

(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2011-522228

(P2011-522228A)

(43) 公表日 平成23年7月28日(2011.7.28)

(51) Int.Cl.		F I		テーマコード (参考)
GO 1 N 33/53	(2006.01)	GO 1 N 33/53		K
GO 1 N 33/543	(2006.01)	GO 1 N 33/543	5 2 1	
		GO 1 N 33/543	5 2 5 U	

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 19 頁)

(21) 出願番号	特願2011-510804 (P2011-510804)	(71) 出願人	510315973
(86) (22) 出願日	平成21年3月26日 (2009.3.26)		英科新▲創▼(厦▲門▼) 科技有限公司
(85) 翻訳文提出日	平成22年11月30日 (2010.11.30)		中華人民共和国361022福建省厦▲門
(86) 国際出願番号	PCT/CN2009/000322		▼市海▲滄▼新▲陽▼工▲業▼区新光路3
(87) 国際公開番号	W02009/149615		32号
(87) 国際公開日	平成21年12月17日 (2009.12.17)	(74) 代理人	100087767
(31) 優先権主張番号	200810111567.0		弁理士 西川 恵清
(32) 優先日	平成20年6月10日 (2008.6.10)	(74) 代理人	100155745
(33) 優先権主張国	中国 (CN)		弁理士 水尻 勝久
		(74) 代理人	100143465
			弁理士 竹尾 由重
		(74) 代理人	100155756
			弁理士 坂口 武
		(74) 代理人	100161883
			弁理士 北出 英敏

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 ヒト ABO/RH/MN 血液型を迅速に判定する方法及びキット

(57) 【要約】

血液検体を、抗 A、抗 B、抗 D、抗 M、又は抗 N 血液型の抗体が予め被覆固定化されたテストストリップ上に滴下し、テストストリップの一端に洗浄液を滴下した後、反応スポットにおいて凝集された赤血球が残されているか否かによって検体の血液型を判定する、ヒト ABO/Rh/MN 血液型の判定方法。

【選択図】 図 1

【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

血液検体を、抗 A、抗 B、抗 D、抗 M、又は抗 N 血液型の抗体が予め被覆固定化されたテストストリップ上に滴下し、テストストリップの一端に洗浄液を滴下した後、洗浄液の泳動により、抗体との凝集反応が発生していない赤血球を滴下スポットから遠ざける一方、抗体と免疫凝集した赤血球を検体滴下スポットに残し、その後、反応スポットに凝集した赤血球が残されているか否かによって検体の血液型を判定することを含む、ヒト A B O / R h / M N 血液型の判定方法。

【請求項 2】

前記血液検体が、赤血球又は全血、或いは生理食塩水または等張のリン酸塩緩衝液で希釈した赤血球又は全血であってもよい、請求項 1 に記載の方法。

10

【請求項 3】

前記血液検体が、一部分の溶血又は高脂質含量の血液試料を含んでもよい、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記抗体は、物理的な吸着又は化学架橋法によりテストストリップに固定されている、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

反応スポットに凝集した赤血球が残されているか否かを、肉眼で、或いは光学信号または電気信号の採集機器によって判断する、請求項 1 に記載の方法。

20

【請求項 6】

請求項 1 に記載の方法を完成するためのキットであって、判定用テストストリップと、洗浄液と、採血具とからなり、前記テストストリップが、洗浄パッドと、サンプルアプライパッドと、緩衝パッドと、吸水パッドと、透明防水テープと、内張りとしてのポリエステル板とからなる、キット。

【請求項 7】

テストストリップを構成する前記洗浄パッドと、サンプルアプライパッドと、緩衝パッドと、吸水パッドとは、一定の孔径を有する多孔質高分子材料により作製され、且つその孔径の大きさは少なくとも 1 個の赤血球を通過可能である、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 8】

血液型抗体が固定されたサンプルアプライパッド上に血液検体を滴下し、洗浄パッド上に等張の洗浄液を滴下し、その後、サンプルアプライパッドに凝集した赤血球が残されているか否かによって血液検体の血液型を判定する、請求項 7 に記載のキット。

30

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

本発明は、人類の A B O / R h / M N 血液型を迅速に判定する方法及びその対応するキットに関する。

【背景技術】**【0002】**

血液型分型方法は、ヒト血液赤血球を A、B、A B 及び O の四型、並びに R h 血液型系と M N 血液型系に分類する一般的な方法である。血液型の判定の一般的な方法としては、検体赤血球と、血液型の抗体を含有する試薬とを混合して両者を反応させた後、赤血球の細胞凝集が発生しているか否かを観察することによって検体赤血球の血液型を判定する方法である。このような方法では、まず患者の血清中から赤血球を分離し、適量の赤血球と、試験管中またはガラス板上に導入された試験溶液（抗 A 血清、抗 B 血清、或いは抗 D 血清または抗 M 血清、抗 N 血清）とを混合し、ここで免疫反応の進行に有利なその他の試薬を添加してもよく、保温、遠心と攪拌を行った後、肉眼で観察し、細胞の凝集が発生しているか否かを確認する。

