

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局

(43) 国際公開日  
2017年1月12日(12.01.2017)



(10) 国際公開番号  
WO 2017/006409 A1

- (51) 国際特許分類:  
G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/48 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2015/069377
- (22) 国際出願日: 2015年7月6日(06.07.2015)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (71) 出願人: 株式会社リージャー (LEISURE, INC.)  
[JP/JP]; 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町2-3-3-8 浜町アクセスビル2階 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 大澤 進(OSAWA Susumu); 〒2840023 千葉県四街道市みそら4丁目17番9号 Chiba (JP). 杉本 晋哉(SUGIMOTO Shinya); 〒1320015 東京都江戸川区西瑞江3-4-0-7 Tokyo (JP).
- (74) 代理人: 平木 祐輔, 外(HIRAKI Yusuke et al.); 〒1056232 東京都港区愛宕2丁目5番1号 愛宕グリーンヒルズMORIタワー32階 Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: METHOD FOR TRANSMITTING ACCURACY TO MEASUREMENT METHOD USING DILUTED PLASMA AS TEST SAMPLE

(54) 発明の名称: 希釈血漿を検査試料として用いる測定法への正確さの伝達方法

(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a method for transmitting the accuracy of a measured value using an accurately valued calibrator to a measured value determined by a measurement method using diluted plasma as a test sample, said transmission method, whereby the accuracy in measurement conducted by a standard measurement method using undiluted serum as a calibrator is transmitted to measurement using diluted serum or plasma, comprising: (i) diluting 3-5 fold control serum or pooled serum, to which the accuracy of an accurately valued calibrator has been transmitted, and calibrating a measurement method using diluted plasma as a test sample with the use of the diluted serum as a calibrator; and (ii) measuring the test sample by the measurement method thus calibrated.

(57) 要約: 本発明の方法は、希釈血漿を検査試料として用いる測定方法による測定値に、正確に値付けされた校正物質を用いた測定値の正確さを伝達する方法であって、(i) 正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を3~5倍に希釈し、希釈した血清を校正物質として用いて、希釈血漿を検査試料として用いる測定方法の校正を行い、(ii) 校正した前記測定方法により検査試料を測定することを含む方法であり、希釈していない血清を校正物質として用い、基準測定操作法で測定したときの測定の正確さを、希釈した血清又は血漿を用いた測定に伝達する方法の提供を目的とする。



WO 2017/006409 A1

## 明 細 書

発明の名称：

希釈血漿を検査試料として用いる測定法への正確さの伝達方法

### 技術分野

[0001] 本発明は、血液等の生体試料中の分析対象成分を測定する生化学・免疫化学検査において、生体試料を特定組成を有する緩衝液で希釈し、希釈した試料を検査試料として用いて血漿試料成分や酵素活性を分析するときの測定値の正確さを伝達する方法に関する。

### 背景技術

[0002] 生化学検査や免疫化学検査において、血液中の成分や酵素活性等の血液中の種々の物質を定量し、得られた定量値により、被験者の健康状態や疾患の有無を判断することができる。このような検査は多数の検査室で種々の測定系を用いて行われており、正確な判断を行うために、それぞれの測定において同一の正確な定量値が得られる必要がある。このため、検査対象物質の正確な値がわかっている値付けされた試料を一次校正物質 (calibrator) として、各測定操作方法の校正 (calibration) を行い、その測定操作方法で測定を行った場合の正確さを確保することが行われている。一次校正物質は、例えば、測定対象物質を秤量し、特定の基準測定操作法 (一次基準測定操作法) で値付けされ、厳密に管理される。しかしながら、検査試薬や装置を製造する製造業者や日常検査業務を行う検査室で、一次校正物質を常に利用することはできない。そこで、正確な値がわかっている値付けがされた一次校正物質を用いて基準となる二次基準測定操作法の校正を行い、該測定操作法により他の校正物質の値付けを行い、値付けられた校正物質を二次校正物質として用いることが行われている。二次校正物質を用いて、さらに他の基準測定操作法 (例えば、推奨測定操作法) の校正を行う。このような工程により、一次校正物質を用いた一次基準測定操作法による測定の正確さを、二次校正物質を用いた二次基準測定操作法による測定に伝達することができる。

実際には、さらに同様の工程を繰り返し、検査試薬や装置の製造業者が入手可能な管理血清等の製造業者実用校正物質が調製され、その製造業者が用いている測定操作法の校正が行われ、製造業者が製品を製造する際に用いる製品校正物質の値付けがされ、最終的に製品校正物質を用いて検査室等の最終使用者が日常的に用いる測定操作法の校正が行われ、その測定操作法で一般の被験体の日常検査試料である実検体が測定される。上記の工程の階層段階を経ることにより、最終的には日常的に用いる測定操作法による日常検査試料を用いたときの測定に、一次校正物質を用いて基準となる一次基準測定操作法で測定したときの値の正確さが伝達される。最終的な測定が正確か否かは、上記の階層段階を遡ることによりわかり、これを日常検査測定値のトレーサビリティが確保されているという。このような検査測定値の正確さを伝達するためには、検査試料中の種々の妨害因子の存在により測定の変動を避けるために、各階層において用いる校正物質の性状は同等である必要があるとされている。実際には、校正物質として、希釈していない血清や血漿が用いられる。

[0003] 一方、希釈していない血清以外の検査試料を用いる検査法も存在する。例えば、いつでも、血液の検査を行える方法として、微量の血液を内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学分量を定量する方法として特開2003-161729号公報に記載の方法がある。

[0004] 上記のように、一般の検査室等で日常的に行われる生化学・免疫化学分量の定量において、特定の検査項目の値が決められている校正物質を、基準となる基準測定操作法で測定した値の正確さを伝達し、日常的に行われる生化学・免疫化学定量法の測定値の正確さを確保する必要がある。

[0005] 希釈した血漿を用いた生化学・免疫化学検査は微量の手指採血試料で検査が可能である利点がある。この方法により得られた検査値は健康状態のスクリーニング検査として利用するとき、希釈していない血清や血漿を測定した健診データとの正確さについての互換性を確保することで、希釈血漿値の有

用性が高まる。

[0006] 従来は、血漿を希釈した測定値の正確さの確認は、二次校正物質（常用参照標準物質）で正確さを確認した測定法を用いて、多数例の希釈していない血漿値を測定した値とその血漿を希釈して測定した値の相関プロットから2つの測定値の回帰式（関係式）を求めて、その回帰式（関係式）の傾きと切片から正確さを確認する方法により、希釈していない血清や血漿を測定した健診データとの正確さについての互換性を確保していた。

### 先行技術文献

### 特許文献

[0007] 特許文献1：特開2003-161729号公報

### 発明の概要

### 発明が解決しようとする課題

[0008] 希釈されていない血清や血漿を測定するための生化学・免疫化学検査の測定条件は各市販測定試薬ごとに最適化された条件が提示されている。この条件下において、あらかじめ測定対象項目の正確な値が値付けされた校正物質を、基準となる基準測定操作法で測定したときの値の正確さが伝達された校正物質がそれぞれの市販試薬に添付され、その測定操作法の正確さが確保されている。この場合、市販測定試薬の実検体である検査試料及び校正物質として、希釈されていない血清又は血漿が用いられ、両者の性状は同等であることが原則となる。

[0009] 一方、これら正確さが伝達された市販測定試薬を用いて、希釈血漿を検査試料として用いて測定する場合、目的の検査試料は希釈されているので、希釈されていない血清又は血漿を測定するための条件では正確な測定値を得ることはできない。このため検査試料として希釈血漿を用いる場合、血清及び血漿測定とは異なる約10倍希釈血漿に最適な試料量、試薬量で測定する必要がある。従って、市販測定試薬を用いた測定に正確さを伝達するために用いる校正物質と希釈血漿の性状が異なるため、希釈されていない血清又は血漿

を測定するための条件では正確な測定値を得ることはできない。すなわち、校正物質と性状が異なる希釈血漿を用い、異なる条件で測定するため、希釈されていない血清や血漿を校正物質として用いて校正した測定の正確さは、希釈血漿を検査試料として用いる測定操作法には伝達されない。これは、例えば、測定値に影響を及ぼす妨害因子の濃度が希釈していない血清と希釈血清では異なること等による。

[0010] 上記のように、正確さを伝達するとき、起源として用いられる正確に調製された一次校正物質を基準となる一次基準測定操作法で測定し値付けし、値付けされた一次校正物質を用いて二次基準測定操作法の校正 (calibration) を行う。次いで、該二次基準測定操作法で二次校正物質を測定し値付けし、値付けされた二次校正物質を用いて特定の測定操作法の校正を行う。このような、値付けと校正を繰り返すことにより、一般の検査室で前記の特定の測定操作法で検査試料を用いて検査を行う際の測定値の正確さが伝達される。通常は、各階層で用いられる校正物質と検査室で用いられる検査試料の性状は同等であり、希釈していない血清が用いられる。

