

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第3631203号
(P3631203)

(45) 発行日 平成17年3月23日(2005.3.23)

(24) 登録日 平成16年12月24日(2004.12.24)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/53

GO 1 N 33/53

K

GO 1 N 33/48

GO 1 N 33/48

P

請求項の数 1 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2001-398562 (P2001-398562)	(73) 特許権者	502002016
(22) 出願日	平成13年12月27日 (2001.12.27)		カトリック中央医療院
(65) 公開番号	特開2002-257823 (P2002-257823A)		大韓民国ソウル特別市瑞草區盤浦洞505番地
(43) 公開日	平成14年9月11日 (2002.9.11)	(74) 代理人	100100103
審査請求日	平成15年7月2日 (2003.7.2)		弁理士 太田 明男
(31) 優先権主張番号	2000-0085709	(72) 発明者	韓慶子
(32) 優先日	平成12年12月29日 (2000.12.29)		大韓民国ソウル特別市永登浦區汝矣島洞47韓星Apt B棟401號
(33) 優先権主張国	韓国 (KR)	審査官	山村 祥子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 溶血性貧血検査方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

患者より血液を抽出した後、末梢血2 μ lをphycoerythrinと接合させた抗血色素抗体で0.6%の食塩水において常温で15分間染色する段階と；
前記phycoerythrinと接合させた抗血色素抗体で0.6%の食塩水において常温で15分間染色した後、洗浄せずに3mlの食塩水を添加する段階と；
前記3mlの食塩水を添加し流細胞分析機で分析する段階で損傷された赤血球数と赤血球が以前に破損したのかまたは、最近破損したものであるかも区別できるようになされる段階と、
を有することを特徴とする溶血性貧血検査方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は微細脈管病性貧血のように壊れた赤血球が血中に存在する場合、生理食塩水よりも貯蔵液において抗血色素を利用して損傷した赤血球を検出する流細胞測定法を実施して溶血性貧血の迅速な診断のみならず、患者に重要な壊れた赤血球と重要でない古い壊れた赤血球とを区別できるようにした溶血性貧血検査方法(Diagnostic Method of Hemolytic Anemia)に関する。

【0002】

【従来の技術】

10

20

従来の赤血球検査方法は血液を抽出してガラス板に塗抹した後、染色して顕微鏡で観察してきたが、この時赤血球が円形でなくして、歪んだものがある場合これと壊れた赤血球との鑑別が難しく、壊れた赤血球であるとしても患者においては重要な最近破損したものの可否かを明確な判断ができず、溶血性貧血の診断及び治療にかなりの難しさを有していた。つまり、末梢血液内の壊れた赤血球の存在は微細血管病性溶血性貧血(MAHA)の最も重要な徴候であるばかりでなく、播種性血管内の凝固症のような血管内の溶血と関連した他の多くの疾病においても重要な徴候である。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】

このような壊れた赤血球の存在を確認するために利用される唯一の方法は、血液を塗抹した後Romanovsky染色して顕微鏡で検査する方法にして、これは壊れた赤血球の定量的分析のための唯一の方法であった。しかしながら、この方法は労働集約的であって手間が多くかかり歪んだ正常赤血球と壊れた赤血球とを区別しにくく、たまには脾臓除去手術を受けた患者が溶血のような重要な臨床的症状の無い壊れた赤血球の増加症等の際だった異形赤血球増加症が現れる場合もある。

10

【0004】

従って、末梢血液内の壊れた赤血球検査及び定量化を迅速に成し得る新たな方法の開発が必要となり、臨床的重要性を有する新たに生成された壊れた赤血球と、臨床的重要性の無い古い壊れた赤血球とを区別できるとすればさらに好ましいことであろう。

血管の溶血症の場合には球状赤血球症と卵型赤血球症等の異形赤血球増加症が頻繁に関連している。自家免疫性溶血性貧血症において用いられる抗グロブリンテストのような各々の疾病のための特別な実験室検査法が利用可能なものの、血管外溶血症の初期診断は極めて難しい問題点があった。

