

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4815368号
(P4815368)

(45) 発行日 平成23年11月16日(2011.11.16)

(24) 登録日 平成23年9月2日(2011.9.2)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 33/543 (2006.01) GO 1 N 33/543 5 8 5
GO 1 N 33/80 (2006.01) GO 1 N 33/80
GO 1 N 33/53 (2006.01) GO 1 N 33/53 K

請求項の数 4 (全 11 頁)

(21) 出願番号	特願2007-60568 (P2007-60568)	(73) 特許権者	510005889
(22) 出願日	平成19年3月9日(2007.3.9)		ベックマン コールター, インコーポレ イテッド
(65) 公開番号	特開2008-224319 (P2008-224319A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 928 21, プレア, エス. クレーマー ブー ルバード 250
(43) 公開日	平成20年9月25日(2008.9.25)	(74) 代理人	100108855
審査請求日	平成21年6月29日(2009.6.29)		弁理士 蔵田 昌俊
		(74) 代理人	100091351
			弁理士 河野 哲
		(74) 代理人	100088683
			弁理士 中村 誠
		(74) 代理人	100109830
			弁理士 福原 淑弘

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血球凝集判定用容器

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

一 以上のカラムを有する血球凝集判定用容器であって、
 前記カラムが、試料保持部と、凝集部と、凝集判定部とを備え、
 前記試料保持部は、その底面に血球が通過できる少なくとも一以上の細孔を有するフィルタ部を備え、
 前記凝集部は、凝集用液体で満たされ、かつ前記凝集判定部が、前記凝集部の底面に位置し、
 前記カラム内を垂直方向に落下する血球が、前記フィルタ部を通過して前記凝集部に入り、前記凝集部の底面に位置する前記凝集判定部に至る
 血球凝集判定用容器。

【請求項 2】

前記試料保持部または凝集部が、前記凝集用液体の注入口を備える請求項 1 に記載の血球凝集判定用容器。

【請求項 3】

前記試料保持部が、前記凝集部と着脱可能である請求項 1 に記載の血球凝集判定用容器。

【請求項 4】

前記凝集部の内径が、前記試料保持部の内径以下である請求項 1 ないし 3 のいずれか一項に記載の血球凝集判定用容器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、不規則抗体の検出を行うために、赤血球の凝集を判定する凝集判定用容器に関する。

【背景技術】

【0002】

ABO血液型における抗Aおよび抗B抗体は規則抗体といわれるが、それ以外の赤血球抗原に対する抗体を不規則抗体という。不規則抗体の保有者が献血者に占める頻度は0.2~0.3%であるが、妊婦では0.5%とやや高く、受血者における陽性頻度はさらに高く2~5%といわれている。不規則抗体の中には、発現頻度が多く臨床的に症状が重篤になるものもあり、その存在の有無の判定は極めて重要である。

10

【0003】

輸血現場では、ABO血液型とRhD血液型についてのみ型合わせを行い、その他の不規則抗体については交差適合試験において判定を行っている。交差適合試験とは、輸血を行う前に供血者の血球と受血者の血清(血漿)の反応(主試験)、および供血者の血清(血漿)と受血者の血球の反応(副試験)を調べて、輸血が可能か否かを決定するための試験である。

【0004】

交差適合試験としては、主に(i)間接抗グロブリン試験法および(ii)カラム凝集法が知られている。

20

【0005】

(i)間接抗グロブリン試験法

不規則抗体と特異的に結合する抗ヒトグロブリン抗体(クームス血清)を使用した方法である。被検血清(血漿)中に不規則抗体が存在する場合、血球試薬と被検血清とを混合すると、不規則抗体が赤血球の膜抗原に結合し、不規則抗体と赤血球の複合体が形成される。抗ヒトグロブリン抗体は不規則抗体と結合するため、該複合体は抗ヒトグロブリン抗体を介して互いに結合し合い、凝集塊が形成される。間接抗グロブリン試験法では、抗ヒトグロブリン抗体(クームス血清)を加える前に、洗浄工程が不可欠である。判定結果に影響を及ぼす血清中に浮遊する不規則抗体を除去するためである。

