

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2010-522336
(P2010-522336A)

(43) 公表日 平成22年7月1日(2010.7.1)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/543 (2006.01)	GO 1 N 33/543 5 8 7	2 G O 5 4
GO 1 N 33/545 (2006.01)	GO 1 N 33/545 B	4 B O 6 3
GO 1 N 33/53 (2006.01)	GO 1 N 33/53 X	
GO 1 N 21/78 (2006.01)	GO 1 N 33/53 S	
C 1 2 Q 1/26 (2006.01)	GO 1 N 21/78 Z	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 17 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2010-500366 (P2010-500366)
 (86) (22) 出願日 平成20年3月20日 (2008.3.20)
 (85) 翻訳文提出日 平成21年11月12日 (2009.11.12)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2008/050204
 (87) 国際公開番号 W02008/114060
 (87) 国際公開日 平成20年9月25日 (2008.9.25)
 (31) 優先権主張番号 0705495.0
 (32) 優先日 平成19年3月22日 (2007.3.22)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 508293977
 クオシエント ダイアグノスティックス
 リミテッド
 イギリス国 サリー ケーティー 1 2 3
 ビーイー, ウォルトン オン テームズ
 , モレジー ロード, ラッセル ハウ
 ス, ユニット 3 ビー, ファースト
 フロア
 (74) 代理人 100097319
 弁理士 狩野 彰
 (72) 発明者 ベッシー, ジョン フィリップ
 イギリス国 サリー ケーティー 2 4 5
 ビーティー, イースト ホースリー,
 フォレスト ロード, “カンナ”

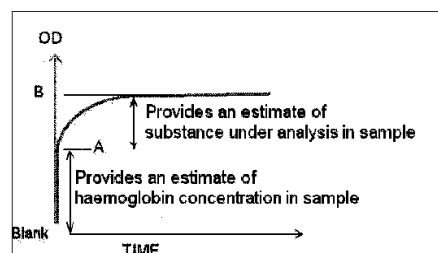
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 全血分析

(57) 【要約】

全血試料の血漿成分中の目標物質(たとえば、コレステロールまたはCRP)の濃度を評価する方法と装置。ここでは、試験に先立って血漿から赤血球を分離する必要がなく、したがって試験装置の設計と構造が簡単になる。本発明は、これを、調べる分析物を時間依存(生化学/免疫化学)反応によって測定し、また別に赤血球容積の評価のためにマーカー物質(たとえば、ヘモグロビン)を測定することによって、実現する。後者においては、試料添加に及ぼす固有フィルター効果に帰される反応混合物の物理的性質(この場合、透過率)の非時間依存変化を使用する。これらの非時間依存変化は、反応化学現象の一部ではなく、連続的測定と数学的モデル化により、分析のための化学的現象によって引き起こされる物理的性質の時間依存変化から分離される。これらの二つのパラメータを組み合わせるアルゴリズムを使用することにより、目標物質の量を評価することができ、試料の%赤血球容積率の変化を補正することができる。本発明の方法は、患者試料の複雑な変化(たとえば、赤血球容積率)に即応すべき分析を一律に実施することを可能にするもので

Figure 1



【特許請求の範囲】

【請求項1】

全血試料に含まれる物質を分析する方法であって、

(a) 全血試料中の分析物と特異試薬との間の溶液中での反応を実施し、このとき前記試料を時刻 t_0 において前記試薬と混合し、

(b) 反応の進行中、前記溶液の透過率を適当な波長で連続モニターし、

(c) 検出された透過率値から、試料の添加前の反応溶液の透過率 T_{init} を記録し、試料を添加したあとの時刻 t_0 における透過率 T_0 と時刻 t の透過率 T を計算し、ここで t はすべての分析物が試薬と反応した時刻、または平衡が実現された時刻であり、

(d) T_{init} と T_0 の値から、血液添加後の試料の光学濃度、したがってその試料に含まれているヘモグロビンの量を計算し、

(e) T_0 と T の値から、ステップ(a)の反応に帰される透過率の変化を計算し、

(f) これらの測定値の関係から、赤血球容積率変動に関して補正した試料中の分析物の濃度を導出すること、

から成ることを特徴とする方法。

【請求項2】

ステップ(a)における反応が免疫比濁分析のための反応であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

当該試薬が粒子に結合した分析物に特異的な抗体を含むことを特徴とする請求項2に記載の方法。

【請求項4】

当該粒子がラテックスビーズであることを特徴とする請求項3に記載の方法。

【請求項5】

当該分析物がC反応性タンパク質であることを特徴とする請求項1から4の中のいずれか一つに記載の方法。

【請求項6】

ステップ(a)における反応が比色分析のための反応であることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項7】

当該試薬が、着色終点を生じる一連の酵素駆動関連反応を生じる酵素を含むことを特徴とする請求項6に記載の方法。

【請求項8】

当該分析物がコレステロールであることを特徴とする請求項6または7に記載の方法。

【請求項9】

当該試薬がコレステロールオキシダーゼとコレステロールエステラーゼのうち一つまたは両方を含むことを特徴とする請求項6から8の中のいずれか一つに記載の方法。

【請求項10】

ステップ(f)におけるアルゴリズムが、 $y=ax^2+bx+c$ の形のものであり、ここで、 a 、 b および c が検量定数であり、 y が $\log[(T_0-T)/T_0]$ の計算から得られる分析物の測定値であり、 x が $\log[(T_{init}-T_0)/T_{init}]$ の計算から得られるヘモグロビンの測定値であることを特徴とする請求項1から9の中のいずれか一つに記載の方法。

