

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) Int. Cl.⁶
G01N 33/48

(45) 공고일자 2000년12월15일

(11) 등록번호 10-0276144

(24) 등록일자 2000년09월27일

(21) 출원번호	10-1992-0023170	(65) 공개번호	특1993-0013730
(22) 출원일자	1992년12월03일	(43) 공개일자	1993년07월22일
(30) 우선권주장	07/802,593 1991년12월05일 미국(US)		
(73) 특허권자	바이엘 코포레이션	원비카인드 케니쓰 에프	
	미국 뉴욕주 10591 태리타운 베네딕트 애브뉴 511마운트 시나이 스쿨 오	브 메디신 오브 더 씨티 유니버시티 오브 뉴욕	슬로에인 엘먼
	미국 뉴욕 10029 뉴욕 원 구스타브 엘 레비 플레이스		
(72) 발명자	그레고리 엠. 코올라		
	미합중국 뉴저지 07003 블룸필드 뉴웰 드라이브 61		
	데니얼 벤-데이비드		
	미합중국 뉴욕 10588 슈럽 오크 아스펜 로드 1335		
	알버트 쿠포		
	미합중국 뉴욕 10583 스카스데일 원딩 레인 11		
	소피 에스. 팬		
	미합중국 뉴욕 10546 밀우드 글렌우드 로드 21		
	제너 피셔		
	미합중국 뉴저지 07640 해링톤 파크 노마 로드 144		
	그레이스 이. 마틴		
	미합중국 뉴욕 10549 마운트 키스코 파크 드라이브 99		
	레오나드 온스타인		
	미합중국 뉴욕 10607 화이트 플레인즈 빌통 로드 5		
(74) 대리인	이병호		

