



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1755348 B

(45) 授权公告日 2010.12.01

(21) 申请号 200510106963.0

(22) 申请日 2005.09.29

(30) 优先权数据

2004-289097 2004.09.30 JP

(73) 专利权人 希森美康株式会社

地址 日本兵库县

(72) 发明人 河岛康之 酒井康裕

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专
利商标事务所 11038

代理人 陈昕

(51) Int. Cl.

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 21/75 (2006.01)

G01N 33/487 (2006.01)

(56) 对比文件

JP 特开平 9-329596 A, 1997.12.22, 全文.

JP 特开平 8-240520 A, 1996.09.17, 全文.

CN 1123769 C, 2003.10.08, 全文.

US 2002/0115118 A1, 2002.08.22, 全文.

WO 03/095974 A2, 2003.11.20, 全文.

EP 1413889 A2, 2004.04.28, 说明书第 0002

段、第 0009 段、第 0099 段至第 0110 段及图 1、16 和 17.

马丽等. 酵母菌对 UF-100 全自动尿沉渣分析仪红细胞检测结果的影响. 上海医学检验杂志 16 3. 2001, 16 (3), 161-162.

RUSSELL A D. Similarities and differences in the responses of microorganisms to biocides. Journal of antimicrobial chemotherapy 52 5. 2003, 52 (5), 750-763.

KING M A. Detection of dead cells and measurement of cell killing by flow cytometry. Journal of Immunological Methods 243. 2000, 243 155-166.

审查员 冯志华

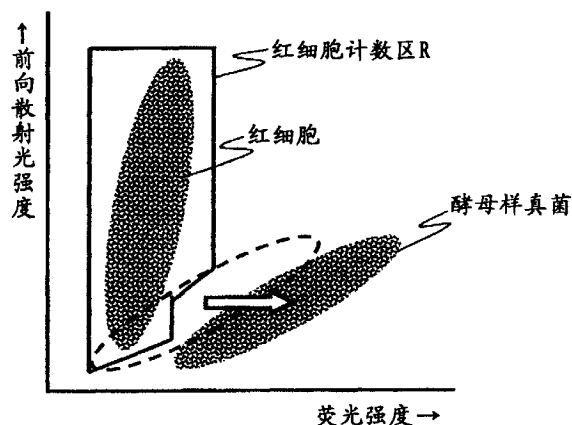
权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 7 页

(54) 发明名称

检体中粒子分析方法、分析装置及分析试剂

(57) 摘要

本发明的课题是对于即使出现了酵母样真菌的检体,也能够更有效、精度更好地判别出检体中的红细胞。本发明提供了一种检体中粒子分析方法,包括样品制备步骤、检测步骤、判别步骤,样品制备步骤:实施不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的处理及采用荧光色素的荧光染色处理,制备样品液;检测步骤:由样品液中的粒子检测反映粒子大小的第一信息和反映粒子荧光染色程度的第二信息;判别步骤:根据检出的第一、第二信息,判别红细胞。



1. 检体中粒子分析方法,包括样品制备步骤、检测步骤、判别步骤,

样品制备步骤:对认为含有红细胞和酵母样真菌的检体,使用含有选自苊醇、 β -苯乙醇、苯酚、1-苯氧基-2-丙醇、2-苯氧基乙醇、乙酸苯酯、2-氨基苯并噻唑及苯并噻唑的化合物的试剂,实施不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的处理和采用荧光色素的荧光染色处理,制备样品液;

检测步骤:从上述样品液中的粒子检测反映粒子大小的第一信息和反映粒子荧光染色程度的第二信息;

判别步骤:根据检出的第一、第二信息,判别红细胞。

2. 权利要求1所述的检体中粒子分析方法,所述化合物为2-苯氧基乙醇、2-氨基苯并噻唑或苯并噻唑。

3. 权利要求1所述的检体中粒子分析方法,所述荧光染色处理在pH为7.0-9.0的环境下进行。

4. 权利要求1所述的检体中粒子分析方法,所述第一信息为被光照射的粒子发出的散射光的强度。

5. 权利要求1所述的检体中粒子分析方法,所述第二信息为被光照射的粒子发出的荧光的强度。

6. 权利要求1所述的检体中粒子分析方法,所述检体是尿。

7. 检体中粒子分析装置,包括样品制备部、检测部、控制部,样品制备部包括检体放置部、第一试剂放置部、第二试剂放置部、混合部、供给结构,

检体放置部:放置被认为含有红细胞和酵母样真菌的检体;

第一试剂放置部:放置含有选自苊醇、 β -苯乙醇、苯酚、1-苯氧基-2-丙醇、2-苯氧基乙醇、乙酸苯酯、2-氨基苯并噻唑及苯并噻唑的化合物作为不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的物质的第一试剂;

第二试剂放置部:放置含有荧光色素的第二试剂;

混合部:混合前述检体和第一、二试剂以制备样品液;

供给结构:向前述混合部供给放置在第一试剂放置部中的第一试剂和放置在第二试剂放置部中的第二试剂;

检测部:由上述样品液中的粒子检测反映粒子大小的第一信息和反映粒子荧光染色程度的第二信息;

控制部:根据检出的第一、第二信息,判别红细胞。

8. 权利要求7所述的检体中粒子分析装置,所述检测部具备流动室、光源、散射光受光部、及荧光受光部:

流动室:供样品液流动;

光源:向在流动室中流动的样品液照射光;

散射光受光部:检测被光照射的样品液中的粒子发出的散射光作为前述第一信息;

荧光受光部:检测被光照射的样品液中的粒子发出的荧光作为前述第二信息。

9. 权利要求8所述的检体中粒子分析装置,所述散射光为前向散射光。

10. 权利要求7所述的检体中粒子分析装置,所述检体是尿。

11. 检体中粒子分析用试剂盒,包含第一试剂和第二试剂,

第一试剂:含有选自苕醇、 β -苯乙醇、苯酚、1-苯氧基-2-丙醇、2-苯氧基乙醇、乙酸苯酯、2-氨基苯并噻唑及苯并噻唑的化合物作为不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的物质;

第二试剂:含有荧光色素。

12. 权利要求 11 所述的检体中粒子分析用试剂盒,所述化合物为 2-苯氧基乙醇、2-氨基苯并噻唑或苯并噻唑。

13. 权利要求 11 所述的检体中粒子分析用试剂盒,所述第一试剂的 pH 在 7.0-9.0 的范围。

14. 权利要求 11 所述的检体中粒子分析用试剂盒,所述检体是尿。

15. 检体中粒子分析用试剂,含有选自苕醇、 β -苯乙醇、苯酚、1-苯氧基-2-丙醇、2-苯氧基乙醇、乙酸苯酯、2-氨基苯并噻唑及苯并噻唑的化合物作为不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的物质,和荧光色素。

检体中粒子分析方法、分析装置及分析试剂

技术领域

[0001] 本发明涉及分析尿或脑脊液、关节液等的检体中粒子的方法、装置及试剂,更详细地说,涉及更加提高检体中出现的红细胞和酵母样真菌等特定细菌的判别精度的检体中粒子的分析方法、装置及试剂。

背景技术

[0002] 分析尿中出现的红细胞、白细胞、上皮细胞、圆柱、细菌等的粒子对判别肾、泌尿类疾病至关重要。例如,红细胞对自肾脏的肾小球至尿道的通路中判定有无出血至关重要。此外,白细胞的增加表示有可能出现炎症、感染症。通过检查红细胞和圆柱的形态,还可以推断出其产生部位。

[0003] 目前,作为分析尿中出现粒子的方法,常用的是将实施了染色的尿检体置于载玻片或计算盘上用显微镜观察,计数视野内每种粒子的方法。但这种方法所谓的用手的方法,不仅会给实施者造成负担,也容易因实施者的熟练程度不同而产生计数结果的偏差。

