

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4794334号
(P4794334)

(45) 発行日 平成23年10月19日(2011.10.19)

(24) 登録日 平成23年8月5日(2011.8.5)

(51) Int.Cl.

F 1

GO 1 N	33/493	(2006.01)	GO 1 N	33/493	A
C 1 2 Q	1/04	(2006.01)	C 1 2 Q	1/04	
GO 1 N	33/52	(2006.01)	GO 1 N	33/52	A
GO 1 N	21/78	(2006.01)	GO 1 N	21/78	C
GO 1 N	21/77	(2006.01)	GO 1 N	21/77	D

請求項の数 9 (全 27 頁)

(21) 出願番号	特願2006-78007 (P2006-78007)
(22) 出願日	平成18年3月22日 (2006.3.22)
(65) 公開番号	特開2007-255954 (P2007-255954A)
(43) 公開日	平成19年10月4日 (2007.10.4)
審査請求日	平成21年3月12日 (2009.3.12)

(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
(74) 代理人	100109793 弁理士 神谷 恵理子
(72) 発明者	河島 康之 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	山村 祥子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】尿試料分析用試薬及び尿試料の分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

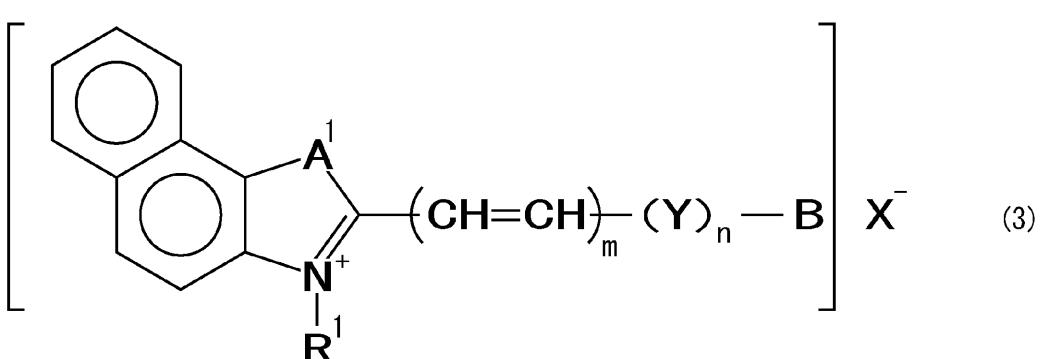
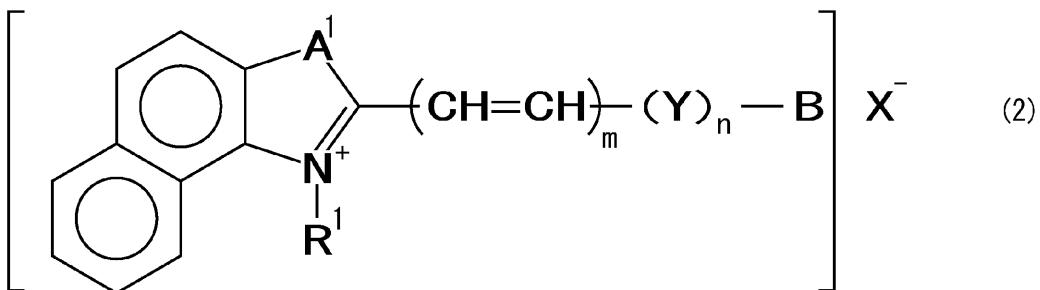
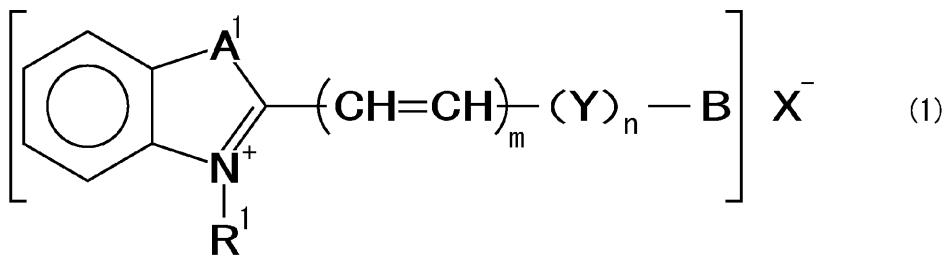
【請求項 1】

尿試料中の酵母様真菌の細胞膜に損傷を与えるために用いられ、芳香族アルコール、酢酸フェニル及びベンゾチアゾール化合物からなる群より選択される真菌細胞膜損傷物質；赤血球の蛍光強度よりも損傷を受けた酵母様真菌の蛍光強度が強くなるように酵母様真菌を染色できる第1色素；及び

前記損傷を受けた酵母様真菌の蛍光強度よりも精子の蛍光強度が強くなるように精子を染色する第2色素；
を含有し、

前記第1色素及び第2色素が、それぞれ下記(1)式、(2)式、及び(3)式で表わされる蛍光色素からなる群より選択される尿試料分析用試薬：

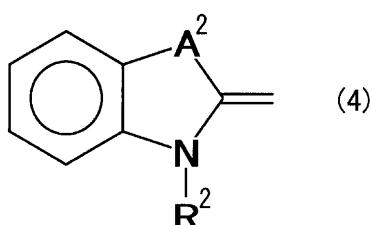
【化1】



(式中、A¹は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は-C(CH₃)₂-であり；R¹は低級アルキル基；Xはハロゲン又は過塩素酸；Yは-CH=又は-NH-；mは1又は2；nは0又は1；

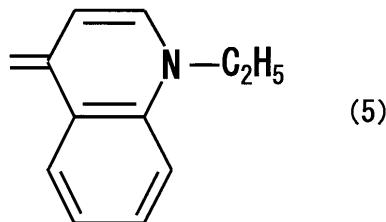
Bは下記(4)式

【化2】



(式中、A²は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は-C(CH₃)₂-であり、R²は低級アルキル基)；2つの低級アルコキシ基若しくは1つのジ低級アルキルアミノ基(この低級アルキルはシアノ基で置換されていてもよい)で置換されたフェニル基；又は下記(5)式

【化3】

である。)。

10

【請求項2】

前記芳香族アルコールが、フェノキシエタノールである請求項1に記載の試薬。

【請求項3】

前記第1色素の極大吸収波長が630～640nmであり、前記第2色素の極大吸収波長が640～660nmである請求項1又は2に記載の試薬。

【請求項4】

前記真菌細胞膜損傷物質と、前記第1色素及び第2色素とが、別々の容器に収容されている請求項1～3のいずれかに記載の試薬。

【請求項5】

芳香族アルコール、酢酸フェニル及びベンゾチアゾール化合物からなる群より選択される真菌細胞膜損傷物質を用いて尿試料中に含まれる酵母様真菌の細胞膜に損傷を与え、赤血球の蛍光強度よりも酵母様真菌の蛍光強度が強くなるように酵母様真菌を染色可能な第1色素と、酵母様真菌の蛍光強度よりも精子の蛍光強度が強くなるように精子を染色可能な第2色素とを用いて蛍光染色処理して測定用試料を調製する工程；

20

前記測定用試料に、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

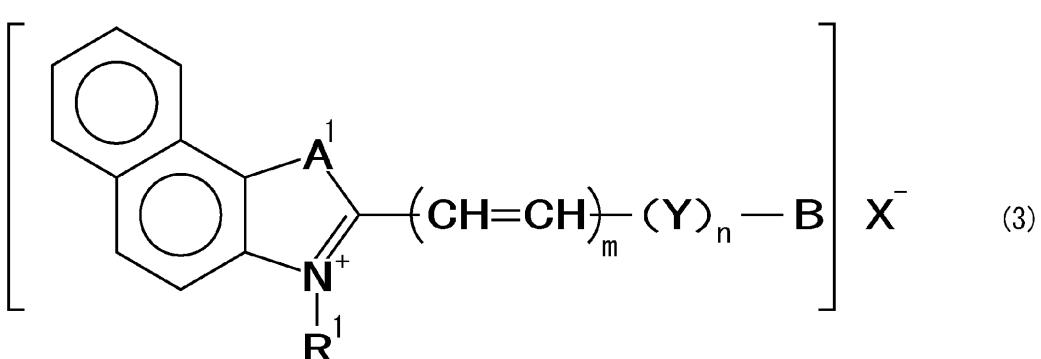
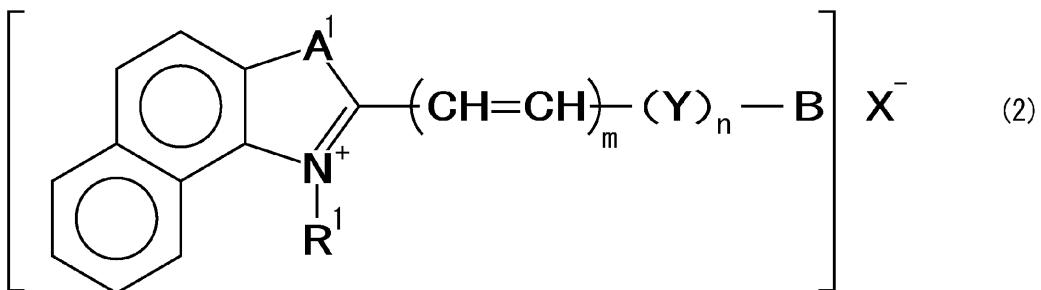
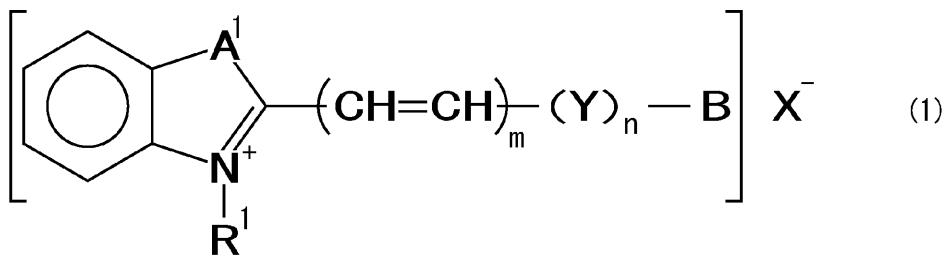
前記散乱光情報及び前記蛍光情報に基づいて、前記測定用試料に含まれる精子を計数する工程