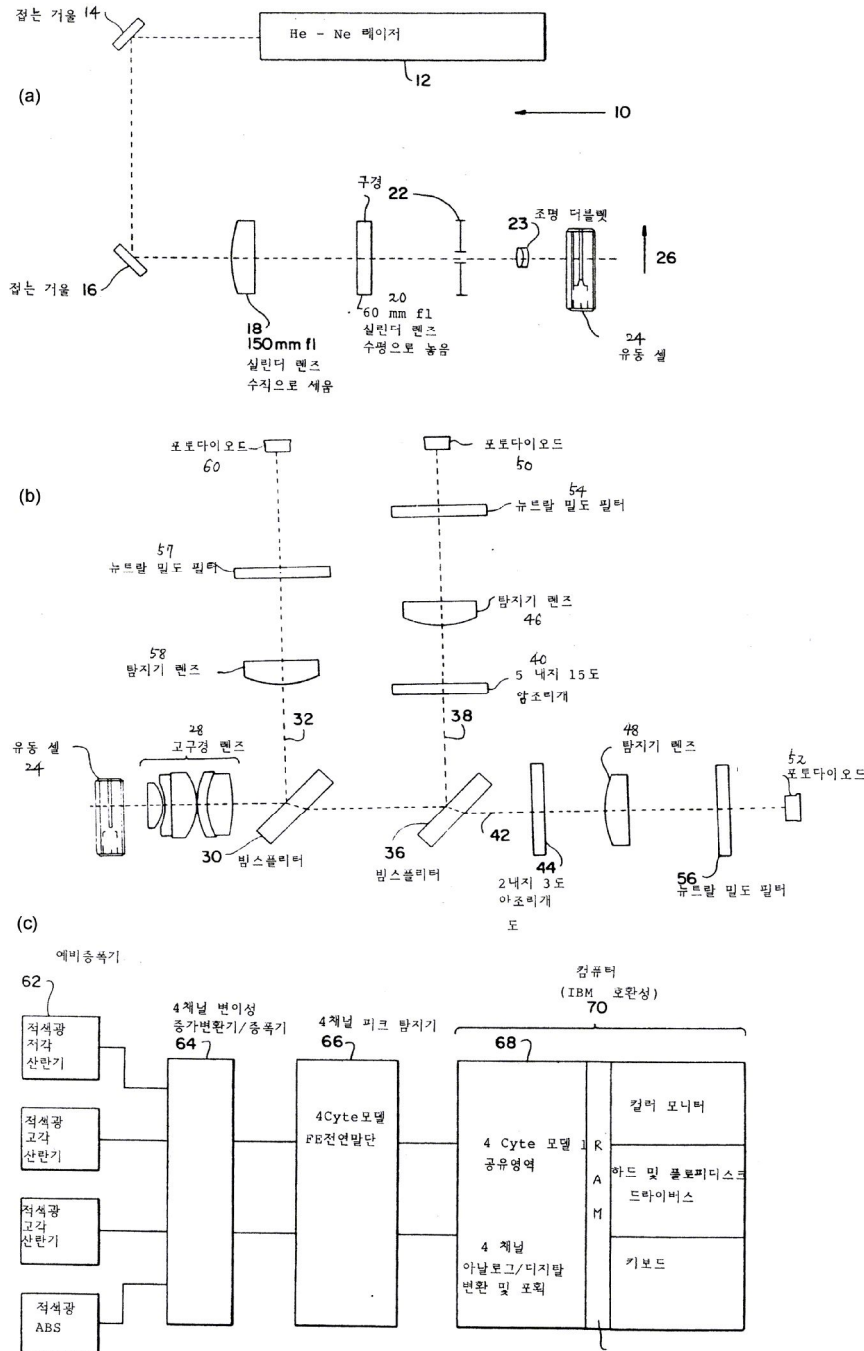
심사관 : 김상희

(54) 전혈 중 망상 적혈구의 동정 및 특성화에 사용하는 시약 조성물 및 이를 사용한 세포동정방법

요약

혈액 샘플중 망상 적혈구 염색을 위한 유기 양이온성 염료 및 약 6 내지 약 9의 pH를 유지하기 위한 완충용액을 포함하는 시약 조성물을 사용하여 망상 적혈구 및 성숙한 적혈구 세포를 특성화하고 판별하는 방법이 기술되어 있다. 염료는 청색 흡광 염료인 옥사진 750 또는 뉴 메틸렌 블루일 수 있다. 양쪽 이온성 계면활성제가 망상 적혈구 및 적혈구의 등용적 측정적 구형화 수행을 위해 시약 조성물중 포함하고, 시약 조성물 및 전혈 샘플 혼합물을 유동 혈구 계산기의 감지 영역을 통해 통과시키는 경우, 각각의 세포에 의해 산란되고 흡수된 광이 측정되고, 적혈구는 망상 적혈구로부터 판별되며, 각각의 망상 적혈구 또는 적혈구의 용적, 헤모글로빈 농도 및 헤모글로빈 함량, 및 평균 망상 적혈구 또는 적혈구의 세포용적, 평균 혈구 헤모글로빈 농도 및 평균 세포 헤모글로빈이 측정된 나란히 배열된 세포 용적 및 헤모글로빈 농도로부터 계산된다. 하나의 방법은 또한 위-흡광에 대한 측정된 흡광 시그널 조절을 포함한다.

대표도



명세서

[발명의 명칭]

전혈 중 망상적혈구의 동정 및 특성화에 사용하는 시약 조성물 및 이를 사용한 세포 동정 방법

[도면의 간단한 설명]

제1a도, 제1b 및 제1c도는 본 발명의 원리를 실행하기 위한 산란/흡광 유동 혈구계산기의 조명 광학장치, 탐지 광학 장치 및 탐지 시그널 프로세싱 시스템 각각을 도식적으로 나타낸 것이며;

제2a(1)도 및 2b(1)도는 적색광 산란 대 적색광 흡수의 사이토그램(cytogram)이고, 제2a(2)도 및 2b(2)도는 실시예 1에 따른, 옥사진(Oxazine) 750 및 뉴 메틸렌 블루로 각각 염색된 부분적 구형인 적혈구 및 망상적혈구를 함유하는 전혈 샘플에 대한 적색 광 낮은 각 산란 대 적색 광 높은 각 산란의 사이토그램을 나타낸 것이며;

제3a(1)도 및 3b(1)도는 적색광 산란 대 적색광 흡수의 사이토그램이며, 제3a(2)도 및 제3b(2)도는 실시예 2에 따른, 옥사진 750 및 뉴메틸렌 블루로 각각 염색된 완전히 구형인 적혈구 및 망상적혈구를 함유

하는 전혈 샘플에 대한 적색광 낮은 각 산란 대 적색광 높은 각 산란의 사이토그램을 나타낸 것이며;

제4a도 및 제4b도는 실시예 4에 따른, 옥사진 750으로 염색된 망상적혈구에 대한 MCV와 MCHC 데이터 사이의 상호관계를 보여주는 것이며;

제5a(1)도 및 제5b(1)도는 실시예 3에 따른, 적색광 산란 대 적색광 흡수의 사이토그램이며 제5a(2)도 및 제5b(2)도는 가상 흡광(pseudo-absorption) 보정을 사용하여 옥사진 750 및 뉴 메틸렌 블루로 각각 염색된 완전히 구형인 적혈구 및 망상적혈구를 함유하는 전혈 샘플에 대한 적색 광 낮은 각 산란 대 적색 광 높은 각 산란의 사이토그램을 나타낸 것이며;

제6도는 실시예 3에 따른 NCCLS 참조방법과 본원 발명의 옥사진 750 함유 시약을 사용하여 전혈 샘플중에서 탐지된 망상적혈구의 백분율의 비교를 나타낸 것이며;

제7도는 "+"로 동정되는 망상적혈구 및 "■"로 동정되는 적혈구를 사용하여 HC 대 V의 사이토그램을 나타낸 것이며;

제8a도 및 제8b도는 적색 광 산란 대 적색광 흡수의 사이토그램 및 염색되지 않은 구형이 아닌 적혈구에 대한 적색광 높은 각 산란 대 적색광 낮은 각 산란의 사이토그램을 각각 나타낸 것이며; 제8c도 및 제8d도는 염색되지 않은 구형의 적혈구 세포에 대한 유사한 사이토그램이며; 제8c도는 가상 흡광에 대해 보정된 것이다.

[발명의 상세한 설명]

본 발명은 전혈(whole blood) 샘플중의 세포를 동정하고 특성화하는데 사용하는 시약 조성물 및 이의 용도에 관한 것이고, 더욱 특히 광 산란 및 흡광 유동 혈구계산(flow cytometry) 기술에 의해 전혈 샘플중의 망상적혈구를 동정하고 동시에 다량의 개별적 망상적혈구 및 적혈구의 용적, 헤모글로빈 농도 및 헤모글로빈 함량을 측정하는데 사용하는 시약 조성물 및 이의 용도에 관한 것이다.

모든 고등 동물에서, 혈액은 다양한 종류의 현탁된 소체(corpuscle)들(적혈구, 백혈구 및 혈소판)이 존재하는 수성 체액부(혈장)로 구성된다. 혈장은 대략 90%의 물, 9%의 단백질, 0.9%의 염 및 기타 미량의 물질(예: 당, 요소, 요산 등)로 이루어진 조성물이다.

