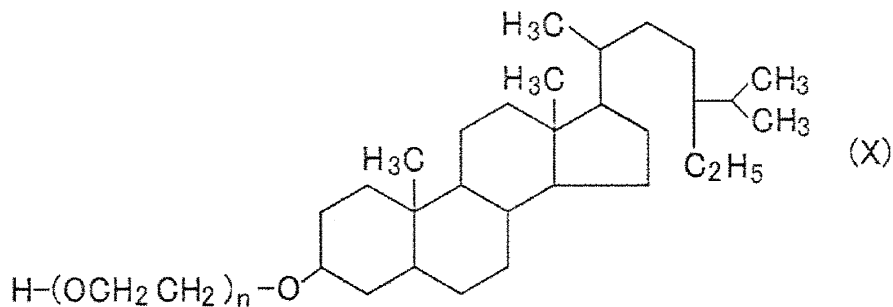
上記式中の n は、10 ~ 30 である。

【0039】

ポリオキシエチレン水素添加ステロールの型のノニオン性界面活性剤としては、以下の式 (X) 又は式 (XI) で表されるものが好ましい。

【0040】

【化8】

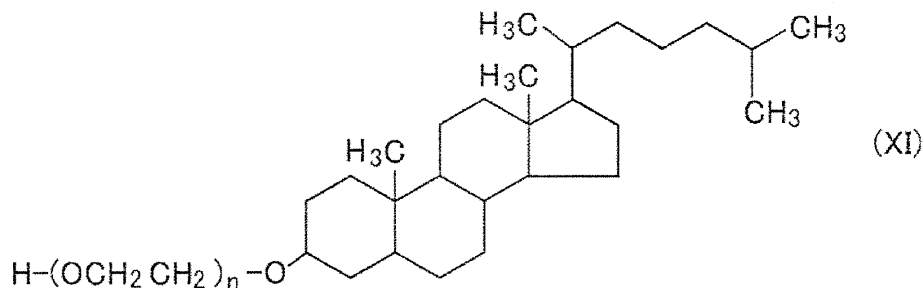


【0041】

上記式中の n は、20 ~ 30 である。

【0042】

【化9】



【0043】

上記式中の n は、20 ~ 30 である。

【0044】

なお、炭素数 12 ~ 22 のアルキル基としては、ドデシル基、ヘキサデシル基などを挙げることができる。炭素数 12 ~ 22 のアルケニル基としては、オレイル基などを挙げることができる。また、上記の式 (V)、式 (VI)、式 (IX) ~ 式 (XI) 中の n が小さすぎると血球の細胞膜に過度の損傷を与えてしまい、大きすぎると血球の細胞膜に十分な損傷を与えることができなくなる場合がある。同様に、上記の式 (VII) 及び式 (VIII) 中の k 、 n 、 m 、 x 、 y 及び z の合計が小さすぎると血球の細胞膜に過度の損傷を与えてしまい、大きすぎると血球の細胞膜に十分な損傷を与えることができなくなる場合がある。

【0045】

ノニオン性界面活性剤としては、具体的には、ポリオキシエチレン (16) オレイルエ

10

20

30

40

50

ーテル、ポリオキシエチレン(20)セチルエーテル、ポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(8)セチルエーテル、ポリオキシエチレン(30)ポリオキシプロピレン(6)デシルテトラデシルエーテル、ポリオキシエチレン(20)ヒマシ油、ポリオキシエチレン(20)硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレン(50)硬化ヒマシ油、ポリオキシエチレン(25)フィトスタノール、などが挙げられる。この中でも、ポリオキシエチレン(16)オレイルエーテル、ポリオキシエチレン(20)ポリオキシプロピレン(8)セチルエーテルが特に好ましい。

【0046】

ノニオン性界面活性剤の濃度としては、500~7000mg/Lが好ましく、800~6000mg/Lがより好ましく、1000~5000mg/Lが最も好ましいが、使用するノニオン性界面活性剤の種類により適宜調製することができる。

10

なお、ノニオン性界面活性剤の濃度が少なすぎると、例えば採血後時間が経過した試料を用いた場合に、カチオン性界面活性剤による白血球及び有核赤血球の細胞膜への過度の損傷が抑えられず、特に有核赤血球と好塩基球以外の白血球とを正確に弁別できない場合がある。一方、ノニオン性界面活性剤の濃度が高すぎると、カチオン性界面活性剤による白血球及び有核赤血球の細胞膜への損傷を阻害して、特に好塩基球と好塩基球以外の白血球とを正確に弁別できない場合がある。従って、上記の範囲の濃度であれば、採血後時間が経過した試料を用いた場合であっても、有核赤血球と好塩基球以外の白血球を正確に弁別することができる。

【0047】

20

第1試薬は、分子内に少なくとも一つの芳香環を有するカルボン酸(以下、「芳香族カルボン酸」という)又はその塩を少なくとも1種類含有することが好ましい。芳香族カルボン酸を使用することにより、より効率的に短時間で赤血球を溶血することができる。

なお、芳香族カルボン酸を含まない第1試薬を測定に用いた場合、血液試料によっては好塩基球の値が偽高値を示す場合がある。偽高値となる理由は明らかになっていないが、血液試料に含まれる好塩基球以外の血球又はその他の成分が、好塩基球と類似する大きさ、形態又は蛍光強度を示しているからであると考えられる。しかしながら、上記の血液試料を、芳香族カルボン酸を含む第1試薬を用いて測定することによって、偽高値を示す現象を抑えることができる。

【0048】

30

使用する芳香族カルボン酸としては、分子内に少なくとも一つの芳香環を有する有機酸又はその塩であれば特に限定されない。好ましい芳香族カルボン酸としては、サリチル酸、フタル酸、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸、アミノ安息香酸、及びそれらの塩などが挙げられる。

第1試薬中の上記の芳香族カルボン酸又はその塩の濃度は、第1試薬中のpHが以下に示した範囲となる濃度であれば特に限定されないが、0.1~100mMが好ましく、0.5~50mMがより好ましい。

なお、芳香族カルボン酸の濃度が少なすぎると上述したような効果が十分に得られず、好塩基球を正確に弁別できない場合がある。一方、芳香族カルボン酸の濃度が高すぎると、有核赤血球と好塩基球以外の白血球とを正確に弁別できない場合がある。従って、上記の範囲の濃度であれば、有核赤血球と好塩基球とを他の血球から正確に弁別することができる。

40

【0049】

第1試薬で試料を処理する際には、有核赤血球や好塩基球との測定に障害となる赤血球を溶血させることが好ましい。赤血球は、通常、約150mOsm/kg以下の浸透圧で細胞膜に細孔を生じ、赤血球内部のヘモグロビンを溶出し光学的に透明になる(溶血する)。光学的に透明になった赤血球は、実質的にフローサイトメトリを用いる測定の障害とはならない。赤血球の溶血には、低い浸透圧条件及び低いpH条件が好ましい。この二つの条件を満足する浸透圧は、20mOsm/kg~150mOsm/kgである。上記第1試薬の浸透圧をこの範囲に設定することにより、有核赤血球や好塩基球との測定に障害となる赤血球を効率よ

50

く溶血させることができる。

【0050】

好塩基球には、酸性条件下では他の白血球に比べて破壊されにくいといった特性がある。ゆえに、第1試薬のpHは、2.0～4.5が好ましく、2.0～3.5がより好ましい。pHがこの範囲内であれば、好塩基球の顆粒が安定する。また、pHがこの範囲内であれば、白血球、有核赤血球などには過度の影響を与えずに赤血球を効率よく溶血させることができる。これにより、無核の赤血球の散乱光や蛍光は極めて小さくなるので、赤血球が、有核赤血球や白血球の測定に実質的に悪影響をおよぼさない。

【0051】

第1試薬のpHは、緩衝剤を用いて調整してもよい。好ましい緩衝剤は、所望の $\text{pH} \pm 2.0$ の付近に pKa を有する緩衝剤であり、例えば、リンゴ酸、酒石酸、マロン酸、コハク酸、クエン酸、ジグリコール酸などが挙げられる。第1試薬中の上記の緩衝剤の濃度は、pHを上記の範囲に保つことができるものであれば特に限定されない。

10

【0052】

なお、上記の芳香族カルボン酸と上記の緩衝剤とを組み合わせると、有核赤血球の弁別の性能が向上するため、好適である。緩衝剤と芳香族カルボン酸との組み合わせとしては、例えば、リンゴ酸とサリチル酸又はサリチル酸塩、リンゴ酸とフタル酸又はフタル酸塩、クエン酸とサリチル酸又はサリチル酸塩、クエン酸とフタル酸又はフタル酸塩、リンゴ酸と安息香酸又は安息香酸塩、リンゴ酸、及びフタル酸又はフタル酸塩と安息香酸又は安息香酸塩、などが挙げられる。

20

【0053】

第1試薬中の浸透圧を赤血球の溶血に適切な範囲とするために、例えば NaCl 、 KCl などの電解質、糖類などを用いることができる。また、上記の緩衝剤の濃度によっても浸透圧を調整することができる。

【0054】

第1試薬は、上記の界面活性剤及び芳香族カルボン酸又はその塩と、所望により上記の緩衝剤とを、上記の濃度になるように適切な溶媒に溶解し、所望により NaOH 、 HCl などを用いてpHを調整することにより得ることができる。上記の適切な溶媒としては、上記の成分を溶解させることができるものであれば特に限定されないが、例えば、水、有機溶媒、これらの混合液などが挙げられる。有機溶媒としては、アルコール、エチレングリコール、ジメチルスルホキシド（以下、「 DMSO 」という）などが挙げられる。

30

【0055】

第2試薬は、核酸を染色可能な蛍光色素を含有する。上記第1試薬で処理した試料中の血球を、核酸を染色可能な蛍光色素で染色した場合、白血球は強く染色され、強い蛍光を発する。一方、有核赤血球は弱く染色され、弱い蛍光を発する。蛍光色素の染色性の差から、有核赤血球と、好塩基球以外の白血球や好塩基球とを弁別することができる。このように白血球と有核赤血球の蛍光強度に差異が生じる作用機序は明確ではないが、おそらく有核赤血球の核(DNA)が凝縮しているために、色素の細胞核への取り込みが阻害されていると考えられる。

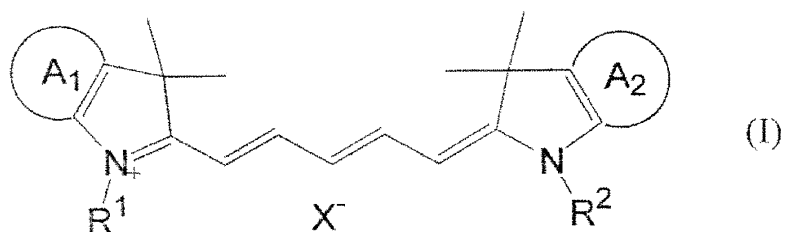
【0056】

蛍光色素としては、核酸を染色するものであれば特に限定されず、一般的に当該分野において用いられるのであれば使用できる。第2試薬に含有される蛍光色素としては、以下の式(I)の蛍光色素及び式(II)の蛍光色素が挙げられる。