を含み、

前記第1色素及び第2色素が、それぞれ下記(1)式、(2)式、及び(3)式で表わされる蛍光色素からなる群より選択される尿試料の分析方法：

30

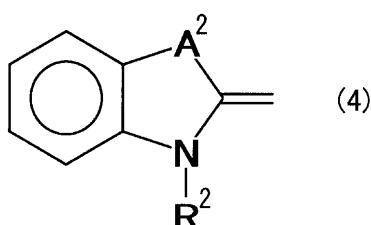
【化4】



(式中、 A^1 は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ であり； R^1 は低級アルキル基； X はハロゲン又は過塩素酸； Y は $-\text{CH}=$ 又は $-\text{NH}-$ ； m は 1 又は 2； n は 0 又は 1；

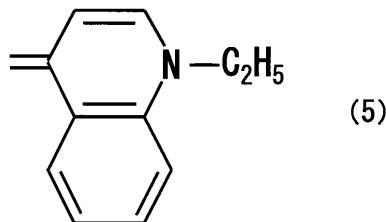
B は下記(4)式

【化5】



(式中、 A^2 は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$ であり、 R^2 は低級アルキル基)；2つの低級アルコキシ基若しくは1つのジ低級アルキルアミノ基(この低級アルキルはシアノ基で置換されていてもよい)で置換されたフェニル基；又は下記(5)式

【化6】



である)。

10

【請求項6】

前記散乱光情報が前方散乱光強度であり、前記蛍光情報が蛍光強度である請求項5に記載の方法。

【請求項7】

前記計数工程において、前記測定用試料に含まれる赤血球、酵母様真菌及び精子を弁別し、それを計数する請求項5又は6に記載の分析方法。

【請求項8】

前記計数工程において、前記散乱光情報及び前記蛍光情報を二軸とする散布図を作成し、前記散布図中に前記精子が出現する領域を特定することにより、前記精子を計数する請求項5～7のいずれかに記載の方法。

20

【請求項9】

前記散布図において、前記赤血球が出現する領域と、前記酵母様真菌が出現する領域とをさらに特定することにより、前記赤血球及び前記酵母様真菌をそれぞれ計数する請求項8に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、尿試料に含まれる有形成分を分析するための試薬及び分析方法に関する。

【背景技術】

【0002】

30

腎・尿路系の感染症、炎症性病変、変性病変、結石症、腫瘍などの疾患では、それぞれの疾患に応じて、尿中に種々の有形成分が出現する。有形成分としては、赤血球、酵母様真菌、精子などが挙げられる。尿中のこれらの成分を分析することは腎・尿路系の疾患の早期発見や異常部位の推定をする上で重要である。

【0003】

尿中の有形成分を分析するための試薬としては、例えば、特許文献1に開示の試薬が挙げられる。特許文献1には、3,3'-ジメチル-2,2'-オキサカルボシアニンアイオダイド(DiOC₂(3))等の縮合ベンゼン誘導体の第1染料と、エチジウムプロマイド又はプロピジウムアイオダイド等の損傷を受けた白血球を染色できる第2染料とを含む尿中有形成分分析用試薬が開示されている。第1染料は、細胞膜に結合することができ、しかも赤血球と酵母様真菌に対する染色性が異なるので、赤血球と酵母様真菌の染色性の差を蛍光強度の差違として捉えることが可能になる。しかしながら、特許文献1には、精子を含む尿を検体として用いた場合に、精子を尿中の他の成分と弁別し、計数することについて一切記載されていない。

40

【0004】

【特許文献1】特開平8-170960号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

本発明は、以上のような事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、尿試料に含ま

50

れる有形成分のうち精子を正確に弁別し、計数することができる試薬及び方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【0006】

本発明の尿試料分析用試薬は、尿試料中の赤血球の細胞膜を実質的に損傷させず、酵母様真菌の細胞膜に損傷を与える物質（以下、「真菌細胞膜損傷物質」という）；前記赤血球の蛍光強度よりも損傷を受けた酵母様真菌の蛍光強度が強くなるように酵母様真菌を染色できる第1色素；及び前記損傷を受けた酵母様真菌の蛍光強度よりも精子の蛍光強度が強くなるように精子を染色する第2色素を含有する。

【0007】

10

前記真菌細胞膜損傷物質は、精子の細胞膜を実質的に損傷しないものであることが好ましい。

【0008】

前記真菌細胞膜損傷物質は、芳香族アルコール、酢酸フェニル及びベンゾチアゾール化合物からなる群より選択されることが好ましく、前記芳香族アルコールが、フェノキシエタノールであることが好ましい。

【0009】

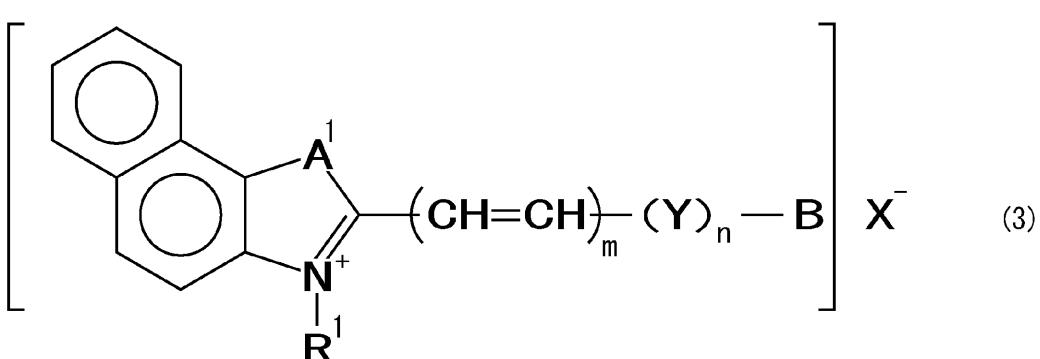
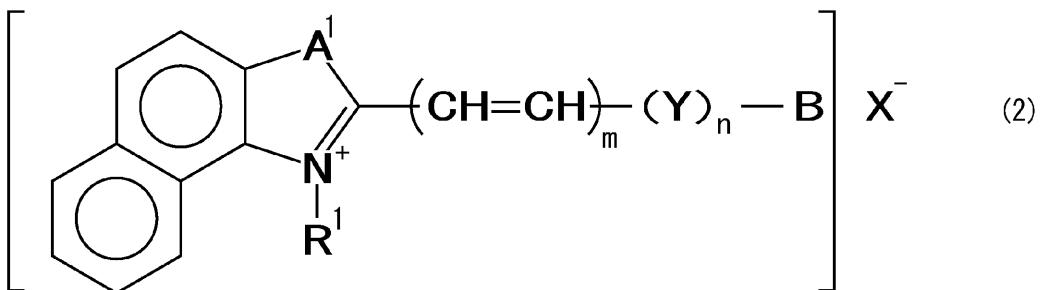
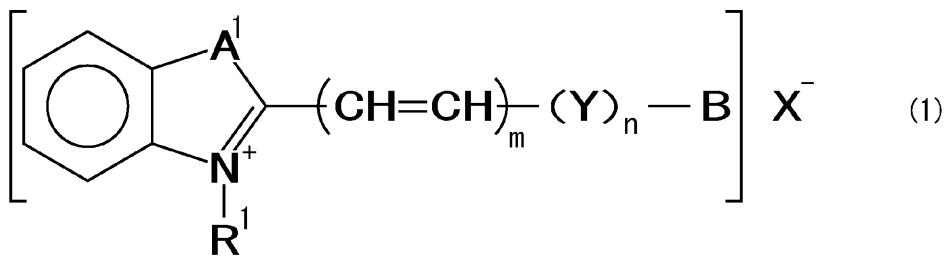
前記第1色素が、損傷を受けた酵母様真菌の核酸を染色し、精子の細胞膜を染色するものであることが好ましく、前記第2色素は、第1色素よりも細胞膜透過性が高い色素であることが好ましい。

20

【0010】

前記第1色素及び第2色素が、それぞれ下記(1)式、(2)式、及び(3)式で表わされる蛍光色素からなる群より選択されることが好ましい。

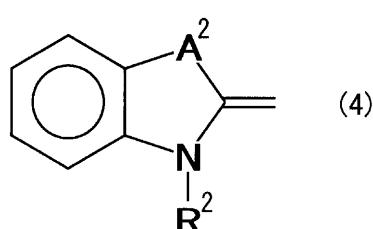
【化4】



(式中、A¹は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は-C(CH₃)₂-であり；R¹は低級アルキル基；Xはハロゲン又は過塩素酸；Yは-CH=又は-NH-；mは1又は2；nは0又は1；

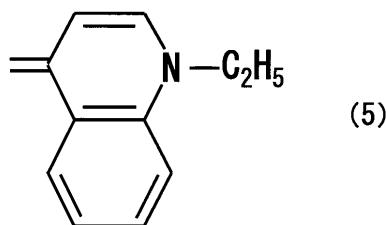
Bは下記(4)式

【化5】



(式中、A²は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は-C(CH₃)₂-であり、R²は低級アルキル基)；2つの低級アルコキシ基若しくは1つのジ低級アルキルアミノ基(この低級アルキルはシアノ基で置換されていてもよい)で置換されたフェニル基；又は下記(5)式

【化6】



である。)。

10

【0011】

前記第1色素の極大吸収波長が630～640nmであり、前記第2色素の極大吸収波長が640～660nmであることが好ましい。

【0012】

本発明の尿分析用試薬は、前記真菌細胞膜損傷物質と、前記第1色素及び第2色素とが、別々の容器に収容されていてもよい。

【0013】

本発明の尿試料の分析方法は、尿試料中に含まれる赤血球の細胞膜を実質的に損傷させることなく酵母様真菌の細胞膜に損傷を与え、赤血球の蛍光強度よりも酵母様真菌の蛍光強度が強く、且つ酵母様真菌の蛍光強度よりも精子の蛍光強度が強くなるように、前記尿試料を蛍光染色処理して測定用試料を調製する工程；前記測定用試料に、光を照射して散乱光情報及び蛍光情報を取得する工程；及び前記散乱光情報及び前記蛍光情報に基づいて、前記測定用試料に含まれる精子を計数する工程を含む。前記散乱光情報が前方散乱光強度であり、前記蛍光情報が蛍光強度であることが好ましい。