【請求項11】

T_0 が、反応速度式にもとづく、透過率データの時間経過にあてはめた曲線の逆外挿によって決定されることを特徴とする請求項1から10の中のいずれか一つに記載の方法。

【請求項12】

T が、データ収集時間を越える、当該あてはめ曲線の順外挿によって決定されることを特徴とする請求項1から11の中のいずれか一つに記載の方法。

【請求項13】

当該外挿が、検出透過率データを時間に対してプロットし、プロットされた点に対する

10

20

30

40

50

最適あてはめ曲線を使用することを含むことを特徴とする請求項11または12に記載の方法。

【請求項14】

当該プロットが、データに対する最適あてはめ曲線に関数をあてはめ、この関数を時刻 t_0 と t に外挿することによって、実行されることを特徴とする請求項13に記載の方法。

【請求項15】

透過率データが記録される時間が3分以内であることを特徴とする請求項1から14の中のいずれか一つに記載の方法。

【請求項16】

ステップ(a)において試料が試薬と混合される前に、試料だけが、波長 λ_n の入射電磁波によって励起され、ここで、波長 λ_n がヘモグロビンと反応との両方を検出することができ、選択された波長周波数において生成初期透過率 (T_{init}) が検出されることを特徴とする請求項1から15の中のいずれか一つに記載の方法。

10

【請求項17】

T_0 値とともに T_{init} を使用し、 $ZOD = \text{Log}[T_{init}/T_0]$ により、ゼロ光学濃度 (ZOD) を計算することができることを特徴とする請求項16に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、全血試料に含まれる物質の分析を実施する方法に関する。

20

【背景技術】

【0002】

イギリス特許出願第0606450.5号明細書には、蛍光消光により糖化タンパク質の分析を行うことが記載されている。この方法と装置においては、蛍光分析に際して、分析化学現象によって生じる時間依存変化とは別に、固有のフィルター効果に帰される非時間依存変化を別に評価することにより、非蛍光物質(たとえば、ヘモグロビン)の濃度を評価する(ヘモグロビン-A1cを測定する)。このような方法は、個別の光度計その他の測定の必要をなくし、したがって方法とそれに使用する装備とを単純化するものである。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0003】

本発明は、前記方法を、必ずしも蛍光分析によらない他の物質の測定に応用しようというものである。本発明の方法においては、発生する信号(たとえば、透過信号)を連続的にモニターし、この信号を、反応している物質の測定に使用するだけでなく、添加試料の初期量を測定して補正するためにも使用する。

【0004】

先行技術は、ある範囲内の物質量を分析することを含む。このとき、特定の化学反応現象の時間経過を光度測定によって追跡する。この追跡は、たとえば、微小ラテックス粒子上に付着した分析物に特異的な抗体を使用し、測定分析物が、分析物/抗原と抗体の反応が進行するときにラテックス粒子の凝集を促進する場合に、生成される濁りの増大を測定することによる。この濁り増大の測定は、通常光度計を使用し、また光度測定の原理を使用することにより、達成できる。そのような濃度依存濁りを、基準試料によって生成される濁りと比較する。これは、確立された先行技術である。

40

【0005】

さらに、この方法に含まれる手法は、溶液中で一連の酵素関連反応(enzyme-linked reaction)を実施することである。この場合、全血試料の血漿の分析物は、最終的に無色反応成分から着色色素が生成される酵素促進反応によって、変化する。着色は時間依存進行し、光度計によって測定される。この色変化の測定は、通常光度計により、光度測定の原理を使用して、実施することができる。次に、そのような濃度依存透過率変化を基準試料によって生じる変化と比較する。このやり方も確立された先行技術である。

50

【0006】

全血試料の場合、血漿成分内に存在する物質を分析するとき、考慮しなければならないパラメータがある。それは、全血試料の容積に対する赤血球の割合または赤血球容積率であり、この値は、年齢、気候、栄養、病気の状態およびその他の要因によって大きく変化する。たとえば、40%赤血球容積率というのは、その全血容積において、容積の40%が赤血球によって占められ、60%が血漿である、ということである。患者の血液の赤血球容積率が大きくなると、試験装置に投入される一定容積試料中の血漿の容積が減少し、その逆も起こる。測定される分析物を含有するのは血漿成分だけであるから、反応混合物に添加される血漿成分の容積が小さくなると、反応混合物内の測定される物質の濃度は小さくなり、したがって得られる分析値もそうなり、この逆も起こる。

10

【0007】

全血中の血漿物質の濃度を与える分析は、どんなものでも、赤血球容積率の変化に応じて補正して真の血漿濃度を得るようにしなければならない。そのため、そのような分析は、通常、あらかじめ濾過または遠心分離によって赤血球を分離した血清または血漿に関して実施される。治療、医院またはクリニックの計画に当たって、小容積の全血試料を濾過または他の機械的操作によって血漿成分から分離するが、これはシステムの設計の複雑さに当たって費用を増すものである。

【0008】

これらの状況においてもっとも有力なのは二つの物質を測定することであり、これらの物質のうち一つは調べる分析物であり、他の一つは試料の赤血球容積率を評価または標準化するためのマーカーと見なされるものである。