말초혈(즉, 골수밖의 혈액)의 세포 또는 소체는 두가지 주요 그룹: 적혈구(최우선의 목적은 산소를 운반하는 것이다) 및 백혈구(최우선의 기능은 면역 시스템과 관련되어 체내에 대한 외래 물질을 파괴시키는 데 관여한다)로 나뉘어진다.

상기 두가지 주요 그룹이외에, 혈액은 또한 지혈(hemostasis)에서 중요한 소위 혈소판을 함유한다.

적혈구 성숙의 최종 단계는 이들이 골수로부터 방출된 후 말초혈 중에서 순환하고 있는 동안 일어난다. 이러한 미숙한 적혈구 또는 "망상적혈구"는 핵을 소실하게 됨으로써 분열하거나 리보핵산(RNA)을 합성할 수 있는 능력을 상실하게 된다. 이러한 기능이 소실됨에도 불구하고, 망상적혈구는 여전히 대사적으로 활성이며 한동안은 단백질을 합성할 수 있고 헴(heme)의 합성을 위해 철을 흡수할 수 있고, 에너지-풍부 상태를 유지하기 위해 요구되는 필수적인 대사적 반응을 수행할 수 있다. 이들 세포는 대개 이들을 양이온성 염료의 용액에 노출시켜 양이온성 염료와 망상적혈구내의 음이온성 RNA가 반응하여 망상적혈구내에 급게 또는 거칠게 염색된 "망상질(reticulum)"로 침전하게 함으로써(이러한 특성으로 망상적 혈구라 명명됨) 성숙한 적혈구와 가장 쉽게 구별된다.

망상적혈구는 정상적으로 총 적혈구 집단의 약 0.5 내지 2%를 차지하지만, 이러한 함량은 비정상적인 조건하에서 극적으로 변할 수 있다. 예를 들어, 망상적 혈구의 계산치는 혈액 장애를 연구하는데 있어서 진단 보조제로서, 출혈(hemorrhage)에 따른 적혈구 재생의 지표로서, 또한 특정 악성 질환의 화학요법에 초기 독성을 탐지하는데 있어서 다년간 사용되어 왔다.

핵산(RNA 및 DNA)은 실질적으로 양이온성 염료로 염색될 수 있는 다가음이온이다. 망상적혈구내의 RNA는 단지 몇 개의 양이온성 염료[브릴리언트 크레실 블루(Brilliant Cresyl Blue; BCG), 뉴 메틸렌 블루(New Methylene Blue; NMB), 아우라민 O(Auramine O; AuO), 아크리딘 오렌지(Acridine Orange; AO), 티아졸 오렌지(Thiazole Orange; TO) 및 피로닌 Y(Pyronine Y; PY)]로만 염색될 수 있다. 상기 염료중에서, 단지 서브-세트(sub-set)만이 세포로 급속히 투과되어(그럼으로써 염색되는)질 수 있다. 서브-세트는 NMB 및 AO를 포함한다. 망상적혈구의 염색 속도 및 정도는 염료의 세포와 농도, 망상적혈구 막을 통한 염료의 침투속도, 및 양이온성 염료와 망상적혈구 RNA 사이의 특이결합 상수의 세기에 따라 다르다. 후자의 두가지 특성은 상이하며 각 염료에 대해 용이하게 예측할 수 없으므로 시행착오는 유용한 망상적혈구 염색물을 찾기 위해서 필수적이다. 모든 양이온성 물질이 완전히 적혈구(및 망상적혈구)막을 침투할 수 있는 것은 아니며 필수적으로 양이온을 동반하는 음이온의 성질은 양이온성 물질이 급속히, 느리게 투과하거나 또는 전혀 침투하지 않거나 하는 여부에 영향을 미칠 수 있다. 소수성 분자는 일반적으로 친수성 분자보다 빨리 적혈구 막으로 침투하며 작은 분자는 일반적으로 큰 분자보다 빨리 막을 침투한다. 망상적혈구를 염색할 수 있는 상기 양이온성 염료와 혼합된 염 또는 완충액의 서브-세트만이 급속한 염색을 허용하는데, 즉, "부적당한" 완충액과 "적당한" 염료는 망상적혈구를 염색하기 위해 "연구한 시간"을 소모할 것이다. 또 다시, 시행착오가 망상적혈구를 염색하는 혼합물의 유용한 제형물을 발견하기 위해 필요한 것이다. 따라서, 지침으로 이용될 수 있는 다양한 "법칙"에도 불구하고, 어떤 조건하에서 어떤 특수한 양이온성 염료가 급속히 투과되어 망상적 혈구를 염색할 수 있는지를 사전에 예측하는 것은 아직까지 불가능하다.

유량 혈구계산법의 기본 개념은 필수적으로 한번에 특수 감지 영역을 통해 세포들을 통과시키는 것이다. 전형적으로, 유체역학적 포커싱을 이용하여, 단일 세포들은 산란광, 흡광 또는 형광성 광을 측정하기 위한 포커싱된 광원 및 탐지 시스템으로 구성된 감지 영역을 통해 통과된다.

광을 차단하는 입자의 광에 대한 효과는 여러 방법으로 탐지될 수 있다. 일반적으로, 입자는 입자가 현탁되어 있는 매질의 굴절률과는 다른 굴절률을 갖는다.