[0011] このように、常用される校正物質の値付けされた測定値である評定値は市販試薬を生化学自動分析装置や免疫化学自動分析装置を用いて、希釈していない血清試料を測定する条件で認証しているため、希釈した血清や血漿への正確さの伝達方法を確立する必要がある。

[0012] 本発明は、希釈していない血清を校正物質として用い、基準測定操作法で測定したときの測定の正確さを、希釈した血清又は血漿を用いた測定に伝達する方法の提供を目的とする。

### 課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、本発明者らが開発した、希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法であって、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定操作方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる

物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定操作方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定操作方法において、値付けされた校正物質を用いて基準となる基準測定操作法で測定したときの測定の正確さを伝達する方法について鋭意検討を行った。

[0014] 値付けされた校正物質として、管理血清等を入手することができるが、管理血清は希釈されていない血清であるので、管理血清を用いて、希釈血漿を検査試料として用いる測定操作法に正確さを伝達することはできないとされていた。

[0015] 本発明者らは、正確さが認証された校正物質を用いた測定の正確さが伝達された管理血清を、前記の測定法で用いる希釈緩衝液で3～5倍に希釈し、希釈した管理血清を校正物質として用いて、希釈血漿を検査試料として用いる測定操作法の校正を行うことにより、該測定操作法に、管理血清を用いる測定が確保している正確さが伝達されることを見出し、本発明を完成させるに至った。

[0016] すなわち、本発明は以下のとおりである。

[1] 希釈血漿を検査試料として用いる測定方法による測定値に、正確に値付けされた校正物質を用いた測定値の正確さを伝達する方法であって、

(i) 正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を3～5倍に希釈し、希釈した血清を校正物質として用いて、希釈血漿を検査試料として用いる測定方法の校正を行い、

(ii) 校正した前記測定方法により検査試料を測定することを含む方法。

[2] 正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を3倍に希釈して、校正物質として用いる、[1]の方法。

[3] 希釈血漿を検査試料として用いる測定方法が、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学分量を定量する、内部標準物質を利用する測定方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学分量を定量する、外部標準物質を利用する測定方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定方法である、[1]又は[2]の方法。

[4] 希釈血漿の希釈に用いる希釈緩衝液が、赤血球の溶血を防止するために高張に調製されており、かつ補酵素を含むpH6.5~8.0の緩衝液である、[1]~[3]のいずれかの方法。

[5] 希釈血漿の希釈に用いる希釈緩衝液が、以下の組成を有する、[4]の方法：

pH6.5~pH8.0、1.5~2.5 mmol/L HEPES、6~10 mmol/L EDTA-2Na、2~4 mmol/L D-mannitol、40~60 mmol/L  $K_2HPO_4$ 、0.025~0.075 mmol/L PALP(ピリドキサーリン酸)、4~6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸、100~250 mmol/L NaCl、浸透圧300~450 mOsm/Kg、又は、pH6.5~pH8.0、30~100mmol/L HEPES、30~100mmol/L 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール 0.2~1.0 mmol/L EDTA-2K、2~4 mmol/L D-mannitol、0.025~0.075 mmol/L PALP(ピリドキサーリン酸)、4~6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸、1~3 mmol/Lリチウム、浸透圧300~450 mOsm/Kg。

[6] 希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法であって、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生

化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定方法に用いる測定装置を用いた測定の校正を行う方法であって、正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を3～5倍に希釈し、希釈した血清を校正物質として用いて、前記測定の校正を行う方法。

[7] 正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を3倍に希釈して、校正物質として用いる、[6]の方法。

[8] 希釈血漿の希釈に用いる希釈緩衝液が、赤血球の溶血を防止するために高張に調製されており、かつ補酵素を含むpH6.5～8.0の緩衝液である、[6]又は[7]の方法。

[9] 希釈血漿の希釈に用いる希釈緩衝液が、以下の組成を有する、[8]の方法：

pH6.5～pH8.0、1.5～2.5 mmol/L HEPES, 6～10 mmol/L EDTA-2Na, 2～4 mmol/L D-mannitol, 40～60 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 0.025～0.075 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4～6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 100～250 mmol/L NaCl、浸透圧300～450 mOsm/Kg11、又は、pH6.5～pH8.0、30～100mmol/L HEPES, 30～100mmol/L 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール, 0.2～1.0 mmol/L EDTA-2K, 2～4 mmol/L D-mannitol, 0.025～0.075 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4～6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 1～3 mmol/Lリチウム, 浸透圧300～450 mOsm/Kg。

**発明の効果**

[0017] 本発明の方法により、希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法であって、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定操作方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定操作方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定操作方法に、一次校正物質を用いて測定したときの正確さを伝達させることができる。

[0018] 該測定操作方法により、微量の血液 (10~65  $\mu$ L) を用いて生化学検査13項目、腫瘍マーカー、肝炎検査など多くの検査ができる。この検査法は時間と場所を選ばないことから健診を受けられない主婦や自営業の人々の未病を発見できる。また、本発明の方法により、検査データの正確さを保証できるため、精密検査のために医療機関や人間ドックなどの検査データとの互換性も高まり、医療機関での同じ検査を再度実施することが不要になり国民医療費の節減にも貢献する。

### 図面の簡単な説明

[0019] [図1]血漿希釈緩衝液の検定の結果を示す図である (PALP無添加)。

[図2]血漿希釈緩衝液の検定の結果を示す図である (PALP添加)。

### 発明を実施するための形態

[0020] 本発明は、希釈血漿を検査試料として用いる測定法に、正確さを伝達する方法である。具体的には、希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法であって、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数

から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定操作方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定操作方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定操作方法を用いて、希釈血漿中の検査対象項目を測定するときに、あらかじめ検査対象項目の値がわかっている値付けされた校正物質を、基準となる基準測定操作法で測定したときに得られる測定値の正確さを伝達する方法である。

[0021] 希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法として、特開2003-161729号公報に記載の方法を例示することができる。この方法においては、微量の血液を希釈し、該希釈血液から血球を除去し、希釈血漿を分離して、希釈血漿を検査試料として用いる。この方法においては、血液分離器具を用いることが望ましい。該血液分離器具は、採取した血液を収容する血液採取手段と、前記血液中の血球と血漿とを分離する濾過手段と、分離された血球を収容する血球採取手段と、分離された血漿を収容する血漿採取手段と、前記血液採取手段内に収容された血液を加圧する加圧手段とを備えており、前記濾過手段は、一端側が前記血液採取手段の血液排出部に連通すると共に他端側が前記血球採取手段の血球導入部に連通された細管を有し、該細管の壁面には、血漿の通過を許容し、かつ血球の通過を阻止する大きさの多数の貫通孔が形成されており、前記加圧手段による加圧動作により、前記血液採取手段内の血液が前記濾過手段内に導入され、かつ該濾過手段の前記貫通孔を介して前記血液中の血漿が前記血漿採取手段内に分離収容されるように構成されたことを特徴とする。

[0022] 該方法においては、血液から血球を除き血漿を調製し、その際に血漿希釈

用緩衝液を用いるので、調製された血漿は前記の緩衝液で希釈されている。該方法においては、内部標準物質、外部標準物質、又は内部標準物質と外部標準物質を利用する方法を用いて血漿の希釈倍率を算出し、血液試料中の検査項目である生化学・免疫化学成分量を定量する。

[0023] ここで、内部標準物質とは、生体試料中に全く含まれないか、又は、含まれていても極微量である物質であり、内部標準物質は、生体試料の希釈に用いる緩衝液に所定の濃度になるように添加して用いる。緩衝液に添加した状態で長期間保存しても安定な物質が好ましい。内部標準物質として用い得る物質として、分子量500以下の化学物質で分子内に硫酸イオン ( $-SO_3^-$ )、カルボキシルイオン ( $-COO^-$ )、チオール基 ( $-SH$ )、第4級アミン ( $-NH_3^+$ )などの置換基を持つ化合物で、マルトースなどの2単糖類、グルタミン酸、ロイシン、バリン、イソロイシン、4-ヒドロキシベンゼン、ヒドロキシ酪酸、クレアチン、リンゴ酸、金属類（リチウム、ナトリウム、カリウム、クロール）、硫酸基を分子内に持つトリンダー試薬である(N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン)、ADPS(N-エチル-N-スルホプロピル-3-メトキシアニリン)、ALPS(N-エチル-N-スルホプロピルアニリン)、DAOS(N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン)、HDAOS(N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメトキシアニリン)、MAOS(N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3,5-ジメチルアニリン)、TOOS(N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-3-メトキシアニリン)、TOPS(N-エチル-N-スルホプロピル-3-メチルアニリン)等が挙げられる。これらの中でもアルカリ金属又はアルカリ土類金属に属する元素であって、天然において生体試料中に含まれないものが好ましい。アルカリ金属に属する元素として、Li（リチウム）、Rb（ルビジウム）、Cs（セシウム）、Fr（フランシウム）が挙げられ、アルカリ土類金属に属する元素として、Sr（ストロンチウム）、Ba（バリウム）、Ra（ラジウム）が挙げられ、この中でもLi（リチウム）が好ましい。また、グリセロール-3-リン酸を用いることもできる。内部標準物質の生体試料の希釈に用いる緩衝液への添加濃度は、希