20

【0009】

公知のように、赤血球を溶解させたあとの、全血のヘモグロビン濃度は、全血試料中の赤血球容積に比例する。

【0010】

ヘモグロビン濃度は、光度計を用いて、いろいろな波長での公知のやり方または前記各種化学反応現象(濁りまたは酵素触媒色生成)によって、評価することができる。必要な初期ブランク測定の後、二つの分析化学現象(色生成または濁りの発達)とヘモグロビンとが測定できる可視スペクトル内のある点で、試料透過率を連続的に測定する装置は、イギリス特許出願0606450.5号明細書に記載されているアルゴリズムの使用により、初期透過率の評価を行い、それから、分析物の化学反応現象の進行の前に、ヘモグロビン濃度の評価を行うことができる(というのは、この効果は瞬間的であり、化学反応には依存しないからである)。また、同じアルゴリズムにより、最終透過率の測定をも行う。この最終透過率は、示差分析により、調べている分析物によって進行している時間依存の化学現象を明らかにするものである。これらの二つの評価値の間関係を計算するアルゴリズムは、赤血球容積率の変化によって変化しない血漿値の決定に使用することができる。

30

【課題を解決するための手段】

【0011】

本発明の第一の側面においては、
 全血試料に含まれる物質を分析する方法であって、
 (a) 全血試料中の分析物と特異試薬との間の溶液中での反応を実施し、このとき前記試料を時刻 t_0 において前記試薬と混合し、
 (b) 反応の進行中、前記溶液の透過率を適当な波長で連続モニターし、
 (c) 検出された透過率値から、試料の添加前の反応溶液の透過率 T_{init} を記録し、試料を添加したあとの時刻 t_0 における透過率 T_0 と時刻 t の透過率 T を計算し、ここで t はすべての分析物が試薬と反応した時刻、または平衡が実現された時刻であり、
 (d) T_{init} と T_0 の値から、血液添加後の試料の光学濃度、したがってその試料に含まれているヘモグロビンの量を計算し、
 (e) T_0 と T の値から、ステップ(a)の反応に帰される透過率の変化を計算し、
 (f) これらの測定値の間関係から、赤血球容積率変動に関して補正した試料中の分析

40

50

物の濃度を導出すること、
から成ることを特徴とする方法、
が提供される。

【0012】

現在のところ意図される本発明の主要用途は、全血中の血漿分析物の分析である。

以下、免疫比濁分析(immunoturbidimetric method)による分析物たとえばC反応性タンパク質(CRP)の測定、または一連の酵素駆動関連反応(enzyme driven linked reaction)によって着色終点を生成する別の反応物たとえばコレステロールに適用される原理を示す二つの実施例について説明する。

【0013】

免疫比濁分析に関する実施例の場合、好ましくはCRPに対する抗体が粒子たとえばラテックスビーズに結合され、この粒子は、抗体と分析物との反応が進行すると、凝集する。

【0014】

一連の酵素駆動関連反応の場合、好ましくは、必須の酵素は測定される物質に特異的なものであり、たとえばコレステロールエステラーゼおよびコレステロールオキシダーゼである。

【0015】

ステップ(f)における T_0 と T の測定値から導かれる関係は、好ましくは、

$$y = ax^2 + bx + c$$

の形のアルゴリズムの使用によって導かれ、ここで、 a 、 b および c は検量定数であり、 y は分析物の測定値から導かれる値たとえば $\log[(T_0 - T)/T_0]$ であり、 x はヘモグロビンの測定値から導かれる値たとえば $\log[(T_{init} - T_0)/T_{init}]$ である。

【0016】

血液が装置によって試薬に添加されて混合される完全自動化装置システムの場合、化学反応現象が進行するときに検出できる最初の透過率点は、血液添加と混合後、約5秒以内に測定できるであろう。しかし、非自動化システムの場合、初期結合反応のモニターはもっと遅れる。それは、作業者が、試薬を含む反応キュベットに血液試料を手操作で添加し、混合してから、光度計の反応キュベットに戻すのに必要なある程度の長さの時間のためである。したがって、血液試料の添加直後の t_0 における実際の透過率レベルは、手動および自動どちらのシステムにおいても直接には測定できない。

【0017】

これを克服するために、時刻 t_0 、すなわち試料が添加されて混合された直後であるがまだ反応が起こっていない時刻、における透過率レベル T_0 は、好ましくは、化学結合反応の速度式にもとづいて、透過率データの時間変化にあてはめた曲線の逆外挿によって決定される。これは、好ましくは、時間に対して検出透過率データをプロットし、プロットされた点に対して最適あてはめ曲線をあてはめることを含む。このプロットは、機械的または手操作でさえも行うことができるが、データの最適あてはめ曲線の数学的関数をあてはめて、グラフ自体の生成なしで、この関数を時刻 t_0 および t に外挿することによって、自動的または数学的に実行することができる。この曲線あてはめは、任意の適当な数学的方法によって実行できるが、以下で、方法の一例を説明する。これらの方式により、記録データを使用して、分散を最小に抑えてから、曲線を外挿して、 T_0 の値が得られる。

【0018】

さらに、データ収集時間を越えて、このあてはめ曲線を順外挿することにより、時間 t すなわち反応終点における透過率レベル T も決定される。このやり方での t_0 および t の透過率レベルの決定により、信頼性の高い正確な結果が得られることがわかった。

【0019】

反応混合物の透過率が測定される時間間隔は、分析を行うのに使用するのに適当な任意のものとするができる。長時間の場合、正確な結果が得られるが、分析が遅くなる。そのため、短時間が便利であるが、結果は不正確になりうる。外挿するためのデータの量が少なくなるからである。測定時間の適当な長さは、分析される物質およびその物質の抗