20

【0014】

前記計数工程において、前記散乱光情報及び前記蛍光情報を二軸とする散布図を作成し、前記散布図中に前記精子が出現する領域を特定することにより、前記精子を計数してもよい。

【0015】

また、前記計数工程において、前記測定用試料に含まれる赤血球、酵母様真菌及び精子を弁別し、それぞれを計数することが好ましく、この場合、さらに前記散布図において、前記赤血球が出現する領域と、前記酵母様真菌が出現する領域とをさらに特定することにより、前記赤血球及び前記酵母様真菌をそれぞれ計数してもよい。

30

【0016】

本明細書にいう「細胞膜の損傷」とは、細胞膜に特定の物質が通過できるような細孔があくことをいう。

【発明の効果】

【0017】

本発明の尿試料分析用試薬を用いれば、尿試料に含まれる有形成分のうち精子を正確に弁別し、計数することができる。

40

また、本発明の尿試料の分析方法によれば、尿試料に含まれる有形成分のうち精子を正確に弁別し、計数することができ、さらに必要に応じて、赤血球、酵母様真菌をそれぞれ正確に弁別し、計数することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0018】

〔尿試料分析用試薬〕

本発明の尿試料分析用試薬は、尿試料中の赤血球の細胞膜を実質的に損傷させず、酵母様真菌の細胞膜に損傷を与える物質（以下、「真菌細胞膜損傷物質」という）；前記赤血球の蛍光強度よりも損傷を受けた酵母様真菌の蛍光強度が強くなるように酵母様真菌を染色できる第1色素；及び前記損傷を受けた酵母様真菌の蛍光強度よりも精子の蛍光強度が

50

強くなるように精子を染色する第2色素を含有する。

以下、順に説明する。

【0019】

(1) 真菌細胞膜損傷物質

真菌細胞膜損傷物質は、酵母様真菌の細胞膜の一部に細孔をあける作用を有する。この物質により細胞膜に細孔が生じると、色素がこの細孔を通過して細胞内に進入できるようになる。細胞膜が損傷した細胞では、色素が細胞膜表面のみならず、細胞内部にも入り込むと、細胞内の物質（例えば、核酸など）が染色され、膜が損傷していない細胞よりも蛍光強度が高くなる。従って、真菌細胞膜損傷物質と、損傷した細胞膜を有する有形成分を染色できる色素とを用いることにより、損傷した細胞膜を有する有形成分と損傷しなかつた細胞膜を有する有形成分との弁別が可能になる。

10

【0020】

真菌細胞膜損傷物質は、赤血球を溶血しないものを用いることが好ましい。さらに、精子の細胞膜を実質的には損傷しないものであることが好ましい。

【0021】

真菌細胞膜損傷物質としては、ベンゼン環を有する非イオン性有機化合物が挙げられる。例えば、ベンジルアルコール、フェネチルアルコール、フェノール、1-フェノキシ-2-プロパノール、2-フェノキシエタノール等の芳香族アルコールや、酢酸フェニル、2-アミノベンゾチアゾールやベンゾチアゾール等のベンゾチアゾール化合物を用いることができる。これらのうち、2-フェノキシエタノールが好ましく用いられる。

20

【0022】

本発明の試薬における真菌細胞膜損傷物質の含有濃度は、検体と試薬を混合して調製される測定用試料における含有濃度（最終濃度）として、測定される尿試料中の赤血球の細胞膜を実質的に損傷させず、酵母様真菌の細胞膜に損傷を与えることができるように、真菌細胞膜損傷物質の損傷能力に応じて適宜選択すればよい。例えば、2-フェノキシエタノールの場合、試薬中の最終濃度は、好ましくは0.3～1.5%、より好ましくは0.5～1.0%、さらに好ましくは0.5～0.7%である。

【0023】

(2) 第1色素

第1色素は、損傷により生じた細胞膜の細孔から細胞質内に進入することにより、損傷をうけた細胞を染色できる色素で、通常、細胞質内への進入量は細胞膜の損傷度に関係する。

30

【0024】

真菌はその種類の多様性からサイズも種々にわたり、大型真菌では散乱光により赤血球と区別することが困難なため、色素による染色性の差違（蛍光強度）により区別できることが望まれる。第1色素は、真菌細胞膜損傷物質により生じた細胞膜の細孔から細胞質内に進入して酵母様真菌を染色できる色素で、これにより、膜が損傷した真菌と実質的に膜損傷を受けていない赤血球との間で染色性に差違を出すことができる。すなわち、真菌細胞膜損傷物質により損傷が与えられた酵母様真菌の細胞質内へは、実質的に損傷を受けなかつた赤血球や精子よりも、第1色素が多く進入することになるので、酵母様真菌の第1色素による染色性（蛍光強度）が、赤血球、精子の第1色素による染色性（蛍光強度）よりも高くなる。

40

【0025】

第1色素としては、核をもたない赤血球と核を有する酵母様真菌との染色性の区別に有效であることから、核酸を染色する色素が好ましく用いられる。

【0026】

第1色素は、細胞膜に損傷を受けていない赤血球や精子の細胞膜を染色することが好ましく、赤血球の細胞膜よりも精子の細胞膜を強く染色することが好ましい。真菌細胞膜損傷物質の作用によっても赤血球や精子の細胞膜は実質的に損傷を受けないため、第1色素が細胞膜を通過することは実質的にできない。しかしながら、上記のような第1色素を用

50

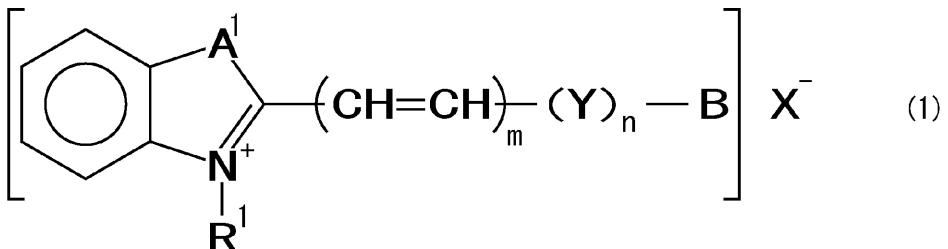
いることにより、赤血球及び精子が染色され、さらに赤血球よりも精子の細胞膜を強く染色することにより、これらの細胞の弁別が容易となる。

【0027】

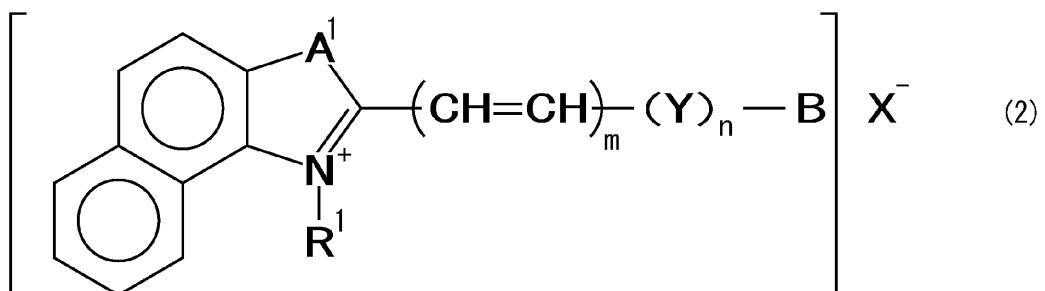
このような第1色素は、下記(1)式、(2)式、及び(3)式で表わされる色素からなる群より選択されることが好ましい。

前記第1色素及び第2色素が、それぞれ下記(1)式、(2)式、及び(3)式で表わされる蛍光色素からなる群より選択されることが好ましい。

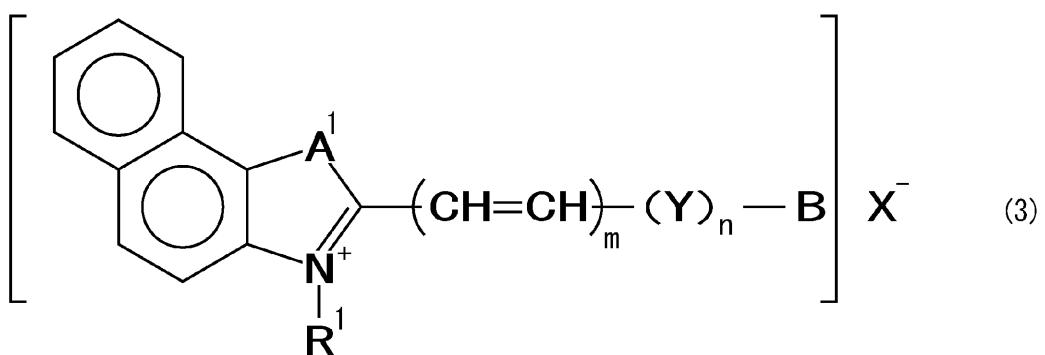
【化7】



10



20



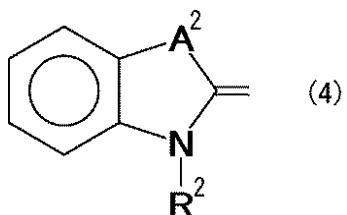
30

(式中、A¹は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は-C(C₂H₅)₂-であり；R¹は低級アルキル基；Xはハロゲン又は過塩素酸；Yは-CH=又は-NH-；mは1又は2；nは0又は1；

Bは下記(4)式

【0028】

【化8】



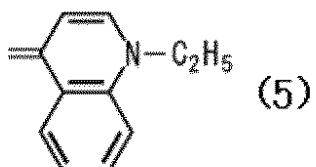
(4)