40

【0057】

【化10】

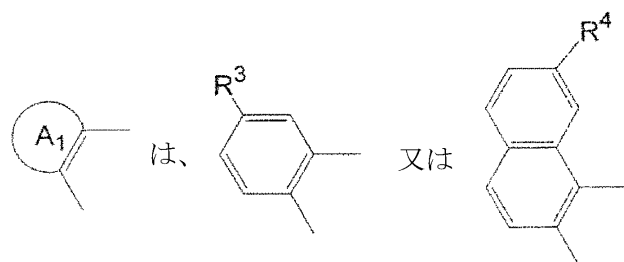


【0058】

上記式中の R^1 及び R^2 は、アルキル基である。なお、 R^1 及び R^2 は、互いに同一又は異なっている。さらに、

【0059】

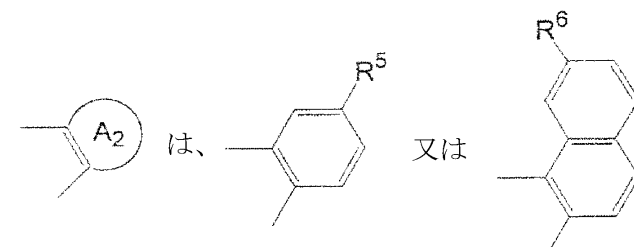
【化11】



である。また、

【0060】

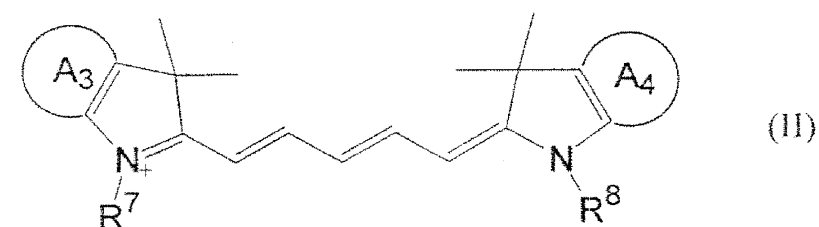
【化12】



である。 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 は、水素原子又はアルキル基である。なお、 R^3 、 R^4 、 R^5 及び R^6 は、互いに同一又は異なっている。 X^- はアニオンである。

【0061】

【化13】



【0062】

上記式中の R^7 及び R^8 は、酸性基を有していてもよいアルキル基である。なお、 R^7 及び R^8 は、互いに同一又は異なっている。さらに、

【0063】

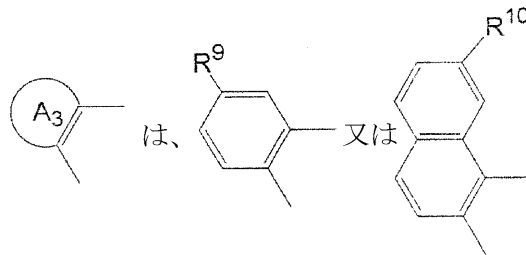
10

20

30

40

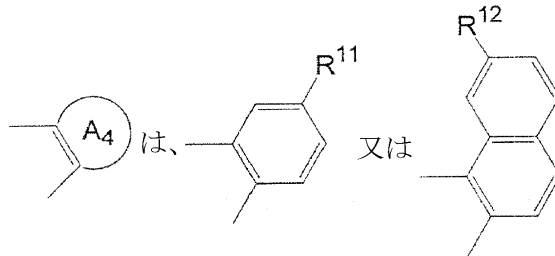
【化14】



である。また、

【0064】

【化15】



である。R⁹、R¹⁰、R¹¹及びR¹²は、水素原子又は酸性基である。R⁹、R¹⁰、R¹¹及びR¹²は、互いに同一又は異なっている。但し、R⁷～R¹²のいずれか1つには、酸性基が存在する。R⁷～R¹²に存在し得る酸性基は、塩を形成していてもよい。但し、R⁷～R¹²に存在し得る酸性基のうちいずれか1つは、プロトンを放出した基である。

【0065】

本明細書において、上記の式(I)及び式(II)における「アルキル基」は、直鎖状又は分枝鎖状のいずれであってもよい。アルキル基の炭素数は、通常、1～20、好ましくは1～10であるが、蛍光色素の水溶性の観点から、炭素数1～6がより好ましい。アルキル基の好ましい例としては、メチル、エチル、プロピル、ブチル、ペンチル、ヘキシルなどが挙げられる。

【0066】

式(I)におけるアニオンX⁻としては、F⁻、Cl⁻、Br⁻及びI⁻のようなハロゲンイオン、CF₃SO₃⁻、BF₄⁻、ClO₄⁻などが挙げられる。

【0067】

本明細書において、式(II)において存在し得る「酸性基」とは、プロトンを放出し得る基及びプロトンを放出し得る基がプロトンを放出した基の両方を含む。プロトンを放出し得る基としては、カルボキシル基、スルホン酸基、リン酸基などが挙げられ、スルホン酸基が好ましい。

【0068】

上記の酸性基は塩を形成していてもよい。このような塩としては、ナトリウム塩、カリウム塩のようなアルカリ金属塩などが挙げられる。より好ましくは、ナトリウム塩である。

【0069】

上記の式(I)及び式(II)の蛍光色素は、1種又は2種以上を用いることができる。上記の蛍光色素は、株式会社林原生物化学研究所から購入することができる。

【0070】

本発明の試料分析用試薬中の色素の濃度は、色素の種類により適宜選択することができるが、一般に0.01～100mg/L、好ましくは0.1～10mg/L、より好ましくは0.2～6.0mg/Lである。

【0071】

なお、第2試薬に含有される上記の式(I)及び式(II)の蛍光色素は、有核赤血球

10

20

30

40

50

に対する親和性よりも白血球に対する親和性が強いので、白血球を強く染色する。従って、これらの蛍光色素を用いて染色された細胞から発せられる蛍光の差異に基づいて、有核赤血球と好塩基球以外の白血球や好塩基球とを、より正確に弁別することができる。

【0072】

第2試薬は、上記の蛍光色素を上記の濃度になるように適切な溶媒に溶解することにより得ることができる。また、適切な溶媒としては、上記の蛍光色素を溶解させることができるものであれば特に限定されないが、水、有機溶媒、これらの混合液などが挙げられる。有機溶媒としては、アルコール、エチレングリコール、DMSOなどが挙げられる。なお、蛍光色素は水溶液中での長期保存安定性が低い場合があり、その場合は上記の有機溶媒中に溶解させるのが好ましい。

10

【0073】

試料分析用試薬キットは、第1試薬：第2試薬：試料の容量比が、10～500：1～10：1、より好ましくは20～100：2～5：1となる量で試料と混合するのが好ましい。このような比で第1試薬、第2試薬及び試料を混合して測定用試料とすることにより、赤血球の溶解が速やかに進行し、血球成分の染色を良好に行うことができる。また、試料の量は数 μ l～100 μ l程度あれば、測定を良好に行うことができる。

【0074】

本発明の一実施形態である試料分析方法は、上記の第1試薬により、試料中の赤血球を溶血させ、血球の細胞膜に蛍光色素が透過できる程度の損傷を与え、上記の第2試薬により、損傷を受けた血球を染色する工程、染色された血球に光を照射して散乱光情報及び蛍光情報を取得する工程、及び得られた散乱光情報及び得られた蛍光情報に基づいて、試料中の好塩基球及び/又は有核赤血球を分類して計数する工程を含む。

20

【0075】

染色工程では、第1試薬と第2試薬と試料とを混合する。この工程において、第1試薬に含まれるカチオン性界面活性剤、アニオン性界面活性剤及び芳香族カルボン酸は、試料中の赤血球を溶血させ、血球の細胞膜に蛍光色素が透過できる程度の損傷を与える。ゆえに、第1試薬と第2試薬と試料とを混合することによって、測定対象の血球を効率的に蛍光染色することが可能となる。

【0076】

染色工程において、第1試薬と第2試薬と試料とを混合する順序としては、特に限定されない。第1試薬と第2試薬とを先に混合し、この混合液と試料とを混合してもよい。また、第1試薬と試料とを先に混合し、この混合液と第2試薬とを混合してもよい。いずれの順序で混合しても同等の測定結果を得ることができる。

30

【0077】

染色工程では、第1試薬と第2試薬と試料とを混合した後に、15～50℃、好ましくは30～45℃の温度で5～120秒間、好ましくは5～30秒間反応させるのが好ましい。

【0078】

染色工程において染色された血球は、フローサイトメータを用いることにより分析することができる。以下、フローサイトメータを用いた血球の分析について説明する。染色された血球がフローサイトメータのフローセルを通過する際に、血球に光を照射することにより、散乱光情報及び蛍光情報を得ることができる。散乱光情報としては、一般に市販されるフローサイトメータで測定できる散乱光であれば特に限定されず、前方散乱光（例えば、受光角度0～20度付近）、側方散乱光（受光角度90度付近）などの散乱光のパルス幅、散乱光強度などが挙げられる。一般に、側方散乱光は細胞の核や顆粒などの内部情報を反映し、前方散乱光は細胞の大きさの情報を反映することが知られている。本実施形態の方法においては、散乱光情報として前方散乱光強度及び側方散乱光強度を用いることが好ましい。

40

【0079】

蛍光情報とは、適当な波長の光を測定用試料に照射して、励起された蛍光を測定して得

50

られるものである。使用する蛍光色素に応じて、適当な受光波長を選択することができる。蛍光は、上記の蛍光色素によって染色された細胞内の核酸や顆粒などから発せられる。

【 0 0 8 0 】

用いるフローサイトメータの光源は特に限定されず、蛍光色素の励起に好適な波長の光源が選ばれる。例えば、赤半導体レーザー、青半導体レーザー、アルゴンレーザー、He - Neレーザーなどが使用される。特に半導体レーザーは気体レーザーに比べて非常に安価であり、好適である。

【 0 0 8 1 】

上記のようにして測定した散乱光と蛍光とに基づいて、有核赤血球及び好塩基球を他の成分から弁別して計数することができる。この工程は、例えば、(1) 蛍光情報と前方散乱光情報とを二軸とするスキヤッタグラムを作成し、(2) 前方散乱光情報と側方散乱光情報とを二軸とするスキヤッタグラムを作成し、(3) 得られた各スキヤッタグラムを適当な解析ソフトで解析することを含むのが好ましい。