[0004] 近年来,正在开发一种利用流式细胞术对尿中所含粒子自动分类而计数的技术。该方法是将对尿检体实施荧光染色而制成的样品液流经流动室,并向上述流动室照射激光。然后检测被激光照射的样品液中的粒子发出的前向散射光和荧光的强度。前向散射光强度反映该粒子的大小,粒子越大前向散射光的强度越大。荧光强度反映粒子的荧光染色程度。粒子的种类不同,前向散射光强度和荧光强度也各不相同,因此通过组合这些光学信息进行分析,可以判别其粒子的种类并计数。这种技术已在例如美国专利第 5325169 号说明书中公开。

[0005] 但在专利文献 1 的方法中,当作为较大型细菌的酵母样真菌含在尿检体中时,从这样粒子检出的前向散射光强度和荧光强度与从红细胞检出的程度相同,有时难以进行与红细胞的判别。

[0006] 针对这种问题有技术,例如,对出现红细胞和酵母样真菌的检体,获取添加用于使红细胞溶血的细胞膜损伤剂而制成样品液用流式细胞仪测定的结果,以及不添加细胞膜损伤剂而制成样品液用流式细胞仪测定的结果,通过比较两种结果来区别红细胞和酵母样真菌并计数。上述技术例如已在专利文献 2 中公开。

[0007] 专利文献 1:美国专利 5325169 号说明书

[0008] 专利文献 2:特开平 9-329596 号公报

发明内容

[0009] [发明要解决的课题]

[0010] 但专利文献 2 记载的方法,为分别测定使红细胞溶血的样品和不使红细胞溶血的样品,除了增加测定所必需的检体和试剂的量,还要增加测定必需的时间。

[0011] 本发明借鉴上述课题,提供一种能够更有效地判别检体中红细胞的检体中粒子的分析方法、分析装置和分析用试剂。并且,本发明提供一种能够精度更好地判别检体中红细

胞的检体中粒子的分析方法、分析装置及分析用试剂。

[0012] [解决课题的方法]

[0013] 本发明提供检体中粒子分析方法,包括样品制备步骤、检测步骤、判别步骤,

[0014] 样品制备步骤:对认为含有红细胞和酵母样真菌的检体实施不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的处理和采用荧光色素的荧光染色处理,制备样品液;

[0015] 检测步骤:从上述样品液中的粒子检测反映粒子大小的第一信息和反映粒子荧光染色程度的第二信息;

[0016] 判别步骤:根据检出的第一、第二信息,判别红细胞。

[0017] 此外,本发明提供检体中粒子分析装置,包括样品制备部、检测部、控制部,

[0018] 样品制备部包括检体放置部、第一试剂放置部、第二试剂放置部、混合部、供给结构,

[0019] 检体放置部:放置被认为含有红细胞和酵母样真菌的检体;

[0020] 第一试剂放置部:放置含有前述不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的物质的第一试剂;

[0021] 第二试剂放置部:放置含有荧光色素的第二试剂;

[0022] 混合部:混合前述检体和第一、二试剂以制备样品液;

[0023] 供给结构:向前述混合部供给放置在第一试剂放置部中的第一试剂和放置在第二试剂放置部中的第二试剂;

[0024] 检测部:由上述样品液中的粒子检测反映粒子大小的第一信息和反映粒子荧光染色程度的第二信息;

[0025] 控制部:根据检出的第一、第二信息,判别红细胞。

[0026] 此外,本发明提供包含第一试剂和第二试剂的检体中粒子分析用试剂盒,

[0027] 第一试剂:含有前述不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的物质;

[0028] 第二试剂:含有荧光色素。

[0029] 此外,本发明提供包含不使检体中红细胞溶血而损伤酵母样真菌细胞膜的物质和荧光色素的检体中粒子分析用试剂。

[0030] [发明效果]

[0031] 根据本发明,即使对出现酵母样真菌的检体,通过不使红细胞溶血且提高酵母样真菌的荧光染色性,使比以往更有效地判别红细胞成为可能。并且通过本发明,使得精度更好地判别红细胞成为可能。

附图说明

[0032] 图1 现有方法所得二维散点图的模式说明图。

[0033] 图2 是本发明一种实施方式所得二维散点图的模式说明图。

[0034] 图3 是本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置的外观说明图。

[0035] 图4 是本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置的内部构成说明图。

[0036] 图5 是本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置的样品制备部的说明图。

[0037] 图6 是本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置的检测部的说明图。

[0038] 图7 是本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置的控制部的说明图。

[0039] 图 8 是说明本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置的整体控制的流程图。

[0040] 图 9 是本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置的粒子信号分析的工作说明图。

[0041] 图 10 是说明由本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置执行的分析程序的各步骤的流程图。

[0042] 图 11 是说明由本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置作成的二维散点图的一例示意图。

[0043] 图 12 是本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置的液晶触摸屏中,显示分析结果的状态的示意图。

[0044] 图 13 是说明由本发明一种实施方式的尿中粒子分析装置作成的二维散点图的一例示意图。

[0045] 符号说明

[0046] 100 尿中粒子分析装置

[0047] 200 样品制备部

[0048] 221 检体放置部

[0049] 222 试剂放置部

[0050] 223 恒温器

[0051] 224 分流装置

[0052] 225 检体容器

[0053] 226 反应容器

[0054] 227 试剂容器

[0055] 231 试剂容器

[0056] 300 检测部

[0057] 301 流动室

[0058] 306 激光光源

[0059] 308 光电二极管

[0060] 311 光电倍增管

[0061] 400 控制部

[0062] 401 存储器

[0063] 402CPU

[0064] 403 信号处理电路

[0065] 404 动作控制电路

具体实施方式

[0066] 以下说明本发明的实施方式。但本发明并不限于该实施方式。在该实施方式中,通过将尿检体与指定试剂混合对尿中粒子实施荧光染色来制备样品液。然后由样品液中含有的各粒子检测反映粒子大小的信息及反映粒子染色程度的信息。再通过对这些信息进行分析,将红细胞与其他粒子相区别而计数。

[0067] 作为检测反映粒子大小的信息及反映粒子染色程度的信息的方法,例如可采用流式细胞术。而作为使上述方法自动进行的装置有流式细胞仪。流式细胞仪具有流动室、激

光光源、光电转换元件、信号处理电路,流动室用于使样品液流动;激光光源向流经流动室中的样品液照射激光;光电转换元件接受被激光照射的样品液中的粒子发出的散射光或荧光,再根据光强度将其转变为电信号;信号处理电路提取光电变换元件输出的每种粒子的电信号的信号强度。粒子发出的散射光的强度是反映粒子大小的信息,粒子发出的荧光的强度是反映粒子的荧光染色程度的信息。作为散射光,可举出向正对粒子入射的激光光轴的延长方向或其周边方向散射的光(前向散射光),或向与正对粒子入射的激光光轴的垂直方向或其周边方向散射的光(侧向散射光),或向其他角度散射的光。它们均可用作反映粒子大小的信息,但特别优选使用前向散射光。

[0068] 另外,检测反映粒子大小的信息也可以使用所谓的电阻式的检测器。电阻式检测器使粒子通过施加了电压的细孔时捕捉电阻变化作为电信号。其信号强度因粒子大小(体积)的不同而不同,因此可将之用作反映粒子大小的信息。

[0069] 若预先确定出红细胞具有的荧光强度及散射光强度(或通过电阻式检测器检测的每种粒子的电信号强度)的范围,通过判定从各粒子检出的信号是否在该范围内可判别该粒子是否是红细胞。

[0070] 作为用于与检体混合而制备样品液的试剂,可使用含有用于尿检体中粒子染色的荧光色素的染色液,以及含有用于对检体实施荧光染色处理的调整环境的物质的稀释液。通过将检体与稀释液及染色液混合,可制备出分析用样品液。

