

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3600247号
(P3600247)

(45) 発行日 平成16年12月15日(2004.12.15)

(24) 登録日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/48

P

GO 1 N 1/30

GO 1 N 1/30

請求項の数 15 (全 21 頁)

<p>(21) 出願番号 特願平8-531975 (86) (22) 出願日 平成8年4月19日(1996.4.19) (65) 公表番号 特表平11-508353 (43) 公表日 平成11年7月21日(1999.7.21) (86) 国際出願番号 PCT/US1996/005520 (87) 国際公開番号 W01996/033396 (87) 国際公開日 平成8年10月24日(1996.10.24) 審査請求日 平成15年4月14日(2003.4.14) (31) 優先権主張番号 08/426,408 (32) 優先日 平成7年4月21日(1995.4.21) (33) 優先権主張国 米国(US)</p>	<p>(73) 特許権者 アボット・ラボラトリーズ アメリカ合衆国、イリノイ・60064-3500、アボット・パーク、アボット・パーク・ロード・100、チャド・377 / エイ・ピー・6・デー-2</p> <p>(74) 代理人 弁理士 川口 義雄</p> <p>(74) 代理人 弁理士 船山 武</p> <p>(74) 代理人 弁理士 伏見 直哉</p>
--	--

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 網状赤血球を迅速に分析するための組成物及び方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

網状赤血球染色量の非対称シアニン染料と、イミダゾールバッファ、Hepesバッファ、Bis-Trisバッファ及びTrisバッファから成るグループから選択された20mM~60mMのバッファ溶液と、N,N-ビス〔3-D-グルコン-アミドプロピル〕コラミド、n-ドデシル-D-マルトシド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックコポリマー、n-テトラデシル-D-マルトシド、デカノイル-N-メチル-グルカミド、n-ドデシル-D-グルコピラノシド及びn-デシル-D-グルコピラノシドから成るグループから選択された染料安定化量の非イオン性界面活性剤とから成る水性核酸染色用試薬であって、前記試薬が、pH6.0~8.0を有しており、水性試薬溶液中でシアニン染料と干渉しないかまたは沈殿しない一価もしくは二価のアルカリ塩によって230~340mOsm/リットルに調整された浸透性を有していることを特徴とする試薬。

10

【請求項2】

非対称シアニン染料が環置換されていることを特徴とする請求項1に記載の試薬。

【請求項3】

前記非対称シアニン染料が、ヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム、ヨウ化2-ジエチルアミノ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム、ヨウ化2-メチルチオ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン

20

) - 1 - フェニルキノリニウム、及び、4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムトシレートから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 4】

非対称シアニン染料が、ヨウ化 2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムであることを特徴とする請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 5】

非対称シアニン染料の網状赤血球染色量が $0.1 \mu\text{g/ml} \sim 0.3 \mu\text{g/ml}$ であることを特徴とする請求項 3 に記載の試薬。

10

【請求項 6】

バッファがイミダゾールであることを特徴とする請求項 5 に記載の試薬。

【請求項 7】

非イオン性界面活性剤が $0.1\text{g/dl} \sim 1.0\text{g/dl}$ の量で存在することを特徴とする請求項 5 に記載の試薬。

【請求項 8】

非イオン性界面活性剤がポリオキシプロピレン - ポリオキシエチレンブロックコポリマーであることを特徴とする請求項 7 に記載の試薬。

【請求項 9】

非イオン性界面活性剤が $5\text{mg/dl} \sim 20\text{mg/dl}$ の量で存在することを特徴とする請求項 5 に記載の試薬。

20

【請求項 10】

非イオン性界面活性剤が N,N - ビス〔3 - D - グルコン - アミドプロピル〕コラミドであることを特徴とする請求項 9 に記載の試薬。

【請求項 11】

更に、有効量の微生物増殖阻害用防腐剤を含むことを特徴とする請求項 1 に記載の試薬。

【請求項 12】

防腐剤が、5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン (2.0 - 2.5%) と 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン (0.7 - 0.9%)、5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン (1.05 - 1.25%) と 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン (0.25 - 0.45%)、及び、ナトリウムアジドから成るグループから選択されることを特徴とする請求項 11 に記載の試薬。

30

【請求項 13】

全血サンプル中の網状赤血球の計数を、全血球分析を得るためのサンプルの別のアリコートとの区別と同時進行的に行う方法であって、

(a) サンプルの 1 つ以上のアリコートを分析及び区別すべく全自動分析装置内部の夫々異なる場所に案内し、

(b) 網状赤血球染色量の非対称シアニン染料と、イミダゾールバッファ、Hepes バッファ、Bis - Tris バッファ及び Tris バッファからなるグループから選択した $20\text{mM} \sim 60\text{mM}$ のバッファ溶液と、N,N - ビス〔3 - D - グルコン - アミドプロピル〕コラミド、n - ドデシル - D - マルトシド、ポリオキシプロピレン - ポリオキシエチレンブロックコポリマー、n - テトラデシル - D - マルトシド、デカノイル - N - メチルグルカミド、n - ドデシル - D - グルコピラノシド及び n - デシル - D - グルコピラノシドから成るグループから選択された染料安定化量の非イオン性界面活性剤とを含み、pH $6.0 \sim 8.0$ を有しており、該水性試薬溶液中でシアニン染料と干渉しないかまたは沈殿しない一価もしくは二価のアルカリ塩によって $230 \sim 340\text{mOsm/l}$ に調整された浸透性を有している試薬とサンプルの網状赤血球アリコートとを混合し、同時に、混合した試薬 / 網状赤血球アリコートを全自動分析装置の光学的検出ゾーンに案内する段階と、

40

(c) 細胞が前記検出ゾーンをほぼ一度に 1 個ずつ通過するように、混合した試薬 / 網状赤血球アリコートを移動させる段階と、

50

(d) 前記光学的検出ゾーンにおいて被染色サンプルを入射光ビームによって照射して蛍光イベントを惹起する段階と、

(e) 被染色網状赤血球が前記光学的検出ゾーンを通過中に前記サンプル溶液中の網状赤血球の蛍光イベントを測定し、

(f) 被染色網状赤血球の測定された蛍光イベントをカウントすることによって前記サンプル中に存在する網状赤血球の数を決定する段階とから成る方法。

【請求項14】

環置換されたシアニン染料が、ヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムと、ヨウ化2-ジエチルアミノ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムと、ヨウ化2-メチルチオ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムとから成るグループから選択されることを特徴とする請求項13に記載の方法。

10

【請求項15】

全血サンプル中の網状赤血球を計数する方法であって、

(a) 網状赤血球染色量の非対称シアニン染料と、イミダゾールバッファ、Hepesバッファ、Bis-Trisバッファ及びTrisバッファから成るグループから選択された20mM~60mMのバッファ溶液と、N,N-ビス〔3-D-グルコン-アミドプロピル〕コラミド、n-ドデシル-D-マルトシド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックコポリマー、n-テトラデシル-D-マルトシド、デカノイル-N-メチル-グルカミド、n-ドデシル-D-グルコピラノシド及びn-デシル-D-グルコピラノシドから成るグループから選択された染料安定化量の非イオン性界面活性剤とを含み、pH6.0~8.0を有しており、該水性試薬溶液中でシアニン染料と干渉しないかまたは沈殿しない一価もしくは二価のアルカリ塩によって230~340mOsm/リットルに調整された浸透性を有している試薬とサンプルのアリコートとを混合し、同時に、混合した試薬/網状赤血球アリコートを生体組織を全自動分析装置の光学的検出ゾーンに案内する段階と、

20

(b) 細胞が前記検出ゾーンをほぼ一度に1個ずつ通過するように、試薬/網状赤血球アリコートを移動させる段階と、

(c) 前記光学的検出ゾーンにおいて被染色サンプルを入射光ビームによって照射して蛍光イベントを惹起する段階と、

30

(d) 被染色網状赤血球が前記光学的検出ゾーンを通過中に前記サンプル溶液中の網状赤血球の蛍光イベントを測定する段階と、

(e) 被染色網状赤血球の測定された蛍光イベントをカウントすることによって前記サンプル中に存在する網状赤血球の数を決定する段階とから成る方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、網状赤血球を迅速に分析するための方法及び安定な水性試薬組成物に関する。より特定的には本発明は、光散乱及び蛍光によるフローサイトメトリーの技術を用いて網状赤血球を迅速に分析するための全自動方法及び安定な試薬組成物に関する。本発明の方法及び安定な水性試薬組成物の使用によって、高処理能力のマルチパラメータ血液計測装置において網状赤血球を迅速に分析し、その結果をカウント数及び成熟度によって報告することが可能になる。該方法はまた、別個のインキュベーション段階を要せずに、網状赤血球及び有核赤血球細胞("NRBC")カウント数を含む全血球細胞("CBC")カウント数をリアルタイムで分析し得る。

40

背景

赤血球("RBC")は正常には網状赤血球として血流に入る。血球増生は赤芽細胞の発生に始まり、骨髄でほぼ五世代の中間有核細胞が存続し、最後に網状赤血球が形成される。網状赤血球は幼若赤血球であり、細胞から核が排除された発達のこの段階でも細網物質(リボソームRNA及びメッセンジャーRNA)をまだ含んでいる。

