



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월21일
(11) 등록번호 10-2080416
(24) 등록일자 2020년02월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/96 (2006.01) G01N 1/38 (2006.01)
G01N 33/49 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/96 (2013.01)
G01N 1/38 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-7000463
(22) 출원일자(국제) 2016년07월06일
심사청구일자 2018년01월05일
(85) 번역문제출일자 2018년01월05일
(65) 공개번호 10-2018-0016509
(43) 공개일자 2018년02월14일
(86) 국제출원번호 PCT/JP2016/070009
(87) 국제공개번호 WO 2017/006964
국제공개일자 2017년01월12일
(30) 우선권주장
JP-P-2015-135065 2015년07월06일 일본(JP)
JP-P-2016-133958 2016년07월06일 일본(JP)
(56) 선행기술조사문헌
JP2001330603 A*
JP2003270239 A*
JP2011112451 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
후지필름 가부시킴가이샤
일본 도쿄도 미나토쿠 니시 아자부 2초메 26방 3
0고
(72) 발명자
우라노 히카루
일본 가나가와켄 아시가라카미군 가이세이마치 미
야노다이 798반치 후지필름 가부시킴가이샤 나이
나카츠가와 하루야스
일본 가나가와켄 아시가라카미군 가이세이마치 미
야노다이 798반치 후지필름 가부시킴가이샤 나이
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인코리어나

전체 청구항 수 : 총 12 항

심사관 : 양경식

(54) 발명의 명칭 혈액 검사 키트, 그 부재 및 그 제조 방법

(57) 요약

혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여, 미량의 혈액 검체에 포함되는 대상 성분의 분석을 높은 정밀도로 행하는 것을 과제로 한다. 혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액과, 상기 희석액이 수용된 제1 수용 기구, 상기 희석액으로 희석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 상기 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부재를 포함하는, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하기 위한, 혈액 검사 키트로서, 상기 희석액 중에 포함될 수 있는 상기 부재에서 유래하는 상기 표준 성분의 양을 규정한 것을 특징으로 하는, 혈액 검사 키트를 제공한다.

(52) CPC특허분류

G01N 33/49 (2019.01)

(72) 발명자

오사와 스스무

일본 도쿄도 츄오구 니혼바시 닌교쵸 2쵸메 33반
8고 가부시키키가이샤 리자 나이

스기모토 신야

일본 도쿄도 츄오구 니혼바시 닌교쵸 2쵸메 33반
8고 가부시키키가이샤 리자 나이

명세서

청구범위

청구항 1

혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액과,

상기 희석액이 수용된 제1 수용 기구, 상기 희석액으로 희석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 상기 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부재를 포함하는, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하기 위한, 혈액 검사 키트로서,

혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분이 나트륨 이온 또는 염화물 이온과, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 또 다른 표준 성분이고,

상기 다른 표준 성분이, 총 단백 또는 알부민이고,

상기 희석액 중에 포함될 수 있는 상기 부재에서 유래하는 상기 나트륨 이온 또는 염화물 이온의 양을 규정한 것을 특징으로 하는, 혈액 검사 키트.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 희석액 중에 포함될 수 있는 상기 부재에서 유래하는 상기 나트륨 이온 또는 염화물 이온의 양이, 희석액의 양의 0.5질량% 이하인, 혈액 검사 키트.

청구항 3

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 희석액의 용량이 혈장의 용량의 15배 이하인, 혈액 검사 키트.

청구항 4

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

혈액 중에 항상적으로 존재하는 또 다른 표준 성분을 이용하여, 상기 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도의 분석을 검증하는, 혈액 검사 키트.

청구항 5

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 혈액 검사 키트가 구비하는 부재가, 상기 희석액으로 희석된 혈액 검체로부터 혈장을 회수하기 위한 분리 기구를 포함하는, 혈액 검사 키트.

청구항 6

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 희석액이, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 포함하지 않는, 혈액 검사 키트.

청구항 7

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 희석액이,

2-아미노-2-메틸-1-프로판올, 2-에틸아미노에탄올, N-메틸-D-글루카민, 다이에탄올아민, 및 트라이에탄올아민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노알코올 화합물과,

HEPES라고도 칭하는 2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진일]에테인설폰산, TES라고도 칭하는 N-트리스(하이드록시메틸)메틸-2-아미노에테인설폰산, MOPS라고도 칭하는 3-모폴리노프로페인설폰산, 및 BES라고도 칭하는 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노에테인설폰산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충제를 포함하는, 혈액 검사 키트.

청구항 8

청구항 1 또는 청구항 2에 있어서,

상기 회석액이, 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분을 더 함유하는, 혈액 검사 키트.

청구항 9

청구항 8에 있어서,

혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분이, 리튬 이온 또는 글리세롤 삼인산인, 혈액 검사 키트.

청구항 10

청구항 1 또는 청구항 2에 기재된 혈액 검사 키트에 이용하기 위한 부재로서,

부재가, 회석액을 수용하기 위한 제1 수용 기구, 회석액으로 회석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 상기 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부재인, 부재.

청구항 11

삭제

청구항 12

혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 제거하는 데에 유효한 조건으로 부재를 세정하는 공정을 포함하는, 청구항 1 또는 청구항 2에 기재된 혈액 검사 키트의, 또는 청구항 1 또는 청구항 2에 기재된 혈액 검사 키트에 이용하기 위한 부재의 제조 방법으로서,

상기 조건이, 전기 전도도가 $1\mu\text{S}/\text{cm}$ 이하의 물의 사용인, 제조 방법.

청구항 13

삭제

청구항 14

혈액 검체를 회석시키기 위한 회석액과,

상기 회석액이 수용된 제1 수용 기구, 상기 회석액으로 회석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 상기 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부재를 이용하여 회석된 혈액 검체를 얻는 공정과,

혈액 중에 항상적으로 존재하는 나트륨 이온 또는 염화물 이온의 표준값을 이용하여 회석된 혈액 검체의 회석 배율 1을 결정하는 공정과,

혈액 중에 항상적으로 존재하는 총 단백 또는 알부민의 표준값을 이용하여 회석된 혈액 검체의 회석 배율 2를 결정하는 공정과,

회석 배율 1 및 2를 비교하는 공정과,

결정된 회석 배율의 어느 것과, 혈액 검체 중의 측정 대상 성분의 농도의 측정값으로부터, 혈액 검체 중의 상기 측정 대상 성분의 농도를 분석하는 공정을 포함하고,

상기 회석액 중에 포함될 수 있는 상기 부재에서 유래하는 상기 나트륨 이온 또는 염화물 이온의 양이 규정되어

있는, 혈액 분석 방법.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은, 미량의 혈액 검체 중의 대상 성분을 분석하기 위한, 혈액 검사 키트, 키트에 이용하기 위한 부재, 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 일반적으로, 채혈에는, 의사 등 일정한 유자격자가 주사기를 이용하여 정맥으로부터 혈액을 채취하는 일반 채혈과, 검사 대상자가 자신의 손가락 등에 채혈 바늘을 찔러 혈액을 채취하는 자기 채혈이 있다.
- [0003] 일반 채혈에 의하여 채취된 혈액은, 채취 용기에 밀폐된 상태로 의료 기관 또는 검사 기관에 반송되어, 그곳에서 검사가 행해지고 있다. 혈액을 혈구와 혈장으로 분리하지 않고 반송하는 경우에는, 의료 기관 또는 검사 기관에서 원심분리기에 의하여 혈액을 혈구와 혈장으로 분리한 후에 검사가 행해진다. 또, 검사 대상자가 행하는 자기 채혈에서는, 채혈 후의 혈액은 분리막에 의하여 혈구와 혈장으로 분리되고, 이 분리된 상태로 검사 장소에 수송되어, 그곳에서 검사가 행해진다.
- [0004] 특허문헌 1에는, 자기 채혈에 의하여 채취된 혈액 검체의 검사 방법이 기재되어 있다. 구체적으로는, 1) 용량을 정량하지 않고 채취한 정량해야 할 성분을 함유하는 미지 용량의 생체 시료와 일정량의 지시 물질을 함유하는 일정량의 수성 용액으로 이루어지는 정량용 시료를 조제하는 공정, 2) 일정량의 지시 물질을 함유하는 일정량의 수성 용액 중의 지시 물질의 농도(C_1)와 정량용 시료 중의 지시 물질의 농도(C_2)로부터 생체 시료의 희석 배율(a)을 구하는 공정, 3) 정량용 시료 중의 정량해야 할 성분의 농도(Y)를 구하는 공정, 4) 상기 2)에서 구한 생체 시료 희석 배율(a)과 상기 3)에서 구한 정량용 시료 중의 정량해야 할 물질의 농도(Y)로부터 생체 시료 중의 정량해야 할 성분을 결정하는 공정을 포함하는 생체 시료 중의 정량해야 할 성분의 정량 방법이 기재되어 있다.
- [0005] 특허문헌 2에는, 검체 중의 분석 대상 성분량을 측정하고, 또한 이 이외의 항상적으로 검체 중에 본래 존재하는 표준 성분의 양을 측정하여, 이 표준 성분의 양과, 검체 중에서의 표준 성분의 기정 농도로부터 검체의 양을 결정하며, 이 검체량과, 분석 대상 성분량으로부터, 검체 중의 분석 대상 성분의 농도를 결정하는 정량 분석법이 기재되어 있다.
- [0006] 또, 특허문헌 3에는, 혈액 희석 정량 기구를 이용하여 인간이나 동물로부터 미량 혈액을 채취하여 그대로 또는 희석시킨 후 일정량을 다른 기기나 용기 또는 직접 시약에 공급하는 것이 기재되어 있다. 또한 특허문헌 4에는, 희석용 수용액 중의 지시 물질의 흡광도를 이용하여, 생물학적 시료 중의 정량해야 할 성분의 농도를 정량하는 방법이 기재되어 있다.
- [0007] 현재, 시판되고 있는 혈액 검사 키트에 있어서는, 특허문헌 1에 기재되어 있는 지시 물질, 이른바 내부 표준 물질을 이용하는 방법이 채용되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