40

50

(式中、 A^2 は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は $-C(CH_3)_2-$ であり、 R^2 は低級アルキル基) ; 2つの低級アルコキシ基若しくは1つのジ低級アルキルアミノ基(この低級アルキルはシアノ基で置換されていてもよい)で置換されたフェニル基; 又は下記(5)式

【化9】



10

である。)

【0029】

(1) ~ (3) 式において、 A^1 と A^2 は同一であってもよいし、異なっていてもよい。また、 R^1 と R^2 は同一であってもよいし、異なっていてもよい。

上記化学構造を有する色素は細胞膜に結合可能で、細胞膜が損傷していない精子、赤血球等の細胞膜に結合、吸着してこれらを染色するとともに、細胞膜が損傷した酵母様真菌に対しては、損傷により生じた細胞膜の細孔から、細胞質内に入り込んで、核酸を染色する。

【0030】

20

上記低級アルキル基としては、炭素数1 ~ 6のアルキル基を意味し、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシル等が挙げられる。Xのハロゲン原子としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素が挙げられる。Bにおける2つの低級アルコキシ基で置換されたフェニル基とは、2つの C_{1-3} アルコキシ基を、好ましくは C_{1-2} アルコキシ基、例えばメトキシ基、エトキシ基で置換されたフェニル基をいう。具体的には、2,6-ジメトキシフェニル基、2,6-ジエトキシフェニル基が挙げられる。また、Bにおけるジ低級アルキルアミノ基(該低級アルキル基はシアノ基で置換されていてもよい)で置換されたフェニル基とは、 C_{1-3} アルキルアミノ基、好ましくは C_{1-2} アルキルアミノ基で置換されたフェニル基をいう。ここでいうアルキル基は、シアノ基で置換されていてもよく、例えば、メチル、エチル、シアノメチル、シアノエチル等を含む。好ましいジ低級アルキルアミノ基(該低級アルキルはシアノ基で置換されていてもよい)で置換されたフェニル基としては、4-ジメチルアミノフェニル基、4-ジエチルアミノフェニル基、4-(シアノエチルメチルアミノ)フェニル基などが挙げられる。

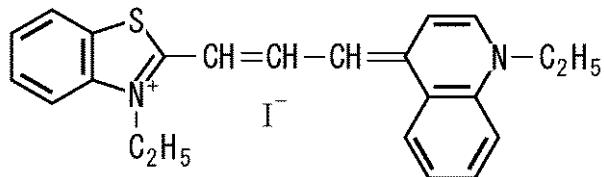
このような縮合ベンゼン誘導体の具体例を以下に挙げる。

【0031】

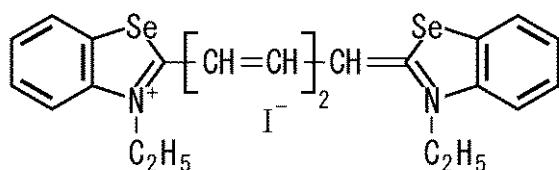
30

【化10】

NK-321

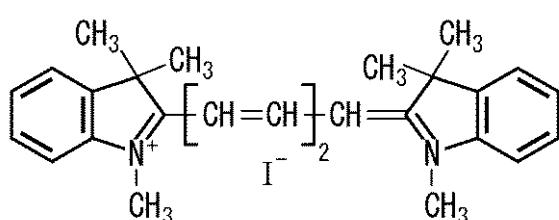


NK-1590



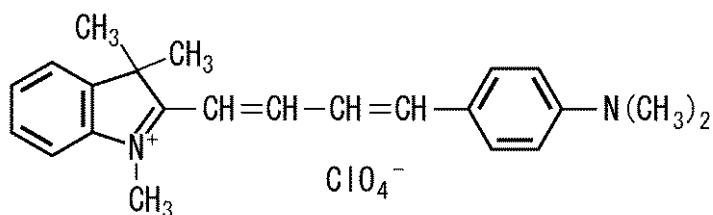
10

NK-529



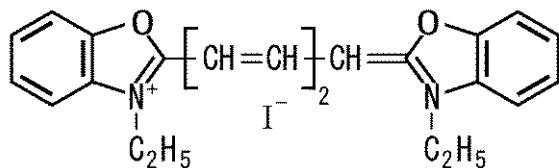
20

NK-2780

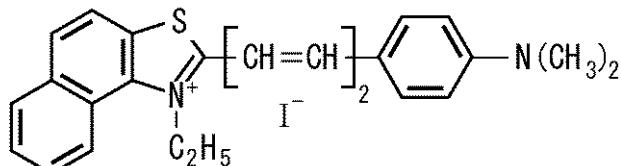


30

NK-1511

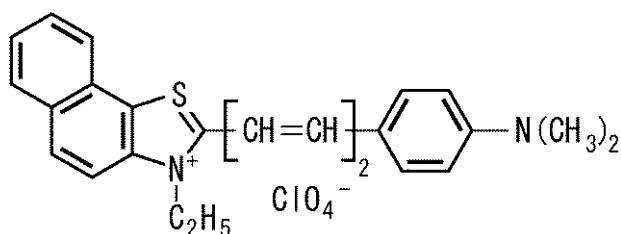


NK-376

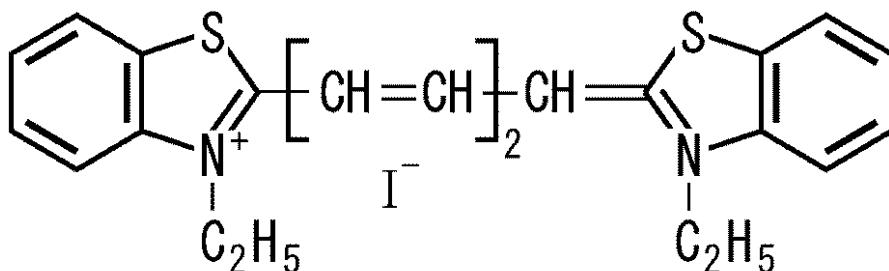


40

NK-2711

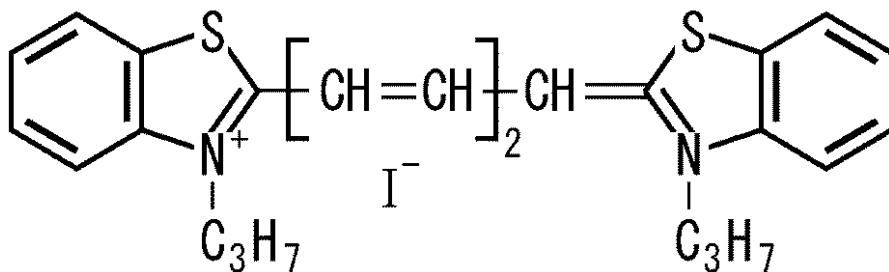


【化11】
NK-136



10

NK-2251



20

【0032】

上記縮合ベンゼン誘導体の色素のうち、NK-シリーズは、林原生物化学研究所（株）より入手することができる。

試薬における第1色素の好ましい含有濃度は、色素の種類、分析装置にもよるが、測定用試料（試薬と検体の混合物）における最終濃度として3～9 ppmとなるように含まれていることが好ましい。

【0033】

(3) 第2色素

第2色素は、損傷を受けた酵母様真菌よりも精子を強く染色できる色素である。また、第2色素は、第1色素よりも細胞膜透過性が高い色素で、細胞膜が損傷していない精子、赤血球等を染色することができる。第2色素は、細胞膜に結合、吸着して細胞膜自体を染色するものであってもよいし、細胞膜中に浸透して、さらに細胞質内にまで入り込んで核酸を染色する色素であってもよい。

30

【0034】

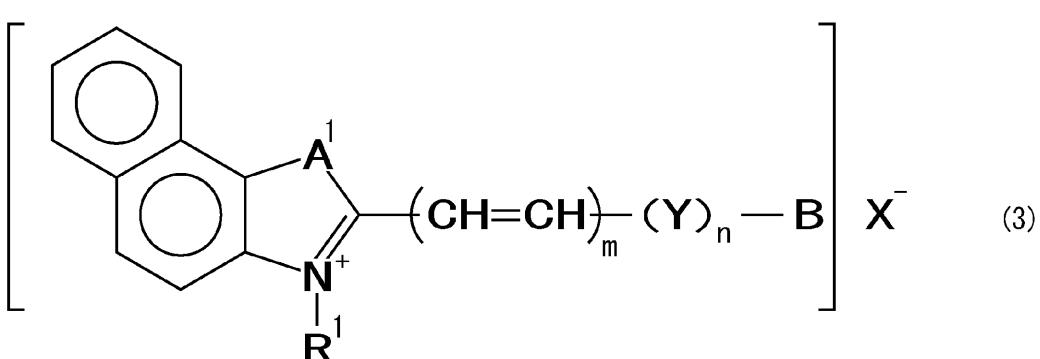
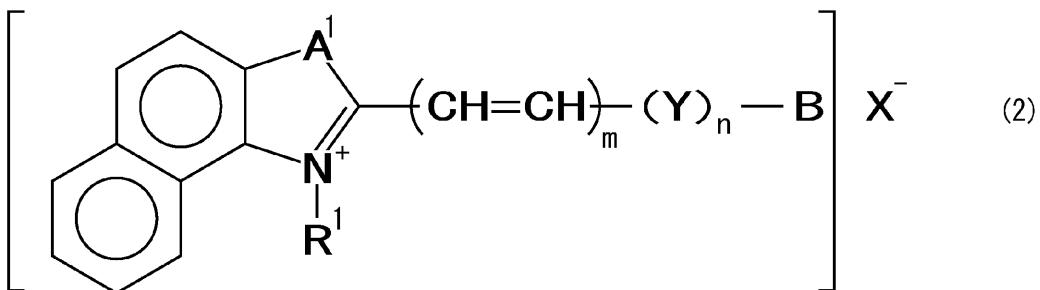
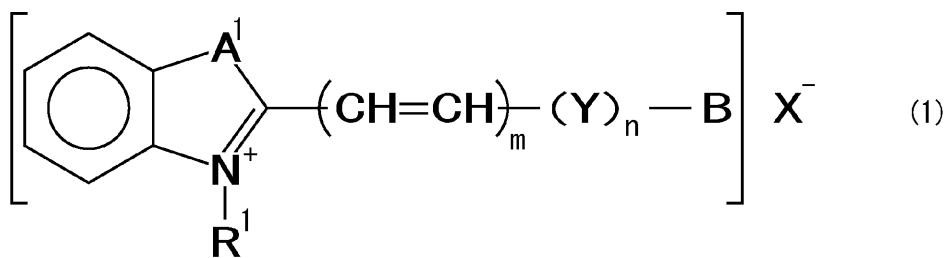
第2色素は、精子の細胞膜に特異的に透過性が高いものであることが好ましい。酵母様真菌には種々のサイズ、細胞膜を有するものがあるため、真菌細胞膜損傷物質によってもそれほど損傷が与えられず、第1色素によりそれほど染色されないもの（蛍光強度低い）も存在する。このような酵母様真菌で、サイズが小さいものの場合、精子との区別が困難である。第1色素よりも膜透過性が高く、さらには精子に対する膜透過性が高い第2色素で精子を染色することにより、第1色素で染色されにくかったが第2色素で染色された精子と第1色素で染色されやすい酵母様真菌とを区別することが容易となる。