釈後に内部標準物質の濃度が測定できる濃度であれば、限定されない。例えば、0.1~1000mM/L、好ましくは0.1~100mM/L、さらに好ましくは0.5~10mM/Lの濃度で添加すればよい。例えば、リチウムを内部標準物質として用いる場合、生体試料の希釈に用いる緩衝液にリチウムを上記濃度で添加すればよい。

[0024] 希釈緩衝液に内部標準物質が規定量溶解している場合、本来緩衝液中に存在するこの内部標準物質は、緩衝液及び血漿又は、血清中に分布することになり、希釈される。つまり、緩衝液中の内部標準物質の初期濃度 ( $C_0$ ) は、血液が添加されることによって濃度 ( $C_1$ ) へ変化する。この $C_0$ 及び $C_1$ によって、血漿の希釈率 ( $r_1$ ) =  $C_0 / (C_0 - C_1)$  が算出される。緩衝液量を $V_0$ 、血漿を緩衝液に添加した総量 $V_1$ とする。ここで、本来血漿又は、血清に存在する血球膜を透過しない成分の希釈率は、血漿又は、血清の希釈率と等しいので、 $r_1 = (V_0 + V_1) / V_1 = C_0 / (C_0 - C_1)$  によって算出される。

[0025] 外部標準物質は、生体試料中に含まれており、恒常性が高い物質、すなわち、生体試料中濃度の生理的変動が少ない物質であり、さらにヒト個体間で生体試料中濃度の差が少ない物質が好ましい。このような物質として、ナトリウム( $\text{Na}^+$ )、クロール( $\text{Cl}^-$ )、タンパク質が挙げられる。タンパク質としては、例えば血液に含まれ恒常性が高いアルブミンや血清中総タンパク質等が挙げられる。この中でも、特に恒常性が高く、また、個体間の変動が少ないナトリウムが好ましい。ヒト血漿中のナトリウム濃度の正常値、すなわち健康人の血漿中のナトリウム濃度は、約138~145mmol/L(mEq/L)であり、正常中央値は約142mmol/Lである。緩衝液を用いて希釈した後の外部標準物質の濃度と健康人の血漿中ナトリウム濃度の平均値から、検体として用いる生体試料の希釈倍数を求めることができる。

[0026] 外部標準物質を利用する場合、血漿の希釈倍数は、外部標準物質を用いて算出式(1)を用いた以下の算出方法により求めることができる。

[0027] 算出方法 1

$$X = \frac{A}{B} \quad (1)$$

A : 血漿中外部標準物質濃度の正常中央値の吸光度、

B : 希釈血漿中の外部標準物質の吸光度、

X : 血漿希釈倍数

[0028] 外部標準物質としてナトリウムを用いる場合、ナトリウムの吸光度を求めればよい。血漿中ナトリウム濃度の正常中央値の吸光度としては、ナトリウム142 mmol/Lの吸光度を用いればよい。

[0029] さらに、上記の内部標準物質と外部標準物質を併用して希釈倍数を求めることもできる。

[0030] 血漿の希釈倍数は、内部標準物質及び外部標準物質を用いて以下の3種類の算出方法により求めることができる。

[0031] 以下に説明する方法においては、血液を内部標準物質が添加された希釈用緩衝液で希釈し、フィルターを用いてろ過し得られた血漿試料を用いる。、内部標準物質としてリチウムを用い、外部標準物質としてナトリウムを用いる。

[0032] 算出方法 1

A : 内部標準物質を添加した緩衝液中の内部標準物質の吸光度

B : 希釈血漿中の内部標準物質の吸光度

C : 血漿中外部標準物質濃度の正常中央値の吸光度

D : 希釈血漿中の外部標準物質の吸光度

X : 血漿希釈倍数

[0033] ここで、希釈血漿とは、血液試料を希釈用緩衝液で希釈し、血球を除去して得られた血漿をいう。内部標準物質としてリチウムを用い、外部標準物質としてナトリウムを用いる場合、リチウムの濃度は、例えば、キレート比色法等でリチウム濃度を測定した場合に得られる吸光度で表すことができる。また、ナトリウムの濃度は、酵素的測定法等で測定した場合の吸光度で表す

ことができる。血漿中ナトリウム濃度の正常中央値は健常者の中央値であり、血漿中ナトリウム濃度の正常中央値の吸光度としては、ナトリウム142 mmol/Lの吸光度を用いればよい。該値は、既知の値である。以下の算出方法2及び3においても同様である。

[0034] 緩衝液による血漿の希釈倍数Xは下の算出式(1)又は算出式(2)で求めることができる。

$$X = \frac{A + C}{B + D} \quad (1)$$

$$X = \frac{\sqrt{A^2 + C^2}}{\sqrt{B^2 + D^2}} \quad (2)$$

[0037] 希釈血漿中の分析対象成分である生化学成分の測定濃度や酵素活性を定量し、該定量値に算出式(1)で求めた希釈倍数を乗じて、元の血漿中の分析対象成分を定量することができる。

[0038] 算出方法2

B: 希釈血漿中の内部標準物質の吸光度

D: 希釈血漿中の外部標準物質の吸光度

X: 血漿希釈倍数

血漿の希釈倍数は下の算出式(3)で求めることができる。

$$X = a \times (B + D) \pm b \quad (3)$$

(a及びbは係数)

[0039] 算出方法2においては、あらかじめB+Dと希釈倍数のデータを取得し、 $X = a \times (B + D) \pm b$ で表される回帰直線を作成しておく。

[0040] 希釈血漿中の分析対象成分である生化学成分の測定濃度や酵素活性を定量し、該定量値に算出式(3)で求めた希釈倍数を乗じて、元の血漿中の分析対象成分を定量することができる。

[0041] 算出方法3

A : 内部標準物質を添加した緩衝液中の内部標準物質の吸光度

B : 希釈血漿中の内部標準物質の吸光度

C : 血漿中外部標準物質濃度の正常中央値の吸光度、

D : 希釈血漿中の外部標準物質の吸光度

B' : 外部標準物質の吸光度から算出した希釈倍数による、希釈血漿中の内部標準物質の吸光度の補正值

X : 血漿希釈倍数

[0042] 内部標準物質（例えば、リチウム）と外部標準物質（例えば、ナトリウム）の希釈倍数Xは同じと仮定すると、下記の式が得られる。

$$X = A/B = C/D$$

[0043] 外部標準物質（例えば、ナトリウム）の希釈倍数により内部標準物質（例えば、リチウム）の吸光度変化量補正值B'を下の式で求める。

$$(B') = (A \times D) / C$$

[0044] 内部標準物質（例えば、リチウム）の吸光度変化量補正值B'でAを除することで外部標準物質（例えば、ナトリウム）補正による内部標準物質（例えば、リチウム）希釈倍数を求める。

$$X = A/B' \quad (4)$$

[0045] 希釈血漿中の分析対象成分である生化学成分の測定濃度や酵素活性を定量し、該定量値に算出式（4）で求めた希釈倍数を乗じて、元の血漿中の分析対象成分を定量することができる。

[0046] 内部標準物質を利用する方法を内部標準法、外部標準物質を利用する方法を外部標準法、内部標準物質と外部標準物質の両方を併用する方法をハイブリッド法と呼ぶ。

[0047] 血漿の希釈倍率はあらかじめ決めておく必要はないが、この方法により、血漿は約10倍に希釈される。

[0048] この方法においては、血漿を希釈するための希釈用緩衝液として、血液から血球を除き血漿を調製するため、赤血球の溶血を防止するために高張に調製された緩衝液を用いる。用いる希釈用緩衝液の浸透圧は、血液の浸透圧が2

85mOsm/kgであるのに対して、300~450 mOsm/Kg、好ましくは320~450 mOsm/Kg、さらに好ましくは320~430 mOsm/Kg、さらに好ましくは350~430 mOsm/Kg、さらに好ましくは355 mOsm/Kg若しくは426 mOsm/Kgである。緩衝液のpHは、生体試料のpHに近い、pH6.5~pH8.0、好ましくはpH7.0~pH7.5、さらに好ましくはpH7.4である。

[0049] 緩衝液中には、分析対象成分を安定に保つことを目的にキレート剤、界面活性剤、抗菌剤、防腐剤、補酵素、糖類、阻害剤等が含有されてもよい。キレート剤としては、エチレンジアミン四酢酸塩 (EDTA)、クエン酸塩、シュウ酸塩等が挙げられる。界面活性剤としては、例えば、陽イオン界面活性剤、陰イオン界面活性剤、両性界面活性剤又は非イオン界面活性剤が挙げられる。防腐剤としては、例えば、アジ化ナトリウムや抗生物質等が挙げられる。補酵素としては、ピリドキサルリン酸 (PALP)、マグネシウム、亜鉛等が挙げられる。糖類としては、マンニトール、デキストロース、オリゴ糖等が挙げられる。特に、マンニトールとピリドキサルリン酸 (PALP)の添加により血球膜や酵素を安定することができ、3~4種類の抗生物質や抗菌剤の添加により、手指採血時に手指表面から一部混入する細菌の増殖を抑えることができ、生体成分の細菌による分解の安定化を図ることができる。