[0071] 尿检体中如果出现酵母样真菌,从酵母样真菌检出的前向散射光和荧光的强度会与从红细胞检出的强度重合,如前所述有时会给判别带来困难。为此,通过使稀释液中含有使酵母样真菌和红细胞之间产生荧光染色的染色性差异的物质,使从酵母样真菌和红细胞检出的荧光强度产生差异,可以提高红细胞的判别精度。作为这种物质,可举出损伤酵母样真菌的细胞膜并使细胞内部色素透过性亢进的物质。在不损伤酵母样真菌细胞膜的情况下,荧光色素仅与细胞膜表面结合,而细胞膜有损伤时,荧光色素不仅到达细胞膜表面,而且进入细胞内部与核酸等细胞内物质结合,提高了荧光染色性。此外,损伤酵母样真菌细胞膜并使细胞内部色素透过性亢进的物质必须是不损伤红细胞细胞膜的物质。这是因为红细胞细胞膜损伤时易产生溶血,使红细胞计数变得困难。作为满足上述条件的物质,可举出具有苯环的非离子性有机化合物。例如,可采用苕醇、 β -苯乙醇、苯酚、1-苯氧基-2-丙醇、2-苯氧基乙醇等芳香醇,或乙酸苯酯、或2-氨基苯并噻唑、苯并噻唑等苯并噻唑化合物。其中特别优选使用2-苯氧基乙醇。

[0072] 此外,为提高上述各物质的溶解性,也可以使稀释液中含有MTAB、DTAB、OTAB等表面活性剂。需要说明的是,上述表面活性剂的浓度高的话有可能使红细胞溶血,因此优选采用不使红细胞溶血程度的浓度。

[0073] 稀释液优选含有用于保持不使红细胞溶血的渗透压及pH范围内的缓冲能力的缓冲剂或渗透压调节剂。稀释液的pH期望为7.0-9.0,优选7.1-8.6,更优选7.1-7.8,进一步优选7.3-7.8的范围。这是因为稀释液的pH超过9.0变成强碱性使红细胞有可能溶血。此外,在酸性区域时,尿检体中的pH变化大则有可能使红细胞受到损伤或使尿中粒子的染色性整体降低。

[0074] 作为稀释液中含有的缓冲剂可使用现有公知的缓冲剂。例如可举出Tris及MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、

EPSPS、Tricine、Bicine、TAPS 这样的 Good 氏缓冲剂等。其中,优选 HEPES。浓度则根据所用缓冲剂的缓冲能力,使用稀释尿检体时使 pH 在一定范围内的浓度。通常为 20-500mM,优选 50-200mM。

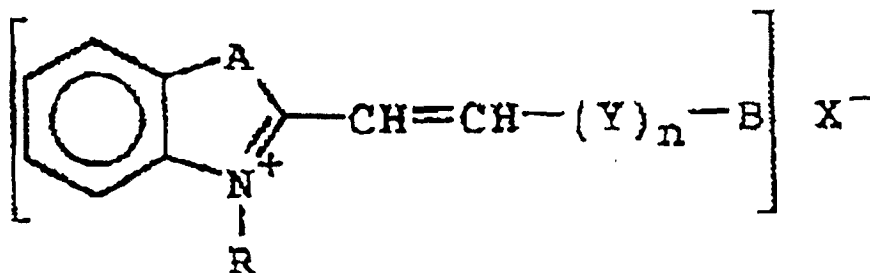
[0075] 作为稀释液中含有的渗透压调节剂,可使用无机盐类或丙酸盐等有机盐类、糖类等。无机盐类可使用氯化钠、氯化钾、溴化钠等。有机盐类中的丙酸盐可使用丙酸钠、丙酸钾、丙酸铵等。其它有机盐类可使用草酸盐、醋酸盐等。糖类可使用山梨糖醇、葡萄糖、甘露糖醇等。渗透压调节剂的添加以防止红细胞溶血和获得稳定的荧光强度为目的。尿的渗透压分布在 50-1300mOsm/kg 的宽范围。分析用试剂的渗透压过低时红细胞溶血提早进行,反之分析用试剂的渗透压过高时尿中粒子的损伤变大,因此渗透压优选 100-600mOsm/kg,更优选 150-500mOsm/kg。

[0076] 此外,为降低尿中出现的无结晶性盐类(例如磷酸铵、磷酸镁、碳酸钙)的影响,也可使稀释液中含有能使它们溶解的螯合剂。螯合剂只要是脱钙剂、脱镁剂就没有特殊的种类限定。例如,可举出 EDTA 盐、CyDTA、DHEG、DPTA-OH、EDDA、EDDP、GEDTA、HDTA、HIDA、甲基 EDTA (Methyl-EDTA)、NTA、NTP、NTP0、EDDPO 等。优选使用 EDTA 盐、CyDTA、GEDTA。浓度可在 0.05-5W/W% 的范围下使用,优选 0.1-1W/W%。需要说明的是,这里所谓的脱钙剂、脱镁剂是指与钙离子、镁离子结合,形成水溶性化合物的物质。

[0077] 用于使尿中所含粒子染色的荧光色素例如可使用以下化学式表示的稠合苯衍生物。

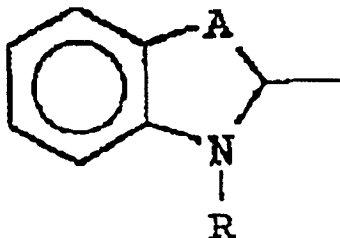
[0078] [化学式 1]

[0079]



[0080] [式中, A 表示 -O-, -S- 或 $-C(CH_3)_2-$, R 表示低级烷基, X 表示卤素, Y 表示 $-CH=$ 或 $-NH-$, n 表示 0 或 1, B 表示

[0081]

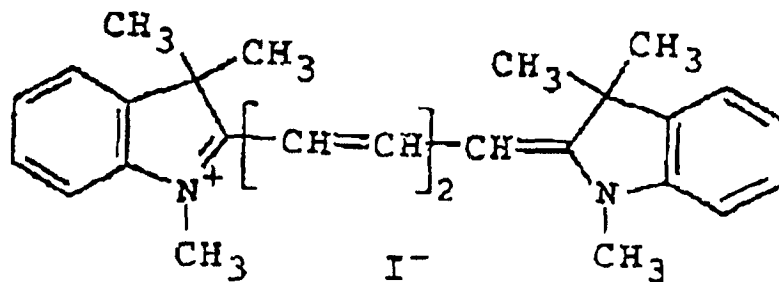


[0082] (式中, A 和 R 与上述同义)或被 2 个低级烷氧基或 1 个二低级烷基氨基(该低级烷基也可被氰基取代)取代的苯基。]上述低级烷基指碳原子数 1-6 的烷基,例如可举出甲基、乙基、丙基、丁基、戊基、己基等。X 表示的卤素可举出氟、氯、溴、碘。此外,在 B 中被 2 个低级烷氧基取代的苯基是指被 2 个 C_{1-3} 的烷氧基优选 C_{1-2} 的烷氧基例如被甲氧基、乙氧基取代的苯基。具体可举出 2,6-二甲氧基苯基、2,6-二乙氧基苯基。此外, B 中被二低级烷

基氨基（该低级烷基也可被氰基取代）取代的苯基是指被 C_{1-3} 的烷氨基优选 C_{1-2} 的烷氨基取代的苯基。这里该烷基也可被氰基取代。例如包括甲基、乙基、氰甲基、氰乙基等。优选的被二低级烷基氨基（该低级烷基也可被氰基取代）取代的苯基可举出 4-二甲氨基苯基、4-二乙氨基苯基、4-(氰乙基甲氨基)苯基等。这种稠合苯衍生物的具体例子可举出化学式 3。该色素由日本感光色素研究所（株）购入。

[0083] [化学式 3]

[0084]



[0085] 上述色素为聚甲炔类荧光色素，通过照射波长 633nm 的红色激光激发荧光。另外，染色液中含有的荧光色素除上述以外，还可根据激发荧光用的激光波长适当选择合适的荧光色素使用。

[0086] 荧光色素在水溶液中不稳定者居多，因此使荧光色素溶解于水溶性有机溶剂作为染色液使用可以提高荧光色素的保存稳定性。水溶性有机溶剂优选低级烷醇、低级烷二醇或低级烷二醇单低级烷基醚。例如可使用甲醇、乙醇、正丙醇、乙二醇、二甘醇、三甘醇、乙二醇单甲醚、乙二醇单乙醚等。其中优选乙二醇、二甘醇、三甘醇，考虑到对尿中粒子的影响或粘度等更优选乙二醇。荧光色素期望在分析用样品液中的最终浓度为 1-20ppm，优选 3-12ppm，更优选 3-9ppm 的范围使用。