貧血症または低酸素症の状態ではこの過程が短縮されていると考えられる。これらの症状

50

があるとき、正常よりも早い時期の網状赤血球が血流に入ると考えられる。これらの初期網状赤血球は、過剰量のRNAを含むこと、サイズが普通よりも大きいこと、ヘモグロビン含量が低いこと、血流中に網状赤血球として維持される時間が長いこと、などによって認識される。

1930年代初期に、L.Heilmeyer (Ztschr.Klin.Ned.121:361 - 379,1932) は、網状赤血球を、それらに含まれる網系質(網状赤血球に含まれている生体染色可能物質)の量に従って4つの年齢集団に分類した。それ以来の伝統として、グループIは30以上の網系質、グループIIは15 - 30の網系質、グループIIIは3 - 15の網系質及びグループIVは1 - 2の網系質を含むという分類が用いられている。正常な網状赤血球のカウント数は、成人ではRBCカウント数の約0.5~2.5%、新生児ではRBCカウント数の約2.0~6.0%である。年齢集団
10

でみると、正常な成人の網状赤血球の大部分はグループIVに分類され、グループIのものは殆どない。網状赤血球のカウント数は赤血球産生の尺度である。従って、貧血症の診断及び治療に有用である。歴史的に、網状赤血球のカウント数は貧血症の病因及び分類に極めて密接に関連付けられてきた。溶血性貧血、ピルビン酸キナーゼ欠損、鎌状細胞貧血、タラセミア(地中海貧血)では網状赤血球のカウント数が増加し、巨大赤芽球性貧血、再生不良性貧血、全身性骨髄機能不全では網状赤血球カウント数が減少する。最近ではまた、化学療法剤の骨髄毒性作用を検査するために網状赤血球カウント数が使用されている。従って、網状赤血球のカウント数と網状赤血球の成熟指数とが極めて有効な情報であるということはこの血液学者も例外なく認める処である。
20

最も頻用されている網状赤血球のカウント方法は手動操作による鏡検法である。1949年にG.Brecher (Am.J.Clin.Pathol.19:895 - 896,1949) によってニュー・メチレン・ブルー(“NMB”)が導入されるまではブリリアント・クレゾール・ブルーが主として使用されていた。最新のNational Committee for Clinical Laboratory Standards (“NCCLS”) 刊行物(NCCLS DOC.H44 - P) は、等容量の血液をNMB染料と混合し、約15分間インキュベートしてRNAを沈降させるNMB染色を承認している。次いで、血液塗抹標本を作製し、染色された網状赤血球を顕微鏡でカウントする。Miller接眼ディスクを接眼レンズに挿入する。接眼レンズ内部の小さいほうの視野の面積は大きいほうの視野の面積の1/9である。小さいほうの視野でRBC数を計測し、大きいほうの視野で網状赤血球を計測する。連続する20個の視野でカウントを実施し、大きいほうの視野の網状赤血球の総数を小さいほうの視野の赤血球総数の9倍の値で除算することによって網状赤血球の%を計算する。手動操作による方法の欠点は、労働集約的であること、不正確であること、時間が掛かること、主観的であること、などである。
30

フローサイトメトリーの技術によってこれらの欠点を是正するために様々な実験が試みられた。1980年代には、フローサイトメーターによって網状赤血球を染色及びカウントするためにピロニン・ワイ(“RY”)及びアクリジン・オレンジ(“AO”)が使用された。現在では、全血サンプル中の網状赤血球を計数するために使用できる半自動的フローサイトメトリーの方法がいくつか知られている。既存の方法の各々では、オーラミン・オー(“AuO”)またはチアゾール・オレンジ(“T0”)のような有機カチオン性染料を含む希釈剤を使用して網状赤血球内部のRNAを染色する。インキュベーション期間中に、染料がゆっく
40

りと細胞膜に浸透し、各網状赤血球の内部のRNAに結合する。サンプルが検出ゾーンを通過するとき被染色網状赤血球が発生する信号の量は、各網状赤血球内部のRNA含量にほぼ比例する。従って、適正な励起光源及び発光検出システムを備えたフローサイトメーターを使用して、全血サンプル中の網状赤血球のパーセンテージを測定し得る。しかしながら、特に計器がマルチパラメーター血液分析システムである場合、網状赤血球測定方法の全自動化を難しくする問題の原因が数多く存在する。最大の問題は、染色サンプルを“オフライン(非直結)”で調製しなければならないことである。フローサイトメーターによるサンプル処理を可能にするためには、染料が細胞に浸透して網状赤血球のRNAを十分に染色するように、サンプル調製段階で数分またはそれ以上の長いインキュベーション期間が必要である。更に、網状赤血球中のRNAを染色するために常用されている染
50

料の多くは、水溶液中で不安定であり、RNA及びDNAに結合するだけでなく、フローセルも含めて計器のプラスチック管、ガラス表面などにも結合する。このため、試験の実施後に、全システムに対して時間及び手間の掛かる洗浄作業が必要となる。

Kaminskyらの米国特許第3,684,377号、Adamの米国特許第3,883,247号及びNataleの米国特許第4,336,029号はいずれも、網状赤血球を染色するためにA0を使用することを開示している。A0は網状赤血球に対して優れた染色性を有しているが(RNAに結合して赤色蛍光を発生させる)、血漿にも結合してサンプル流の高いバックグラウンド蛍光を発生させるので、良好なシグナル対ノイズ("S/N")比を得ることが極めて難しい。検出の問題に加えて、フローサイトメーターでA0を使用すると、A0がプラスチック管及びフローセル表面に結合し易いことも難しい問題である。更に、A0法は5~7分間のインキュベーションを必要としており、最新の高処理能力のマルチチャンネル血液分析装置を用いて方法を実施するためにはこの所要時間はあまりにも長い。

10

Saga, Jr.の米国特許第4,707,451号はチオフラビン・ティー(thioflavin T)またはクリサニリン(chrysaniline)から成る試薬組成物を開示している。この方法では網状赤血球が染料を吸収するまでに約7分間を要し、また、バックグラウンド蛍光があまりにも高いのでグループIVの網状赤血球の検出に適した良好なS/N比が得られない。

Leeらの米国特許第4,883,867号は、RNA及びDNAを染色するための染料を開示している。網状赤血球の分析に好適な染料はT0であり、方法は最短でも30分のインキュベーション時間を要する。T0は高い核酸結合親和性及び量子効率を有しているが、T0の膜透過速度は極めて遅い(30分)ので、高処理能力の臨床用マルチパラメーター血液計測装置における使用には不適である。

20

Kurodaの米国特許第4,971,917号は、成熟赤血球の非特異的染色を抑制するためのAu0と炭酸塩とを含有する試薬組成物を教示している。米国特許第4,985,176号は、フローサイトメーターで使用するための別の網状赤血球染色試薬を開示しており、この試薬は、好ましい染料としてAu0を含み、染色に必要なサンプルインキュベーション時間が30秒~20分の範囲である。フローサイトメーターでAu0を使用するときの欠点は、A0のような染料はDNA及びRNAだけに親和性を有しているのではなく、多様な種類のプラスチック及びガラスの表面にも親和性を有しているため、マルチパラメーター血液計測装置を用いて方法を実施することが極めて難しいことである。TOA Medical Electronics CO., Ltd.は、そのSystem x(登録商標)R-1000及びR-3000単独型全自動網状赤血球分析装置にAu0法を組み込むことには成功したが、NE8000またはSE9000計器のようなマルチパラメーター血液計測装置で同方法を使用することはできなかった。

30

Colellaらの米国特許第5,284,771号は、網状赤血球中のRNAを染色するカチオン性染料(オキサジン(登録商標)750)と、染色サンプルをフローサイトメーター的計測システムで処理するとき偏平な赤血球の方向性ノイズを除去する両イオン性球状化剤とを含む単一試薬溶液によって全血サンプルを処理する段階から成る方法及び試薬組成物を開示している。

最近になってMiles Inc.は、彼らの最新のH*3(登録商標)血液計測装置に上記方法を組込んだ。この計器は、ヘリウム/ネオン("Hene")電子光学的検出システムを備えており、網状赤血球を染色するためのオキサジン(登録商標)750核酸染料と、容量分析の基準として赤血球と網状赤血球とを球状化する両イオン性界面活性剤とを使用している。H*3(登録商標)を用いた網状赤血球計測方法は、血液と網状赤血球試薬とを手動操作で混合し次いでオフラインで15分間のインキュベーションを必要とする半自動方法ではない。この方法は、グループIVの網状赤血球の検出感度が低い。

40

Coulter Corporationもまた、彼らのSTKS(登録商標)及びMaxim(登録商標)の血液分析装置に半自動の網状赤血球分析方法を組込んだ。Coulterは彼らの技術をVCS(Volume, Conductivity and Scatter(容量、導電率及び散乱))と呼ぶ。VCSを実施するためには、まず血液サンプルをCoulterの網状赤血球用染料(NMB含有)と混合する。次いで、混合物を室温で5分間インキュベーションする。次に、染色された少量の血液サンプルを、硫酸を含有する清澄化溶液で希釈する。方法が低感度であること及び赤血球の分離度がよくない