X軸に蛍光強度、Y軸に前方散乱光強度をとってスキヤッタグラムを描いた場合、例えば、図1に示すように、有核赤血球、好塩基球及び好塩基球以外の白血球は、それぞれ集団(クラスター)を形成して分布する。なお、図中で、NRBCと示したのは有核赤血球の集団であり、BASOと示したのは好塩基球の集団であり、WBC - BASOと示したのは好塩基球以外の白血球の集団であり、WBCと示したのは白血球の集団である。このようなスキヤッタグラムにおいては、有核赤血球は白血球よりも蛍光強度が小さい領域に出現する。このことにより、白血球と有核赤血球とを明確に弁別することができる。また、好塩基球は、好塩基球以外の白血球よりもサイズが大きく、蛍光強度が大きい領域に出現する。このことにより、好塩基球以外の白血球と弁別することができる。しかしながら、白血球数が多い試料や採血後時間が経過した試料を測定した場合、蛍光強度と前方散乱光強度とを利用したスキヤッタグラムにおいて、好塩基球と好塩基球以外の白血球とを、正確に弁別できないことがある。その場合は、前方散乱光情報と側方散乱光情報とを利用することができる。X軸に側方散乱光強度、Y軸に前方散乱光強度をとってスキヤッタグラムを描いた場合、例えば図2に示すように、好塩基球及び好塩基球以外の白血球は、それぞれ集団(クラスター)を形成して分布する。なお、図中で、BASOと示したのは好塩基球の集団であり、WBC - BASOと示したのは好塩基球以外の白血球の集団である。このようなスキヤッタグラムにおいては、好塩基球は、他の白血球よりも側方散乱光強度と前方散乱光強度が大きい領域に出現する。このことにより、好塩基球と他の白血球を弁別することができる。さらに、前述したように、図1から有核赤血球と他の白血球を弁別することができる。ゆえに、図1及び図2のどちらの領域にも含まれる細胞を好塩基球として算出することにより、より精度の高い好塩基球を求めることができる。

【 0 0 8 2 】

なお、スキヤッタグラム上の各集団がどの血球に対応するかは、各血球のみを含む試料を本実施形態の試薬キットで処理した後、測定を行い、出現位置を確認することによって特定することができる。

【 0 0 8 3 】

スキヤッタグラム上の集団を、適当な解析ソフトで解析することにより、有核赤血球及び好塩基球の数と割合を算出することができる。具体的には、スキヤッタグラムにおいて、ある所定の細胞が出現すると考えられる位置に細胞集団が認められた場合、まずこの集団の中心を特定する。この中心から他の細胞集団の出現領域までの間で、所定の細胞集団の細胞が出現している部分までをこの細胞集団の境界とすることができる。設定された領域内に出現する細胞を、所定の細胞として計数することができる。また、好塩基球以外の白血球も計数することにより、全白血球に対する好塩基球の比率(好塩基球/全白血球:以下、「好塩基球比率」という)と、全白血球に対する有核赤血球の比率(有核赤血球/全白血球:以下、「有核赤血球比率」という)とを算出することができる。なお、有核赤血球比率は、通常100個の白血球当たり出現する有核赤血球の百分率で表され、単位は「個/100WBC」と表記される。

【 0 0 8 4 】

本実施形態の試料分析用試薬キット及び試料分析方法を用いると、有核赤血球が形成する集団及び好塩基球が形成する集団が、他の血球細胞が形成する集団からそれぞれ明確に分離されるので、より正確な計数を行うことができる。

【 0 0 8 5 】

本発明を以下の実施例によってさらに詳細に説明するが、本発明には種々の変更、修飾が可能であり、本発明の範囲は以下の実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【 0 0 8 6 】

以下の実施例において用いたカチオン性界面活性剤は、デシルトリメチルアンモニウムプロマイド（以降、DTABとする）、ドデシルトリメチルアンモニウムクロライド（LTAC）である。

10

【 0 0 8 7 】

以下の実施例において用いたノニオン性界面活性剤は、以下のとおりである。
 ポリオキシエチレン（16）オレイルエーテル（製品名：NIKKOL BO-16）、
 ポリオキシエチレン（20）セチルエーテル（製品名：NIKKOL BC-20TX）、
 ポリオキシエチレン（20）ポリオキシプロピレン（8）セチルエーテル（製品名：NIKKOL PBC-44）、
 ポリオキシエチレン（30）ポリオキシプロピレン（6）デシルテトラデシルエーテル（製品名：NIKKOL PEN-4630）、
 ポリオキシエチレン（20）ヒマシ油（製品名：NIKKOL CO-20TX）、
 ポリオキシエチレン（20）硬化ヒマシ油（製品名：NIKKOL HCO-20）、
 ポリオキシエチレン（50）硬化ヒマシ油（製品名：NIKKOL HCO-50）、
 ポリオキシエチレン（25）フィトスタノール（製品名：NIKKOL BPSH-25）。

20

いずれも日光ケミカルズ株式会社から購入することができる。

【 0 0 8 8 】

以下の実施例において用いた芳香族カルボン酸は、サリチル酸、フタル酸、安息香酸、ヒドロキシ安息香酸及びアミノ安息香酸である。

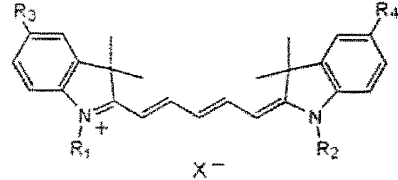
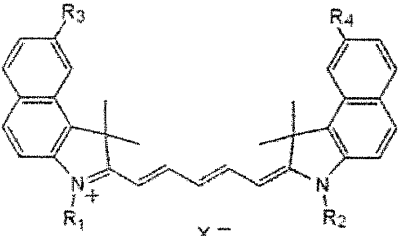
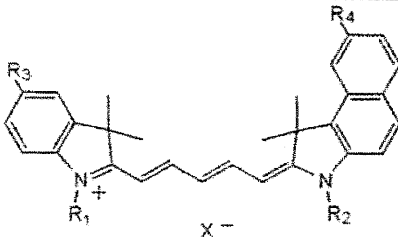
30

【 0 0 8 9 】

以下の実施例において用いた蛍光色素は、NK-529、NK-2670、NK-3750、NK-3383、NK-1840、NK-9001、NK-9003、NK-2929、NK-3375、NK-5056、NK-3266、NK-3620である。いずれも株式会社林原生物化学研究所から購入することができる。これら色素の化学式を、表1に示した。

【 0 0 9 0 】

【表 1】

一般式	色素名	構造				
		R1	R2	R3	R4	X
	NK-529	CH ₃	CH ₃	H	H	I ⁻
	NK-2670	CH ₃	CH ₃	H	H	ClO ₄ ⁻
	NK-3750	CH ₃	CH ₃	H	H	BF ₄ ⁻
	NK-3383	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	H	H	ClO ₄ ⁻
	NK-1840	(CH ₂) ₃ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₃ SO ₃ Na	H	H	なし
	NK-9001	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ Na	H	H	なし
	NK-9003	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	SO ₃ Na	SO ₃ ⁻	なし
	NK-2929	CH ₃	CH ₃	H	H	ClO ₄ ⁻
	NK-3375	CH ₃	CH ₃	H	H	I ⁻
	NK-5056	(CH ₂) ₄ SO ₃ ⁻	(CH ₂) ₄ SO ₃ ·NH(C ₂ H ₅) ₃	H	H	なし
	NK-3266	CH ₃	CH ₃	H	H	ClO ₄ ⁻
	NK-3620	C ₄ H ₉	C ₄ H ₉	H	H	ClO ₄ ⁻

10

20

30

【0091】

比較例 1

本例では、従来の方法を利用して、採血後約 8 時間経過した血液試料を測定した。

被験者 3 名からそれぞれ採取された血液試料を、自動血球計数装置 X E - 2 1 0 0 (シスメックス製：赤半導体レーザ (633 nm) を搭載) を用いて測定し、全白血球数及び好塩基球を計数した。この計数結果に基づいて、好塩基球比率を算出した。なお、試薬としては、ストマトライザ - F B I I (シスメックス製) を用いた。また、測定には、採血後約 8 時間経過した血液試料を用いた。

40

測定の結果、これら試料の好塩基球の含有量は、正常値以上であることが認められた (以下、この試料を B A S O 試料 1、B A S O 試料 2 及び B A S O 試料 3 とする)。B A S O 試料 1 の好塩基球比率は 0.8%、B A S O 試料 2 の好塩基球比率は 3.4%、B A S O 試料 3 の好塩基球比率は 1.6% であった。これらの結果を実施例 1 又は 2 の対照とした。

【0092】

次に、上記とは別の被験者 3 名からそれぞれ採取された血液試料に含まれる有核赤血球を、自動血球計数装置 X E - 2 1 0 0 を用いて測定し、全白血球数及び有核赤血球数を計数した。この計数結果に基づいて、有核赤血球比率を算出した。なお、試薬としては、ストマトライザ - N R (シスメックス製) を用いた。また、測定には、採血後約 8 時間経過

50

した血液試料を用いた。

測定の結果、これらの試料は有核赤血球が出現していることが認められた（以下、この試料をNRBC試料1、NRBC試料2及びNRBC試料3とする）。NRBC試料1の有核赤血球比率は4.4個/100WBC、NRBC試料2の有核赤血球比率は1.9個/100WBC、NRBC試料3の有核赤血球比率は1.3個/100WBCであった。これらの結果を実施例1又は2の対照とした。

【0093】

実施例1

本実施例では、下記の組成の第1試薬及び第2試薬を調製し、各試薬を用いて採血後約8時間経過した血液試料を測定した。

なお、第1試薬のpHは3.0である。

【0094】

第1試薬A

サリチル酸ナトリウム 0.5mM、DL-リンゴ酸 10mM、LTAC 2000ppm、BO-16 1000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬B

サリチル酸ナトリウム 0.5mM、DL-リンゴ酸 10mM、LTAC 1500ppm、PBC-44 1000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬C

サリチル酸ナトリウム 10mM、LTAC 2000ppm、BO-16 1000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬D

サリチル酸ナトリウム 10mM、LTAC 1500ppm、PBC-44 1000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬E

フタル酸水素カリウム 0.5mM、DL-リンゴ酸 10mM、LTAC 2000ppm、BO-16 1000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬F

フタル酸水素カリウム 2mM、DL-リンゴ酸 10mM、LTAC 1500ppm、PBC-44 1000ppmを含有する水溶液である。

【0095】

第2試薬

エチレングリコール 100mL中に、NK-3383 15mgを溶解したものである。

【0096】

上記の第1試薬1mL、第2試薬20μL及び血液試料（BASO試料1、2若しくは3、又はNRBC試料1、2若しくは3）20μLを十分に混和し、その混合液を40で10秒間反応させて測定用試料を調製した。測定用試料を633nmの励起光源を有するフローサイトメータの検出部に導き、測定用試料中の細胞に励起光を照射した。そして、該細胞から発せられる散乱光信号及び蛍光信号を検出し、得られた信号を解析して測定用試料中の好塩基球、有核赤血球及び全白血球を測定した。この測定は、自動血球計数装置XE-2100を用いて行われた。

なお、測定には、採血後約8時間経過したBASO試料1及び2並びにNRBC試料1及び2を用いた。

【0097】

測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1のスキヤッタグラム、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2のスキヤッタグラムを作成した。採血後約8時間経過したBASO試料1及び2を用いた測定により得られた第2スキヤッタグラムを図3に、採血後約8時間経過したNRBC試料1及び2を用いた測定により得られた第1スキヤッタグラムを図4に示す。