[0087] 需要说明的是，染色液和稀释液并非要以分开的溶液使用，也可以使稀释液中含有荧光色素，以单一溶液的试剂使用。

[0088] 图 1 和图 2 是显示以通过流式细胞仪测定的含有红细胞和酵母样真菌的尿样品液中的各种粒子的前向散射光强度和荧光强度为坐标轴的二维散点图的模式图。取前向散射光强度为纵轴，取荧光强度为横轴，在该坐标空间中，越往上前向散射光强度越大，越往右荧光强度越大。红细胞计数区 R 是用于将具有其范围内的前向散射光强度和荧光强度的粒子视作红细胞来计数的区域，各个图中红细胞对应的点的集合在红细胞计数区 R 内出现。并且酵母样真菌对应的点的集合也示于各图中。

[0089] 图 1 表示由现有方法制备的尿样品液获得的二维散点图，酵母样真菌对应的点的一部分进入了红细胞计数区 R 内。此时，红细胞的计数结果比实际多，难以求出正确的红细胞数。

[0090] 另一方面，图 2 表示由本发明方法制备的尿样品液获得的二维散点图，可知酵母样真菌对应的点的出现位置与图 1 相比向右方移动（图 1 中酵母样真菌对应的点位置在图 2 中用虚线表示），与红细胞计数区 R 不重合。这是因为通过使酵母样真菌的染色性提高的物质的作用，由酵母样真菌检出的荧光强度变大的缘故。该物质不损伤红细胞的细胞膜，因而不会影响红细胞的检测和计数。

[0091] 实施例 1

[0092] 以下说明本发明的实施例。该实施例以人尿作为检体,通过应用流式细胞术的尿中粒子分析装置进行尿中红细胞的检测。

[0093] 检体

[0094] 本实施例中,以向含有红细胞的人尿中添加了浓度为 100 个/ μ l 左右的纯培养的酵母样真菌(光滑假丝酵母, *C. glabrata*)作为检体。

[0095] 试剂

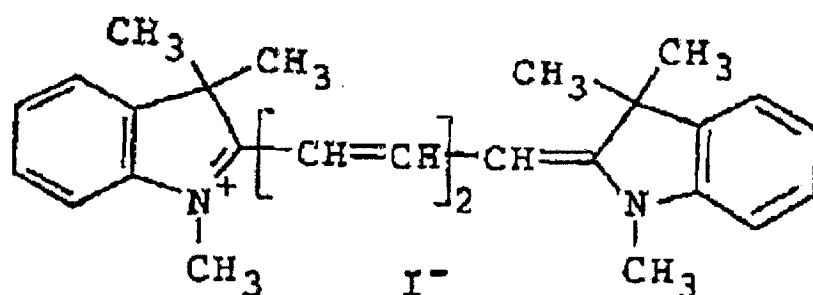
[0096] 尿中粒子分析装置所用的试剂采用以下组成的染色液和稀释液。

[0097] 染色液

[0098] 将下式表示的荧光色素溶解在乙二醇中使分析用样品的最终浓度达 6ppm,以此作为染色液。

[0099] [化学式 4]

[0100]



[0101] 稀释液

[0102] 将以下各物质溶解于蒸馏水中作为稀释液。

[0103] HEPES..... 11.9g/l

[0104] 丙酸钠..... 5.98g/l

[0105] EDTA-3K..... 4.0g/l

[0106] 2-苯氧基乙醇..... 7.5g/l

[0107] 氢氧化钠..... pH 达 7.0 的量

[0108] 尿中粒子分析装置

[0109] 图 3 表示本实施例所用尿中粒子分析装置 100 的外观图。装置前面具备进行各种设定输入和显示输出分析结果的液晶触摸屏 101、覆盖后述样品制备部 200 的盖板 102, 开关 103。图 4 表示尿中粒子分析装置 100 的内部构成。装置右侧空间具备负责装置运转和分析处理的控制部 400。装置左下空间具备用于检测样品液发出的信号的检测部 300。余下的空间具备用于制备样品液的样品制备部 200。

[0110] 以下分别说明样品制备部 200、检测部 300、控制部 400 各部。

[0111] 样品制备部 200 的构成

[0112] 图 5 是表示样品制备部 200 的说明图。样品制备部 200 的眼前右侧具备检体放置部 221, 眼前左侧具备试剂放置部 222, 内侧具备恒温器 223。并且还具备分流装置 224。工作者通过打开上述图 3 所示的盖板 102, 可以看见图 5 所示的样品制备部 200。在样品制备部 200 中, 检体放置部 221 配置有装入检体的检体容器 225。恒温器 223 配置有反应容器 226。此外, 试剂放置部 222 配置有装入染色液的试剂容器 227、装入稀释液的试剂容器 231。恒温器 223 的构成可以使装入反应容器 226 中的液体在保持规定温度的同时进行振

荡搅拌。分流装置 224 的构成使其前端可以吸入和排出指定量的液体,并且可通过未图示的驱动装置前后、上下、左右移动。样品容器 233 连接有后述的检测部 300 的流动室 301。

[0113] 检测部 300 的构成

[0114] 图 6 是表示检测部 300 构成的说明图。检测部 300 具备用于样品液流动的流动室 301。流动室 301 具备将被激光照射部分的内部流路被细小地汇集在一起的细孔部 302、将样品液朝着细孔部向上方喷射的喷嘴 303、鞘液供给口 304、排液口 305。此外,检测部 300 具备用于照射激光的激光光源 306。激光光源 306 是射出波长 633nm 的激光的红色半导体激光光源。半导体激光光源与氩离子激光光源为代表的以往的气体激光光源相比属小型激光光源,并且具有振荡寿命长的优点。检测部 300 还具备使激光光源 306 发出的激光向流动室 301 聚光的聚光器 307、接受被激光照射的样品液中的粒子发出的前向散射光并转变成电信号的光电二极管 308、将前向散射光向光电二极管 308 聚光的聚光镜 309 和针孔 310、接受被激光照射的样品液中的粒子发出的荧光并转变成电信号的光电倍增管 311、将荧光向光电倍增管 311 聚光的聚光镜 312、滤光片 313、针孔 314、使由光电二极管 308 和光电倍增管 311 输出的电信号增强而作为前方散射光信号和荧光信号向控制部 400 输出的放大器 315、316。

[0115] 控制部 400 的构成

[0116] 图 7 是表示控制部 400 的构成、及控制部 400 和装置各部的关系的框图。控制部 400 具备存储器 401、中央处理器 (CPU) 402、处理由检测部 300 送出信号的信号处理电路 403、控制尿中粒子分析装置 100 的装置各部运转的动作控制电路 404。存储器 401 存储涉及由样品液中含有的红细胞或细菌等粒子所得信号的分析的分析程序和控制装置各部工作的控制程序。并且存储通过信号处理电路 403 处理的数据和由分析程序得到的处理结果。CPU 402 执行由存储器 401 读出的分析程序和控制程序,处理、分析检测部 300 中由样品液检出的信号,并将用于控制装置各部工作的信号送往工作控制电路 404。由分析程序得到的分析结果由液晶触摸屏 101 输出。

[0117] 以下详细说明尿中粒子分析装置 100 的工作。图 8 是表示由控制程序进行尿中粒子分析装置 100 的整体控制的流程图。工作者按下开关 103,启动控制程序,依次执行步骤 S1(分析用样品液的制备)、步骤 S2(粒子信号的检测)、步骤 S3(粒子信号的分析)。由此控制样品制备部 200、检测部 300、控制部 400 的各部,自动执行尿中粒子分析装置 100 的一系列工作。以下说明上述步骤 S1、S2、S3 中的装置各部的工作。

[0118] 步骤 S1(分析用样品液的制备)