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

(특허문헌 0004) 특허문헌 4: 일본 공개특허공보 2009-109196호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 특허문헌 1에 기재된 방법에 있어서는, 혈액 검체가 미량인 경우에는, 혈액 검체량에 대한 회석액의 비율을 높게 하는 것이 필요해진다. 그러나, 이 경우, 혈액 검체를 회석시키기 전후의 회석액의 체적 변화율이 매우 작아지기 때문에, 내부 표준 물질의 농도의 변화율이 작아져, 측정값의 반복 재현성이 저하된다는 문제가 있다.
- [0010] 특허문헌 2에는, 정상인의 전혈 약 100 μ L를 다공질막에 적하하고, 혈구를 분리하여 혈청을 전개한 후에, 150 μ L의 생리 식염수 등장액 PBS(Phosphate-buffered saline: pH7.4)를 첨가하여 얻은 액을 원심분리하여 얻어진 상청(上淸)을 분석 시료로서 분석하고 있지만, 100 μ L 미만의 채혈에 대해서는 기재되어 있지 않다.
- [0011] 특허문헌 3의 방법에서는, 10 μ L의 혈액량을 마이크로 피펫으로 정확하게 채취하여 분석하고 있지만, 채혈에 익숙하지 않은 환자가 채취하는 경우에는 일정량을 정확하게 채취하기는 어렵고, 오차를 포함하는 채혈로 검사를 행한 경우에는 측정값에 오차가 포함되는 결과가 된다.
- [0012] 특허문헌 4에 기재된 측정 방법은 회석 배율이 10배 정도인 측정이며, 회석 배율을 더 높여 회석 혈액량을 충분히 확보하는 경우에는, 특허문헌 1과 마찬가지로, 측정값의 반복 재현성이 저하된다는 문제가 있다.
- [0013] 상술한 바와 같이, 미량의 혈액 검체를 사용하는 경우에 대하여 측정값의 반복 재현성이 높은 혈액 분석 방법이 요망되고 있다. 본 발명자들은, 분석을 높은 정밀도로 행하기 위해서는, 종래부터 제안되고 있는 내부 표준 물질을 이용하는 것은 충분하지 않다고 생각하여, 외부 표준 물질을 이용하는 방법을 검토했다.
- [0014] 본 발명은, 미량 혈액을 완충액으로 회석시켜 성분을 정량 분석하는 방법으로서, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 방법에 있어서, 혈액 검사 키트의 부재로부터, 완충액 중으로 용출되는 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분 농도를 규정함으로써, 예를 들면 특허문헌 1 및, 특허문헌 2의 종래 기술에는 없는 정밀도로, 정확하게 회석 배율을 구하여 성분의 정량 분석을 행하기 위한 혈액 검사 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다. 또한, 내부 표준을 이용하여 회석 배율을 구하는 방법을 병용함으로써, 정밀도를 더 높이는 것이 가능한 혈액 검사 키트를 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위하여 예의 검토한 결과, 채취된 혈액 검체를 회석액으로 회석시키고, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 회석 배율을 결정하여, 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 혈액 분석 방법에 있어서, 부재에서 유래하는 상기 표준 성분의 양을 일정량 이하로 억제함으로써, 상기 과제를 해결할 수 있는 것을 발견하여, 본 발명을 완성하기에 이르렀다. 본 발명은 이하를 제공한다.
- [0016] [1] 혈액 검체를 회석시키기 위한 회석액과,
- [0017] 상기 회석액이 수용된 제1 수용 기구, 상기 회석액으로 회석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 상기 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부재를 포함하는, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하기 위한, 혈액 검사 키트로서,
- [0018] 상기 회석액 중에 포함될 수 있는 상기 부재에서 유래하는 상기 표준 성분의 양을 규정한 것을 특징으로 하는, 혈액 검사 키트.
- [0019] [2] 상기 회석액 중에 포함될 수 있는 상기 부재에서 유래하는 상기 표준 성분의 양이, 회석액의 양의 0.5질량% 이하인, 1에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0020] [3] 상기 회석액의 용량이, 혈장의 용량의 15배 이하인, 1 또는 2에 기재된, 혈액 검사 키트.
- [0021] [4] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분이 나트륨 이온 또는 염화물 이온인, 1 내지 3 중 어느 하나

에 기재된 혈액 검사 키트.

- [0022] [5] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 상기 표준 성분이, 나트륨 이온 또는 염화물 이온과, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 또 다른 표준 성분인, 1 내지 4 중 어느 하나에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0023] [6] 상기 또 다른 표준 성분이, 총 단백 또는 알부민인, 5에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0024] [7] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 또 다른 표준 성분을 이용하여, 상기 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도의 분석을 검증하는, 1 내지 6 중 어느 하나에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0025] [8] 상기 혈액 검사 키트가 구비하는 부재가, 상기 회석액으로 회석된 혈액 검체로부터 혈장을 회수하기 위한 분리 기구를 포함하는, 1 내지 7 중 어느 하나에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0026] [9] 상기 회석액이, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 포함하지 않는, 1 내지 8 중 어느 하나에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0027] [10] 상기 회석액이, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올, 2-에틸아미노에탄올, N-메틸-D-글루카민, 다이에탄올아민, 및 트라이에탄올아민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 아미노알코올 화합물과, HEPES라고도 칭하는 2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진일]에테인설포산, TES라고도 칭하는 N-트리스(하이드록시에틸)메틸-2-아미노에테인설포산, MOPS라고도 칭하는 3-모폴리노프로페인설포산, 및 BES라고도 칭하는 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노에테인설포산으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충제를 포함하는, 1 내지 9 중 어느 하나에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0028] [11] 상기 회석액이, 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분을 더 함유하는, 1 내지 10 중 어느 하나에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0029] [12] 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분이, 리튬 이온 또는 글리세롤 삼인산인, 11에 기재된 혈액 검사 키트.
- [0030] [13] 1 내지 12 중 어느 하나에 기재된 혈액 검사 키트에 이용하기 위한, 부재.
- [0031] [14] 부재가, 회석액을 수용하기 위한 제1 수용 기구, 회석액으로 회석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 상기 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부재인, 13에 기재된 부재.
- [0032] [15] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 제거하는 데에 유효한 조건으로 부재를 세정하는 공정을 포함하는, 1 내지 12 중 어느 한 항에 기재된 혈액 검사 키트의, 또는 13 또는 14에 기재된 부재의, 제조 방법.
- [0033] [16] 상기 조건이, 전기 전도도가 $1\mu\text{S}/\text{cm}$ 이하인 물의 사용인, 15에 기재된 제조 방법.

발명의 효과

- [0034] 본 발명의 혈액 검사 키트 및 그 부재에 의하면, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도의 분석을 양호한 정밀도로 행할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 제조 방법에 의하면, 상술한 분석을 양호한 정밀도로 행할 수 있는 혈액 검사 키트 및 그 부재를 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0036] 도 1은, 본 발명의 실시양태에 관한 혈액 검사 키트의 단면도이다.
- 도 2는, 회석액에 대한 나트륨 이온의 허용 용출 농도(회석액에 대한 중량%)를 산출한 결과의 예이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0037] 이하, 본 발명의 실시형태를 설명한다. 또한, X~Y로 나타나는 범위는, 상한 X와 하한 Y의 값을 포함한다. 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을, 외부 표준 물질 또는 외부 표준이라고 하는 경우가 있다. 또, 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분을, 내부 표준 물질 또는 내부 표준이라고 하는 경우가 있다.
- [0038] 미량의 혈액을 채취하는 방법으로서 여과지를 이용하여 혈액 분석 행하는 방법이 일본 공개특허공보 평10-104226호에 개시되어 있다. 또 여과지 대신에 혈액 보관성이 높은 다공질재를 이용하는 방법이 특허문헌 2에 개

시되어 있다. 이들 방법에서는, 소재에 흡수된 혈액 성분을 완충액 등으로 추출하여 측정하게 되기 때문에, 혈액에 항상적으로 존재하는 외부 표준 물질인 나트륨 이온, 염화물 이온, 칼슘 이온, 단백 등을, 혈액을 용출하여 재용해한 경우의 완충액에 의한 희석률을 추측하는 기준 물질로서 이용하는 것이 기재되어 있다. 그러나 이들 방법에서는, 혈액의 채취량은 다양하여, 채취한 혈액의 희석률이 높아지면 그 후의 분석 정밀도가 낮아져 결과가 불균일하고, 일단 혈액을 응집시켜 고화시키기 때문에 분석 대상이 되는 성분의 안정성의 보증이 불충분한 경우가 있었다. 또, 건조한 시료로부터 생체 성분을 추출하는 완충액은, pH 조정이나 생체 성분 안정화를 위하여 NaOH나 NaCl, HCl을 첨가한 완충액을 이용할 필요가 있다. 이로 인하여, 시료의 성분에서 비교적 높은 농도로 존재하고, 항상성이 있으며, 개체 간의 차가 적은 나트륨 이온이나 염화물 이온의 농도를 외부 표준으로 하여, 희석된 원래의 다른 생체 성분 농도의 보정을 행하는 것에 이용할 수 없다는 문제가 있었다.

[0039] 한편, 채취한 미량 혈액을 내부 표준 첨가 완충액으로 희석시켜, 내부 표준 물질의 희석 배수로부터 희석 혈장 중의 미지량이 존재하는 성분량을 정량하는 방법으로서 특허문헌 1에 기재된 방법이 개시되어 있다. 내부 표준 물질로서는 N-(2-하이드록시-3-설포프로필)-3,5-다이메톡시아닐린·나트륨염(HSDA), 혹은 애시드 블루 9(브릴리언트 블루 FCF)가 이용되고 있으며, 혈액을 안정적으로 유지하기 위한 완충제나 방부제가 이용되고 있다. 이와 같은 처방은, 혈액을 응고시키지 않는 점에서 그 성분의 안정성을 유지하는 것을 실현했지만, 역시 혈액 채취량이 불규칙하거나, 채취량이 적은 경우에는, 희석 후의 내부 표준 물질의 희석률이 작아지는 것이나, 혈액 성분량 자체가 저하되기 때문에, 검사 정밀도의 신뢰성이 저하되는 것이 문제였다. 또, 완충액으로 희석시키는 방법은 생체 성분이 pH7.4인 생리적 조건의 완충액으로 보존되어, 수송 중의 안정성도 우수하지만, 내부 표준 첨가 완충액에 대한 시료에 의한 내부 표준의 희석률이 작아, 적은 시료 첨가로는 측정 오차가 발생하기 쉽다는 문제가 있었다.