10

20

30

40

50

さらに、これらスキャッタグラムに基づいて、全白血球、好塩基球及び有核赤血球を計数し、好塩基球比率及び有核赤血球比率を算出した。表2は、比較例1及び本実施例で算出された、採血後8時間経過したBASO試料1又は2の好塩基球比率を示したものである。表3は、比較例1及び本実施例で算出された、採血後8時間経過したNRBC試料1又は2の有核赤血球比率を示したものである。

【0098】

【表2】

使用した試料	実施例		比較例の 好塩基球比率(%)
	使用した試薬	好塩基球比率(%)	
BASO試料1 (採血後8時間)	第1試薬A、第2試薬	1.1	0.8
	第1試薬B、第2試薬	1.1	
	第1試薬C、第2試薬	1.2	
	第1試薬D、第2試薬	1.1	
	第1試薬E、第2試薬	1.2	
	第1試薬F、第2試薬	1.2	
BASO試料2 (採血後8時間)	第1試薬A、第2試薬	3.5	3.4
	第1試薬B、第2試薬	3.8	
	第1試薬C、第2試薬	3.5	
	第1試薬D、第2試薬	3.6	
	第1試薬E、第2試薬	3.7	
	第1試薬F、第2試薬	3.7	

10

20

【0099】

【表3】

使用した試料	実施例		比較例の 有核赤血球比率 (個/100WBC)
	使用した試薬	有核赤血球比率 (個/100WBC)	
NRBC試料1 (採血後8時間)	第1試薬A、第2試薬	5.3	4.4
	第1試薬B、第2試薬	4.6	
	第1試薬C、第2試薬	4.2	
	第1試薬D、第2試薬	4.5	
	第1試薬E、第2試薬	4	
	第1試薬F、第2試薬	4.2	
NRBC試料2 (採血後8時間)	第1試薬A、第2試薬	1.8	1.9
	第1試薬B、第2試薬	1.8	
	第1試薬C、第2試薬	2.1	
	第1試薬D、第2試薬	1.8	
	第1試薬E、第2試薬	2	
	第1試薬F、第2試薬	2	

30

40

【0100】

図3に示すように、本実施例の試料分析用試薬を用いた場合、好塩基球が好塩基球以外の白血球から明確に弁別されることがわかった。図4に示すように、本実施例の試料分析用試薬を用いた場合、有核赤血球が好塩基球や好塩基球以外の白血球から明確に弁別されることがわかった。このように、好塩基球及び有核赤血球がそれぞれ明確に弁別されるため、図3及び4に示すようにしてスキャッタグラム上で所定の領域内に出現する細胞を好塩基球及び有核赤血球として、それらの数や全白血球数に対する比率を正確に求めることができた。

また、表2及び3より、実施例1で算出された比率と比較例1で算出された比率とは近似した値であった。従って、本実施例の試料分析用試薬を用いると、有核赤血球と好塩基

50

球とをそれぞれ別々の試薬を用いて測定した場合と同程度の精度で測定を行うことができることが確認された。

【0101】

実施例2

本実施例では、実施例1の第1試薬及び第2試薬を用いて採血後約50時間経過した血液試料を測定した。測定方法は、血液試料以外は、実施例1と同じである。本例の測定には、採血後約50時間経過したBASO試料2又は3並びにNRBC試料2又は3を用いた。

なお、実施例1の第1試薬A～Fのうち、BASO試料2及びNRBC試料2の測定には第1試薬A、B、E及びFを用い、BASO試料3及びNRBC試料3の測定には第1試薬C及びDを用いた。

10

【0102】

実施例1と同様に、測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1のスクアッタグラム、前方散乱光強度及び側方散乱光強度を二軸とする第2のスクアッタグラムを作成した。採血後約50時間経過したBASO試料2を用いた測定により得られた第1スクアッタグラム及び第2スクアッタグラム、並びに採血後約50時間経過したNRBC試料2を用いた測定により得られた第1スクアッタグラムを図5に示す。また、採血後約50時間経過したBASO試料3を用いた測定により得られた第1スクアッタグラム及び第2スクアッタグラム、並びに採血後約50時間経過したNRBC試料3を用いた測定により得られた第1スクアッタグラムを図6に示す。

20

さらに、これらスクアッタグラムに基づいて、全白血球、好塩基球及び有核赤血球を計数し、好塩基球比率及び有核赤血球比率を算出した。表4は、本実施例で算出された、採血後50時間経過したBASO試料2又は3の好塩基球比率を示したものである。なお、表4では、第1スクアッタグラム（前方散乱光強度及び蛍光強度）及び第2スクアッタグラム（前方散乱光強度及び側方散乱光強度）に基づいて算出されたそれぞれの好塩基球比率を示した。表5は、本実施例で算出された、採血後50時間経過したNRBC試料2又は3の有核赤血球比率を示したものである。

【0103】

【表4】

使用した試料	使用した試薬	好塩基球比率(%)	
		前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 蛍光強度
BASO試料2 (採血後50時間)	第1試薬A、第2試薬	36	33
	第1試薬B、第2試薬	36	36
	第1試薬E、第2試薬	36	35
	第1試薬F、第2試薬	34	34
BASO試料3 (採血後50時間)	第1試薬C、第2試薬	16	16
	第1試薬D、第2試薬	18	19

30

【0104】

【表 5】

使用した試料	使用した試薬	有核赤血球比率 (個/100WBC)
NRBC試料2 (採血後50時間)	第1試薬A、第2試薬	1.9
	第1試薬B、第2試薬	1.8
	第1試薬E、第2試薬	1.8
	第1試薬F、第2試薬	1.8
NRBC試料3 (採血後50時間)	第1試薬C、第2試薬	1.1
	第1試薬D、第2試薬	1.2

10

【0105】

図5及び図6に示すように、本実施例の試料分析用試薬を用いた場合、採血後約50時間経過した試料中の好塩基球が、好塩基球以外の白血球から明確に分画されることがわかる。また、本実施例の試料分析用試薬を用いた場合、採血後約50時間経過した試料中の有核赤血球が、好塩基球や好塩基球以外の白血球から明確に分画されることがわかる。このように、採血後に時間が経過した試料であっても、好塩基球及び有核赤血球がそれぞれ明確に弁別されるため、図5及び6に示すようにしてスキャッタグラム上で所定の領域内に出現する細胞を好塩基球及び有核赤血球として、それらの数や全白血球数に対する比率を正確に求めることができた。

20

比較例1の方法で測定した場合、採血後約8時間経過したBASO試料2の好塩基球比率は3.4%、採血後約8時間経過したBASO試料3の好塩基球比率は1.6%であった。さらに、採血後約8時間経過したNRBC試料2の有核赤血球比率は1.9個/100WBC、採血後約8時間経過したNRBC試料3の有核赤血球比率は1.3個/100WBCであった。これら比較例1の結果並びに表4及び表5の結果から、実施例2で算出された比率と比較例1で算出された比率とは近似した値であった。従って、本実施例の試料分析用試薬を用いると、採血後に時間が経過した試料であっても、有核赤血球と好塩基球とをそれぞれ別々の試薬を用いて測定した場合と同程度の精度で測定を行うことが確認された。

30

また、表2及び表4のBASO試料2の結果から、採血後約50時間経過した試料において算出された好塩基球比率と、採血後約8時間経過した試料において算出された好塩基球比率とは近似した値であった。表3及び表5NRBC試料2の結果から、採血後約50時間経過した試料において算出された有核赤血球比率と、採血後約8時間経過した試料において算出された有核赤血球比率とは近似した値であった。

以上のことから、本実施例の試料分析用試薬を用いると、採血後に時間が経過した試料であっても、高い精度で測定を行うことが確認された。

【0106】

実施例3

本実施例では、カチオン性界面活性剤であるDTABと各種のノニオン性界面活性剤との組み合わせについて検討した。ここでは、下記の組成の第1試薬及び第2試薬を調製した。なお、第1試薬のpHは3.0である。

40

【0107】

第1試薬A

サリチル酸ナトリウム 10mM、BO-16 3000ppm及びDTAB 3000ppmを含有した水溶液である。

第1試薬B

サリチル酸ナトリウム 10mM、BO-16 7000ppm及びDTAB 7000ppmを含有した水溶液である。

第1試薬C

50

サリチル酸ナトリウム 10 mM、PBC - 44 3000 ppm及びDTAB 5000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬D

サリチル酸ナトリウム 10 mM、PBC - 44 7000 ppm及びDTAB 7000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬E

サリチル酸ナトリウム 10 mM、BC - 20TX 2000 ppm及びDTAB 3000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬F

サリチル酸ナトリウム 10 mM、BC - 20TX 2000 ppm及びDTAB 5000 ppmを含有した水溶液である。 10

第1試薬G

サリチル酸ナトリウム 10 mM、BPSH - 25 3000 ppm及びDTAB 7000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬H

サリチル酸ナトリウム 10 mM、BPSH - 25 7000 ppm及びDTAB 7000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬I

サリチル酸ナトリウム 10 mM、HCO - 50 5000 ppm及びDTAB 5000 ppmを含有した水溶液である。 20

第1試薬J

サリチル酸ナトリウム 10 mM、HCO - 50 7000 ppm及びDTAB 7000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬K

サリチル酸ナトリウム 10 mM、HCO - 20 3000 ppm及びDTAB 5000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬L

サリチル酸ナトリウム 10 mM、HCO - 20 7000 ppm及びDTAB 7000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬M

サリチル酸ナトリウム 10 mM、CO - 20TX 3000 ppm及びDTAB 5000 ppmを含有した水溶液である。 30

第1試薬N

サリチル酸ナトリウム 10 mM、CO - 20TX 7000 ppm及びDTAB 7000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬O

サリチル酸ナトリウム 10 mM、PEN - 4630 3000 ppm及びDTAB 5000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬P

サリチル酸ナトリウム 10 mM、PEN - 4630 5000 ppm及びDTAB 7000 ppmを含有した水溶液である。 40

【0108】

第2試薬

NK - 3383 300 ppmを含有するエチレングリコールである。

【0109】

上記の第1試薬1 mL、第2試薬20 µL及びBASO又はNRBCの含有が認められた血液試料(BASO試料4又はNRBC試料4)20 µLを十分に混和し、その混合液を41で10秒間反応させて測定用試料を調製した。実施例1と同様に自動血球計数装置XE-2100を用いて、測定用試料中の好塩基球、有核赤血球及び全白血球を測定した。なお、測定には、採血後約8時間経過した血液試料を用いた。

【 0 1 1 0 】

B A S O 試料 4 から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第 1 のスキヤッタグラム、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第 2 のスキヤッタグラムを作成した。N R B C 試料 4 から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とするスキヤッタグラムを作成した。各スキヤッタグラムは、図 7、8、9 及び 10 に示した。

【 0 1 1 1 】

図 7 ~ 10 に示すように、D T A B とノニオン性界面活性剤とを組み合わせた試料分析用試薬を用いた場合、好塩基球が好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。さらに、D T A B とノニオン性界面活性剤とを組み合わせた試料分析用試薬を用いた場合、有核赤血球が好塩基球や好塩基球以外の白血球から明確に弁別されることがわかった。