그러므로, 입자는 굴절률 차이, 입자의 크기, 입자의 모양 및 굴절률 및 구조내에서의 내부 변이, 및 조명광의 파장에 따라 달라지는 다양한 강도로 각의 범위를 통해 조명되는 광을 산란시킬 것이다. (동질성 구형을 위해서는 미 산란 이론(Mie Scattering Theory)이 산란광의 분포 및 강도에 대한 완전한 기술을 제공해 준다).

또한 입자는 특정 입사광을 흡수할 수 있다. 후자의 경우, 일부의 흡광은 흡광의 파장보다 더 긴 파장에서 전형적으로 형광성 광으로서 재방출될 수 있다.

상기 및 기타 효과는 산란광, 비산란광 및 형광성광의 상이한 각 간격을 측정하기 위해 배열된 광 탐지기를 측정될 수 있다.

입자가 세포 만큼, 전형적으로 직경 $15\mu\text{m}$ 이하 정도로 작으면, 특히, 현탁 스트림의 조명된 부분에 떨어지는 초당 광자수에 비교되는 고속(전형적으로 초당 큰 간격 세포 100 내지 1000개)에서의 통과에 의해 영향 받는 조명 빔에 있는 [그리고 흡광 탐지기(및 심지어 형광 탐지기)의 배경 조명에 비교되는 광자의 수는 매우 작다. 그러므로, 입자들 사이의 작은 입자 차이의 탐지의 감수성의 한계는 광자 유동(적어도 광원의 고유 "밝기"에 의존한다)에 극적으로 의존적이고 광자유동의 혼란이 얼마나 큰가는 입자들 사이의 기타 작고 큰 차이에 의해 발생하는 것이다.

흡광, 산란 및 형광 유동 혈구계산법에서 간섭 노이즈(noise)의 주요 공급원은 각 종류의 시그널에 대해 매우 상이할 수 있다. 가장 근접하게는, 염색된 또는 염색되지 않은 세포로부터의 형광 시그널의 크기는 시그널이 발생하는 세포의 모양 또는 배향에 의해서는 거의 영향받지 않는 반면, 산란 및 흡수 시그널은 모양 및 배향에 의해 매우 강하게 영향 받는다. 극단의 예로서, 사람 적혈구의 자연적인 양쪽-오목한 모양(biconcave)은 이들이 발생하는 흡수 및 산란 시그널에 중요한 영향을 미치며, 전형적이고 전통적으로 염색된 망상적혈구의 작은 흡수 시그널을 더 크게 한다(제8a도 및 제8b도 참조). 이러한 이유로 본 발명에 선행한 기술에서는 망상적혈구를 계산하기 위해서 또는 일반적으로 세포중 저 농도의 흡광·분자를 측정하는데 흡광 유동 혈구계산법이 유용하지 않았다. 한편, 세포 또는 이들의 주위 매질(예를 들어, 비결합된 형광 염료)중에 있는 약한 형광 물질은 흡광 또는 산란 시그널에 실질적으로 영향을 미치지 않는다.

전혈의 항응고 샘플중 망상적혈구의 백분율을 계산하는데 유용할 수 있는 수개의 반-자동화 방법이 이용 가능하다. 기존의 각각의 방법에서, 유기 양이온성 염료, 예를 들어, A0, Au0 또는 T0를 함유하는 희석제는 망상적혈구내의 RNA를 염색하기 위해 사용된다. 염료는 세포막을 투과하여 RNA와 결합하고 대개는 각 망상적혈구내에 "망상질"을 침전시킨다. 염색된 RNA로부터의 시그널의 양은 대략적으로 RNA 함량에 비례한다. 적당한 염색후, 적당한 여기 광원(전형적으로 488nm에서 방출되는 아르곤 이온 레이저)을 갖는 형광 유동 혈구계산기 및 방출 탐지 시스템은 유출액에서 망상적혈구의 백분율을 결정하기 위해 사용될 수 있다.

형광 염료 및 유동 혈구계산법을 사용하는 전혈 샘플중 망상적혈구를 판별시키기 위한 예시적 방법은 특허문헌에 기술되어 있다.

예를 들어, 미합중국 특허 제3,684,377호에서 아담스(Adams) 및 카멘츠키(Kamentsky)는 사람 혈액을 위한 정상 생리적 범위내에 있는 pH 인자 및 삼투압 농도를 갖는 아크리딘 오렌지의 수성 용액을 포함하는 자동 혈액 분석용 염료 조성물을 기술하고 있다. 염료 조성물은 적혈구 산란 시그널과 함께 형광 시그널의 존재 또는 부재를 측정함으로써 망상적혈구를 계산하는데 사용될 수 있다.

미합중국 특허 제3,883,247호에서 아담스(Adams)는 10^{-6} 내지 10^{-5} g/ml 농도의 아크리딘 오렌지를 포함하는 염료 조성물을 사용하는, 아담스(Adams)와 카멘츠키(Kamentsky)의 방법과 유사한 방법을 기술하고 있다.

미합중국 특허 제4,336,029호에서 네이탈(Natale)은 약 7.4의 pH 및 등장성삼투압 농도의 염료 A0, 시트레이트 이온 및 파라포름알데하이드의 수성 용액을 포함하는 시약 조성물을 기술하고 있다. 다양한 성분의 농도는 망상적혈구 및 혈소판의 염료 흡수를 최대화하고 혈액 샘플 및 시약 조성물의 혼합이 2 내지 5분내에 달성되도록 하는 염료의 흡수가 제공되도록 선택된다. 네이탈 시약(Natale reagent)을 이용한 혈소판 및 망상적혈구를 탐지하는 자동화된 방법은 미합중국 특허 제4,325,706호에서 거쉬만(Gershman) 등에 의해 기술되었다.