[0040] 또한 이들 선행 기술의 실시예에서는, 추출하는 완충액에는 인산 완충 생리 식염수가 생체 성분의 안정 유지가 우수하므로 이용되고 있지만, 인산 완충 생리 식염수에는 나트륨 이온이나 염화물 이온이 포함되어 있다. 이로 인하여 나트륨 이온이나 염화물 이온은 외부 표준으로서 이용할 수 없어, 칼슘 이온, 단백 등이 이용되고 있다. 따라서, 미량 혈액에 대한 혈액 검사를 높은 정밀도로 행하기 위해서는, 종래 기술에 기재되어 있는 바와 같이 희석률을 보정하는 외부 표준 물질의 사용이나, 종래 제안되고 있는 내부 표준 물질을 함유하는 완충액의 사용에서는 검사 정밀도의 확보가 충분하지 않았다.

[0041] 또, 혈액 중의 항상성 물질이라고 해도, 예를 들면 나트륨 이온에 있어서는, 정상값 134~146mmol/L의 분포의 폭을 갖기 때문에, 보다 정확한 희석 배율을 산출하는 것이 필요하다. 희석 배율의 정밀도가 저하되면 검사 정밀도에 악영향을 주어, 검사의 신뢰성을 손상시킬 리스크가 높아지게 된다. 특히, 키트를 구성하는 부재로부터 완충액 중으로 용출되는 외부 표준 물질에 의한 오염(이른바 컨테미네이션)이 조금이라도 있었던 경우에, 혈액 채취량이 많거나 적으면, 컨테미네이션의 희석 배율 산출에 주는 영향도가 달라지게 된다. 특허문헌 2에는, 이와 같은 키트를 구성하는 부재로부터 완충액 중으로 용출되는 외부 표준 물질의 컨테미네이션의 희석 배율 산출에 주는 영향도를 일정하게 하는 것에 관해서는, 일체 언급하고 있지 않다.

[0042] 또, 특허문헌 1에는, 내부 표준에 관한 기재는 있지만, 외부 표준과 병용하는 것에 관한 기재는 없다. 따라서, 외부 표준의 컨테미네이션에 관한 기재는 없고, 컨테미네이션을 방지하기 위한 구체적인 수단은 일체 제안되고 있지 않다.

[0043] 본 발명은, 미량 혈액 검체를 완충액으로 희석시켜 대상 성분의 농도를 분석하기 위한 키트로서, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 외부 표준을 이용하여 대조 성분의 분석을 행할 때에, 종래 기술에는 없는 정밀도로 희석 배율을 구할 수 있는, 혈액 검사 키트를 제공하는 것을 목적으로 한다. 이를 위한 해결 수단으로서, 희석액 중에 포함될 수 있는 상기 부재에서 유래하는 상기 표준 성분의 양을 규정한 것이다. 또, 바람직한 양태에 있어서는, 외부 표준을 이용할 뿐만 아니라, 내부 표준을 이용하는 것으로 하고 있다.

[0044] 본 발명에 의하여, 혈액 중의 분석 대상 성분을 측정하는 측정 방법에 있어서, 환자 스스로가 혈액을 채혈하는 경우에 미량의 혈액 성분을 희석액에 투입하여 희석시켰을 때에, 합성 수지(또한 본 명세서에서는, 플라스틱을 합성 수지와 동의로 이용하고 있음), 유리 또는 고무를 소재로 하는 키트를 구성하는 부재를, 사전에 세정해 둬으로써, 키트를 구성하는 부재로부터 용출되는 항상성이 있는 표준 성분을 최대한 억제함으로써, 혈액에서 유래하는 항상성이 있는 표준 성분을 충분히 높은 정밀도로 검출하는 것에 의하여, 분석 대상 성분의 정량을 양호한 정밀도로 행할 수 있는 측정 방법, 혹은 측정 방법을 사용한 혈액 검사 시스템을 실현하는 것이 가능해진다.

[0045] 또한, 내부 표준을 이용하여 희석 배율을 구하는 방법을 병용함으로써, 정밀도를 더 높이는 것이 가능한 혈액 검사 키트를 제공한다.

- [0046] [1] 혈액 검사 키트
- [0047] 본 발명의 혈액 검사 키트는,
- [0048] 혈액 검체를 희석시키기 위한 희석액과,
- [0049] 상기 희석액이 수용된 제1 수용 기구, 상기 희석액으로 희석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부재를 포함하고, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하기 위한, 혈액 검사 키트로서,
- [0050] 상기 희석액 중에 포함될 수 있는 상기 부재에서 유래하는 상기 표준 성분의 양을 규정한 것을 특징으로 한다.
- [0051] 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석한다란, 대상 성분의 농도를 결정하는 것(즉, 대상 성분을 정량하는 것), 또는 대상 성분의 농도가 소정 기준값 이상인지 소정 기준값 이하인지를 결정하는 것 등을 포함하고, 분석의 형태는 특별히 한정되지 않는다.
- [0052] [채혈 방법과 양]
- [0053] 본 발명의 혈액 검사 키트는, 혈액 검체를 채취하기 위하여 사용된다. 본 발명의 혈액 검사 키트에 의한 혈액의 채취는, 대상자 자신이 행해도 되고, 의사 등의 유자격자가 행해도 된다.
- [0054] 바람직한 양태에서는, 환자 본인이, 랜셋 등의 나이프가 장착된 기구를 이용하여 손가락 끝 등에 상처를 입혀 피부 밖으로 나온 혈액을 채취한다. 환자의 부담을 줄이기 위하여, 침습성 낮게 혈액을 채취하는 것이 바람직하고 혈액을 채취하는 경우에 무통, 혹은 통증이 매우 적은 상태에서 채혈할 수 있는 것이 요망되며, 그 경우, 상처의 깊이, 크기는 작은 것이 바람직하고, 채취할 수 있는 혈액도 매우 적어진다. 따라서, 본 발명의 혈액 검사 키트로 채취되는 검체의 용량(즉, 채혈량)은 100 μ L 이하인 것이 바람직하다. 이와 같이 적은 환자의 채혈량으로도, 본 발명에서는, 혈액 검사 키트의 부재로부터, 희석액 중으로 용출될 수 있는 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분 농도를 낮게 규정하고, 또 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분으로서, 예를 들면 나트륨 이온, 또는 염화물 이온을 이용함으로써, 양호한 측정 정밀도로 분석 대상물을 측정하기 위한 방법을 제공하는 것이 가능해진다.
- [0055] [혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분]
- [0056] 상기와 같이, 혈장 성분의 희석 배율이 높은 희석 혈장의 희석 후의 대상 성분에 대하여, 희석 전의 혈액의 혈장 중에 존재하는 농도를 정확하게 분석하기 위해서는, 희석액 중에 미리 존재하는 물질의 농도의 변화율로부터 구하는 방법에서는, 농도 변화의 비율이 매우 작아지기 때문에 측정 오차가 크고, 또 측정의 재현성이 악화된다는 폐해가 있다. 따라서 본 발명의 혈액 검사 키트는, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하기 위한, 혈액 검사 키트이다.
- [0057] 여기에서, 표준 성분을 "이용하여"란, 표준 성분에 대한 표준값(항상값)에 근거하여, 대상 성분의 농도를 분석하기 위한 희석 배율을 결정하는 의미이다. 따라서, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 것은, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 항상값(표준값)에 근거하여 희석 배율을 결정하여, 대상 성분의 농도를 분석하는 것이기도 하다.
- [0058] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분은, 예를 들면 나트륨 이온, 염화물 이온, 칼륨 이온, 마그네슘 이온, 칼슘 이온, 총 단백, 및 알부민 등을 들 수 있다. 혈액 검체의 혈청 및 혈장 중에 포함되는 이들 표준 성분의 농도는, 나트륨 이온 농도는, 134~146mmol/L(평균값: 142mmol/L), 염화물 이온 농도는, 97~107mmol/L(평균값: 102mmol/L), 칼륨 이온 농도는, 3.2~4.8mmol/L(평균값: 4.0mmol/L), 마그네슘 이온 농도는, 0.75~1.0mmol/L(평균값: 0.9mmol/L), 칼슘 이온 농도는, 4.2~5.1mmol/L(평균값: 4.65mmol/L), 총 단백 농도는, 6.7~8.3g/100mL(평균값: 7.5g/100mL), 알부민 농도는, 4.1~5.1g/100mL(평균값: 4.6g/100mL)이다. 본 발명에서는, 환자의 통증을 완화시키기 위하여 채혈하는 혈액량이 매우 적은 경우에 있어서의 대상 성분의 측정을 가능하게 하기 위한 것이며, 미량의 혈액을 희석액으로 희석시켰을 때에, 희석액 중에 존재하는 "혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분"의 농도를 양호한 정밀도로 측정할 필요가 있다. 희석 배율이 높아지면, 본래 혈액 중에 존재하는 성분의 희석액 중의 농도가 저하되고, 희석 배율에 따라서는 농도 측정 시에, 측정 오차를 포함할 가능성이 있다. 따라서, 미량의 혈액 성분을 높은 희석 배율로 희석시켰을 때에, 상기 표준 성분을 충분히 높은 정밀도로 검출하기 위해서는, 미량의 혈액 중에 높은 농도로 존재하는 표준 성분을 측정하는 것이 바람직하다. 본

발명에서는, 혈액 검체 중에 항상적으로 존재하는 성분 중에서도 고농도로 존재하는, 나트륨 이온(Na^+) 또는 염화물 이온(Cl^-)을 이용하는 것이 바람직하다. 나아가서는, 상술한 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분 중에서도 혈액 중에 존재하는 양이 가장 높은 나트륨 이온을 측정하는 것이 가장 바람직하다. 나트륨 이온은, 평균값이 표준값(기준 범위의 중앙값)을 나타내고, 그 값은, 142mmol/L 이며, 혈장 중의 총 양이온의 90mol% 이상을 차지한다.