[0050] 緩衝液としては、好ましくはグッド緩衝液が用いられ、HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl] ethanesulfonic acid) (pKa=7.55)、TES (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid) (pKa=7.50)、MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) (pKa=7.20) 又はBES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid) (pKa=7.15) 等が挙げられる。その中でもHEPES (2-[4-(2-ヒドロキシエチル)-1-ピペラジニル]エタンスルホン酸) が好ましい。

[0051] そのような緩衝液であって、内部標準物質を利用する緩衝液の組成として以下の組成が例示できる。以下の緩衝液では、グリセロール-3-リン酸を内部標準物質として用いている。

[0052] pH6.5~pH8.0、1.5~2.5 mmol/L HEPES, 6~10 mmol/L EDTA-2Na, 2~4 mm

ol/L D-mannitol, 40~60 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 0.025~0.075 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4~6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 100~250 mmol/L NaCl、浸透圧300~450 mOsm/Kg。

[0053] 具体的には以下の組成が例示できる。

[0054] pH7.40, 2 mmol/L HEPES, 0.8 mmol/L EDTA-2Na, 2.74 mmol/L D-mannitol, 50 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 0.05 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4.857 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 170.8 mmol/L NaCl、浸透圧426 mOsm/Kg。

[0055] 外部標準物質として、生体試料中に含まれる物質を用いるため、生体試料を希釈する緩衝液としては、外部標準物質が含まれていないか、あるいは含まれていたとしても生体試料を希釈した後の混合物中の外部標準物質の測定に影響を及ぼさない程度の極微量の濃度で含まれる緩衝液を用いる必要がある。また、外部標準物質の測定を妨げる物質が含まれていないか、あるいは含まれていたとしても生体試料を希釈した後の希釈溶液中の外部標準物質の測定に影響を及ぼさない程度の極微量の濃度で含まれる緩衝液を用いる必要がある。これらの物質が含まれていないか、あるいは含まれていたとしても生体試料を希釈した後の混合物中の外部標準物質の測定に影響を及ぼさない程度の極微量の濃度で含まれる緩衝液を、前記物質を実質的に含まない緩衝液という。例えば、本発明の方法で用いる希釈用緩衝液中のナトリウム濃度は、100 nmol/L以下である。

[0056] 例えば、外部標準物質として、ナトリウム又はクロールを用いる場合、生体試料の希釈用緩衝液にナトリウム又はクロールが含まれていないか、含まれていたとしても極微量である必要がある。さらに、ナトリウムはアルカリ金属類に属する元素又はアルカリ土類金属類に属する元素の定量に影響を及ぼすため、生体試料の希釈用緩衝液にナトリウムは含まれていないか、含まれていたとしても極微量である必要がある。また、生体試料中の目的分析対象物を測定するため、目的分析対象物の分解や変性を防ぐために、生体試料の希釈用緩衝液は、生体試料のpHに近い、pH6.5~pH8.0、好ましくはpH7.0~pH7.5、さらに好ましくはpH7.4の緩衝液である必要がある。さらに、本発明

においては、緩衝液で希釈された血液中の生体成分を測定するため、緩衝液成分がこれら測定しようとする生体成分の変性や安定性に影響を及ぼしてはならない。従来は、pH7.4前後で緩衝能を有し、ナトリウムやクロールを含まない緩衝液は存在しなかったため、ナトリウムやクロールを外部標準物質として用いることは不可能であった。本発明においては、pH7.4前後で緩衝能を有し、ナトリウムやクロールを含まない緩衝液を新たに開発し、ナトリウムやクロールを外部標準物質として用いることを可能にした。

[0057] このようなナトリウム、クロール、アルカリ金属類の元素及びアルカリ土類金属類の元素を含まないアルカリ性物質として、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)、2-エチルアミノエタノール、N-メチル-D-グルカミン、ジエタノールアミン、トリエタノールアミン等のアミノアルコール化合物類と酸性を示す化合物としてGood's緩衝剤(グッドバッファ)があり、pKaがpH7.4付近の緩衝剤である、HEPES (2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]ethanesulfonic acid) (pKa=7.55)、TES (N-Tris(hydroxymethyl)methyl-2-aminoethanesulfonic acid) (pKa=7.50)、MOPS (3-Morpholinopropanesulfonic acid) (pKa=7.20) 又はBES (N,N-Bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid) (pKa=7.15) を組合せて混合した緩衝液が挙げられる。この中でも、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)とHEPES、TES、MOPS又はBESの組合せが好ましく、さらに、2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール(AMP)とHEPESの組合せが好ましい。

[0058] 上記緩衝液を作製するためには、アミノアルコールとGood's緩衝剤を1:2~2:1、好ましくは1:1.5~1.5:1、さらに好ましくは1:1の濃度比で混合すればよい。緩衝液の濃度は限定されないが、アミノアルコール又はGood's緩衝剤の濃度は、0.1~1000 mM/L、好ましくは1~500 mM/L、さらに好ましくは10~100 mM/Lである。

[0059] 内部標準物質と外部標準物質を利用する緩衝液の組成として以下の組成が例示できる。以下の緩衝液では、グリセロール-3-リン酸及びリチウム(Li)を内部標準物質として利用している。また、外部標準物質としては、血液中

に含まれるナトリウム又はクロールを利用することができる。以下の緩衝液は、ナトリウム及びクロールを含まない。

[0060] pH6.5~pH8.0、30~100mmol/L HEPES, 30~100mmol/L 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール, 0.2~1.0 mmol/L EDTA-2K, 2~4 mmol/L D-mannitol, 0.025~0.075 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4~6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 1~3 mmol/Lリチウム, 浸透圧300~450 mOsm/Kg。

[0061] 具体的には以下の組成が例示できる。

[0062] pH7.40、50mmol/L HEPES, 50mmol/L 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール, 0.8 mmol/L EDTA-2K, 284 mmol/L D-mannitol, 0.05 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 1 mmol/Lリチウム, 浸透圧355 mOsm/Kg。

[0063] 本発明の正確さを伝達する方法は、好適には、上記の血漿希釈用緩衝液を用いる測定法による測定への正確さを伝達する方法へ適用される。

[0064] 従来は、血漿を希釈した検査試料の測定値の正確さの確認は、二次校正物質（常用参照標準物質ということもある）で正確さを確認した測定操作法を用いて、多数例の希釈していない血漿値を測定した値とその血漿を希釈して測定した値の相関プロットから2つの測定値の回帰式（関係式）を求めて、その回帰式（関係式）の傾きと切片から正確さを確認する方法により行っていた。

[0065] この方法は、正確さが伝達された測定操作法により値付けされた校正物質を、希釈血漿を検査試料として用いる方法と同様に希釈して用いるという点で、校正物質と検査試料の性状や測定方法の同等性は確保されているので、理論上は正確さが伝達される方法である。しかしながら、この方法では、正確さの伝達に多くの工程を必要とするため、正確さが十分に伝達されないおそれがあった。

[0066] 本発明の方法においては、最初に、希釈していない血清ベースの校正物質を用いる測定操作法であって、正確に調製された一次校正物質を基準となる一次基準測定操作法で測定したときの測定の正確さが伝達された測定操作方

法から、該血清ベースの校正物質を3～5倍に希釈した校正物質を用いる測定操作法に正確さを伝達する。次いで、該希釈血清を校正物質として、日常的に行われる、微量の血液を内部標準物質入り緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質、外部標準物質、又は内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の検査対象項目である生化学・免疫化学分量を定量する測定操作法を校正する。この校正した方法で、検査試料である希釈血漿を測定する。この結果、正確に値付けされた一次校正物質を、基準となる一次基準測定操作法で測定したときの測定の正確さが、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質、外部標準物質、又は内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学分量を定量する測定操作法による測定に伝達される。

[0067] 正確に値付けされた一次校正物質を、一次基準測定操作法で測定したときの測定の正確さが伝達された血清ベースの校正物質として、特定の検査項目の測定値の正確さが伝達され、該検査項目の含有量が表示された血清を用いることができる。該血清を用いた測定には、二次校正物質を介在して、一次校正物質を一次基準測定操作法で測定したときの測定の正確さが伝達される。すなわち、一次校正物質を用いて二次基準測定操作法を校正し、二次基準測定操作法で二次校正物質の値付けを行い、さらに二次校正物質で推奨血清測定操作法を校正し、推奨血清測定操作法で血清を値付けした血清を用いることができる。推奨血清測定操作法としては、例えば、市販試薬と市販の生化学自動分析装置を用いた測定法が挙げられる。この場合、二次校正物質を用いる測定に伝達された正確さが推奨血清測定操作法を介して、上記の血清を用いる測定に伝達されたということができる。二次校正物質を常用参照標準物質と呼ぶこともある。