50

ことが方法の精度に極めて不利な影響を与えている。これは、(清澄化溶液によって溶解された)網状赤血球間質、他の細胞落屑及び血小板がノイズを発生し、適正な信号の識別を難しくするからである。凝集した血小板だけは拡大された信号を発生し得るので、血小板の信号はRBC及び網状赤血球間質によって発生した信号と干渉しない。

Kurodaの米国特許第4,981,803号は、フローサイトメトリーの方法によって網状赤血球をカウントするためのAu0を含有する試薬を開示している。試薬は2種類の溶液、即ち、染料(Au0)を非水性溶媒に溶解した染色用原液と、網状赤血球中のRNAの最適染色条件を満たすバッファ溶液とから成る。Kurodaは、これらの2つの溶液を染色直前に混合することによって、網状赤血球をカウントするための安定な最終染色用溶液が常に得られると主張している。この方法にも問題は多い。最大の問題は、彼らが選択した非水性溶媒のグループ(エチレングリコール、トリエチレングリコール、ジエチレングリコール)が高い屈折率を有していることである。このような屈折率はマルチパラメーター血液分析装置における使用に不適である。その理由は、(リン酸緩衝生理食塩水のような)水性被覆溶液を使用する必要があり、このような被覆溶液が屈折率約1.334を有しているからである。Kuroda特許に記載されているメタノール、エタノールまたはプロパノールのような(被覆溶液である生理食塩水に近い屈折率をもつ)他の溶媒は極めて揮発性であり、従ってこれらも適当でない。更にこの方法においては、安定な網状赤血球試薬を提供するために、少量の原液と多量の水性バッファとをオンライン(直結)で混合する必要があるが、このような混合は技術的に極めて難しい。

上記のような理由から、水性環境で安定な試薬を使用し、フローサイトメーターまたは高処理能力のマルチパラメーター血液分析装置において実施できる迅速で正確な網状赤血球の分析方法が久しく要望されている。

発明の概要

網状赤血球を計数するための別個のインキュベーション段階を必要とすることなく全血サンプル中のCBC及び網状赤血球を同時に計数する方法が提供される。

1つの実施態様は、網状赤血球染色量の非対称シアニン染料と、イミダゾールバッファ、Hepesバッファ、Bis-Trisバッファ及びTrisバッファから成るグループから選択された約20mM~約60mMのバッファ溶液と、N,N-ビス[3-D-グルコン-アミドプロピル]コラミド、n-ドデシル-D-マルトシド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックコポリマー、n-テトラデシル-D-マルトシド、デカノイル-N-メチル-グルカミド、n-ドデシル-D-グルコピラノシド及びn-デシル-D-グルコピラノシドから成るグループから選択された染料安定化量の非イオン性界面活性剤とから成る水性の核酸染色用試薬を提供する。試薬はpH約6.0~約8.0を有しており、水性試薬溶液中でシアニン染料と干渉しないかまたは沈殿しない一価もしくは二価のアルカリ塩によって約230~約340mOsm/リットルに調整された浸透性(オスモル濃度(osmolality))を有している。別の実施態様は、網状赤血球の計数方法を提供する。まず、全血サンプルのアリコートを手洗の核酸染色用試薬と混合する。次いで、このサンプル/試薬アリコートを別個にインキュベートすることなく分析用光学フローセルに搬送する。細胞がほぼ一度に1個の割合で被照射光学フローセルを通過する際に、光散乱特性値及び蛍光特性値が検出され、この特性値に基づいてサンプル中の網状赤血球の計数が行われる。

別の実施態様は、ヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム、ヨウ化2-ジエチルアミノ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム、ヨウ化2-メチルチオ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム、及び、4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムトシレート(すべてMolecular Probes, Eugene, ORから入手可能)から成るグループから選択された約0.1µg/ml~約0.3µg/mlの染料と、約40mM~約60mMのイミダゾールバッファと、N,N-ビス[3-D-グルコン-アミドプロピル]コラミドとポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロッ

10

20

30

40

50

クコポリマーとから成るグループから選択された染料安定化量の非イオン性界面活性剤とから成り、pH約6.8～約7.2を有しており、NaCl、KCl、LiCl、CaCl₂、MgCl₂及びZnCl₂から成るグループから選択された一価もしくは二価のアルカリ塩によって約280～約310mOsm/リットルに調整されたオスモル濃度を有している水性の核酸染色用試薬を提供する。更に別の実施態様は、網状赤血球数と全血球数との同時計数方法を提供する。CBC（全血球）数を測定するために全血サンプルの第一アリコート（分析を進行させながら、サンプルの第二のアリコート）を水性の核酸染色用試薬と混合し、サンプルの網状赤血球成分を上記の手順で分析する。

【図面の簡単な説明】

図1aは、5.63%の網状赤血球を含む臨床サンプルの前方散乱（“FSC”）信号対緑色蛍光（“FL1”）信号の二次元のFACScan（登録商標）表示（細胞図）である。 10

図1bは、図1aのゲートされた赤血球（“RBC”）集団のLF1ヒストグラムである。

図1cは、2.63%の網状赤血球と増加濃度の白血球（“WBC”）集団とを含む臨床サンプルのFSC信号対FL1信号のFACScan（登録商標）細胞図である。

図1dは、図1cのゲートされたRBC集団のFL1ヒストグラムである。

図2a及び図2bは、FACScan（登録商標）計器で実施した経時試験の結果を表すグラフである。

図3aは、増加濃度の網状赤血球を含む臨床サンプルのFSC信号対FL1信号を示すFACScan（登録商標）細胞図である。

図3bは、図3aの血液サンプルのゲートされた赤血球集団のFL1ヒストグラムである。 20

図4aは、Abbott Laboratories血液分析装置で測定した正常血液サンプルの細胞図であり、中角光散乱（“IAS”）対FL1をいずれも4桁の対数で表す。

図4bは、図4aのゲートされたRBC集団及び網状赤血球集団のFL1ヒストグラムを示す。ヒストグラムの1×目盛表示はRBCピークを示し、ヒストグラムの5×目盛表示は網状赤血球集団を示す。

図5aは、Abbott Laboratories血液分析装置で測定した極めて低い濃度の網状赤血球及び増加濃度のWBCを含む臨床血液サンプルのIAS対FL1の細胞図である。

図5bは、図5aのゲートされたRBC及び網状赤血球集団のFL1ヒストグラムを示す。ヒストグラムの1×目盛表示及び5×目盛表示の双方が示されている。

図6aは、Abbott Laboratories血液分析装置で測定した高レベルの網状赤血球（20.5%）とRBC（96.4k/リットル）とを含む抗凝固処理した臨床血液サンプルのIAS対FL1の細胞図である。 30

図6bは、図6aのゲートされたRBC及び網状赤血球集団のFL1ヒストグラムを示す。ヒストグラムの1×目盛表示及び5×目盛表示の双方が示されている。

図7は、National Committee for Clinical Laboratory Standards（“NCCLS”）の方法と本発明の全自動方法とを実施することによって得られた網状赤血球の結果を比較するグラフである。

図8は、網状赤血球を検出するためにチアゾールオレンジ染色方法及び本発明の全自動方法を実施し、得られた網状赤血球分析結果の線形回帰データの比較を示すグラフである。分析用サンプルとしては図7に示したサンプルと同じサンプルを使用した。 40

図9は、本発明の全自動方法を実施することによって測定した網状赤血球%の線形性を示すグラフである。

図10は、種々の非イオン性界面活性剤の存在下及び非存在下の、RNA結合した有標シアニン染料、ヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム(Molecular Probes, Eugene, OR)の保存寿命試験における発光スペクトルである。試薬を室温で3カ月半保存した。

図11は、RNA結合したシアニン染料、ヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムの保存寿命試験における発光スペクトルであり、冷蔵下で4カ月の安定性が証明される 50

。図12は、RNA結合したシアニン染料、ヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムの保存寿命試験における発光スペクトルであり、高温下で3週間の安定性が証明される。

。図13は、1.0%のポリオキシプロピレン - ポリオキシエチレンブロックコポリマー (“Pluronic (登録商標) F127”) を添加するかまたは非添加のBis - Trisバッファ中のRNA結合したシアニン染料、ヨウ化2 - メチルチオ - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウム (Molecular Probes, Eugene, OR) の経時試験における発光スペクトルを示す。試薬を室温で6カ月半保存した。

10

図14は、0.2%のPluronic (登録商標) F127を添加した種々のバッファ中のRNA結合したシアニン染料、ヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムの保存寿命試験における発光スペクトルを示す。全部の試薬を室温で6週間保存した。

図15aは、FACScan (登録商標) サイトメーターで測定したFSC信号対FL1信号の二次元表示である。

図15bは、図15aのゲートされた赤血球集団のFL1ヒストグラムである。

図15cは、FACScan (登録商標) フローサイトメーターで行った経時試験の結果を、15秒から4.0分までの網状赤血球%として表すグラフである。

20

発明の詳細な説明

本発明の実施態様は、フローサイトメトリーの方法論を利用して血液サンプル中の網状赤血球を迅速かつ正確に分析する方法及び安定な水性試薬系を包含する。これらの実施態様は概して、網状赤血球と有核赤血球 (“NRBC”) を含む全血球 (“CBC”) とを計数するための迅速な同時分析を行うものである。本発明の実施態様は、分析用計器及び血液分析方法の使用を含む。一般にこのような分析用計器の1つは全自動インピーダンス分析装置から成る。このような全自動計器の1つにおいては、全自動光散乱分析装置が全自動インピーダンス分析装置に統合され、全自動蛍光分析装置が全自動光散乱分析装置に統合されている。