[0059] 피험자의 혈액 중에 있어서의 혈장 성분의 점유율은, 용적의 비율로 약 55%인데, 피험자의 염분 섭취량의 변화 등으로 변동된다. 이로 인하여, 본 발명의 키트를 이용하는 경우는, 혈장 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 표준값을 이용하여 혈장의 희석 배율을 결정하고, 결정된 희석 배율을 이용하여 혈액 검체의 혈장 중의 대상 성분의 농도를 분석한다. 희석 배율을 결정하는 방법으로서, 혈장의 희석액 중의 외부 표준 물질(예를 들면, 나트륨 이온 등)의 측정값(농도 X)과, 혈액 검체의 혈장 중에 포함되는 상기 외부 표준 물질(예를 들면, 나트륨 이온 등)의 기정 농도값(농도 Y; 나트륨 이온의 경우에는 142mmol/L)으로부터, 혈액 검체 중의 혈장 성분의 희석 배율(Y/X)을 산출함으로써 희석 배율을 구할 수 있다. 이 희석 배율을 이용하여, 혈장의 희석액 중의 대상 성분의 측정값(농도 Z)을 측정하고, 이 측정값에 희석 배율을 곱함으로써, 실제로 혈액 검체의 혈장 중에 포함되는 분석 대상 성분의 농도 $[Z \times (Y/X)]$ 를 측정하는 것이 가능해진다.

[0060] 나트륨 이온 농도 및 염화물 이온 농도는, 예를 들면 염광 광도법, 유리 전극법, 적정법, 이온 선택 전극법, 효소 활성법 등에 의하여 측정할 수 있다.

[0061] 나트륨 이온의 측정에서는 나트륨 이온에 의하여 효소 갈락토시다제는 효소 활성이 활성화되는 점에서, 완충액으로 희석된 매우 저농도의 나트륨 이온(24mmol/L 이하) 시료를 수 μL 로 측정하는 효소적 측정법을 이용할 수 있다. 이 방법은 생화학·면역 자동 분석 장치에 적응시킬 수 있고, 나트륨 이온 측정을 위하여 별도의 측정 기기를 필요로 하지 않는 점에서 효율성이 높아 경제적이다.

[0062] 또, 부재에서 유래하는 표준 성분의 양을 규정한 혈액 검사 키트가 실제로 사용되고 있는지, 또 혈액의 희석과 혈장의 희수의 방법이 정상적으로 행해지고 있는지 확실하기 위해서는, 혈장 중의 또 다른 표준 성분으로부터 독립적으로 희석 배율을 추가적으로 구하여, 그 값이 위에서 구한 희석 배율과 일치하는지를 확인하는 것이 바람직하다. 일치한다면, 2개의 측정값(a, b)에 있어서, 그들의 차의 그들의 평균값에 대한 비율, 즉 $|a-b|/\{(a+b)/2\} \times 100$ 이, 20% 이하인 것이며, 바람직하게는 10% 이하인 것이고, 보다 바람직하게는 5% 이하인 것이다. 이로써, 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도의 분석이 정상적으로 행해지고 있는지의 검증이 가능해진다. 여기에서, 나트륨 이온 또는 염화물 이온 이외의 혈장 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 예로서는, 총 단백 또는 알부민으로부터 선택되는 것이 바람직하고, 총 단백질이 보다 바람직하다. 총 단백질의 측정법은, 브렛법이나, 자외 흡수법, 브래드포드법, 로리법, 바이신코닌산(Bicinchoninic Acid: BCA)법, 형광법 등 공지的方法和이 있고, 측정 시료의 특성이나 감도, 시료량 등에 따라 적절히 사용하는 방법을 선택할 수 있다.

[0063] [혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분]

[0064] 바람직한 양태의 하나로서, 키트는, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분과 함께, 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하기 위한 것이다.

[0065] 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분은, 키트 중의 희석액(후술함)에, 소정 농도가 되도록 첨가하여 이용할 수 있다. 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분으로서, 혈액 검체 중에 전혀 포함되지 않거나, 혹은 포함되어 있었다고 해도 극미량의 물질을 사용할 수 있다. 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분으로서, 혈액 검체 중의 대상 성분의 측정에 간섭을 부여하지 않는 물질, 혈액 검체 중의 생체 효소의 작용을 받아 분해되지 않는 물질, 희석액 중에 안정적인 물질, 혈구막을 투과하지 않고 혈구 중에 포함되지 않는 물질, 완충액의 보존 용기에 흡착되지 않는 물질, 양호한 정밀도로 측정할 수 있는 검출계를 이용할 수 있는 물질을 이용하는 것이 바람직하다.

[0066] 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분으로서, 희석액에 첨가한 상태로 장기간 보관해도 안정적인 물질이 바람직하다. 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분의 예로서는, 글리세롤 삼인산, 알칼리 금속으로서 Li, Rb, Cs, 또는 Fr, 그리고 알칼리 토류 금속으로서 Sr, Ba, 또는 Ra를 들 수 있고, 이들 중에서, Li 및 글리세롤 삼인산이 바람직하다.

[0067] 이들 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분은, 혈액 희석 후의 농도 측정 시에 제2 시약을 첨가함으로써 발색시켜, 그 발색 농도로부터 희석 혈액 중의 농도를 구할 수 있다. 예를 들면, 희석액에 첨가한 리튬 이온의 측정은, 킬레이트 비색법(할로젠화 포피린 킬레이트법: 퍼플루오로-5,10,15,20-테트라페닐-21H,23H-포피린)을

이용하여 생화학 자동 분석 장치로 대량 시료를 미량의 시료로 용이하게 측정할 수 있다.

- [0068] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분과 함께, 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분을 이용하여 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도를 분석하기 위한 혈액 검사 키트를 이용하는 것, 즉 2개의 표준 성분을 병용함으로써, 보다 신뢰성이 높은 분석이 실현 가능해진다.
- [0069] 2개의 표준 성분을 병용하는 양태에 있어서, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분으로서 나트륨 이온을, 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분으로서 리튬 이온을 이용하여, 나트륨 이온의 측정을 β -갈락토시다제 활성이 비례 관계에 있는 것을 이용한 효소 활성법으로 행하고, 리튬 이온의 측정을 상술한 킬레이트 비색법으로 측정하는 경우에는, 혈액 검체의 회석 배율은, 하기 식 1 내지 4 중 어느 하나의 식으로 산출할 수 있다.
- [0070] [수학식 1]
- [0071] 식 1: $X=(A+C)/(B+D)$
- [0072] 식 2: $X=\{(A^2+C^2)^{1/2}\}/\{(B^2+D^2)^{1/2}\}$
- [0073] 식 3: $X=a \times (B+D) \pm b$
- [0074] (여기에서, a 및 b는 계수이며, 미리 (B+D)와 회석 배율의 데이터를 취득하여, 식 3으로 나타나는 표준 곡선을 작성해 둬)
- [0075] 식 4: $X=A/B'$
- [0076] (여기에서, $B'=(A \times D)/C$ 임)
- [0077] 상기 식에 있어서, A, B, C, D, B' 및 X는, 이하와 같이 정의된다.
- [0078] A: 완충액을 발색시켰을 때의 흡광도
- [0079] B: 혈장 첨가 후의 흡광도 변화량
- [0080] C: 혈장 나트륨 중앙값 142mmol/L의 흡광도
- [0081] D: 혈장 회석 후의 나트륨 이온 농도에 있어서의 흡광도
- [0082] B': 혈장 나트륨의 흡광도로부터 산출한 회석 배율에 의한, 회석 혈장 중의 혈액 중에 존재하지 않는 표준 성분의 흡광도의 보정값
- [0083] X: 혈장 회석 배수
- [0084] 회석률을 구할 때의 또 하나의 산출 방법으로서, 제곱 평균법을 이용한 식 5로 산출하고, 회석액 중의 분석 대상 성분의 농도에, 식 5로 산출한 회석률을 곱하여 혈액 검체의 성분 중의 대상 성분의 농도를 분석하는 양태도 바람직하다.
- [0085] [수학식 2]
- [0086] 식 5: $X=[\{(A/B)^2+(C/D)^2\}/2]^{1/2}$
- [0087] 혈액 검체의 성분 중의 대상 성분의 농도는, 회석액 중의 대상 성분의 농도로부터, 상기 회석 배율에 근거하여 산출할 수 있다.
- [0088] [회석액]
- [0089] 본 발명의 혈액 검사 키트는, 채취한 혈액 검체를 회석시키기 위한 회석액을 포함한다. 혈액 검체를 회석시키기 위한 회석액은, 회석 배율을 구하기 위하여 사용하는 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 함유하지 않는 회석액이다. 본 명세서에 있어서 "함유하지 않는다"란, "실질적으로 함유하지 않는다"는 것을 의미한다. 여기에서, "실질적으로 함유하지 않는다"란, 회석 배율을 구할 때에 사용하는 항상성이 있는 물질을 전혀 포함하지 않거나, 혹은 포함되어 있다고 해도, 혈액 검체를 회석시킨 후의 회석액의 항상성이 있는 물질의 측정에 영향을 미치지 않을 정도의 극미량의 농도로 포함되는 경우를 의미한다. 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분으로서, 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 이용하는 경우에는, 회석액으로서는, 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 실질적으로 함유하지 않는 회석액을 사용한다.