미합중국 제4,707,451호에서 세이지(Sage) 2세에 의해 기술된 시약에서, 망상적혈구는 티오폴라빈 T 또는 크리사닐린으로 염색된다. 전혈 샘플은 등장성 염수 용액중 염료(0.2mg/ml)의 $25\mu\text{l}$ 분취량을 항응고 전혈 $10\mu\text{l}$ 와 혼합하고 약 7분 동안 항온처리하여 효과적으로 염색됨이 밝혀졌다.

미합중국 특허 제4,883,867호에서 리(Lee) 등은 RNA 또는 DNA를 염색하기 위한 염료 조성물을 기술하고 있다. 염료 조성물은 바람직한 염료 화합물로서 T0를 포함한다. 망상적혈구는 30분의 최소 시간내에 염색된다.

유동 혈구 계산 기술을 사용한 망상적혈구 계산을 위한 시약이 미합중국 특허 제4,971,917호에서 구로다(Kuroda)에 의해 기술되어 있는데, 이 시약은 형광 유동 혈구계산법에 의해 분석되는 경우 성숙한 적혈구가 망상적혈구로서 착오되어 계산되는 것을 방지하기 위해 염료(예: Au0)에 의한 성숙한 적혈구의 비-특이적 염색을 감소시키는 카보네이트 염을 함유한다.

미합중국 특허 제4,981,803호는 2개의 용액, 즉, 비-수성 용액중에 염료 Au0가 용해되어 있는 염색을 위한 스톱 용액 및 적정 염색 조건을 만족시키는 완충 용액을 포함하는 망상적혈구 계산용 시약을 기술하고 있다.

Au0를 포함하는 형광 유동 혈구 계산 기술을 위한 또 하나의 망상적혈구 염색 시약은 미합중국 특허 제4,985,176호에서 구로다(Kuroda) 등에 의해 기술되어 있다. 이 참조문헌은 어느 경우에서나 시약과 샘플의 항온처리 시간을 30초 내지 20분으로 교시하고 있다.

상기 명시한 바와 같이, 단지 양이온성 염료의 작은 서브-세트만이 망상적혈구를 선택적으로 염색하며 이들중 더 작은 서브-세트만이 망상적혈구를 급속히 투과한다. 본 발명의 양이온성 염료 화합물은 5분이 내에 망상적혈구를 염색하여 유동 혈구계산법에 의한 망상적혈구 분석은 혈액 샘플 및 시약 조성물이 함께 혼합된 후 즉시 수행될 수 있으므로 본 발명은 자동화된 방법을 위해 용이하게 적용될 수 있다.

망상적혈구를 정량하기 위한 4급화된 A0 유도체가 본원에서 참조로 인용되는 공개유종인 미합중국 특허 원 제07/444,255호(1989.1.12 출원)[참조: "Compounds and Reagent Composition and Their Use in the Quantitative Determination of Reticulocyte in Whole Blood"란 명칭으로 Fan 및 Fischer가 출원]에 기술되어 있다. Fan 등에 의하면 시약은 파라포름알데하이드 및 칼륨 옥살레이트를 포함하는 완충용액중 A0 유도체의 1mℓ당 10-6g을 함유한다. 이러한 시약 조성물은 망상적혈구를 염색하여 혈액 샘플중 망상적혈구의 정량적 형광 유동 혈구 계산 분석을 가능하게 해준다. 이 시약 또는 상기 언급된 시약중 어떤 것도 하기 언급될 배향 노이즈(noise) 문제를 방지하는 구형화제를 함유하지 않으며, 어떤 것도 기타 진단학적으로 중요한 파라미터, 예를 들어, 셀-바이-셀(cell-by-cell)에 기초하여 망상적혈구 및 적혈구의 용적 및 헤모글로빈 함량의 동시 측정을 허용하지 않는다.

Sapiro 및 Stevens는 유동 혈구 계산에 의해 DM 함량을 측정하는데 옥사진 750의 사용을 기술하고 있다[참조: Flow Cytometry of DNA Content Using Oxazine 750 or Related Laser Dyes With 633nm Excitation, Cytometry Vol. 7, pp. 107-110 (1986)]. 세포는 10 μ m 내지 30 μ m의 옥사진 750으로 염색되고 DNA 측정을 위한 에탄올의 첨가로 고정된다. Sapiro 및 Stevens는 옥사진 750이 RNA를 염색하지 않는 것 같다고 주장한다. 더우기, 옥사진 750을 사용한 이러한 프로토콜은 망상적혈구 계산 및 또는 기타 진단학적으로 중요한 적혈구 파라미터, 예를 들어, 셀-바이-셀에 기초하여 용적 및 헤모글로빈 농도의 동시 측정을 허용하지 않는다.

상기 언급한 바와 같이, 흡광 또는 산란 광 유동 혈구 계산기의 사용을 통한 망상적혈구 정량의 단점은 배향 노이즈 및 망상적혈구 시그널 사이를 분별할 수 없다는 것이다. 사람 및 많은 기타 포유동물 적혈구는 양쪽이 오목한 디스크 모양을 갖는다. 이러한 비대칭성 적혈구에 의해 산란된 광의 양은 세포의 배향으로 다양해진다. 따라서, 2개의 동일한 적혈구는 감지 영역내에서 이들의 배향이 동일하지 않는 한 감지 영역을 통해 통과될 때 매우 다른 산란광 및 흡광 시그널을 발생시킨다. 이 결과 정상 적혈구의 산란 및 흡광의 크기 분포가 매우 광범위하고 바이모달(bimodal)이라는 것이다(제8a도 및 제8b도 참조). 소량의 염색된 망상적혈구 하나에 존재한다는 점을 제외하고는 동일한 2개의 적혈구는 일반적으로 이들의 상이한 배향때문에 산란 광 및 흡광 탐지기에 대해 큰 시그널 차이를 발생한다. 이것이 발생하면, 염색된 망상질이 발생할 수 있는 매우 작은 차이는 배향 노이즈에 묻히게 된다.