30

【0006】

(ii)カラム凝集法

セファデックスゲルを充填したカラム内に凝集塊を捕捉させる方法である。抗ヒトグロブリン抗体を介して不規則抗体と赤血球の複合体が互いに結合し合い、凝集塊が形成されると、該凝集塊はセファデックスゲル内に浸透することができず、該ゲル上面に凝集塊のバンドが形成される。Y. Lapierreらは、特許文献1において、カード上に隣接して配置された複数のカラムに、10~200 μ mのセファデックスゲルやガラスビーズに代表される不溶性粒子を充填し、遠心によって効率よく赤血球の凝集物と非凝集物を区別できる反応容器を考案している。セファデックスゲルが充填されたカラムには、例えばDiaMed社のマイクロタイピングシステム(以下、MTSカードという)がある。MTSカードは、セファデックスゲルが充填された複数のカラムが直列に配置されたカードタイプの凝集判定容器であるが、使用するセファデックスゲルは高価である。

40

【特許文献1】特公平8-7215号公報

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

上述したように、間接抗グロブリン試験法は、洗浄工程が必要であり、試験手続きが煩雑になるという問題がある。一方、カラム凝集法は、セファデックスゲルを充填しているが、このセファデックスゲルが高価であるという問題がある。本発明は、洗浄工程が不要で簡便かつ安価な、不規則抗体の有無を判定できる血球凝集判定用容器を提供することを

50

目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者は、輸血現場では緊急を要する場合も多々あり、より迅速かつ簡便な判定キットの開発が望まれており、また、輸血行為は医療現場で日常的に行われており、大量使用が可能な安価な判定キットの開発が望まれているとの考えの下に、鋭意研究を行った。そして、洗浄工程をなくし、かつセファデックスゲル等の高価な材料を使用しない、全く新たな判定キットを開発するに至った。

【0009】

即ち、本発明は、一以上のカラムを有する血球凝集判定用容器であって、前記カラムが、試料保持部と、凝集部と、凝集判定部とを備え、前記試料保持部は、その底面に血球が通過できる少なくとも一以上の細孔を有するフィルター部を備え、前記凝集部は、凝集用液体で満たされ、かつ前記凝集判定部が、前記凝集部の底面に位置し、前記カラム内を垂直方向に落下する血球が、前記フィルター部を通過して前記凝集部に入り、前記凝集部の底面に位置する前記凝集判定部に至る血球凝集判定用容器を提供する。

10

【発明の効果】

【0010】

本発明の血液凝集判定用容器は、洗浄工程が不要であり、迅速かつ簡便に不規則抗体の有無を判定することができる。また、セファデックスゲル等の高価な材料を使用していないので、非常に安価な血球凝集判定用容器を提供することができる。従って、医療現場において大量に使用することができ、かつ使い捨てが可能になるため、検査結果のより厳密な正確性が確保され得る。

20

【0011】

その他、本発明の凝集判定容器は、カラム遠心凝集法用のカラムとして使用することが可能であり、その形状がカードタイプなので、当該カード本体を複写機によってコピーし、判定結果を長期保存することも可能である。また、判定後に検体が内部に留まるので、二次感染や汚染の危険性が軽減する。更に、ゲルを均一に且つ空気が入らないようにカラムに充填するという従来困難とされていた工程をなくすことが可能である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0012】

以下、本発明を、図面に基づいて詳細に説明する。

30

【0013】

図1は、本発明の血球凝集判定用容器10の正面図である。一枚のカード基板上に6本のカラム20が直列に配置されている。一枚のカード基板上に配置されるカラムの数に特に制限はないが、好ましくは1~10本のカラムが配置される。取り扱いの観点から、カード基板のサイズは、縦1~20cm、横1~30cm程度が好ましい。

【0014】

カード基板の材質については、特に制限はないが、少なくとも各カラム内の底面に位置する凝集判定部を外部から目視できる程度に透明である必要がある。カード基板の具体的材質としては、例えば、ポリスチレン、ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリメチルメタクリレート、ポリエチレンビニルアルコール、アクリル樹脂、ポリアミド樹脂、ポリイミド樹脂、ポリスルホン酸樹脂、環状シクロオレフィン樹脂、セルロースアセテート、硝酸セルロース、フルオロカーボン樹脂、ポリカーボネートまたはポリジメチルシロキサン、ポリスチレン、およびガラスからなる群から選択される。

40

【0015】

本発明の血球凝集判定用容器は、遠心分離機にセットされ、遠心処理を施される。具体的には、前記カード基板を数枚~十数枚セット可能なローターを使って遠心処理を行う。

【0016】

図2は、本発明の血球凝集判定用容器のカラム20の斜視図である。図2では、カラム

50

の形状を円柱で表わしているが、多角柱であってもよい。

【0017】

図3は、図2のA-A'線で切断した第一の断面図である。カラム内には、試料保持部30が設けられている。試料保持部30は、血球試薬と被検血清(血漿)とを貯留可能な液体保持部を備えている。図3では、試料保持部30をお椀型の形状で表しているが、液体を貯留できる形状であればよく、例えば、逆三角錐等の多角錐形状であってもよい。