- [0090] 본 발명에 있어서는, 환자가 채혈한 혈액 검체를 희석시킨 후, 의료 기관 또는 검사 기관에 수송하여 대상 성분의 농도를 분석할 수 있다. 채혈부터 분석까지는 장시간 걸릴 가능성이 있는 점에서, 그 사이에, 혈액의 희석액 중에 있어서 대상 성분이 분해나 변성되는 것을 방지하는 것이 바람직하다. 혈액의 pH는, 정상인이라면 통상 pH7.30~7.40 정도로 일정하게 유지되고 있다. 따라서, 대상 성분이 분해나 변성되는 것을 방지하기 위하여, 희석액은, pH6.5~pH8.0, 바람직하게는 pH7.0~pH7.5, 더 바람직하게는 pH7.3~pH7.4의 pH 영역에서 완충 작용을 갖는 완충액인 것이 바람직하고, 희석액은, pH의 변동을 억제하는 완충 성분을 함유하는 완충액인 것이 바람직하다.
- [0091] 완충액의 종류로서는, 아세트산 완충액(Na), 인산 완충액(Na), 시트르산 완충액(Na), 붕산 완충액(Na), 타타르산 완충액(Na), Tris(트리스(하이드록시메틸)아미노에테인) 완충액(Cl), HEPES([2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진일]에테인설폰산]) 완충액, 인산 완충 생리 식염수(Na) 등이 알려져 있다. 이들 중에서 pH7.0~pH8.0 부근의 완충액으로서, 인산 완충액, Tris 완충액, HEPES 완충액이 대표적인 것이다. 그러나, 인산 완충액은 인산의 나트륨염이 포함되어 있는 것, Tris 완충액은, 해리 pKa가 8.08이기 때문에, pH7.0~pH8.0 부근에서 완충능을 갖게하기 위해서는 통상은 염산과 조합하여 사용되는 것, HEPES의 설폰산의 해리 pKa는 7.55인데, 이온 강도를 일정하게 하여 완충 용액을 조정하기 위하여, 통상은 수산화 나트륨과 염화 나트륨과 HEPES의 혼합물이 이용되는 점에서, 이들은 pH를 일정하게 유지하는 작용을 갖는 완충액으로서 유용하지만, 본 발명에 있어서 외부 표준 물질로서 이용하는 것이 바람직한 물질인 나트륨 이온 혹은 염화물 이온을 함유하기 때문에, 본 발명으로서의 적용은 바람직하지 않다.
- [0092] 본 발명의 키트에 포함되는 희석액으로서, 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 함유하지 않는 완충액을 이용하는 것이 바람직하다. 본 발명에서 이용하는 희석액은 바람직하게는, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올(AMP), 2-에틸아미노에탄올, N-메틸-D-글루카민, 다이에탄올아민, 및 트라이에탄올아민으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 적어도 1종의 아미노알코올 화합물, 그리고 Good's 완충액(굿 버퍼)으로 pKa가 7.4 부근의 완충제인 HEPES라고도 칭하는 2-[4-(2-하이드록시에틸)-1-피페라진일]에테인설폰산(pKa=7.55), TES라고도 칭하는 N-트리스(하이드록시메틸)메틸-2-아미노에테인설폰산(pKa=7.50), MOPS라고도 칭하는 3-모폴리노프로페인설폰산(pKa=7.20), 및 BES라고도 칭하는 N,N-비스(2-하이드록시에틸)-2-아미노에테인설폰산(pKa=7.15)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 완충제를 포함하는 희석액이다. 상기 중에서도, 2-아미노-2-메틸-1-프로판올(AMP)과 HEPES, TES, MOPS 또는 BES의 조합이 바람직하고, 또한 2-아미노-2-메틸-1-프로판올(AMP)과 HEPES의 조합이 가장 바람직하다.
- [0093] 상기 완충액을 조제하기 위해서는, 아미노알코올과 Good's 완충액을 1:2~2:1, 바람직하게는 1:1.5~1.5:1, 더 바람직하게는 1:1의 농도비로 혼합하면 된다. 완충액의 농도는 한정되지 않지만, 아미노알코올 또는 Good's 완충액의 농도는, 0.1~1000mmol/L, 바람직하게는, 1~500mmol/L, 더 바람직하게는 10~100mmol/L이다.
- [0094] 완충액 중에는, 분석 대상 성분을 안정적으로 유지하는 것을 목적으로 킬레이트제, 계면활성제, 항균제, 방부제, 보효소, 당류 등이 함유되어 있어도 된다. 킬레이트제로서는, 에틸렌다이아민 사아세트산(EDTA)염, 시트르산염, 옥살산염 등을 들 수 있다. 계면활성제로서는, 예를 들면 양이온 계면활성제, 음이온 계면활성제, 양성 계면활성제 또는 비이온 계면활성제를 들 수 있다. 방부제로서는, 예를 들면 아자이드화 나트륨이나 항생 물질 등을 들 수 있다. 보효소로서는, 피리독살인산, 마그네슘, 아연 등을 들 수 있다. 적혈구 안정화제의 당류로서는, 만니톨, 텍스트로스, 올리고당 등을 들 수 있다. 특히, 항생 물질의 첨가에 의하여, 손가락 채혈 시에 손가락 표면으로부터 일부 혼입되는 세균의 증식을 억제할 수 있어, 세균에 의한 생체 성분의 분해를 억제하여, 생체 성분의 안정화를 도모할 수 있다.
- [0095] 이들 완충액은 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분이나 내부 표준 물질을 포함하지 않고, 측정계에 간섭을 부여하지 않는 것이 중요하다. 또, 이들 완충액으로 희석된 성분은 생화학·면역 자동 분석 장치에서의 다양한 측정법으로도 측정에 간섭하지 않는 것, 또한 혈구가 용혈하지 않는 것이나 생체 성분이 37℃에서도 안정적으로 보존될 수 있는 것이 바람직하다.
- [0096] 혈액 검체로 전혈을 사용하는 경우에는, 희석한 혈액 중의 혈구 성분을 필터 여과할 필요로부터, 완충액의 침투압을 혈액과 동등(285mOsm/kg(mOsm/kg은, 용액의 물 1kg이 갖는 침투압으로, 이온의 밀리몰수를 나타냄))하게 또는 그 이상으로 함으로써 혈구의 용혈을 방지할 수 있다. 침투압은, 대상 성분의 측정, 및 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 측정에 영향을 주지 않는 염류, 당류 또는 완충제 등에 의하여, 등장으로 조정할 수 있다.
- [0097] 완충액으로 희석된 혈장 나트륨 이온을 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분으로 하여 측정하는 방법에는 염광 광도법, 원자 흡광법, 그리고 이온 선택 전극법이 있다. 본 발명에서는 미량의 혈액을 손가락으로부터 채취

하여 완충액으로 희석시킨 시료는 불과 150 μL 정도이며, 생화학 성분이나 면역 검사 항목을 10항목 이상 측정하는 점에서 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 측정은 수 μL 의 미량으로 측정할 수 있는 것이 바람직하다. 또, 다수의 시료를 분석할 필요로부터, 시판 중인 생화학·면역 자동 분석 장치에 적용할 수 있는 것이 바람직하다.

[0098] [희석액의 양, 희석 배율]

[0099] 혈액 검사로서, 간 기능, 신장 기능, 메타볼리즘 등, 특정 장기, 특정 질환을 검사하는 경우에는, 장기나 질환에 특유의 복수의 측정 대상 성분의 정보를 입수하여, 장기 상태, 생활 습관의 예측 등을 행하기 위하여, 일반적으로는, 복수의 측정 대상 성분의 분석이 동시에 행해진다. 예를 들면, 간장 상태를 검사하기 위해서는, 일반적으로는, ALT(알라닌 트랜스아미나제), AST(아스파라긴산 아미노트랜스페라제), γ -GTP(γ 글루타밀 트랜스펩티다제), ALP(알칼리포스파타제), 총 빌리루빈, 총 단백, 알부민 등, 수종류 이상의 물질의 혈액 중의 농도가 측정된다. 이와 같이, 복수의 대상 성분을 하나의 혈액 검체로부터 측정하기 위해서는, 재측정의 가능성도 고려하여, 희석된 혈액의 양이 어느 정도 필요하다. 따라서, 채취한 혈액을 희석시키는 희석액은, 어느 정도의 양을 확보하는 것이 중요하다. 키트에 있어서의 희석액의 양은, 혈장의 용량의 20배 이하(즉 희석 배율은, 혈장의 용량의 20배 이하)인 것이 바람직하고, 또 15배 이하인 것이 보다 바람직하다. 예를 들면, 채혈량을 50 μL 로 하면, 혈장의 용량은 28 μL 로 계산할 수 있고, 희석액이 360 μL 이면, 희석 배율은 14배가 된다. 또한, 혈구/혈장비를 50/50으로 하면, 혈장을 기준으로 한 경우의 희석 배율이 50/(50+50)배가 됨으로써, 혈액 검체를 기준으로 한 희석 배율을 대략 계산할 수 있다. 키트에 있어서의 희석액의 양은, 혈액 검체의 용량에 대해서는 10배 이하(즉 희석 배율은, 혈액 검체의 용량의 10배 이하)인 것이 바람직하고, 또 7.5배 이하인 것이 보다 바람직하다. 즉 본 발명은 실시형태의 하나로서, 희석액의 용량이, 혈액 검체의 용량의 7.5배 이하인, 상술한 혈액 검사 키트를 제공한다.

[0100] [혈액 검체의 희석물로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구]

[0101] 본 발명의 키트에 의하여 채취된 혈액 검체는, 분석이 행해질 때까지, 희석된 상태로 장시간 경과할 가능성이 있다. 그 사이에, 예를 들면 적혈구의 용혈이 일어나면, 혈구 내에 존재하는 물질이나 효소 등이 혈장 혹은 혈청 중으로 용출되어 검사 결과에 영향을 주거나, 용출된 헤모글로빈이 갖는 흡수에 의하여, 분석 대상 성분의 광학적인 흡수 등의 광 정보에 의하여 분석 대상 성분량을 측정하는 경우에 영향을 미칠 가능성이 있다. 따라서, 용혈을 방지하는 것이 바람직하다. 이로 인하여, 혈액 검체의 희석물로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구를 키트에 포함하는 양태가 바람직하다. 분리 기구의 바람직한 예는, 분리막이다. 분리막은, 예를 들면 혈액 검체의 희석액에 압력을 가함으로써, 혈구 성분은 분리막으로 포획되고, 혈장 성분을 통과시켜, 혈구를 분리하여 혈장 성분을 회수하도록 이용할 수 있다. 이 경우, 항응고제를 이용하는 것이 바람직하다. 또, 측정의 정밀도를 확보하기 위하여, 분리막을 통과한 혈장이 혈구층으로 역류하지 않는 것이 바람직하고, 이를 위해서는 구체적으로는, 일본 공개특허공보 2003-270239호에 기재된, 역류 방지 수단을 키트의 구성 요소로 할 수 있다.

[0102] [부재, 및 부재로부터의 용출]

[0103] 본 발명의 키트에 있어서는, 희석액 중에 포함될 수 있는 혈액 키트의 부재에서 유래하는 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 양이 규정된다. 희석액 중에 포함될 수 있는 양은, 대상이 되는 부재를 실제로 적절한 양의 희석액에 일정 시간 노출시켜, 부재에서 유래하여 희석액에 포함되게 된 표준 성분의 양을 측정함으로써 구할 수 있다. 이 부재에서 유래하는 표준 성분의 양은, 혈액 검체의 희석물의 측정에 큰 영향을 주지 않고, 대상 성분의 농도의 분석을 양호한 정밀도로 행할 수 있는 양이면, 특별히 한정되지 않는다. 구체적으로는, 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 부재에서 유래하는 양은, 희석액의 양의 0.5질량% 이하이고, 바람직하게는 0.4중량% 이하이며, 보다 바람직하게는 0.3중량% 이하이다. 희석액 중에 포함될 수 있는 혈액 키트의 부재에서 유래하는 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 양은 적은 것이 바람직하고, 하한값은 특별히 한정되지 않는다.