미합중국 특허 제4,575,490호 및 제4,412,004호에서 Kim 및 Ornstein은 유동혈구계산기에서 적혈구의 용적의 측정시 배향 노이즈를 제거하는 방법을 교시하고 있다. 이들의 방법은 세포 사이의 어떤 배향 차이를 제거하기 위한 비염색된 적혈구의 등용적식(isovolumetric) 구형화법을 수반하여 더 정밀하고 정확하게 세포 용적의 측정을 가능하게 한다. 각 적혈구 세포는 양쪽이 오목한 모양으로부터 계면활성 구형화제에 의해 완전한 구형으로 전환된다. "완충" 단백질 및/또는 알데하이드 고정제는 구형화제와 함께 사용되어 적혈구의 용혈(lysis)을 방지한다. Kim 및 Ornstein에 의해 기술된 음이온성 계면활성제는 급속히 반응하여, 망상질을 염색하고 투과하기 위해 사용된 양이온성 염료를 침전시키는 것으로 밝혀졌기 때문에 망상적혈구 염색물과 함께 사용될 수 없다.

미합중국 특허 제4,735,504호에서 Tycko는 항응고 전혈 샘플중 적혈구에 대한 개별적 및 평균 적혈구 용적(MCV), 및 개별적 및 평균 소체 헤모글로빈 농도를 측정하기 위한 완전히 자동화된 방법 및 수단을 제공하는 유동 혈구 계산기인 TECHNICONH 1시스템의 적혈구 채널을 기술하고 있다. 이 방법에서, 2 μ l 분취량의 전혈 샘플중의 적혈구는 우선 회석된 다음 방금 기술된 Kim 및 Ornstein 방법을 사용하여 등용적 측정으로 구형화된다. 20초 항온처리 기간후, 이들 세포는 분석기의 적혈구 채널내의 조명된 측정 영역을 통해 한 번에 필수적으로 통과된다. 2개의 분리 각 간격으로 상기 세포에 의해 산란된 광의 크기가 측정된다. 광원 및 탐지각의 선택은 본 출원에서 중요하다. 광원이 633nm에서 빛을 방출하는 헬륨 네온 레이저인 경우, 2개의 산란된 광 집합각 간격은 2 내지 3도(2° 내지 3°) 및 5 내지 15도(5° 내지 15°)이다. 각 간격에서 산란된 광의 수준이 세포에 대해 알려지면, 그 세포에 대한 용적 및 헤모글로빈 농도는 미(Mie) 산란 이론에 의해 예상되는 값과 비교하여 결정된다. 각 세포에 대한 용적(V) 및 헤모글로빈 농도(HC)는 기억장치에 저장되고 MCV 및 MCHC는 Tycko에서 기술된 바와 같은 당해 분야에서 공지된 기술에 의해 샘플 측정 주기의 완결시 계산된다. V 및 HC 분포 사이토그램 및 V 및 HC 히스토그램은 상기 계산을 사용하여 만들어진다.

상기 어떤 방법도 망상적혈구와 비-망상적혈구를 구별하지 못하고, 상기 기술되고 실행된 방법들은 망상적혈구 및 적혈구의 진단학적으로 중요한 파라미터, 예를 들어, 셀-바이-셀(cell-by-cell)을 기준으로 하여 용적 및 헤모글로빈 농도를 분리적으로 측정하기 위해서는 사용될 수 없다.

유동 혈구계산기를 사용한 망상적혈구 계산을 수행함에 있어 또 하나의 난점은 망상적혈구 탐지 시그널, 성숙한 적혈구 세포 시그널 및 시스템 노이즈 사이를 분별하는데 어려움이 있다는 점이다. RNA의 염색된 스트랜드는 미숙한 망상적혈구에 많이 존재하며, 유동 혈구 계산기로 탐지되는 경우 비교적 큰 크기의 시그널을 발생한다. 그러나, 더 성숙한 세포는 덜 염색된 RNA를 함유하여 유동 혈구 계산기 측정 시스템의 노이즈에 의해 차단될 수 있는 더 작은 시그널을 발생한다.

광 산란 및 흡광 또는 형광 유동 혈구계산 기술에 의해 전혈 샘플중 망상적혈구의 동정 및, 동시에 망상적혈구 및 적혈구의 용적, 헤모글로빈 농도 및 헤모글로빈 함량을 개별적으로 측정하기 위한 방법 및 시약에 대한 필요성이 대두되었다.