40

【0003】

50

試料は、抗 A 試薬の存在下で細胞の凝集が発生し、抗 B 試薬の存在下で凝集が発生しない場合には、A 型血液と判定される。試料は、抗 B 試薬の存在下で細胞の凝集が発生しているが、抗 A 試薬の存在下で凝集が発生しない場合には、B 型血液と判定される。試料は、抗 A 試薬と抗 B 試薬とともに凝集している場合には、試料が A B 型血液と判定される。試料は、抗 A 試薬と抗 B 試薬とともに反応しない場合には、O 型血液と判定される。試料と抗 D 試薬とが凝集する場合は、血液試料は R h 陽性血液型であり、試料と抗 D 試薬とが凝集しない場合は、血液試料は R h 陰性血液型である。M N 血液型は対応の凝集反応が発生しているか否かによって M、N 及び M N の三型に分けられる。

【0004】

現在、ヒト A B O / R h / M N 血液型の検定技術は二つに分けることができ、一つは細胞膜上に結合した血液型の抗原を検定する技術であり、赤血球の生理食塩水凝集法、中和実験、吸収実験、解離実験および混合凝集反応等を含む。もう一つは遊離の血液型の抗原を直接に検定する技術であり、協同凝集反応、放射免疫反応等を含む。

10

【0005】

現在よく使われている赤血球生理食塩水凝集法は、既知の I g M または I g G 型抗体を新鮮な赤血球表面の血液型の抗原と結合させることにより、赤血球を凝集させて、血液検体の血液型を判断する。この方法は臨床輸血の前の血液型検査（配型）に広く使用されている。しかし、このような方法では対応の試薬を組合わせて使用する必要があり、且つ試薬の低温保存が必要であり、結果も判断し難い。

【0006】

その他の血液型検定方法も各自の欠点を有しており、例えば中和実験方法では時間が長くかかり、且つ感度が比較的低い。解離実験と混合凝集反応法では操作に対する要求が高く、毎回の実験において繰り返し条件を確立する必要があり、その感度も高くない。協同凝集反応方法は I g G 型抗体感作の黄色ブドウ球菌プロテイン A (S P A) を用いて、ブドウ球菌の凝集の有無を観察することによって検体試料の血液型を判断するが、当該方法では試薬の保存に対する要求が高い。放射免疫と酵素免疫法は感度が高いが、かかる時間が比較的長く、一人分の検定に不適切で、また現場での検定も不可能である。

20

【0007】

つまり、現在よく使われている臨床の血液型検定方法は、検定時間が長く、人手による操作の度合いが大きく、さらに結果が主観的な偏差に大きく影響されるとともに汚染される可能性がある等の問題がある。従って、伝統的な血液型の検定方法に対して実質的な改善が必要とされている。

30

【発明の開示】

【0008】

本方法の一つの目的は、血液検体を、抗 A、抗 B、抗 D、抗 M、又は抗 N 血液型の抗体が予め被覆固定化されたテストストリップ上に滴下し、テストストリップの一端に洗浄液を滴下した後、洗浄液の泳動により、抗体との凝集反応が発生していない赤血球を滴下スポットから遠ざける一方、抗体と免疫凝集した赤血球を検体滴下スポットに残させ、その後、反応スポットにおいて凝集された赤血球が残されているか否かによって検体の血液型を判定することを含む、ヒト A B O / R h / M N 血液型の判定方法を提供することにある。

40

【0009】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、テストストリップ上に滴下する血液検体の体積は、1 ~ 10 μ l と微小であってもよい。前記洗浄液は 10 m M のリン酸塩緩衝液 (P B S)、生理食塩水またはその他の等張溶液である。前記血液検体は検査用テストストリップのサンプルアプライパッド上に滴下される。

【0010】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記血液型の抗体を固定する方法としては物理的な吸着または化学架橋等の方法であってもよい。

【0011】

50

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記血液検体は、赤血球又は全血、或いは生理食塩水、リン酸塩緩衝液等の等張溶液で希釈した赤血球又は全血の懸濁液であってもよい。また、前記血液試料は、一部分の溶血又は高脂質含量の血液試料を含んでいてもよい。

【0012】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、検定結果の判断は、肉眼で、或いは光学信号または電気信号の採集機器によって判断することができる。

【0013】

簡単に言うと、血液試料は、相応する血液型の抗体を結合させたサンプルアブライパッドと接触して反応した後、サンプルアブライパッド上において相応する抗体と免疫結合反応が起こる。洗浄液体で洗浄した後、免疫結合反応が発生した試料はサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質として残り、免疫結合反応が発生していない血液試料は洗浄液の洗浄によりサンプルアブライパッドから離され、検体滴下スポットに赤色の物質の残留がない。よって、赤血球と相応する抗体との免疫反応後、サンプルアブライパッド上に赤色の物質の残留が有るか無いかによって赤血球と血液型の抗体とが免疫反応したかどうかを判断し、さらに血液試料のA B O / R h / M N血液型を判定する。

