



등록특허 10-2084410



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월04일
(11) 등록번호 10-2084410
(24) 등록일자 2020년02월27일

(51) 국제특허분류 (Int. Cl.)
G01N 33/96 (2006.01) *G01N 1/38* (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)

(52) CPC특허분류
G01N 33/96 (2013.01)
G01N 1/38 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-7000464

(22) 출원일자(국제) 2016년07월06일
심사청구일자 2018년01월05일

(85) 번역문제출일자 2018년01월05일

(65) 공개번호 10-2018-0016510

(43) 공개일자 2018년02월14일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2016/070010

(87) 국제공개번호 WO 2017/006965
국제공개일자 2017년01월12일

(30) 우선권주장
JP-P-2015-135064 2015년07월06일 일본(JP)
JP-P-2016-133960 2016년07월06일 일본(JP)

(56) 선행기술조사문헌

JP2001330603 A*

JP2015105936 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

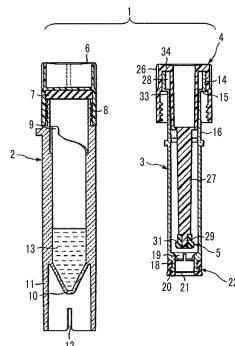
전체 청구항 수 : 총 13 항

심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 혈액 분석 방법 및 혈액 검사 키트

(57) 요약

본 발명의 과제는, 50 μ L 이하의 혈액 검체에 있어서 측정값의 반복 재현성이 높은 혈액 분석 방법과, 상기 혈액 분석 방법에 있어서 사용하기 위한 혈액 검사 키트를 제공하는 것이다. 본 발명에 의하면, 채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시키는 공정과, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 희석 배율을 결정하는 공정과, 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 공정을 포함하는, 혈액 분석 방법으로서, 혈액 검체의 용량이 50 μ L 이하이고, 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율이 14배 이상이며, 희석액이, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 함유하지 않는 희석액인, 혈액 분석 방법이 제공된다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

GO1N 33/49 (2019.01)

(72) 발명자

오사와 스스무

일본 도쿄도 츠오구 니혼바시 닌교쵸 2쵸메 33반
8고 가부시키가이샤 리자 나이

스기모토 신야

일본 도쿄도 츠오구 니혼바시 닌교쵸 2쵸메 33반
8고 가부시키가이샤 리자 나이

명세서

청구범위

청구항 1

채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시키는 공정과,

혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 희석 배율을 결정하는 공정과,

혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 공정을 포함하는, 혈액 분석 방법으로서,

상기 혈액 검체의 용량이 $50\text{ }\mu\text{L}$ 이하이고, 상기 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율이 14배 이상이며, 상기 희석액이, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분을 함유하지 않는 완충액이고, 상기 희석 배율을 결정하는 공정에 있어서 상기 표준 성분의 측정 시약을 이용하여 상기 표준 성분의 농도를 측정하는, 혈액 분석 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시키는 공정 후에, 희석된 혈액 검체로부터 혈장 성분 함유 시료를 회수하는 공정을 포함하는, 혈액 분석 방법.

청구항 3

청구항 2에 있어서,

상기 회수하는 공정이 분리막을 이용하는 공정인, 혈액 분석 방법.

청구항 4

청구항 2 또는 청구항 3에 있어서,

상기 희석된 혈액 검체로부터 혈장 성분 함유 시료를 회수하는 공정 후에, 상기 혈장 성분 함유 시료를 수송하는 공정을 포함하는, 혈액 분석 방법.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분이 나트륨 이온 또는 염화물 이온인, 혈액 분석 방법.

청구항 6

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분이 나트륨 이온 또는 염화물 이온과, 또한 적어도 1종의 표준 성분인, 혈액 분석 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서,

상기 또한 적어도 1종의 표준 성분이 총 단백 또는 알부민으로부터 선택되는 표준 성분인, 혈액 분석 방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서,

상기 희석액이 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 함유하지 않는 희석액인, 혈액 분석 방법.

청구항 9

청구항 5에 있어서,

혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분이 나트륨 이온인, 혈액 분석 방법.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

상기 희석액이 나트륨 이온을 함유하지 않는 희석액인, 혈액 분석 방법.

청구항 11

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 희석액이 pH6.5~pH8.0의 pH 영역에서 완충 작용을 갖는 완충액인, 혈액 분석 방법.

청구항 12

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 희석액이, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올, 2-에틸아미노에탄올, N-메틸-D-글루카민, 다이에탄올아민, 및 트라이에탄올아민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노알코올 화합물과, HEPES라고도 칭하는 2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-페페라진일]에테인설폰산, TES라고도 칭하는 N-트리스(하이드록시메틸)메틸-2-아미노에테인설폰산, MOPS라고도 칭하는 3-모폴리노프로페인설폰산, 및 BES라고도 칭하는 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노에테인설폰산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충제를 포함하는 희석액인, 혈액 분석 방법.

청구항 13

청구항 1 내지 청구항 3 중 어느 한 항에 있어서,

상기 표준 성분과는 다른 표준 성분의 표준값을 이용하여 구한 희석 배율로부터 상기 대상 성분의 농도의 분석을 검증하는 공정을 더 포함하는, 혈액 분석 방법.

청구항 14

삭제

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 미량의 혈액 검체 중의 대상 성분을 분석하기 위한, 혈액 분석 방법 및 혈액 검사 키트에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로, 채혈에는, 의사 등 일정한 유자격자가 주사기를 이용하여 정맥으로부터 혈액을 채취하는 일반 채혈과, 검사 대상자가 자신의 손가락 등에 채혈 바늘을 찔러 혈액을 채취하는 자기 채혈이 있다.

[0003] 일반 채혈에 의하여 채취된 혈액은, 채취 용기에 밀폐된 상태로 의료 기관 또는 검사 기관에 반송되어, 그곳에서 검사가 행해지고 있다. 혈액을 혈구와 혈장으로 분리하지 않고 반송하는 경우에는, 의료 기관 또는 검사 기관에서 원심분리기에 의하여 혈액을 혈구와 혈장으로 분리한 후에 검사가 행해진다. 또, 검사 대상자가 행하는 자기 채혈에서는, 채혈 후의 혈액은 분리막에 의하여 혈구와 혈장으로 분리되고, 이 분리된 상태로 검사 장소에 수송되어, 그곳에서 검사가 행해진다.

[0004] 특허문헌 1에는, 자기 채혈에 의하여 채취된 혈액 검체의 검사 방법이 기재되어 있다. 구체적으로는, 1) 용량을 정량하지 않고 채취한 정량해야 할 성분을 함유하는 미지 용량의 생체 시료와 일정량의 지시 물질을 함유하는 일정량의 수성 용액으로 이루어지는 정량용 시료를 조제하는 공정, 2) 일정량의 지시 물질을 함유하는 일정량의 수성 용액 중의 지시 물질의 농도(C_1)와 정량용 시료 중의 지시 물질의 농도(C_2)로부터 생체 시료의 희석 배율(a)을 구하는 공정, 3) 정량용 시료 중의 정량해야 할 성분의 농도(Y)를 구하는 공정, 4) 상기 2)에서 구한 생체 시료 희석 배율(a)과 상기 3)에서 구한 정량용 시료 중의 정량해야 할 물질의 농도(Y)로부터 생체 시료 중의 정량해야 할 성분을 결정하는 공정을 포함하는 생체 시료 중의 정량해야 할 성분의 정량 방법이 기재되어 있다.

[0005] 특허문헌 2에는, 검체 중의 분석 대상 성분량을 측정하고, 또한 이 이외의 항상적으로 검체 중에 본래 존재하는 표준 성분의 양을 측정하여, 이 표준 성분의 양과, 검체 중에서의 표준 성분의 기준 농도로부터 검체의 양을 결정하며, 이 검체량과, 분석 대상 성분량으로부터, 검체 중의 분석 대상 성분의 농도를 결정하는 정량 분석법이 기재되어 있다.