본 발명자들은 여러가지 널리 공지된 기술로 양이온성 염료를 사용하여 망상체를 염색시키고자 한다는 전제로 시작하였다. 본 발명자들은 또한 형광 및/또는 흡광도를 이용하여 적혈구를 검출할 수 있는 유동 혈구계산법을 개발하는데 관심을 갖고 있었다. 또한, 흡광도의 경우, 본 발명자들은 적혈구체를 사용하여 배향 노이즈를 제거시키고자 하였다(제8c도 및 제8d도 참조). (원래 세포 용적을 정확하게 회수하고 동시에 측정하는데 관심이 없는 경우, 대부분의 배향 노이즈를 제거하기 위하여 혈구체가 등용적 또는 완전할 필요는 없다.) 본 발명자들은 또한, 등용적 혈구체 및 전술한 타이코 방법, 즉, 형광 및 흡광 방법을 사용함으로써, 본 발명자들은 적혈구를 또한 선택적으로 염색시킨 시약을 사용하는 셀-바이-셀을 기준으로 하여 망상적혈구를 동시에 측정하고 성숙한 적혈구 용적 및 헤모글로빈을 측정할 수 있길 기대 하였다(혈구가 완전하고, 등용적이 아니나, 등장성의 X인자에 대해 어느 정도 알려져 있는 경우 용적에 대해서 1/X로 보정하고 단박질, 예를 들어, 헤모글로빈 농도에 대해서 X로 보정하는 타이코의 방법을 사용하여 원래값을 계산할 수 있다는 점을 주지할 것).

타이코의 방법을 이용하기 위해서는, 헤모글로빈이 매우 투명한 영역으로 단색광을 방출하는 광원이 필요하다; 전형적으로 적색 헬륨 네온 레이저, 또는 보다 더 긴 파장의 레이저와 같은 광원이 있다. 이는 파장을 또한 흡광도 측정용으로 사용하고자 하는 경우, 염료는 적색광을 강하게 흡수하는 청색 염료이어야 함을 의미한다.

본 발명자들은 양이온성 염료와의 혼화성을 위해서, 및 적혈구 구형화제로서 Kim과 Ornstein의 교시에 의해 제시되는 바에 따라 비이온성, 양이온성 및 양쪽이온성 계면활성제를 탐구하였다. Kim과 Ornstein 방법에서와 같이, 본 발명자들은 적혈구 용혈작용을 지연시키기 위한 계면활성제의 농도를 "완충"시키기 위하여 단백질(전형적으로 소 혈청 알부민)을 사용하였다. 수많은 계면 활성제(예: 트리톤 X100 및 라우릴프로필아미도베타인)가 만족스럽게 작용하였다. 그 다음 본 발명자들은 또한 라우릴프로필아미도베타인 및 기타 양쪽이온성 계면활성제(예: DTS 및 TDAPS)가 적혈구 용혈작용을 지연시키기 위한 단백질 완충을 필요로 하지 않으며, Kim과 Ornstein 방법에 있어서, 모든 종류의 혈액 세포에 대한 이상적인 대체 구형화제임을 발견하였다. 이들은 단백질 완충을 필요로 하지 않기 때문에, 제조하기에 안정하고 더욱 간단한 시약이다(Kim과 Ornstein의 고정 단계가 더이상 필수적인 것은 아니다; 달리, 단백질-함유 시약에 있어서 세균 생육 문제가 또한 제거된다). 본원과 동시에 출원되고 본 발명의 양수인에게 양도된, "시약 조성물 및 구형화 세포에 있어서 이의 용도"란 명칭의, 계류중인 미합중국 특허원 제_____호의 주제이다.

따라서, 본 발명의 주 목적은 흡광 유동 혈구계산법에 의해서 혈액 샘플중 기타 혈구로부터 망상적혈구를 분리시키기 위해 개선된 시약 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

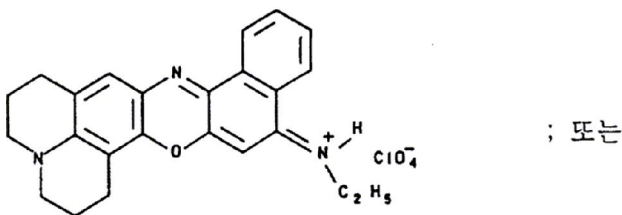
본 발명의 다른 목적은 흡광 유동 혈구계산법으로 전혈 샘플 중에서의 망상 적혈구를 계산하기 위한, 상기와 같은 시약 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 다른 목적은 적혈구와 망상적혈구를 구형화시키고 동시에 망상 적혈구를 염색시키기 위한, 상기와 같은 시약 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

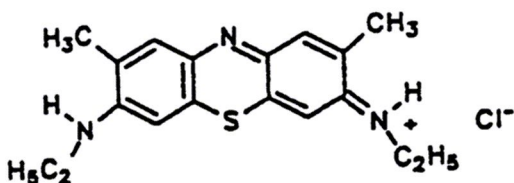
본 발명의 그외 목적은 흡광 및 산란광 유동 혈구계산법으로 전혈 샘플 중에서 망상적혈구와 적혈구의 용적, 헤모글로빈 농도 및 헤모글로빈 함량을 동시에 측정하기 위한, 상기와 같은 시약 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 목적은 또한 혈액 샘플내의 각각의 적혈구와 망상적혈구를 구별하고 동시에 각각을 계수하며, 셀-바이-셀 기준의 측정치로부터 결정한 각 세포 유형의 용적, 헤모글로빈 함량, 헤모글로빈 농도, 평균 적혈구 용적, 및 평균 혈구 헤모글로빈 농도를 측정하기 위한, 상기와 같은 시약 조성물 및 방법을 제공하는 것이다.