10

【0014】

本発明のもう一つの目的は、上記検定方法を完成するためのキットを提供することであって、当該キットは、検定用テストストリップ、洗浄液と採血具とからなり、その検定用テストストリップは、洗浄パッド、サンプルアブライパッド、緩衝パッド、吸水パッド、防水テープ及び内張りとしてのポリエステル板とからなる。

20

【図面の簡単な説明】

【0015】

【図1】図1は本発明の血液型検定キットにおける、A B O血液型の迅速判定用テストストリップを示す模式図である。

【図2】図2は本発明の血液型検定キットにおける、A B O血液型の迅速判定用テストストリップを示す更なる模式図である。ここで、1は洗浄パッド、2は防水テープ、3は血液型の抗体を含有するサンプルアブライパッド、4は緩衝パッド、5は吸水パッド、6は内張りとしてのポリエステル板である。

【図3】図3は本発明の血液型検定キットにおける、R h血液型の迅速判定用テストストリップを示す模式図である。ここで、1は洗浄パッド、2は防水テープ、3は抗D抗体を含有するサンプルアブライパッド、4は緩衝パッド、5は吸水パッドである。

30

【図4】図4は本発明の血液型検定キットにおけるM N血液型の迅速判定用テストストリップを示した模式図である。

【図5】図5は血液型の抗体を固定させたガラス繊維パッド上に陽性の血液試料を滴下した後の、反応の概略図である。ここで、1は赤血球、2は血液型の抗体、3はガラス繊維サンプルアブライパッドである。

【発明を実施するための形態】

【0016】

本発明は、人類の血液検体のA B O / R h / M N血液型を迅速に判定する方法及びその相応するキットに関する。

40

【0017】

まず、本発明は人類の血液検体のA B O / R h / M N血液型を判定する方法を提供する。前記方法は、血液検体を、抗A、抗B、抗D、抗M、又は抗N血液型の抗体が予め被覆固定化されたテストストリップ上に滴下し、テストストリップの一端に洗浄液を滴下した後、洗浄液の泳動により、抗体との凝集反応が発生していない赤血球を滴下スポットから遠ざける一方、抗体と免疫凝集した赤血球を検体滴下スポットに残させ、その後、反応スポットにおいて凝集された赤血球が残されているか否かによって検体の血液型を判定することを含む。

【0018】

50

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記血液検体は、赤血球又は全血、或いは生理食塩水またはリン酸塩緩衝液（P B S）などの等張溶液で希釈した赤血球の懸濁液又は全血の希釈液であってもよい。また、前記血液試料は、溶血試料又は高脂質含量の血液試料を含んでもよい。

【0019】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記滴下させた血液検体の体積は10 μ l以下である。前記洗浄液は10mMリン酸塩緩衝液、生理食塩水またはその他の溶液である。

【0020】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記血液型の抗体を固定する方法としては物理的な吸着または化学架橋等の方法であってもよい。

10

【0021】

本発明は、さらに上記検定方法を完成するためのキットを提供する。当該キットは、検定用テストストリップ、洗浄液と採血具とからなり、その検定用テストストリップは、洗浄パッド、サンプルアプライパッド、緩衝パッド、吸水パッド、防水テープ及び内張りとしてのポリエステル板とからなる（図1を参照）。

【0022】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記洗浄パッド、サンプルアプライパッド、緩衝パッド、吸水パッドは、一定の孔径を有する多孔質高分子材料により作製され、且つその孔径の大きさは少なくとも1個の赤血球を通過可能である。その材質の選択により、その洗浄パッド、サンプルアプライパッド、及び緩衝パッドはガラス繊維パッドと総括的に称する場合もある。

20

【0023】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記血液検体はサンプルアプライパッド上に滴下され、また、前記洗浄液体は洗浄パッド上に滴下される。サンプルアプライパッドは血液型の抗体を固定した多孔質キャリアである。

【0024】

また、血液型の抗体を固定する方法は物理的な吸着または化学架橋法等の方法がある。

【0025】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記血液試料は、ある程度の溶血または脂肪含量が比較的高い血液試料を含む。

30

【0026】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、その検定結果の判断は、肉眼で、或いは光学信号または電気信号の採集判定機器によって完成することができる。具体的には、本発明のキットを用いたヒトA B O / R h / M N血液型の検定は、以下の操作ステップを含む：

【0027】

1) ヒトA B O / R h / M N血液型の抗体を直接または間接的にサンプルアプライパッド3（図2）上に固定する：物理的な吸着または化学架橋手段により、血液型の抗体を一定の孔径を有するガラス繊維パッド上に固定する。ここで、採用した物理的または化学的な固定方法は抗体の生理活性に対してあまり影響しない上、固定化された抗体には抗体タンパク質保存剤が添加されている。保護剤としては、ウシ血清アルブミン、胎児牛血清、ペプトン、蔗糖、ポリビニルピロリドン及びこれらの組み合わせから選択することができる。