10

また、本実施例で使用した B A S O 試料 4 中に含まれる好塩基球は、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第 2 スキヤッタグラム、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第 1 スキヤッタグラムのいずれにおいても、好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。

このように、好塩基球及び有核赤血球がそれぞれ明確に弁別されるため、図 7 ~ 10 に示すようにしてスキヤッタグラム上で所定の領域内に出現する細胞を好塩基球及び有核赤血球として、それらの数や全白血球数に対する比率を正確に求めることが可能である。

【 0 1 1 2 】

20

実施例 4

本実施例では、カチオン性界面活性剤である L T A C と各種のノニオン性界面活性剤との組み合わせについて検討した。ここでは、下記の組成の第 1 試薬及び第 2 試薬を調製した。なお、第 1 試薬の p H は 3 . 0 である。

【 0 1 1 3 】

第 1 試薬 A

サリチル酸ナトリウム 1 0 m M、B O - 1 6 1 0 0 0 p p m 及び L T A C 1 0 0 0 p p m を含有した水溶液である。

第 1 試薬 B

サリチル酸ナトリウム 1 0 m M、B O - 1 6 5 0 0 0 p p m 及び L T A C 2 0 0 0 p p m を含有した水溶液である。

30

第 1 試薬 C

サリチル酸ナトリウム 1 0 m M、P B C - 4 4 1 0 0 0 p p m 及び L T A C 1 0 0 0 p p m を含有した水溶液である。

第 1 試薬 D

サリチル酸ナトリウム 1 0 m M、P B C - 4 4 5 0 0 0 p p m 及び L T A C 2 0 0 0 p p m を含有した水溶液である。

第 1 試薬 E

サリチル酸ナトリウム 1 0 m M、B C - 2 0 T X 1 0 0 0 p p m 及び L T A C 1 0 0 0 p p m を含有した水溶液である。

40

第 1 試薬 F

サリチル酸ナトリウム 1 0 m M、B C - 2 0 T X 5 0 0 0 p p m 及び L T A C 2 0 0 0 p p m を含有した水溶液である。

第 1 試薬 G

サリチル酸ナトリウム 1 0 m M、B P S H - 2 5 1 0 0 0 p p m 及び L T A C 1 5 0 0 p p m を含有した水溶液である。

第 1 試薬 H

サリチル酸ナトリウム 1 0 m M、B P S H - 2 5 5 0 0 0 p p m 及び L T A C 2 0 0 0 p p m を含有した水溶液である。

第 1 試薬 I

50

サリチル酸ナトリウム 10 mM、HCO-50 1000 ppm及びLTAC 1000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬J

サリチル酸ナトリウム 10 mM、HCO-50 7000 ppm及びLTAC 2000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬K

サリチル酸ナトリウム 10 mM、HCO-20 1000 ppm及びLTAC 1000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬L

サリチル酸ナトリウム 10 mM、HCO-20 7000 ppm及びLTAC 2000 ppmを含有した水溶液である。 10

第1試薬M

サリチル酸ナトリウム 10 mM、PEN-4630 1000 ppm及びLTAC 1000 ppmを含有した水溶液である。

第1試薬N

サリチル酸ナトリウム 10 mM、PEN-4630 5000 ppm及びLTAC 1800 ppmを含有した水溶液である。

【0114】

第2試薬

NK-3383 300 ppmを含有するエチレングリコールである。 20

【0115】

上記の第1試薬1 mL、第2試薬20 µL及びBASO又はNRBCの含有が認められた血液試料(BASO試料5又はNRBC試料5)20 µLを十分に混和し、その混合液を41で10秒間反応させて測定用試料を調製した。実施例1と同様に自動血球計数装置XE-2100を用いて、測定用試料中の好塩基球、有核赤血球及び全白血球を測定した。なお、測定には、採血後約8時間経過した血液試料を用いた。

【0116】

BASO試料5から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1のスキヤッタグラム、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2のスキヤッタグラムを作成した。NRBC試料5から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とするスキヤッタグラムを作成した。各スキヤッタグラムは、図11、12、13及び14に示した。 30

【0117】

図11~14に示すように、LTACとノニオン性界面活性剤とを組み合わせた試料分析用試薬を用いた場合、好塩基球が好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。さらに、LTACとノニオン性界面活性剤とを組み合わせた試料分析用試薬を用いた場合、有核赤血球が好塩基球や好塩基球以外の白血球から明確に弁別されることがわかった。

また、本実施例で使用したBASO試料5中に含まれる好塩基球は、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする2スキヤッタグラム、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1スキヤッタグラムのいずれにおいても、好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。 40

このように、好塩基球及び有核赤血球がそれぞれ明確に弁別されるため、図11~14に示すようにしてスキヤッタグラム上で所定の領域内に出現する細胞を好塩基球及び有核赤血球として、それらの数や全白血球数に対する比率を正確に求めることが可能である。

実施例3及び実施例4より、カチオン性界面活性剤とノニオン性界面活性剤とを組み合わせた試料分析用試薬を用いることにより、血液試料中の有核赤血球及び好塩基球を他の白血球から、明確に弁別し、計数できることが示された。

【0118】

実施例5

本実施例では、芳香族カルボン酸と緩衝剤との組み合わせについて検討した。ここでは、下記の組成の第1試薬及び第2試薬を調製した。なお、第1試薬のpHは3.0である。

【0119】

第1試薬A

フタル酸水素カリウム 10mM、DL-リンゴ酸 0mM、BO-16 1000ppm及びLTAC 2000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬B

フタル酸水素カリウム 5mM、DL-リンゴ酸 5mM、BO-16 1000ppm及びLTAC 2000ppmを含有する水溶液である。

10

第1試薬C

フタル酸水素カリウム 1mM、DL-リンゴ酸 9mM、BO-16 1000ppm及びLTAC 2000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬D

フタル酸水素カリウム 0.3mM、DL-リンゴ酸 9.7mM、BO-16 1000ppm及びLTAC 2000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬E

サリチル酸ナトリウム 5mM、DL-リンゴ酸 5mM、PBC-44 1000ppm及びLTAC 1500ppmを含有する水溶液である。

第1試薬F

20

サリチル酸ナトリウム 1mM、DL-リンゴ酸 9mM、PBC-44 1000ppm及びLTAC 1500ppmを含有する水溶液である。

第1試薬G

サリチル酸ナトリウム 0.22mM、DL-リンゴ酸 10mM、PBC-44 1000ppm及びLTAC 1500ppmを含有する水溶液である。

第1試薬H

サリチル酸ナトリウム 5mM、DL-リンゴ酸 5mM、BO-16 1000ppm及びLTAC 2000ppmを含有する水溶液である。

第1試薬I

サリチル酸ナトリウム 1mM、DL-リンゴ酸 9mM、BO-16 1000ppm及びLTAC 2000ppmを含有する水溶液である。

30

第1試薬J

サリチル酸ナトリウム 0.24mM、DL-リンゴ酸 10mM、BO-16 1000ppm及びLTAC 2000ppmを含有する水溶液である。

【0120】

第2試薬

NK-3383 300ppmを含有するエチレングリコールである。

【0121】

上記の第1試薬1mL、第2試薬20μL及びBASO又はNRBCの含有が認められた血液試料(BASO試料6又はNRBC試料6)20μLを十分に混和し、その混合液を41で10秒間反応させて測定用試料を調製した。実施例1と同様に自動血球計数装置XE-2100を用いて、測定用試料中の好塩基球、有核赤血球及び全白血球を測定した。なお、測定には、採血後約8時間経過した血液試料を用いた。

40

【0122】

BASO試料6から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1のスキヤッタグラム、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2のスキヤッタグラムを作成した。NRBC試料6から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とするスキヤッタグラムを作成した。各スキヤッタグラムは、図15、16及び17に示した。

【0123】

50

図15～17に示すように、芳香族カルボン酸と緩衝剤とを組み合わせた試料分析用試薬を用いた場合、好塩基球が好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。さらに、芳香族カルボン酸と緩衝剤とを組み合わせた試料分析用試薬を用いた場合、有核赤血球が好塩基球や好塩基球以外の白血球から明確に弁別されることがわかった。

また、本実施例で使用したBASO試料6中に含まれる好塩基球は、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2スキヤッタグラム、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1スキヤッタグラムのいずれにおいても、好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。

このように、好塩基球及び有核赤血球がそれぞれ明確に弁別されるため、図15～17に示すようにしてスキヤッタグラム上で所定の領域内に出現する細胞を好塩基球及び有核赤血球として、それらの数や全白血球数に対する比率を正確に求めることが可能である。

【0124】

また、図15において、有核赤血球の集団の重心、好塩基球の集団の重心及び好塩基球以外の白血球の集団の重心を特定し、各重心に対応する蛍光強度の値を求め、各値を比較した(データには示していない)。なお、各集団の重心の求め方は、公知の方法を利用した(特開平5-149863号公報)。これにより、フタル酸のみを含む試料分析用試薬(第1試薬A)よりも、フタル酸とリンゴ酸の両方を含む試料分析用試薬(第1試薬B～D)を用いた方が、有核赤血球の蛍光強度と、好塩基球や好塩基球以外の白血球との蛍光強度の差が大きくなることがわかった。さらに、フタル酸とリンゴ酸の両方を含む試料分析用試薬(第1試薬B～D)のうちリンゴ酸の濃度が高い方(第1試薬C及びD)が、有核赤血球の蛍光強度と、好塩基球や好塩基球以外の白血球との蛍光強度の差が大きくなることがわかった。

このことは、図16及び図17のサリチル酸とリンゴ酸を含む試料分析用試薬(第1試薬E～J)においても、同様の傾向がみられた。以上のことから、芳香族カルボン酸と緩衝剤とを組み合わせることによって、特に有核赤血球の弁別の性能が向上することがわかった。

【0125】

実施例6

本実施例では、第2試薬の蛍光色素として種々の蛍光色素を用いた。ここでは、下記の組成の第1試薬及び第2試薬を調製した。なお、第1試薬のpHは3.0である。

【0126】

第1試薬

0.5mM フタル酸水素カリウム、10mM DL-リンゴ酸、1000ppm BO-16及び2000ppm LTACを含有する水溶液である。

【0127】

第2試薬A

NK-529 150ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬B

NK-2670 150ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬C

NK-3750 150ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬D

NK-3383 150ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬E

NK-1840 150ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬F

NK-9001 150ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬G

NK-9003 300ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬H

NK - 2929 150 ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬I

NK - 3375 150 ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬J

NK - 5056 300 ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬K

NK - 3266 150 ppmを含有するエチレングリコールである。

第2試薬L

NK - 3620 150 ppmを含有するエチレングリコールである。

【0128】

上記の第1試薬1 mL、第2試薬20 µL及びBASO又はNRBCの含有が認められた血液試料(BASO試料7又はNRBC試料7)20 µLを十分に混和し、その混合液を41で10秒間反応させて測定用試料を調製した。実施例1と同様に自動血球計数装置XE-2100を用いて、測定用試料中の好塩基球、有核赤血球及び全白血球を測定した。