본 발명의 한 양태에 따르는 시약 조성물은 망상적혈구를 염색시키기 위한 유기 양이온성 염료 및 pH를 약 6 내지 약 9로 유지시키기 위한 완충 용액을 포함한다. 염료는 하기 구조식의 청색 흡광 염료 옥사진 75아오하이오데이톤 소재의 엑시톤 인코포레이티드(Exsiton, Inc.)로부터 구입]:



하기 구조식의 청색 흡광 염료 뉴 메틸렌 블루일 수 있다:



시약 조성물의 완충 시스템은 시약 조성물의 pH를 약 6 내지 약 9로 유지시키기에 적합한 완충물질을 함유한다. 상기 용액은 하기 성분중 하나 이상을 표시된 농도로 포함할 수 있는데, KCl 또는 NaCl를 사용

하여 최종 삼투물 농도를 약 250m Osm 내지 약 330m Osm으로 조정한다.

성분	농도(mM)
K/Na HCO ₃	5-50
Mg Cl ₂	0-88
KCl	4-104
Na ₃ PO ₄	0-1.5
CaCl ₂	0-0.6

바람직하게는, 상기 용액을 시약 조성물의 pH가 약 7 내지 약 8에서 유지되도록 제형화하고, 주어진 농도 범위로 다음 성분 중 하나 이상을 포함할 수 있으며, 삼투물 농도를 약 280m Osm 내지 약 300m Osm으로 유지시킨다.

성분	농도(mM)
Tris/TEA	0-150
K ₂ Ox/EDTA	0-121
KCl/NaCl	0-155

본 발명에 이르러, 본 시약 조성물이 적혈막을 통한 염료 침투를 용이하게 하기 위한 특정 음이온 및 양이온을 함유해야만 한다는 것을 발견하였다. 이러한 음이온에는 비카보네이트, 클로라이드, 보레이트, 바르비탈, 옥살레이트(Ox) 또는 에틸렌디아민테트라아세트산(EDTA)이 포함될 수 있다. 그러나, 음이온이라고 해서 세포막을 통한 염료 침투를 촉진시키는데 효과적이지는 않은 것으로 밝혀졌다. 예를 들면, 다음 음이온, 말레이트, 타르타레이트, 포스페이트중 하나 이상이 본 시약 조성물에 주 음이온으로서, 존재하더라도 소량 포함된 경우, 망상적혈구와 적혈구를 구별할 수 있다. 가능한 양이온은 칼륨, 나트륨, 트리스하이드록시메틸아미노 메탄(Tris), 또는 트리에탄올아민(TEA)을 포함한다.

산란/흡광 유동 혈구계산법을 이용하여 전혈 샘플 중 망상적혈구를 확인하는데 본 시약 조성물을 사용할 수 있다. 광범위한 적용 방법에는 전혈 분취량을 상기 시약 조성물과 혼합하는 것이다. 적당한 배양 기간 후, 샘플/시약 혼합물을 유동 혈구계수기의 특이 감지 영역을 통하여 일정시간 통과시킨다. 유체역학 포커싱 방법(hydrodynamic focusing)을 이용하여, 단일 세포를 감지 영역에 통과시키는데, 여기서 이들은 적합한 조사 파장을 갖는 초점이 맞춰진 광원에 의해 조사된다. 산란 광 시그널중 적어도 하나와 흡광 시그널 중 적어도 하나를 셀-바이-셀 기준으로 세포에 대해 측정한다. 이들 측정치로 부터, 망상적혈구를 적혈구와 구별할 수 있다.

본 발명의 바람직한 양태에 따라서, 상기 시약 조성물은 또한 적혈구와 망상 적혈구를 등용적으로 구형화시키기 위해 양쪽이온성 계면활성제를 포함한다. 양쪽 이온성 구형화제는 바람직하게는 라우르아미도프로필베타인(LAB), 코코아미도프로필베타인(CAPB) 및 코코아미도설포베타인(CASB)과 같은 알킬아미도베타인 또는 알킬 베타인이다. 기타 바람직한 구형화제는 N-테트라데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판설포네이트(TDAPS) 및 N-도데실-N,N-디메틸-3-암모니오-1-프로판설포네이트(DDAPS)이다. TDAPS와 DDAPS가 샘플 제제를 가장 안정하게 해주므로 가장 바람직한 구형화제이다.

혈액 샘플내의 망상적혈구와 적혈구를 효과적으로 등용적으로 구형화시키기 위한, 본 시약 조성물 중의 구형화제의 농도는 약 3.9 μ g/ml 내지 약 148 μ g/ml이다. 구형화제가 LAB 약 12 μ g/ml 내지 약 87.5 μ g/ml; TDAPS 약 3.9 μ g/ml 내지 약 11.8 μ g/ml; DDAPS 약 49.3 μ g/ml 내지 148 μ g/ml; CAPB 약 8.8 μ g/ml 내지 약 17.5 μ g/ml; 또는 CASB 약 12.5 μ g/ml 내지 약 15 μ g/ml의 양으로 존재하는 것이 바람직하다.

본 발명자들은 상술한 완충 시스템의 존재하에서는, RNA를 염색시키는데 필요한 시약 조성물 중 뉴 메틸렌 블루 농도범위가 약 10 내지 100 μ g/ml임을 발견하였다.

본 발명자들은 예를 들어, 상술한 완충 시스템의 존재하에서, RNA 염색에 필요한 시약 조성물 중 옥사진 750의 농도는 낮으며, 즉 약 2 μ g/ml 내지 약 15 μ g/ml 범위이며, 상기 완충제가 침투를 향상시켜 염료가 망상적혈구 중 RNA를 5분 이내에 염색시킴을 발견하였다. 그러한 저농도의 염료는 완전 적혈구의 비-망상적혈구 염색을 최소화시켜 노이즈 배경으로부터 양호한 시그널이 분리되도록 한다. 상기과 같은 신속한 염색은 본 시약 조성물이 자동화 방법에 고도로 적합하도록 한다.