

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-117152

(P2004-117152A)

(43) 公開日 平成16年4月15日(2004.4.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
GO 1 N 33/49	GO 1 N 33/49	X 2GO45
GO 1 N 33/483	GO 1 N 33/483	C
GO 1 N 33/53	GO 1 N 33/53	D
GO 1 N 33/566	GO 1 N 33/566	

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願2002-280696 (P2002-280696)	(71) 出願人	592037055 株式会社日本医学臨床検査研究所 京都府久世郡久御山町大字大橋辺小字大橋 辺16番地10
(22) 出願日	平成14年9月26日 (2002.9.26)	(72) 発明者	日裏 久英 京都府久世郡久御山町大橋辺16-10 株式会社日本医学臨床検査研究所内
		Fターム(参考)	2G045 AA01 BB34 CA24 FA12 FB03 FB07 FB12 GC15

(54) 【発明の名称】 活性化血小板の検査装置

## (57) 【要約】

【課題】本発明の課題は、感度、特異性に優れた活性化した血小板を検査できる方法を提供することである。

【解決手段】血小板の活性化に伴って出現する血小板表面上のG P I I b / I I I a や P - セレクチンのような種々の糖蛋白質やリン脂質のひとつであるホスファチジルセリン等を、これらの物質に特異的に結合するリガンドを用いて検出する方法及び臨床検査室で汎用されている血液分析装置で抗凝固剤にクエン酸を用いた試料の血小板を測定することによる活性化血小板の検査とを組み合わせた。

【選択図】 なし

**【特許請求の範囲】****【請求項 1】**

全血試料中の血小板を光学的に測定する工程、測定したデータを解析し血小板凝集塊を検出する工程及び生理活性を利用して活性化血小板マーカーを検出する工程を含むことを特徴とする活性化血小板の検査方法。

**【請求項 2】**

生理活性を利用して活性化血小板マーカーを検出する工程が、活性型糖蛋白質 I I b / I I a ( G P I I b / I I I a )、P - セレクチン、ライソゾーム膜成分、ホスファチジルセリン又は血小板由来マイクロパーティクルのうちから選ばれた少なくとも 1 種類の物質を検出する工程であって、該物質と特異的に結合しうるリガンドを用いる請求項 1 に記載の方法。

10

**【請求項 3】**

請求項 1 ~ 2 に記載の方法を行うための装置。

**【請求項 4】**

請求項 1 ~ 3 に記載の方法または装置に用いる試薬またはキット。

**【発明の詳細な説明】****【0001】****【発明の属する技術分野】**

本発明は臨床検査の分野で用いられ、血小板の活性化を調べる検査装置および方法として用いられる。

20

**【0002】****【従来の技術】**

心筋梗塞や脳梗塞をはじめとする虚血性疾患は血液の凝固異常として捕らえることができる。血液凝固機能検査は、プロトロンビン時間測定、種々の凝固指標分子の測定により行われている。一方、血液凝固に大きな役割をしている血小板の検査は、血小板数や血小板の機能を調べる血小板凝集検査を中心に行われている。血小板は、血管損傷などにより露出される内皮下組織のコラーゲンなどの結合組織蛋白質や血漿中に存在するトロンビンなどの血小板膜受容体への結合、あるいは血小板内の顆粒中に存在するアデノシンジフォスフェイト ( A D P )、アドレナリン、セロトニン、トロンボキサン ( T X ) A 2 などの放出によるオートクライン的な膜受容体への結合によって活性化される。そして、フィブリノゲン受容体である糖蛋白質が細胞表面に提示され、その複合体 ( G P I I b / I I I a ) を形成することによって凝集可能となり、フィブリノゲン架橋を介した凝集を起こす。

30

**【0003】**

血栓症の病態を把握する上で血小板活性化マーカーを測定することは各種血栓症の診断的意義に加えて、種々の抗血小板剤を用いた治療におけるモニターにも有用である。従来より活性化血小板のマーカーとして種々の血小板表面マーカーが知られている ( 臨床病理 50、773 - 778、2002 )。しかし、血小板の活性化マーカーは細胞の専用検査装置であるフローサイトメーターを使って行われており、その操作の煩雑さ、コスト等から汎用されるには至っていない。