[0119] 步骤 S1 为控制样品制备部 200,执行分析用样品的制备。步骤 S1 中样品制备部 200 的工作用图 5 来说明。首先,分流装置 224 从试剂放置部 222 的试剂容器 231 吸入稀释液 $522\mu\text{L}$,再从配置在检体放置部 221 中的检体容器 225 吸入检体(人尿) $180\mu\text{L}$ 。然后将吸入的稀释液和检体分别注入配置在恒温器 223 中的反应容器 226。接着再用分流装置 224 从试剂放置部 222 的试剂容器 227 吸入染色液 $18\mu\text{L}$,注入反应容器 226 中。然后在恒温器 223 中在使装有检体、稀释液、染色液的反应容器 226 内的液温保持在 35°C 的状态下搅拌 10 秒,对稀释了的检体实施染色。如此制备的分析用样品液被吸入分流装置 224,供给样品容器 233。由样品容器 233 供给的分析用样品液在检测部 300 的流动室 301 中流动。

[0120] 步骤 S2(粒子信号的检测)

[0121] 步骤 S2 由检测部 300 控制,从分析用样品液的粒子中检测反映各粒子特征的信号。步骤 S2 中检测部 300 的工作用图 6 说明。当如前所述的样品容器 233 中供给样品液时,通过未图示的泵和阀的工作将样品液导向喷嘴 303。再将样品液从喷嘴 303 排出到流动室 301。与此同时,鞘液从未图示的鞘液容器通过鞘液供给口 304 供给流动室 301。由此,样品液在流动室 301 内被鞘液包围,并且被细孔部 302 汇集成细流。通过将样品流微细汇集,能够使样品液中含有的红细胞或细菌等粒子整齐排成一系列地流入细孔部 302。流经细孔部 302 的样品液,受到激光光源 306 射出的激光经聚光器 307 聚光后的照射。接受激光的样品液中的粒子发出的前向散射光通过聚光镜 309 聚光。接着通过针孔 310 的前向散射光被光电二极管 308 接受,并被光电转换为脉冲状前向散射光信号。接受激光的样品液中的粒子发出的荧光被聚光镜 312 聚光。然后通过滤光片 313、针孔 314 的荧光被光电倍增管 311 接受,并被光电转换为脉冲状荧光信号。前向散射光信号和荧光信号分别被放大器 315、316 放大,输送到控制部 400。

[0122] 步骤 S 3(粒子信号的分析)

[0123] 在步骤 S2 中通过检测部 300 检出的前向散射光信号和荧光信号在控制部 400 中按照图 9 所示的流程(步骤 S31~步骤 S34)进行分析。

[0124] 步骤 S31:首先将通过检测部 300 检出的前向散射光信号和荧光信号输入信号处理电路 403。该信号处理电路 403 分别处理前向散射光信号和荧光信号,将一系列信号波形中超出规定信号强度的部分视为检出了粒子的信号。然后提取出粒子每个的信号强度的峰值。以前向散射光信号的峰值作为前向散射光强度,以荧光信号的峰值作为荧光强度。

[0125] 步骤 S32:将上述步骤 S31 获得的前向散射光强度和荧光强度作为各个粒子的数据存储在存储器 401 中。

[0126] 步骤 S33:存储在存储器 401 中的各个粒子的前向散射光强度和荧光强度的数据通过预先存储在存储器 401 中的分析程序进行分析。由 CPU 402 读出而被执行的分析程序的各步骤用图 10 的流程图来说明。

[0127] 步骤 S331:从存储器 401 获得与分析用样品中的各粒子相对应的前向散射光强度和荧光强度的数据。

[0128] 步骤 S332:将前向散射光强度和荧光强度的数据在二维坐标空间中展开,作成以前向散射光强度和荧光强度为参数的二维散点图。

[0129] 步骤 S333:在步骤 S332 中作成的二维散点图中,设定红细胞计数区 R。红细胞计数区 R 是为将具有其范围的前向散射光强度和荧光强度的粒子视为红细胞来计数而设定的区域。红细胞计数区 R 的坐标数据被预先存储在存储器 401 中,在本步骤中通过分析程序被读出,应用于二维散点图。予以说明的是,红细胞计数区 R 的位置是根据由预先镜检等确定为红细胞的尿中粒子获得的前向散射光强度和荧光强度来设定的。

[0130] 上述步骤 S333 中作成的一例二维散点图如图 11 所示。该二维散点图取前向散射光强度为纵轴,取荧光强度为横轴,在该坐标空间中,越往前向散射光强度越大,越往右荧光强度越大。设定红细胞计数区 R。此外样品液中各粒子对应的点的集合在二维散点图上出现。

[0131] 步骤 S334:计数红细胞计数区 R 内出现的点数。然后根据该点数和分析用样品制备时检体的稀释倍率、以及流经流动室的样品液的体积,计算出每单位量检体中含有的红

细胞数。

[0132] 步骤 S335 :将上述作成的二维散点图 and 红细胞计数结果作为分析结果作成用于输出到液晶触摸屏 101 的数据,将作成的数据存储于存储器 401。以上是在步骤 S33 中通过分析程序执行的步骤。接着,进入图 9 所示流程的步骤 S34。

[0133] 步骤 S34 :将上述步骤 S335 中存储于存储器 401 的分析结果的数据输出到液晶触摸屏 101。图 12 是表示上述数据输出到液晶触摸屏 101 的状态的模式图。在液晶触摸屏 101 中显示二维散点图、红细胞数作为分析结果。

[0134] 分析结果的例子

[0135] 图 11 是将上述检体在尿中粒子分析装置 100 中分析得到的二维散点图。取前向散射光强度为纵轴,取荧光强度为横轴,在该坐标空间中,越往前向散射光强度越大,越往右荧光强度越大。红细胞计数区 R 是用于将具有其范围内的前向散射光强度和荧光强度的粒子视作红细胞来计数而设定的区域,红细胞对应的点的集合在此区域内出现。另一方面可知,酵母样真菌对应的点的集合不落在红细胞计数区 R 内。

[0136] 实施例 2

[0137] 作为实施例 1 的对照,在尿中粒子分析装置 100 中使用以下组成的稀释液分析尿检体。该稀释液与实施例 1 使用的稀释液相比,因不含有 2- 苯氧基乙醇而不同。所用检体、染色液、尿中粒子分析装置与实施例 1 相同。

[0138] 稀释液

[0139] 将以下各物质溶解于蒸馏水中作为稀释液。

[0140] HEPES..... 11.9g/l

[0141] 丙酸钠..... 5.98g/l

[0142] EDTA-3K..... 4.0g/l

[0143] 氢氧化钠..... pH 达 7.0 的量

[0144] 图 13 表示本实施例所得二维散点图。在本图中可知,酵母样真菌对应的点的集合的一部分进入红细胞计数区 R 内。比较本实施例 2 和上述实施例 1 可见,在上述实施例 1 中,2- 苯氧基乙醇作用于检体中的酵母样真菌而使色素的透过性亢进,酵母样真菌比红细胞具有更大的荧光强度。

[0145] 实施例 3

[0146] 改变实施例 1 所用稀释液中氢氧化钠的含量,制成 pH 不同的 4 种稀释液。包括实施例 1 所用稀释液在内,将它们作为 pH 分为 5 个不同等级的稀释液 1-5 (稀释液 1 :pH7.0、稀释液 2 :pH7.1、稀释液 3 :pH7.3、稀释液 4 :pH7.8、稀释液 5 :pH8.6)。使用上述稀释液进行尿检体分析。检体采用不含红细胞的人尿中添加浓度为 100 个 / μ l 左右的纯培养的酵母样真菌 (C. glabrata)。所用染色液、尿中粒子分析装置与实施例 1 相同。在使用各稀释液的分析中,算出酵母样真菌所获荧光信号强度的平均值。其结果示于下述表 1 中。予以说明的是,荧光强度的值是将图 11 或图 13 所示由尿中粒子分析装置 100 得到的二维散点图中横轴的最小值设为 0、最大值设为 255 时的相对值。

[0147] 表 1

所用稀释液	稀释液 1	稀释液 2	稀释液 3	稀释液 4	稀释液 5
稀释液的 pH	7.0	7.1	7.3	7.8	8.6
荧光强度平均值	84	85	86	94	98