本発明の開示において、全自動分析装置なる用語は、サンプルを分析するためにオペレーターの介入が不要な装置、即ち、オペレーターは全自動分析装置にサンプルを導入するがその後はオペレーターがもはや介入する必要がない装置を意味する。更に、血液分析装置は、細胞を実質的に絶対項として定量及び分類する。このような分析装置は、細胞を大きさ及び形状によって分類するために電気的インピーダンス及び光学的散乱特性の少なくとも1つを使用する。

30

本発明を実施するために、種々の分析装置をモニター及び制御し、分析装置からデータを収集し、結果を報告する制御装置を備えた全自動血液分析装置を普遍的に利用し得る。例えば、分析装置に制御装置が統合されているとき、オペレーターは全血サンプルに関するデータを制御装置に入力し得る。オペレーターは制御装置を用いて全血サンプルに対して実施すべき試験バンクを選択する。オペレーターは統合分析装置の集中的サンプル処理領域に全血サンプルを導入する。制御装置が分析装置を起動し、分析装置は制御装置の指令下で全血サンプルに対する分析を自動的に実行し得る。制御装置は分析装置から得られたデータを利用し、結果を公式化する。制御装置は結果をオペレーターに報告する。全血サンプルを統合分析装置に導入した後はオペレーターの操作が全く不要であることに注目されたい。好ましい実施態様では全血サンプルの調製が完全に自動化されているので、先ず従来の血液分析試験が行われ、次いでインキュベートされたサンプルの試験が行われる。分析装置に制御装置が統合されているので、血液分析装置及びフローサイトメトリー分析装置の双方から制御装置にデータが供給される。従って、制御装置は患者の血液分析の総合結果をオペレーターに報告し得る。

40

明確な理解を得るために以下の記載では本発明の特定実施態様について詳細に説明するが

50

、他の実施態様の可能であることに留意されたい。記載の実施態様の諸要素の所望の任意の組合せも可能である。

本発明の1つの目的は、安定な水性試薬組成物を提供することである。この試薬は、網状赤血球を染色し得る非対称シアニン染料と、イミダゾールバッファと4-(2-ホドロキシエチル)-1-ピペラジニエタン-スルホン酸(“Hepes”)バッファとビス(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニエタン-スルホン酸(“Bis-Tris”)バッファとトリスヒドロキシメチルアミノメタン(“Tris”)バッファとから成るグループから選択された約20mM~約50mMのバッファとを含み、pH約6.0~約8.0を有し、一価もしくは二価のアルカリ塩によって約230~約340mOsm/リットルに調整されたオスモル濃度を有しており、更に、膜透過を容易にし水性等張溶液中のシアニン染料を安定化する非イオン性界面活性剤(10
界面活性剤次第で約5mg/dl~約1.0g/dl)を含む。好ましくは、染料が環置換されており、DNAまたはRNAと結合したときに増強された蛍光を示す。更に好ましくは、試薬が、約0.1µg/ml~約0.3µg/mlの環置換された非対称シアニン染料を含む。

本発明の別の目的は、本発明の試薬系を使用して網状赤血球及びCBCの差分(differentia
l)を迅速かつ連続的に検出及び算定する方法を提供することである。このような方法の特に顕著な特徴は、別個のインキュベーション段階を設ける必要がないことである。約10秒~約60秒という必要最小限のインキュベーション期間が必要とされるだけである。

このような実施態様の1つは、全血サンプル中の網状赤血球数の計測が、全血球(“CBC”)分析を得るためのサンプルの別のアリコートとの区別(differentiating)と同時進行的に行われる方法を提供する。この方法は、サンプルの1つ以上のアリコートを分析及び区
20別すべく全自動分析装置の夫々異なる場所に案内する段階を含み、この段階中にサンプルの網状赤血球アリコートを染色用試薬と混合することを特徴とする。該試薬は、網状赤血球染色量の非対称シアニン染料と、イミダゾールバッファとHepesバッファとBis-TrisバッファとTrisバッファとから成るグループから選択された約20mM~約60mMのバッファ溶液と、N,N-ビス[3-D-グルコン-アミドプロピル]コラミド、n-ドデシル-D-マルトシド、ポリオキシプロピレン-ポリオキシエチレンブロックコポリマー、n-テトラ
20デシル-D-マルトシド、デカノイル-N-メチル-グルカミド、n-ドデシル-D-グルコピラノシド及びn-デシル-D-グルコピラノシドから成るグループから選択された染料安定化量の非イオン性界面活性剤とから成り、該試薬が、pH約6.0~約8.0を有し、NaCl、KCl、LiCl、CaCl₂、MgCl₂及びZnCl₂のような、水性試薬溶液中でシアニン染料と干渉
30しないかまたは沈殿しない一価もしくは二価のアルカリ塩によって約230~約340mOsm/リットルに調整されたオスモル濃度を有している。試薬/網状赤血球の結合アリコートを全自動分析装置の光学的検出ゾーンに案内する。次いで、試薬/網状赤血球アリコートは被照射検出ゾーンをほぼ一度に1細胞の割合で通過し、蛍光イベント及び散乱光イベントを生じる。これらのイベントを検出し、検出結果に基づいてサンプル中に存在する網状赤血球の数を決定する。

本発明の試薬系に使用できる非対称染料は一般に以下の特性値を有している：

1. 最大吸光度: 488 + 20nm
2. 高い核酸結合親和性
3. 高い量子効率: 0.1
4. モル吸光係数: 10,000
5. RNAまたはDNAに結合したときの蛍光の増強: 20
6. 膜透過速度: < 2分

典型的には、本発明の水性試薬及び網状赤血球計数方法において使用される染料は水性環境で極めて不安定である。このクラスで試験した複数の染料の安定度データを図10から図14に示す。

本発明の試薬系の1つの実施態様は、約0.05µg/ml~約0.5µg/mlの濃度のMolecular Probes, Inc. (Eugene, OR)によって販売されている染料、ヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムと、約20mM~約50mMのイミダゾールバッファと、約5mg/dl~約20mg
50

/dlのN,N - ビス〔3 - D - グルコン - アミドプロピル〕コラミド(“BIGCHAP”)と、約0.02% ~ 約0.055%のProclin(登録商標)300(5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン + 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン)とから成る。pHは1NのHClによって約6.8 ~ 約7.2に調整され、オスモル濃度はNaClによって約270 ~ 約319mOsm/リットルに調整されている。

試薬系の第一の成分は染料である。このような染料の1つのクラスは、参照によって本発明に含まれる国際特許第W094/24213号、「環置換された非対称染料(CYCLIC - SUBSTITUTED UNSYMMETRIC DYES)」に開示されたような非対称シアニン染料である。更に、本発明で使用される染料は、DNAまたはRNAに結合したときに増強された蛍光を示す。かかる有用な染料はまた、RNA及びDNAに対する高い結合親和性と高い量子効率とを有していなければならない。本文及び請求の範囲に記載の特徴を示す種々の非対称シアニン染料を使用できると予測される。このような染料のいくつかの非限定例としては、同じくMolecular Probes, Inc. (Eugene, OR) (“MPI”)から得られるヨウ化2 - プチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウム、ヨウ化2 - ジエチルアミノ - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウム、ヨウ化2 - メチルチオ - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムがある。同じくMPIから供給される4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムトシレートのような他の非対称シアニン染料も本発明の実施に役立つ。4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムトシレートは、メチルブリッジを介してピリジン環系またはキノリン環系に結合した置換ベンザゾリウム環系を含む中性の非対称シアニン染料である。

試薬の第二の成分は、約6.0 ~ 約8.0のpKaを有し、(RNAまたはDNAの染色に必要な)水溶液中のシアニン染料の所要濃度を長期間維持し得るバッファである。このようなバッファは、本発明を実施する際に使用されるシアニン染料または染料を安定化するために使用される非イオン性界面活性剤と反応してはならない。代表的なバッファは、イミダゾール、Hepes、Bis - Tris及びTrisである。

試薬系の第三の成分は非イオン性界面活性剤である。この界面活性剤の種類に従ってまたは使用される複数の非イオン性界面活性剤の組合せ次第で、濃度を約5mg/dl ~ 約1g/dlにすべきである。(1種または複数の)界面活性剤は、シアニン染料の細胞膜透過速度を促進すると考えられる(30秒以内)。界面活性剤は更に、等張性水溶液中のシアニン染料の溶解度及び安定度を向上させる。しかしながら、(1種または複数の)このような界面活性剤は、たとえ低濃度であっても、シアニン染料と沈殿したり、反応したり、あるいはRBCを溶解したりしてはならない。このような界面活性剤の非限定例は、BIGCHAP、n - ドデシル - D - マルトシド、ポリオキシプロピレン - ポリオキシエチレンブロックコポリマー(“Pluronic(登録商標)F127”)、n - テトラデシル - D - マルトシド、デカノイル - N - メチル - グルカミド、n - ドデシル - D - グルコピラノシド及びn - デシル - D - グルコピラノシドである。