【0018】

試料保持部30の底面には、フィルター部40が設けられている。フィルター部には、血球が通過できる細孔が少なくとも一つ以上開いている。

【0019】

試料保持部30の下方には、凝集部50が設けられている。凝集部50は、カラム20内空の主要部をなし、フィルター部40を介して試料保持部30と連通している点を除き、密閉された空間である。

【0020】

凝集部50の底面には凝集判定部60が設置されている。凝集判定部には、ミクロン単位の階段が形成されており、その頂上部70は、前記フィルター部40の真下に位置する。

【0021】

凝集部50は凝集用液体で満たされている。前記凝集用液体とは、不規則抗体試験において、クームス血清を意味する。クームス血清とは、抗ヒト免疫グロブリン抗体を含む血清である。クームス血清は、精製されたヒト免疫グロブリン抗体で前もって免疫したウサギまたはその他の動物から得た血清である。凝集用液体は、試料保持部30または凝集部50の側面上部にある注入口90から凝集部50に注ぐ。凝集部50が凝集用液体で満たされた後、前記注入口90を塞ぐ。

【0022】

ここで、凝集部50に充填された凝集用液体が、試料保持部30に流出するのを防止する必要がある。第一の方法として、使用時に凝集用液体を凝集部50に充填する方法が挙げられる。この際、クームス血清には糖類等を混ぜて比重を高くし、試料保持部30内の液体と混じり合わないようにするとよい。第二の方法として、あらかじめ凝集用液体を凝集部50に充填しておく場合において、血球凝集判定用容器を凍結保存する方法が挙げられる。凍結保存した血球凝集判定用容器を取り出して試料保持部30内で検体を反応させた後、血球凝集判定用容器を加温して凝集用液体を融解させる。凝集用液体が融解した後、遠心処理を行う。第三の方法として、前記フィルター部40を低融点固体で塞ぐ方法が挙げられる。試料保持部30内で検体を反応させた後、血球凝集判定用容器を加温して低融点固体を融解させる。低融点固体が融解した後、遠心処理を行う。低融点固体としては、アガロース、パラフィン等が挙げられる。

【0023】

次に、本発明の血球凝集判定用容器の使用方法について説明する。まず、赤血球を含む血球試薬を試料保持部30に滴下する。同時に、被検血清(血漿)を同じく試料保持部30に滴下し、血球試薬と被検血清とを混合する。患者の血清中に不規則抗体が含まれている場合、該不規則抗体は、赤血球の膜抗原と結合する。ここで、本発明の血球凝集判定用容器に対して遠心処理を行う。遠心速度を調節し、前記混合液中の成分のうち最も比重の高い赤血球のみを沈降させる。沈降した赤血球はフィルター部40を通過し、凝集部50に入る。

【0024】

従来の不規則抗体の判定装置では、血球試薬と被検血清とを反応させた後、判定結果に影響を及ぼす、赤血球の膜抗原と結合していない血清中に浮遊する抗体を取り除くための洗浄工程を行う必要があった。これに対し、本発明の血球凝集判定用容器では、不規則抗体が結合した赤血球と比較して比重の低い血清中に浮遊する抗体は、試料保持部30に留まり、不規則抗体が結合した赤血球のみが凝集部50に移行するため、洗浄工程を行う必

10

20

30

40

50

要がない。これは、不規則抗体検査において極めて優れた特徴である。

【 0 0 2 5 】

凝集部 5 0 は、抗ヒト免疫グロブリン抗体を含む血清（クームス血清）で満たされている。抗ヒト免疫グロブリン抗体は不規則抗体と強く結合する。赤血球の膜抗原に不規則抗体が結合している場合、抗ヒト免疫グロブリン抗体が不規則抗体と結合することによって、赤血球が凝集塊を形成する。赤血球は、遠心力によってフィルター部 4 0 から垂直に落下し、凝集判定部 6 0 の頂上部 7 0 に落下する。凝集判定部 6 0 は、凝集の程度によって赤血球の移動度が異なるような形状をなしており、凝集判定部 6 0 における赤血球の広がり具合を観察することによって凝集の程度を判定することができる。