[0148] 表 1 中, 稀释液的 pH 在 7.0–8.6 的中性至弱碱性的范围, 碱性越强, 酵母样真菌的荧光染色性越大。由此, 通过选择提高酵母样真菌的荧光染色性而使其与红细胞的荧光强度的差异变大的 pH, 使两者的判别更加准确。

[0149] 实施例 4

[0150] 在实施例 1 所用的稀释液中, 制备使用其它物质代替作为作用于酵母样真菌而使色素透过性亢进的物质而含有的 2- 苯氧基乙醇的稀释液。使用上述稀释液进行尿检体分析。所用检体、染色液、尿中粒子分析装置与实施例 3 相同。在使用各稀释液的分析中, 算出酵母样真菌所获荧光信号强度的平均值。代替 2- 苯氧基乙醇而含于稀释液中的物质及酵母样真菌所获得的荧光信号强度的平均值示于下述表 2 中。此外, 各物质在稀释液中的浓度均为 1.0wt%。荧光强度的值与实施例 3 相同, 是将图 11 或图 13 所示由尿中粒子分析装置 100 得到的二维散点图中横轴的最小值设为 0、最大值设为 255 时的相对值。

[0151] 表 2

物质名	荧光强度
β -苯乙醇	84
苊醇	73
苯酚	55
1-苯氧基-2-丙醇	103
乙酸苯酯	82
2-氨基苯并噻唑	70
苯并噻唑	92

[0152] 予以说明,根据本发明人等的实验,在使用不含有表2举出之类的使酵母样真菌的荧光染色性提高的物质的稀释液的场合,酵母样真菌所获得的荧光信号强度的平均值为20~50左右。因此可知,通过使稀释液中含有表2举出的各物质,可以大大提高酵母样真菌的荧光染色性。通过在荧光染色所用的荧光色素,或与其它试剂中的各物质的组合中,从

上述各物质中选择适当的物质使用,使酵母样真菌和红细胞的荧光强度的差异变大,两者的判别变得更加准确。

[0153] 上述各实施例中,对于提高酵母样真菌的荧光染色性以提高红细胞的判别精度来说,该技术即使在连串的葡萄球菌存在于检体而阻碍红细胞的判别的场合也能够应用。葡萄球菌的细胞一个一个均比红细胞小,故通常不会影响红细胞的判别,但葡萄球菌连成串时,外观尺寸变大,与红细胞的大小重合,有时难以正确判断。此时,通过使用上述已说明的试剂提高葡萄球菌的荧光染色性,能够精度更好地判别出红细胞。

[0154] 此外,上述实施例中采用尿作为检体,但本发明并不限于此。例如也可以采用以下物质作为检体:脑脊液、关节液、淋巴液、胸水、腹水、咯痰、咽喉粘液或鼻腔粘液等粘液、气管洗涤液等洗涤液、尿道分泌物或阴道分泌物等分泌物、创口浸出液或脓浸出液等浸出液。