40

【0035】

このような第2色素は、下記(1)式、(2)式、及び(3)式で表わされる色素からなる群より選択されることが好ましい。

【化12】

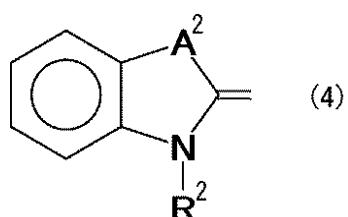


(式中、A¹は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は-C(CH₃)₂-であり；R¹は低級アルキル基；Xはハロゲン又は過塩素酸；Yは-CH=又は-NH-；mは1又は2；nは0又は1；

Bは下記(4)式

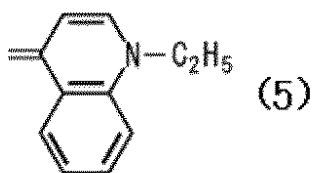
【0036】

【化13】



(式中、A²は酸素原子、硫黄原子、セレン原子、又は-C(CH₃)₂-であり、R²は低級アルキル基)；2つの低級アルコキシ基若しくは1つのジ低級アルキルアミノ基(この低級アルキルはシアノ基で置換されていてもよい)で置換されたフェニル基；又は下記(5)式

【化14】



である。)

【0037】

(1)～(3)式において、 A^1 と A^2 は同一であってもよいし、異なっていてもよい。
10
。また、 R^1 と R^2 は同一であってもよいし、異なっていてもよい。

【0038】

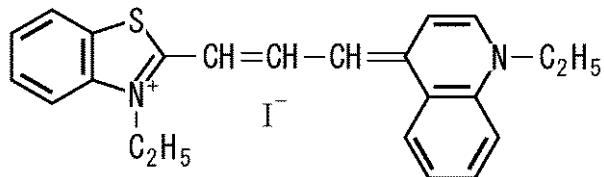
上記低級アルキル基としては、炭素数1～6のアルキル基を意味し、例えば、メチル、エチル、プロピル、ブチル、イソブチル、ペンチル、ヘキシリ等が挙げられる。Xのハロゲン原子としては、フッ素、塩素、臭素、ヨウ素が挙げられる。Bにおける2つの低級アルコキシ基で置換されたフェニル基とは、2つの $C_{1\sim 3}$ アルコキシ基を、好ましくは $C_{1\sim 2}$ アルコキシ基、例えばメトキシ基、エトキシ基で置換されたフェニル基をいう。具体的には、2,6-ジメトキシフェニル基、2,6-ジエトキシフェニル基が挙げられる。また、Bにおけるジ低級アルキルアミノ基（該低級アルキル基はシアノ基で置換されていてもよい）で置換されたフェニル基とは、 $C_{1\sim 3}$ アルキルアミノ基、好ましくは $C_{1\sim 2}$ アルキルアミノ基で置換されたフェニル基をいう。ここでいうアルキル基は、シアノ基で置換されていてもよく、例えばメチル、エチル、シアノメチル、シアノエチル等を含む。好ましいジ低級アルキルアミノ基（該低級アルキルはシアノ基で置換されていてもよい）で置換されたフェニル基としては、4-ジメチルアミノフェニル基、4-ジエチルアミノフェニル基、4-(シアノエチルメチルアミノ)フェニル基などが挙げられる。

このような縮合ベンゼン誘導体系色素の具体例を以下に挙げる。

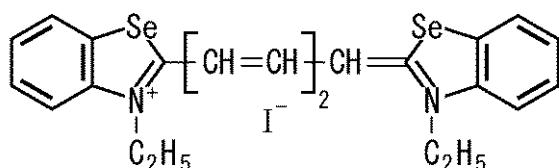
【0039】

【化15】

NK-321

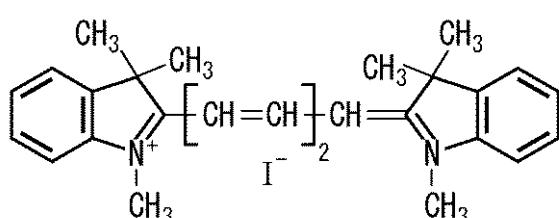


NK-1590



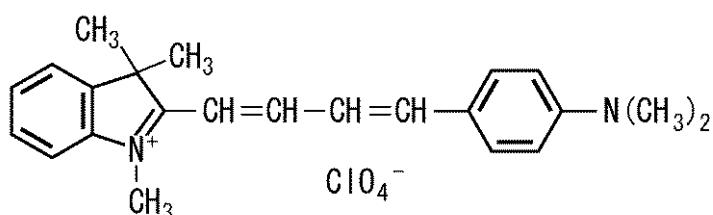
10

NK-529



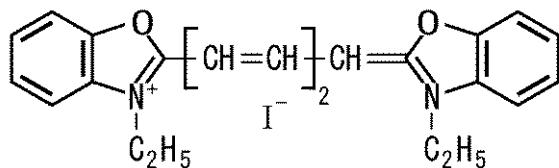
20

NK-2780

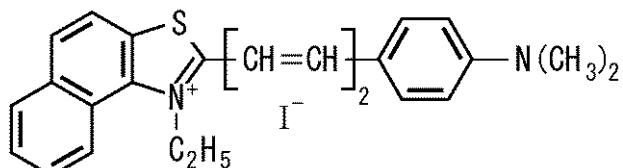


30

NK-1511

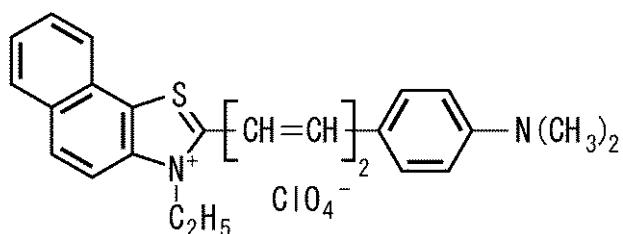


NK-376

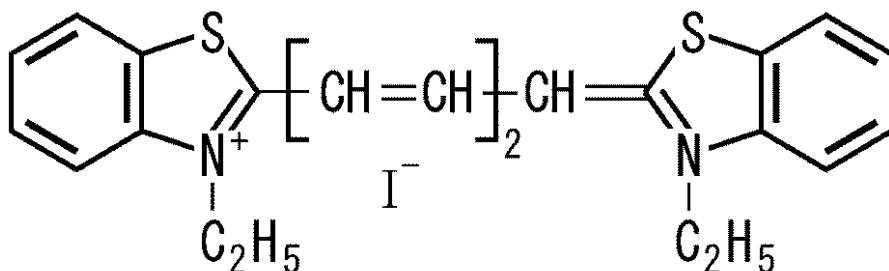


40

NK-2711

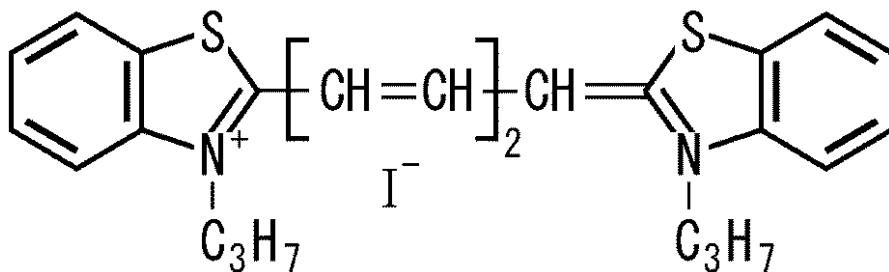


【化16】
NK-136



10

NK-2251



20

【0040】

上記縮合ベンゼン誘導体の色素のうち、NK-シリーズは、林原生物化学研究所（株）より入手することができる。

【0041】

上記(1)式、(2)式、(3)式で表される色素は、第1色素で用いることができる色素と同じである。従って、第1色素を、(1)式、(2)式、及び(3)式で表される上記色素群から選択する場合、第2色素は選択した第1色素よりも膜透過性が高いもの、特に精子の細胞膜に対して透過性が第1色素よりも高いものが好ましい。

30

【0042】

このような組合わせは、例えば、上記(1)式で示される蛍光色素において、R¹またはA¹が異なる組合わせである。R¹のアルキル基の炭素数を変えることにより、膜透過性を変えることができる。例えば、(1)式中のm、n、Y及びBが共通である色素の組合わせにおいて、R¹がエチル基、プロピル基のもの（例えばNK-136、NK-2251）は、R¹がメチル基のもの（例えばNK-529）よりも膜透過性が高い。一般に(1)式、(2)式、又は(3)式で表される色素においては、R¹の炭素数が多い程、膜透過性が高くなる。