試薬系の更に別の成分は、網状赤血球を含む赤血球または白血球の溶解を防止するために試薬の浸透性(オスモル濃度)を約230mOsm/リットル ~ 約340mOsm/リットルに調整する一価または二価のアルカリ塩である。このような塩は、溶液中でシアニン染料と反応したりまたは沈殿してはならない。このような塩の例としては、NaCl、KCl、LiCl、CaCl₂、MgCl₂、ZnCl₂などがある。

任意成分としては、試薬中での微生物の増殖を防止する防腐剤がある。このような防腐剤は、細胞または被染色細胞の光散乱特性または蛍光発光特性を変化させてはならない。このような防腐剤の例としては、Proclin(登録商標)300、Proclin(登録商標)150(5 - クロロ - 2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン(1.05 - 1.25%)と2 - メチル - 4 - イソチアゾリン - 3 - オン(0.25 - 0.45%))、ナトリウムアジドなどがある。

10

20

30

40

50

上記の試薬系を使用することによって、フローサイトメーターまたは他の全自動血液分析装置における網状赤血球の迅速な分析が可能である。1つの実施態様では、5 μ lの全血サンプルを、本文及び請求の範囲に記載の1.0mlの試薬系と混合し、サンプルと試薬との混合物を、混合後30~60秒以内、最速では10秒という短い時間内に市販のフローサイトメーターに導入する。図1aから図1dは、実施例1に記載の手順で調製した正常血液のサンプルを用いて行ったこのような方法の結果を示す。

本発明の別の実施態様は、全自動的な高処理能力のマルチパラメーター血液分析装置によって網状赤血球を迅速に定量分析し得る。参照によって本発明に含まれる1994年8月1日出願の「全自動分析の実施方法及び装置(METHOD AND APPARATUS FOR PERFORMING AUTOMATED ANALYSIS)」という表題の米国特許出願第08/283,379号は、特に光散乱信号の軸方向光損失("ALL")と中角散乱("IAS")とを利用し、計器が全血サンプル中の細胞及び細胞サブクラスを全自動的に識別できるように種々の蛍光信号を検出する全自動血液分析装置を開示している。

しかしながら一般には、本発明を実施する方法は、全血サンプルを、存在するいかなる網状赤血球のRNAをも染色する試薬と混合し、ほぼ一度に1細胞が被照射光学フローセルを通過するように混合物を流動させ、細胞からの散乱光及び放出蛍光を検出し、サンプル/試薬混合物を別個のインキュベーション段階または期間で処理することなくサンプル中に存在する網状赤血球の量を決定する段階から成る。本発明の試薬の1つは、約0.1 μ g/ml~約0.3 μ g/mlの非対称シアニン染料と、イミダゾールバッファ、Hepesバッファ、Bis-Trisバッファ及びTrisバッファから成るグループから選択された約20mM~約60mMのバッファと、界面活性剤の種類または複数の界面活性剤の組合せに依存して約5mg/dl~約1.0g/dlの濃度の非イオン性界面活性剤とから成り、試薬が約6.0~約8.0のpHを有し、一価または二価のアルカリ塩によって約230~約340mOsm/リットルに調整されたオスモル濃度を有している。

上記のマルチパラメーター血液分析装置において全血サンプル中の網状赤血球のパーセンテージと絶対カウント数とを分析するために、約7856 μ lの希釈/被覆(シース)溶液(等張性生理食塩水)を収容したRBCカップにサンプル吸引プローブで約18.75 μ lの全血サンプルを導入し、双方の流体を混合する。次いで、サンプル中のRBCの絶対カウント数を電子的に測定するために希釈サンプルをシースドインピーダンスアパーチャー(sheathed impedance aperture)に搬送する(参照によって本発明に含まれる1994年8月1日出願の「METHOD AND APPARATUS FOR PERFORMING AUTOMATED ANALYSIS」という表題の米国特許出願第08/283,379号のRBC分析用計器校正の詳細な記載参照)。同時に、約200 μ lの希釈サンプルを600 μ lの本発明の試薬を収容した別の容器(「網状赤血球受容カップ」)に移送し、混合する。準備(混合)したサンプルを、シース付きの検出用光学フローセルに搬送する。希釈/被覆溶液によって包囲された層状サンプル流の形態で細胞がほぼ一度に1個ずつフローセルを通過するときに測定プロセスが開始される。被測定容積(volume)は光ビームによって照射されており、流動軸に垂直な2つの次元において流体力学的に収束した細胞流によって限定され、流動軸に平行な1つの次元において約17ミクロンのレーザービームの垂直方向ビームウエストによって限定されている。この試験を実施するとき、サンプルの流速は約2.0 μ l/秒であり、RBC及び網状赤血球のサンプル流の対応する被照射検出容積は約80 \times 5 \times 17ミクロンの寸法をもつ楕円筒である。17ミクロンは円筒の軸に沿って測定された寸法である。

この時点で、図4aの細胞図のIAS及びFL1の二次元特徴空間に示すように、細胞の存在は、3°~10°のコーン内の光を検出する中角散乱ホトダイオード及び青色蛍光FL1を検出する光電子増倍管("PMT")によって検出される。細胞が上記被照射容積を通過するときにパルスが発生し、パルスはこれらの検出器によって測定される。次にこれらのパルスの振幅がフィルター化され、増幅され、デジタル化され、対応するIAS及びFL1の二次元特徴空間にリストモードで記憶される。細胞は8秒間カウントされる。上記の流速及び希釈率を用いた場合、血液1マイクロリットルあたりRBCカウント数が5百万個の正常被験サンプル中で生じるイベントカウントの割合は毎秒5950であろう。次に、上記のIAS及びFL1の特

10

20

30

40

50

微空間のリストモードデータにアルゴリズムが応用され、20秒以内の計算時間で以下のパラメーターが決定される。

1. RBCゲート：網状赤血球を含むRBC集団をゲートするがWBC及び血小板を排除することによって、WBC及び血小板を排除する。
2. 網状赤血球のパーセント：ゲートされたRBC集団をそれらのFL1信号の大きさに従って再分析する。成熟RBCに属する領域を定義するために、対数適合度 (log fit) をFL1ヒストグラムに適用し、この領域よりも上にあるFL1信号を有する細胞を網状赤血球として標識する。網状赤血球のカウント数をRBCカウント総数で除算することによって網状赤血球の%を計算する。
3. 網状赤血球の絶対カウント数：網状赤血球のパーセントにCBCモードで得られたサンプル中のRBCの絶対カウント数を乗算することによって得られる。
4. 網状赤血球成熟指数 ("RMI") : RMIは、正常な網状赤血球集団の平均蛍光を1標準偏差 ("S.D.") 以上上回るFL1信号を有している網状赤血球のパーセントとして表す。

上記は単なる便宜的な記載であり、本発明のRMIの式が上記のアルゴリズムにのみ限定されることは全くない。以下の実施例は、光散乱及び蛍光によるフローサイトメトリーの技術を用いて網状赤血球を迅速に分析するための試薬組成物及び該組成物を組込んだ方法を示す。これらの実施例は単なる代表例であり、本発明の範囲がこれらの実施例に限定されないことは理解されよう。

実施例 1

5マイクロリットルの臨床サンプルを1.0mlの試薬と混合した。試薬は、1NのHClでpH7.0 + 0.1に調整した50mMのイミダゾールバッファと、6.4g/リットルのNaClと、0.1マイクログラム/mlのヨウ化2 - ジエチルアミノ - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウム (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) と、0.2%のPluronic (登録商標) F127と、0.03%のProclin (登録商標) 300とから成る。次いで、サンプルと試薬との混合物を30 ~ 60秒以内にFACScan (登録商標) フローサイトメーター (Becton Dickinson & Co.) に導入し、試薬組成物中の染料による膜透過速度を測定した。図1aは、前方散乱 (FSC) 信号対緑色蛍光 (FL1) 信号の二次元表示である。図1bは、ゲートされた赤血球集団のFL1ヒストグラムであり、染色された網状赤血球集団が成熟RBC集団の右側に示されている。図1c及び図1dは夫々、第二の臨床サンプルの結果を示す図1a及び図1bと同様のグラフである。

実施例 2

図2aは、FACScan (登録商標) フローサイトメーターで実施した経時試験の結果を長時間 (30秒 ~ 30分) にわたる網状赤血球の%として表すグラフであり、図2bは、網状赤血球の平均FL1として表すグラフである。双方の図から理解されるように、網状赤血球の%は30秒以内に定常状態に到達し、染色濃度は30秒以内にピークの約80%に到達する。本発明によってこのように迅速な染色が得られるので、別個のインキュベーション装置または方法を要せずに本文中に開示した方法及び試薬を全自動血液分析装置及びフローサイトメーターに組込むことが可能である。