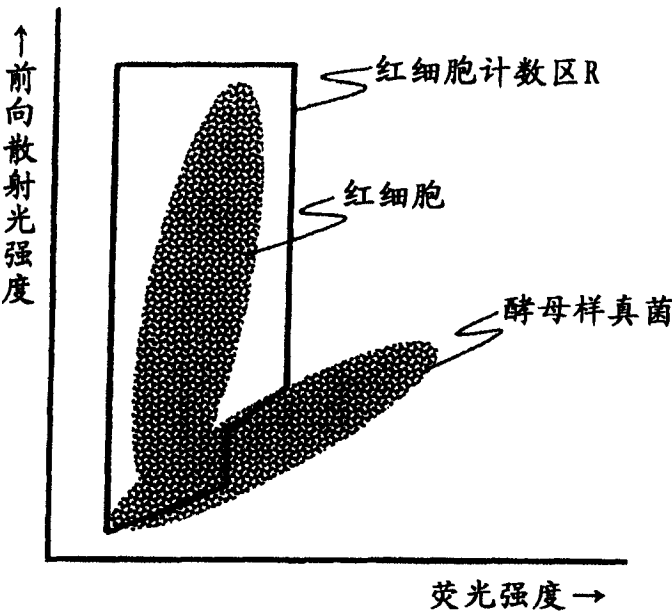


图 1

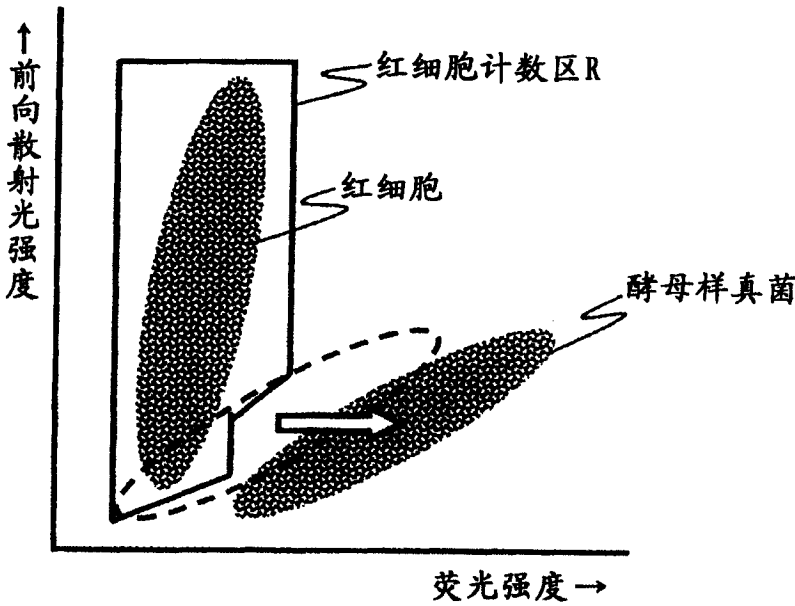


图 2

图 3

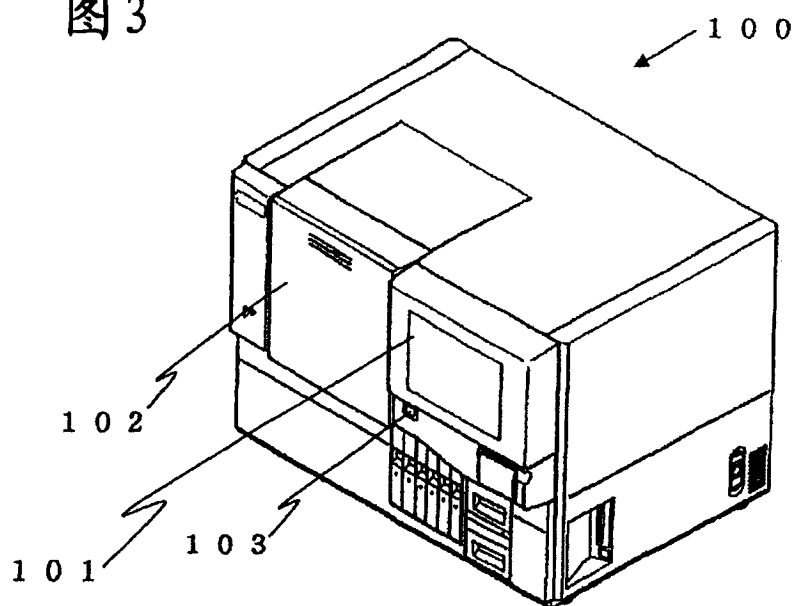


图 4

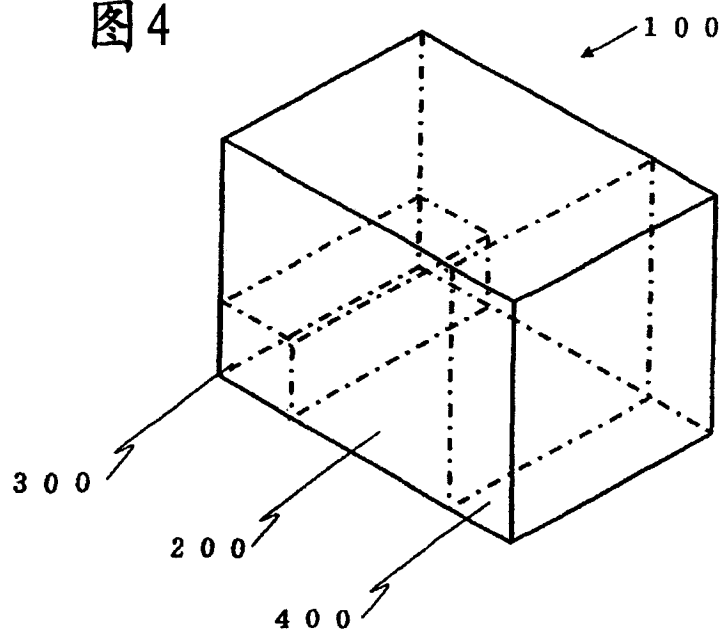
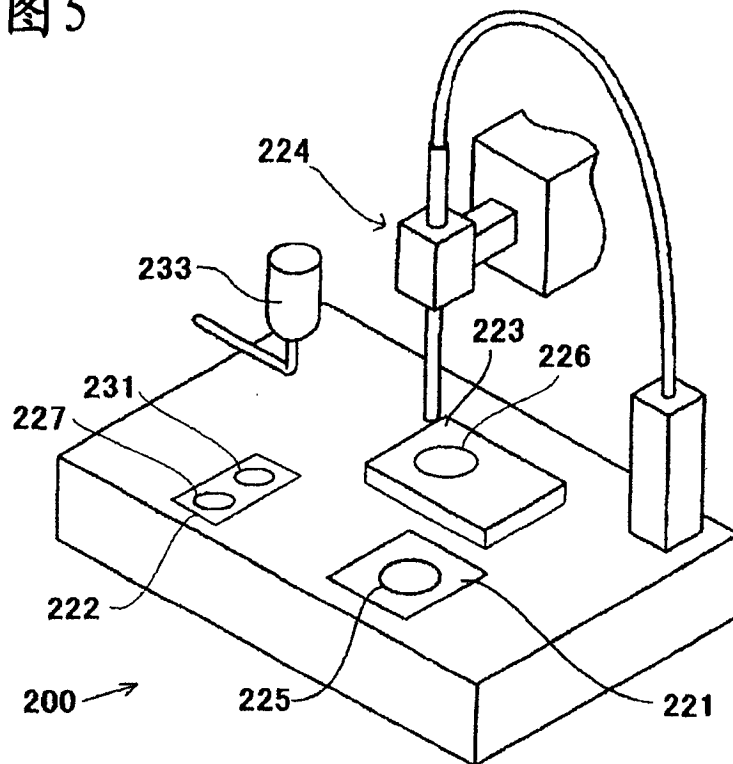