[0006] 또, 특허문헌 3에는, 혈액 희석 정량 기구를 이용하여 인간이나 동물로부터 미량 혈액을 채취하여 그대로 또는 희석시킨 후 일정량을 다른 기기나 용기 또는 직접 시약에 공급하는 것이 기재되어 있다. 또한 특허문헌 4에는, 희석용 수용액 중의 지시 물질의 흡광도를 이용하여, 생물학적 시료 중의 정량해야 할 성분의 농도를 정량하는 방법이 기재되어 있다.

[0007] 한편, 혈액 검체를 검사 대상자가 채취할 때에는, 소형 나이프가 구비된 랜싯으로 채취하여, 혈액 중의 임의 성분의 농도의 정량에 사용되고 있는데, 통상 $100\text{ }\mu\text{L}$ 이상의 혈액 검체를 채취하는 것을 필요로 하고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 특허문헌 1: 일본 공개특허공보 2003-161729호
 (특허문헌 0002) 특허문헌 2: 일본 공개특허공보 2001-330603호
 (특허문헌 0003) 특허문헌 3: 일본 공개특허공보 2009-122082호
 (특허문헌 0004) 특허문헌 4: 일본 공개특허공보 2009-109196호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 특허문헌 1에 기재된 방법에 있어서는, 혈액 검체가 미량인 경우에는, 혈액 검체량에 대한 희석액의 비율을 높게 하는 것이 필요해진다. 그러나, 이 경우, 혈액 검체를 희석시키기 전후의 희석액의 체적 변화율이 매우 작아지기 때문에, 내부 표준 물질의 농도의 변화율이 작아져, 측정값의 반복 재현성이 저하된다는 문제가 있다.

[0010] 특허문헌 2에는, 정상인의 전혈 약 $100\text{ }\mu\text{L}$ 를 다공질막에 적하하고, 혈구를 분리하여 혈청을 전개한 후에, $150\text{ }\mu\text{L}$ 의 생리 식염수 등장액 PBS(Phosphate-buffered saline: pH7.4)를 첨가하여 얻은 액을 원심분리하여 얻어진 상청(上清)을 분석 시료로서 분석하고 있지만, $100\text{ }\mu\text{L}$ 미만의 채혈에 대해서는 기재되어 있지 않다.

[0011] 특허문헌 3의 방법에서는, $10\text{ }\mu\text{L}$ 의 혈액량을 마이크로 피펫으로 정확하게 채취하여 분석하고 있지만, 채혈에 익숙하지 않은 환자가 채취하는 경우에는 일정량을 정확하게 채취하기는 어렵고, 오차를 포함하는 채혈로 검사를

행한 경우에는 측정값에 오차가 포함되는 결과가 된다.

[0012] 특허문헌 4에 기재된 측정 방법은 희석 배율이 10배 정도인 측정이며, 희석 배율을 더 높여 희석 혈액량을 충분히 확보하는 경우에는, 특허문헌 1과 마찬가지로, 측정값의 반복 재현성이 저하된다는 문제가 있다.

[0013] 상기한 바와 같이, 미량의 혈액 검체를 사용하는 경우에 대하여 측정값의 반복 재현성이 높은 혈액 분석 방법이 요망되고 있다. 본 발명은, 50 μ L 이하의 혈액 검체에 있어서 측정값의 반복 재현성이 높은 혈액 분석 방법과, 상기 혈액 분석 방법에 있어서 사용하기 위한 혈액 검사 키트를 제공하는 것을 해결해야 할 과제로 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 예의 검토한 결과, 채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시키고, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 희석 배율을 결정하여, 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 혈액 분석 방법에 있어서, 혈액 검체의 용량이 50 μ L 이하이고, 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율이 14배 이상이며, 희석액으로서 혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분을 함유하지 않는 희석액을 사용하는 구성에 의하여, 상기 과제를 해결할 수 있는 것을 발견하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 즉, 본 발명에 의하면 이하의 발명이 제공된다.

[0015] (1) 채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시키는 공정과,

[0016] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 희석 배율을 결정하는 공정과,

[0017] 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 공정을 포함하는, 혈액 분석 방법으로서,

[0018] 혈액 검체의 용량이 50 μ L 이하이고, 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율이 14배 이상이며, 희석액이, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 함유하지 않는 희석액인, 혈액 분석 방법.

[0019] (2) 채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시키는 공정 후에, 희석된 혈액 검체로부터 혈장 성분 함유 시료를 회수하는 공정을 포함하는, (1)에 기재된 혈액 분석 방법.

[0020] (3) 회수하는 공정이 분리막을 이용하는 공정인, (2)에 기재된 혈액 분석 방법.

[0021] (4) 희석된 혈액 검체로부터 혈장 성분 함유 시료를 회수하는 공정 후에, 혈장 성분 함유 시료를 수송하는 공정을 포함하는, (2) 또는 (3)에 기재된 혈액 분석 방법.

[0022] (5) 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분이 나트륨 이온 또는 염화물 이온인, (1) 내지 (4) 중 어느 하나에 기재된 혈액 분석 방법.

[0023] (6) 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분이 나트륨 이온 또는 염화물 이온과, 또한 적어도 1종의 표준 성분인, (1) 내지 (5) 중 어느 하나에 기재된 혈액 분석 방법.

[0024] (7) 상기 또한 적어도 1종의 표준 성분이 총 단백 또는 알부민으로부터 선택되는 표준 성분인, (6)에 기재된 혈액 분석 방법.

[0025] (8) 희석액이 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 함유하지 않는 희석액인, (5)에 기재된 혈액 분석 방법.

[0026] (9) 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분이 나트륨 이온인, (5)에 기재된 혈액 분석 방법.

[0027] (10) 희석액이 나트륨 이온을 함유하지 않는 희석액인, (9)에 기재된 혈액 분석 방법.

[0028] (11) 희석액이 pH6.5~pH8.0의 pH 영역에서 완충 작용을 갖는 완충액인, (1) 내지 (10) 중 어느 하나에 기재된 혈액 분석 방법.

[0029] (12) 희석액이, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올, 2-에틸아미노에탄올, N-메틸-D-글루카민, 다이에탄올아민, 및 트라이에탄올아민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노알코올 화합물과, HEPES라고도 칭하는 2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-페페라진일]에테인설폰산, TES라고도 칭하는 N-트리스(하이드록시메틸)메틸-2-아미노에테인설폰산, MOPS라고도 칭하는 3-모폴리노프로페인설폰산, 및 BES라고도 칭하는 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노에테인설폰산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충제를 포함하는 희석액인, (1) 내지 (11) 중 어느 하나에 기재된 혈액 분석 방법.

[0030] (13) 상기의 표준 성분과는 다른 표준 성분의 표준값을 이용하여 구한 희석 배율로부터 상기의 대상 성분의 농도의 분석을 겸중하는 공정을 더 포함하는, (1) 내지 (12) 중 어느 하나에 기재된 혈액 분석 방법.

[0031] (14) 혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액과, 희석된 혈액 검체를 수용하기 위한 용기를 포함하는, (1) 내지 (13) 중 어느 하나에 기재된 혈액 분석 방법에 있어서 사용하기 위한 혈액 검사 키트.

발명의 효과

[0032] 본 발명의 혈액 분석 방법 및 혈액 검사 키트에 의하면, 혈액 검체의 양이 적더라도 측정값의 반복 재현성이 높은 분석을 행할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0033] 도 1은, 희석된 혈액 검체를 수용하기 위한 용기의 구성의 일례를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0034] 이하, 본 발명에 대하여 상세하게 설명한다.

