



[12] 发明专利申请公开说明书

[21]申请号 93107076.7

[51]Int.Cl⁵

G01N 33 / 579

[43]公开日 1994 年 6 月 8 日

[22]申请日 93.5.8

[30]优先权

[32]92.5.8 [33]JP[31]142010 / 92

[32]93.4.2 [33]JP[31]100426 / 93

[71]申请人 生化学工业株式会社

地址 日本东京

[72]发明人 田中重则 田村弘志

[74]专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 杨丽琴

G01N 33 / 50

说明书页数:

附图页数:

[54]发明名称 前处理剂、前处理方法、使用经前处理的试样的测定法、测定用药盒以及感染症的诊断方法

[57]摘要

本发明采用简单的处理方法除去生物化学反应的干扰因子或者使其变性,而不需要分离变性析出物的操作,借此以极高的检出率迅速、有效地测定特别是来源于血源的试样中的 β -葡聚糖和内毒素。本发明提供了用于上述测定的前处理剂、前处理方法、测定方法、测定用的药盒以及感染症的诊断方法。

权利要求书

1. 一种前处理剂，其特征在于，它是适用于含有干扰生化反应的反应干扰因子的试样的前处理剂，其中含有溴化己二甲铵化合物和碱金属氢氧化物。

2. 权利要求1的前处理剂，其中所说含有干扰生化反应的反应干扰因子的试样是含有干扰鲎反应的反应干扰因子的试样。

3. 一种前处理剂，它是在利用鲎反应来测定试样中的内毒素时使用的权利要求1的前处理剂，它另外还含有非离子型表面活性剂或阴离子型表面活性剂和碱土金属卤化物。

4. 一种前处理剂，它是在利用鲎反应来测定试样中的(1→3)-β-D-葡聚糖时使用的权利要求1的前处理剂，它另外还含有碱金属卤化物。

5. 一种前处理剂，其特征在于，它是在利用鲎反应来测定试样中的(1→3)-β-D-葡聚糖时，为了在进行鲎反应之前对含有干扰鲎反应的反应干扰因子的试样进行处理而使用的前处理剂，它以碱金属氢氧化物作为主要成分。

6. 权利要求1-5任一项中所记载的前处理剂，其特征在于，它作为几种溶液分开保存，在使用时再将这些溶液混合。

7. 一种前处理方法，它是在利用鲎反应来检出在含有干扰鲎反应的反应干扰因子的试样中所含的、能够用鲎反应来检出的物质时，在鲎反应之前先对试样进行处理的前处理方法，该方法的特征是把权利要求1-6任一项中所记载的前处理剂与试样混合并加温。

8. 权利要求7记载的前处理方法，其中的试样为血液试样。

9. 权利要求 7 记载的前处理方法，其中，可用鲎反应检出的物质是内毒素，前处理剂为权利要求 3 中记载的前处理剂。

10. 权利要求 7 记载的前处理方法，其中，可用鲎反应检出的物质是 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖，前处理剂为权利要求 4 或 5 中记载的前处理剂。

11. 一种测定方法，其特征在于，它是利用鲎反应来测定在试样中对鲎试剂具有特异反应物质的测定方法，该方法是利用权利要求 7 - 10 中任一项的方法进行前处理，再把处理后的试样与鲎试剂混合以使其反应，然后检测基质的变化。

12. 一种用于测定对鲎试剂具有特异反应的物质的药盒，其特征在于，它至少由下述试剂构成：

(A) 从权利要求 1 - 6 的前处理剂中选择的 1 种以上的前处理剂，

(B) 以鲎变形细胞的溶胞产物为原料获得的鲎试剂。

13. 权利要求 12 记载的测定用药盒，其中 (B) 的鲎试剂是对内毒素具有特异反应的鲎试剂，而对鲎试剂具有特异反应的物质是内毒素。

14. 权利要求 12 记载的测定用药盒，其中 (B) 的鲎试剂是对 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖具有特异反应的鲎试剂，而对鲎试剂具有特异反应的物质是 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖。

15. 权利要求 13 记载的测定用药盒，其特征在于，它还含有下列 (C) 试剂作为构成试剂：

(C) 含有一定量内毒素的标准试剂。

16. 权利要求 14 记载的测定用药盒，其特征在于，它还含有

下列 (D) 试剂作为构成试剂：

(D) 含有一定量 (1 → 3) - β - D - 葡聚糖的标准试剂。

1 7 . 感染症的诊断方法，其特征在于，用权利要求 1 1 的测定方法来定量地测定来自活体的试样中对鲎试剂具有特异反应的物质，当该物质的测定值超过一定量时，即可判定该试样是来自患有感染症的活体的试样。

说明书

前处理剂、前处理方法、使用经前处理的试样的
测定法、测定用药盒以及感染症的诊断方法

本发明涉及用于含有干扰生化反应的反应干扰因子的试样的前处理剂、其前处理方法、使用经前处理的试样的测定法、在该测定法中使用的测定用药盒以及根据该试样对感染症的诊断方法，特别是涉及在根据利用鲎变形细胞的溶胞产物进行的鲎反应来进行测定时，对含有干扰这种反应的因子的活体试样，特别是血液试样中的 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖和内毒素的测定方法，尤其是涉及为了通过高精度地测定来自真菌感染症和革兰氏阴性细菌感染症患者的血液试样中的 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖和内毒素来诊断真菌感染症和革兰氏阴性细菌感染症时，有效地对上述血液试样进行处理的方法以及上述的测定法。

迄今为止，利用生化反应来对活体试样中的目的物质进行测定被广泛地应用于临床诊断上。例如，作为典型的生物化学的诊断方法，可以举出的例子是利用鲎反应来检测真菌或革兰氏阴性细菌等。

所谓鲎反应是指利用鲎试剂来进行的生化反应。

在鲎试剂内所含的鲎变形细胞溶胞产物（以下简称「溶胞产物」）中，同时存在有与内毒素反应而被活化的级联型凝固系（C因子系）和与 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖（以下简称「 $\beta -$ 葡聚糖」）反应而被活化的级联型凝固系（G因子系）（图1），仅仅利用前者的系

来特异地测定内毒素的方法以及仅仅利用后者的系来特异地测定 β - 葡聚糖的方法都是已知的 (Obayashi T. et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985))。另外, 在真菌感染症患者的血液中, β - 葡聚糖的含量增高, 在革兰氏阴性菌感染症患者的血液中, 内毒素的含量增高。根据对血液中 β - 葡聚糖或内毒素的测定结果, 可以分别地对真菌感染症或革兰氏阴性细菌感染症作出诊断。

利用这样的 G 因子系来测定 β - 葡聚糖的方法和利用 C 因子系来测定内毒素的方法, 由于其检出灵敏度非常高, 因此已被确认适用于检出在活体试样中微量的上述各种物质, 特别是被确认能有效地诊断潜伏性的真菌感染症和革兰氏阴性细菌感染症, 并且已开始在临床检查上使用。

可是, 在利用根据溶胞产物的 G 因子系和 C 因子系的级联反应来测定活体试样中, 特别是血液中的 β - 葡聚糖和内毒素时, 为了利用溶胞产物中的丝氨酸蛋白酶的反应, 必须进行前处理, 以便使其中所含的各种干扰该反应的干扰因子 (例如, 由于凝血酶和 Xa 因子显示与溶胞产物中的凝结酶相类似的作用, 因此成为假阳性因子, 而 α_2 - 浆胞素抑制剂、 α_1 - 抗胰蛋白酶和抗凝血酶 III 对反应有很强的干扰作用, 因此成为假阴性因子) 失去活性或者将其除去。为此目的, 向来都是对血液试样进行特定的处理, 借此调制一种富血小板的血浆 (PRP), 然后往其中加入高氯酸并在 37°C 下进行加温处理, 然后进行离心分离以除去变性析出物, 取出其中的上清液, 用碱将其中和, 以它作为被检液 (Obayashi T. et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985))。然而, 在采用这样的方法时, 变性析出物的分离操作十分麻烦, 全过程的操作步骤过多, 在操作过程中由于能对反

应体系产生影响的物质而造成污染的危险性。

即使是为了测定内毒素和 β -葡聚糖而采取上述那样的前处理方法，也必须在所有的试管中进行前处理，而且还要把经过这种前处理的试样的一部分取出，放入其他的试管中进行鲎反应。另外，在使用合成基质法进行测定时，通常须使用一种被称之为终点法的方法，该方法是对在鲎反应之后，由于基质分解而生成的对硝基苯胺进行重氮化反应，使它变成一种红色的色素，然后测定其吸光度。所说的终点法通常操作麻烦而且测定时间长，所以希望找到一种能在短时间内对很多个样品一次处理好的方法。如果使用微板来代替试管，可以对多个样品同时进行处理，然而，用终点法来进行连续的自动测定是困难的。

因此，希望使用一种利用上述的微板，而且直接而自动地测定基质的变化的动力学方法（特开平 3-220456）来进行测定，然而，该方法的问题是，由于微板的反应液量少和反应液混浊等的影响，不能进行高精度的测定。

另外，由于对内毒素和 β -葡聚糖的测定需使用不同的反应系，因此对试样前处理也不同，这样，为要测定同一个试样中的上述两种物质，需要采用不同的方法进行前处理，因此需要大量的劳动力，而且也不经济，所以人们希望找到一种可用来进行一次性处理就能测定上述两种物质的前处理剂。

因此，如果能找到一种通用性的前处理剂，只要使用这一种前处理剂对活体试样进行前处理就能使其适用于各种生化反应，则该测定法就不必对活体试样进行互不相同的烦杂的前处理，这样就可期待能给生物化学的研究、疾病的诊断等带来非常大的效果，这样的前处理

剂是人们所期望的。

本发明的目的是要提供用于感染症诊断的前处理剂、前处理方法、测定方法、测定用药盒以及感染症的诊断方法，所说方法应能解决上述现有技术的前处理法中所存在的问题，而且，对于干扰生化反应的反应干扰因子，例如，对于血液试样中所含的，干扰在鲎反应中G因子系或C因子系反应的反应干扰因子，只需进行简单的处理即能将其除去，或者使其变性并且不需要分离变性析出物的操作，而且，采用在生化反应测定时不会产生混浊的方法，因此能以极高的检出率迅速而有效地测定血液试样中的 β -葡聚糖或内毒素。