40

【0028】

高力価のヒトA B O / R h / M N血液型モノクローナル抗体を取り、5mMリン酸塩緩衝液で適当な力価に希釈し、また抗体のガラス繊維パッド上の固定と保存のために抗体固定保護剤を添加する。後継の免疫反応の進行を促進するために希釈後の抗体溶液中に反応増強剤を添加してもよい。希釈後の抗体1.5mL当たり5cm \times 5cmの繊維パッドに広げる比率で、抗体を予め活性化したガラス繊維パッド上に被覆して37 $^{\circ}$ Cで乾燥した後

50

密封して保存する。

【0029】

2) サンプルアブライパッド3上に検体の滴下を行った後、洗浄パッド2(図3)上に洗浄液体を滴下させる。サンプルを添加して洗浄液を滴下させた後、免疫結合反応が発生するとともに結果が現れる。

【0030】

3) 反応が完成して洗浄した後、サンプルアブライパッド上において赤色の残留物の有無によって、血液検体試料の血液型を判定する。

【0031】

ABO血液型検定用テストストリップにおいて、反応物が洗浄された後、抗A抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がある場合、血液検体は相応する抗A抗体に捕らえられ、抗A抗体と凝集反応が発生した(即ち陽性反応)ことを表す。洗浄後、抗A抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がない場合、血液検体は抗A抗体と凝集反応が発生していない(即ち陰性反応)ことを表す。反応と洗浄が完了した後に、抗B抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がある場合、血液検体は抗B抗体と凝集反応が発生したことを表す。洗浄後に、抗B抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がない場合、血液検体は抗B抗体と凝集反応が発生していないことを表す。従って、検定結果により、抗A抗体と抗B抗体とともに凝集反応が発生した血液試料の血液型はAB型で、抗A抗体のみと凝集反応が発生した血液試料の血液型はA型で、抗B抗体のみと凝集反応が発生した血液試料の血液型はB型で、抗A抗体と抗B抗体のいずれにも凝集反応が発生していない血液試料の血液型はO型であると判定できる。

10

20

【0032】

Rh血液型検定用テストストリップにおいて、反応して洗浄を完了した後に、抗D抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がある場合、血液検体は抗D抗体と凝集反応が発生していないことを表す。反応して洗浄を完了した後に、抗D抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がない場合、血液検体は抗D抗体と凝集反応が発生していないことを表す。従って、検定結果により、抗D抗体と凝集反応が発生した血液試料の血液型はRh陽性血液型、抗D抗体と凝集反応が発生していない血液試料の血液型はRh陰性血液型であると判定できる。

30

【0033】

MN血液型検定用テストストリップにおいて、反応物が洗浄された後に、抗M抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がある場合、血液検体は相応する抗M抗体に捕らえられ、抗M抗体と凝集反応が発生したことを表す。洗浄後に、抗M抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がない場合、血液検体は抗M抗体と凝集反応が発生していないことを表す。反応して洗浄を完了した後に、抗N抗体を含有するサンプルアブライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がある場合、血液検体は抗N抗体と凝集反応が発生したことを表す。従って、検定結果により、抗M抗体と抗N抗体とともに凝集反応が発生した血液試料の血液型はMN型で、抗M抗体のみと凝集反応が発生した血液試料の血液型はM型で、抗N抗体のみと凝集反応が発生した血液試料の血液型はN型であると判定できる。

40

【0034】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、その迅速判定用テストストリップは、内張り、洗浄パッド、サンプルアブライパッド、緩衝パッド、吸水パッド、防水テープとからなる。内張りの上に順次に、洗浄パッド、サンプルアブライパッド、緩衝パッド、吸水パッド、及び防水テープを貼り付ける。サンプルアブライパッドの縁部は洗浄パッドの縁部上に重なり、緩衝パッドの縁部はサンプルアブライパッドの縁部上に重なり、吸水パッドの縁部は緩衝パッドの縁部上に重なり、防水テープは洗浄パッドとサンプルアブライパッドとの重なった縁部上に貼り付けられることで、洗浄液体がサンプルアブライパッドの表面から広がることを防止している。内張りはポリエステル材料からなっているが、

50

これに制限されない。

【0035】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、ここでいう抗体の固定とは、物理的または化学架橋等の方法を利用して、抗A、抗B、抗D、抗Mあるいは抗N等の抗体を、一定の孔径を有するガラス繊維パッドまたはその他の類似する孔径のキャリア上に固定することを指す。固定する前に、抗体の力価に基づいて抗体に対して一定比率の希釈を行って、それを使用に適した濃度にする。浸漬、均一塗布あるいはスプレーの方法を採用して抗体をガラス繊維パッド（サンプルアプライパッド）上に固定することができる、その後、凍結乾燥または加熱乾燥処理を行う。ここで、前記抗体は予め架橋剤であるグルタルアルデヒドで処理したものである。