30

【0043】

第1色素と第2色素とは、極大吸収波長が異なっていてもよいし、同じであってもよい。これらの色素の極大吸収波長が異なる場合、尿の分析に際しては、第1色素の励起用光源だけでなく、第2色素の励起用光源も備えた分析装置を使用することができる。一方、1種類の波長の光しか照射しない光源を用いる場合、例えば、この波長は第1色素の吸収波長であり、第2色素の吸収波長でもあることが好ましく、第1色素の極大吸収波長であることが好ましい。また、第1色素の極大吸収波長の光源を用いる場合、第1色素から発光される光によって第2色素が励起されてもよい。少なくとも一方の色素から発せられる光が、他方の蛍光を消光しないことが好ましい。

40

【0044】

第1色素と第2色素の励起光が異なる場合には、前記第1色素の極大吸収波長が630

50

~ 640 nmであり、前記第2色素の極大吸収波長が640 ~ 660 nmであることが好ましい。

【0045】

例えば、633 nmの赤色レーザーを使用する場合、第1色素としてNK-529を用い、第2色素としてNK-136及び／又はNK2251を用いることが好ましい。

【0046】

第2色素の好ましい濃度は、色素の種類、使用する分析装置、さらには、第1色素の種類との組合せに応じて適宜決める必要がある。

【0047】

例えば、第1色素としてNK-529を使用し、第2色素としてNK-136を使用した場合、最終濃度が0.1 ~ 1.2 ppmであることが好ましく、0.3 ~ 0.6 ppmであることがより好ましい。

【0048】

(4) その他の成分

本発明の試薬には、真菌細胞膜損傷物質、第1色素、第2色素の他に、下記のような成分を含有することが好ましい。

【0049】

(4-1) 緩衝剤

赤血球及び精子の細胞膜が損傷しないpHの範囲に緩衝能を保つために緩衝剤を含むことが好ましい。

緩衝剤としては、試薬のpHが5.0 ~ 9.0、好ましくは6.5 ~ 8.6、より好ましくは7.0 ~ 7.8、更に好ましくは7.1 ~ 7.8の範囲となるものを用いることが好ましい。試薬のpHが9.0を越えて強アルカリ性になると赤血球が溶血するおそれがあり、またpHが5.0未満では尿検体におけるpH変化が大きく赤血球がダメージを受けたり、尿中の粒子の染色性が全体的に低下するおそれがある。

【0050】

緩衝剤としては、試薬のpHを所望の範囲に保持することができるものであればよく、例えば、トリス及びMES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPS、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPS、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPSなどのグッド緩衝剤等を用いることができる。これらのうち、HEPESが好ましく用いられる。濃度は用いる緩衝剤の緩衝能に応じて、尿検体と混合したときにpHがある一定の範囲内になる濃度で用いられる。具体的には、20 ~ 500 mM、好ましくは50 ~ 200 mMで用いられる。

【0051】

(4-2) 浸透圧補償剤

さらに、赤血球及び精子の細胞膜が損傷しない浸透圧を保つために浸透圧補償剤を含むことが好ましい。尿の浸透圧は、50 ~ 1300 mOsm/kgと広範囲にわたって分布していることから、分析用試薬の浸透圧が低すぎると赤血球の溶血が早期に進行してしまい、逆に高すぎると尿中有形成分の損傷が大きくなるので、浸透圧は100 ~ 6000 mOsm/kgが好ましく、150 ~ 500 mOsm/kgが好ましい。

【0052】

このような浸透圧に保つために用いられる浸透圧補償剤としては、無機塩類やプロピオン酸塩等の有機塩類、糖類などが挙げられる。無機塩類としては、塩化ナトリウム、塩化カリウム、臭化ナトリウム等が用いられる。有機塩類のうち、プロピオン酸塩としては、プロピオン酸ナトリウム、プロピオン酸カリウム、プロピオン酸アンモニウム等が用いられる。他の有機塩類としては、シュウ酸塩、酢酸塩等が用いられる。糖類としては、ソルビトール、グルコース、マンニトール等が用いられる。

【0053】

(4-3) キレート剤

10

20

30

40

50

尿中に出現する無晶性塩類（例えば、リン酸アンモニウム、リン酸マグネシウム、炭酸カルシウム）の影響を低減するために、それらを溶解するためのキレート剤を含有させてもよい。キレート剤は、脱カルシウム剤、脱マグネシウム剤であればよく、特に種類の限界はない。例えば、EDTA塩、CyDTA、DHEG、DPTA-OH、EDDA、EDDP、GEDTA、HDTA、HIDA、Metyl-EDTA、NTA、NTP、NTPO、EDDPO等が挙げられる。好適には、EDTA塩、CyDTA、又はGEDTAが用いられる。

試薬中の含有濃度は、尿検体と混合して調製される測定用試料の最終濃度として、0.05～5W/W%となるような範囲、好ましくは0.1～1W/W%となるような濃度である。

10

【0054】

(4-4) 界面活性剤

真菌細胞膜損傷物質の溶解性を向上させるために、試薬中に、ミリストリメチルアンモニウムプロミド(MTAB)、デシルトリメチルアンモニウムプロミド(DTAB)、オクチルトリメチルアンモニウムプロミド(OTAB)等の界面活性剤を含有させてもよい。これらの界面活性剤の濃度が高いと赤血球や精子の細胞膜を溶解してしまうおそれがあるので、赤血球を溶血させない程度、さらには精子の細胞膜を損傷させない程度の濃度で含有させることが好ましい。

【0055】

(5) 試薬キット

20

本発明の分析用試薬は、上記真菌細胞膜損傷物質、第1色素、第2色素及び緩衝剤等のその他の成分が全て同じ容器に収容された1液型の試薬であってもよいが、これに限らない。

第1色素及び第2色素の安定性の面から、真菌細胞膜損傷物質を含有する第1試薬と、第1色素及び第2色素を含有する第2試薬とを別々の容器に収容し、これらを備えた試薬キットとすることが好ましい。

【0056】

試薬キットの場合、真菌細胞膜損傷物質を含有する第1試薬に、緩衝剤、浸透圧補償剤、界面活性剤、キレート剤を含有させることが好ましい。

【0057】

30

一方、蛍光色素は水溶液中では分解されやすいものが多いので、第2試薬は、蛍光色素を水溶性有機溶媒に溶解させたものとすることが好ましい。

水溶性有機溶媒としては、低級アルカノール、低級アルキレングリコール、又は低級アルキレングリコールモノ低級アルキルエーテルが好ましく用いられる。例えば、メタノール、エタノール、n-プロパノール、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール、エチレングリコールモノメチルエーテル、エチレングリコールモノエチルエーテルなどを使用することができる。これらのうち、エチレングリコール、ジエチレングリコール、トリエチレングリコール等のグリコール類が好ましく、尿中の試料への影響や粘性などを考慮すると、エチレングリコールがより好ましく用いられる。

【0058】

40

(分析方法)

本発明の尿試料の分析方法は、測定用試料を調製する工程と、この測定用試料に光を照射し、散乱光情報及び蛍光情報を取得する工程と、これらの情報に基づいて精子を計数する工程を含む。

【0059】

上記測定用試料調製工程においては、尿試料を処理して測定用試料を調製する。この処理により、尿試料中の酵母様真菌は、その細胞膜に損傷を受け、赤血球は実質的に損傷を受けない。また、この処理により、赤血球の蛍光強度よりも酵母様真菌の蛍光強度が強くなり、且つ酵母様真菌の蛍光強度よりも精子の蛍光強度が強くなるように、赤血球、酵母様真菌及び精子が蛍光染色される。この処理は、具体的には、上記本発明の分析用試薬を

50

、尿検体と混合することにより行なうことができる。

【0060】

尿試料を上記本発明の分析用試薬と混合すると、真菌細胞膜損傷物質が酵母様真菌の細胞膜を損傷し、この損傷した細胞膜を第1色素が通過することにより、酵母様真菌が染色される。一方、真菌細胞膜損傷物質で溶血しなかった赤血球は、第1色素により、酵母様真菌ほど染色されないので、結果として、赤血球の蛍光強度よりも酵母様真菌の蛍光強度が強くなるように染色される。また、真菌細胞膜損傷物質は精子には実質的に作用しないため、精子の細胞膜は実質的に損傷を受けていないが、第1色素が精子の細胞膜に結合することによって精子が染色される。

【0061】

第2色素は第1色素よりも膜透過性が大きいので、さらには精子の細胞膜に対する特異性が高いので、第2色素は、膜が損傷していなくても精子の細胞膜に結合し、さらには精子の細胞膜全体、ときには細胞質内まで染色することが可能となる。結果として、第2色素により、酵母様真菌の蛍光強度よりも精子の蛍光強度が強くなるように蛍光染色処理されたことになる。

10

【0062】

散乱光情報及び蛍光情報取得工程で用いられる励起光は、第1色素又は第2色素の少なくともいずれかを励起できればよいが、好ましくは両方を励起する。一方の色素しか励起しない光を照射する場合、他方の色素が、例えば励起された色素から放射される蛍光で励起される必要がある。すなわち、このような場合には、使用する分析用試薬に含有される色素の組合せとして、双方の色素が励起される組合せの色素が含まれていることが好ましい。

20

【0063】

このような分析用試薬を用いて調製された測定用試料の第1色素及び第2色素が励起され、試料中の有形成分の形態の情報を示す散乱光情報と、有形成分の染色強度の情報を示す蛍光情報とを取得する。

【0064】

測定用試料からの散乱光情報及び蛍光情報の取得は、測定用試料をフローサイトメータのフローセルに導入し、前記フローセル内を流れる前記測定用試料に前記蛍光色素を励起する励起光を照射することにより行なうことが好ましい。

30

【0065】

散乱光情報としては、散乱光強度、好ましくは前方散乱光強度である。前方散乱光強度は、一般に細胞の大きさに対応した情報を取得できる。

【0066】

蛍光情報としては、好ましくは蛍光強度であり、散乱光情報としては、好ましくは散乱光強度、より好ましくは前方散乱光強度である。前方散乱光強度は、一般に細胞の大きさに対応した情報である。