[0035] 혈액 검사를 행하는 경우, 채혈 바늘을 피험자의 정맥에 삽입하여 혈액을 채취하거나, 손가락 끝 등의 피부에 상처를 입혀, 피부 밖으로 흘러나온 혈액을 채취하는 방법으로 혈액을 입수하고 있다. 어떤 방법도 피부에 상처를 입히는 침습적인 행위이기 때문에, 환자의 통증을 수반하게 된다. 이로 인하여, 피부에 입히는 상처를 작게 하여 침습성을 최대한 억제하여, 환자의 통증을 완화시키는 방법으로 채혈하여 분석을 행하는 방법이 많은 환자로부터 요망되고 있다. 그 경우, 상처를 작게 함으로써 통증은 적어지지만, 채혈량이 미량이 되기 때문에, 검사 가능한 대상 성분의 종류가 한정된다는 폐해가 있다. 특허문헌 1의 검사 방법에 이와 같은 양태를 적용시켜, 상기 폐해를 해결하고자 하는 경우, 채혈량에 대한 희석액량의 비율을 높게 함으로써, 혈액을 희석시킨 희석액에 대하여, 검사가 필요한 분석 대상 성분 전체를 검사하는 것을 가능하게 하는 데에 충분한 양을 확보하게 된다. 그러나, 채혈량이 적은 경우에는 혈액을 희석시키기 전후의 희석액의 체적 변화율이 매우 작아져, 내부 표준 물질로서 사용하는 물질의 변화율도 매우 작아지기 때문에, 계량 시의 계량 오차나, 측정 시의 측정 오차가 상대적으로 커져, 측정 정밀도의 악화나, 반복 재현성의 저하 등에 의하여 검사의 신뢰성이 손상될 가능성이 있다. 따라서, 측정값의 재현성이 높은 검사를 위해서는, 혈액 검체의 양을 어느 정도 확보할 필요가 있으며, 피험자에게 어느 정도의 통증을 수반하는 채혈 방법을 행할 필요가 있었다.

[0036] 특허문헌 2에서는, 약 $100\text{ }\mu\text{L}$ 의 혈액량을 채취하고 있지만, $100\text{ }\mu\text{L}$ 의 혈액을 환자가 스스로 채혈하는 경우, 손가락 끝 등의 피부에 입히는 상처는 크게 할 필요가 있어, 환자에게 통증을 수반하고, 사람에 따라서는 강한 통증으로서 느끼는 경우도 있다. 또, 상처도 깊으므로 지혈이 늦어질 우려도 있다. 또한 특허문헌 2에서는, 항상 성 성분량으로서 혈액 중의 항상성의 중심값이 0.9mmol/L 인 마그네슘 이온, 4.65mmol/L 인 칼슘 이온, $7.5\text{g}/100\text{mL}$ 인 총 단백을 이용하여 희석 배율을 측정하고 있다. 그러나, 환자가 채혈하는 혈액량이 적어지면, 희석액 중의 항상성 성분의 농도가 낮아져, 항상성 성분을 측정할 때에 무시할 수 없는 측정 오차를 포함하는 결과가 된다. 그 결과, 희석 배율의 측정값에도 오차를 포함하게 되어, 측정의 신뢰성이 손상된다.

[0037] 특허문헌 3의 방법에서는, $10\text{ }\mu\text{L}$ 로 적은 혈액량을 마이크로 피펫으로 일정량을 정확하게 채취하여 분석하고 있지만, 환자가 채취하는 경우에는, 채혈에 익숙하지 않은 환자도 많기 때문에 일정량을 정확하게 항상 채취하는 것은 어렵다. 환자가 채취하는 경우에는, 반복 채혈하기 때문에, 많은 혈액량이 피부 밖으로 흘러나오게 되거나, 오차를 포함하는 채혈로 검사를 한 경우에 측정값에 오차가 포함되는 결과가 된다.

[0038] 특허문헌 4에는, 2파장의 광을 이용하여, 유미(乳靡)의 영향을 보정하여 측정 정밀도를 높이는 기술이 개시되어 있는데, 희석 배율이 10배 정도인 측정이다. 특허문헌 4의 방법은, 희석한 혈액량이 $100\text{ }\mu\text{L}$ 이하인 분석에는 유효하지만, 분석 대상 성분이 적어, 다양한 많은 분석 대상 성분의 정보를 입수하여, 장기 상태, 생활 습관의 예측 등에 사용할 목적의 검사에는 대응할 수 없다. 이 경우, 희석 배율을 더 높여 희석 혈액량을 충분히 확보하는 경우에는, 특허문헌 1과 동일한 과제에 직면한다.

[0039] 본 발명은, 상기한 문제점을 고려하여 검토된 것이다. 본 발명의 혈액 분석 방법 및 혈액 검사 키트에 의하면, 채혈 시의 침습성을 저감시켜 환자의 부담을 완화시키기 위하여 채취하는 혈액량을 미량으로 한 경우이더라도, 희석 배율을 높게 하여 분석해야 할 희석액량을 충분히 확보했을 때의 재현성이 양호한 희석 배율을 실현할 수 있어, 대상 성분의 분석을 양호한 정밀도로 행할 수 있다. 채취하는 혈액량이 미량이며, 희석 배율이 높은 경우에 있어서, 희석액으로서 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 함유하지 않는 희석액을 사용하고, 상기 표준 성분의 표준값을 이용하여 희석 배율을 결정함으로써 측정값의 반복 재현성이 높은 분석을 행할 수 있는 것은, 선행 기술 문헌으로부터는 예상할 수 없는 전혀 의외의 효과이다.

[0040] [1] 혈액 분석 방법

[0041] 본 발명의 혈액 분석 방법은,

[0042] 채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시키는 공정과,

[0043] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 희석 배율을 결정하는 공정과,

[0044] 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 공정을 포함하는, 혈액 분석 방법으로서,

[0045] 혈액 검체의 용량이 $50 \mu\text{L}$ 이하이고, 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율이 14배 이상이며, 희석액이, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분을 함유하지 않는 희석액인 방법이다.

[0046] 본 발명에서는, 혈액 검체를 채취하여, 혈액 검체 중의 대상 성분을 분석한다. 본 발명의 혈액 분석 방법은, 대상자 자신이 혈액을 채취하는 자기 채혈로 실시해도 되고, 의사 등의 유자격자가 주사기를 사용하여 혈액을 채취하는 일반 채혈에 있어서 실시해도 된다.

[0047] 바람직한 양태로서는, 환자 본인이, 랜싯 등의 나이프가 장착된 기구를 이용하여 손가락 끝 등에 상처를 입혀 피부 밖으로 나온 혈액을 채취한다. 환자의 부담을 줄이기 위하여, 침습성 낮게 혈액을 채취하는 것이 바람직하고 혈액을 채취하는 경우에 무통, 혹은 통증이 매우 적은 상태에서 채혈할 수 있는 것이 요망되며, 그 경우, 상처의 깊이, 크기는 작은 것이 바람직하고, 채취할 수 있는 혈액도 매우 적어진다. 따라서, 본 발명의 혈액 분석 방법에서 이용하는 혈액 검체의 용량(즉, 채혈량)은 $50 \mu\text{L}$ 이하이며, $40 \mu\text{L}$ 이하가 바람직하고, $30 \mu\text{L}$ 이하가 보다 바람직하며, $20 \mu\text{L}$ 이하가 더 바람직하고, 하한은 특별히 한정되지 않지만 일반적으로는 혈액 분석을 행하기 위한 필요한 혈액량으로서 $5 \mu\text{L}$ 이상인 것이 바람직하다. 본 발명에 있어서는, 혈액 검체가 미량인 경우여도, 양호한 측정 정밀도로 대상 성분의 분석을 행하는 것이 가능하다.

[0048] 본 발명에서는, 채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시킨다.