実施例 3

約15%の網状赤血球を含む5マイクロリットルの臨床サンプルを1.0mlの本発明試薬と混合した。試薬は、1NのHClでpH7.0 + 0.1に調整した50mMのイミダゾールバッファと、6.4g/リットルのNaClと、0.2マイクログラム/mlのヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウム (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) と、0.2%のPluronic (登録商標) F127と、0.03%のProclin (登録商標) 300とから成る。次いで、サンプルと試薬との混合物を30秒以内にFACScan (登録商標) フローサイトメーターに導入し、サンプル中の網状赤血球の%を測定した。図3aは、FSC信号対FL1信号の二次元表示であり、図3bは、ゲートされた赤血球集団のFL1ヒストグラムである。データが示すように、WBC及び血小板はRBC及び網状赤血球の集団から十分に分離され、染色された網状赤血球のFL1強度は、赤血球のFL1ヒストグラム上で血液サンプル中の網状赤血球濃度の定量分析に用いる網状赤血球の領

10

20

30

40

50

域を容易に定義できるような強度である。

実施例 4

この実施例では、全自動的な高処理能力のマルチパラメータ血液分析装置（1994年8月1日出願の“METHOD AND APPARATUS FOR PERFORMING AUTOMATED ANALYSIS”という表題の米国特許出願第08/283,379号）を使用した。正常被験者から採取した18.75 μ lのEDTA - 抗凝固処理全血サンプルを、サンプル吸引プローブを用いて、約7856 μ lの希釈/被覆溶液（等張性生理食塩水）を収容したRBCカップに導入し、混合した。次いで、サンプルのRBC絶対カウント数を測定するために希釈サンプルをシースドインピーダンスアパーチャーに搬送した。同時に、約200マイクロリットルの希釈全血サンプルを、600マイクロリットルの本発明試薬を収容した網状赤血球のカップに移した。この試薬は、1NのHClでpH7.0 + 0.1に調整した50mMのイミダゾールバッファと、6.4g/リットルのNaClと、0.2 μ g/mlのヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムと、10mg/mlのBIGCHAPと、0.03%のProclin（登録商標）300とを含んでいた。次いで、サンプル/試薬混合物を散乱及び蛍光を検出するシース付きの光学フローセルに搬送した。システム検出プロセスは前述の通りであり、1994年8月1日出願の“METHOD AND APPARATUS FOR PERFORMING AUTOMATED ANALYSIS”という表題の米国特許出願第08/283,379号の記載内容全部が参照によって本明細書に含まれるものとする。サンプル/試薬混合物の搬送に要する処理停止時間は僅か10秒に短縮される。IAS対FL1細胞図上で網状赤血球を含むRBC集団がゲートされ（図4a）、ゲートされたRBC集団のFL1ヒストグラム（図4b）を利用して網状赤血球のカウント数及びRMIの測定値が値が得られる。FL1ヒストグラムの1 \times 表示はRBC集団ピークを示す目盛りであり、5 \times 表示は網状赤血球集団を示す。これらの結果は、付加的なサンプルインキュベーション用装置もしくは方法またはオフラインのサンプル調製段階を要せず、サンプル中の網状赤血球とCBCとの同時分析が可能であることを示す。

10

20

実施例 5

標準方法で測定して低濃度の網状赤血球及び増加濃度のWBCを含むことが判明した臨床サンプルを、サンプル吸引プローブを用いて、約7856 μ lの希釈/被覆溶液（等張性生理食塩水）を収容した米国特許出願第08/283,379号に記載の装置のRBCカップに導入する。次いで、希釈したサンプルをシースドインピーダンスアパーチャーに搬送し、サンプルのRBC絶対カウント数を測定する。同時に、約200マイクロリットルの希釈サンプルを、600マイクロリットルの本発明試薬を収容した網状赤血球のカップに移送し、混合した。この試薬は、1NのHClでpH7.0 + 0.1に調整した50mMのイミダゾールバッファと、6.4g/リットルのNaClと、1.0mlあたり0.2 μ gのヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムと、0.2%のPluronic（登録商標）F127と、2.5mg/dlのn - ドデシル - D - マルトシドと、0.03%のProclin（登録商標）300とを含んでいた。次に、サンプル/試薬混合物をシース付きの検出用光学フローセル100に搬送した。システム検出プロセスについては前述した。IAS対FL1細胞図では網状赤血球を含むRBC集団がゲートされ（図5a）、ゲートされたRBC集団のFL1ヒストグラム（図5b）を使用して網状赤血球のカウント数及びRMIの測定値を得る（このサンプルの網状赤血球のカウント数はRMIの計算には少なすぎた）。図5bのFL1ヒストグラムは、RBC集団ピーク（1 \times 表示）及び網状赤血球集団（5 \times 表示）の双方を示す目盛りを有している。このサンプルでは、検出可能な網状赤血球集団は観察できない。

30

40

実施例 6

この実施例では、増加濃度の網状赤血球（標準方法で測定して20%）及び増加濃度のWBC（96k/リットル）を含む臨床サンプルを使用した。サンプルを実施例4に記載の手順で処理した。結果を図6a及び6bに示す。データが示すように、本発明は、WBC及び血小板を正確に排除し、暗い網状赤血球と明るい網状赤血球との双方を同定及びカウントし得る。上記のアルゴリズムを使用するとこのサンプルは69.2%という高いRMI値を示した。

実施例 7

実施例4に記載の高処理能力のマルチパラメータ血液分析装置及び実施例1に記載のFA

50

CScan (登録商標) フローサイトメーターにおいて、室温で30分のインキュベーションを要するチアゾールオレンジ (T0) 法 (米国特許第4,883,867号) を用いて77の臨床サンプルを分析した。各サンプルに対してNCCLS標準方法 (詳細に関しては従来技術の項参照) による処理も実施した。次に、本発明の非インキュベーション方法の結果を、T0法及びNCCLS法の結果に比較した。線形回帰プロットを図7及び図8に示す。データが示すように、本発明の結果は、NCCLS鏡検法 ($R = 0.982$ 、勾配 = 1.05、Y軸切片 = 0.002) 及びT0法 ($R = 0.986$ 、勾配 = 0.964、Y軸切片 = 0.005) の結果と十分な相関関係を有している。

実施例 8

一方は正常ウナギ (サンプル 1) 及び他方は網状赤血球増加症のウナギ (サンプル 2) から2つのEDTA - 抗凝固処理ウナギ血液サンプルを作製した。サンプル 1は1.9%の網状赤血球を含み、サンプル 2は90%を上回る濃度の網状赤血球を含んでいた。以下のプロトコルに従って線形性サンプルを調製した。

1. 双方のサンプルのRBC濃度を $3.5 + 0.05M$ /リットルに調整した。
2. 以下の表に示す割合で2つのサンプルを混合することによって6レベルの線形性サンプルを調製した。

管番号	サンプル 1	サンプル 2
1	0.00ml	1.50ml
2	0.30ml	1.20ml
3	0.60ml	0.90ml
4	0.90ml	0.60ml
5	1.20ml	0.30ml
6	1.35ml	0.15ml

3. 米国特許第08/283,379号の血液分析装置でサンプルを分析した。
4. 全血サンプル 1μ 1あたりの網状赤血球の%及び絶対数の理論値を以下の式に従って計算した：

$$\text{サンプルの網状赤血球の理論的 \%} = \left[\left(\frac{n}{1.5} \right) \times A \% \right] + \left[\left(\frac{m}{1.5} \right) \times B \% \right] \times 100$$

但し、

n = 線形性サンプル中のサンプル 1 の容量

m = 線形性サンプル中のサンプル 2 の容量

1.5 = 線形性サンプルの総容量

A % = 非希釈サンプル 1 中の網状赤血球の%

B % = 非希釈サンプル 2 中の網状赤血球の%、

及び、

$$\text{網状赤血球の理論的絶対数} = \left[\left(n \times A \right) + \left(m \times B \right) \right] / 1.5 \text{ サンプルの網状赤血球の理論的 \%}$$

但し、

n = 線形性サンプル中のサンプル 1 の容量

m = 線形性サンプル中のサンプル 2 の容量

1.5 = 線形性サンプルの総容量

A = 非希釈サンプル 1 中の網状赤血球の

B = 非希釈サンプル 2 中の網状赤血球の。

5. 理論値を横座標、マルチパラメーター血液計測装置から得られた値を縦座標として線形性曲線をプロットした。

結果を図9に示す。データが示すように、本発明の方法及び試薬は、網状赤血球濃度90%まで線形応答を示す。

実施例 9

種々の界面活性剤を評価するために本発明に従って調製した数種類の試薬の安定度を図10~14に示す。安定度試験は、HITACHI F4500 (登録商標) 計器 (励起波長488nm) を用い、以下のプロトコルに従って試薬にRNAを添加し、RNAに結合したシアニン核酸染色の発光スペクトルを走査することによって行った。

10

20

30

40

50

1. 脱イオン水中のRNA (仔ウシ肝臓RNA、Sigma Cat.No.R7250) 溶液 (1mg/ml) を調製した。
2. 各RNAの100 μ l の原液を1.6mlの本発明の試験試薬に添加し、混合した。
3. 次いで、HITACHI F4500 (登録商標) 計器 (励起波長488nm) を用い、RNA結合シアニン核酸染色の発光スペクトルを450nmから650nmまで走査した。全部の試験試薬でRNA結合シアニン染料の全目盛りを2,000に設定する。

実施例10

図10は、水溶液中のシアニン染料、ヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウム安定化させる効果を異なる5種類の界面活性剤について試験した以外は、実施例4に記載の手順で調製した50mMのイミダゾールバッファ中のRNA結合したヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウム染料 (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) の発光スペクトルである。全部の試薬を室温で3.5カ月間保存した。ピークの高い順に：