【0067】

計数工程においては、取得した散乱光情報及び蛍光情報に基づいて、精子と、尿試料中の他の有形成分とを分別し、精子が計数される。これにより、正確に尿試料中の精子を計数することができる。この工程においては、散乱光強度と蛍光強度とを二軸とする散布図を作成し、精子が出現する領域を特定し、この領域内の細胞数を計数することにより行なうことが好ましい。また、散乱光情報及び蛍光情報に基づいて、赤血球及び酵母様真菌をも正確に弁別し、それぞれを計数することができる。赤血球及び酵母様真菌の弁別及び計数も、散乱光強度と蛍光強度とを二軸とする散布図を作成し、それぞれが出現する領域を特定することによって行なわれることが好ましい。

40

【0068】

例えば、散乱光強度（縦軸）と蛍光強度（横軸）を2軸として作成される散布図の概念図は、図1のようになる。参考のために、真菌細胞膜損傷物質と第1色素を含む試薬（第2色素含まず）を用いて調製した測定用試料を同様に分析した場合に得られる散布図の概

50

念図を図2に示す。酵母用真菌、精子は、分析用試薬の第1色素に染色され、さらに精子は、第2色素に染色される結果、種々のサイズと細胞膜損傷程度が異なることにより散布図において右上がりに現れる酵母様真菌集団に対して、赤血球は左端集団となって出現する。図2では、精子集団は、サイズが小さく、膜損傷が少ない酵母様真菌集団の一部と重なっているのに対し、図1では、第2色素に染色されて蛍光強度が高くなった結果、精子集団が右側へシフトするため、酵母様真菌集団との重なりを回避することが可能となる。これにより、酵母様真菌集団と精子集団とを明確に区別できるようになり、精子数を正確にカウントすることが可能となる。

【0069】

また、例えば、図1のような散布図が得られた場合、赤血球領域、酵母様真菌集団、及び精子集団に分離できているので、各集団を計数することにより、それぞれの有形成分の試料中の含有率を知ることができる。

【0070】

〔フローサイトメータ〕

本発明の試薬が適用される尿試料分析装置は、上記の蛍光色素の励起波長を有する光を照射する励起光用光源；試料中の有形成分から発せられる散乱光及び蛍光を取得する受光器；受光した散乱光に関する情報及び受光した蛍光に関する情報を処理して、前記有形成分が赤血球、酵母様真菌、又は精子のいずれであるかを判定する情報処理手段を備えている。

【0071】

前記散乱光に関する情報は散乱光強度であり、前記蛍光に関する情報は蛍光強度であることが好ましい。

【0072】

前記情報処理手段は、取得された散乱光強度及び蛍光強度が、赤血球、酵母様真菌、及び精子のいずれに該当するかを判定することにより、前記尿試料中に含まれる赤血球、酵母様真菌、及び精子を弁別して、計数する計数手段を備えていることが好ましい。

【0073】

計数手段は、前方散乱光強度及び蛍光強度を二軸とする散布図を作成し、赤血球集団、酵母様真菌集団、及び精子集団を特定して、当該集団に含まれるドット数を計数するものであることが好ましい。また、特定した集団における平均蛍光強度や平均散乱光強度などを算出する演算手段を備えていても良い。

【0074】

また、精子集団の特定について、例えば、第2色素を含有しない試薬を尿検体と混合した比較用試料の散乱光情報と蛍光情報から得られる散布図と、本発明の試薬を尿検体と混合した測定用試料の散乱光情報と蛍光情報から得られる散布図との比較に基づいて行なう場合、上記演算手段が、これらの2つの散布図の比較、及び精子集団の特定を行なうようにしてもよい。

【0075】

分析装置には、さらに作成した散布図や演算結果を表示する表示部を備えていても良い。

【実施例】

【0076】

〔測定用試料の調製方法〕

(1) 真菌細胞膜損傷物質含有液(第1試薬)

真菌細胞膜損傷物質として2-フェノキシエタノールを使用し、その他、緩衝剤、浸透圧補償剤、キレート剤、及びpH調節剤を下記濃度で含有させて第1試薬とした。

H E P E S 11.9 g / l

プロピオン酸ナトリウム 5.98 g / l

E D T A - 3 K 4.0 g / l

2-フェノキシエタノール 7.5 g / l

10

20

30

40

50

水酸化ナトリウム pHが7.2となる量

【0077】

(2) 色素含有液(第2試薬)

(2-1) 色素含有液A:

第1色素としてNK529を、ジエチレングリコールに溶解することにより色素含有液Aを調製した。

【0078】

NK529は、本実施例で使用するフローサイトメータ(尿中有形成分分析装置UF110i(シスメックス社製))のアルゴンレーザ光源(488nm)を、半導体レーザ光源(635nm)に置き換えたもの:以下、単にフローサイトメーターという)に備え付けられている励起用光源から発せられる赤色レーザー光(波長635nm)で励起される。

10

【0079】

(2-2) 色素含有液B

第1色素としてNK529と、第2色素としてNK136とを、ジエチレングリコールに溶解することにより色素含有液Bを調製した。

【0080】

(2-3) 色素含有液C

第1色素としてNK529と、第2色素としてNK2251とを、ジエチレングリコールに溶解することにより色素含有液Cを調製した。

【0081】

(3) 尿検体との混合

尿検体と上記第1試薬とを1:3の割合で混合し、さらに第2試薬としての色素含有液を、第1色素の最終濃度が6ppmとなるように混合して測定用試料とした。

20

【0082】

[第2色素の濃度と精子染色性の関係]

色素含有液Bにおいて、NK529を、測定用試料における最終濃度として6ppmとなる量だけ含有し、NK136の含有量を、最終濃度として0.3ppm、0.6ppm、1.2ppm、1.5ppm、3ppm、6ppmとなるように含有させたものを用いた。

第2色素の濃度が異なる色素含有液Bそれぞれを用いて、精子が出現している検体及び上記第1試薬と混合して、測定用試料を調製した。調製した測定用試料をフローサイトメータに導入して、蛍光強度を測定した。

30

【0083】

また、同様に精子が出現している検体を使用し、色素含有液Bに代えて色素含有液Aを用いて測定用試料を調製し、これをフローサイトメータに導入して、NK136の含有量が0ppmのときの蛍光強度を測定した。

これらの結果を図3に示す。

【0084】

図3から、NK136の濃度が0.3~1.2ppmの範囲で、蛍光強度が高く、それ以上、高濃度にしても、蛍光強度は増大しなかった。

40

【0085】

[尿検体1の分析]

尿検体1として、精子が出現しているヒトの尿を用いた。

実施例1:

色素含有液として、NK529の最終濃度が6ppm、NK136の最終濃度が0.6ppmとなるように調製した色素含有液Bを用いた。

尿検体1を、それぞれ第1試薬と混合し、さらに上記色素含有液Bと混合して、尿検体1の測定用試料を調製した。

【0086】

調製した測定用試料を、フローセルに導入して、フローサイトメーターで測定し、蛍光

50

強度（横軸）及び前方散乱光強度（縦軸）を二軸とする二次元散布図を作成した。得られた散布図を図4に示す。また、この散布図中、精子が出現すると考えられる領域（散布図中の実線で囲まれた領域）を特定した。この領域内に出現する精子から検出された蛍光強度の平均値は、165であった。

【0087】

比較例1：

色素含有液A（NK529の色素最終濃度6ppm）を用いて、実施例1と同様にして、尿検体1を含む測定用試料を調製した。

調製した測定用試料を、フローセルに導入して、フローサイトメーターで測定し、蛍光強度（横軸）、及び前方散乱光強度（縦軸）を二軸とする二次元散布図を作成した。得られた散布図を図5に示す。この散布図中、精子が出現すると考えられる領域（散布図中の実線で囲まれた領域）を特定した。この領域内に出現する精子から検出された蛍光強度の平均値は、110であった。10

【0088】

図4と図5との比較、及びこれらの平均蛍光強度から、第2色素としてNK136を含む試薬（実施例1）を用いた方が、精子が蛍光強度の高い方の領域に出現することがわかる。

【0089】

〔尿検体2の分析〕

尿検体2として、酵母様真菌が出現しているヒトの尿を用いた。20

実施例2：

色素含有液として、NK529の最終濃度が6ppm、NK136の最終濃度が0.6ppmとなるように調製した色素含有液Bを用いた。

尿検体2を、それぞれ第1試薬と混合し、さらに上記色素含有液Bと混合して、尿検体2の測定用試料を調製した。

【0090】

調製した測定用試料を、フローセルに導入して、フローサイトメーターで測定し、蛍光強度（横軸）及び前方散乱光強度（縦軸）を二軸とする二次元散布図を作成した。得られた散布図を図6に示す。また、この散布図において、精子が出現すると考えられる領域（図中、実線で囲まれた部分）の平均蛍光強度を算出したところ、87であった。30

【0091】

比較例2：

色素含有液A（NK529の色素最終濃度6ppm）を用いて、実施例2と同様にして、尿検体2を含む測定用試料を調製した。

調製した測定用試料を、フローセルに導入して、フローサイトメーターで測定し、蛍光強度（横軸）及び前方散乱光強度（縦軸）を二軸とする二次元散布図を作成した。得られた散布図を図7に示す。また、この散布図中、精子が出現すると考えられる領域（散布図中の実線で囲まれた領域）を特定した。この領域内に出現する精子から検出された蛍光強度の平均値は、87であった。

【0092】

図6と図7との比較、及びこれらの平均蛍光強度から、試薬における第2色素は、酵母様真菌の出現位置に実質的に影響を与えていないことがわかる。40

【0093】

〔尿検体3の分析〕

尿検体3として、精子が出現しているヒトの尿を用いた。

実施例3：

色素含有液として、NK529の最終濃度が6ppm、NK2251の最終濃度が0.6ppmとなるように調製した色素含有液Cを用いた。

尿検体3を、それぞれ第1試薬と混合し、さらに上記色素含有液Cと混合して、尿検体3の測定用試料を調製した。50

【0094】

調製した測定用試料を、フローセルに導入して、フローサイトメーターで測定し、蛍光強度（横軸）及び前方散乱光（縦軸）を二軸とする二次元散布図を作成した。得られた散布図を図8に示す。また、この散布図中、精子が出現すると考えられる領域（散布図中の実線で囲まれた領域）を特定した。この領域内に出現する精子から検出された蛍光強度の平均値は、165であった。