10

20

30

40

50

体との反応の時間変化に依存する。容易に入手できる試薬を使用するCRP免疫比濁分析においても酵素コレステロール分析においても、通常、約3分の測定時間が適当である。やはり可能なのは、少ないデータによる結果を外挿し、反応の進行と同時にその外挿の正確さを連続的にチェックすることにより、時間を短縮することである。早期(すなわち、たとえば20~30秒程度の短時間)外挿からのデータの正確さが連続記録観察によって確認されたならば、その外挿を使用して、少ないデータと短い測定時間とから、終点と始点とにおける結果を高信頼性で予想することができる。

【0020】

好ましくは、ステップ(a)において、試料を抗体試薬と混合する前に、溶液のみを、適当な波長 λ_n (すなわち、透過率測定により、ヘモグロビンと、抗体-分析物反応によって生じる濁りまたは酵素駆動関連反応によって生じる色とが検出できる波長)の入射電磁放射によって励起し、この選択周波数において得られる初期透過率(T_{init})を検出する。これと T_0 の値とを組み合わせ、下記の式、

$$ZOD = \text{Log}[T_{init}/T_0]$$

により、ゼロ光学濃度(ZOD)を計算することができる。

【0021】

ZODは、総ヘモグロビン濃度に比例することが知られている。したがって、初期透過率の測定値を使用して、総ヘモグロビン濃度を決定することができ、この値を赤血球容積率決定に使用することができる。

【0022】

必ずしも各分析の前に T_{init} を決定する必要はない。この値は、反応キュベットおよび使用試薬の再現性に依りて標準値または定数値とすることができるからである。

【0023】

当業者には明らかなように、ここで述べる本発明の方法と装置には、本発明の範囲を逸脱することのない多くの変形を加えることができる。しかし、本発明にとって基本的なことは、測定する物理的パラメータ(蛍光、透過率、その他の物理的性質たとえば濁りのどれであれ)を、一方では、一つの物質の特異的反応によって時間依存変化するように変えることができ、また他方では、もう一つの物質によって瞬間変化したがって非時間依存変化するように変えることができる、ということである。一つの物質を測定される目標分析物とし、もう一つの物質を試料添加または試料性質による変化を補正するマーカーとすることができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0024】

以下、本発明の原理がさらに十分に理解されるように、本発明を、単なる例としての全血中のコレステロールの測定に関して、必要な場合には添付の図面を参照しつつ、詳細に説明する。

【0025】

本発明は、血液中のコレステロールの分析に使用することができる。この方法においては、適当な緩衝剤に溶解させた、一連の酵素関連反応の成分がキュベット内に投入される。血液試料の投入の前に、この試薬混合物を、光度計内で、適当な波長(510 nm)の電磁放射によって励起し、ブランク透過率(T_{init})を測定する。

【0026】

このキュベットを光度計から取り出すか、その場所に置いたまま、ただちに血液試料を添加して混合し、時間の関数として透過率を検出して記録する。このデータをプロットし、データの集合に曲線をあてはめる。図3は、そのような反応の時間変化グラフを示し、この場合、Aで示される透過率 T_{init} が、試料投入前、ゼロ秒において、記録される。この反応に関する実際の透過率実験データの時間経過が、手動システムの場合キュベットの再導入、または自動システムの場合混合のあと、適当な時間が経過するまで、記録される(通常は、1秒未満の間隔で)。逆外挿により、 t_0 における T_0 、すなわち試料が添加されたがまだ目標分析物との反応が起こっていない時刻における透過率レベル(B)が決定される。

10

20

30

40

50

同様に、順外挿(測定データの端は図3のグラフからはみ出ているので、図3には示さない)により、反応終点 t における透過率レベル T が決定される。この時点では、目標反応物との反応が完了している。

【0027】

T_0 および T の外挿評価に関して有効性が示されている多くの可能な曲線あてはめルーチンのうちで、適当な曲線あてはめルーチンは、下記の一般速度式に従うものである。

$$T_t = T_0 + (T - T_0) \times (1 - e^{-t/\tau})$$

ここで、

T_t =時刻 t 秒における透過率

T_0 =時刻0における透過率

T =無限大の時刻における透過率(すなわち、反応終点)

$e=2.71828$ (自然対数の底)

τ =速度定数

T_0 、 T および τ は、各データ点におけるあてはめ値と測定値との間の二乗分散の総和すなわち

$$\sum (T_{t\text{実際}} - T_{t\text{評価}})^2$$

が最小になるように、あてはめルーチンによって繰り返し計算することによって、決定される。

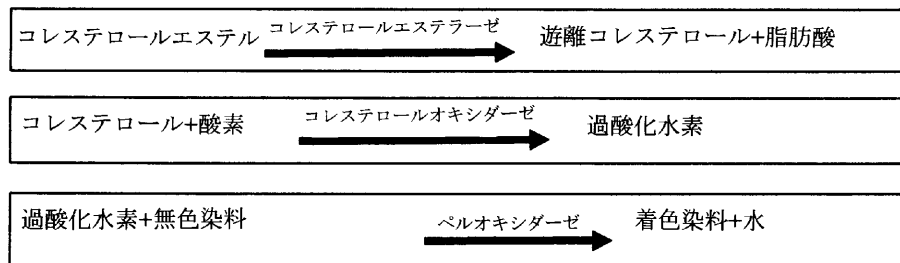
【0028】

データの数学的モデル化は、同様に使用できる他の曲線あてはめ法によっても実行できる。

【実施例】

【0029】

緩衝剤、および酵素関連反応のための酵素と反応物との混合物から成る体積既知(たとえば、2.0 ml)の試薬(下記参照)を、反応キュベットに投入した。



【0030】

この混合物を、光度計に入れて510 nmで励起した。ブランク透過率を、約5秒間、<1秒間隔で測定し、測定値を読み取った。

【0031】

血漿コレステロールレベルが既知の一定体積(5 μ L)の血液を、時刻 t_0 にキュベットに投入し、混合した。混合を停止してから、510 nmにおける透過率を3分間の反応時間にわたって測定した。混合を行い、液体の渦が消えるのにかかる時間があるため、透過率は、血液試料の添加後、約1/10秒からしか記録されない。