本发明是一种对含有干扰生化反应的反应干扰因子的试样的前处理剂，这种前处理剂（以下称为“通用前处理剂”）的特征是其中含有溴化己二甲铵化合物和碱金属氢氧化物。

本发明的前处理特别适用于含有干扰鲎反应的反应干扰因子的试样。

本发明提供了一种在利用鲎反应来测定试样中的内毒素时使用的前处理剂（测定内毒素用的前处理剂），这种前处理剂含有上述的溴化己二甲铵化合物和碱金属氢氧化物，另外还含有非离子型表面活性剂或阴离子型表面活性剂和碱土金属卤化物。

本发明还提供了一种在利用鲎反应来测定试样中的（1 $\rightarrow$ 3）- β -D-葡聚糖时使用的前处理剂（测定 β -葡聚糖用的前处理剂A），这种前处理剂含有上述的溴化己二甲铵化合物和碱金属氢氧化物，另外还含有碱金属卤化物。

本发明还提供了一种在利用鲎反应来测定试样中的（1-3）- β -D-葡聚糖时使用的前处理剂（测定 β -葡聚糖用的前处理剂

B)，其特征在于，它是为了在进行鲎反应之前，对含有干扰鲎反应的反应干扰因子的试样进行处理而使用的前处理剂，其中以碱金属氢氧化物为主要成分。

本发明的上述各种前处理剂可以作为多种溶液分开保存，在使用时再将这些溶液混合在一起。特别是那些在预混合时会产生混浊或分解的成分，最好彼此分开地保存在单独的溶液中。

本发明提供了一种前处理方法，其特征在于，在利用鲎反应来检出那些在含有干扰鲎反应的反应干扰因子的试样中所含的、可用鲎反应来检出的物质时，在鲎反应之前先对试样进行前处理，在该前处理方法中，从上述的前处理剂物组中选择特定的前处理剂来与所说的试样混合并将其加温。另外，在测定目的物质相同的情况下，根据具体情况有时可以把这些前处理剂组合起来混合在一起使用。

这个前处理方法适用于试样为血液试样的情况。本发明提供了两种上述的前处理方法，在一种前处理方法中，可用鲎反应检出的物质是内毒素，而所说的前处理剂是测定内毒素用的前处理剂，在另一种前处理方法中，可用鲎反应检出的物质是 $(1 \rightarrow 3) - \beta - D -$ 葡聚糖，而前处理剂是测定 $\beta -$ 葡聚糖用的前处理剂A或B。

本发明提供了一种测定法，其特征在于，它是一种利用鲎反应来测定试样中对鲎试剂具有特异反应的物质的测定方法，它是采用上述前处理方法中的任一种方法来对试样进行前处理，然后把经过处理的试样与鲎试剂混合并使其反应，检测出基质的变化。

本发明提供了一种为了测定对鲎试剂具有特异反应的物质的测定用药盒，该药盒至少由下述试剂构成。

(A)从上述前处理剂中选择出的1种以上的前处理剂。

(B) 以鲎变形细胞的溶胞产物作为原料制得的鲎试剂。

因此，为了对内毒素进行特异的测定，最好 (B) 中的鲎试剂是对内毒素具有特异反应的试剂，而对该鲎试剂具有特异反应的物质是内毒素。作为构成试剂，最好其中还含有 (C)，即一种含有一定量内毒素的标准试剂。

另外，为了对 β - 葡聚糖进行特异的测定，最好 (B) 的鲎试剂是对 β - 葡聚糖具有特异反应的试剂，而对该鲎试剂具有特异反应的物质是 β - 葡聚糖。作为构成试剂，最好其中还含有 (D)，即一种含有一定量 β - D - 葡聚糖的标准试剂。

另外，本发明还提供了对感染症的诊断方法，其特征在于，使用可检出上述基质变化的测定方法来定量地测定在来自活体的试样中对鲎试剂具有特异反应的物质，当该物质的测定值超过一定数值时，就可判定该试样是来自患有感染症的活体的试样。

下面具体地解释本发明。

用本发明的前处理剂来处理的对象，即所谓“含有干扰生化反应的反应干扰因子的试样”，是一种可能含有可利用生化反应测定的目的物质的试样，并且是含有一种以上的能影响生化反应的反应干扰因子的试样。通常该试样是来自活体的试样，特别是来自血液的试样。作为来自血液的试样，通常是用公知的方法对从包括人类在内的哺乳动物采集的血液进行处理而获得的血浆或血清，或者是含有蛋白酶类、蛋白酶抑制剂类、来自血液的蛋白制剂等的血浆或血清等。所谓“反应干扰因子”是指与所定的生化反应无关的反应因子（假阳性因子），或者是在反应的任一阶段中对该反应具有干扰作用的因子（假阴性因子），典型的是在血液中所含的上述的因子等。

为了由血液调制成血浆，通常是向血液中添加肝素等抗凝血药，并最好用离心分离法使血球沉淀。这时，如果以低转速（例如 150xg 程度）分离，则可获得含有较多血小板的富血小板血浆（P R P），如果以高转速（例如 1000xg 程度）分离，则可获得贫血小板血浆（P P P）。在本发明中，作为测定对象的血液试样是血浆时，它可以是 P R P 和 P P P 中的任何一种。

另外，所谓血清是指从血液中除去血球和若干血液凝固因子后所获的物质，血清的调制方法通常是把采集的血液置于容器中，分离除去生成的血饼，从而获得血清。

用本发明的前处理剂来处理上述的来源于血液的试样，就可排除反应干扰因子对鲎反应等生化反应的影响。

所谓“生化反应”通常是指鲎反应、抗原抗体反应、酶反应等一般用于活体物质测定的反应。

在本发明中，所谓“鲎反应”是指用低张液等从鲎的变形细胞（血球细胞）中提取出的溶胞产物（鲎变形细胞的溶胞产物）的 C 因子系成分（至少是含有 C 因子和 B 因子以及凝结酶前体的成分）与内毒素的反应以及 G 因子系成分（至少是含有 G 因子和凝结酶前体的成分）与 β -葡聚糖的反应两种反应中的一种或两种反应。所谓“鲎试剂”和“以鲎变形细胞的溶胞产物作为原料获得的试剂”，二者皆是指按照上述的鲎反应为了测定内毒素或 β -葡聚糖所用的试剂，是按照公知方法（例如，参照 J. Biochem., 80, 1011-1021 (1976)）由 *Limulus polyphemus*、*Tachypleus tridentatus*、*Tachypleus gigas*、*Carcinoscorpius rotundicauda* 等的鲎的血淋巴液调制的通常含有鲎变形细胞的溶胞产物的试剂，根据应用情况在必要时可往其中添加

下述的肽合成基质。所谓“对内毒素有特异反应的鲎试剂”，通过将上述的溶胞产物的G因子特异地抑制或者将其吸附、除去（例如 WO 90/02951、US 5,155,032、US 5,179,006、WO 92/03736、WO 92/06381）或者将C因子系成分分解、再构成（例如，特公平 2-18080、特公平 3-18080、Obayashi T. et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985)）而调制成的。另外，所谓“对 β -葡聚糖有特异反应的鲎试剂”，是通过将上述的溶胞产物的C因子特异地抑制或者将其吸附、除去（例如 WO 91/19981、WO 92/16651）或者将G因子系成分分解、再构成（Obayashi T. et al., Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985)）而调制成的。因此， β -葡聚糖用鲎试剂是指按照反应系不被内毒素活化而被 β -葡聚糖特异地活化的方法调制而得的试剂。另外，内毒素用鲎试剂是指按照反应系不被 β -葡聚糖活化而被内毒素特异地活化的方法调制而得的试剂。

在本发明中所用的鲎试剂只要具有上述的那些机能即可，对于其制法和组成等没有限定。

在该鲎反应中，在测定 β -葡聚糖或内毒素的场合下，作为反应干扰因子可以举出能对G因子系或C因子系反应产生影响的因子。这里，“反应干扰因子”是从 β -葡聚糖或内毒素开始，在图1中所示的溶胞产物的G因子系和/或C因子系的阶段的酶反应（级联反应）的任一阶段中与 β -葡聚糖或内毒素发生无关反应的上述假阳性因子或假阴性因子。

以下对本发明的前处理剂作具体的叙述。

本发明的通用前处理剂至少是由溴化己二甲铵化合物和碱金属氢氧化物构成。

所说的碱金属氢氧化物是指钾、锂、钠等碱金属的氢氧化物，具体地说是氢氧化钾（KOH）、氢氧化锂（LiOH）、氢氧化钠（NaOH）等。所说的前处理剂，通常是使用含有一种或多种碱金属氢氧化物的水溶液。其中最好是 KOH 和 NaOH。

前处理剂中的碱金属氢氧化物浓度，通常最好是调节成使被检液中的碱金属氢氧化物浓度等于 0.04-0.4 mol/L。

在本发明中所用的溴化己二甲铵化合物最好是溴化己二甲铵的盐，例如，可以是溴化己二甲铵卤化物。溴化己二甲铵卤化物最好是溴化己二甲铵溴化物（一般名：溴化己二甲铵）、溴化己二甲铵氯化物等，然而在本发明中，不限于这些卤化物等，可以根据需要用其他取代基，例如碳原子数为 1 - 6 的烷基（甲基、乙基等）置换溴化己二甲铵中的氢原子后生成的含有溴化己二甲铵衍生物的盐的物质。

本发明中所用的溴化己二甲铵化合物的分子量可在约 1,000-50,000，最好是在 5,000-10,000 的范围内选择，而它在前处理剂中的用量可在 0.05-0.3%，最好是在 0.1-0.2%（重量/体积）的范围内。其使用量应按照适合于对试样所用的生化反应的原则来调整。

这种通用前处理剂可以适当地含有其他任意的化学物质，可以使用适用于下述的鲎反应的前处理剂的组成成分。

上述的通用前处理剂，例如在用于鲎反应的场合，可以作为内毒素测定用、 β -葡聚糖测定用，或者作为这两者兼有的测定用，可以根据所应用的适宜的种类，对溴化己二甲铵化合物的量。其他成分的量作细微的调整。