[0068] ここで、上記の血清を用いた測定に、正確さが伝達されていることを確認することが望ましい。上記の血清を用いて校正された推奨血清測定操作法により、二次校正物質を用いて多重測定（例えば、5重測定）を行い、その平均値が二次校正物質のあらかじめ定められた評定濃度許容誤差内に入ってい

るか確認する。評定濃度許容誤差は校正物質の認証書に標記されている。評定濃度許容誤差内に入っている場合、上記の血清を用いた測定に正確さが伝達されていると判断できる。一方、評定濃度許容誤差内に入っていない場合、上記の血清を補正し、同様の工程を繰り返して、正確さが伝達されていることを確認すればよい。

[0069] 測定値の正確さが伝達された血清として、各種の検査項目の値があらかじめ値付けされている市販の管理血清(コントロール血清)を用いることができる。市販の管理血清は、凍結乾燥品、凍結品、液状品があるが、いずれも用いることができる。また、生化学検査用管理血清及び免疫血清検査用管理血清があり、用途に応じて必要な管理血清を用いればよい。

[0070] 市販の管理血清として、L-スイトロールI, II, III, IIEX、L-トライロールEX、L-コンセーラIEX, IIEX (日水製薬、生化学検査用)、イムノーコンセーラI, II (日水製薬、免疫血清検査用)、イムノピアリ1, 2、QC-RE' 栄研' (栄研化学)、QAPトロール (シスメックス社) 等が挙げられる。

[0071] また、市販の管理血清の代りに、例えば、市販の管理血清に測定値の正確さを伝達するために用いられる元となる二次校正物質を用いて校正した基準となる測定操作方法で各種項目を値付けすることにより、二次校正物質を用いた測定の正確さが伝達されたヒトプール血清を用いてもよい。このように、プール血清や市販の管理血清を用いた測定操作法には、二次校正物質を基準測定法で測定したときの測定の正確さが伝達されている。現実的には、二次校正物質は高価であるので、値付けされた市販の管理血清を用いた場合、二次校正物質を入手して校正や値付けを行うコストを削減することができる。

[0072] 上記の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を用いて、推奨希釈血漿測定操作法を校正する。推奨希釈血漿測定操作法は、上記の希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法であって、(i) 微量の血液を、血液に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分

量を定量する、内部標準物質を利用する測定操作方法、(ii) 微量の血液を、血液に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定操作方法、又は(iii) 微量の血液を、血液に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定操作方法である。次いで、上記の管理血清又はプール血清を3～5倍、好ましくは3倍に希釈した希釈血清を推奨希釈血漿測定操作法により、値付けする。このようにして値付けした希釈血清を希釈血清実用校正物質と呼ぶ。

[0073] 管理血清は、構築された校正の階層段階により既に正確さが伝達されている。従って、管理血清から正確さを伝達することにより、3～5倍希釈血清にも、構築された階層による正確さの伝達が可能になる。

[0074] この際、3～5倍に希釈された管理血清又はプール血清を用いた方法に正確さが伝達されたことを確認することが望ましい。管理血清と3～5倍希釈した管理血清又はプール血清を、管理血清又はプール血清を校正物質として用いて校正された推奨血清測定操作法で多重測定する。管理血清又はプール血清の測定値と3～5倍に希釈した管理血清又はプール血清の測定値が同等であること、すなわち評定濃度許容誤差内に入っていることを確認し、同等である場合、3～5倍に希釈した管理血清又はプール血清を用いる測定に正確さが伝達されていると判断することができる。

[0075] 正確さが伝達された3～5倍に希釈された管理血清又はプール血清を用いた測定により、検査試料である希釈血漿を用いて希釈血漿日常測定操作法により測定を行えばよい。ここで、希釈血漿日常測定操作法は、上記の希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法であって、(i) 微量の血液を、血液に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希

釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定操作方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定操作方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定操作方法である。

[0076] 3～5倍希釈した管理血清又はプール血清は、希釈していない管理血清又はプール血清とは性状が異なり、また、測定条件も異なるため、従来常識に従えば、管理血清又はプール血清を用いて測定したときの正確さは、3～5倍希釈した管理血清又はプール血清には伝達されないはずである。しかしながら、驚くべきことに、3～5倍に希釈した希釈血清を校正物質として用いることにより、確実に正確さが伝達される。3倍より希釈倍率が小さいと校正物質の濃度が高すぎ、測定時の吸光度が測定上限を超えてしまい、正確さが伝達されず、一方、5倍より希釈倍率が大きい場合も、性状の相違が多くなり正確さは伝達されない。

[0077] 血清中には、生化学検査や免疫化学検査を妨害する物質が含まれている。例えば、血清を校正物質として用いて校正した測定操作法を用いて、血清を測定した場合、妨害物質の含有量に関して、両者は異なるので、正確さが伝達され得る。一方、血清を希釈すると妨害物質の濃度が薄くなるので、希釈していない血清と希釈した血清では測定値が異なる可能性があった。しかし、本発明の方法において、3～5倍の希釈では大きく変動しないことが明らかになった。

[0078] 上記の希釈血清実用校正物質を用いて、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を

分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定操作方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定操作方法、又は(ii i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定操作方法の校正を行う。

[0079] この結果、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定操作方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定操作方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定操作方法により、希釈血漿を検査試料として用いた生化学検査及び免疫化学検査の測定に正確さが伝達され、通常の日常の検査における、前記方法によって、正確に生化学・免疫化学成分量を定量することが可能になる。

[0080] 一次基準測定操作法で値付けされた一次校正物質は、国際度量衡委員会 (CIPM) により定義されたSI単位を基準とするため、正確さが伝達された微量の血液を内部標準物質入り緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質、外部標準物質、又は内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から

希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する方法による測定は、計量学的トレーサビリティによってSI単位にまで遡ることができる。

- [0081] 本発明の方法により、希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法であって、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定操作方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定操作方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定操作方法に用いる測定装置の校正、及び該測定装置を用いた測定の校正を行うことができる。

## 実施例

- [0082] 実施例 1 希釈血漿を検査試料として用いる測定法への正確さの伝達

二次校正物質（常用参照標準物質）を用いた測定の正確さを希釈血漿試料を用いた測定に伝達するために用いた「二次校正物質（常用参照標準物質）」（一般社団法人 検査医学標準物質機構（ReCCS））と「管理血清；サイトロールI、II、IIEX」（日水製薬）の組成を表1と表2に示した。表1中の「拡張不確かさ」は、測定値の許容誤差範囲に相当する。

- [0083] 測定装置は日本電子製JCA-BM6010を用い、測定用試薬は市販の生化学検査用試薬を用いた。血清の測定条件は市販試薬メーカーの指定条件で測定した。測定条件を表3に示す。
- [0084] 希釈血漿測定法での生化学分析装置は日本電子製JCA-BM6010を用い、測定用試薬は市販の生化学検査用試薬を用いた。希釈血漿測定における生化学分析装置の測定条件を表3に示す。

[0085] 希釈血漿測定法においては、管理血清を希釈緩衝液で3倍に希釈して試料とした。なお、希釈血漿測定法は、希釈血漿の測定に適した測定条件で行う測定法をいう。希釈血漿測定法において、抗生物質を含む以下の血漿希釈緩衝液を用いて血漿を希釈した。

pH7.40, 2 mmol/L HEPES, 8.06 mmol/L EDTA-2Na, 2.74 mmol/L D-mannitol, 50 mmol/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.05 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4.857 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 170.8 mmol/L NaCl

[0086] この希釈緩衝液の浸透圧は、426 mOsm/Kgであった。

[0087] [表1]

表1 二次校正物質 (常用参照標準物質)

検査項目	常用参照標準物質 JSCC 常用酵素	
	表示値(U/L)	拡張不確かさ
AST	161	± 4
ALT	155	± 4
γ-GT	152	± 5

検査項目	含窒素・グルコース常用参照標準物質 JCCRM521		含窒素・グルコース常用参照標準物質 JCCRM521		含窒素・グルコース常用参照標準物質 JCCRM521	
	表示値(mg/dL)	拡張不確かさ	表示値(mg/dL)	拡張不確かさ	表示値(mg/dL)	拡張不確かさ
グルコース	100.1	± 1.0	150.2	± 1.6	248.9	± 2.6
尿素窒素	12.8	± 0.2	28.7	± 0.5	46.6	± 0.7
クレアチニン	0.89	± 0.03	2.20	± 0.09	5.31	± 0.21
尿酸	5.5	± 0.08	8.08	± 0.11	11.99	± 0.23

検査項目	コレステロール・中性脂肪常用参照標準物質 JCCRM223		コレステロール・中性脂肪常用参照標準物質 JCCRM223		コレステロール・中性脂肪常用参照標準物質 JCCRM223	
	表示値(mg/dL)	管理限界	表示値(mg/dL)	管理限界	表示値(mg/dL)	管理限界
総コレステロール	① 138.6	± 1.4	② 176.5	± 1.7	③ 205.8	± 1.9
HDLコレステロール			④ 43.3	± 0.8	⑤ 66.0	± 1.2
LDLコレステロール			⑦ 108.2	± 2.4	⑧ 136	± 3
中性脂肪			⑥ 184.9	± 2.3	③ 105.9	± 1.1