[0049] 혈액 검사로서, 간 기능, 신장 기능, 메타볼리즘 등, 특정 장기, 특정 질환을 검사하는 경우에는, 장기나 질환에 특유의 복수의 측정 대상 성분의 정보를 입수하여, 장기 상태, 생활 습관의 예측 등을 행하기 위하여, 일반적으로는, 복수의 대상 성분의 분석이 동시에 행해진다. 예를 들면, 간장 상태를 검사하기 위해서는, 일반적으로는, ALT(알라닌 트랜스아미나제), AST(아스파라진산 아미노트랜스페라제), γ -GTP(γ 글루타밀 트랜스펩티다제), ALP(알칼리포스파타제), 총 빌리루빈, 총 단백, 알부민 등의 수종류 이상의 성분의 혈액 중의 농도가 측정된다. 이와 같이, 복수의 대상 성분을 하나의 혈액 검체로부터 측정하기 위해서는, 채측정의 가능성도 고려하면, 희석된 혈액의 양이 어느 정도 필요하다. 따라서, 채취한 혈액을 희석액으로서는, 어느 정도의 양의 희석액을 사용하는 것이 필요해진다. 채취한 혈액량에 관계없이, 사용하는 희석액의 양은, 복수의 대상 성분을 측정하기 위해서는, $250 \mu\text{L}$ 이상이 바람직하고, $300 \mu\text{L}$ 이상이 보다 바람직하며, $350 \mu\text{L}$ 이상이 더 바람직하고, $400 \mu\text{L}$ 이상인 것이 가장 바람직하며, 희석액의 양의 상한은 특별히 한정되지 않지만, 측정에 유효한 희석률을 실현하기 위하여, 일반적으로는 $1000 \mu\text{L}$ 이하가 바람직하다.

[0050] 채취하는 혈액에는, 혈장 성분과 혈구 성분이 포함되는데, 혈장 성분 중의 대상 성분의 농도를 측정하기 위하여, 혈액으로부터 혈구 성분을 제외한 혈장 성분과 희석액을 혼합하는 것이 바람직하다. 미리 혈액으로부터 혈구 성분을 분리한 후에 희석액과 혼합해도 되고, 채취한 혈액을 희석액으로 혼합한 후, 분리막 등을 이용하여 혈구 성분을 분리해도 된다.

[0051] 혈액이 희석된 상태로 장시간 방치되는 경우에는, 예를 들면 적혈구의 용혈이 일어나면, 혈구 내의 농도가 높은 물질이나 효소 등이 혈장 혹은 혈청 중으로 용출되어, 검사 결과에 영향을 주거나, 색조에 따라 대상 성분을 측정하는 경우에 헤모글로빈 성분이 검사에 영향을 줄 가능성이 있다. 따라서, 본 발명에 있어서는, 환자가 채취한 혈액으로부터 혈구를 분리하여 혈장을 회수하는 공정을 행한 후 희석을 행할 수도 있다. 또 본 발명에 있어서는, 채취된 혈액 검체를 희석액으로 희석시키는 공정 후에, 희석된 혈액 검체로부터 혈장 성분 함유 시료를 회수하는 것이 바람직하다. 혈장 성분 함유 시료란, 혈장 성분과 희석액을 포함하는 시료이다. 이 경우, 상기에서 회수한 혈장 성분 함유 시료를, 예를 들면 검사 장소까지 수송할 수 있다.

[0052] 혈액으로부터 혈구를 분리하여 혈장을 회수하는 방법과, 희석된 혈액으로부터 혈구를 분리하여 혈장 성분 함유 시료를 회수하는 방법은, 특별히 제한은 없다. 항응고제가 들어간 채혈관으로 채혈한 후에 원심분리를 행하여 혈액을 혈구 성분과 혈장 성분으로 분리해도 되며, 혈액 성분에 압력을 가하여 여과막 등의 분리막을 통과시키고, 혈구 성분을 분리막에 포착시켜 혈액으로부터 혈구 성분을 분리해도 된다. 이 경우, 항응고제를 이용해도 된다. 혈장 성분을 회수하는 공정은, 상기 중에서도 바람직하게는, 분리막을 이용하는 공정이다. 또, 측정의 정

밀도를 확보하기 위하여, 혈구 성분을 제외한 혈액의 용액 부분과 물리적으로 격리하는 것이 바람직하고, 이 경우, 구체적으로는, 일본 공개특허공보 2003-270239호에 기재된 역류 방지 수단을 갖는 생체 시료 분리 기구 등을 이용할 수 있다.

[0053] 본 발명에서는, 침습성 낮게 혈액을 채취하는 것이 바람직하고, 미량의 혈액 검체로부터 혈액의 희석액을 조제하는 것이 중요하며, 채취한 혈액을 희석액으로 희석시킬 때에 있어서의, 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율이 높은 것이 요구된다. 여기에서 말하는 희석 배율이란, 혈액 검체으로부터 혈구 성분을 제거한 혈장 성분의 희석 배율이고, 본 발명에 있어서의 희석 배율은, 14배 이상이며, 17배 이상이 바람직하고, 21배 이상이 보다 바람직하며, 25배 이상이 더 바람직하고, 30배 이상이 특히 바람직하며, 40배 이상이 가장 바람직하고, 상한은 특별히 한정되지 않지만, 높은 정밀도의 측정을 가능하게 하기 위하여, 일반적으로는 100배 이하가 바람직하다. 실제 혈액을 희석액으로 희석시키는 경우의 혈액의 희석 배율로는, 6배 이상부터의 고배율이어도, 희석액으로 희석시킨 경우의 희석 배율 측정의 반복 재현성이 양호하며, 환자가 채혈을 행할 때의 통증을 줄이기 위해서는 채혈량이 적어지기 때문에, 혈액의 희석 배율로서는, 8배 이상이 바람직하고, 10배 이상이 보다 바람직하며, 13배 이상이 더 바람직하고, 18배 이상이 가장 바람직하며, 상한은 특별히 한정되지 않지만, 높은 정밀도의 측정을 가능하게 하기 위하여, 일반적으로는 50배 이하가 바람직하다.

[0054] 상기와 같이, 혈장 성분의 희석 배율이 높은 희석 혈장의 희석 후의 대상 성분에 대하여, 희석 전의 혈액의 혈장 중에 존재하는 농도를 정확하게 분석하기 위해서는, 희석액 중에 미리 존재하는 물질의 농도의 변화율로부터 구하는 방법에서는, 농도 변화의 비율이 매우 작아지기 때문에 측정 오차가 크고, 또 측정의 재현성이 악화된다 는 폐해가 있다. 따라서 본 발명에서는, 측정 정밀도를 높이기 위하여, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 희석 배율을 결정한다. 또한, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분은, 외부 표준 물질이라고도 칭한다.

[0055] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분은, 예를 들면 나트륨 이온, 염화물 이온, 칼륨 이온, 마그네슘 이온, 칼슘 이온, 총 단백, 및 알부민 등을 들 수 있다. 혈액 검체의 혈청 및 혈장 중에 포함되는 이들 표준 성분의 농도는, 나트륨 이온 농도는, 134~146mmol/리터(평균값: 142mmol/리터), 염화물 이온 농도는, 97~107mmol/리터(평균값: 102mmol/리터), 칼륨 이온 농도는, 3.2~4.8mmol/리터(평균값: 4.0mmol/리터), 마그네슘 이온 농도는, 0.75~1.0mmol/리터(평균값: 0.9mmol/리터), 칼슘 이온 농도는, 4.2~5.1mmol/리터(평균값: 4.65mmol/리터), 총 단백 농도는, 6.7~8.3g/100mL(평균값: 7.5g/100mL), 알부민 농도는, 4.1~5.1g/100mL(평균값: 4.6g/100mL)이다. 본 발명에서는, 환자의 통증을 완화시키기 위하여, 채혈하는 혈액량이 매우 적은 경우에 있어서의 대상 성분의 측정을 가능하게 하기 위한 것이며, 미량의 혈액을 희석액으로 희석시켰을 때에, 희석액 중에 존재하는 "혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분"의 농도를 양호한 정밀도로 측정할 필요가 있다. 희석 배율이 높아지면, 본래 혈액 중에 존재하는 성분의 희석액 중의 농도가 저하되어, 희석 배율에 따라서는 농도 측정 시에, 측정 오차를 포함할 가능성이 있다. 따라서, 이들 "혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분" 중에서, 미량의 혈액 성분을 높은 희석 배율로 희석시켰을 때에, 상기 표준 성분을 충분히 높은 정밀도로 검출할 수 있기 때문에, 미량의 혈액 중에 높은 농도로 존재하는 표준 성분을 측정하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는, 혈액 검체 중에 항상적으로 존재하는 성분 중에서도 고농도로 존재하는, 나트륨 이온(Na^+) 또는 염화물 이온(Cl^-)을 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서는, 상기한 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분 중에서도 혈액 중에 존재하는 양이 가장 높은 나트륨 이온을 측정하는 것이 가장 바람직하다. 나트륨 이온은, 평균값이 표준값(기준 범위의 중앙값)을 나타내고, 그 값은, 142mmol/리터이며, 혈장 중의 총 양이온의 90% 이상을 차지한다.