也就是说，本发明可以提供一种至少含有上述的碱金属氢氧化物

和溴化己二甲铵化合物的前处理剂来作为内毒素和 β -葡聚糖两者兼用的测定用前处理剂（以下称为兼用前处理剂）。

碱金属氢氧化物的主要作用可认为是它具有能使反应干扰因子变性等机能，而溴化己二甲铵化合物则具有可使测定试样的浊度降低的作用，换言之，对于被认为由中性脂肪、脂蛋白所引起的非特异的浊度的增大具有抑制作用，而且该前处理剂兼备了不干扰两个反应系的性质。含有这两种物质的前处理剂，当将其作为一种前处理剂进行检测样品的处理时，可以用于各种反应系的测定。

本发明的兼用前处理剂，除了这两种成分外再追加其他一些特定成分可以更进一步地提高测定精度。例如，作为这类成分，可以举出：氨基或亚氨基化合物、N-二（羟乙基）甘氨酸〔化学名：N，N-双（2-羟乙基）甘氨酸；优良缓冲剂之一〕等。

作为氨基或亚氨基化合物，可以举出：氨基酸、亚氨基酸、多氨基酸、聚乙烯亚胺、具有氨基的核酸碱或它们的盐。具体地说，其例子有：组胺二盐酸盐、L-组氨酸二盐酸盐、聚-L-组氨酸盐酸盐（分子量 15,000-50,000）、聚-L-赖氨酸盐酸盐（分子量 2,000-70,000）、聚-L-精氨酸盐酸盐（分子量 5,000-150,000）、聚乙烯亚胺（分子量 1,000-70,000）、腺嘌呤盐酸盐、胞嘧啶盐酸盐等。

这些氨基或亚氨基化合物，在前处理剂中可以按 0.03-0.3%（重量/体积）的含量范围使用。

另外，N-二（羟乙基）甘氨酸在前处理剂中可以按 0.005-0.05 mol/L，最好按 0.02-0.05 mol/L 的含量范围使用。

另外，本发明的兼用前处理剂可以用作调制内毒素测定用的专用前处理剂和/或 β -葡聚糖测定用专用前处理剂的中间试剂使用。

内毒素测定用前处理剂是在以上述兼用前处理剂的组成成分作为组成成分的基础上至少追加非离子型表面活性剂或阴离子型表面活性剂和碱土金属卤化物而构成的。

其中，作为非离子型表面活性剂，没有特别的限制，可以举出的有：聚氧乙烯醚类、聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯类和烷基葡萄糖苷类等。

作为聚氧乙烯醚类，可以举出：聚氧乙烯-P-叔辛基（或异辛基）苯基醚（聚合度 8-40）、聚氧乙烯-4-叔辛基（或异辛基）环己基醚（聚合度 8-40）、聚氧乙烯-P-壬基苯基醚（聚合度 9-15）、聚氧乙烯环庚基己基醚（聚合度 10-20）、聚氧乙烯十二烷基醚（聚合度 10-29）等。作为市售品，包括：Triton 系列表面活性剂（Octoxynol、聚氧乙烯 P-t-辛基苯基醚）、Brij 系列表面活性剂（聚氧乙烯烷基醚）以及 Emulgen 系列表面活性剂（聚氧乙烷壬基苯基醚）等。

作为烷基葡萄糖苷类，可以举出：n-庚基-（ α -或 β -）D-吡喃葡萄糖苷、n-辛基-（ α -或 β -）D-吡喃葡萄糖苷、n-壬基-（ α -或 β -）D-吡喃葡萄糖苷、n-癸基-（ α -或 β -）D-吡喃葡萄糖苷或 n-十二烷基-（ α -或 β -）D-吡喃葡萄糖苷等。

作为聚氧乙烯山梨糖醇酐烷基酯类，可以举出：聚氧乙烯山梨糖醇酐（聚合度约 20）的一月桂基酯、一棕榈酸酯、一硬脂酸酯、一油酸酯或三油酸酯等。作为市售品，包括 Tween 系列表面活性剂。

作为 Triton 系列表面活性剂，其例子有：Triton X-100、X-114、X-102、X-165、X-305、X-405、Igepal CA-630、Neutronyx 605、Conco NIX-100、Nonidet P-40 等。作为 Brij 系列表面活性剂，其

例子有：Brij 35、58 等。作为 Emulgen 系列表面活性剂，其例子有 Emulgen 911、913 等。作为 Tween 系列表面活性剂，其例子有：Tween 20、40、60、80、85 等。

作为非离子型表面活性剂，最好是 Triton 系列和 Tween 系列表面活性剂。

作为阴离子型表面活性剂，可以举出：十二烷基硫酸盐等烷基硫酸盐、烷基磺酸盐等。作为十二烷基硫酸盐，其具体例子有：十二烷基硫酸酯钠、十二烷基硫酸酯锂、十二烷基硫酸酯钾等。其中最好是十二烷基硫酸酯钠。

作为碱土金属卤化物，可以举出：氯化钙、氯化镁、氯化锶等。其中最好是氯化钙。

在所说的内毒素测定用前处理剂中，溴化己二甲铵化合物和碱金属氢氧化物的配合比例可以按照与上述兼用前处理剂几乎相同的范围来调节。而表面活性剂，在前处理剂中可以按照 0.04-0.4%（重量/体积）的含量范围来使用。碱土金属卤化物在前处理剂中可以按照 0.005-0.05 mol/L 的含量范围来使用。

另外，本发明的内毒素测定用前处理剂可以往其中追加所需的成分，例如，可以把上述的氨基或亚氨基化合物、N-二（羟乙基）甘氨酸等按照与上述兼用前处理剂同样程度的含量范围来使用。

这里，作为碱金属卤化物的例子有：氯化钠、氯化钾、氯化锂等。其中最好是氯化钠和氯化钾。可以认为，这种碱金属卤化物对 β -葡聚糖向血液成分的吸附具有抑制作用。

在本发明的 β -葡聚糖测定用前处理剂 A 中，溴化己二甲铵化合物与碱金属氢氧化物的配合比例可以按照与上述兼用前处理剂几乎相

同的范围来调节。而碱金属卤化物在前处理剂中可以按照 0.05-0.5 mol/L 的含量范围使用。

另外，本发明的 β - 葡聚糖测定用前处理剂 A，可以再往其中追加所需的成分，例如，可以将上述的氨基或亚氨基化合物、N - 二（羟乙基）甘氨酸等按照与上述兼用前处理剂同样程度的范围使用。

另外，本发明还提供了以上述碱金属氢氧化物作为主要成分的 β - 葡聚糖测定用前处理剂 B。在这种前处理剂 B 中可以根据需要添加其他的添加剂。作为这种添加剂，例如可以举出这样一些物质，这些物质能防止 β - 葡聚糖被吸附到血液成分上而抑制 G 因子级联反应，或者使反应系稳定化，具有提高再现性的作用。例如，适用的有碱金属卤化物等。

本发明的前处理剂可以分成几种溶液保存，在使用时再将这些溶液混合在一起。假如把碱金属氢氧化物和碱土金属卤化物和 / 或非离子型表面活性剂混合在一起而长期地保存，就会产生沉淀等不合适的情况，因此最好将它们分别地保存，直到即将进行前处理时或者在前处理时再加以混合。特别是 KOH 和 CaCl_2 以及 Triton X-100 最好分别地保存。

使用上述前处理剂来对试样进行的处理，基本上就是将其添加到试样中并加以混合，同时加温。可以根据需要一边进行搅拌或振动等，一边对其加温。这时的处理温度可以根据前处理后适用的生化反应或者试样的种类而适当地选定，通常是在 25 - 70 $^{\circ}\text{C}$ ，最好是在 37 - 56 $^{\circ}\text{C}$ 的范围内，处理时间在 5 - 40 分，最好是在 5 - 20 分的范围内。

利用鲎反应来测定试样中对鲎试剂具有特异反应的物质，即内毒

素或 β - 葡聚糖的方法就是把用本发明的前处理剂处理过的试样与一种由鲎变形细胞的溶胞产物制得到鲎试剂混合并使其反应，从而检测出基质的变化。

经过前处理的试样不需经过离心分离和中和处理即可直接进行鲎反应。利用鲎反应的测定法的步骤如下，把鲎试剂加入经过前处理的试样中，将混合液在约 37°C ，pH 7-9 的条件下反应适当的时间，利用根据基质反应的测定手段来测定基质的变化，然后根据预先用标准试剂制成的校正曲线来计算出 β - 葡聚糖或内毒素在试样中的含量。

在测定内毒素的场合下，必须把经过上述兼用前处理剂或内毒素测定用前处理剂处理过的试样与至少含有能与内毒素反应的 C 因子系成分的鲎试剂混合并使其反应，最好是选择仅仅与内毒素具有特异反应的试剂作为这种鲎试剂。作为这种鲎试剂，可以举出的是含有 C 因子系成分、而 G 因子系成分则已被除去或已被抑制的试剂。

另外，这里所说的兼用前处理剂和内毒素测定用前处理剂，也可以根据情况混合在一起使用。

在测定 β - 葡聚糖的场合下，把经过上述兼用前处理剂或 β - 葡聚糖测定用前处理剂 A 或 B（另外，也可以把这三种前处理剂适当地组合，混合在一起使用）处理过的试样与至少含有能与 β - 葡聚糖反应的 G 因子系成分的鲎试剂混合并使其反应，最好是选择只与 β - 葡聚糖具有特异反应的试剂作为这种鲎试剂。作为这种鲎试剂，可以举出的是含有 G 因子系成分，而 C 因子系成分则已被除去或已被抑制的试剂。

因此，最好把在测定内毒素或 β - 葡聚糖时的反应混合液的 pH

值调节至适合于 G 因子系或 C 因子系的 pH 值附近，通常可以使用公知的缓冲液根据所需将 pH 值调节至 7 - 9 的范围。另外，从下述的实施例可以证明，经过本发明的前处理而失去活性的假阳性因子、假阴性因子，其活性没有再恢复。相反地，在把用该前处理剂处理过的含有比较高浓度碱性物质的被检液与萤试剂混合时，该前处理剂并没有对该 G 因子系或 C 因子系中的各成分的反应性产生不良影响，我们认为这是由于缓冲作用的缘故。