[0088]

[表2]

表2 市販管理血清

項目	サイトロール I		サイトロール II		サイトロール II EX	
	表示値	管理限界	表示値	管理限界	表示値	管理限界
総蛋白	6.1	5.8 ~ 6.4	8.3	7.9 ~ 8.7	8.3	7.9 ~ 8.7
アルブミン	4.0	3.8 ~ 4.2	5.4	5.1 ~ 5.7	5.4	5.1 ~ 5.7
AST	36	34 ~ 38	166	160 ~ 172	161	155 ~ 167
ALT	31	29 ~ 33	157	151 ~ 163	156	150 ~ 162
γ-GT	44	41 ~ 47	134	128 ~ 140	137	131 ~ 143
総コレステロール	121	116 ~ 126	169	163 ~ 175	252	243 ~ 261
HDL コレステロール	37	34 ~ 40	50	47 ~ 53	48	45 ~ 51
LDL コレステロール	74	69 ~ 79	104	99 ~ 109	167	158 ~ 176
中性脂肪	46	42 ~ 50	63	58 ~ 68	202	187 ~ 217
尿素窒素	16.6	15.6 ~ 17.6	51.2	48.3 ~ 54.1	50.6	47.8 ~ 53.4
クレアチニン	0.9	0.8 ~ 1.0	5.7	5.5 ~ 5.9	5.7	5.5 ~ 5.9
尿酸	3.6	3.4 ~ 3.8	9.8	9.4 ~ 10.2	9.7	9.3 ~ 10.1
グルコース	97	93 ~ 101	303	294 ~ 312	301	292 ~ 310

[0089]

[表3]

表3 希釈血漿用測定条件

検査項目		総蛋白	アルブミン	AST	ALT	γGTP	総コレステロール		
希釈血漿用	第1試薬量(μL)	50.5	60	35	35	40	40		
	第3試薬量(μL)	0	19.8	8.75	8.75	20	13.2		
	試料量(μL)	9.5	10	25	25	14.4	5		
血清用	第1試薬量(μL)	100	100	100	100	100	100		
	第3試薬量(μL)	0	33	33	33	50	33		
	試料量(μL)	4.3	10.7	25	25	18	5.5		
検査項目		HDLコレステロール	LDLコレステロール	中性脂肪	尿素窒素	クレアチニン	尿酸	グルコース	
希釈血漿用	第1試薬量(μL)	40	40	40	48	40	55	40	
	第3試薬量(μL)	13.33	13.2	13.2	12	13.2	18.33	10	
	試料量(μL)	4	5.2	10	12	10	4.5	5	
血清用	第1試薬量(μL)	90	100	100	100	100	100	100	
	第3試薬量(μL)	30	33	33	25	33	25	25	
	試料量(μL)	9	6.5	5.5	8.6	4	8.5	4.2	

[0090] 各種二次校正物質を基準として管理血清（サイトロールII EX）の表示値を確認した結果を表4に示した。表4に示すように管理血清（サイトロールII EX）は二次校正物質での評定値と希釈緩衝液で3倍希釈した実測値に3倍乗じた値と許容誤差範囲内に収まっていた。この結果は、希釈した血漿を試料として用いる測定のための校正物質である「希釈血漿実用校正物質」として利用可能であることを示している。

[0091] この結果より、二次校正物質から正確さが伝達された管理血清を3倍に希釈して作製した「希釈血漿実用校正物質」を希釈血漿試料を用いる測定の校正物質として利用することで、管理血清を用いた測定の正確さの伝達が可能であることがわかった。

[0092]

[表4]

表4 希釈管理血清の正確さ

スイトロール II EX	総蛋白 (g/dL)	アルブミン (g/dL)	AST(U/L)	ALT(U/L)	$\gamma$ -GT(U/L)	総コレステ ロール (mg/dl)	HDLコレス テロール (mg/dl)
3倍希釈血清実測値	2.89	1.82	53.42	51.99	45.60	85.99	16.88
3倍乗じた実測値	8.67	5.45	160.27	155.98	136.80	257.98	50.65
二次校正物質での評定値	8.68	5.40	161.00	156.00	137.00	256.73	50.71
許容誤差下限	8.58	5.20	157.00	153.00	132.00	253.73	49.71
許容誤差上限	8.78	5.60	165.00	159.00	142.00	259.73	51.71
スイトロール II EX	LDHコレス テロール (mg/dl)	中性脂肪 (mg/dl)	尿素窒素 (mg/dl)	クレアチ ニン (mg/dl)	尿酸 (mg/dl)	グルコース (mg/dl)	
3倍希釈血清実測値	55.50	65.41	16.97	1.90	3.19	100.20	
3倍乗じた実測値	166.50	196.22	50.91	5.70	9.56	300.61	
二次校正物質での評定値	167.00	196.01	50.60	5.70	9.70	301.00	
許容誤差下限	160.00	193.01	49.20	5.60	9.50	298.00	
許容誤差上限	174.00	199.01	52.00	5.80	9.90	304.00	

[0093] 次に、「希釈血漿実用校正物質」を、希釈血漿試料を検査試料として用いる測定の校正物質として利用し、特開2003-161729号公報に記載の微量の血液を内部標準物質入り緩衝液で希釈し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の未知量の存在する生化学・免疫化学成分量を定量する方法の校正を行った。該方法により、希釈血漿試料測定値に内部標準から求めた血漿希釈倍数を乗じて測定値を求めた。この測定値と二次校正物質で校正した測定条件での原血清の測定値の相関関係式を導いた。原血清の測定値は、二次校正物質で校正した血清測定条件（メーカー指定）での測定により求めた。得られた相関関係式13の測定項目について表5に示した。

[0094]

[表5]

表5 血漿と希釈血漿との相関性試験による正確さ

項目	相関係数	回帰式
総蛋白	0.751	$y = 0.98 + 1.4$
アルブミン	0.822	$y = 0.97 + 0.6$
AST	0.99	$y = 0.98 + 0.5$
ALT	0.998	$y = 1.00 - 0.1$
$\gamma$ GTP	0.998	$y = 1.02 - 0.6$
総コレステロール	0.973	$y = 0.97 + 5.6$
HDL-コレステロール	0.987	$y = 0.97 + 1.5$
LDL-コレステロール	0.990	$y = 0.98 + 3.3$
中性脂肪	0.999	$y = 1.05 - 3.8$
尿素窒素	0.993	$y = 0.99 + 0.1$
クレアチニン	0.966	$y = 0.98 + 0.0$
尿酸	0.994	$y = 1.01 + 0.0$
グルコース	0.994	$y = 0.97 + 2.0$

[0095] 原血清の測定値と希釈血漿を用いる特開2003-161729号公報に記載の方法による測定値との相関関係式から各検査項目の比例系統誤差は±5%以下であり、その多くは±3%以内であり、原血清の測定値と特開2003-161729号公報に記載の方法による測定値の間に高い相関が得られた。

[0096] この結果は、本発明の方法により、二次校正物質を用いた正確な測定の正確さが、希釈血漿を検査試料として用いる特開2003-161729号公報に記載の方法による測定に伝達されたことを示す。

[0097] 実施例2 血漿希釈緩衝液の検定

実施例1で用いた血漿希釈緩衝液又は該血漿希釈緩衝液から補酵素であるP ALP(ピリドキサルリン酸)を除いた緩衝液で2種類の管理血清-1及び管理血清-2を10倍にそれぞれ希釈した。この希釈試料を室温又は37℃で保存した。希釈直後から保存後6日間までAST(アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ)及びALT(アラニンアミノトランスフェラーゼ)を測定し、測定値の安定性を経時的に確認した。

[0098] 結果を図1及び2に示す。図1はPALPを含まない緩衝液を用いたときの結果を示し、図2はPALPを含む緩衝液を用いたときの結果を示す。

[0099] PALP無添加の緩衝液を用いた場合、室温では測定値は安定であったが、37℃では測定値が低下した。一方、PALPを添加した緩衝液を用いた場合、測定値は37℃でも安定であった。

[0100] この結果は、PALP無添加の緩衝液を用いて希釈した管理血清を用いて、希釈血漿を用いる測定操作法を校正しても、正確さの伝達ができないことを示している。すなわち、本実施例では、3～5倍の希釈管理血清を校正物質として用いた「推奨希釈血漿測定操作法」で測定している。PALPを含む緩衝液と含まない緩衝液を用いて測定したところ、PALPを含まない緩衝液を用いた場合は、正確に測定できなかった。この結果は、PALPを含まない緩衝液を用いた測定には、正確さが伝達されていないことを示している。校正に用いた校正物質と実際の検査試料（日常希釈血漿試料）の性状が同等であるべきであることを考慮すると、「希釈血漿日常測定操作法」を校正するとき用いる校正物質としては、PALPを含む干渉液で3～5倍希釈した管理血清を用いるべきである。