【0095】

比較例3：

色素含有液A（NK529の色素最終濃度6ppm）を用いて、実施例3と同様にして、尿検体3を含む測定用試料を調製し、フローサイトメーターで測定して、蛍光強度（横軸）及び前方散乱光（縦軸）を二軸とする二次元散布図を作成した。得られた散布図を図9に示す。また、この散布図中、精子が出現すると考えられる領域（散布図中の実線で囲まれた領域）を特定した。この領域内に出現する精子から検出された蛍光強度の平均値は、126であった。

10

【0096】

図8と図9との比較、及びこれらの平均蛍光強度から、第2色素としてNK2251を含有する試薬を用いることにより、精子の染色性が高くなり、精子出現集団が右側（高蛍光強度）の方へシフトすることがわかる。

以上から、第1色素よりも膜透過性が高い第2色素を含有する試薬を用いることにより、精子が出現すると考えられる領域を従来よりも高蛍光強度側に設定して、酵母様真菌が出現すると考えられる領域とを区別することが可能になる。あるいは第2色素を含有しない試薬と第2色素を含有する試薬のそれぞれから得られる散布図を重ね合わせ、高蛍光強度領域に差違となって現れた集団を精子集団と特定することもできる。従って、本発明の分析用試薬を用いることにより、酵母様真菌、赤血球、及び精子を区別した高精度の分析が可能となる。

20

【産業上の利用可能性】**【0097】**

本発明の尿試料分析用試薬は、赤血球、酵母様真菌、精子を弁別できるように染色処理できるので、尿検体について、赤血球、酵母様真菌、精子の含有率などを高精度で測定、分析したい場合に、好適に用いることができる。

30

【図面の簡単な説明】**【0098】**

【図1】本発明の尿試料分析用試薬を用いて精子及び酵母用真菌を含む尿試料を測定した場合に得られる散布図概念図である。

【図2】従来の分析用試薬を用いて精子及び酵母用真菌を含む尿試料を測定した場合に得られる散布図概念図である。

【図3】NK136の濃度と蛍光強度の関係を示すグラフである。

【図4】実施例1で得られた散布図。

【図5】比較例1で得られた散布図。

【図6】実施例2で得られた散布図。

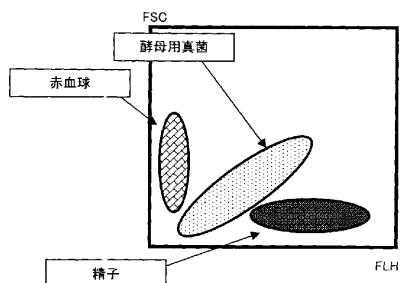
40

【図7】比較例2で得られた散布図。

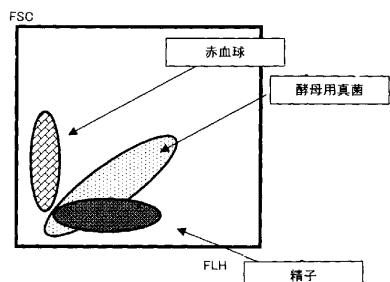
【図8】実施例3で得られた散布図。

【図9】比較例3で得られた散布図。

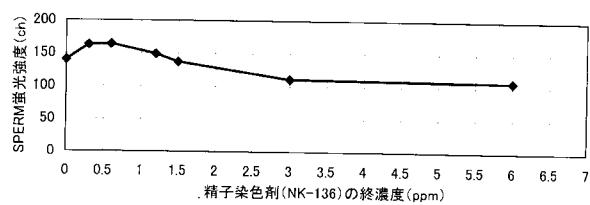
【図 1】



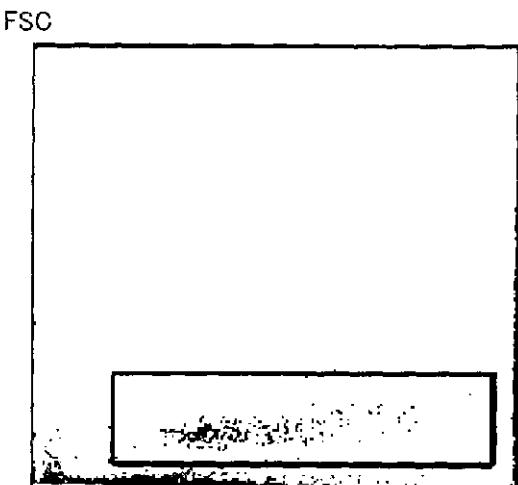
【図 2】



【図 3】

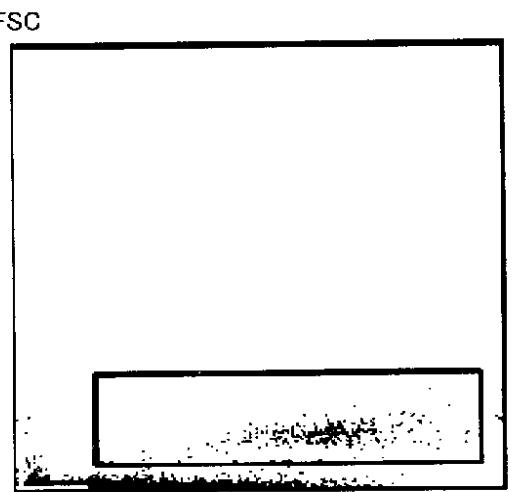


【図 5】



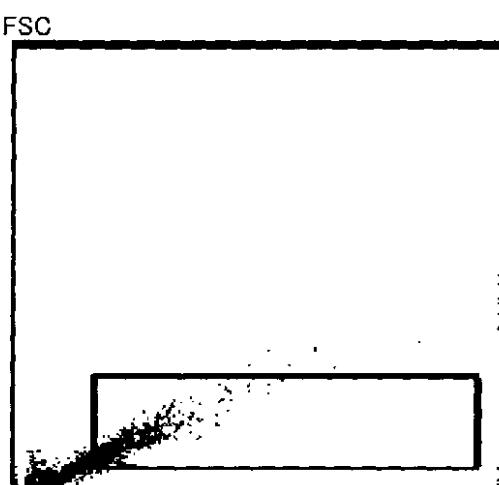
FLH =110

【図 4】



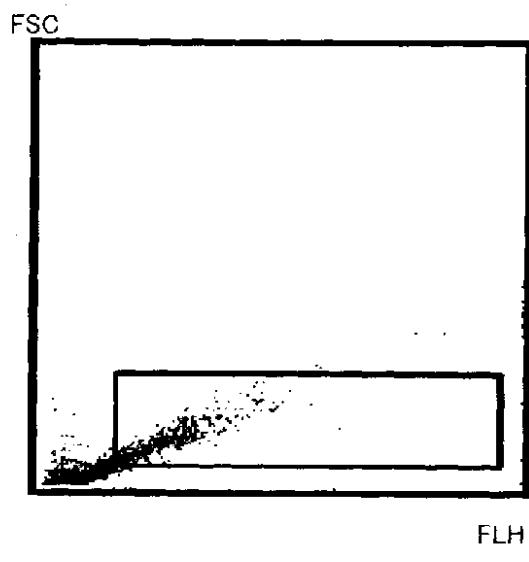
FLH =165

【図 6】



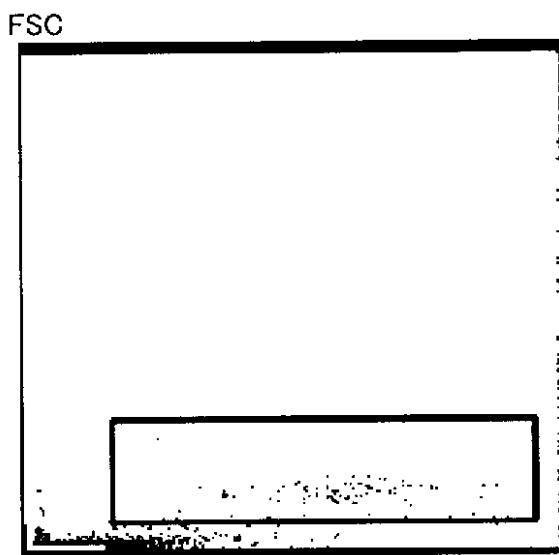
FLH =87

【図7】



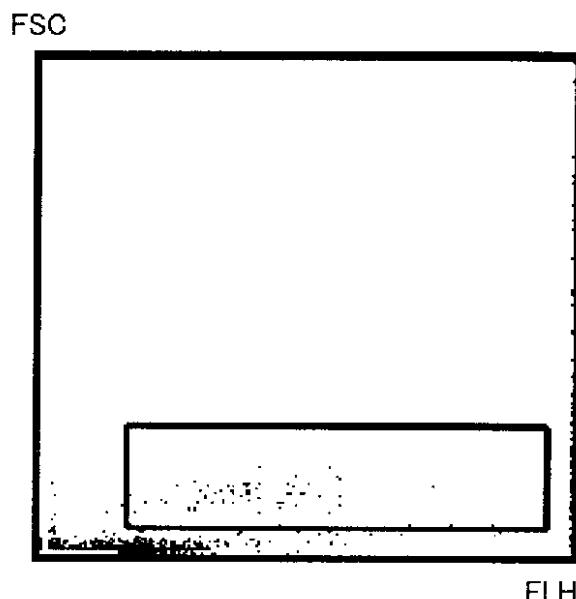
FLH =87

【図8】



FLH =165

【図9】



FLH =126

フロントページの続き

(56)参考文献 特開平09-329596(JP,A)
特開平08-170960(JP,A)
特開2001-242168(JP,A)
特開2004-121143(JP,A)
特表2006-520612(JP,A)
国際公開第2006/007479(WO,A1)
特開平07-181177(JP,A)
特開平10-307135(JP,A)
特開平11-075892(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48 - 33/98
C12Q 1/04
G01N 21/75 - 21/83