在该反应混合液中，为了测定上述被检液的 β - 葡聚糖或内毒素，如上所述，由于被图 1 中的溶胞产物的 G 因子系级联反应或 C 因子系级联反应所活化而生成的凝结酶的，对基质的酰胺酶活性或蛋白酶活性可以用公知的方法测定。此处所说的基质，既可以是合成的基质，也可以是天然的基质，它能够通过酶反应而被水解，因而导致可以容易地检出的生成物，是一种能使反应混合液基于酶反应而发生变化的基质，这种变化，不管是定性地或定量地都能进行测定。

例如，把含有 β - 葡聚糖或内毒素测定用的溶胞产物和肽合成基质的反应系与被检液接触而使其进行反应，从而可以测定酰胺酶活性。作为这样的肽合成基质，其例子有：能够转变成上述凝结酶的基质的肽（例如，甲氧羰基 - D - 六氢化酞胺酰 - Gly - Arg；由 N 末端被保护的 Leu-Gly-Arg、Ile-Glu-Ala-Arg 等排列构成的肽等）的 C 末端的精氨酸的羧基上的发色性残基（例如，P - 硝基苯胺、P - (N, N - 二乙基氨基) 苯胺、P - (N - 乙基 - N - B - 羟乙基) 苯胺等）、发荧光性残基（例如，7 - 氨基甲基香豆素等）、发光性残基以及氮等由于酰胺结合而被置换了的肽合成基质。也就是说，酰胺酶活性的测定可以通过测定由于凝结酶受到这些基质的作用而生成的反应产物

(P-硝基苯胺、氨等)来进行。具体地说,可供采用的测定内毒素的方法的例子有:具体地说,可供采用的测定内毒素的方法的例子有:把经过上述前处理的被检液与在含有溶胞产物的G因子系或C因子系成分的反应系中的上述肽合成基质共存而进行反应(级联反应以及在必要时使其向生成物的其他色素转变的变换反应),然后对反应生成的色素、发荧光物质、发光物质或氨,分别采用分光光度计(特公昭 63-26871、特公平 3-66319 等)、荧光光度计、化学发光测定装置、氨检出用电极(特开昭 62-148860)等来测定。

具体地说,把本发明的前处理剂置于一块微板中,用该前处理剂进行前处理,然后再通过鲎反应等生化反应来进行有效的测定。特别是在动力学法中,可以使用2波长同时测光的方法来进行适合的测定,这样就可以迅速和准确地测定目的物质。

另一方面,为了测定凝结酶的蛋白酶活性,例如,利用含有作为凝结酶天然基质的凝结物(コァギエログン)的 β -葡聚糖测定用鲎试剂或内毒素测定用鲎试剂来测定通过级联反应生成凝结酶的作用而生成凝固素凝胶的形成反应,例如用适当的仪器(例如,浊度测定装置、粘度测定装置等)来测定,或者用肉眼来判定,从而对内毒素进行测定(特公平 4-14310 等)。在上述反应中使用的鲎试剂,最好是使用一些能够特异地抑制或吸附、除去上述那样的溶胞产物的G因子的试剂(内毒素测定用)或者能够特异地抑制或吸附、除去溶胞产物的C因子的试剂(β -葡聚糖测定用)。通常在这些鲎试剂中已经含有凝结物(コァギエログン),当然也可按别的途经添加进去。

本发明的 β -葡聚糖的测定法对于真菌感染症,特别是对于难以诊断的潜伏性真菌感染症的早期诊断特别有效,另外,本发明的内毒

素测定法对于革兰氏阴性细菌感染症的早期诊断特别有效。

为了进行真菌感染症的诊断，先从怀疑为真菌感染症的患者身上采集血样，在用本发明的前处理剂处理后，测定其中 β - 葡聚糖的含量，当血液中的 β - 葡聚糖超过一定量（正常值）时，则可判断该患者已患真菌感染症。

同样，为了诊断革兰氏阴性细菌的传染病，由被怀疑为这种传染病患者身上采集血液，用本发明的前处理剂处理所采集的血液样品，然后测定内毒素，当血液中的内毒素超过一定量（正常值）时，可以断定该患者患有革兰氏阴性细菌传染病。

在本发明中，从本发明的上述兼有用前处理剂、测定内毒素用的前处理剂、测定 β - 葡聚糖用的前处理剂 A 或 B 等前处理剂中选取的一种以上的组合，与上述测定内毒素用的鲎属试剂，测定 β - 葡聚糖用的鲎属试剂等一种以上适当地组合起来，即可构成所希望的测定用药盒。

本发明的药盒，可以根据需要任意增加其它的构成药剂。这类药剂例如可以是含有一定量内毒素或 β - 葡聚糖的标准试剂、空白试验用的蒸馏水、反应试剂溶解、反应用的缓冲液等。

所述的缓冲液，例如可以举出 Good 缓冲液（如 HEPES（N-2-羟乙基哌嗪-N'-2-乙烷磺酸）缓冲液）、Tris-HCl 缓冲液等。

下面列举实施例来具体地说明本发明，但本发明不受这些实施例的限制。

实施例 1-1：向 PRP 中添加回收 β - 葡聚糖的试验（前处理剂的 KOH 浓度）

按照每次 1ml 血液添加 5 个单位的肝素，采集健康人的血液，

取 2ml 采集的血液，以 $150 \times g$ 离心分离 10 分钟，得到富血小板的血浆（PRP）。

在 $190 \mu\text{l}$ 这种 PRP 试验样品中，添加 $10 \mu\text{l}$ 由茯苓菌（*Poria cocos*）得来的 β -葡聚糖调制品（茯苓聚糖；按齐藤等，Agric. Biol. Chem., 32, 1261-1269 (1968) 的方法调制）的 0.01M 氢氧化钠（NaOH）水溶液（ 1.0ng/ml ），充分混合后，取其 $5 \mu\text{l}$ 放入不含有 β -葡聚糖的微板（商品名：トキシベットプレート 96F，生化学工业（株）出售），加入 $20 \mu\text{l}$ 在 $0-1.0\text{mol/l}$ 范围内选择的氢氧化钾（KOH）水溶液 [前处理剂]（被检液中的 KOH 浓度为 $0-0.8\text{mol/l}$ ），在 37°C 加热保持 10 分钟，用以作为被检液。

按下述方法测定被检液中 β -葡聚糖的量：使用按照 Obayashi, T. et al. (Clin. Chim. Acta, 149, 55-65 (1985)) 的方法由蜚变形细胞的溶胞产物调制的、含有 G 因子系成分和显色和成基质（Boc-Leu-Gly-Arg-pNA（对硝基酰苯胺））的用于测定 β -葡聚糖 的显色合成基质法冷冻干燥制品（以下简称为 G 试剂），在 $25 \mu\text{l}$ 被检液中加入 $50 \mu\text{l}$ 溶解有 0.2mol/l Tris-HCl 缓冲液（ $\text{pH}8.0$ ）的 G 试剂溶液和 $50 \mu\text{l}$ 蒸馏水，在 37°C 加热 30 分钟使之反应，随后依次加入 0.04% （W/V）亚硝酸钠（ 1mol/l 盐酸溶液） $50 \mu\text{l}$ 、 0.3% （w/v）氨基磺酸铵 $50 \mu\text{l}$ 以及 0.07% （w/v）N-1-萘基乙二胺二盐酸盐（ 14% （W/v）N-甲基-2-吡咯烷酮溶液） $50 \mu\text{l}$ ，进行重氮偶合反应，以 630nm 为对照波长，利用微板读数装置测定 545nm 的吸光度（ $545-630\text{nm}$ ），进行定量。

表 1 中给出了对于在同一条件下前处理的没有添加 β -葡聚糖的 PRP 的测定结果（吸光度），同时还给出了通过改变前处理剂溶液

中的 K O H 浓度而调整被检液中 K O H 浓度的情况下 β - 葡聚糖添加回收率。

表 1

被 检 液	KOH 浓度 (mol/l)	未添加 β -葡萄糖的被检液的吸光度	β -葡萄糖添加回收率(%)
P R P (+ β 葡萄糖) + KOH	0 . 0 0 0	0 . 0 2 4	0
	0 . 0 1 6	0 . 0 2 5	3
	0 . 0 3 2	0 . 0 2 9	6 5
	0 . 0 4 0	0 . 0 3 0	9 0
	0 . 0 6 0	0 . 0 3 0	1 0 0
	0 . 0 8 0	0 . 0 3 0	1 0 0
	0 . 1 6 0	0 . 0 3 0	1 0 0
	0 . 2 4 0	0 . 0 2 9	1 0 0
	0 . 3 2 0	0 . 0 2 8	9 5
	0 . 4 0 0	0 . 0 2 7	9 2
对 照 物	0 . 6 0 0	0 . 0 2 7	7 0
	0 . 8 0 0	0 . 0 2 6	6 5
	0 . 0 0 0	0 . 0 2 5	1 0 0

在表 1 中，KOH 浓度 (mol/l) 表示处理 P R P 时的被检液中的浓度，未添加 β - 葡聚糖的被检液的吸光度表示对于未添加 β - 葡聚糖的前处理 P R P 的 545-639 nm 测定的吸光度。

β - 葡聚糖添加回收率，是以对照物的测定值为 100%，用百分率表示添加了 β - 葡聚糖的被检液 (添加 β - 葡聚糖前处理 P R P) 的回收率。所述的对照物，是用注射用生理食盐水代替 P R P，用注射用蒸馏水代替前处理剂，以添加和未添加 β - 葡聚糖的测定值作为基准。

由表 1 可以看出，只用注射用蒸馏水进行处理，完全没有检测出 β - 葡聚糖，随着被检液的 KOH 的浓度增加，回收率显著增加。另外，当 KOH 浓度高于 0.6mol/l 或低于 0.03mol/l 时， β - 葡聚糖的回收率皆降低，如果以 0.04-0.4mol/l 左右的浓度使用，可以消除 G 因子系反应的假阳性因子和干扰因子 (假阴性因子) 的影响，以高的可信度准确地测出 P R P 中的 β - 葡聚糖的真值，具有良好的再现性。