**【0004】**

一方、日常の臨床検査室で行われている血液学分析は、赤血球、白血球、血小板数等 20 数項目を数分間で測定できる自動分析装置で行っている。また、このような血液学自動分析装置の中には、抗体を用いた白血球 T 細胞のサブセット検査や血小板数の測定が簡単にできる装置が開発されている。このような汎用装置を用いて活性化された血小板の検査が望まれている。山本らは、脳梗塞患者の血小板測定において、クエン酸採血した試料で測定した血小板数測定の分布図を解析することによって、E D T A 採血試料より顕著に活性化血小板を検出しうることを報告している ( 日本臨床検査自動化学会、第 34 回大会 )。しかし、本報告では脳梗塞における提案された方法の感度 ( 脳梗塞患者での活性化血小板の検出割合 ) は約 60 % 前後である。したがって、簡便で感度及び特異性に優れた活性化血小板の検査方法が望まれていた。

40

50

## 【 0 0 0 5 】

## 【 発明が解決しようとする課題 】

本発明の課題は、簡便で感度及び特異性に優れた活性化した血小板を検査できる方法を提供することである。

## 【 0 0 0 6 】

## 【 課題を解決するための手段 】

本発明者らは、血小板の活性化に伴って出現する血小板表面に種々の糖蛋白質やリン脂質のひとつであるホスファチジルセリン等をリガンドを用いて検出すること及び臨床検査室で汎用されている血液分析装置で抗凝固剤にクエン酸を用いた試料で血小板を測定することによる血小板凝集塊の検出の検査を組合せることにより本発明を完成させた。

10

## 【 0 0 0 7 】

本発明は以下の構成からなる。

1、全血試料中の血小板を光学的に測定する工程、測定したデータを解析し血小板凝集塊を検出する工程及び生理活性を利用して活性化血小板マーカーを検出する工程を含むことを特徴とする活性化血小板の検査方法。

2、生理活性を利用して活性化血小板マーカーを検出する工程が、活性型糖蛋白質 I I b / I I I a ( G P I I b / I I I a )、P - セレクチン、ライソゾーム膜成分、ホスファチジルセリン又は血小板由来マイクロパーティクルのうちから選ばれた少なくとも 1 種類の物質を検出する工程であって、該物質と特異的に結合しうるリガンドを用いる上記 1 に記載の方法。

20

3、上記 1 ~ 2 に記載の方法を行うための装置。

4、上記 1 ~ 3 に記載の方法または装置に用いる試薬またはキット。

## 【 0 0 0 8 】

## 【 発明の実施の形態 】

本発明は、血小板の検査法に関するものであり、とりわけ活性化されている血小板の検査方法に関するものである。本発明は、試料中の血小板凝集塊の検出と活性化血小板マーカーの検出の 2 つの検査方法を組み合わせた検査方法および検査装置を提供するものである。

## 【 0 0 0 9 】

血小板をレーザーフローサイトメトリー法により測定した散乱光情報をスキャッターグラムに表して解析することにより活性化血小板を認識する。すなわちクエン酸採血された試料では血小板の活性化により凝集塊を形成した血小板がスキャッターグラム上で通常の血小板とは異なった分布で観察される。この血小板凝集塊の検出を活性化血小板の指標として検査する。

30

## 【 0 0 1 0 】

一方、血小板表面に活性化により特異的に出現してくるマーカーを、生理活性を利用して測定する方法として、抗体を用いる免疫学的方法が一般的である。その例として、活性型糖蛋白質 I I b / I I I a ( G P I I b / I I I a ) に結合する抗体 ( P A C - 1 )、G P I I b / I I I a に結合しているフィブリノゲンに結合する抗体、さらにはそのフィブリノゲンに結合しているトロンボスポンジンに結合する抗体、血小板表面の P - セレクチンに結合する抗体 ( C D 6 2 P )、血小板表面のライソゾーム膜成分に結合する抗体 ( C D 6 3 )、血小板由来マイクロパーティクルに結合する抗体 ( G P I X、G P I b、G P I I b )、ホスファチジルセリンに結合する抗体、また抗体以外のリガンドとして、ホスファチジルセリンと特異的に結合するアネキシン V 及び活性型 G P I I b / I I I a に結合しうるアルギニン - グリシン - アスパラギン酸のアミノ酸配列を有するペプチド ( R G D ペプチド ) 等が例示される。これらの抗体、アネキシン V 及び R G D ペプチド等は適当な標識をしておくことにより簡単に検査が行える。標識の例としてはフルオレセイン、フィコエリスリン、ペリオジニン クロロフィル プロテイン、テキサスレッド、C y 3 及び C y 5 等の蛍光物質で標識することができる。標識したリガンドを検体と反応させることにより、血小板表面に結合した標識リガンドを指標として活性化血小板をフローサイト