- A = BIGCHAP (10mg%) ;
- B = マルトシド (5mg%) ;
- C = Pluronic (登録商標) F127 (0.2%) ;
- D = コール酸、ナトリウム塩 (10mg%) ;
- E = 界面活性剤非添加 ;
- F = カプリル酸、ナトリウム塩 (10mg%)

を示す。

データが示すように、BIGCHAP、マルトシド及びPluronic (登録商標) F127は水性緩衝溶液中で染料を極めて有効に維持することができたが、コール酸のナトリウム塩及びカプリル酸のナトリウム塩は有効でなかった。実際、試薬にカプリル酸を添加すると染料の保存寿命が短縮された。

実施例11

図11は、BIGCHAPまたはPluronic (登録商標) F127を界面活性剤として用いて実施例4に記載の手順で調製し4 で4カ月間保存したRNA結合シアニン染料、ヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムの発光スペクトルである。ピークの高い順に：

- A = 新しく調製した対照試薬 ;
- B = BIGCHAP (10mg%) ;
- C = Pluronic (登録商標) F127 (0.2%) ;
- D = Pluronic (登録商標) F127 (1.0%) ;
- E = 界面活性剤非添加

を示す。

図から判るように、4カ月の試験期間中に本発明の染料の有意な劣化は生じない。

実施例12

図12は、RNA結合シアニン染料、ヨウ化2 - ブチル - 4 - (2,3 - ジヒドロ - 3 - メチル - (ベンゾ - 1,3 - チアゾール - 2 - イル) - メチリデン) - 1 - フェニルキノリニウムの発光スペクトルであり、5mg%のBIGCHAPを含む本発明試薬中の3週間の高い温度での安定度を証明する。実施例4に記載の手順で試験試薬を調製し、実施例9のプロトコルに従ってRNAを添加した。ピークの高い順に；

- A = 4 ;
- B = 25 ;
- C = 37 ;
- D = 45

を示す。

データが証明するように、適当な水性緩衝溶液に非イオン性界面活性剤BIGCHAPを添加すると、シアニン染料の高温に対する感受性が低下し、従ってより安定になる。

実施例 13

図13は、1.0%のPluronic(登録商標)F127を添加するかまたは非添加のBis-Trisバッファ中のRNA結合したヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムの発光スペクトルである。イミダゾールバッファをBis-Trisバッファによって置換し、ヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムをヨウ化2-メチルチオ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム染料(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)によって置換し、室温で6.5カ月間保存した以外は、実施例4に記載の手順で試薬を調製した。

10

ピークの高い順に；

A = 1.0%Pluronic(登録商標)F127を添加したヨウ化2-メチルチオ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム試薬；

B = 界面活性剤を全く添加しないBis-Trisバッファ中のヨウ化2-メチルチオ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム；

C = 界面活性剤を全く添加しないイミダゾールバッファ中のヨウ化2-メチルチオ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム；

20

D = 1.0%のPluronic(登録商標)F127を添加したグリシル-グリシンバッファ中のヨウ化2-メチルチオ-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウム

を示す。

結果は、このシアニン染料の安定化にはバッファと界面活性剤との適正な組合せが必要であることを示す。

実施例 14

図14は、バッファと共に0.2%のPluronic(登録商標)F127を含む種々のバッファ中のRNA結合したシアニン染料、ヨウ化2-ブチル-4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムの発光スペクトルである。全部の試薬を室温で6週間保存した。

30

ピークの高い順に；

A = Trisバッファ；

B = Bis-Trisバッファ；

C = イミダゾール；

D = HEPESバッファ；

E = グリシル-グリシンバッファ；

F = リン酸バッファ

を示す。

このデータが示すように、Trisバッファ、Bis-Trisバッファ及びイミダゾールバッファは染料を十分に維持するが、グリシル-グリシンバッファ及びリン酸バッファは維持しない。

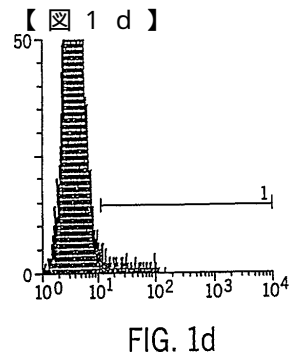
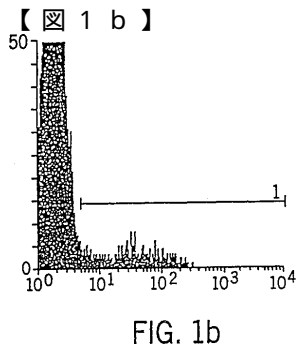
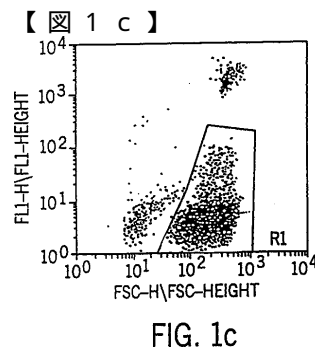
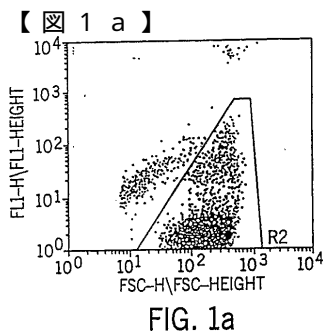
40

実施例 15

約2.3%の網状赤血球を含む5マイクロリットルの正常サンプルを、1.0mlの本発明試薬と混合した。試薬は、1NのHClでpH7.0+0.1に調整し、NaClで290mOsm/リットルのオスモル濃度に調整した50mMのTrisバッファと、0.2µg/mlの4-(2,3-ジヒドロ-3-メチル-(ベンゾ-1,3-チアゾール-2-イル)-メチリデン)-1-フェニルキノリニウムトシレート(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR)と、0.2%のPluronic(登録商標)F127と、0.03%のProclin(登録商標)300とを含んでいた。次いで、サンプル中の網状赤血球の%を測定するために、15秒以内にサンプル/試薬混合物をFACSscan(登録商標)フロー

50

サイトメーターに導入した。図15aは、FACScan(登録商標)サイトメーターのFSC信号対FL1信号の二次元表示であり、図15bは、ゲートされた赤血球集団のFL1ヒストグラムを示す。図15cは、FACScan(登録商標)フローサイトメーターで行った経時試験の結果を、15秒から4.0分までの網状赤血球の%として表す。図から判るように、RBC+網状赤血球のゲートは網状赤血球を血小板及びWBCから明確に分離する。また、網状赤血球が極めて迅速に染色されるので網状赤血球の%が15秒以内に定常状態に到達する。このような迅速な染色性が得られたので、全自動血液分析装置及びフローサイトメーターに検出方法を組込むことが可能になる。