也就是说，未添加 β - 葡聚糖前处理 P R P 的吸光度，在与未添加 β - 葡聚糖的对照物的吸光度是相同值的情况下，表明 P R P 中的 G 因子系反应假阳性因子已完全变性。另外，添加 β - 葡聚糖测定的实施例 (β - 葡聚糖添加前处理 P R P) 中的 β - 葡聚糖的回收率为 100% 时，意味着 P R P 中的 G 因子系反应干扰因子 (假阴性因子) 已完全变性。因此，可以使这些反应干扰因子同时变性失去活性的理想条件是， β - 葡聚糖未添加前处理 P R P 的测定值与对照物的值几乎相同，并且，添加 β - 葡聚糖前处理 P R P 的 β - 葡聚糖添加回收率几乎是 100%。

表 1 的结果表明，被检液的 KOH 浓度为 0.04-0.4mol/l 时，可以满足上述的理想条件。

实施例 1 - 2：向 P R P 中添加回收 β - 葡聚糖试验（前处理剂的 NaOH 浓度）。

在 190 μ l 按照与实施例 1 - 1 同样方法调制的 P R P 试样中，添加 10 μ l 与实施例 1 - 1 相同的 β - 葡聚糖调制品（茯苓聚糖）的 0.01M NaOH 水溶液（1.0ng/ml）（被检液中的 NaOH 浓度为 0-0.8 mol/l），充分混合后，取其中 5 μ l 放入トキシペットプレート 96F 中，添加 20 μ l 在 0-0.8mol/l 范围内选择的 NaOH 水溶液 [前处理剂]，在 37℃加温保持 10 分钟，用来作为被检液。

使用 G 试剂，按照与实施例 1 - 1 同样方法测定被检液中的 β - 葡聚糖的含量。

表 2 中给出了在同一条件下前处理的未添加 β - 葡聚糖的 P R P 的测定结果（吸光度），同时还到出使 NaOH 浓度作各种改变的情况下的 β - 葡聚糖添加回收率。

表 2

被 检 液	NaOH 浓度 (mol/l)	未添加 β -葡聚糖的被检液的吸光度	β -葡聚糖添加回收率 (%)
P R P (+ β -葡聚糖 +NaOH)	0 . 0 0 0	0 . 0 2 4	0
	0 . 0 1 6	0 . 0 2 4	2
	0 . 0 3 2	0 . 0 2 9	5 5
	0 . 0 4 0	0 . 0 3 0	8 8
	0 . 0 6 0	0 . 0 3 0	1 0 0
	0 . 0 8 0	0 . 0 3 0	1 0 0
	0 . 1 6 0	0 . 0 3 0	1 0 0
	0 . 2 4 0	0 . 0 3 0	1 0 0
	0 . 3 2 0	0 . 0 2 8	9 4
	0 . 4 0 0	0 . 0 2 8	9 0
	0 . 6 0 0	0 . 0 2 7	7 5
	0 . 8 0 0	0 . 0 2 6	7 2
对 照 物	0 . 0 0 0	0 . 0 2 5	1 0 0

在表 2 中，NaOH 浓度 (mol/l) 表示处理 P R P 时的被检液中的浓度，未添加 β - 葡聚糖被检液的吸光度表示未添加 β - 葡聚糖前处理 PRP 的 545-630nm 测定的吸光度， β - 葡聚糖添加回收率表示以对照物测定值为 100%，用百分率表示的添加 β - 葡聚糖的被检液 (β - 葡聚糖添加前处理 P R P) 的回收率。该对照物是使用注射用生理食盐水代替 P R P、用注射用蒸馏水代理前处理剂，以添加和未添加 β - 葡聚糖的样品测得的值作为基准。

由表 2 可以看出，只用蒸馏进行处理时，完全没有检测出 β - 葡聚糖，增加被检液中的 NaOH 浓度，则回收率显著增加。

表 2 的结果表明，与使用实施例 1 - 1 的 KOH 水溶液作为前处理剂的情况一样，使用一种能使被检液中 NaOH 浓度为 0.04-0.4 mol/l 的 NaOH 水溶液作为前处理剂时，可以排除 P R P 中的假阳性因子和假阴性因子的影响。

实施例 1 - 3：向血清中添加回收 β - 葡聚糖的试验 (处理时间) 不放入抗凝固剂，采集健康人的血液，将 3 ml 所采集的血液在 4℃ 静置 1 小时，然后以 1000xg 离心分离 10 分钟，得到血清。

在 190 μ l 这种血清试料中，添加 10 μ l 含有 10pg 与实施例 1 同样的 β - 葡聚糖调制品 (茯苓聚糖) 的水溶液，然后从中取 5 μ l 放入トキシペットプレート 96F 中，添加 20 μ l 0.1mol/l 的 KOH 水溶液 [前处理剂]，在 37℃ 加温保持预定的时间，用来作为被检液。

采用与实施例 1 中同样的方法，测定上述被检液中添加的 β - 葡聚糖。

与实施例 1 - 1 的情况相同，以表 3 的形式给出各加温时间的测定结果。

表 3

被 检 液	加 温 时 间 (分)	未添加 β - 葡聚糖的被检 液的吸光度	β - 葡聚糖 添加回收率(%)
血清 (+ β - 葡聚糖) + KOH	0	0.025	4
	5	0.026	94
	10	0.031	100
	15	0.031	100
	20	0.032	100
	30	0.031	100
	40	0.030	96
	60	0.028	73
对 照 物		0.025	100

由表 3 可以看出，在加温时间为 0，即添加前处理剂后直接用来作为被检液的情况下， β - 葡聚糖的回收率非常低。相比之下，使用经过 5 - 40 分钟加温的被检液，可以定量地测出添加到血清中的 β - 葡聚糖。也就是说，在这样的条件下进行前处理，可以使假阳性因子和干扰因子变性。以高可信度准确地测出血清中的 β - 葡聚糖的真值，具有良好的再现性。

实施例 1 - 4：向 PPP 中添加回收 β - 葡聚糖的试验（前处理温度）

按照每 1 ml 血液添加 5 个单位的肝素，由健康人体采集 2 ml 血液，以 1000xg 离心分离 10 分钟，得到贫血小板的血浆（PPP）。

在 190 μ l 这种 PPP 试样中，添加 10 μ l 0.01mol/l NaOH 水溶液，该水溶液中含有 40pg 由粪产碱杆菌（*Alcaligenes faecalis* var. *myxogenes*）IFO 13140 得到的 β - 葡聚糖（カードラン；和光纯药工业（株）出售），然后从中取 5 μ l 放入トキシベットプレート 96F 中，加入 0.1mol/l KOH 溶液 20 μ l，在规定的温度下加温保持 10 分钟，用它来作为被检液。

采用与实施例 1 - 1 相同的方法测定添加到上述被检液中的 β - 葡聚糖。

与实施例 1 - 1 的情况同样，以表 4 形式给出各加温温度的测定结果。

表 4

被 检 液	处理温度 (°C)	未添加 β -葡聚糖的 检液的吸光度	β -葡聚糖 添加回收率 (%)
P P P (+ β -葡聚糖) + K O H	4	0 . 0 2 5	1 2
	2 0	0 . 0 2 9	8 4
	2 5	0 . 0 3 0	9 3
	3 7	0 . 0 3 1	1 0 0
	4 5	0 . 0 3 1	1 0 0
	5 6	0 . 0 3 1	1 0 0
	7 0	0 . 0 2 7	9 1
对 照 物		0 . 0 2 5	1 0 0

由表 4 可知，处理温度为 4℃ 的情况下， β -葡聚糖的回收率低，而在 25℃ 以上温度处理时，可以定量地检测出添加到 P P P 中的 β -葡聚糖。

实施例 1 - 5：测定真菌传染病患者的 P R P 样品

按照与实施例 1 同样的方法，从被怀疑为真菌传染病患者身上采血，调制成 P R P 检测样品。取其中 5 μ l 放入トキシペットプレート 96F 的各个阱中，再加入 0.1mol/l NaOH 水溶液〔前处理液〕20 μ l，在 37℃ 加温保持 10 分钟，将它作为被检液。然后用与实施例 1 - 1 同样的方法使之与 G 试剂进行反应，测定吸光度。使用与实施例 1 - 4 同样已知量的カードラン作为标准试剂，利用另外作出的标准曲线换算上述被检液中的 β -葡聚糖含量，结果示于表 5 中。

表 5 预测为潜伏性真菌传染病的血浆 (PRP) 中 β -葡聚糖浓度

NO	疾 患	PRP β -葡聚糖	血 培	临 床 症 状	结 果
1	ALL	357.7 pg/ml	(+)	白色念珠菌分离	死
2	AML	27.4	(+)	热带念珠菌分离	死
3	AIHA	594.6	(+)	新型隐球菌分离	存 活
4	ALL	60.6	(-)	全身性曲霉病(尸体解剖)	死
5	ALL	92.5	(-)	使用咪康唑后有改善	存 活
6	AML	46.1	(-)	使用咪康唑后有改善	存 活

ALL: 急性淋巴细胞白血病; AML: 急性骨髓性白血病; AIHA: 自身免疫性溶血性贫血。

如表 5 中所示，在所有病例（NO.1-NO.6）中都检测出高浓度的 β - 葡聚糖（健康人的 β - 葡聚糖含量： 0.2 ± 0.3 pg/ml），其中有 3 例（NO.1-NO.3）在血培中分别检测出白色念珠菌（*Candida albicans*）、热带念珠菌（*Candida tropicalis*）和新型隐球菌（*Cryptococcus neoformans*），有 1 例（No.4）的血培是阴性的，但在死亡后对尸体解剖进行组织病理学检查，检查出烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）。剩下的 2 例（No.5 和 No.6），根据临床症状、经过、药物敏感性等怀疑是真菌传染病，但血培是阴性的，经过使用抗真菌药（咪康唑），临床观察有明显改善，因此诊断为真菌感染。

因此，用本发明的前处理剂处理真菌传染病患者的 P R P，然后测定 β - 葡聚糖，可以快速、准确地诊断真菌感染病，尤其是用常规检查方法很难诊断的潜伏性真菌感染症。

实施例 1 - 6：测定真菌感染症患者血清样品

按照与实施例 1 - 3 同样的方法，从被怀疑为真菌感染症患者的身上采血，调制成血清样品。取 5 μ l 放入トキシペットプレート 96F 的各阱内，再加入 20 μ l 0.1mol/l KOH 水溶液 [前处理剂]，在 37℃加温保持 10 分钟，用它来作为被检液。然后按照与实施例 1 同样的方法使其与 G 试剂反应，测定吸光度。使用与实施例 1 - 4 相同已知量的カードラン作为标准试剂，利用另外作成的标准曲线换算上述被检液中的 β - 葡聚糖含量，结果示于表 6 中。