40

50

メトリー等により検出するか、あるいは血小板由来マイクロパーティクルの検出の場合にはフローサイトメトリーのスキャッターグラム上でその画分を検出する。

【0011】

本発明の方法を簡単に実施するには、全自動の総合血液学分析装置、例えばCELL-DYN 4000（ダイナボット社製）を用いることにより実施可能である。本装置では、免疫学的に血小板や白血球を測定するフローサイトメトリー機能が組み込まれていることを利用して、たとえば活性型のGPIIb/IIIaを認識するPAC-1抗体をフルオレセインで標識したフルオレセイン標識PAC-1抗体を用いて測定したのちスキャッターグラム又はヒストグラムを作成する等のデータ解析により、活性型GPIIb/IIIaを検出することが可能である。その情報を基に活性化血小板の指標とすることができる。用いる検査試料は、もうひとつの検査である血小板の検査とリンクさせて、クエン酸採血した血液が好適である。

10

【0012】

本発明の方法に用いるもう一方の血小板数測定は、クエン酸採血された血液でレーザー光学法により測定しスキャッターグラム化し解析することにより行われる。活性化された血小板を含む試料では通常の血小板の分布とは異なる領域に活性化血小板に起因する血小板凝集塊の分布が現れる。それらはたとえば、前記のCELL-DYN 4000（ダイナボット社製）を用いてレーザー光学法により90度散乱と小角散乱（7度）のスキャッターグラムにより検査できる。本発明の方法及び装置は、特にこれらに限定されるものではなく、血小板数検査において血小板凝集塊に起因する活性化血小板を検出しようとするものであれば良く、そして同一装置内にフローサイトメトリー機能を備えた装置であれば好適である。すなわち、同一試料、装置を用いて、血小板の検査を行うことにより、活性化血小板をより簡単に、感度良く検査できるといった格別の効果がある。

20

【0013】

【実施例】

本発明の実施例を以下に示すが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【実施例1】

3.8%クエン酸ナトリウム添加全血（1：9）40例を全自動血液学分析装置CELL-DYN 4000（ダイナボット社製）により2次元レーザー法モード（90度/7度）で血小板数の測定を行い、スキャッターグラム解析により血小板凝集塊の有無を判定した。

30

一方、市販のPAC-1マウスモノクローナル抗体をフルオレセインで標識しFITC-PAC-1抗体を調製した。調製したFITC-PAC-1抗体を用いて、CELL-DYN 4000の免疫学的測定モード（PLT-imm）で血小板表面の活性型GPIIb/IIIa

をマーカーとして活性化血小板を検査した。その結果を表1に示した。

【0014】

【表1】

表1 活性化血小板の検査結果

	凝集塊陽性	凝集塊陰性
PAC-1陽性	6	4
PAC-1陰性	1	29

40

【0015】

以上の結果、PAC-1抗体の陽性率は10/40であり、一方凝集塊陽性の検出率は7/40である。両検出いずれかが陽性の数は11/40となり、両検出法を組み合わせることにより、より効果的な活性化血小板の検出が可能であり、本発明の有用性が確認できた。

【0016】

50

**【発明の効果】**

本発明により、簡便で感度及び特異性に優れた活性化した血小板を検査できる方法、試薬及び装置を提供することができる。

专利名称(译)	激活血小板检查系统		
公开(公告)号	<a href="#">JP2004117152A</a>	公开(公告)日	2004-04-15
申请号	JP2002280696	申请日	2002-09-26
申请(专利权)人(译)	日本医科大学临床检验实验室		
[标]发明人	日裏久英		
发明人	日裏久英		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/566		
FI分类号	G01N33/49.X G01N33/483.C G01N33/53.D G01N33/566		
F-TERM分类号	2G045/AA01 2G045/BB34 2G045/CA24 2G045/FA12 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/FB12 2G045/GC15		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种检测活化血小板的方法，具有极好的灵敏度和特异性。解决方案：在血小板表面上检测各种糖蛋白如GPIIb / IIIa或P-选择蛋白的方法之间采用组合法，血小板或磷脂酰丝氨酸是磷脂等之一，通过使用配体键合具体地，对于该材料，通过在临床实验室中广泛使用的血液分析装置中使用柠檬酸作为抗凝血剂测量样品中的血小板来检查活化的血小板。Ž

	凝集陽性	凝集陰性
PAC-1陽性	6	4
PAC-1陰性	1	29