20

【0005】

【課題を解決するための手段】

本発明はこのような問題点を解決するために発明されたものにして、患者より血液を抽出した後、末梢血 $2\mu\text{l}$ をPEと接合させた抗血色素の抗体で0.6%の食塩水で常温下で15分間染色した後、洗浄せずに3mlの食塩水を添加して流細胞分析機で分析する検査方法であって、本発明の流細胞分析法は洗浄またはlysing stepが不要となり、結果は20分以内に容易に得ることができる。

30

【0006】

従って、血液塗抹における壊れた赤血球の数を数えることはかなりの手間が掛かり、たまには歪んだ赤血球との区別が難しかったものの、本実験の簡便で迅速な方法を用いることにより、壊れた赤血球等損傷した赤血球の正確な測定が可能であるばかりでなく、抗血色素抗体を用いた流細胞分析機により、新たに生成された損傷赤血球のみを検出する迅速かつ、正確な溶血性貧血検査方法を新たに提示できるようにしたものである。

【0007】

以下に本発明の実施例を詳細に説明すると下記の通りである。患者より血液を抽出した後、末梢血 $2\mu\text{l}$ をPEと接合させた抗血色素の抗体で0.6%の食塩水で常温下で15分間染色する段階と；前記染色後洗浄せずに3mlの食塩水を添加する段階と；前記3mlの食塩水を添加し流細胞分析機で分析する段階とを有する溶血性貧血検査方法である。

40

【0008】

【発明の実施の形態】

このように成される検査方法を実施するために先ず貧血患者70名、微細血管病性溶血性貧血(MAHA)患者42名、マラリア患者8名、球状赤血球症患者8名(遺伝的球状赤血球症患者3名、自家免疫性溶血性貧血症患者3名、原因不明の球状赤血球症患者2名)、卵型赤血球症患者2名、脾臓除去手術を受けた患者6名、鉄分欠乏症貧血(IDA)患者4名と対象群として健康な成人血小板提供者107名を対象に実験を行った。

【0009】

MAHA患者42名の内40名が急性または慢性白血病患者であって彼等の内19名が骨

50

髄移植 (B M T) を受けた。

前記脾臓除去手術を受けた患者 6 名の内 4 名が原因不明血小板減少性紫斑病 (I T P) のため、15 日乃至 5 年前に脾臓除去手術を受け、残りの 2 名の患者は慢性骨髄性白血病により巨大脾腫大のため 2 か月乃至 3 年前に脾臓除去手術を受けた。

さらに、遺伝的球状赤血球症患者 3 名全てが父母及び兄弟等のサンプルも調査した。

前記患者等は浸透圧脆弱性検査結果 0.52 ~ 0.62 % の塩化ナトリウム溶液 (C) で溶血開始が現れた。

前記マラリア患者全員は *Plasmodium vivax* により感染した。

本発明の実験では赤血球計算のため EDTA で抗凝固させた血液サンプルを採取した後 4 時間以内に使用し、分析前には常温 (18 ~ 20) で保管した。

10

前記サンプル患者に基づき本発明で行った実験を詳細に調べて見ることにする。

【 0 0 1 0 】

流細胞分析機を利用した損傷赤血球分析

患者より抽出した損傷赤血球は生理食塩水では抗血色素抗体で染色されなかった。損傷赤血球の血色素が損傷した膜を通じて抗血色素抗体に露出され得る適正食塩水濃度を見出だすため、M A H A 患者 10 名と正常人 10 名から末梢血液を採取して 0.2 % ~ 2.0 % の範囲内で濃度別に抗血色素抗体 (デンマーク、D a k o A / S) で染色した。その結果 M A H A 患者のサンプルと正常人のサンプルとを区別し得る適正濃度は 0.6 % の食塩水として現れた。

【 0 0 1 1 】

20

本発明では試薬の安定性検査のため、正常人 5 名と M A H A 患者 5 名のサンプルを 0.6 % の食塩水と混ぜた直後、1 日後、2 日後、3 日後、4 日後、5 日後、6 日後、7 日後に抗体で染色した。この時、抗体は *phycoerythrin* (P E) で標識し、保存剤として 0.1 % のゼラチン、ペンタクロロフェノールと共に、燐酸塩緩衝食塩水で希釈され抗体塩基溶液の浸透圧は 316 m O s m / k g であった。抗血色素抗体 5 μ l を夫々の食塩水 50 μ l と混合した。