表 6

NO	疾 病	血清 β -葡聚糖	血 培	临 床 症 状	结 果
1	MM	456.4 pg/ml	(+)	高里氏念珠菌分离	存 活
2	APML	104.8	(+)	克柔氏念珠菌分离	存 活
3	APML	152.1	(-)	全身性曲霉病(尸体解剖)	死 亡
4	MAL	734.8	(-)	使用フルコザール后有所改善	存 活
5	ALL	302.8	(-)	使用两性霉素B后有所改善	存 活

MM: 多发性骨髓肿、APML: 急性前骨髓球形白血病、
 AML: 急性髓性白血病、ALL: 急性淋巴性白血病。

如表 6 中所示，在所有病例（No.1-No.5）中都检测出高浓度的 β - 葡聚糖（健康人的 β - 葡聚糖含量： 0.2 ± 0.2 pg/ml），其中有 2 例（No.1 和 No.2），在血培中分别检查出高里氏念珠菌（*Candida guilliermodi*）和克柔氏念珠菌（*Candida krusei*），有 1 例（No.3）的血培是阴性的，但死亡后解剖进行组织病理学检查，发现了烟曲霉（*Aspergillus fumigatus*）。剩下的 2 例（No.4 和 No.5），从临床症状、经过、药物敏感性等来看怀疑是真菌感染症，但血培是阴性的，使用抗真菌药（两性霉素 B、フルコナゾール）给药后，临床观察有显著改善，因此认为是患了真菌感染症。

因此，用本发明的前处理剂处理真菌感染症患者的血清，然后测定其中的 β - 葡聚糖，可以迅速而准确地诊断真菌感染症，特别是用普通检查方法很难诊断的潜伏性真菌感染症。

实施例 1 - 7：在测定 β - 葡聚糖的凝胶化法（比浊法）中所用的药盒

制备由下列试剂成分构成的、用于测定 β - 葡聚糖的凝胶化法（比浊法）药盒（供 50 个检验样品用）。

（A）前处理剂 1.0 ml

0.1 mol/l NaOH 水溶液

（B）G 因子系反应试剂（冷冻干燥品）适量

在由鲎、大眼蚤属得到的溶胞产物（リムルス HSII- テストキット，和光纯药（株）出售）中，添加 15%（w/v）葡聚糖（分子量 70000），以 3500 rpm 离心分离 10 分钟，然后与多孔性纤维素凝胶（セルロファイン GC-200m，生化学工业（株）出售）混合，用玻璃过滤器过滤，冷冻干燥该滤液而制成这种反应试剂。

(C) G 因子系反应试剂溶解。反应用缓冲液 5.0ml 0.1mol/l Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0)

(D) 标准 β - 葡聚糖试剂 (冷冻干燥制品) 适量
市售的 カードラン (见实施例 1 - 4)

(E) 标准 β - 葡聚糖试剂溶解用蒸馏水 (不含 β - 葡聚糖)
1.0 m l

(F) 空白试验用蒸馏水 (不含 β - 葡聚糖) 1 . 0 m l 实施例
1 - 8 : 测定 β - 葡聚糖用显色合成基质法药盒

制备由下列试剂成分构成的、用以测定 β - 葡聚糖的显色合成基质法药盒 (供 100 个样品用)

(A) 前处理剂 2 . 0 m l
0 . 1 mol/l KOH 水溶液

(B) G 因子系反应试剂 (冷冻干燥品) 适量

在由 *Tachypleus Tridentatus* 制得的溶胞产物中, 添加 15% (W/V) 葡聚糖 (分子量 40000), 以 3500rpm 离心分离 10 分钟, 然后使之通过孔径 0.20 μ m 的尼龙膜过滤器 (ナルゲンシリンジフィルター, 直径 25mm, ナルジェ社制造), 将通过液加到 MS 混合液 (含有 0.8M 氯化镁和 6mM Boc-Leu-Gly-Arg-pNA) 中, 冷冻干燥制成这种试制。

(C) G 因子系应试制溶解, 反应用缓冲液 5.0ml 0.2 mol/l Tris-HCl 缓冲液 (pH0.8)

(D) 标准 β - 葡聚糖试剂 (冷冻干燥品) 适量

由茯苓菌得到的 β - 葡聚糖调制品 (茯苓聚糖, 参见实施例 1 - 1)

(E) 用于溶解标准 β - 葡聚糖试剂的蒸馏水 (不含 β - 葡聚糖)
2 . 0 m l

(F) 空白试验用蒸馏水 (不含 β - 葡聚糖) 2 . 0 m l

实施例 2 - 1 : 向 P R P 中添加回收内毒素试验 (前处理剂的溴化己二甲胺浓度)

将每 1 m l 血液添加 5 单位肝素而采集的健康人的血液 2 m l 以 150xg 离心分离 1 0 分钟, 得到富血小板的血浆 (P R P)。

在 190 μ l 这种 P R P 试样中添加 10 μ l 由大肠杆菌 0111:B4 株得到的内毒素调制品的水溶液 (2ng/ml), 充分混合后, 取 5 μ l 放入作为反应容器的不含内毒素的微板 (商品名 トキシペットプレート 96F, 生化学工业 (株) 出售) 中, 作为前处理剂, 在含有 0.1mol/l KOH、0.01mol/l 氯化钙 (CaCl_2)、0.1% (W/V) Triton X-100 的水溶液中添加溴化己二甲胺使之含量达到 0.01-0.5% (W/V), 所得水溶液混合液用来作为前处理剂添加 2 0 μ l, 在强制空气循环式微板读出装置 (商品名: ウェルリグー SK601, 生化学工业 (株) 出售) 内于 3 7 $^{\circ}\text{C}$ 保持 1 0 分钟。在 2 5 μ l 这样的被检液中添加内毒素特异的合成基质法萤试验试剂 (商品名: エンドスペシー ES-200, 生化学工业 (株) 出售) 100 μ l (0.1mol/l Tris-HCl 缓冲液, pH8.0, 5.6ml 中溶解), 在 3 7 $^{\circ}\text{C}$ 使之反应 3 0 分钟。以 492nm 作为对照, 测定 405nm 的吸光度, 每隔 1 5 秒对 2 波长测定, 算出每 1 分钟的吸光度变化率 (m Abs/分) (动力学法)。以使用 D W (蒸馏水) 代替 PRP 和前处理剂时的测定值作为对照, 算出每 1ml PRP 的内毒素浓度和内毒素添加回收率。另外, 同时使用试管作为前处理容器, 除了不含有溴化己二甲胺外使用与上述相同组成的前处理剂, 在 3 7 $^{\circ}\text{C}$ 的

恒温水槽中同样地进行前处理，取 $25\ \mu\text{l}$ 这样前处理过的被检液放入试管中，在恒温水槽中于 $37\ ^\circ\text{C}$ 下使之反应 30 分钟。依次加入 0.04% (W/V) 亚硝酸钠 ($1\ \text{mol/l}$ 盐酸溶液) $50\ \mu\text{l}$ ， 0.3% (W/V) 氨基磺酸铵 $50\ \mu\text{l}$ 以及 0.07% (W/V) N-1-萘基乙二胺二盐酸盐 (14% (W/V) N-甲基-2-吡咯烷酮溶液) $50\ \mu\text{l}$ ，进行重氮偶合反应，然后将其全部移入微板中，利用阱读出装置，以 630nm 为对照，测定 545nm 的吸光度，算出每 1ml PRP 的内毒素浓度和回收率（终馏点法）。表 7 中给出了以微板作为前处理和反应的容器，按动力学法测得的，在前处理剂中的溴化己二甲胺含量作种种改变时的内毒素添加回收率，同时示出了在同一条件下处理的无内毒素添加的 PRP 的测定结果（吸光度和内毒素换算值）。另外还示出了以试管作为前处理和反应的容器，采用不含溴化己二甲胺的前处理剂所获的结果。

表 7

溴化己二甲胺 (处理液中的 浓度：%)	无内毒素添加		添加回收率 (%)
	mAbs/分	内毒素换算值 (pg/ml)	
0	1 . 1	3 0	1 0 0
0 . 0 1	0 . 5	2 2	1 0 0
0 . 0 5	0 . 3	1 0	1 0 0
0 . 1	0	0	1 0 0
0 . 2	0	0	1 0 0
0 . 3	0 . 2	7	1 0 0
0 . 5	1 . 1	3 0	1 0 0
0 (*)	—	0	1 0 0

(*)：使用试管的终馏点法

由表 7 可知，内毒素添加回收率与是否添加溴化己二甲胺无关，给出的结果非常好，都是 100%，但是，在没有添加内毒素的血中，内毒浓度换算值随着溴化己二甲胺的浓度而产生很大变化（0 - 30 pg / ml）。以试管代替微板作为反应容器，采用终馏点法测定的结果是 0 pg / ml。采用微板的动力学法之所以产生这样显著的假阳性反应，其原因是，对于微板内的很少液量（反过来说也就是样品的浓度高），在进行这一反应时，检测样品所特有的非特异的混浊度上升，结果使得将这种混浊度上升作为有意义的变化率来测量和计算，而没有与依赖于内毒素的变化率区分开。作为抑制这种非特异的混浊度增加的添加剂，溴化己二甲胺是非常有效的，它通常，在前处理剂中以 0.05-0.3%，最好是以 0.1-0.2% 的浓度使用，在这样的条件下，可以准确而迅速地测出 PRP 中的内毒素的真实浓度，具有良好的再现性。

实施例 2 - 2：测定革兰氏阴性细菌感染症患者的 PRP 样品

试验对象为，健康人 30 例（内毒素含量： 2.42 ± 2.9 pg/ml）以及怀疑患有因革兰氏阴性细菌引起败血症的白血病等重症血液病及合并感染的肝、胆道疾病的患者 10 例。分别添加肝素，无菌采血，将所采集的血液在 4℃ 以 150xg 离心分离 10 分钟，得到 PRP 检测样品。取 5 μ l 放入トキシペツプレート 96 F 中，加入 20 μ l 由以下成分构成的前处理剂：0.1% Triton X-100、0.1 mol/l KOH、0.03 mol/l N - 二（羟乙基）甘氨酸（为了提高前处理剂的溶解性而添加的 Good 缓冲剂，（株）同仁化学研究所制造，一般名）、0.07% EIP（聚乙烯亚胺）、0.01 mol/l CaCl_2 以及 0.1% 溴化己二甲胺，然后在 37℃ 保持 10 分钟，作为被检液。