【0032】

ブランクおよび血液の透過率信号読み取り値の例を下記の表1に示す。

【表 1】

読み取り時刻	透過率
0.42	81679
0.79	81715
1.16	81729
1.52	81736
1.89	81731
2.26	81740
2.63	81722
2.99	81734
3.36	81729
3.73	81761
4.1	81776
4.47	81785
4.83	81779
5.2	81773

欄1	欄2	欄3	欄4	欄5	欄6	欄7	欄8	欄9
血液 添加後 の時間 (秒)	T	数学的 あてはめ 曲線	血液 添加後 の時間 (秒)	T	数学的 あてはめ 曲線	血液 添加後 の時間 (秒)	T	数学的 あてはめ 曲線
0.42		56090	60.36	49933	50023	120.29	47761	47798
1.16		55972	61.09	49901	49980	121.03	47713	47782
2.26		55799	62.2	49905	49916	122.13	47614	47759
3.36		55630	63.3	49823	49854	123.24	47600	47736
4.47		55462	64.4	49757	49793	124.34	47618	47714
5.57		55299	65.51	49683	49732	125.44	47574	47692
6.67		55138	66.61	49643	49674	126.55	47575	47670
7.41		55032	67.34	49598	49635	127.28	47552	47656
8.14		54928	68.08	49594	49597	128.02	47510	47642
9.25		54774	69.18	49525	49540	129.12	47530	47621
10.35	54801	54623	70.29	49469	49485	130.22	47520	47601
11.08	54610	54524	71.02	49452	49449	130.96	47566	47587
12.19	54594	54377	72.12	49427	49395	132.06	47652	47568
13.29	54443	54233	73.23	49413	49342	133.17	47690	47548
14.06	54352	54134	73.96	49372	49307	133.9	47755	47536
15.13	54200	53999	75.07	49296	49256	135	47781	47517
16.23	53996	53862	76.17	49296	49206	136.11	47774	47498
17.34	53869	53727	77.27	49223	49157	137.21	47754	47480
18.44	53678	53595	78.38	49181	49108	138.31	47729	47463
19.91	53449	53423	79.85	49134	49045	139.78	47688	47440
20.64	53331	53339	80.58	49087	49014	140.52	47694	47428
21.75	53242	53213	81.69	49017	48968	141.62	47690	47411
22.85	53125	53091	82.79	49028	48923	142.73	47676	47395
23.95	52990	52971	83.89	48979	48879	143.83	47608	47379
25.06	52862	52852	85.01	48916	48835	144.93	47539	47363
26.16	52736	52736	86.1	48938	48793	146.04	47457	47347
27.29	52620	52620	87.2	48945	48751	147.14	47258	47332
28	52509	52548	87.94	48871	48724	147.87	47088	47322
29.1	52405	52437	89.04	48896	48683	148.98	47030	47307
30.21	52275	52328	90.14	48874	48644	150.08	47152	47292
30.57	52252	52293	90.51	48867	48631	150.45	47218	47287
31.31	52170	52222	91.25	48835	48604	151.18	47278	47278
32.78	52016	52083	92.72	48777	48554	152.65	47313	47259
33.15	51954	52049	93.08	48775	48541	153.02	47277	47255
34.99	51684	51881	94.92	48731	48480	154.86	46858	47232
35.35	51650	51849	95.29	48740	48468	155.23	46763	47228
36.82	51545	51719	96.76	48708	48420	156.7	46498	47210
37.93	51428	51623	97.86	48600	48385	157.8	46318	47197
38.3	51405	51592	98.24	48586	48373	158.17	46304	47193
39.77	51196	51468	99.7	48508	48328	159.64	46324	47177
40.13	51140	51438	100.07	48493	48317	160.01	46370	47172
41.97	51052	51289	101.91	48376	48262	161.85	46584	47152
42.34	51056	51259	102.28	48326	48251	162.21	46638	47149
43.81	50925	51144	103.75	48292	48209	163.69	46544	47133
44.18	50903	51115	104.12	48260	48199	164.05	46487	47129
45.65	50775	51003	105.59	48302	48157	165.52	46519	47114
46.02	50673	50976	105.95	48304	48148	165.89	46544	47110
47.86	50253	50840	107.79	48278	48098	167.73	46587	47092
48.22	50203	50814	108.16	48281	48088	168.1	46549	47089
49.69	50152	50709	109.63	48247	48050	169.57	46668	47074