[0104] 혈액 검사 키트에 있어서는, 통상 혈액을 채취하는 흡인기에는 파이버 로트가 사용되고 있으며, 이 파이버 로트에는 항응고제로서 에틸렌다이아민 사아세트산(EDTA)의 나트륨염이 사용되고 있다. 또, 혈장을 분리 회수하기 위한 기구로서 유리 필터가 사용되고 있으며, 이것에는 소다 유리, 탄산 나트륨 등의 미량의 나트륨 이온이 포함되어 있다. 소다 유리는, 규사(SiO_2), 탄산 나트륨(Na_2CO_3), 탄산 칼슘(CaCO_3)을 혼합하여 용해시킴으로써 얻어진다. 유리 필터를 유지하기 위한 개스킷의 소재, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구가 고무제이면, 제단백을 위한 NaOH 세정, 및 성형 시에 사용되는 이형제(질산 나트륨, 아질산 나트륨 등의 혼합물) 등의 잔사분으로서 미량의 나트륨 이온이 포함되는 경우가 있다. 플라스틱(수지) 성형품인

부재는, 표면에 미량 Na이 포함되는 경우가 있다. 수지 성형에 사용하는 이형제 중에 금속 원소로서 주석, 아연, 칼슘 등과 함께, 나트륨이 포함되기 때문이다.

[0105] 이들이 키트에서 유래하는 나트륨 이온으로서, 회석액 중에 혼입되는 것이 상정된다. 본 발명자들의 검토에 의하면, 회석액에 실제로 포함될 수 있는 키트 유래의 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분(바람직하게는 나트륨 이온 또는 염화물 이온)의 양을 충분히 줄임으로써, 구체적으로는, 회석액에 있어서의 농도를 0.5중량% 이하로 함으로써, 채혈량 50 μ L 이상(추정되는 회석 배율은 15배 이하)에 있어서, 고정밀도의 회석 배율 재현성이 얻어지는 것을 발견했다. 또, 이때, 회석액 중으로 용출되는 나트륨 이온량(혈액 유래가 아닌 나트륨 이온량, 즉 컨테미네이션 성분)이, 혈장 중의 나트륨 이온량에 대하여, 바람직하게는 $\pm 2\%$ 이하이면, 회석 배율의 산출을 고정밀도로 유지할 수 있다.

[0106] 본 발명의 혈액 검사 키트는, 혈액을 채취하는 혈액 채취 기구, 회석액이 수용된 제1 수용 기구, 회석액으로 회석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구로 이루어지는 군으로부터 선택되는 부재 중 적어도 하나를 갖는다. 본 발명의 혈액 검사 키트의 일례로서는, 혈액 검체의 성분을 회석시키기 위한 회석액, 회석액이 수용된 제1 수용 기구, 회석액으로 회석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구, 피부에 상처를 입혀 혈액을 피부 밖으로 배어 나오게 하는 바늘이나, 랜셋, 상처에 붙이는 반창고 또는 소독 부재(예를 들면, 아이소프로판올(70% 아이소프로판올 등) 또는 에탄올 등을 함침시킨 부직포), 취급 설명서 등을 구비할 수 있다. 회석된 혈액 검체로부터 혈장 성분을 회수하기 위한 분리 기구로서는, 분리막인 양태가 바람직하고, 혈구 성분을 분리 가능한 미세 구멍을 갖는 필터가 보다 바람직하다.

[0107] 제1 수용 기구, 및 제2 수용 기구는, 하나의 기구를 제1 수용 기구 및 제2 수용 기구로서 겸용해도 되고, 별도의 기구를 구비하는 양태여도 된다. 수용 기구 내에 있는 혈액을 회석시킨 회석액을, 환자, 혹은 회석 배율의 측정이나 분석 대상 성분의 분석을 행하는 측정자에게 확인 가능하게 하기 위하여, 제1 수용 기구, 및 제2 수용 기구는, 투명한 소재로 되어 있는 것이 바람직하다.

[0108] 분리 기구를 지지하는 지지 기구는, 개스킷인 양태가 바람직하다. 또, 밀봉 기구로서는, 수용 기구가 통형의 형상을 한 기구 등인 경우에는, 개구에 덮개를 덮는 것이 가능한 캡이나, 나선형의 홈을 갖는 덮개, 혹은 고무 마개 등을 사용할 수 있다.

[0109] 상기의 구성에 의하여, 회석액에 의하여 혈액을 회석시킨 후에, 즉시 혈장 혈구 분리하는 기능을 혈액과 회석액의 혼합 용기에 부여함으로써, 혈액 성분의 안정성과 혈구 세포로부터의 용혈에 의한 성분의 변동의 영향을 배제하여, 혈액 채취 후의 시료의 안정성을 부여할 수 있다.

[0110] 본 발명의 키트는, 100 μ L 이하의 채혈량이라도, 양호한 측정 정밀도로 분석 대상 성분을 분석할 수 있는 방법을 실현 가능하게 하는 것이며, 환자에게, 100 μ L 이하의 적은 채혈량이어도 양호한 정밀도로 측정하는 것이 가능한 것 등의 정보가 기재된 취급 설명서를 포함하는 키트인 것이 바람직하다.

[0111] [키트의 구체예]

[0112] 바람직한 양태의 하나에 있어서, 키트는, 회석액, 회석액이 수용된 제1 수용 기구(혈액 검체의 회석물을 수용하기 위한 수용 기구이기도 함), 회석액으로 회석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구, 분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구, 회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구, 및 수용한 혈장을 제2 수용 기구 내에 유지시키기 위한 밀봉 기구를 포함한다. 구체적인 기구로서는, 예를 들면 일본 특허공보 제3597827호의 도 1부터 도 13에 기재된 기구를 사용할 수 있다. 일본 특허공보 제3597827호의 도 1을, 본원의 도 1로서 원용한다.

[0113] 혈액 분리 기구(1)는 채혈 용기(2)(회석액이 수용된 수용 기구, 제1 수용 기구라고 하는 경우도 있다. 혈액 검체의 회석물을 수용하기 위한 수용 기구이기도 함)와, 채혈 용기(2)에 끼워 삽입 가능한 통체(3)(회수한 혈장을 수용하기 위한 제2 수용 기구)와, 통체(3)에 끼울 수 있는 캡 피스톤(4)과, 캡 피스톤(4)의 하단에 마련된 밀폐 덮개(5)(밀봉 기구)를 구비하고, 사용 전에는, 도 1에 나타내는 바와 같이, 채혈 용기(2)의 상단 개구부는 캡(6)에 의하여 패키징(7)을 통하여 밀폐되어 있다. 본 발명에 있어서의 회석된 혈액 검체를 수용하기 위한 수용 기구는, 도 1의 구성에 있어서는, 채혈 용기(2)와 통체(3)의 조합에 대응한다. 즉, 회석된 혈액 검체를 수용하기 위한 수용 기구는 1개여도 되고 2개 이상의 조합이어도 된다.

- [0114] 채혈 용기(2)는 투명한 재질로 만들어져 원통형을 이루고, 그 상단부에는, 외면에 나사부(8)가 형성되며, 내면에 계지부(9)가 돌출되어 마련되어 있다. 또, 채혈 용기(2)의 하단부에는, 역원뿔형의 바닥부(10)가 형성되고, 바닥부(10)의 주위에 원통형의 다리부(11)가 형성되어 있다. 다리부(11)는, 혈액의 분석 검사 시에 사용하는 샘플 플 컵과 동일 외경을 갖고 있으며, 바람직하게는, 그 하단의 대향하는 위치에 각각 연직 방향으로 슬릿 홈(12)이 형성되어 있다. 또한 채혈 용기(2) 내에는, 도 1에 나타나 있는 바와 같이, 소요량, 예를 들면 500mm^3 의 희석액(13)이 미리 들어 있어도 된다.
- [0115] 통체(3)는 투명한 재질로 만들어져 원통형을 이루고, 그 상단부에는 확경부(14)가 형성되어 있다. 확경부(14)는 박육부(薄肉部)(15)를 통하여 본체부(16)와 접속되어 있다. 통체(3)의 하단부에는, 축경부(18)가 형성되고, 축경부(18)의 내면에는 계지 돌기부(19)가 형성되어 있다. 또한 축경부(18)의 하단부에는 외측 플랜지부(20)(지지 기구)가 형성되고, 외측 플랜지부(20)의 하단 개구부는 여과막(21)(분리 기구)에 의하여 덮이며, 여과막(21)은 혈액 중의 혈장의 통과를 허용하고, 혈구의 통과를 저지하도록 되어 있다.
- [0116] 축경부(18)의 외주에는 실리콘 고무제의 커버(22)가 장착되어 있다(도 1).
- [0117] 캡 피스톤(4)은, 대략 원통형의 파지부(26)와, 파지부(26)와 동심으로 하방으로 뻗는 심봉부(27)로 구성되어 있다. 파지부(26)의 내측 상단부에는 통체(3)의 확경부(14)가 감합 가능한 원통형의 공간(28)이 형성되고, 또 그 하방은 나각(螺刻)되어 나사에 나사 결합 가능하게 되어 있다. 심봉부(27)는 그 하단부(29)가 편형으로 형성되고, 하단부(29)에 밀폐 덮개(5)가 착탈 가능하게 마련되어 있다(도 1 참조). 밀폐 덮개(5)는 실리콘 고무제이다.
- [0118] 혈액 검체의 희석물로부터의 혈장의 분리 회수 조작은, 구체적으로는, 다음과 같이 행한다. 희석액을 수용하는 채혈 용기(2)에, 채취한 혈액을 투입한 후, 채혈 용기(2)의 상부를 잡고 기포가 일지 않도록 주의하면서 혈액과 희석액을 충분히 흔들어 섞는다. 다음으로, 여과막(21)을 지지하는 통체(3)(혈장, 혈구 분리 시의 실린더 측으로 돌아 들어감에 따른 액 누출을 방지)를 여과막이 아래가 되도록 채혈 용기(2)에 삽입하고, 천천히 일정한 스피드로 채혈 용기(2)의 바닥면까지 여과막을 눌러 내린다. 이때, 통체(3)의 여과막을 통과하여 혈장이 상부로 올라오고, 혈구는 채혈 용기(2)의 하부에 남는다. 그 후, 캡 피스톤(4)을 통체(3)에 천천히 삽입하여, 밀폐 덮개(5)에 의하여 역류에 의한 혈장과 혈구의 혼합을 방지한다.
- [0119] 상기한 기구에 의한 혈액 분리 방법의 상세는, 일본 특허공보 제3597827호의 단락 번호 0023~0026과, 도 12 및 도 13에 기재되어 있으며, 그 내용은 본 명세서에 인용된다.
- [0120] 본 발명의 혈액 검사 키트에 포함되는 각각의 요소의 개수는 특별히 한정되지 않으며, 각각 1개여도 되고, 2개 이상의 복수여도 된다.
- [0121] 본 발명의 혈액 검사 키트에 포함되는 부재의 재료는, 내파손성, 위생면, 가격 등의 관점에서, 합성 수지인 것이 바람직하다. 예를 들면, 폴리에틸렌, 폴리프로필렌, 폴리염화 바이닐, 폴리염화 바이닐리덴, 폴리스타이렌, 폴리아세트산 바이닐, 폴리우레테인, 폴리에틸렌테레프탈레이트, 폴리락트산, 아크릴로나이트릴뷰타다이엔스타이렌 수지(ABS 수지), 아크릴로나이트릴스타이렌 수지(AS 수지), 아크릴 수지(PMMA), 폴리카보네이트, 실리콘 수지 등을 들 수 있다.
- [0122] 본 발명의 혈액 검사 키트는, 다양한 부재의 전부를, 수납 용기에 수납한 형태로서 제공할 수 있다.
- [0123] [2] 키트 및 부재의 제조 방법
- [0124] 본 발명은 또, 상술한 키트 및 부재의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 제조 방법은, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 제거하는 데에 유효한 조건으로 부재를 세정하는 공정을 포함한다.
- [0125] [부재의 세정 공정]
- [0126] 본 발명의 혈액 검사 키트에 사용되는 부재는, 플라스틱, 유리 또는 고무로 소재로 하고 있지만, 본 발명자들은, 이와 같은 부재로부터 용출될 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분을, 부재의 제조 공정을 포함하는 혈액 검사 키트의 제조 공정에 있어서, 소정의 방법에 의하여 유효하게 제거할 수 있는 것을 발견했다.
- [0127] 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분을 제거하는 데에 유효한 조건은, 구체적으로는, 대상 부재를, 전기 전도도가 $1\mu\text{S}/\text{cm}$ 이하인 순수로 세정하는 공정, 바람직하게는 대상 부재에, 전기 전도도가 $1\mu\text{S}/\text{cm}$ 이하인 순수를 샤워 형태로 분사하는 공정이다. 이와 같은 공정에 의하여 충분히 세정함으로써 용출 농도를 희석액에 대하여 0.5중량% 이하로 낮출 수 있는 것을 본 발명자들은 발견했다.