なお、測定には、採血後約8時間経過した血液試料を用いた。

【0129】

BASO試料7から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1のスキッタグラム、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2のスキッタグラムを作成した。NRBC試料7から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とするスキッタグラムを作成した。各スキッタグラムは、図18、19及び20に示した。

【0130】

図18~20に示すように、いずれの蛍光色素を含む試料分析用試薬を用いた場合でも、好塩基球が好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。さらに、いずれの蛍光色素を含む試料分析用試薬を用いた場合でも、有核赤血球が好塩基球や好塩基球以外の白血球から明確に弁別されることがわかった。

また、本実施例で使用したBASO試料7中に含まれる好塩基球は、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2スキッタグラム、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1スキッタグラムのいずれにおいても、好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。

このように、好塩基球及び有核赤血球がそれぞれ明確に弁別されるため、図18~20に示すようにしてスキッタグラム上で所定の領域内に出現する細胞を好塩基球及び有核赤血球として、それらの数や全白血球数に対する比率を正確に求めることが可能である。

【0131】

実施例7

安息香酸類の検討

本実施例では、芳香族カルボン酸として、安息香酸カリウム、4-ヒドロキシ安息香酸ナトリウム、3-ヒドロキシ安息香酸ナトリウム、4-アミノ安息香酸カリウムを用いた。ここでは、下記の組成の第1試薬及び第2試薬を調製した。なお、第1試薬のpHは3.0である。

【0132】

第1試薬A

2 mM 安息香酸カリウム、8 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC-44及び2500 ppm LTACを含有する水溶液である。

第1試薬B

3 mM 安息香酸カリウム、7 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC-44及び2500 ppm LTACを含有する水溶液である。

第1試薬C

4 mM 安息香酸カリウム、6 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC-44及び2500 ppm LTACを含有する水溶液である。

10

20

30

40

50

第1試薬D

7 mM 4 - ヒドロキシ安息香酸ナトリウム、3 mM DL - リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。

第1試薬E

8 mM 4 - ヒドロキシ安息香酸ナトリウム、2 mM DL - リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。

第1試薬F

4 mM 3 - ヒドロキシ安息香酸ナトリウム、6 mM DL - リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。

第1試薬G

5 mM 3 - ヒドロキシ安息香酸ナトリウム、5 mM DL - リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。

第1試薬H

1 mM 安息香酸カリウム、9 mM DL - リンゴ酸、2000 ppm BO - 16 及び 2800 ppm LTAC を含有する水溶液である。

第1試薬I

2 mM 4 - アミノ安息香酸カリウム、8 mM DL - リンゴ酸、2000 ppm BO - 16 及び 2800 ppm LTAC を含有する水溶液である。

【0133】

なお、第1試薬A～Gまでは、2 mM フタル酸水素カリウム、10 mM DL - リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液を対照とし、第1試薬H及びIは、0.5 mM フタル酸水素カリウム、10 mM DL - リンゴ酸、2000 ppm BO - 16 及び 2800 ppm LTAC を含有する水溶液を対照とした。

【0134】

第2試薬

NK - 3383 150 ppm を含有するエチレングリコールである。

【0135】

上記の第1試薬1 mL、第2試薬20 µL 及びBASO又はNRBCの含有が認められた血液試料(BASO試料8及び9又はNRBC試料8及び9)20 µLを十分に混和し、その混合液を41で7秒間反応させて測定用試料を調製した。実施例1と同様に自動血球計数装置XE - 2100を用いて、測定用試料中の好塩基球、有核赤血球及び全白血球を測定した。なお、測定には、採血後約8時間経過した血液試料を用いた。

【0136】

BASO試料8及び9から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1のスクアッタグラム、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2のスクアッタグラムを作成した。NRBC試料8及び9から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とするスクアッタグラムを作成した。各スクアッタグラムは、図21及び22に示した。

【0137】

図21及び22に示すように、いずれの場合でも、好塩基球が好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。さらに、いずれの場合でも、有核赤血球が好塩基球や好塩基球以外の白血球から明確に弁別されることがわかった。

また、本実施例で使用したBASO試料8及び9中に含まれる好塩基球は、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2スクアッタグラム、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1スクアッタグラムのいずれにおいても、好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。

このように、好塩基球及び有核赤血球がそれぞれ明確に弁別されるため、図21及び22に示すようにしてスクアッタグラム上で所定の領域内に出現する細胞を好塩基球及び有核赤血球として、それらの数や全白血球数に対する比率を正確に求めることが可能である

10

20

30

40

50

。

【0138】

実施例 8

フタル酸水素カリウムと安息香酸カリウムの組み合わせ

本実施例では、芳香族カルボン酸として、フタル酸水素カリウムと安息香酸カリウムの組み合わせを検討した。ここでは、下記の組成の第1試薬及び第2試薬を調製した。なお、第1試薬のpHは3.0である。

【0139】

第1試薬 A

2 mM フタル酸水素カリウム、10 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。 10

第1試薬 B

1.5 mM フタル酸水素カリウム、0.5 mM 安息香酸カリウム、10 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。

第1試薬 C

1.33 mM フタル酸水素カリウム、0.66 mM 安息香酸カリウム、10 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。

第1試薬 D

1 mM フタル酸水素カリウム、1 mM 安息香酸カリウム、10 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。 20

第1試薬 E

0.66 mM フタル酸水素カリウム、1.33 mM 安息香酸カリウム、10 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。

第1試薬 F

0.5 mM フタル酸水素カリウム、1.5 mM 安息香酸カリウム、10 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。 30

第1試薬 G

2 mM 安息香酸カリウム、10 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC - 44 及び 2500 ppm LTAC を含有する水溶液である。

【0140】

第2試薬

NK - 3383 150 ppm を含有するエチレングリコールである。

【0141】

上記の第1試薬 1 mL、第2試薬 20 μ L 及びBASO又はNRBCの含有が認められた血液試料 (BASO試料10又はNRBC試料10) 20 μ L を十分に混和し、その混合液を41 で7秒間反応させて測定用試料を調製した。実施例1と同様に自動血球計数装置XE-2100を用いて、測定用試料中の好塩基球、有核赤血球及び全白血球を測定した。なお、測定には、採血後約8時間経過した血液試料を用いた。 40

【0142】

BASO試料10から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1のスキャッタグラム、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2のスキャッタグラムを作成した。NRBC試料10から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とするスキャッタグラムを作成した。各スキャッタグラムは、図23に示した。

【0143】

50

図23に示すように、いずれの場合でも、好塩基球が好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。さらに、いずれの場合でも、有核赤血球が好塩基球や好塩基球以外の白血球から明確に弁別されることがわかった。

また、本実施例で使用したBASO試料10中に含まれる好塩基球は、前方散乱光強度及び側方散乱光を二軸とする第2スキャッタグラム、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする第1スキャッタグラムのいずれにおいても、好塩基球以外の白血球成分から明確に弁別されることがわかった。

【0144】

フタル酸水素カリウムを用いた場合は、ゴースト量が少なくなるという長所があり、安息香酸カリウムはWBC分画とNRBC分画が明確に弁別され良好になるという長所がある。これらを混合して使用することにより、好塩基球及び有核赤血球が、それぞれより明確に弁別されるようになる。

【0145】

このように、好塩基球及び有核赤血球がそれぞれ明確に弁別されるため、図23に示すようにしてスキャッタグラム上で所定の領域内に出現する細胞を好塩基球及び有核赤血球として、それらの数や全白血球数に対する比率を正確に求めることが可能である。

【0146】

実施例9

採血後あまり時間が経過していない血液試料の測定

本実施例では、X軸に蛍光強度、Y軸に前方散乱光強度をとったスキャッタグラムを用い、本発明の試薬で、採血後あまり時間が経過していない血液試料のNRBC及びBASOの両方を測定した。ここでは、下記の組成の第1試薬及び第2試薬を調製した。

【0147】

第1試薬（溶血剤）：

2 mM フタル酸水素カリウム、10 mM DL-リンゴ酸、1000 ppm PBC-44及び2000 ppm LTACを含有する水溶液である。なお、第1試薬のpHは3.0である。

第2試薬（染色液）：

NK-3383 50 ppmを含有するエチレングリコールである。

【0148】

なお、血液試料としては、

BASOの含有が認められた血液試料（BASO試料）・・・12検体

NRBCの含有が認められた血液試料（NRBC試料）・・・12検体

を用いた。いずれの血液試料も、採血後約2～7時間経過したものである。

【0149】

第1試薬1 mL、第2試薬20 µL及び血液試料（BASO試料又はNRBC試料）20 µLを十分に混和し、その混合液を41で7秒間反応させて測定用試料を調製した。実施例1と同様に自動血球計数装置XE-2100を用いて、測定用試料中の好塩基球、有核赤血球及び全白血球を測定した。

BASO試料又はNRBC試料から調製された測定用試料について、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とするスキャッタグラムを作成した。BASO試料の測定結果から得られたスキャッタグラムの一つを、図25に示す。また、NRBC試料の測定結果から得られたスキャッタグラムの一つを、図26に示す。

【0150】

図25及び図26から、本発明の試薬は、採血後あまり時間が経過していない血液試料についても同様に、NRBC及びBASOの分別が可能となったことが明らかとなった。

【0151】

上記のスキャッタグラムにおいて、所定の領域内に出現する細胞を全白血球、好塩基球、有核赤血球として、それらの数を求めた。また、得られた各細胞の数から、全白血球数に対する好塩基球又は有核赤血球の比率を求めた。

10

20

30

40

50

【 0 1 5 2 】

さらに、同じ血液試料について、比較例 1 と同様の操作により、全白血球、好塩基球及び有核赤血球の数、並びに全白血球数に対する好塩基球又は有核赤血球の比率を、コントロールとして求めた。

【 0 1 5 3 】

そして、上記試薬（第 1 試薬、第 2 試薬）を用いた測定により得られた結果と上記コントロールの、全白血球数、好塩基球比率、有核赤血球比率の相関を確認した結果を、図 27 に示す。なお、図 27 において、実施例 9 及びコントロールの全白血球数は B A S O 試料を測定した場合の結果である。

【 0 1 5 4 】

図 27 から、本発明の試薬を用いて測定した結果及びコントロールは、全白血球数、好塩基球比率及び有核赤血球比率のいずれにおいても、相関係数（ r ）が 0.9 以上となり、高い相関関係があることが明らかとなった。このことから、本発明の試薬は、採血後あまり時間が経過していない血液試料についても同様に、N R B C 及び B A S O の測定が可能であることが分かった。