10

20

30

40

欄1	欄2	欄3	欄4	欄5	欄6	欄7	欄8	欄9
血液添加後の時間(秒)	T	数学的あてはめ曲線	血液添加後の時間(秒)	T	数学的あてはめ曲線	血液添加後の時間(秒)	T	数学的あてはめ曲線
50.06	50096	50684	110	48268	48040	169.94	46677	47071
51.9	49943	50557	111.84	48246	47994	171.77	46680	47054
52.27	49926	50532	112.21	48230	47985	172.14	46674	47051
53.74	50013	50434	113.68	48199	47949	173.61	46724	47038
54.11	50035	50410	114.04	48193	47940	173.98	46768	47034
55.95	50102	50292	115.88	48074	47897	175.82	46703	47018
56.31	50115	50269	116.28	48036	47888	176.19	46694	47015
57.78	50095	50178	117.72	47976	47855	177.66	46730	47003
58.15	50087	50155	118.09	47967	47846	178.03	46751	47000
59.99	49959	50044	119.93	47794	47806	179.86	46780	46985
60.36	49933	50023	120.29	47761	47798	180.23	46774	46982

10

【0033】

欄2、4、6および8は、透過率測定読み取り値である。このデータを時間に対してプロットすると、図3に示す曲線が得られる。前記の適当なアルゴリズムを用いてこれらの値に数学的に導かれる曲線をあてはめ、また、欄3、5、7および9に示す数値をも図3のグラフに示した。この試料の T_0 および T を、データをそれぞれ t_0 および t に逆および順外挿することによって導くことができる。

20

【0034】

表2は、赤血球容積率を操作して30~60%の基準範囲内にあるようにした血液試料に関する一連の同様な分析の結果を示す。

【表2】

欄1	欄2	欄3	欄4	欄5	欄6	欄7
コレステロール目標物質	赤血球容積率	ZOD	DOD	コレステロール計算値	平均	変動係数
2.2	30%	0.068	0.024	2.06	2.21	7.91%
2.2	30%	0.076	0.027	2.40		
2.2	30%	0.071	0.025	2.16		
2.2	45%	0.117	0.030	2.41	2.24	7.74%
2.2	45%	0.115	0.029	2.26		
2.2	45%	0.135	0.029	2.06		
2.2	60%	0.163	0.032	2.63	2.20	37.37%
2.2	60%	0.154	0.026	1.25		
2.2	60%	0.162	0.032	2.71		
4.9	30%	0.066	0.049	5.21	5.33	6.83%
4.9	30%	0.074	0.047	5.04		
4.9	30%	0.085	0.052	5.74		
4.9	45%	0.125	0.044	4.93	4.97	0.76%

30

40

欄1	欄2	欄3	欄4	欄5	欄6	欄7
コレステロール 目標物質	赤血球容積率	ZOD	DOD	コレステロール 計算値	平均	変動係数
4.9	45%	0.126	0.044	5.00		
4.9	45%	0.130	0.044	4.99		
4.9	60%	0.167	0.043	5.88	5.91	17.11%
4.9	60%	0.167	0.040	4.91		
4.9	60%	0.179	0.043	6.93		
8.1	30%	0.082	0.066	7.59	8.20	10.78%
8.1	30%	0.086	0.077	9.21		
8.1	30%	0.075	0.068	7.80		
8.1	45%	0.130	0.063	8.42	8.06	7.83%
8.1	45%	0.119	0.059	7.33		
8.1	45%	0.131	0.062	8.43		
8.1	60%	0.171	0.051	8.75	8.08	7.77%
8.1	60%	0.161	0.050	7.50		
8.1	60%	0.165	0.051	7.98		

10

【0035】

各試料に関して、ゼロ光学濃度(ZOD)と光学濃度(DOD)とを、下記の式により、Tフランク、 T_0 およびT から計算した。

20

$$ZOD = \text{Log}[(T\text{フランク}) / (T_0)]$$

$$DOD = [\text{Log}(T_0 / T)] - ZOD$$

【0036】

分析作業範囲内での下限と上限とにおける基準試料の赤血球容積率を変えたときの、DODとZODとの関係を示す一連のグラフが、二次曲線あてはめにより、数学的に記述される。検量定数a、bおよびc(ならびにa'、b'およびc')を、異なる赤血球容積率レベルとなるように操作した高および低血漿コレステロールのこれらの基準試料に対して定めた(二次多項式)(図5)。

【0037】

30

すると、未知試料の血漿中のコレステロール濃度を、実験で得られた値DOD未知およびZOD未知から次のように計算することができる。

1. 試料のZODから高濃度基準試料(H)に関するDODを計算する。

$$DOD_{\text{高}} = a \cdot ZOD^2 + b \cdot ZOD + c$$

2. 試料のZODから低濃度基準試料(L)に関するDODを計算する。

$$DOD_{\text{低}} = a' \cdot ZOD^2 + b' \cdot ZOD + c'$$

3. 下記の式により、未知試料の血漿コレステロール濃度を計算する。

$$[[DOD_{\text{未知}} - DOD_{\text{低}}] / [DOD_{\text{高}} - DOD_{\text{低}}] \times [H - L]] + L$$

【0038】

赤血球が存在する場合に一律にコレステロール値を決定する方法の妥当性は、高濃度および低濃度基準試料に関するコレステロール値ならびに高低両基準の大体中央の範囲内にある試料のコレステロール値を、逆に算出することによって示される。(表2;欄5、6および7ならびに図6)。

40

【0039】

これにより、導出された値が試料の赤血球容積率にほとんど影響されない、ということが示された。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】反応の大体のグラフであり、この反応においては、初期ブランク測定後の試料自身の存在に帰される光学濃度(OD)の初期増加(または、透過率減少)後の特異的反応化学現

50

象により、反応時間の経過によって、ODが増加する。

【図2】透過率の初期(すなわち、時刻ゼロにおける)低下から導かれる510 nmにおけるゼロ光学濃度(ZOD)と、添加ヘモグロビンの量(いろいろな赤血球容積率の一定体積の試料からのもの)との間の関係を示すグラフである。