### 産業上の利用可能性

[0101] 本発明の方法により、希釈血漿を検査試料として用いる測定法に、測定の正確さを伝達することができ、希釈血漿を検査試料として用いる測定法で正確な生化学検査及び免疫化学的検査を行うことができる。

## 請求の範囲

- [請求項1] 希釈血漿を検査試料として用いる測定方法による測定値に、正確に値付けされた校正物質を用いた測定値の正確さを伝達する方法であつて、
- (i) 正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を3～5倍に希釈し、希釈した血清を校正物質として用いて、希釈血漿を検査試料として用いる測定方法の校正を行い、
  - (ii) 校正した前記測定方法により検査試料を測定することを含む方法。
- [請求項2] 正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を3倍に希釈して、校正物質として用いる、請求項1記載の方法。
- [請求項3] 希釈血漿を検査試料として用いる測定方法が、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定方法である、請求項1又は2に記載の方法。
- [請求項4] 希釈血漿の希釈に用いる希釈緩衝液が、赤血球の溶血を防止するために高張に調製されており、かつ補酵素を含むpH6.5～8.0の緩衝液である、請求項1～3のいずれか1項に記載の方法。

[請求項5] 希釈血漿の希釈に用いる希釈緩衝液が、以下の組成を有する、請求項4記載の方法：

pH6.5～pH8.0、1.5～2.5 mmol/L HEPES, 6～10 mmol/L EDTA-2Na, 2～4 mmol/L D-mannitol, 40～60 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 0.025～0.075 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4～6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 100～250 mmol/L NaCl、浸透圧300～450 mOsm/Kg、又は、pH6.5～pH8.0、30～100mmol/L HEPES, 30～100mmol/L 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール, 0.2～1.0 mmol/L EDTA-2K, 2～4 mmol/L D-mannitol, 0.025～0.075 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4～6 mmol/L グリセロール-3-リン酸, 1～3 mmol/Lリチウム, 浸透圧300～450 mOsm/Kg。

[請求項6] 希釈血漿を検査試料として用いる測定操作方法であって、(i) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含む緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、内部標準物質を利用する測定方法、(ii) 微量の血液を、血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分量を定量する、外部標準物質を利用する測定方法、又は(iii) 微量の血液を、血液中に含まれない物質である内部標準物質を含むが血液中に含まれる物質である外部標準物質を含まない緩衝液で希釈し、血液から希釈血漿を分離し、内部標準物質と外部標準物質の希釈倍数から希釈血漿中の生化学・免疫化学成分を定量する、内部標準物質と外部標準物質を利用する測定方法に用いる測定装置を用いた測定の校正を行う方法であって、正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプール血清を3～5倍に希釈し、希釈した血清を校正物質として用いて、前記測定の校正を行う方法。

[請求項7] 正確に値付けされた校正物質の正確さが伝達された管理血清又はプ

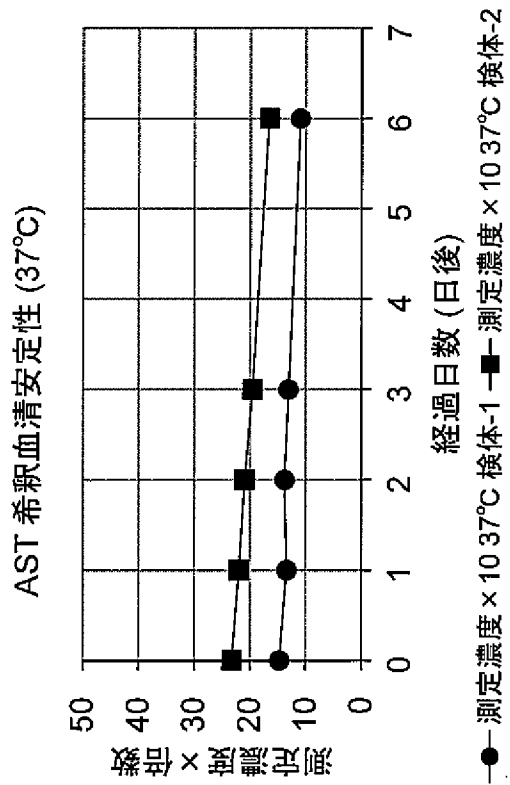
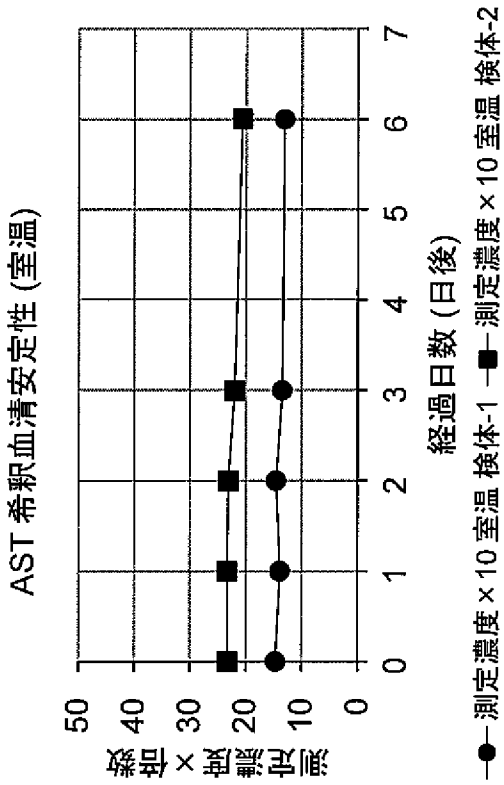
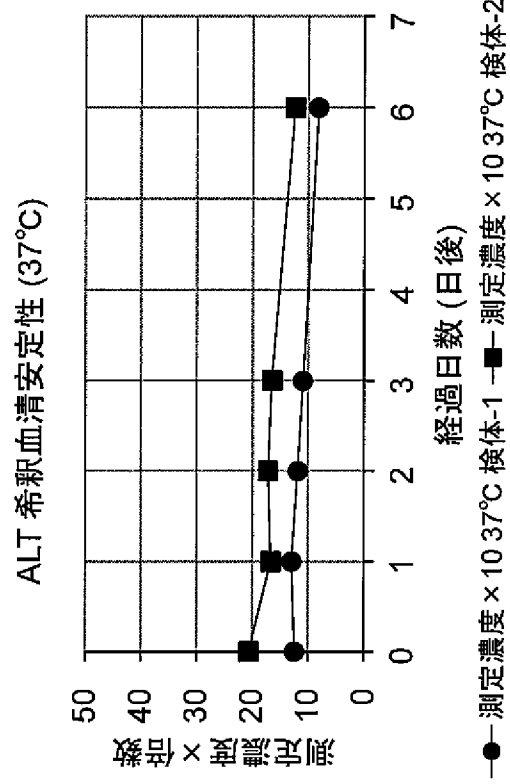
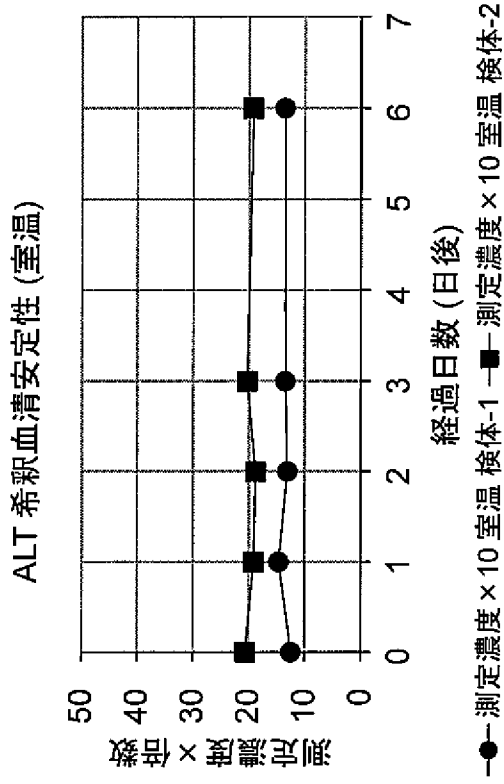
ール血清を3倍に希釈して、校正物質として用いる、請求項6記載の方法。

[請求項8] 希釈血漿の希釈に用いる希釈緩衝液が、赤血球の溶血を防止するために高張に調製されており、かつ補酵素を含むpH6.5~8.0の緩衝液である、請求項6又は7に記載の方法。