[0056] 환자인 피험자의 혈액 중에 있어서의 혈장 성분의 점유율은, 용적의 비율로 약 55%인데, 피험자의 염분 섭취량의 변화 등으로 변동되며, 또 피험자에 따라 다르다. 이로 인하여, 본 발명에 있어서는, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 희석 배율을 결정하고, 결정된 희석 배율을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석한다. 희석 배율을 결정하는 방법으로서는, 혈장의 희석액 중의 외부 표준 물질(예를 들면, 나트륨 이온 등)의 측정값(농도 X)과, 혈장 중의 상기 외부 표준 물질(예를 들면, 나트륨 이온 등)의 기준 농도값(농도 Y; 나트륨 이온의 경우에는 142mmol/리터)으로부터, 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율(Y/X)을 산출함으로써 희석 배율을 구할 수 있다. 이 희석 배율을 이용하여, 혈장의 희석액 중의 대상 성분의 측정값(농도 Z)을 측정하고, 이 측정값에 희석 배율을 곱함으로써, 실제로 혈액 검체 중에 포함되는 분석 대상 성분의 농도 [$Z \times (Y/X)$]를 측정하는 것이 가능해진다.

[0057] 또, 혈액 중의 분석 대상 성분의 농도 분석이 정상적으로 행해지고 있는지 검증하기 위하여, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 다른 2개 이상의 성분을 표준 성분으로서 이용하여, 각각 독립적으로 혈액 검체 중의 혈장 성분

의 희석 배율을 구하고, 그 값이 일치하는 것을 확인하는 것이 바람직하다. 일치한다란, 2개의 측정값(a, b)에 있어서, 그들의 차의 그들의 평균값에 대한 비율, 즉 $|a-b|/ \{(a+b)/2\} \times 100\%$, 20% 이하인 것이며, 바람직하게는 10% 이하인 것이고, 보다 바람직하게는 5% 이하인 것이다. 바람직한 일 양태로서는, 나트륨 이온 이외의 혈장 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분으로부터 구한 희석 배율이, 나트륨 이온 농도로부터 구한 희석 배율과 일치하는 것을 확인함으로써, 혈액의 희석액 중의 나트륨 이온 농도의 측정값으로부터 구한 희석 배율을 이용하여 행한 혈액 중의 분석 대상 성분의 농도 분석이 정상적으로 행해지고 있는지 검증이 가능해진다. 염화물 이온의 측정법은, 이온 선택 전극을 이용한 전극법(Ion Selective Electrode: ISE)이나, 아밀라제 등의 효소를 이용하는 효소법, 질산 은 적정법 등이 있으며, 측정 시료의 특성이나 감도, 시료량 등에 따라 적절히 사용하는 방법을 선택할 수 있다. 또, 나트륨 이온 및 염화물 이온 이외의 혈장 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 예로서는, 총 단백 또는 알부민으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 총 단백으로부터 선택되는 것이 보다 바람직하며, 총 단백의 측정법으로서는, 뷰렛법이나, 자외 흡수법, 브래드포드법, 로리법, 바이신코닌산(Bicinchoninic Acid: BCA)법, 형광법 등 공지의 방법이 있고, 측정 시료의 특성이나 감도, 시료량 등에 따라 적절히 사용하는 방법을 선택할 수 있다.

[0058] 나트륨 이온 농도 및 염화물 이온 농도는, 예를 들면 염광 광도법, 유리 전극법, 적정법, 이온 선택 전극법, 효소 활성법 등에 의하여 측정할 수 있다.

[0059] 본 발명에 있어서, 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석한다란, 대상 성분의 농도를 결정하는 것(즉, 대상 성분을 정량하는 것), 또는 대상 성분의 농도가 소정의 기준값 이상인지 소정의 기준값 이하인지를 결정하는 것, 어느 정도의 농도를 포함하는지를 검출하는 정성(定性)을 행하는 것 등을 포함하고, 분석의 형태는 특별히 한정되지 않는다.

[0060] 본 발명에 있어서는, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분(이하, 항상성 물질이라고도 함)을 희석액으로 희석 후에 측정하고, 상기한 바와 같이 희석 배율을 결정하여, 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석할 수 있다. 혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액은, 희석 배율을 구하기 위하여 사용하는 "혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분"을 함유하지 않는 희석액이다. 본 명세서에 있어서 "함유하지 않는다"란, "실질적으로 함유하지 않는다"는 것을 의미한다. 여기에서, "실질적으로 함유하지 않는다"란, 희석 배율을 구할 때에 사용하는 항상성 물질을 전혀 포함하지 않거나, 혹은 포함되어 있다고 해도, 혈액 검체를 희석시킨 후의 희석액의 항상성 물질의 측정에 영향을 미치지 않을 정도의 극미량의 농도로 포함되는 경우를 의미한다. 항상성 물질로서, 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 이용하는 경우에는, 희석액으로서는, 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 실질적으로 함유하지 않는 희석액을 사용한다.

[0061] 본 발명에 있어서는, 환자가 채혈한 혈액 검체를 희석시킨 후, 의료 기관 또는 검사 기관에 수송하여 대상 성분의 농도를 분석할 수 있다. 채혈부터 분석까지는 장시간 걸릴 가능성이 있는 점에서, 그 사이에, 혈액의 희석액 중에 있어서 대상 성분이 분해나 변성되는 것을 방지하는 것이 바람직하다. 혈액의 pH는, 정상인이라면 통상 pH7.30~7.40 정도로 일정하게 유지되고 있다. 따라서, 대상 성분이 분해나 변성되는 것을 방지하기 위하여, 희석액은, pH6.5~pH8.0, 바람직하게는 pH7.0~pH7.5, 더 바람직하게는 pH7.3~pH7.4의 pH 영역에서 완충 작용을 갖는 완충액인 것이 바람직하고, 희석액은, pH의 변동을 억제하는 완충 성분을 함유하는 완충액인 것이 바람직하다.

[0062] 완충액의 종류로서는, 아세트산 완충액(Na), 인산 완충액(Na), 시트르산 완충액(Na), 봉산 완충액(Na), 타타르산 완충액(Na), Tris(트리스(하이드록시메틸)아미노에테인) 완충액(Cl), HEPES([2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-페페라진일]에테인설폰산]) 완충액, 인산 완충 생리 식염수(Na) 등이 알려져 있다. 이들 중에서 pH7.0~pH8.0 부근의 완충액으로서는, 인산 완충액, Tris 완충액, HEPES 완충액이 대표적인 것이다. 그러나, 인산 완충액은 인산의 나트륨염이 포함되어 있는 것, Tris 완충액은, 해리 pKa(Ka는 산해리 상수)가 8.08이기 때문에, pH7.0~pH8.0 부근에서 완충능을 갖게 하기 위해서는 통상은 염산과 조합하여 사용되는 것, HEPES의 설폰산의 해리 pKa는 7.55인데, 이온 강도를 일정하게 하여 완충 용액을 조정하기 위하여, 통상은 수산화 나트륨과 염화 나트륨과 HEPES의 혼합물이 이용되는 점에서, 이들은 pH를 일정하게 유지하는 작용을 갖는 완충액으로서는 유용하지만, 외부 표준 물질로서 이용하는 것이 바람직한 물질인 나트륨 이온 혹은 염화물 이온을 함유하기 때문에, 본 발명에 대한 적용은 바람직하지 않다.