【 0 0 2 6 】

なお、凝集判定部まで血球を落下させる物理的力は、上述したように、遠心処理による重力が基本だが、磁力を用いることもできる。この場合、カラム底面に磁石を設置し、あらかじめ磁性化された血球試薬を用いて試験を行う。

【 0 0 2 7 】

図 4 は、図 2 の A - A ' 線で切断した第二の断面図である。凝集部 5 0 の内径が、試料保持部 3 0 の内径以下である点に特徴がある。より具体的には、凝集部 5 0 がその上方において外壁を狭めた細管状をなし、その下方において凝集判定部 6 0 を設置可能な程度の内空を備える。その他の構成は、図 3 の第一の断面図と同様である。凝集部 5 0 の容積が小さくなることにより、その内部に充填される凝集用液体の量を少なくすることができる。また、血球を確実に真下に落下させることができ、凝集判定部 6 0 の頂上部 7 0 への血球の落下をより確実にすることができる。

【 0 0 2 8 】

図 2 ~ 4 に記載の本発明の血球凝集判定用容器は、試料保持部 3 0 と凝集部 5 0 とが一体となった構成をなす。他の態様として、試料保持部 3 0 が凝集部 5 0 と着脱可能な構成をなしてもよい。試料保持部 3 0 が凝集部 5 0 と着脱可能である場合、凝集部 5 0 に充填する凝集用液体は試料保持部 3 0 を取り外して入れることができ、凝集用液体を注入する注入口 9 0 は不要となる。

【 0 0 2 9 】

図 5 は、本発明の血球凝集判定用容器のカラムの分解斜視図である。試料保持部 3 0 が、凝集部 5 0 と着脱可能である。凝集部 5 0 は、試料保持部 3 0 をはめ込む開口部 8 0 を備えている。開口部 8 0 から凝集用液体を注入し、凝集用液体で凝集部 5 0 が満たされた後に試料保持部 3 0 を開口部 8 0 にはめ込み、固着させる。試料保持部 3 0 の外周形状は、開口部 8 0 の内周形状と等しく、開口部 8 0 に試料保持部 3 0 をはめ込んだときに、前記外周と内周が密着する。従って、試料保持部 3 0 と開口部 8 0 を固着した状態では、凝集部 5 0 内空は、フィルター部 4 0 を介して試料保持部 3 0 と連通している点を除き、密閉された空間となる。凝集部 5 0 は、開口部 8 0 を備えている限りにおいて、その形状には特に制限はなく、図 4 のように、凝集部の内径が試料保持部 3 0 の内径以下であってもよい。凝集部 5 0 の底面には凝集判定部 6 0 が設置されている。

【 0 0 3 0 】

図 6 は、図 5 のカラムにおける、試料保持部 3 0 の斜視図である。試料保持部 3 0 の底面にはフィルター部 4 0 が設けられている。試料保持部 4 0 を開口部 8 0 に固着した状態において、フィルター部 4 0 は、凝集判定部 6 0 の頂上部 7 0 の真上に位置する。試料保持部 3 0 の形状には、前記開口部との関係を満たす限りにおいて特に制限はない。図 6 では、試料保持部 3 0 をお椀型の形状で表しているが、液体を貯留できる形状であればよく、例えば、逆三角錐等の多角錐形状であってもよい。

【 0 0 3 1 】

図 7 は、フィルター部の斜視図 (a) と平面図 (b) である。フィルター部 4 0 には、赤血球が通過できる細孔が少なくとも一つ以上設けられている。フィルター部 4 0 は、フィルター部材として別途作製した後に試料保持部 3 0 にはめ込む方法の他、試料保持部 3 0 の底面に直接細孔を開けてフィルター部を作製してもよい。この場合、フィルター部 4

10

20

30

40

50

0 は、試料保持部 30 との明確な区別はなく、細孔が開いている部位を便宜上フィルター部と呼ぶ。フィルター部の直径は10~1000 μm 程度が好ましく、細孔の数は1~100個程度が好ましい。各細孔の孔径は、4 μm ~100 μm が好ましい。赤血球の大きさは、6~8 μm である。孔径が4 μm よりも小さいと、赤血球が通過することができない。また、孔径が100 μm よりも大きいと、試料保持部 30 の試料と凝集部 50 の凝集用液体とが混合してしまい、判定結果に影響を及ぼす。細孔の作製には、周知の微細加工技術を使用することができる。例えば、レーザ加工技術が挙げられ、ナノ秒~フェムト秒のパルスレーザを照射することによって、細孔を開けることができる。フィルター部 40 は、頂上部 70 の真上に位置する。フィルター部 40 を通過した血球は重力によって垂直に落下し、凝集判定部 60 の頂上部 70 に落下する。