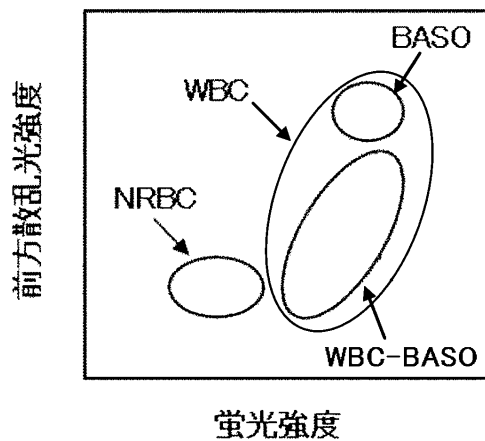
【 0 1 5 5 】

本出願は、2007年9月27日に出願された日本国特許出願特願2007-252666号、及び2008年3月24日に出願された日本国特許出願特願2008-76606号に関し、これらの特許請求の範囲、明細書、図面及び要約書の全ては本明細書中に参照として組み込まれる。

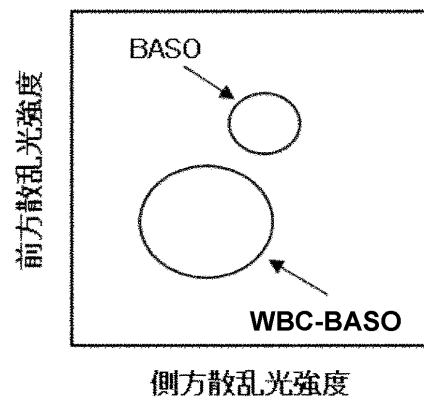
10

20

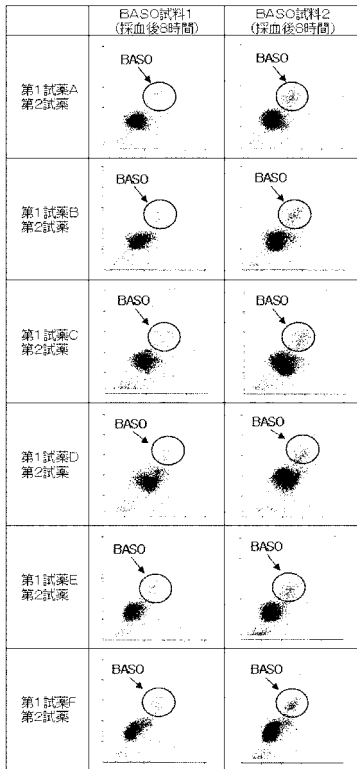
【 図 1 】



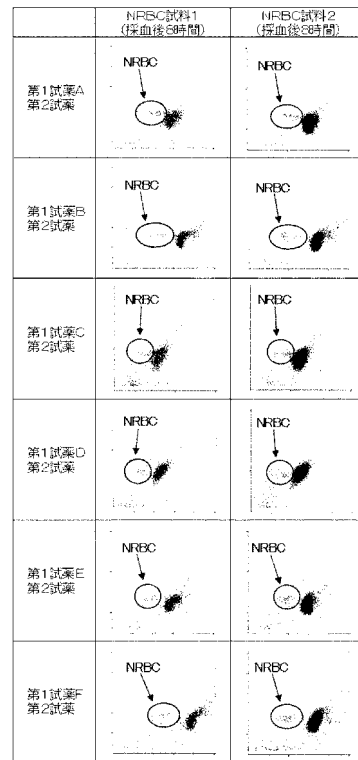
【 図 2 】



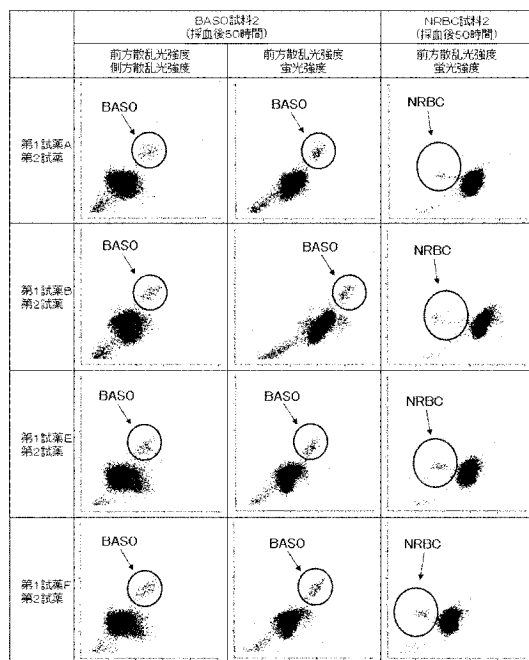
【 図 3 】



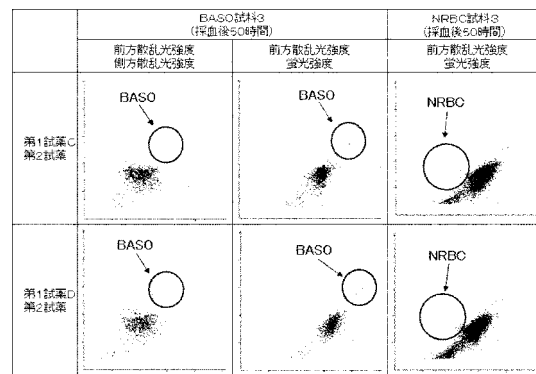
【 図 4 】



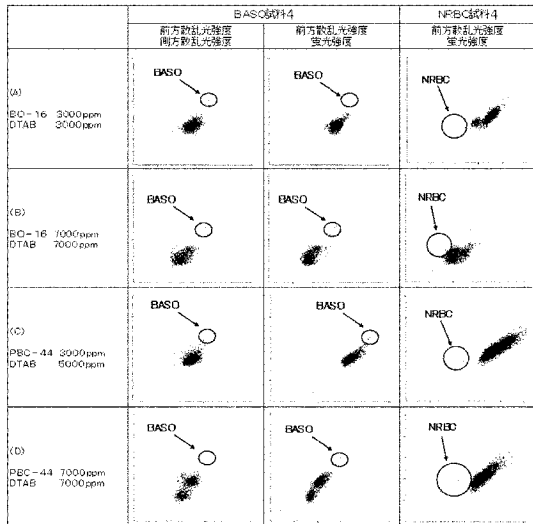
【 図 5 】



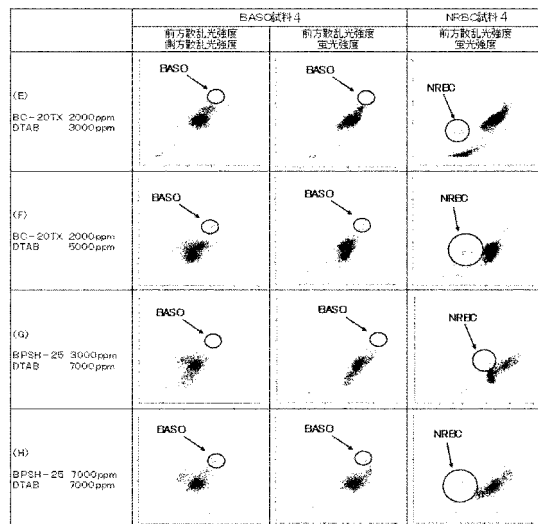
【 図 6 】



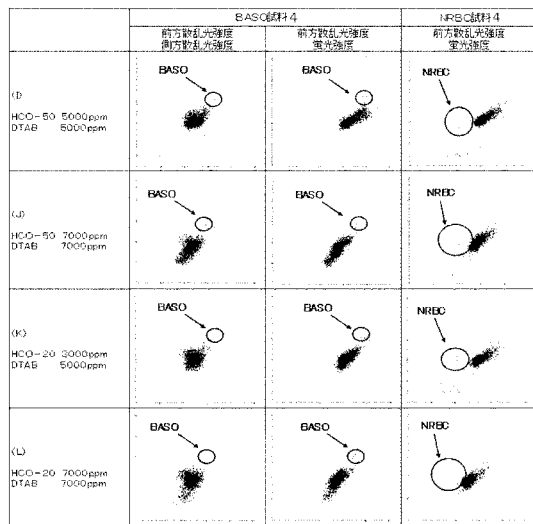
【 図 7 】



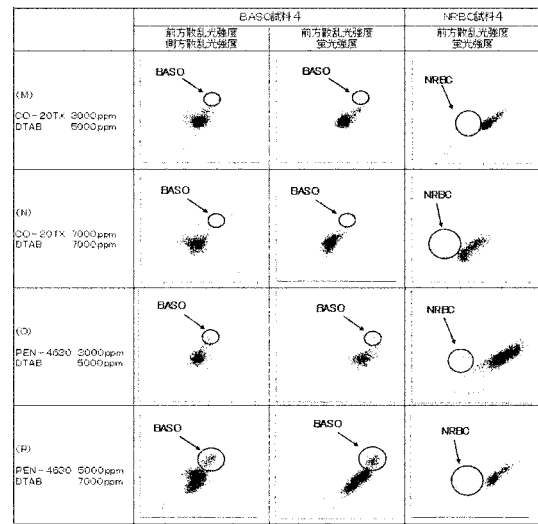
【 図 8 】



【 図 9 】



【 図 10 】



【 1 1 】

	HFBC試料4		BASO試料5	
	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度
(A)				
(B)				
(C)				
(D)				
	NRBC	NRBC	NRBC	NRBC
	BASO	BASO	BASO	BASO
	BASO	BASO	BASO	BASO
	BASO	BASO	BASO	BASO
	REN-4630 1000ppm LTAC 1000ppm	REN-16 5000ppm LTAC 2000ppm	REN-44 1000ppm LTAC 1000ppm	REN-44 5000ppm LTAC 2000ppm

【 1 2 】

	BASO試料5		NRBC試料5
	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度
(E)			
(F)			
(G)			
(H)			
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BC-20TX 1000ppm LTAC 1000ppm	BC-20TX 5000ppm LTAC 2000ppm	BPSH-25 1000ppm LTAC 1500ppm
	BPSH-25 5000ppm LTAC 2000ppm		

【 1 3 】

	BASO試料5		NRBC試料5
	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度
(I)			
(J)			
(K)			
(L)			
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	HCO-50 1000ppm LTAC 1000ppm	HCO-50 7000ppm LTAC 2000ppm	HCO-20 1000ppm LTAC 1000ppm
	HCO-20 7000ppm LTAC 2000ppm		

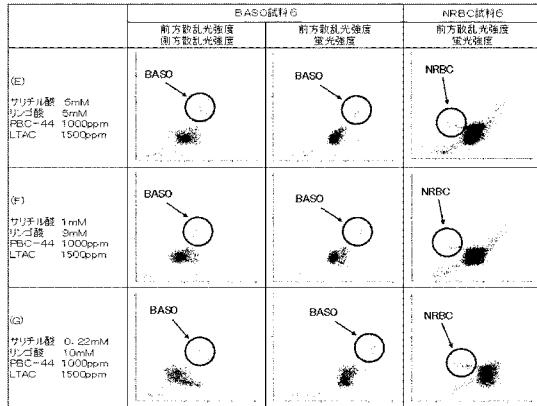
【 1 5 】

	BASO試料6		NRBC試料6
	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度
(A)			
(B)			
(C)			
(D)			
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	フタリ酸 10mM フタリ酸 9mM BC-16 1000ppm LTAC 2000ppm	フタリ酸 5mM フタリ酸 5mM BC-16 1000ppm LTAC 2000ppm	フタリ酸 1mM フタリ酸 9mM BC-16 1000ppm LTAC 2000ppm
	フタリ酸 0.3mM フタリ酸 0.7mM BC-16 1000ppm LTAC 2000ppm		