[0063] 본 발명에서 이용하는 희석액으로서는, 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 함유하지 않는 완충액을 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 이용하는 희석액은 바람직하게는, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올(AMP), 2-에틸아미노에탄올, N-메틸-D-글루카민, 다이에탄올아민, 및 트라이에탄올아민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1

종의 아미노알코올 화합물과, Good's 완충액(굿 베퍼)으로 pKa 가 7.4 부근의 완충제인 HEPES라고도 칭하는 2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진일]에테인설폰산($pKa=7.55$), TES라고도 칭하는 N-트리스(하이드록시메틸)메틸-2-아미노에테인설폰산($pKa=7.50$), MOPS라고도 칭하는 3-모폴리노프로페인설폰산($pKa=7.20$), 및 BES라고도 칭하는 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노에테인설폰산($pKa=7.15$)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충제를 포함하는 희석액이다. 상기 중에서도, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올(AMP)과 HEPES, TES, MOPS 또는 BES의 조합이 바람직하고, 또한, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올(AMP)과 HEPES의 조합이 가장 바람직하다.

[0064] 상기 완충액을 조제하기 위해서는, 아미노알코올과 Good's 완충액을 1:2~2:1, 바람직하게는 1:1.5~1.5:1, 더 바람직하게는 1:1의 농도비로 혼합하면 된다. 완충액의 농도는 한정되지 않지만, 아미노알코올 또는 Good's 완충액의 농도는, 0.1~1000mmol/L, 바람직하게는, 1~500mmol/L, 더 바람직하게는 10~100mmol/L이다.

[0065] 완충액 중에는, 분석 대상 성분을 안정적으로 유지하는 것을 목적으로 칼레이트제, 계면활성제, 항균제, 방부제, 보효소, 당류 등이 함유되어 있어도 된다. 칼레이트제로서는, 에틸렌다이아민 사아세트산염(EDTA), 시트르산염, 옥살산염 등을 들 수 있다. 계면활성제로서는, 예를 들면 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제, 양성 계면활성제 또는 비이온 계면활성제를 들 수 있다. 방부제로서는, 예를 들면 아자이드화 나트륨이나 항생 물질 등을 들 수 있다. 보효소로서는, 피리독살 인산, 마그네슘, 아연 등을 들 수 있다. 적혈구 안정화제의 당류로서는, 만니톨, 텍스트로스, 올리고당 등을 들 수 있다. 특히, 항생 물질의 첨가에 의하여, 손가락 채혈 시에 손가락 표면으로부터 일부 혼입되는 세균의 증식을 억제할 수 있어, 세균에 의한 생체 성분의 분해를 억제하여, 생체 성분의 안정화를 도모할 수 있다.

[0066] 혈액 검체로 전혈을 사용하는 경우에는, 희석한 혈액 중의 혈구 성분을 필터 여과할 필요로부터, 완충액의 침투압을 혈액과 동등(285mOsm/kg(mOsm/kg는, 용액의 물 1kg이 갖는 침투압으로, 이온의 밀리몰수를 나타냄))하게 또는 그 이상으로 함으로써 혈구의 용혈을 방지할 수 있다. 침투압은, 대상 성분의 측정, 및 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 측정에 영향을 주지 않는 염류, 당류 또는 완충제 등에 의하여, 등장으로 조정할 수 있다.

[0067] 본 발명에 있어서의 분석의 대상 성분은 한정되지 않고, 혈액 중에 포함되는 모든 물질이 대상이 된다. 예를 들면 임상 진단에 이용되는 혈액 중의 생화학 검사 항목, 종양 마커나 간염 마커 등 각종 질환의 마커 등을 들 수 있고, 단백질, 당, 지질, 저분자 화합물 등을 들 수 있다. 또, 측정은 물질 농도뿐만 아니라, 효소 등의 활성을 갖는 물질의 활성도 대상이 된다. 각 대상 성분의 측정은, 공지의 방법으로 행할 수 있다.

[2] 혈액 검사 키트

[0069] 본 발명의 혈액 검사 키트는, 혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액과, 희석된 혈액 검체를 수용하기 위한 용기를 포함하는, 상기한 본 발명의 혈액 분석 방법에 있어서 사용하기 위한 혈액 검사 키트이다.

[0070] 용기의 재료는, 내파손성, 위생면, 가격 등의 관점에서, 합성 수지인 것이 바람직하다. 예를 들면, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리염화 바이닐, 폴리염화 바이닐리덴, 폴리스타이렌, 폴리아세트산 바이닐, 폴리유레테인, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리락트산, 아크릴로나이트릴뷰타다이엔스타이렌 수지(ABS 수지), 아크릴로나이트릴스타이렌 수지(AS 수지), 아크릴 수지(PMMA), 폴리카보네이트, 실리콘 수지, 실리콘 고무 등을 들 수 있다.

[0071] 본 발명의 혈액 검사 키트의 일례로서는, 혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액, 희석액이 수용된 제1 수용기구, 희석액으로 희석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구, 피부에 상처를 입혀 혈액을 피부 밖으로 배어 나오게 하는 바늘이나, 랜싯, 상처에 붙이는 반창고 또는 소독 부재(예를 들면, 아이소프로판올(70질량% 아이소프로판올 등) 또는 에탄올 등을 함침시킨 부직포), 취급 설명서 등을 구비할 수 있다.

[0072] 혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액으로서는, 본 명세서 중 상기한 희석액을 사용할 수 있다.

[0073] 제1 수용 기구, 및 제2 수용 기구는, 하나의 기구를 제1 수용 기구 및 제2 수용 기구로서 겸용해도 되고, 별도의 기구를 구비하는 양태여도 된다. 수용 기구 내에 있는 혈액을 희석시킨 희석액을, 환자, 혹은 희석 배율의 측정이나 분석 대상 성분의 분석을 행하는 측정자에게 확인 가능하게 하기 위하여, 제1 수용 기구, 및 제2 수용 기구는, 투명한 소재로 되어 있는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에서 말하는 투명이란, 관측자가 내부의 액량을 확인할 수 있을 정도로 투명하면 되고, 반투명 등을 포함하는 개념이다.

[0074] 혈장을 분리하기 위한 분리 기구로서는, 분리막인 양태가 바람직하고, 혈구 성분을 분리 가능한 미세 구멍을 갖

는 필터가 보다 바람직하다. 분리 기구를 지지하는 지지 기구는, 개스킷인 양태가 바람직하다. 또, 밀봉 기구로서는, 수용 기구가 통형의 형상을 한 기구 등인 경우에는, 개구에 덮개를 덮는 것이 가능한 캡이나, 나선형의 흠을 갖는 덮개, 혹은 고무 마개 등을 사용할 수 있다.

[0075] 본 발명은, 미량의 혈액인 $50\text{ }\mu\text{L}$ 이하의 채혈량이더라도, 양호한 측정 정밀도로 분석 대상 성분을 분석할 수 있는 방법을 실현 가능하게 하는 것이며, 환자에게, $50\text{ }\mu\text{L}$ 이하의 적은 채혈량이어도 양호한 정밀도로 측정하는 것이 가능하다는 정보가 기재된 취급 설명서를 포함하는 키트인 것이 바람직하다.

[0076] 희석액이 수용된 제1 수용 기구, 희석액으로 희석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구에 대한 구체적인 구성예로서는, 예를 들면 일본 특허공보 제3597827호의 도 1부터 도 13에 기재된 기구를 사용할 수 있다. 일본 특허공보 제3597827호의 도 1을, 본원의 도 1로서 원용 한다.