10

【0036】

本発明の一つの好ましい実施形態によれば、前記血液検体は、赤血球または全血、或いは10mMリン酸塩緩衝液（PBS）、生理食塩水等の等張溶液で希釈した赤血球懸濁液（希釈度通常2 - 50%）であってもよい。ある程度の溶血または比較的高い脂肪含量の血液試料も、本発明のキットに適している。

【0037】

適当に希釈したまたは未希釈の検体全血或いは血細胞試料を、血液型の抗体を含有するサンプルアプライパッド上に添加して、免疫結合反応を待った後に洗浄液でサンプルアプライパッドを洗浄する。洗浄液は、10mMリン酸塩緩衝液（PBS）またはその他の溶液であってもよい。免疫反応後の凝集した赤血球の存在は、肉眼でも容易に観察でき、また、光信号又は電気信号の採集判断機器によって、大量の試料の血液型の検定結果を読み取ることができる。

20

【0038】

例えば、ABO血液型の検定を行う際に、実際の操作は、一枚のポリエステル板基材上に区分して並列され、それぞれサンプルアプライパッド上に抗Aまたは抗B血液型の抗体を固定させた二本の検定用テストストリップ上で完成することができる。

【0039】

例えば、MN血液型の検定を行う際に、実際の操作は、一枚のポリエステル板内張り上に区分して並列され、それぞれサンプルアプライパッド上に抗Mまたは抗N血液型の抗体を固定させた二本の検定用テストストリップ上で完成することができる。

30

【0040】

本発明のヒトABO/Rh/MN血液型を迅速に判定するキットは、血液センターの血液型のスクリーニング、街の採血及び家庭用ABO/Rh/MN血液型自己検査に適用される。迅速な免疫反応及び簡便な結果読み取り手段によって、血液型の迅速且つ簡単正確な検定を達成した。当該方法は、操作が簡単且つ容易で、その他の抗ヒトグロブリン等の試薬の添加を必要としない。本発明の方法において、血液検体試料のサンプル添加量は10マイクロリットルを超えず、全部の検定過程は2分間を超えない。

【0041】

本発明のヒトABO/Rh/MN血液型を迅速に判定する方法およびキットは、免疫クロマトグラフィ法の原理に基づいて、血液型物質の抗原と抗体との反応後に、赤血球の凝集により残留した赤色の物質の有無によって、血液型の判断を実現するものである。本発明の方法は、操作が簡単で、従来通常血液型検定方法の各種欠陥を避けることができる。本発明の方法は、一人分または複数人分の迅速な判定に適している。特に、採血現場におけるABO/Rh/MN血液型の迅速な判定及び家庭用血液型の自己検定に適している。相応する機器と組合わせて使用すれば、当該方法は血液センターに適用して大量の血液試料に対するABO/Rh/MN血液型人群の迅速なスクリーニングを行うことができる。

40

【0042】

以下の実施例は本発明に対して更なる例を挙げて説明したものであり、これらの実施例は、本発明に対しいかなる限定もしない。本発明の技術的な解決案から外れない前提で

50

、本発明に対する当業者が容易に実現できるいかなる変更や変化も、いずれも本発明の特許請求の範囲に該当する。

実施例 1：ヒト A B O 血液型キットにおける検定用テストストリップの作製及び検定ステップ

(1) サンプルアブライパッド上における血液型の抗体の固定 (抗 A、抗 B 抗体)：

【0043】

高力価の血液型モノクローナル抗 A 抗 B 抗体 (長春博徳生物技術有限公司製) を取り、5 m M リン酸塩緩衝液で 1 m l になるまで希釈した。最終の力価は 6 4 であった。ガラス繊維パッド上の抗体の固定と保存を促進するために、希釈後の抗体液中に抗体固定保護剤 (5 % ウシ血清アルブミン、5 % 蔗糖、5 % P V P、5 % 胎児牛血清のリン酸塩緩衝液からなる) を添加した。希釈後の抗体 1 . 5 m l 当たりを 5 c m x 5 c m のガラス繊維パッドに広げる比率で、抗体を予め活性化したガラス繊維パッド上に被覆して 3 7 で乾燥した後密封して保存した。

10

(2) 迅速判定用テストストリップの実装：

【0044】

幅が約 5 - 1 0 c m の長方形のポリエステル板の内張りの中央部に幅が 2 0 m m の洗浄ガラス繊維パッドを貼り付け、その後両辺に幅が 1 0 m m のサンプルアブライパッド、緩衝パッド及び幅が 3 0 m m の吸水パッドを順次に貼り付けて、最後に洗浄パッドとサンプルアブライパッドとの重なる部位に防水テープを貼り付けることで、貼り付けたパッドの剥離及び添加されたサンプルや洗浄液の広がりを防止する。その後、各層の貼り付け済みのポリエステル板を幅 5 m m のストリップに切って長さが約 5 - 1 0 c m , 幅が約 5 m m の検定用テストストリップ (図 1 と図 2 を参照) を得た。