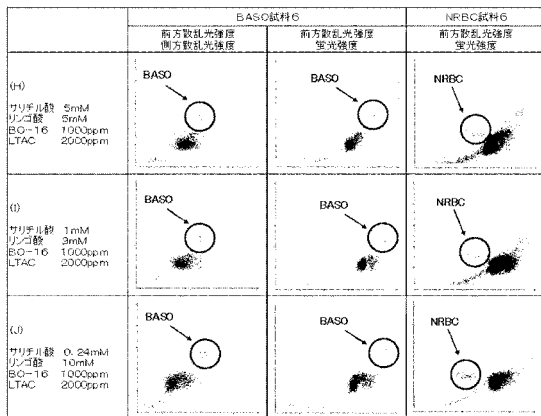
【 1 4 】

	BASO試料3		NRBC試料3
	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 側方散乱光強度
(M)			
(N)			
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	BASO	BASO	NRBC
	REN-4630 1000ppm LTAC 1000ppm	REN-4630 5000ppm LTAC 1800ppm	

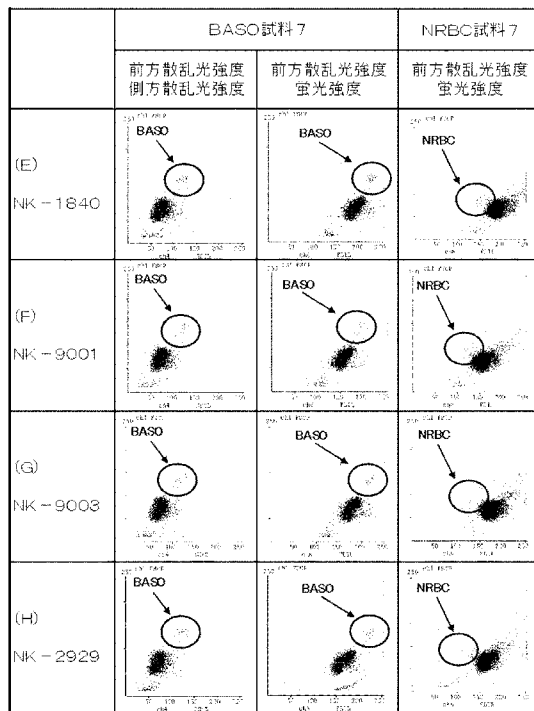
【図 16】



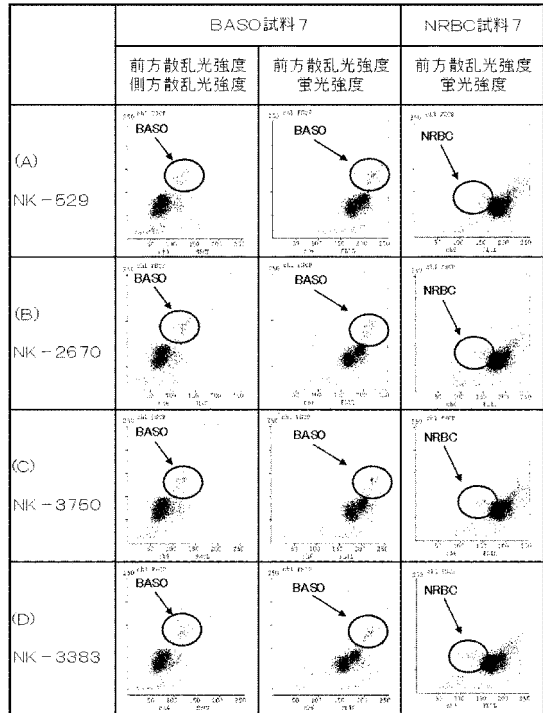
【図 17】



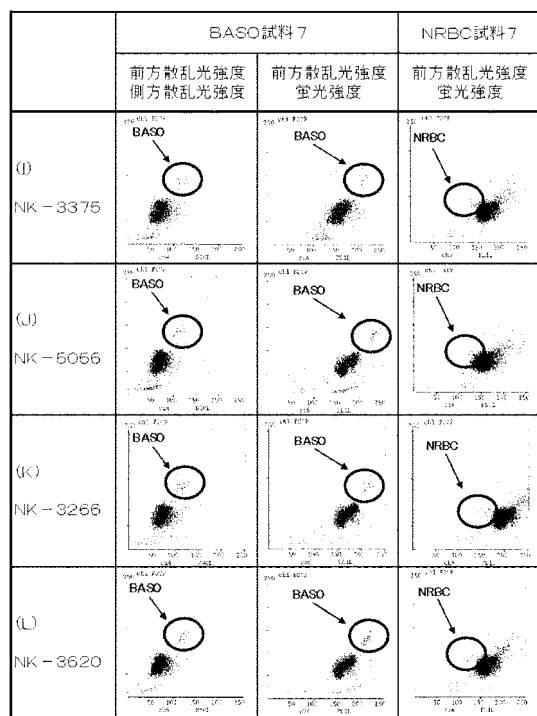
【図 19】



【図 18】



【図 20】



【図 2 1】

芳香族カルボン酸	BASO試料8		NRBC試料8
	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 蛍光強度	前方散乱光強度 蛍光強度
Ref. 2mM 7β-ヒドロキシカテコール 16mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(A) 2mM 安息香酸K 8mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(B) 3mM 安息香酸K 7mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(C) 4mM 安息香酸K 6mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(D) 7mM 4-ヒドロキシ安息香酸Na 3mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(E) 8mM 4-ヒドロキシ安息香酸Na 2mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(F) 4mM 3-ヒドロキシ安息香酸Na 6mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(G) 5mM 3-ヒドロキシ安息香酸Na 5mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC

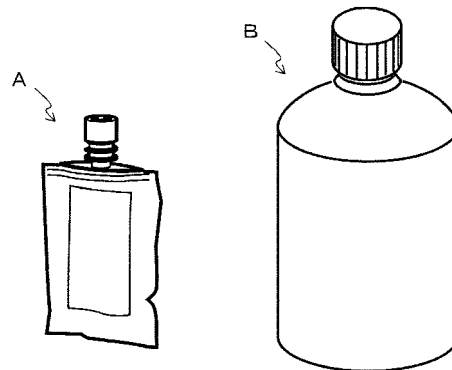
【図 2 2】

芳香族カルボン酸	BASO試料9		NRBC試料9
	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 蛍光強度	前方散乱光強度 蛍光強度
Ref. 0.5mM 7β-ヒドロキシカテコール 10mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(H) 1mM 安息香酸K 8mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC
(I) 2mM 4-アミノ安息香酸K 8mM DL-リンゴ酸	BASO	BASO	NRBC

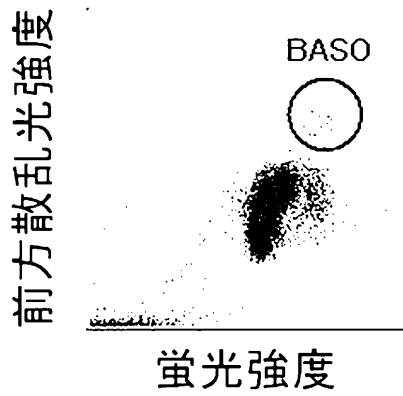
【図 2 3】

芳香族カルボン酸	BASO試料10		NRBC10
	前方散乱光強度 側方散乱光強度	前方散乱光強度 蛍光強度	前方散乱光強度 蛍光強度
(A) 2mM 7β-ヒドロキシカテコール 0mM 安息香酸K	BASO	BASO	NRBC
(B) 1.5mM 7β-ヒドロキシカテコール 0.5mM 安息香酸K	BASO	BASO	NRBC
(C) 1.33mM 7β-ヒドロキシカテコール 0.66mM 安息香酸K	BASO	BASO	NRBC
(D) 1mM 7β-ヒドロキシカテコール 1mM 安息香酸K	BASO	BASO	NRBC
(E) 0.66mM 7β-ヒドロキシカテコール 1.33mM 安息香酸K	BASO	BASO	NRBC
(F) 0.5mM 7β-ヒドロキシカテコール 1.5mM 安息香酸K	BASO	BASO	NRBC
(G) 0mM 7β-ヒドロキシカテコール 2mM 安息香酸K	BASO	BASO	NRBC

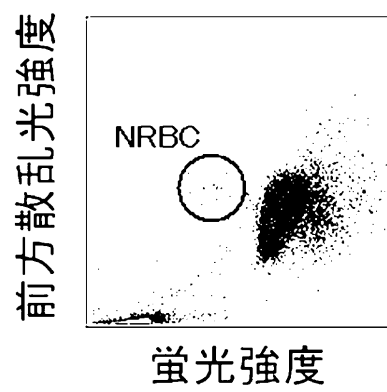
【図 2 4】



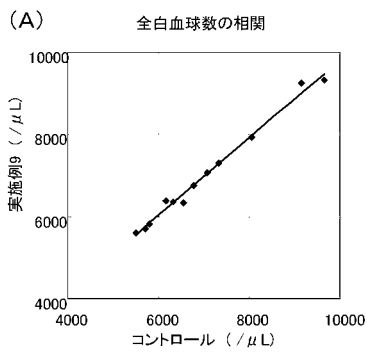
【図25】



【図26】



【図27-1】

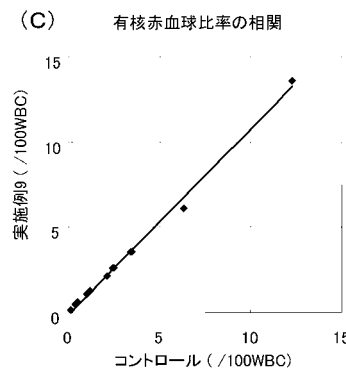


$$y = 0.945x + 357$$

$$r = 0.995$$

(N = 12)

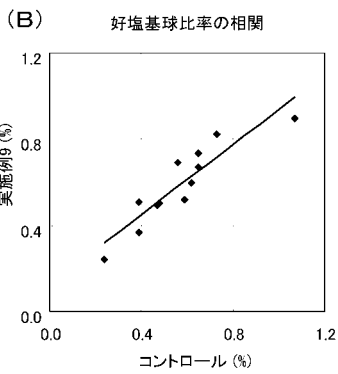
【図27-2】



$$y = 1.083x - 0.078$$

$$R = 0.998$$

(N = 12)



$$y = 0.815x + 0.122$$

$$R = 0.912$$

(N = 12)

フロントページの続き

- (72)発明者 糸瀬 裕司
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 小国 振一郎
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 吉田 歩
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 鈴木 佐緒里
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
- (72)発明者 水上 利洋
兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内

審査官 赤坂 祐樹

- (56)参考文献 特開平07-294518(JP,A)
特開平06-222059(JP,A)
特開2002-148261(JP,A)
特開2006-105625(JP,A)
米国特許第06027709(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
G01N 15/14
C09B 23/00