[0077] 혈액 분리 기구(1)는 채혈 용기(2)(희석액이 수용된 제1 수용 기구)와, 채혈 용기(2)에 끼워 삽입 가능한 통체(3)(희수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구)와, 통체(3)에 씌울 수 있는 캡 피스톤(4)과, 캡 피스톤(4)의 하단에 마련된 밀폐 덮개(5)(밀봉 기구)를 구비하고, 사용 전에는, 도 1에 나타내는 바와 같이, 채혈 용기(2)의 상단 개구부는 캡(6)에 의하여 패킹(7)을 통하여 밀폐되어 있다. 본 발명에 있어서의 희석된 혈액 검체를 수용하기 위한 용기는, 도 1의 구성에 있어서는, 채혈 용기(2)와 통체(3)의 조합에 대응한다. 즉, 희석된 혈액 검체를 수용하기 위한 용기는 1개여도 되고 2개 이상의 조합이어도 된다.

[0078] 채혈 용기(2)는 투명한 재질로 만들어져 원통형을 이루고, 그 상단부에는, 외면에 나사부(8)가 형성되며, 내면에 계지부(9)가 돌출되어 마련되어 있다. 또, 채혈 용기(2)의 하단부에는, 역원뿔형의 바닥부(10)가 형성되고, 바닥부(10)의 주위에 원통형의 다리부(11)가 형성되어 있다. 다리부(11)는, 혈액의 분석 검사 시에 사용하는 샘플 컵과 동일 외경을 갖고 있으며, 바람직하게는, 그 하단의 대향하는 위치에 각각 연직 방향으로 슬릿 흠(12)이 형성되어 있다. 또한 채혈 용기(2) 내에는, 도 1에 나타나 있는 바와 같이, 소요량, 예를 들면 500mm^3 의 희석액(13)이 미리 들어 있어도 된다.

[0079] 통체(3)는 투명한 재질로 만들어져 원통형을 이루고, 그 상단부에는 확경부(14)가 형성되어 있다. 확경부(14)는 박육부(薄肉部)(15)를 통하여 본체부(16)와 접속되어 있다. 통체(3)의 하단부에는, 축경부(18)가 형성되고, 축경부(18)의 내면에는 계지 돌기부(19)가 형성되어 있다. 또한 축경부(18)의 하단부에는 외측 플랜지부(20)(지지 기구)가 형성되고, 외측 플랜지부(20)의 하단 개구부는 여파막(21)(분리 기구)에 의하여 덮이며, 여파막(21)은 혈액 중의 혈장의 통과를 허용하고, 혈구의 통과를 저지하도록 되어 있다.

[0080] 축경부(18)의 외주에는 실리콘 고무제의 커버(22)가 장착되어 있다(도 1).

[0081] 캡 피스톤(4)은, 대략 원통형의 파지부(26)와, 파지부(26)와 동심으로 하방으로 뻗는 심봉부(27)로 구성되어 있다. 파지부(26)의 내측 상단부에는 통체(3)의 확경부(14)가 감합 가능한 원통형의 공간(28)이 형성되고, 또 그 하방은 나각(螺刻)되어, 나사에 나사 결합 가능하게 되어 있다. 심봉부(27)는 그 하단부(29)가 편형으로 형성되고, 하단부(29)에 밀폐 덮개(5)가 착탈 가능하게 마련되어 있다(도 1 참조). 밀폐 덮개(5)는 실리콘 고무제이다.

[0082] 상기한 기구에 의한 혈액 분리 방법의 상세는, 일본 특허공보 제3597827호의 단락 번호 0023~0026과, 도 12 및 도 13에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 명세서에 인용된다.

[0083] 본 발명의 혈액 검사 키트에 포함되는 각각의 요소의 개수는 특별히 한정되지 않으며, 각각 1개여도 되고, 2개 이상의 복수여도 된다.

[0084] 본 발명의 혈액 검사 키트는, 혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액과, 희석된 혈액 검체를 수용하기 위한 용기와, 또한 목적에 따라 상기한 임의의 요소를, 이들을 수납하는 수납 용기에 수납한 형태로서 제공할 수 있다.

[0085] 이하의 실시예에 의하여 본 발명을 설명하지만, 본 발명은 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.

[0086] 실시예

[0087] (참고예 1)

[0088] 1. 미량 혈액 검체를 희석시킨 희석액의 조제

[0089] 지원한 환자에게, 사전 동의를 얻은 후에 정맥으로부터 주사기로 채취한 7mL의 혈액을 채혈관에 얻었다. 이 채혈한 혈액으로부터, 80 μ L, 60 μ L, 40 μ L, 30 μ L, 20 μ L를 각각 10회씩 마이크로 피펫으로 정확하게 청량하고, 하기와 같이 조제한 희석액-1의 360 μ L에 각각 혼합했다. 얻어진 혼합물을 필터를 통과시킴으로써 혈구 성분을 분리하여, 희석 혈장을 얻었다. 얻어진 희석 혈장을 시료로 하고, 생화학 자동 분석 장치를 이용하여, 생체 성분의 각 농도를 측정했다.

[0090] (희석액-1의 조성)

[0091] 희석액-1을 이하의 조성으로 조제했다. 침투압은, OSMOATAT OM-6040(아크레이(주)사제)을 이용하여 측정한 값을 표시했다. 침투압의 단위는, 용액의 물 1kg이 갖는 침투압으로, 이온의 밀리몰수를 나타낸다.

[0092] HEPES 50mmol/L

[0093] 2-아미노-2-메틸-1-프로판올(AMP) 50mmol/L

[0094] D-만니톨 284mmol/L

[0095] 염화 리튬 1mmol/L

[0096] EDTA-2K 0.8mmol/L

[0097] PALP(파리독살 인산) 0.05mmol/L

[0098] 싸이아벤다졸 0.0001질량%

[0099] 아미카신 황산염 0.0003질량%

[0100] 황산 카나마이신 0.0005질량%

[0101] 메로페넴 삼수화물 0.0005질량%

[0102] 침투압 355mOsm/kg

[0103] pH 7.4

[0104] 2. 나트륨 이온 농도의 측정

[0105] 1.에서 조제한 각각의 희석액에 대하여, 나트륨 이온 농도의 측정을 행했다. 측정에는, β -갈락토시다제가 나트륨으로 활성화되는 것을 이용하여, 각각의 희석액 중의 나트륨 이온 농도와 β -갈락토시다제 활성이 비례 관계에 있는 것을 이용한 효소 활성법에 의하여 측정했다. 구체적으로는, 혈액의 희석액을 나트륨 이온을 포함하지 않는 정제수로 5배 희석시킨 후, 3 μ L를 청량하고, 하기와 같이 조제한 제1 시약 52 μ L를 첨가하여, 37°C에서 5분간 가온했다. 이 혼합물에, 하기와 같이 조제한 제2 시약을 26 μ L 첨가하고, 1분간의 흡광도의 변화를 JCA-BM6050형 생화학 자동 분석 장치(니흔 덴시(주)사제)를 이용하여 주파장 410nm, 부파장 658nm로 흡광도를 측정함으로써 구했다. 미리 작성한 검량선으로부터, 나트륨 이온 농도를 측정했다.

[0106] (나트륨 이온 측정 시약의 조제)

[0107] 이하의 조성의 나트륨 이온 측정 시약을 조제했다.