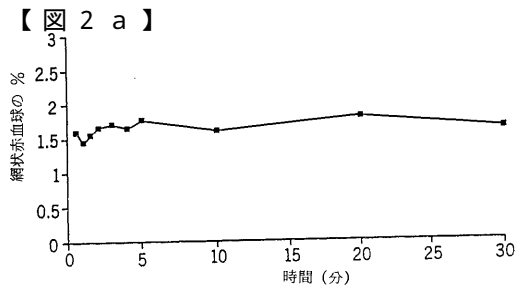


FIG. 2a

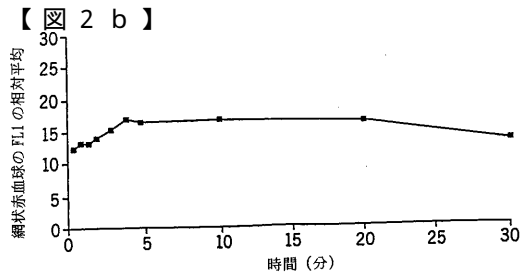


FIG. 2b

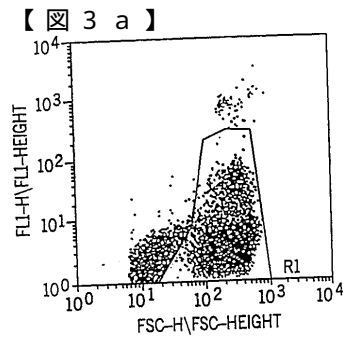


FIG. 3a

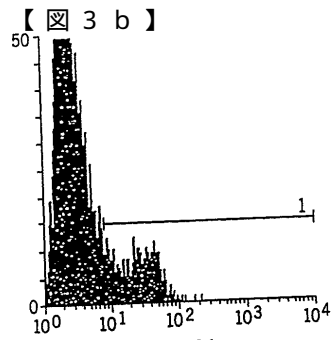


FIG. 3b

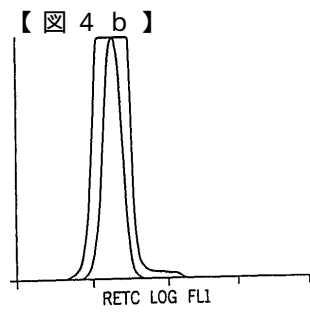


FIG. 4b

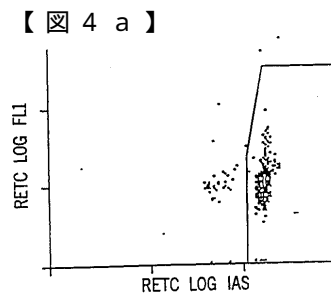


FIG. 4a

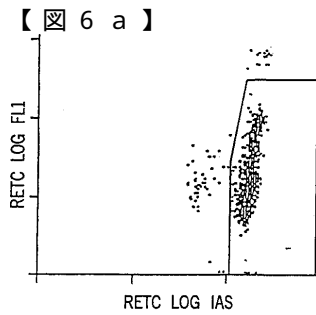


FIG. 6a

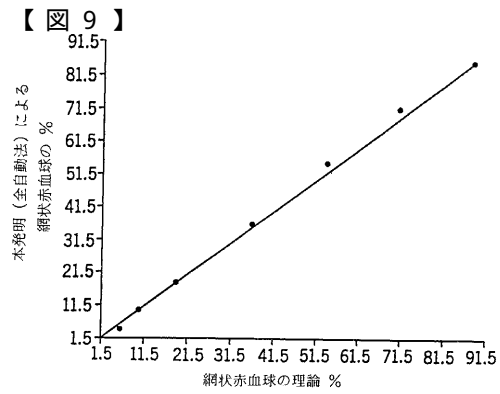
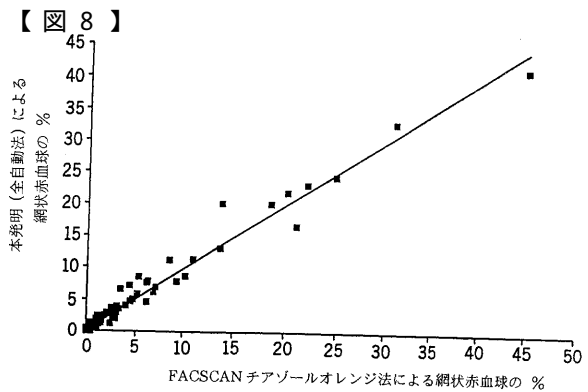
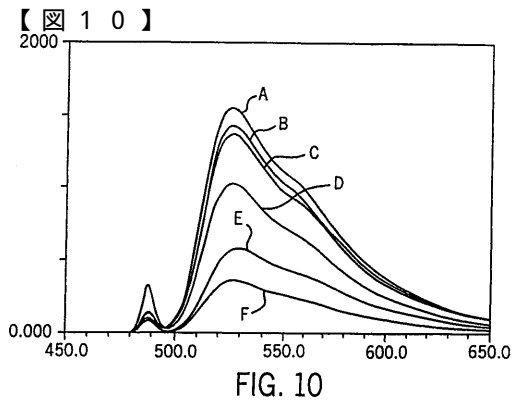
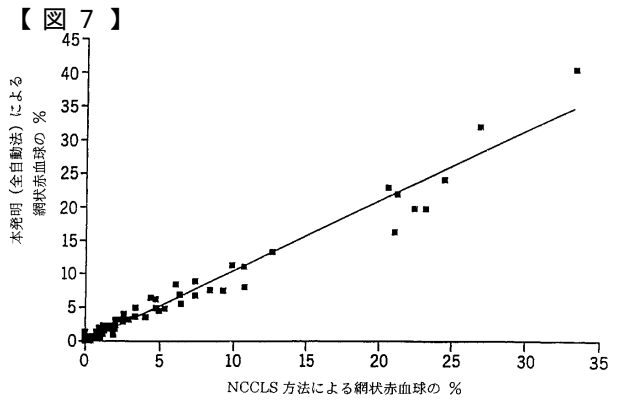
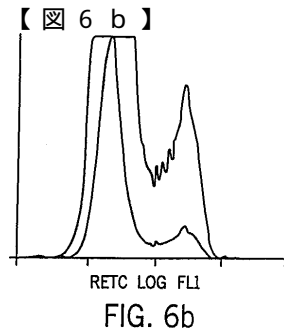
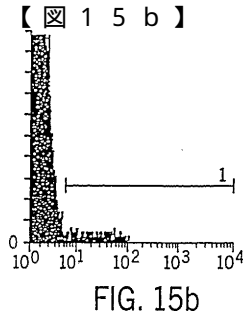
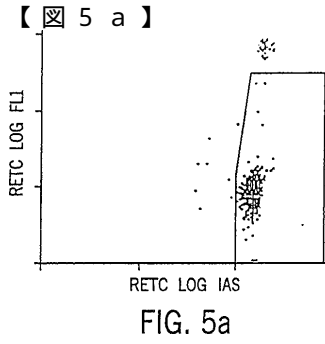
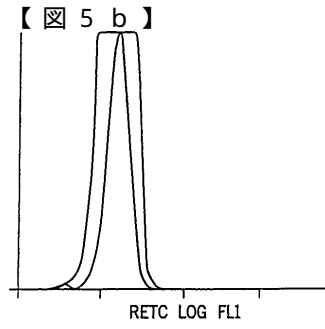
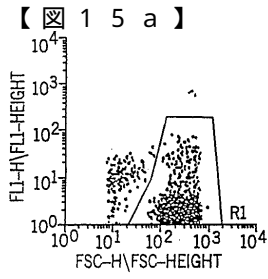


FIG. 9



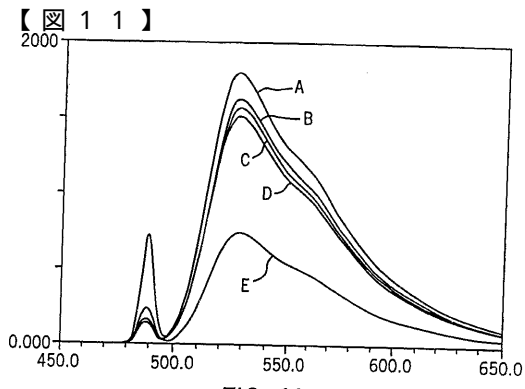


FIG. 11

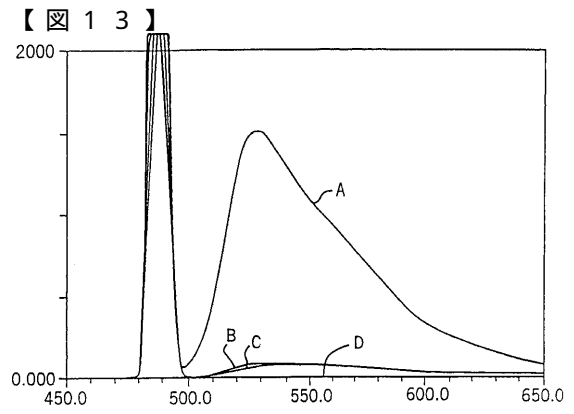


FIG. 13

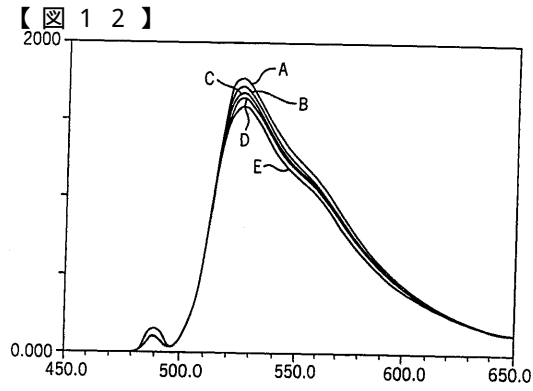


FIG. 12

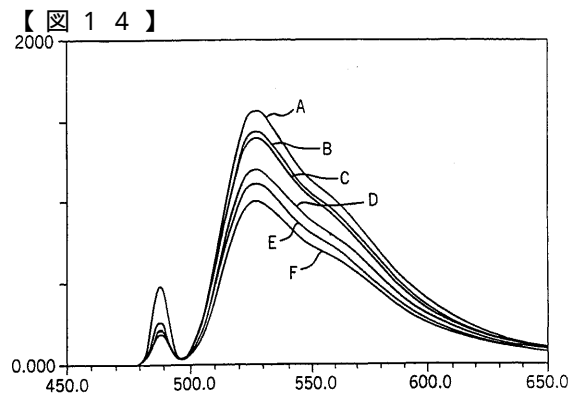


FIG. 14

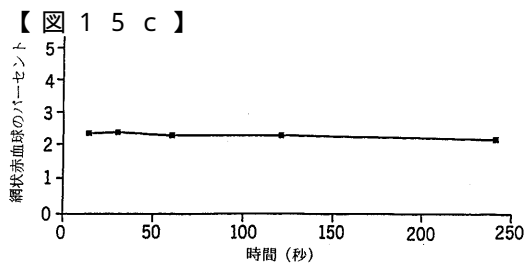


FIG. 15c

フロントページの続き

(72)発明者 キム, ヤング・ラン

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94086、サニーベイル、ラメサ・テラス・934・ジー

(72)発明者 カンター, ジョハンナ

アメリカ合衆国、カリフォルニア・94306、パロ・アルト、ミドル・フィールド・ロード・3
120

審査官 宮澤 浩

(56)参考文献 特開平7-333220(JP, A)

特開平7-196930(JP, A)

特開平6-300753(JP, A)

特開平3-66763(JP, A)

特開昭62-112062(JP, A)

特開平6-27017(JP, A)

特開平6-180316(JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 33/48