与实施例 2 - 1 的情况同样，采用动力学法测定内毒素。利用另外作成的标准曲线求出内毒素换算量，在表 8 中以该换算量给出本实施例的结果。

表 8

样 品	内 毒 素 (pg/ml)
健康人 (30例)	2 . 4 2 ± 2 . 9
患 者	
1	2 5 . 5
2	5 4 . 2
3	1 7 0 . 3
4	1 8 . 5
5	4 2 8 . 5
6	2 0 . 0
7	1 2 7 . 4
8	3 2 . 1
9	3 1 . 5
10	2 5 9 . 7

表 8 中的患者 1 - 10 是通过血培、白血球数、其它检查结果以及发烧等临床症状诊断为怀疑患有革兰氏阴性细菌败血症的病例，采用本发明的方法，所有这些病例均检测出内毒素。另外，使用 PPP 代替上述 PRP 作为检测样品，也得到了同样的结果。

本发明的方法，作为迅速诊断那些用常规检查方法难以确诊的革兰氏阴性细菌败血症的有效方法而受到高度评价，这是可以理解的。

实施例 2 - 3：测定内毒素用显色合成基质法药盒

制备由下列试剂成分构成的、测定内毒素用显色合成基质法药盒（供 100 份样品用）。

（A）前处理剂 2.0 ml

A 液：0.2 mol/l KOH、0.2% 溴化己二甲胺

B 液：0.2% Triton X-100、0.14% 聚乙烯亚胺、0.02 mol/l
CaCl₂、0.06 mol/l N - 二（羟乙基）甘氨酸

使用时将 A 液与 B 液混合。

（B）C 因子系反应试剂（冷冻干燥品）适量

含有按照 Obayashi, T. 等人的方法（见上文）由来源于 *Tachypleus tridentatus* 的溶胞产物调制而成的 C 因子系成分和显色合成基质（Boc-Leu-Gly-Arg-pNA）的冷冻干燥制品

（C）C 因子系反应试剂溶解·反应用缓冲液 5.0ml 0.2 mol/l
Tris-HCl 缓冲液（pH 8.0）

（D）标准内毒素试剂（冷冻干燥品）适量

由大肠杆菌 0111:B4 株得来的内毒素调制品

（E）标准内毒素试剂溶解用蒸馏水（不含有内毒素） 2.0ml

（F）空白试验用蒸馏水（不含内毒素） 2.0ml

(G) 0.2 mol/l Tris-HCl 缓冲液调制用蒸馏水 (不含内毒素)
2.0ml

实施例 3 - 1 : 向 PRP 中添加回收 β - 葡聚糖试验 (前处理剂的溴化己二甲胺浓度)

在 190 μ l 采用与实施例 2 - 1 同样方法调制的 PRP 试样中, 加入 10 μ l 由茯苓菌 (*Poria cocos*) 得来的 β - 葡聚糖调制品 (茯苓聚糖) 的水溶液 (4 ng/ml), 充分混合后, 取 5 μ l 放入不含 β - 葡聚糖的微板 (商品名 トキシペッププレート 96F, 生化学工业 (株) 出售) 中, 添加 20 μ l 前处理液, 该前处理液是在含有 0.1 mol/l KOH 和 0.3 mol/l KCl 的水溶液中添加溴化己二甲胺使之达到 0.01-0.5 % (W/V) 而形成的水溶液混合液, 在强制空气循环式微板读出装置 (高品名 ウェルリーダー-SK601, 生化学工业 (株) 出售) 内于 37 $^{\circ}$ C 保持 10 分钟。

按下面所述的方法测定被检液中的 β - 葡聚糖量: 在 25 μ l 被检液中添加 100 μ l 用 0.1 mol/l HEPES 缓冲液 (pH 7.6) 溶解的 G 试剂 (含有 G 因子系成分和显色合成基质、Boc-Leu-Gly-Arg-pNA 的用于测定 β - 葡聚糖的显色合成基质法试剂冷冻干燥品; 参见实施例 1 - 1), 在 37 $^{\circ}$ C 使之反应 30 分钟。以 492nm 为对照, 间隔 15 秒钟对 2 波长测光, 测定 405nm 的吸光度, 算出每 1 分钟的吸光度变化率 (mAbs/分) (动力学法)。以使用 DW 代替 PRP 和前处理剂时的测定值作为对照, 算出每 1ml PRP 的 β - 葡聚糖浓度和 β - 葡聚糖添加回收率。另外, 用试管作为前处理容器, 使用一种除了不含溴化己二甲胺之外具有与上面所述相同组成的前处理剂在 37 $^{\circ}$ C 恒温水槽中同样进行前处理, 取 25 μ l 经过这样处理的被检液放入试

管中，在恒温水槽中于 37℃ 下使其反应 30 分钟。依次加入 0.04% (W/V) 亚硝酸钠 (1 mol/l 盐酸溶液) 50 μ l、0.3% (W/V) 氨基磺酸铵 50 μ l 和 0.07% (W/V) N-1-萘基乙二胺二盐酸盐 (14% (W/V) N-甲基-2-吡咯烷酮溶液) 50 μ l，进行重氮偶合反应，然后将其全部移到微板中，在阱读出装置中以 630nm 为对照，测定 545nm 的吸光度，算出每 1ml PRP 的 β -葡聚糖浓度和回收率 (终馏点法)。在表 9 中给出了以微板作为前处理和反应的容器，按动力学法测得的，在前处理剂中的溴化二甲胺含量作种种改变时的 β -葡聚糖添加回收率，同时示出了在同一条件下处理的无 β -葡聚糖添加的 PRP 的测定结果 (吸光度和 β -葡聚糖换算值)。另外，还给出了使用试管作前处理和反应容器、不含有溴化己二甲胺的混合液的结果。

表 9

溴化己二甲胺 (处理液中的 浓度：%)	无 β -葡聚糖添加		添加回收率 (%)
	mAbs/分	β -葡聚糖换算值 (pg/ml)	
0	1 . 8	3 0	1 0 0
0 . 0 1	0 . 9	1 5	1 0 0
0 . 0 5	0 . 9	1 4	1 0 0
0 . 1	0 . 7	1 0	1 0 0
0 . 2	0 . 8	1 1	1 0 0
0 . 3	0 . 9	1 3	1 0 0
0 . 5	1 . 3	1 9	1 0 0
0 (*)	—	1 0	1 0 0

(*)：使用试管的终馏点法

由表 9 可以看出， β - 葡聚糖添加回收率与是否添加溴化己二甲胺无关，所给出的结果非常好，都是 100%，但是，没有添加 β - 葡聚糖的血中 β - 葡聚糖浓度换算值随溴化己二甲胺的浓度而有很大的变动 (10-30 pg/ml)。根据使用试管代替微板作反应容器的测定结果，本来应当是 10 pg/ml，之所以产生这样明显的假阳性反应，是因为与内毒素的情况一样，在反应时检验样品特有的非特异的混浊度上升，结果使得将该混浊度上升作为有意义的变化率来测量和计算，而没有将其与依赖于 β - 葡聚糖的变化率区分开来。与实施例 2 - 1 一样，溴化己二甲胺作为抑制这种非特异的混浊度上升的添加剂是非常有效的，通常，在前处理中以 0.05-0.3% 浓度，最好是以 0.1-0.2% 浓度使用。

实施例 3 - 2：测定真菌感染症患者的 PRP 样品

按实施例 2 - 1 所述同样的方法，从被怀疑为真菌感染症的患者身上采血，调制成 PRP 检验样品。取 5 μ l 放入トキシペットプレート 96 F 的各阱中，再加入 20 μ l 由 0.1 mol/l NaOH、0.3 mol/l NaCl 及 0.2% 溴化己二甲胺组成的混合混液（前处理剂），在 37 $^{\circ}$ C 加温保持 10 分钟，作为被检液。然后按与实施例 3 - 1 同样的方法使其与 G 试剂反应，自动测定吸光度变化率。用与实施例 3 - 1 相同已知量的由茯苓菌得来的 β - 葡聚糖作为标准试剂，利用另外作成标准曲线换算上述被检液中的 β - 葡聚糖含量，结果列于表 10 中。

表 1 0 预测为潜伏性真菌感染的血浆 (PRP) 中 β -葡聚糖浓度

NO	疾 病	PRP β -葡聚糖	血 培	临 床 症 状	结 果
1	ALL	403.0 pg/ml	(+)	白色念珠菌分离	死
2	AML	30.5	(+)	热带念珠菌分离	死
3	AIHA	650.4	(+)	新型隐球菌分离	生
4	ALL	62.5	(-)	全身性曲霉病(尸体解剖)	死
5	ALL	95.0	(-)	使用咪康唑后有改善	生
6	AML	47.2	(-)	使用咪康唑后有改善	生

ALL: 急性淋巴细胞白血病; MAL: 急性骨髓性白血病; AIHA: 自身免疫性溶血性贫血

如表 10 中所示，在所有病例 (No. 1 - No. 6) 中都检测出高浓度的 β - 葡聚糖 (健康人的 β - 葡聚糖含量 (18 例) : 8.0 ± 4.0 pg/ml, 其中的 3 例 (No. 1 - No. 3), 在血培中分别检查出白色念珠菌 (*Candida albicans*), 热带念珠菌 (*Candida tropicalis*) 和新型隐球菌 (*Cryptococcus neoformans*), 有 1 例 (No. 4) 血培是阴性的, 但死亡后尸体解剖进行组织病理学检查, 检查出烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。剩下的 2 例 (No. 5、No. 6), 根据临床症状、经过、药物敏感性等怀疑是真菌感染, 但血培是阴性的, 经过用抗真菌剂 (咪康唑) 给药, 临床观察有显著改善, 因此认为是真菌感染。另外, 用 PPP 代替上述 PRP 作为检查样品, 也得到同样的结果。