[0108] 제1 시약

[0109] HEPES · LiOH(pH8.0) 100mmol/L

[0110] D-만니톨 60mmol/L

[0111] N-아세틸시스테인 30mmol/L

[0112] 황산 마그네슘 1.52mmol/L

[0113] β -갈락토시다제 1.1kU/L

[0114] Triton(등록 상표) X-100 0.05질량%

[0115] 제2 시약

[0116] HEPES · LiOH(pH8.0) 100mmol/L

[0117] o-나이트로페닐- β -D-갈락토파라노사이드 15mmol/L

[0118] 상기와 같이 구한 희석액 중의 나트륨 이온 농도(X)와, 혈액의 혈장 중의 나트륨 이온 농도의 표준값(Y)으로부터 각각의 희석액의 희석 배율(Y/X)을 구하여, 채혈한 혈액(80 μ L, 60 μ L, 40 μ L, 30 μ L, 20 μ L)의 각각에 대하여 10개씩 제작한 시료의 희석 배율의 평균값과 희석 배율의 변동 계수인 CV(coefficient of variation)(%)를 구했다. 결과를 표 1에 나타냈다.

[0119] [표 1]

| 채혈량(μ L) | 희석액-1의 양(μ L) | 희석 배율 (10회 측정의 평균값) | 희석 배율의 CV(%) (10회 측정) |
|---------------|--------------------|------------------------|--------------------------|
| 80 | 360 | 9.1 | 3.3 |
| 60 | 360 | 11.5 | 3.5 |
| 40 | 360 | 17.3 | 3.9 |
| 30 | 360 | 22.8 | 4.3 |
| 20 | 360 | 33.7 | 4.7 |

[0120] (희석액 중의 리튬 이온의 측정)

[0122] 희석액에 첨가한 리튬 이온의 측정은, 킬레이트 비색법(할로젠화 포르파린 킬레이트법: 퍼플루오로-5,10,15,20-테트라페닐-21H,23H-포르파린)에 의하여 행했다. 구체적으로는, 혈액의 희석액을, 리튬 이온을 포함하지 않는 정제수로 4.5배로 희석시킨 후, 5 μ L를 침량하여 하기와 같이 조제한 제3 시약 55 μ L를 첨가하여, 37°C에서 10분간 가온했다. 이 혼합물에 대하여, 1분간의 흡광도의 변화를, JCA-BM6050형 생화학 자동 분석 장치(니혼 텐시(주)사제)를 이용하여, 주파장 545nm, 부파장 596nm로 흡광도를 측정함으로써 구했다. 미리 작성한 검량선으로부터, 리튬 이온의 농도를 측정했다.

[0123] (리튬 이온용 측정 시약의 조제)

[0124] 이하의 조성의 리튬 이온용 측정 시약을 조제했다.

[0125] 제3 시약

[0126] 퍼플루오로-5,10,15,20-테트라페닐-21H,23H-포르파린 0.05질량%

[0127] 다이메틸설폐사이드 5질량%

[0128] 트라이에탄올아민 2질량%

[0129] 폴리에틸렌글라이콜-t-옥틸페닐에터 2질량%

[0130] 도데실 황산 나트륨 2질량%

[0131] 상기와 같이 구한 혈액 검체를 희석시킨 희석 후의 희석액 중의 리튬 이온 농도 (A)와, 혈액을 희석시키기 전의 희석액 중의 리튬 이온 농도 (B)로부터 각각의 희석액의 희석 배율[B/(B-A)]을 구하고, 채혈한 혈액(80 μ L, 60 μ L, 40 μ L, 30 μ L, 20 μ L)의 각각에 대하여 10개씩 제작한 시료의 희석 배율의 평균값과 희석 배율의 변동 계수인 CV(%)를 구했다. 결과를 표 2에 나타냈다.

[0132] [표 2]

| 채혈량(μ L) | 희석액-1의 양(μ L) | 희석 배율 (10회 측정의 평균값) | 희석 배율의 CV(%) (10회 측정) |
|---------------|--------------------|------------------------|--------------------------|
| 80 | 360 | 9.2 | 2.9 |
| 60 | 360 | 11.2 | 3.9 |
| 40 | 360 | 18.5 | 6.1 |
| 30 | 360 | 21.9 | 8.7 |
| 20 | 360 | 34.2 | 11.3 |

[0134] 표 1 및 표 2의 결과로부터, 희석액 중에 존재하는 표준 물질을 이용하여 희석 배율을 측정하는 경우에는, 채혈량이 40 μ L 이하이고, 희석 배율이 14배 이상이면, 반복 재현성의 편차가 커지지만, 혈액 중에 존재하는 항상성이 있는 성분인 나트륨 이온을 표준 물질에 이용한 경우에는, 채혈량 80 μ L이며 희석 배율 9.1배로부터, 채혈량 20 μ L이고 희석 배율 33.7배에 있어서도, 희석 배율의 측정값의 반복 재현성은 매우 양호하다는 것을 알 수 있다.

[0135] (실시 예 1)

[0136] 1. ALT(알라닌 트랜스아미나제) 및 AST(아스파라진산 아미노트랜스페라제)의 측정

[0137] 참고예 1에서 주사기를 이용하여 정맥으로부터 채혈한 직후에, 채혈한 동일한 환자의 손가락 끝으로부터 랜싯을 이용하여 혈액을 손가락 끝의 피부 밖으로 배어 나오게 한 후에, 20 μ L~40 μ L 정도의 액체를 흡수할 수 있는 스펜지를 이용하여 혈액을 환자에게 빨아들이게 하고, 참고예 1에서 사용한 희석액과 동일한 조성의 희석액 360 μ L 중에 혈액을 흡수한 스펜지를 담가, 충분히 스펜지로부터 혈액을 희석액 중으로 추출하고, 필터로 여과하여 혈구 성분을 분리하여, 혈액 검체의 혈장 성분의 희석액을 얻었다. 희석액을 밀폐시켜, 검사가 가능한 다른 시설로 반송하고, 그 후, 희석액을 취출하여, 참고예 1의 혈액 중의 나트륨 이온을 이용한 희석 배율의 측정 방법과 동일하게 하여, 희석 배율을 측정한 바, 22.3배의 희석 배율이었다. 이점에서, 채혈량은 30 μ L 미만인 것을 알 수 있었다. 이 희석 검체 중의 ALT, AST의 농도를, 시판 중인 측정 키트(트랜스아미나제 CII-테스트 와코: 와코 준야쿠 고교(주)사제)를 이용하여 측정한 바, 참고예 1의 채혈량 30 μ L에서의 샘플로 나트륨 이온 농도를 이용하여 측정한 희석 배율을 근거로 하여 분석한, ALT, AST의 측정값과 대략 일치한 결과가 얻어졌다.

[0138] (실시예 2)

[0139] 실시예 1에 있어서, 나트륨 이온을 이용한 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율의 측정을 행한 희석액을 이용하여, 하기에 나타내는 방법에 의하여, 염화물 이온 농도를 측정했다.

[0140] (희석액 중의 염화물 이온 농도의 측정)

[0141] 이온 선택 전극(ISE)을 이용하여 염화물 이온의 측정을 행했다. 염화물 이온에 선택적으로 응답하는 이온 선택 전극과 참조 전극 간에 생체 시료를 흘려, 양 전극 간에 발생한 발전압으로부터 염화물 이온 농도를 산출했다.

[0142] 혈장의 희석액 중의 나트륨 이온 농도의 측정으로부터 구한 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율에 대하여, 희석액 중의 염화물 이온 농도의 측정값과, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 염화물 이온 농도의 평균값 102mmol/L로부터 구한 희석 배율이, 동일한 값이라는 결과가 얻어졌다. 이로써, 실시예 1의 나트륨 이온 농도로부터 구한 희석 배율의 측정이 정상적으로 행해지고 있는 것을 알 수 있으며, 측정의 검증이 가능한 것을 알 수 있었다.

부호의 설명

[0143] 1 혈액 분리 기구

2 채혈 용기

3 통체

4 캡 피스톤

5 밀폐 덮개

6 캡

7 패킹

8 나사부

9 계지부

10 바닥부

11 다리부

12 슬릿 흠

13 희석액

14 확경부

15 박육부

16 본체부

18 측정부

19 계지 돌기부

20 외측 플랜지부

21 여과막

22 커버

26 과지부

27 심봉부

28 공간

29 하단부

31 단차부

33 상단부

34 정상부

도면

도면1