20

(3) 試料検定：

【0045】

テストストリップのサンプルアブライパッド上に、5 μ l の全血試料を滴下した。検体試料を滴下した後、洗浄パッド 2 の上にゆっくりと均速で反応洗浄液を 5 滴滴下した。洗浄液のクロマトグラフィの後、サンプルアブライパッドの色を観察した。サンプルアブライパッド 3 の上に顕著な赤色の物質の残留がある場合、陽性反応とし、サンプルアブライパッド 3 の上に赤色の物質の残留がない場合、陰性反応とした。A B O 血液型の抗体と赤血球との反応関係に基づいて、容易に検体試料の血液型を検定できる。また、光信号または電気信号の採集システムによりサンプルアブライパッド上に残留した赤色の物質を採集して、その結果に対し自動的に判断することも可能で、これにより大量の血液試料の A B O 血液型に対する迅速なスクリーニングが実現される。

30

実施例 2：ヒト R h 血液型検定キットにおける検定用テストストリップの作製及び検定ステップ

40

(1) サンプルアブライパッド上における血液型の抗体の固定 (抗 D 抗体)：

【0046】

高力価の血液型モノクローナル抗 D 抗体 (米国 MILLIPORE 社製) を取り、5 m M リン酸塩緩衝液で 1 m l になるまで希釈した。最終力価は 3 2 であった。ガラス繊維パッド上の抗体の固定と保存を促進するために、希釈後の抗体液中に抗体固定保護剤 (5 % 白蛋白、5 % 蔗糖、5 % P V P、5 % 胎児牛血清の P B S 溶液からなる) を添加し、さらに後継の免疫反応の進行を促進するために反応増強剤 (2 % Tween20 と 2 % Triton X-100 を含むリン酸塩緩衝液) を添加した。希釈後の抗体 1 . 5 m l 当たりを 5 c m x 5 c m の繊維パッドに広げる比率で、抗体を予め活性化したガラス繊維パッド上に被覆して 3 7 で乾燥さ

50

せた後密封して保存する（図3を参照）。

【0047】

その他のステップは、A B O血液型キットの迅速判定用テストストリップの作製及び検定ステップと同様にした。

実施例3：ヒトMN血液型検定キットにおける検定用テストストリップの作製及び検定ステップ

【0048】

ヒトMN血液型検定キットの迅速判定用テストストリップの作製及び検定ステップはヒトRh血液型検定キットの迅速判定用テストストリップの作製及び検定ステップと類似し、異なるのは、判定用テストストリップに固定された抗体を抗Mや抗N抗体に替えたことのみにある（図4を参照）。

10

実施例4：本発明の血液型検定方法と従来一般的な方法との比較

【0049】

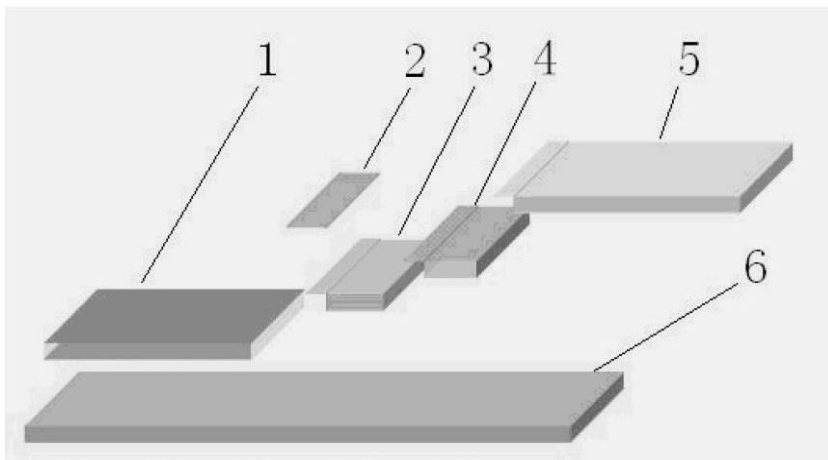
我々は、伝統的な血液型検定方法と本発明の方法およびキットとを使用して、同時に、一般の人の1500例の個体（ドナー）に対し二重盲検法による血液型検定を行ったところ、本方法の検定結果は、既知の血球液体凝集法と比べて、合致率が100%であった。本発明の検定可能な検体の範囲が比較的広く、部分溶血、高脂質血等の検体に対しても検定可能である。また、本発明のキットの検定方法は、現在よく使われている臨床の血液型検定方法が有する、検定時間が長く、人手による操作の度合いが大きく、さらに結果が操作者の主観的な偏差に大きく影響されるとともに汚染される可能性がある等の問題を回避することができる。