图 5



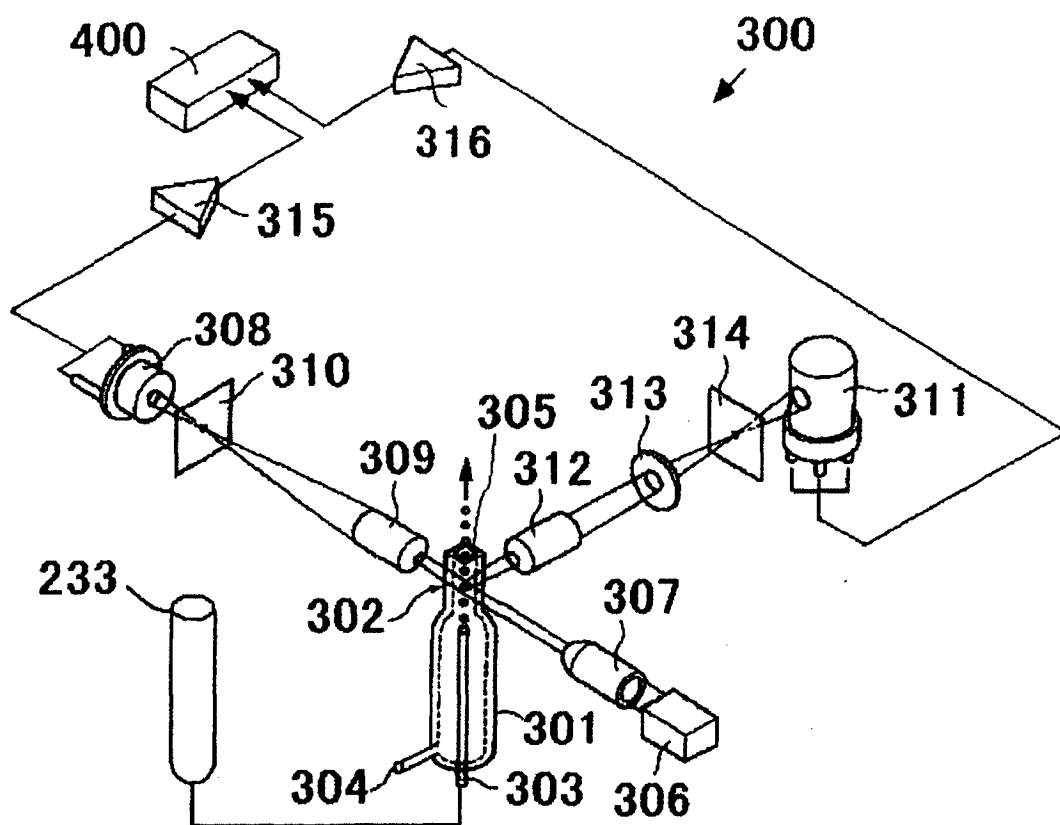


图 6

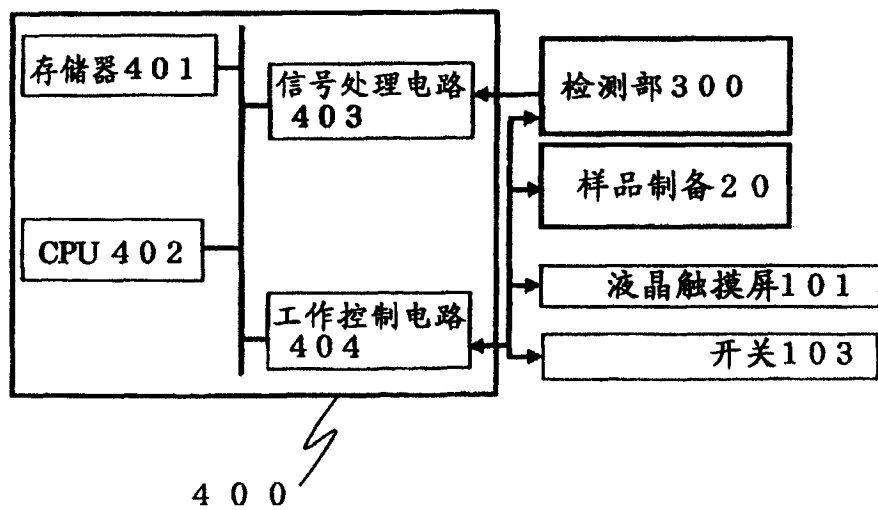


图 7

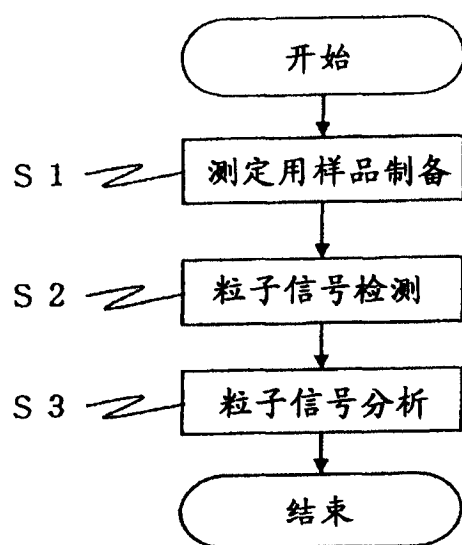


图 8

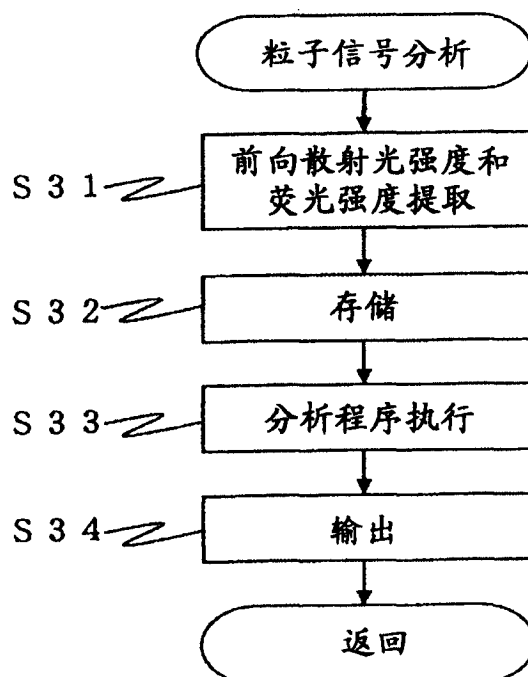


图 9

图 10

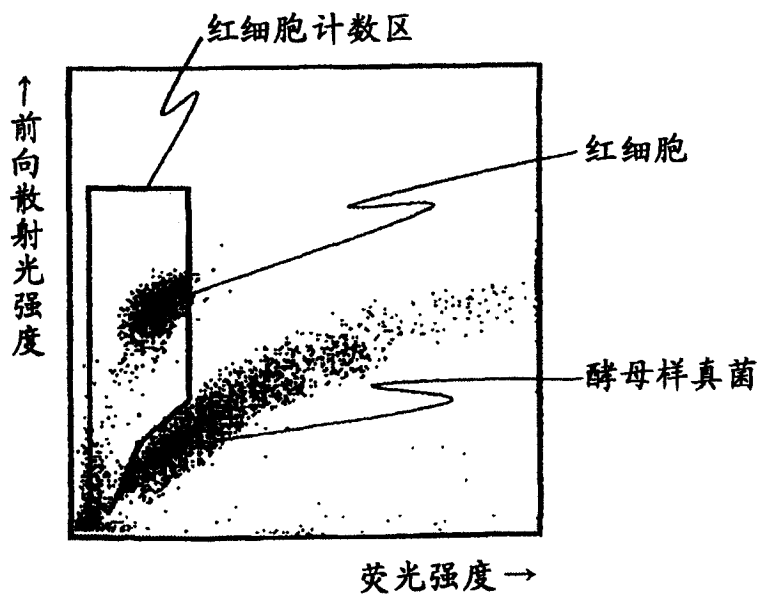
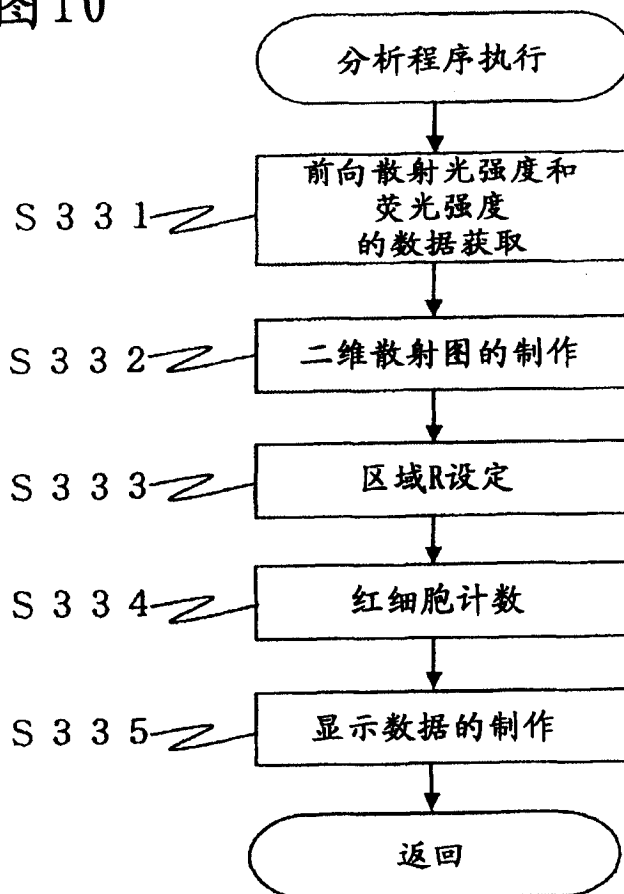


图 11

图 12

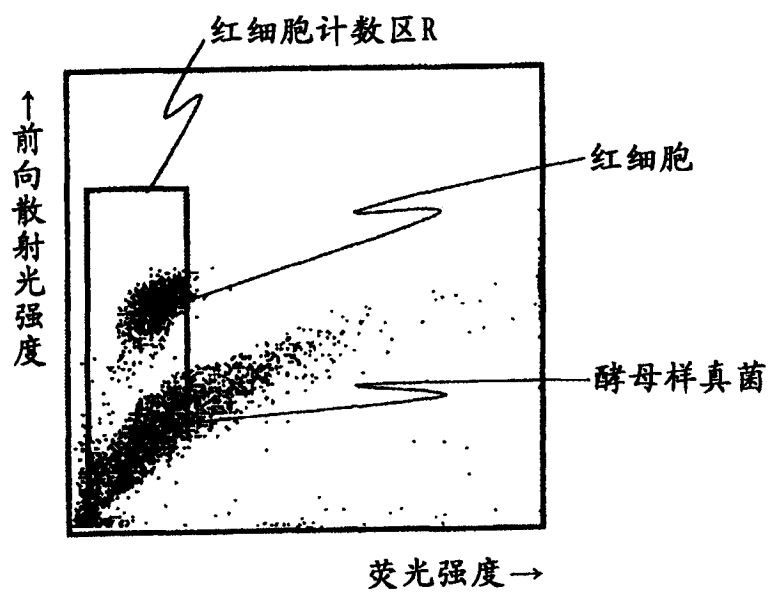
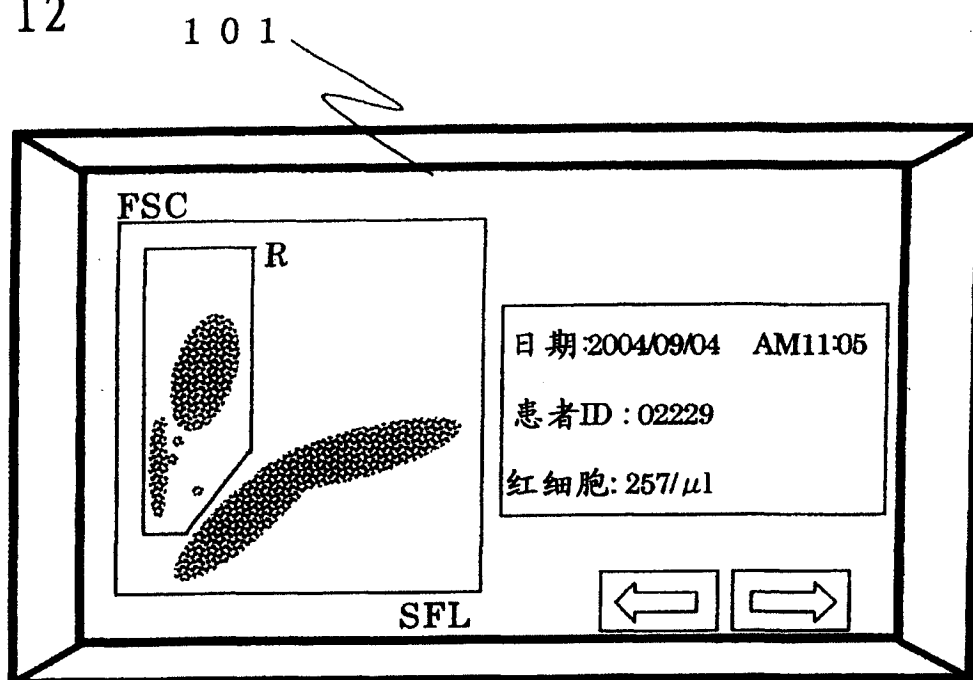


图 13