10

【0032】

図8は、凝集判定部の斜視図(a)と平面図(b)である。(i)は階段状凸型、(ii)は半球型、(iii)は階段状凹型の凝集判定部を表わす。(i)階段状凸型および(ii)階段状凹型の凝集判定部には、その表面にミクロン単位の階段が形成されており、凝集像を効率良く、かつ安定的に作製することができる。(ii)半球型の凝集判定部は、平滑表面に曲面を設けることによって、凝集像を効率良く、かつ安定的に作製することができる。

【0033】

図の二点鎖線は、血球の流れを表わしている。(i)階段状凸型および(ii)半球型の凝集判定部の場合、血球は頂上部 70 に落下し、階段状の凝集判定部の外周に向かって下っていく。凝集塊は全体として高い粘性を示すので、移動が妨げられ、凝集判定部の頂上部 70 に血球が留まる。一方、血球が凝集していない場合、血球は低い粘性を示し(液状)、凝集判定部の外周まで移動する。従って、凝集判定部の頂上部 70 にのみ血球が観察された場合は、凝集の程度が大きい(陽性)と判定できる。一方、凝集判定部全体に血球が広がった場合、凝集は生じていない(陰性)と判定できる。また、弱陽性の判定も可能である。

20

【0034】

(iii)階段状凹型の場合、凝集判定部 60 の外周部に位置する頂上部 70 に血球を落下させる必要があるため、凝集部 50 の内空に障害部を設ける(図示せず)。フィルター部 40 を通過して凝集部 50 内空を垂直に落下する血球は、前記障害部によって凝集部 50 内空の壁面側に誘導され、凝集判定部の外周側の頂上部 70 に落下する。該頂上部 70 に落下した血球は、ミクロン単位の階段を下って凝集判定部中央に向かって移動する。従って、凝集判定部の外周にのみ血球が観察された場合、凝集の程度が大きい(陽性)と判定できる。一方、凝集判定部全体に血球が広がった場合、凝集は生じていない(陰性)と判定できる。(i)および(ii)と同様、弱陽性の判定も可能である。

30

【0035】

凝集判定部での血球の拡散の様子は、カラム上方またはカラム底面から観察することができるので、多数の血球凝集判定用容器を直立させて一箇所に敷き詰め、その状態で一度に全ての判定結果を見ることができる。

【図面の簡単な説明】

40

【0036】

【図1】本発明の血球凝集判定用容器の正面図

【図2】本発明の血球凝集判定用容器のカラムの斜視図

【図3】図2のA-A'線で切断した第一の断面図

【図4】図2のA-A'線で切断した第二の断面図

【図5】本発明の血球凝集判定用容器のカラムの分解斜視図

【図6】図5のカラムにおける、試料保持部の斜視図

【図7】フィルター部の斜視図(a)と平面図(b)

【図8】凝集判定部の斜視図(a)と平面図(b)

【符号の説明】

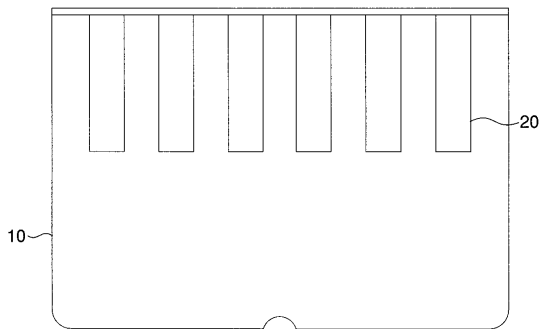
50

【 0 0 3 7 】

- 1 0 血球凝集判定用容器
- 2 0 カラム
- 3 0 試料保持部
- 4 0 フィルター部
- 5 0 凝集部
- 6 0 凝集判定部
- 7 0 頂上部
- 8 0 開口部
- 9 0 注入口