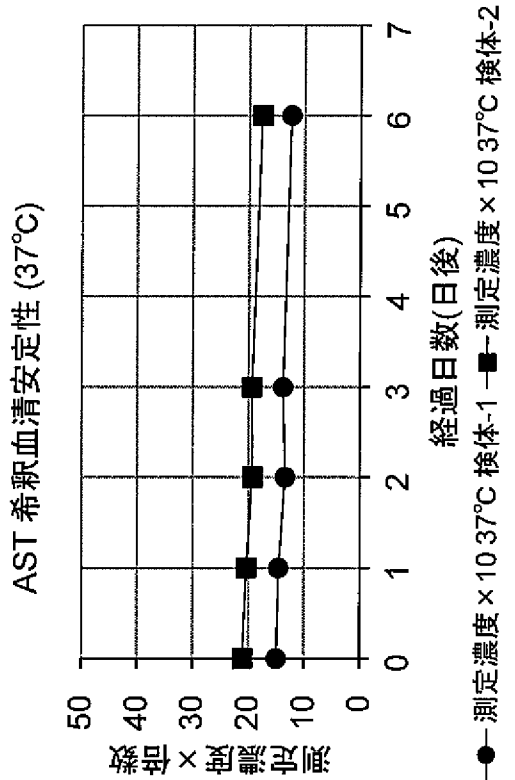
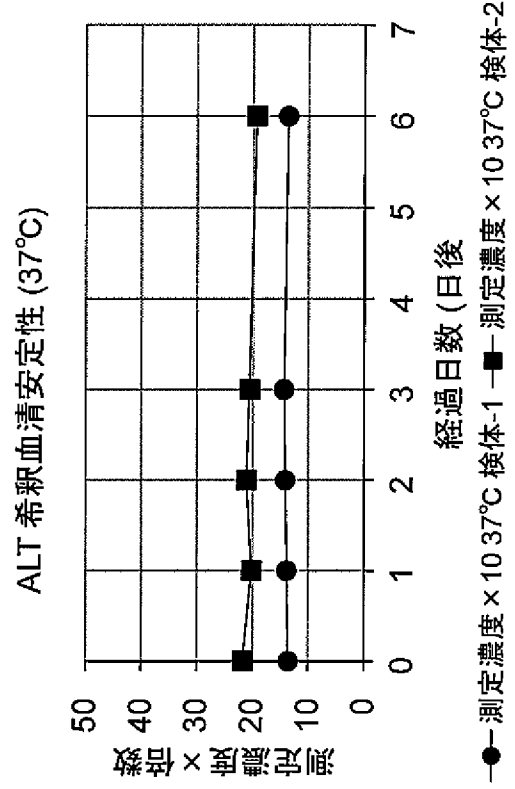
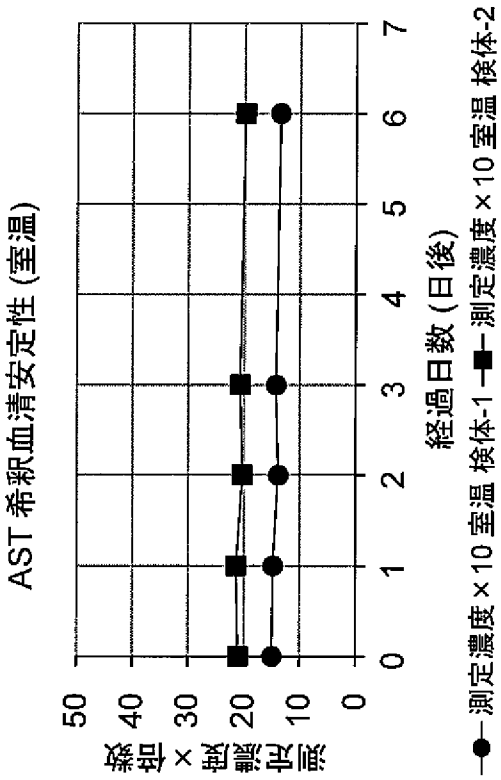
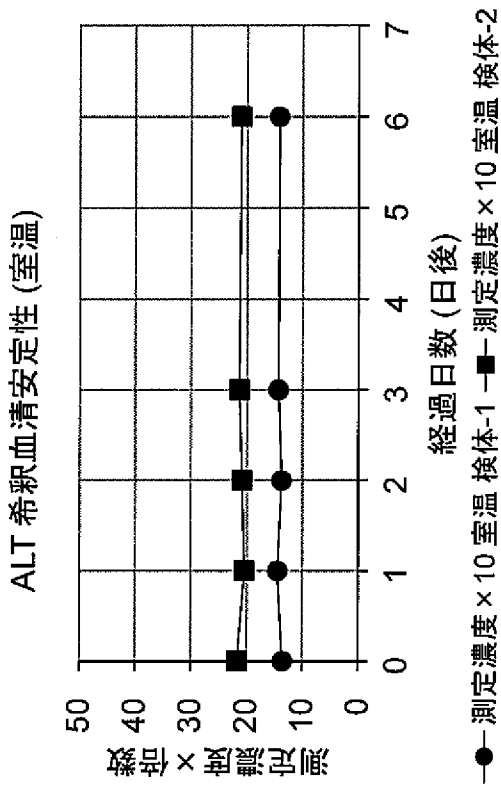
[請求項9] 希釈血漿の希釈に用いる希釈緩衝液が、以下の組成を有する、請求項8記載の方法：

pH6.5~pH8.0、1.5~2.5 mmol/L HEPES, 6~10 mmol/L EDTA-2Na, 2~4 mmol/L D-mannitol, 40~60 mmol/L  $K_2HPO_4$ , 0.025~0.075 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4~6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 100~250 mmol/L NaCl、浸透圧300~450 mOsm/Kg、又は、pH6.5~pH8.0、30~100mmol/L HEPES, 30~100mmol/L 2-アミノ-2-メチル-1-プロパノール, 0.2~1.0 mmol/L EDTA-2K, 2~4 mmol/L D-mannitol, 0.025~0.075 mmol/L PALP(ピリドキサルリン酸), 4~6 mmol/Lグリセロール-3-リン酸, 1~3 mmol/Lリチウム, 浸透圧300~450 mOsm/Kg。

[図1]



[図2]



**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
PCT/JP2015/069377

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
G01N33/49(2006.01) i, G01N33/48(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
G01N33/49, G01N33/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2015
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2015	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2015

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Yoshihisa ITO, "Men'eki Kagaku Sokuteikei deno Sokutei System", Journal of Clinical and Experimental Medicine, 21 February 1998 (21.02.1998), vol.184, no.8, pages 669 to 672	1-9
Y	Shin'ya SUGIMOTO et al., "Futatsu no Naibu Hyojun Kishakuho o Mochiita Seikagaku Komoku to Hematocrit no Sokutei", Journal of Analytical Bio-science, 10 February 2012 (10.02.2012), vol.35, no.1, page 85	1-9
Y/A	JP 2003-161729 A (Leisure, Inc.), 06 June 2003 (06.06.2003), paragraphs [0043], [0045] to [0047] & US 2002/0153316 A1 & EP 1221614 A2	4, 5, 8, 9/1-3, 6, 7

Further documents are listed in the continuation of Box C.       See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 02 September 2015 (02.09.15)	Date of mailing of the international search report 15 September 2015 (15.09.15)
---	--

Name and mailing address of the ISA/ Japan Patent Office 3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915, Japan	Authorized officer  Telephone No.
--	---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2015/069377

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y/A	JP 2011-112451 A (Physical Screening Inc.), 09 June 2011 (09.06.2011), paragraphs [0002], [0004] & WO 2011/065212 A	4, 5, 8, 9/1-3, 6, 7
A	Susumu OSAWA et al., "Naibu Seido Kanriyo Shihan Kanri Kessei ni Okeru Seikakusa no Dentatsu Noryoku no Kento", Japanese Journal of Clinical Laboratory Automation, 01 September 2004 (01.09.2004), vol.29, no.4, page 539	1-9

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/49(2006.01)i, G01N33/48(2006.01)i		
B. 調査を行った分野 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC)) Int.Cl. G01N33/49, G01N33/48		
最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの 日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2015年 日本国実用新案登録公報 1996-2015年 日本国登録実用新案公報 1994-2015年		
国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)		
C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	伊藤喜久, 免疫化学測定系での測定システム, 医学のあゆみ, 1998.02.21, Vol.184, No.8, P.669-672	1-9
Y	杉本晋哉 ほか, 2つの内部標準希釈法を用いた生化学項目とヘマトクリットの測定, 生物試料分析, 2012.02.10, Vol.35, No.1, P.85	1-9
Y/A	JP 2003-161729 A (株式会社リージャー) 2003.06.06, 段落[0043]、 [0045]-[0047] & US 2002/0153316 A1& EP 1221614 A2	4, 5, 8, 9/1-3, 6, 7
<input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。		
* 引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリー文献		
国際調査を完了した日 02.09.2015	国際調査報告の発送日 15.09.2015	
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 海野 佳子 電話番号 03-3581-1101 内線 3252	2 J   3906

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y/A	JP 2011-112451 A (株式会社フィジカルスクリーニング) 2011.06.09, 段落[0002]、[0004] & WO 2011/065212 A	4, 5, 8, 9/1-3, 6, 7
A	大澤進ほか, 内部精度管理用市販管理血清における正確さの伝達能力の検討, 日本臨床検査自動化学会会誌, 2004.09.01, Vol. 29, No. 4, P. 539	1-9