由此可知, 用本发明的前处理剂处理真菌感染症患者的血浆样品 (PRP、PPP), 然后测 β - 葡聚糖, 可以快速而准确地诊断真菌感染症, 尤其是那些用普通检查方法很难诊断的潜伏性真菌感染症。

实施例 3 - 3 : 测定真菌感染症患者血清样品

按照与实施例 3 - 1 同样的方法, 从被怀疑为真菌感染症的患者身上采血, 调制成检查样品。取 $5 \mu\text{l}$ 放入トキシペツプレート 96F 的各小阱中, 加入 $20 \mu\text{l}$ 由 0.1 mol/l KOH 、 0.3 mol/l NaCl 和 0.1% 溴化己二甲胺构成的混合液 (前处理液), 在 37°C 加温保持 10 分钟, 用来作为被检液。然后用与实施例 3 - 1 同样的方法使其与 G 试剂反应, 自动测定吸光度的变化率。用与实施例 3 - 1 相同已知量的由茯苓菌得到的 β - 葡聚糖作为标准试剂, 利用另外作成的标准曲线换算上述被检液中的 β - 葡聚糖含量, 结果示于表 11 中。

表 1 1 预测为潜伏性真菌感染症的血清中 β -葡聚糖浓度

NO	疾 病	血清 β -葡聚糖	血 培	临 床 症 状	结 果
1	MM	475.0 pg/ml	(+)	高里氏念珠菌分离	存 生
2	APML	104.8	(+)	克柔氏念珠菌分离	存 生
3	APML	158.1	(-)	全身性曲霉病(尸体解剖)	亡 死
4	AML	750.5	(-)	使用フルコザール后有所改善	存 生
5	ALL	345.0	(-)	使用两性霉素B后有所改善	存 生

MM: 多发性髓肿, APML: 急性前骨髓球形白血病, AML: 急性髓性白血病,

ALL: 急性淋巴性白血病

如表 1 1 中所示，在所有病例 (No. 1 - No. 5) 中都检查出高浓度的 β - 葡聚糖 (健康人的 β - 葡聚糖含量 (18 例) : 7.2 ± 1.9 pg/ml)，其中有 2 例 (No.1、No.2)，血培中分别检查出高里氏念珠菌 (*Candida guilliermoidi*) 和克柔氏念珠菌 (*Candida krusei*)，有 1 例 (No.3) 血培是阴性的，但病人死亡后尸体解剖进行组织病理学检查，发现了烟曲霉 (*Aspergillus fumigatus*)。剩下 2 例 (No.4 和 No.5)，根据临床症状、经过、药物敏感性等怀疑是真菌感染，但血培是阴性的，使用抗真菌药 (两性霉素 B、フルコナゾール) 后临床观察有明显改善，因此认为是真菌感染症。

由此可知，用本发明的前处理剂处理真菌感染症患者的血清，然后测定 β - 葡聚糖，可以快速而准确地诊断真菌感染症，特别是那些用常规检查方法很难确诊的潜伏性真菌感染症。

实施例 3 - 4 : 用于测定 β - 葡聚糖的凝胶化法 (比浊法) 药盒
制备由下列试剂成分构成的、用于测定 β - 葡聚糖的凝胶化法 (比浊法) 药盒 (供 50 个样品用)。

(A) 前处理剂 1.0ml

0.1 mol/l KOH - 0.05 mol/l KCl - 0.2% 溴化己二甲胺
水溶液

(B) G 因子系反应试剂 (冷冻干燥制品) 适量

在由鲎·大眼蚤属得来的市售溶胞产物 (リムルス HSII-テストワコー，和光纯药工业 (株) 销售) 中添加 15% (W/V) 葡聚糖 (分子量 70000)，以 3500rpm 离心分离 10 分钟，然后与多孔性纤维素凝胶 (セルロファイン GC-200m，生化学工业 (株) 出售) 混合，用玻璃过滤器过滤，滤液经过冷冻干燥得到上述试剂。

(C) G 因子系反应试剂溶解 · 反应用缓冲液 5.0ml 0.1 mol/l
HEPES 缓冲液 (pH 7.6)

(D) 标准 β - 葡聚糖试剂 (冷冻干燥品) 适量

由茯苓菌得来的 β - 葡聚糖调制品 (茯苓聚糖)

(E) 用于溶解标准 β - 葡聚糖试剂的蒸馏水 (不含 β - 葡聚糖)
1.0ml

(F) 空白试验用蒸馏水 (不含 β - 葡聚糖) 1.0ml

实施例 3 - 5 : 用于测定 β - 葡聚糖的显色合成基质法药盒

制备由下列试剂成分构成的、用于测定 β - 葡聚糖的显色合成基质法药盒 (供 100 个样品用)。

(A) 前处理剂 2.0ml

0.1 mol/l KOH - 0.3 mol/l KCl - 0.1% 溴化己二甲胺
水溶液

(B) G 因子系反应试剂 (冷冻干燥品) 适量

在由 *Tachypleus tridentatus* 得来的溶胞产物中添加
15% (W/V) 葡聚糖 (分子量 40000), 以 3500 rpm 离心分离 10 分
钟, 然后使其通过孔径 $0.20\mu\text{m}$ 的尼龙膜过滤器 (ナルゲンシリ
ンフィルター, 直径 25mm, ナルジェ社制造), 将通过液添加到 M S
混合液 (含有 0.8M 氯化镁和 6mM Boc - Len - Gly - Arg - pNA)
中, 经冷冻干燥制成。

(C) G 因子系反应试剂溶解 · 反应用缓冲液 5.0ml 0.2 mol/l
HEPES 缓冲液 (pH 7.6)

(D) 标准 β - 葡聚糖试剂 (冷冻干燥品) 适量

由茯苓菌得来的 β - 葡聚糖调制品 (茯苓聚糖)

(参见实施例 3 - 4)

(E) 用于溶解标准 β - 葡聚糖试剂的蒸馏水 (不含 β - 葡聚糖)
2.0ml

(F) 空白试验用蒸馏水 (不含 β - 葡聚糖) 2.0ml

(G) 用于调制 0.1 mol/l HEPES 缓冲液的蒸馏水 (不含 β -
葡聚糖) 5.0ml

实施例 4 - 1 : 测定感染症患者的 PRP 样品

试验对象是, 健康人 18 例, 被怀疑为因革兰氏阴性细菌引起败血症的白血病等重症血液病及合并感染的肝、胆道疾病患者 10 例, 以及被怀疑为真菌病的患者 6 例。分别添加肝素然后无菌采血, 将所采集的血液在 4℃ 以 150xg 离心分离 10 分钟, 得到 PRP 样品。取其中 5 μ l 放入トキシペットプレート 96F 中, 加入 20 μ l 由 0.1 mol/l KOH 和 0.1% 溴化己二甲胺构成的混合液, 在 37℃ 保持 10 分钟, 用来作为被检液。

内毒素的测定, 与实施例 2 - 1 同样, 使用エントスペーシー采用动力学法进行, 用已知量的内毒素 (由大肠杆菌 0111:B4 株得来) 作为标准试剂, 利用另外作成的标准曲线算出被检液中内毒素的含量。

β - 葡聚糖的测定, 与实施例 3 - 1 同样, 使用 G 试剂采用动力学法进行, 用已知量的 β - 葡聚糖调制品 (由茯苓菌得来的茯苓聚糖) 作为标准试剂, 利用另外作成的标准曲线算出被检液中的 β - 葡聚糖含量, 结果一并示于表 12 中。

表 1 2

样 品		内 毒 素 (pg/ml)
患者	1	2 2 . 7
	2	5 0 . 8
	3	1 7 0 . 0
	4	1 5 . 9
	5	4 1 6 . 8
	6	1 7 . 5
	7	1 1 3 . 3
	8	3 0 . 9
	9	3 0 . 5
	1 0	2 4 2 . 8
样 品		β - 葡聚糖 (pg/ml)
患者	1 1	4 0 2 . 5
	1 2	2 7 . 6
	1 3	6 3 5 . 2
	1 4	6 0 . 7
	1 5	8 8 . 6
	1 6	4 5 . 7

表 1 2 中的患者 NO. 1-10 是怀疑患有革兰氏阴性细菌败血症的病例，所有这些病例用本发明的方法都检测出高浓度的内毒素（健康人的内毒素含量（18 例）： 2.0 ± 2.5 pg/ml）。另外，用 PPP 代替上述 PRP 作为检查样品也得到了同样的结果。

表 1 2 中的患者 No. 11-16 是被怀疑为真菌感染症患者的病例，但是用其它的检查方法对所有这些病例都不能确诊。使用上述方法，对于所有这些病例都检测出高浓度的 β - 葡聚糖（健康人的 β - 葡聚糖含量（18 例）： 7.0 ± 2.5 pg/ml）。

另外，使用 PPP 代替上述 PRP 作为检测样品也得到了同样的结果。

由以上结果可知，使用同一前处理剂处理过的检测样品可以分别测定内毒素和 β - 葡聚糖。

本发明提供了可以有效地对适用各种生物化学反应的血液等活体试样进行前处理的前处理剂，特别是在测定来源于含有 G 因子系反应干扰因子的血浆、血清等活体的试样中的 β - 葡聚糖时，或者测定含有 C 因子系反应干扰因子的该试样中的内毒素时，用以碱金属氢氧化物和溴化己二甲胺化合物作为必要成分的前处理剂对上述试样进行处理，可以十分简便地完全消除掉上述反应干扰因子对反应系的影响，同时还可以抑制处理后的被检液的混浊度上升。另外，在处理之后不需要分离去除变性析出物，因此可以缩短整个操作过程。再有，本发明的测定方法可以在微板中采用动力学法自动测定来源于活体的试样中的内毒素或 β - 葡聚糖，能简便、迅速而高精度地得到再现性很高的结果。在临床检查中应用本发明的测定法，可以迅速而准确地诊断那些采用常规检查方法很难确诊的潜伏性真菌感染病及革兰氏阴性细

菌感染症。

在测定由活体得来的试料中的 β - 葡聚糖时，如果用以碱金属氢氧化物为必要成分的前处理剂来处理该试样，可以完全消除 G 因子系反应干扰因子对 G 因子系反应的影响。

图 1 所示为鲎·变形细胞的溶胞产物的 (1 $\rightarrow$ 3) - β - D - 葡聚糖和内毒素的级联反应的反应机制示意图。

说明书附图

图 1