- [0128] 또한, 부재 세정의 관점에서, 혈액 중에 항상적으로 존재하는 표준 성분은, 미량의 혈액 중에 높은 농도로 존재하는 나트륨 이온 또는 염화물 이온인 것이 바람직하다. 예를 들면, 나트륨 이온에 대하여, 평균값으로 15분의 1인 칼슘 이온, 혹은 80분의 1인 마그네슘 이온으로부터, 나트륨 이온 또는 염화물 이온을 분석상 문제없는 레벨까지로 제거하는 것은 용이하다. 칼슘 이온 또는 마그네슘 이온을 제거하기 위해서는, 고레벨 순수(예를 들면, $0.1 \mu\text{S/cm}$ 이하), 또는 초순수($0.06 \mu\text{S/cm}$ 이하)로 세정하면 되는데, 비용적으로는 불리하다.
- [0129] [3] 그 외
- [0130] 본 발명은 또, 본 명세서의 상기 [1]에서 설명한 구성의 키트를 이용한 혈액 분석 방법을 제공한다. 혈액 분석 방법은, 인간에 대한 의료 행위(의사가 행하는 행위)인 양태와 인간에 대한 의료 행위가 아닌 양태(예를 들면, 채혈자가 환자 자신이며, 또한 분석자가 의사 이외의 사람인 양태, 비인간 동물에 대한 양태 등)가 포함된다. 본 발명의 혈액 분석 방법은, 대상자 자신이 혈액을 채취하는 자기 채혈로 실시해도 되고, 의사 등의 유자격자가 주사기를 사용하여 혈액을 채취하는 일반 채혈에 있어서도 실시해도 된다. 바람직한 양태로서는, 환자 본인 이, 랜셋 등의 나이프가 장착된 기구를 이용하여 손가락 끝 등에 상처를 입혀 피부 밖으로 배어 나온 혈액을 채취한다.
- [0131] 본 발명의 키트를 이용한 분석의 대상이 되는 생체 시료는 혈액이며, 혈액이란, 혈청 또는 혈장을 포함하는 개념이다. 혈액의 기원은 인간에 한정되지 않고, 인간 이외의 동물(비인간 동물)인 포유류, 조류, 어류 등이어도 된다. 인간 이외의 동물로서는, 예를 들면 말, 소, 돼지, 양, 염소, 개, 고양이, 마우스, 곰, 팬더 등을 들 수 있다. 바람직하게는, 생체 시료의 기원은 인간이다.
- [0132] 본 발명의 키트를 이용하여 분석을 행하는 경우, 분석의 대상 성분은 한정되지 않고, 혈액 중에 포함되는 모든 물질이 대상이 된다. 예를 들면 임상 진단에 이용되는 혈액 중의 생화학 검사 항목, 종양 마커나 간염 마커 등 각종 질환의 마커 등을 들 수 있고, 단백질, 당, 지질, 저분자 화합물 등을 들 수 있다. 또, 측정은 물질 농도 뿐만 아니라, 효소 등의 활성을 갖는 물질의 활성도 대상이 된다. 각 대상 성분의 분석은, 공지된 방법으로 행할 수 있다.
- [0133] 실시예
- [0134] 이하, 본 발명의 실시예 및 비교예에 대하여 설명한다.
- [0135] 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분인 나트륨 이온을 표준 물질로 하고, 나트륨 이온 농도의 평균값을 142mmol/L 로 하면, 혈액 검체를 희석액으로 희석시켜, 분리 회수한 혈장 중에 존재하는 나트륨 이온의 평균값을 산출할 수 있다. 한편, 부재에서 유래하는 희석액 중의 나트륨 이온량(혈액 유래가 아닌 나트륨 이온량, 즉 컨테미네이션 성분)이, 혈장 중의 나트륨 이온량의 $\pm 2\%$ 이하이면, 희석 배율의 산출을 고정밀도로 유지할 수 있는 것을 알 수 있으므로, 희석액을 $300 \mu\text{L}$ 로 하여, 희석 배율이 3~25배인 범위에 있어서, 희석액에 대한 나트륨 이온의 허용 용출 농도(희석액에 대한 중량%)를 산출했다. 결과를 도 2에 나타낸다.
- [0136] 예를 들면, 희석 배율 5배에 있어서는, 희석액 중의 부재에서 유래하는 나트륨 이온의 허용 농도는 1.7질량%, 즉 희석액 $360 \mu\text{L}$ 에 대하여 나트륨 이온의 허용 용출량은 $\pm 6.1 \mu\text{g}$ 이며, 또 희석 배율 20배에 있어서는, 희석액에 대한 나트륨 이온의 허용 용출 농도는 0.35질량%, 즉 희석액 $360 \mu\text{L}$ 에 대하여, $\pm 1.3 \mu\text{g}$ 이 되고, 희석 배율이 높아짐에 따라, 급격하게 희석액으로 용출되는 나트륨 이온의 허용 용출량이 엄격해져, 보다 적은 희석액의 용출량이 컨테미네이션으로서, 희석 배율의 정밀도를 저하시키는 것을 알 수 있다.
- [0137] (참고예 1)
- [0138] 1. 부재의 세정과 희석액의 조제
- [0139] 데메칼 혈액 검사 키트(가부시키가이샤 레저사)를 이용했다. 그때, 혈액 검사 키트의 부재인 보틀(희석액을 수용하기 위한 제1 수용 기구), 필터(희석액으로 희석된 혈액 검체로부터 혈장을 분리 회수하기 위한 분리 기구), 개스킷(분리 기구를 지지하기 위한 지지 기구)을, 세정하지 않음, 수돗물 세정, 증류수 세정, 순수 세정(전기 전도도 $1 \mu\text{S/cm}$)을 사전에 실시했다. 그리고, 하기와 같이 조제한 희석액-1의 $360 \mu\text{L}$ 를 보틀에 넣고, 개스킷으로 지지된 필터를 보틀에 밀어 넣어 희석액을 여과하여, 필터를 통과한 액의 나트륨 이온량을 측정했다. 또한 세정은, 물을 부재에 샤워 형태로 분사함으로써 행했다.
- [0140] (희석액 조성)
- [0141] 희석액을 이하의 조성으로 조제했다. 침투압은, OSMOATAT OM-6040(아크레이(주)사제)을 이용하여 측정한 값을

표시했다. 침투압의 단위는, 용액의 물 1kg이 갖는 침투압으로, 이온의 밀리몰수를 나타낸다.