20

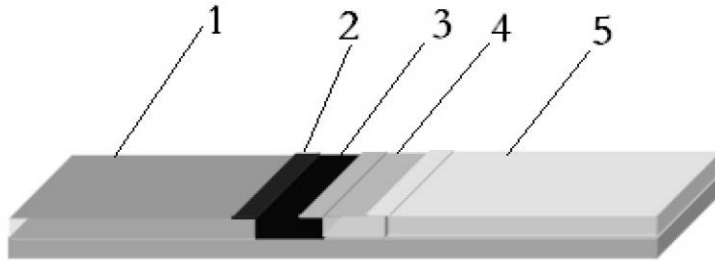
【図1】



【図2】



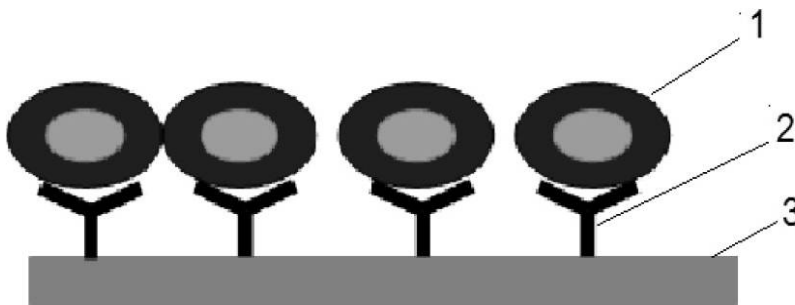
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【手続補正書】

【提出日】平成22年11月30日(2010.11.30)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0029】

2) サンプルアプライパッド3上に検体の滴下を行った後、洗浄パッド1(図3)上に洗浄液体を滴下させる。サンプルを添加して洗浄液を滴下させた後、免疫結合反応が発生するとともに結果が現れる。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0032】

Rh血液型検定用テストストリップにおいて、反応して洗浄を完了した後に、抗D抗体を含有するサンプルアプライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がある場合、血液検体は抗D抗体と凝集反応が発生していることを表す。反応して洗浄を完了した後に、抗D抗体を含有するサンプルアプライパッド上に顕著な赤色の物質の残留がない場合、血液検体は抗D抗体と凝集反応が発生していないことを表す。従って、検定結果により、抗D抗体と凝集反応が発生した血液試料の血液型はRh陽性血液型、抗D抗体と凝集反応が発生していない血液試料の血液型はRh陰性血液型であると判定できる。

【手続補正3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0045

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0045】

テストストリップのサンプルアブライパッド上に、5 μ lの全血試料を滴下した。検体試料を滴下した後、洗浄パッド1の上にゆっくりと均速で反応洗浄液を5滴滴下した。洗浄液のクロマトグラフィの後、サンプルアブライパッドの色を観察した。サンプルアブライパッド3の上に顕著な赤色の物質の残留がある場合、陽性反応とし、サンプルアブライパッド3の上に赤色の物質の残留がない場合、陰性反応とした。ABO血液型の抗体と赤血球との反応関係に基づいて、容易に検体試料の血液型を検定できる。また、光信号または電気信号の採集システムによりサンプルアブライパッド上に残留した赤色の物質を採集して、その結果に対し自動的に判断することも可能で、これにより大量の血液試料のABO血液型に対する迅速なスクリーニングが実現される。

実施例2：ヒトRh血液型検定キットにおける検定用テストストリップの作製及び検定ステップ

(1) サンプルアブライパッド上における血液型の抗体の固定(抗D抗体)：

【手続補正4】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

血液検体を、抗A、抗B、抗D、抗M、又は抗N血液型の抗体が予め被覆固定化されたテストストリップ上に滴下し、テストストリップの一端に洗浄液を滴下した後、洗浄液の泳動により、抗体との凝集反応が発生していない赤血球を滴下スポットから遠ざける一方、抗体と免疫凝集した赤血球を検体滴下スポットに残し、その後、反応スポットに凝集した赤血球が残されているか否かによって検体の血液型を判定することを含む、ヒトABO/Rh/MN血液型の判定方法。

【請求項2】

前記血液検体が、赤血球又は全血、或いは生理食塩水または等張のリン酸塩緩衝液で希釈した赤血球又は全血であってもよい、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記血液検体が、一部分の溶血又は高脂質含量の血液試料を含んでもよい、請求項1に記載の方法。