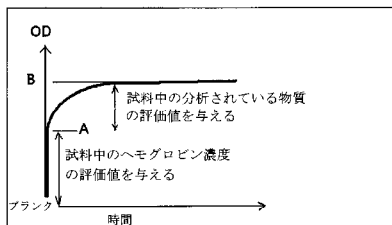
【図3】試料中のコレステロールからの溶液着色応答と無色前駆体が着色色素に変化する一連の酵素関連反応との進行時の透過率信号の時間変化のグラフである。

【図4】いろいろなコレステロール濃度の溶液における反応と血液存在下での一連のコレステロール特異性酵素関連反応における透過率低下の時間変化の総合グラフである。

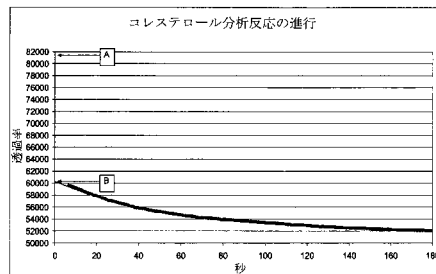
【図5】反応化学現象のOD₀とOD との間の差を示す 光学濃度(DOD)と、低(2.2 mmol/l)および高(8.1 mmol/l)標準血液試料における、ヘモグロビン(したがって、赤血球容積率)の測定値であるゼロ光学濃度(ZOD)との間の関係を示すグラフである。

【図6】コレステロール値が、分析の作業範囲全体にわたる三つの標準試料における、試料赤血球容積率によって変化するときの、当該アルゴリズムと反応化学的方法とから導かれるコレステロール値を示すグラフである。

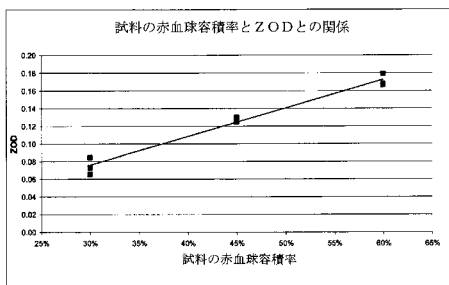
【図1】



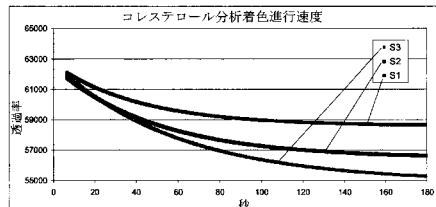
【図3】



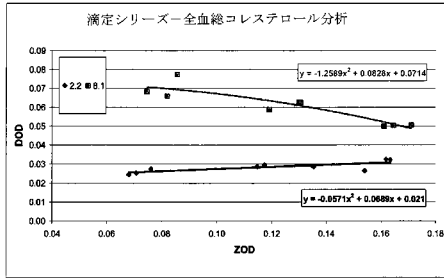
【図2】



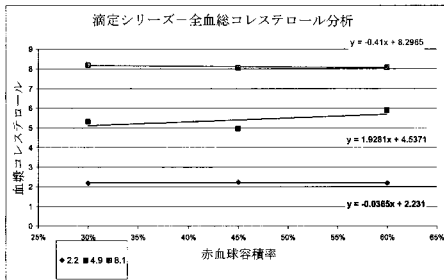
【図4】



【 図 5 】



【 図 6 】



【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No PCT/GB2008/050204
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. G01N33/487 G01N33/49 G01N33/92 G01N33/96		
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) G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used) EPO-Internal, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2006/281187 A1 (EMERY JEFFREY L [US] ET AL) 14 December 2006 (2006-12-14) paragraphs [0016] - [0029], [0036] - [0043], [0048] - [0058], [0061] - [0075], [0081] - [0084]; claims 1-34	1-17
X	EP 1 037 048 A (FUJI PHOTO FILM CO LTD [JP]) 20 September 2000 (2000-09-20) paragraphs [0011], [0014] - [0021], [0066] - [0077]; claims 1-9 ----- -/-	1-17
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
A document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *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) *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		*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 *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 *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. *&* document member of the same patent family
Date of the actual completion of the International search 1 July 2008		Date of mailing of the International search report 10/07/2008
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Boiangiu, Clara

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2008/050204

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2005/018443 A (CYGNUS THERAPEUTIC SYSTEMS [US]) 3 March 2005 (2005-03-03) page 3, line 1 - page 5, line 31 page 9, line 29 - page 10, line 27 page 25, line 1 - page 33, line 5 page 47, line 1 - page 57, line 26 page 77, line 25 - page 81, line 15 claims 1-48	1-17
Y	EP 1 486 778 A (SENS INC I [KR]) 15 December 2004 (2004-12-15) the whole document	1-17
Y	WO 2006/090154 A (AXIS SHIELD ASA [NO]; COCKBAIN JULIAN [GB]; FRANTZEN FRANK [NO]; FAARE) 31 August 2006 (2006-08-31) page 2, line 22 - page 3, line 25 page 18, line 8 - page 20, line 10 examples 2,10 claims 1-11	1-17
Y	EP 1 467 206 A (ROCHE DIAGNOSTICS GMBH [DE]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 13 October 2004 (2004-10-13) the whole document	1-17
Y	WO 01/57510 A (LIFESCAN INC [US]) 9 August 2001 (2001-08-09) the whole document	1-17
Y	WO 2006/109279 A (AGAMATRIX INC [US]; HARDING IAN [US]; WILLIAMS RICHARD [US]; IYENGAR S) 19 October 2006 (2006-10-19) the whole document	1-17
Y	US 2005/267346 A1 (FABER RALF T [US] ET AL) 1 December 2005 (2005-12-01) the whole document	1-17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2008/050204