- [0142] HEPES 50mmol/L
- [0143] 2-아미노-2-메틸-1-프로판올(AMP) 50mmol/L
- [0144] D-만니톨 284mmol/L
- [0145] 염화 리튬 1mmol/L
- [0146] EDTA-2K 0.8mmol/L
- [0147] PALP(피리독살인산) 0.05mmol/L
- [0148] 싸이아벤다졸 0.0001질량%
- [0149] 아미카신 황산염 0.0003질량%
- [0150] 황산 카나마이신 0.0005질량%
- [0151] 메로페넴 삼수화물 0.0005질량%
- [0152] 침투압 355mOsm/kg
- [0153] pH 7.4
- [0154] 2. 나트륨 농도의 측정
- [0155] 1.에서 조제한 각각의 희석액에 대하여, 나트륨 농도의 측정을 행했다. 측정에는, β -갈락토시다제가 나트륨으로 활성화되는 것을 이용하여, 각각의 희석액 중의 나트륨 농도와 β -갈락토시다제 활성이 비례 관계에 있는 것을 이용한 효소 활성법에 의하여 측정했다. 구체적으로는, 나트륨 이온을 포함하지 않는 정제수로 혈액의 희석액을 5배 희석시킨 후, 3 μ L를 칭량하여 하기와 같이 조제한 제1 시약 52 μ L를 첨가하여, 37℃에서 5분간 가온하고, 하기와 같이 조제한 제2 시약을 26 μ L 첨가하여, 1분간의 흡광도의 변화를 JCA-BM6050형 생화학 자동 분석 장치(니혼 덴시(주)사제)를 이용하여 주파장 410nm, 부파장 658nm로 흡광도를 측정함으로써 구했다. 미리 작성한 검량선으로부터, 나트륨의 농도를 측정했다.
- [0156] (나트륨 측정 시약의 조제)
- [0157] 이하의 조성의 나트륨 측정 시약을 조제했다.
- [0158] 제1 시약
- [0159] HEPES · LiOH(pH8.0) 100mmol/L
- [0160] D-만니톨 60mmol/L
- [0161] N-아세틸시스테인 30mmol/L
- [0162] 황산 마그네슘 1.52mmol/L
- [0163] β -갈락토시다제 1.1kU/L
- [0164] TritonX-100 0.05질량%
- [0165] 제2 시약
- [0166] HEPES · LiOH(pH8.0) 100mmol/L
- [0167] o-Nitrophenyl- β -D-Galactopyranoside 15mmol/L
- [0168] 각종 세정에 있어서의 분리 후의 상등액을 5개씩 제작한, 희석액 중으로 용출되는 Na 이온 농도의 평균값과, 편차의 척도인 변동 계수 CV(coefficient of variation)(%)를 구했다. 결과를 표 1에 나타냈다.

[0169] [표 1]

세정 방법	희석액-1 (μL)	희석액에 대한 용출 Na 이온 농도의 평균값 (중량%)	희석액에 대한 용출 Na 이온 농도의 CV(%)	비고
순수 세정	360	0.14	2.4	실시에
중류수 세정	360	2.1	2.5	비교예
수돗물 세정	360	4.3	2.2	비교예
세정하지 않음	360	4.3	3.3	비교예

[0170]

[0171] 도 2에 혈액 검사 키트의 부재(보틀, 개스킷, 필터)의 순수 세정 및, 수돗물 세정에 있어서의 희석액으로 용출되는 나트륨 이온의 희석액에 대한 농도 레벨을 점선으로 기입했다.

[0172] 도 2 및 표 1의 결과로부터, 혈액 중에 존재하는 항상성이 있는 성분인 나트륨 이온을 표준 물질로 이용한 경우에 있어서, 혈액 검사 키트의 부재인 보틀, 개스킷, 필터를 사전에 순수 세정해 둬으로써, 희석액으로 용출되는 나트륨의 희석액에 대한 농도를 평균값으로 0.14중량% 정도로 저하시킬 수 있고, 높은 희석 배율까지의 넓은 범위에 있어서, 고정밀도의 희석 배율을 산출하기 위한 희석액에 대한 나트륨 이온의 허용 용출 농도를 충분히 클리어할 수 있는 것을 알 수 있었다. 실험에서는, 나트륨 이온을 실질적으로 포함하지 않는 희석액에 포함되는 리튬 이온을 표준 물질로서 실시했지만, 리튬 이온의 유무에 상관없이, 실질적으로 나트륨 이온을 포함하지 않으면, 동일한 결론을 얻는 것은 당연하다.

[0173] (실시에 1)

[0174] (희석액 중의 리튬 이온의 측정)

[0175] 참고예 1에서 조제한 각각의 희석액에 대하여, 리튬 이온 농도를 이하와 같이 측정했다.

[0176] 희석액에 첨가한 리튬 이온의 측정은, 킬레이트 비색법(할로젠화 포피린 킬레이트법: perfluoro-5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphyrin)에 의하여 행했다. 구체적으로는, 리튬 이온을 포함하지 않는 정제수를 이용하여 혈액의 희석액을 4.5배로 희석시킨 후, $5\mu\text{L}$ 를 칭량하여 하기와 같이 조제한 제3 시약 $55\mu\text{L}$ 를 첨가하여, 37°C 에서 10분간 가온하고, JCA-BM6050형 생화학 자동 분석 장치(니혼 덴시(주)사제)를 사용하여, 주파장 545nm , 부파장 596nm 로 흡광도를 측정함으로써 구했다. 미리 작성한 검량선으로부터, 리튬 이온의 농도를 측정 가능하다.

[0177] (리튬 이온용 측정 시약의 조제)

[0178] 이하의 조성의 리튬 이온 측정 시약을 조제했다.

[0179] 제3 시약

[0180] Perfluoro-5,10,15,20-tetraphenyl-21H,23H-porphyrin 0.05질량%

[0181] 다이메틸설폭사이드 5질량%

[0182] 트라이에탄올아민 2질량%

[0183] 폴리에틸렌글라이콜-t-옥틸페닐에터 2질량%

[0184] 도데실 황산 나트륨 2질량%

[0185] 혈액 혈장의 희석 배율을 구하는 방법과 계산식을 이하에 나타낸다.

[0186] A: 완충액을 발색시켰을 때의 흡광도

[0187] B: 혈장 첨가 후의 흡광도 변화량

[0188] C: 혈장 나트륨 중앙값 142mmol/L 의 흡광도

[0189] D: 혈장 희석 후의 나트륨 농도에 있어서의 흡광도

[0190] X: 혈장 희석 배수

[0191] 혈장의 완충액에 의한 희석 배수는 하기의 (1) 식의 관계를 이용했다.

- [0192] [수학식 3]
- [0193]
$$X = [\{(A/B)^2 + (C/D)^2\} / 2]^{1/2} \quad (1)$$
- [0194] 상기의 (1) 식과 같이, 회석액 중에 존재하는 내부 표준 물질의 리튬 이온의 회석액의 정보와, 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분으로서, 나트륨 이온의 정보의 제공함의 제공근을 구함으로써, 내부 표준 물질과 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 양쪽 모두의 정보로부터, 회석률을 구하는 것이 가능하며, 혈액에 항상적으로 존재하는 표준 성분의 용출량을 규정한 키트를 이용함으로써, 높은 정밀도로 회석률의 측정이 가능해지는 것을 알 수 있다.
- [0195] (실시예 2)
- [0196] 지원한 환자에게, 사전 동의를 얻은 후에 정맥으로부터 주사기로 채취한 혈액량 10 μ L를 스핀지로 회수하고, 참고예 1과 마찬가지로, 순수 세정을 사전에 실시한 보틀, 필터, 개스킷을 이용한 키트를 사용하여 준비한 회석액에 스핀지로 회수한 혈액을 혼합하여, 필터로 혈구를 분리했다. 이와 같이 하여 얻은 혈구 분리 후의 회석 혈장에 대하여, 참고예 1과 동일하게 하여 나트륨 이온의 농도를 측정했다. 또, 동일한 회석 혈장에 대하여, 하기에 나타내는 방법에 의하여, 총 단백질 농도를 측정했다.
- [0197] (회석 혈장 중의 총 단백질 농도의 측정)
- [0198] 뷰렛법을 측정 원리로 하는 측정을 행했다. 뷰렛 시약: 3.0mmol/L, 황산 구리 400 μ L, 타타르산 칼륨나트륨 21.3mmol/L, NaOH 0.75mmol/L를 준비하여, 회석 혈장과 혼합했다. 혼합 후, 37℃에서 10분간 방치하여, 알칼리성하에서 혈장 중의 단백질과 구리 이온에 의한 540~560nm의 청자색을 나타내는 착체가 형성될 때까지 대기하여, 545nm로 흡광도를 측정하고, 표준 용액의 흡광도로부터 얻은 검량선을 이용하여 혈구 분리 후의 회석 혈장 중의 총 단백질 농도를 정량했다.
- [0199] 상기와 같이 측정한, 나트륨 이온 농도, 총 단백질 농도의 측정값과, 항상적으로 혈장 중에 존재하는 나트륨 이온 농도, 총 단백질 농도의 표준 성분의 농도로부터, 각각 혈장의 회석 배율을 산출한바, 일치된 회석 배율이 얻어졌다. 따라서, 나트륨 이온 농도에 더하여, 나트륨 이온과는 다른 적어도 1종류의 항상성 물질을 이용하여 회석 배율을 구함으로써, 부재에서 유래하는 표준 성분의 양을 규정한 혈액 검체 중의 대상 성분의 농도의 분석이 정상적으로 행해지고 있는 것을 알 수 있으며, 측정 결과의 검증을 가능하다는 것을 알 수 있었다.

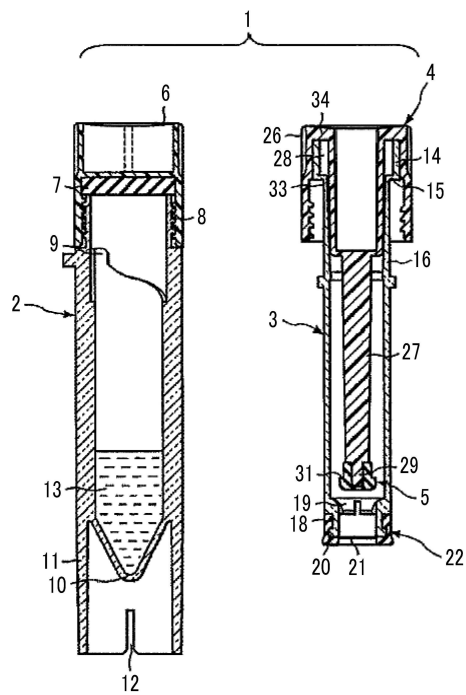
부호의 설명

- [0200] 1 혈액 분리 기구
- 2 채혈 용기
- 3 통체
- 4 캡 피스톤
- 5 밀폐 덮개
- 6 캡
- 7 패킹
- 8 나사부
- 9 지지부
- 10 바닥부
- 11 다리부
- 12 슬릿 홈
- 13 회석액
- 14 환경부
- 15 박육부

- 16 본체부
- 18 측경부
- 19 계지 돌기부
- 20 외측 플랜지부
- 21 여과막
- 22 커버
- 26 파지부
- 27 심봉부
- 28 공간
- 29 하단부
- 31 단차부
- 33 상단부
- 34 정상부

도면

도면1



도면2