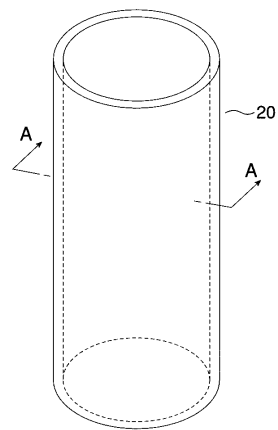
【 図 1 】

図 1



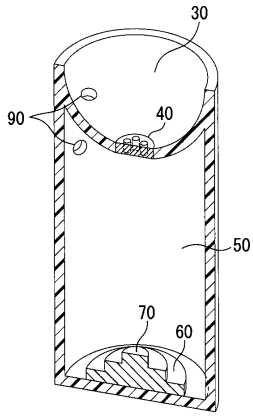
【 図 2 】

図 2



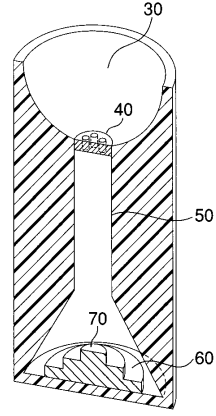
【 図 3 】

図 3



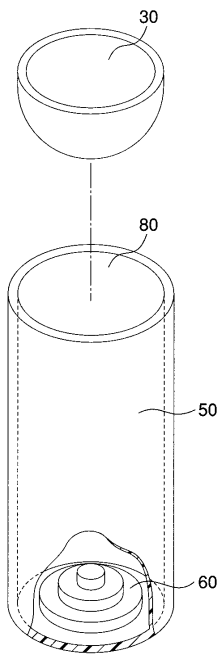
【 図 4 】

図 4



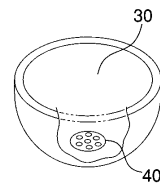
【 図 5 】

図 5



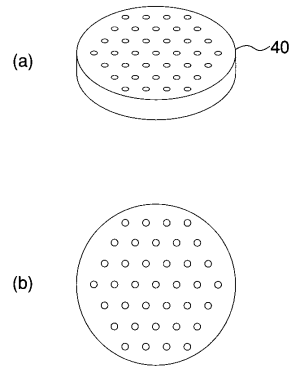
【 図 6 】

図 6



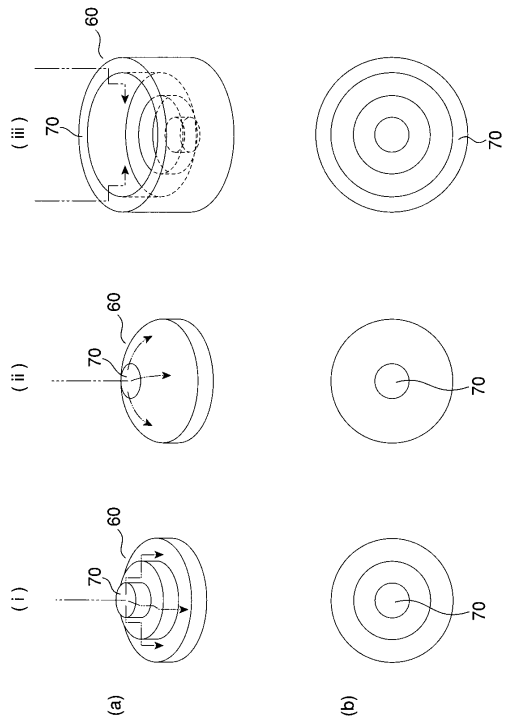
【 図 7 】

図 7



【 8 】

図 8



フロントページの続き

- (74)代理人 100075672
弁理士 峰 隆司
- (74)代理人 100095441
弁理士 白根 俊郎
- (74)代理人 100084618
弁理士 村松 貞男
- (74)代理人 100103034
弁理士 野河 信久
- (74)代理人 100119976
弁理士 幸長 保次郎
- (74)代理人 100153051
弁理士 河野 直樹
- (74)代理人 100140176
弁理士 砂川 克
- (74)代理人 100101812
弁理士 勝村 紘
- (74)代理人 100124394
弁理士 佐藤 立志
- (74)代理人 100112807
弁理士 岡田 貴志
- (74)代理人 100111073
弁理士 堀内 美保子
- (74)代理人 100134290
弁理士 竹内 将訓
- (74)代理人 100127144
弁理士 市原 卓三
- (74)代理人 100141933
弁理士 山下 元
- (72)発明者 田窪 健
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリパス株式会社内
- (72)発明者 玉井 豊廣
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリパス株式会社内
- (72)発明者 北野 宏能
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリパス株式会社内
- (72)発明者 小林 由美
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリパス株式会社内
- (72)発明者 吉村 成明
東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目4番2号 オリパス株式会社内

審査官 海野 佳子

- (56)参考文献 特開平01-267459(JP,A)
特開昭63-261162(JP,A)
特公平08-007215(JP,B2)
特開平04-285858(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
G01N 33/80

G 0 1 N 3 3 / 5 4 3
G 0 1 N 3 3 / 5 3