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date	
US 2006281187	A1	14-12-2006	CA 2611891 A1 EP 1893994 A2 WO 2006138226 A2	28-12-2006 05-03-2008 28-12-2006
EP 1037048	A	20-09-2000	JP 2000262298 A	26-09-2000
WO 2005018443	A	03-03-2005	EP 1653848 A1 JP 2007533346 T KR 20060082852 A	10-05-2006 22-11-2007 19-07-2006
EP 1486778	A	15-12-2004	AT 346161 T CN 1573324 A DE 602004003288 T2 JP 4018082 B2 JP 2005003679 A KR 20040105429 A US 2005000808 A1	15-12-2006 02-02-2005 31-05-2007 05-12-2007 06-01-2005 16-12-2004 06-01-2005
WO 2006090154	A	31-08-2006	CA 2583280 A1 CN 101128738 A EP 1851550 A1	31-08-2006 20-02-2008 07-11-2007
EP 1467206	A	13-10-2004	AT 393911 T CA 2521370 A1 WO 2004090533 A1 JP 2006522923 T US 2006108236 A1	15-05-2008 21-10-2004 21-10-2004 05-10-2006 25-05-2006
WO 0157510	A	09-08-2001	AR 027345 A1 AT 313794 T AU 783311 B2 AU 3297401 A CA 2398203 A1 CN 1394280 A CZ 20021298 A3 DE 60116056 T2 DK 1252514 T3 EP 1252514 A2 ES 2254368 T3 HK 1049881 A1 IL 149662 A JP 2003521708 T MX PA02005797 A PL 358492 A1 TW 520439 B US 2002125145 A1 US 6475372 B1	26-03-2003 15-01-2006 13-10-2005 14-08-2001 09-08-2001 29-01-2003 14-05-2003 10-08-2006 01-05-2006 30-10-2002 16-06-2006 08-09-2006 25-07-2005 15-07-2003 14-10-2003 09-08-2004 11-02-2003 12-09-2002 05-11-2002
WO 2006109279	A	19-10-2006	AU 2006233772 A1 CA 2604386 A1 EP 1869454 A2 KR 20080003421 A US 2006231423 A1	19-10-2006 19-10-2006 26-12-2007 07-01-2008 19-10-2006
US 2005267346	A1	01-12-2005	WO 2005074550 A2	18-08-2005

フロントページの続き

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
C 1 2 Q	1/44	(2006.01)	
		C 1 2 Q	1/26
		C 1 2 Q	1/44

(81) 指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(72) 発明者 グレイ, アドリアン リチャード
イギリス国 バークシャー アールジー 4 1 3 エーユー, ワーキンガム, 6 サフォーク
クローズ

(72) 発明者 パーシバル, デイビッド
イギリス国 フリントシャー シーエイチ 5 3 エイチエス, チェスター, ハワーデン, 4
オーバーリー ドライブ

F ターム(参考) 2G054 AA07 CA23 CE02 EA04 EA06 EA09 EB03 EB05 EB10 GB01
JA01
4B063 QA01 QQ70 QR03 QR12 QX02

【要約の続き】

ある。

【選択図】 図1

专利名称(译)	全血分析		
公开(公告)号	JP2010522336A	公开(公告)日	2010-07-01
申请号	JP2010500366	申请日	2008-03-20
申请(专利权)人(译)	Kuoshento诊断有限公司		
[标]发明人	ベッシージョンフィリップ グレイアドリアンリチャード パーシバルデイビッド		
发明人	ベッシー, ジョン フィリップ グレイ, アドリアン リチャード パーシバル, デイビッド		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/545 G01N33/53 G01N21/78 C12Q1/26 C12Q1/44		
CPC分类号	G01N33/92 G01N33/49 G01N33/72 G01N2333/904 G01N2333/918		
FI分类号	G01N33/543.587 G01N33/545.B G01N33/53.X G01N33/53.S G01N21/78.Z C12Q1/26 C12Q1/44		
F-TERM分类号	2G054/AA07 2G054/CA23 2G054/CE02 2G054/EA04 2G054/EA06 2G054/EA09 2G054/EB03 2G054/EB05 2G054/EB10 2G054/GB01 2G054/JA01 4B063/QA01 4B063/QQ70 4B063/QR03 4B063/QR12 4B063/QX02		
代理人(译)	狩野晃		
优先权	2007005495 2007-03-22 GB		
其他公开文献	JP5006441B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

用于评估全血样品的血浆组分中目标物质（例如胆固醇或CRP）浓度的方法和设备。这里，在测试之前不需要从血浆中分离红血球，从而简化了测试装置的设计和构造。通过以时间依赖性（生物化学/免疫化学）反应测量要分析的分析物并分别测量标记物质（例如血红蛋白）以评估红细胞体积来实现本发明。在后者中，使用归因于对样品添加的内在滤波效应的反应混合物的物理性质（在这种情况下下的渗透性）的非时间依赖性变化。这些与时间无关的变化是通过连续测量和数学建模（而不是反应性化学的一部分）与由分析化学现象引起的物理性质随时间变化分离的。通过使用组合这两个参数的算法，可以评估目标物质的量并校正样品的%红细胞体积比的变化。本发明的方法使得可以均匀地进行应当响应患者样品的复杂变化（例如，红细胞体积比）的分析。

Figure 1