【請求項4】

前記抗体は、物理的な吸着又は化学架橋法によりテストストリップに固定されている、請求項1に記載の方法。

【請求項5】

反応スポットに凝集した赤血球が残されているか否かを、肉眼で、或いは光学信号または電気信号の採集機器によって判断する、請求項1に記載の方法。

【請求項6】

請求項1に記載の方法を完成するためのキット。

【請求項7】

判定用テストストリップと、洗浄液と、採血具とからなり、前記テストストリップが、洗浄パッドと、サンプルアブライパッドと、緩衝パッドと、吸水パッドと、防水テープと

、内張りとしてのポリエステル板とからなる、請求項 6 に記載のキット。

【請求項 8】

テストストリップを構成する前記洗浄パッドと、サンプルアブライパッドと、緩衝パッドと、吸水パッドとは、一定の孔径を有する多孔質高分子材料により作製され、且つその孔径の大きさは少なくとも 1 個の赤血球を通過可能である、請求項 7 に記載のキット。

【請求項 9】

血液型抗体が固定されたサンプルアブライパッド上に血液検体を滴下し、洗浄パッド上に等張の洗浄液を滴下し、その後、サンプルアブライパッドに凝集した赤血球が残されているか否かによって血液検体の血液型を判定する、請求項 7 に記載のキット。

【 国际调查报告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2009/000322
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
See extra sheet		
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)		
IPC: G01N33		
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 practicable, search terms used)		
CNPAT, WPI, EPODOC, PAJ, CNKI: blood type, strip		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	Yu Wei, A test-strip method for determining blood type, Foreign Medical Information, 1987, no.1, page 17, see the whole document	1-5
Y		6-8
Y	CN1438486A (ZHONGDE BIOENGINEERING CO LTD JIANGX) 27 Aug. 2003 (27.08.2003), see embodiments	6-8
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>		
Date of the actual completion of the international search 22 Jun. 2009 (22.06.2009)		Date of mailing of the international search report 02 Jul. 2009 (02.07.2009)
Name and mailing address of the ISA/CN The State Intellectual Property Office, the P.R.China 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China 100088 Facsimile No. 86-10-62019451		Authorized officer WANG Lihua Telephone No. (86-10)62085676

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2009/000322

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN1438486A	2003-08-27	CN1186636C	2005-01-26

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2009/000322

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

G01N33/49 (2006.01) i
G01N33/543 (2006.01) i

国际检索报告		国际申请号 PCT/CN2009/000322
A. 主题的分类		
参见附加页		
按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: G01N33		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
CNPAT, WPI, EPODOC, PAJ, CNKI: 血型, 条, blood type, strip		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	育巍, 试条法测定血型, 国外医学情报, 1987, 第 1 期, 17 页, 参见全文	1-5
Y		6-8
Y	CN1438486A (江西中德生物工程有限公司) 27.8 月 2003 (27.08.2003), 参见实施例部分	6-8
<input type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件 "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件		"T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件
国际检索实际完成的日期 22.6 月 2009 (22.06.2009)		国际检索报告邮寄日期 02.7 月 2009 (02.07.2009)
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451		受权官员 王丽华 电话号码: (86-10) 62085676

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2009/000322

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN1438486A	2003-08-27	CN1186636C	2005-01-26

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2009/000322

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类:

G01N33/49 (2006.01) i

G01N33/543 (2006.01) i

フロントページの続き

(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, MK, 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, ST, SV, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

(74)代理人 100167830

弁理士 仲石 晴樹

(74)代理人 100136696

弁理士 時岡 恭平

(74)代理人 100162248

弁理士 木村 豊

(72)発明者 汪 大明

中華人民共和国 3 6 1 0 2 2 福建省廈門 市海滄 新陽 工業 区新光路 3 3 2 号

(72)発明者 楊 文

中華人民共和国 3 6 1 0 2 2 福建省廈門 市海滄 新陽 工業 区新光路 3 3 2 号

(72)発明者 肖 江群

中華人民共和国 3 6 1 0 2 2 福建省廈門 市海滄 新陽 工業 区新光路 3 3 2 号

(72)発明者 王 保丹

中華人民共和国 3 6 1 0 2 2 福建省廈門 市海滄 新陽 工業 区新光路 3 3 2 号

专利名称(译)	用于快速测定人ABO / RH / MN血型的方法和试剂盒		
公开(公告)号	JP2011522228A	公开(公告)日	2011-07-28
申请号	JP2011510804	申请日	2009-03-26
[标]申请(专利权)人(译)	英科新创(厦门)科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	英科新▲创▼(厦▲门▼)科技有限公司		
[标]发明人	汪大明 楊文 肖江群 王保丹		
发明人	汪 大明 ▲楊▼ 文 肖 江群 王 保丹		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/80		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/543.521 G01N33/543.525.U		
代理人(译)	竹尾 由重 坂口武 Tokioka恭平 木村裕		
优先权	200810111567.0 2008-06-10 CN		
其他公开文献	JP5181058B2		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

一种快速测定人ABO / Rh / MN血型的方法及其检测试剂盒。将待检测的血液样品施加到预先涂有抗A或抗B或抗M或抗N抗体的测试条上，将冲洗溶液滴在测试条的一端，然后滴加血液通过残留在反应部位的凝集红细胞的存在来确定血样的组。