前記抗体混合物の浸透圧は 0.6 % の食塩水 213 m O s m / k g であった。残りのサンプル等は抗体と 0.6 % の食塩水混合物を用いて実験した。さらに末梢血液 2 μ l をこの抗体 - 食塩水混合物に添加して常温で 15 分間放置した。

前記末梢血液 2 μ l をこの抗体 - 食塩水混合物に添加して常温で 15 分間放置した状態で洗淨せずに食塩水 3 m l を直ぐに添加した。

30

この時、蛍光物質を *CELLQuest* ソフトウェアを用いて、流細胞分析機 (F A C S C a l i b u r , B e c k t o n D i c k i n s o n) で分析した。さらに、*Ca li B R I T E T M* 器具 (B e c t o n D i c k i n s o n) で流細胞分析機を 1 週間に 2 回ずつチェックし *Autocamp* ソフトウェアで 1 か月に 1 回ずつチェックした。

【 0 0 1 2 】

本発明で流細胞分析機通路の器具セッティングは線形モードであって、前方散乱 (F S C) 閾値は 52 であり、20,000 個の細胞が分析貯蔵された。壊れた赤血球の一部が無損傷赤血球より小さいものと予想されたため、無損傷赤血球及び血小板全体を含む *large gate* を使用した。

40

前記全てのサンプル等はやはり標識のため同形対象群抗体 (B e c t o n D i c k i n s o n , S a n J o s e , C A) で染色され、標識等は同形対象群の血清を用いてセッティングされ、この方法の精度を評価するために正常サンプル 2 個、M A H A サンプル 2 個を 10 回分析した。

【 0 0 1 3 】

赤血球形態の顕微鏡検査

前記全てのサンプルより血液塗抹を制作し、空気中で乾燥した後、*W r i g h t* 染色を実施して 2 名の病理専門医が検査した。1,000 倍顕微鏡の視野で観察される平均赤血球数が略 200 個であるため本研究では 1,000 倍視野で観察される壊れた赤血球数を

50

数えた後2で割った値を壊れた赤血球%に使用した。

以上のような流細胞分析機を利用した損傷赤血球分析及び赤血球形態の顕微鏡検査の統計を調べて見るに、全ての統計数値は独立標本T - t e s tで分析された。

従って、抗血色素標識された赤血球の比率と顕微鏡検査による壊れた赤血球数の相関関係を評価するためにピアソン相関分析で計算した。有意性検査はSPSSを利用したWilcoxon Signed Ranks testで行った。

【0014】

食塩水濃度別流細胞分析機検査結果

食塩水濃度別流細胞分析機の検査では0.2%の食塩水で正常人と患者等の赤血球50%以上の抗血色素で染色され、食塩水の濃度が0.6%までは食塩水濃度が増加するに従い染色された赤血球比率が減少した。 10

前記0.6%の食塩水ではMAHAサンプルだけが染色された赤血球が1%以上であり、正常人サンプルは全て1%未満であった。これより高い食塩水濃度(0.7~2.0%)では正常人やMAHA患者サンプル全て抗血色素で染色されなかった。

【0015】

0.6%食塩水で流細胞分析機の検査結果

前記夫々のグループで染色された赤血球の比率を表1に示す。

【表1】

group	member of cases	meant SD(%)
normal control	107	0.55 ± 0.23
microangiopathic hemolytic anemia	42	2.95 ± 2.95
malaria	8	1.87 ± 0.72
spherocytosis	8	3.02 ± 1.12
postsplenectomy	8	0.78 ± 0.24
iron deficiency anemia	4	0.59 ± 0.11

【0016】

本発明で試薬は1週間までは安定であって、染色された赤血球の比率が減少せず、分散係数は15.0%であった。正常人の染色された赤血球の比率は0.55 ± 0.23%であ 50

って、107名中7名だけが染色された赤血球の比率が1%以上のものとして示された。M A H A 患者の染色された赤血球の比率は正常人より有意的に高く、($2.95 \pm 2.95\%$ 、 $P = 0.000$)、42名中1名だけが染色された赤血球の比率が1%以下のものとして示された。この時、壊れた赤血球の数は $3.1 \pm 1.8\%$ であり、抗血色素により染色された赤血球の比率と相関関係があった ($r = 0.637$ 、 $P = 0.000$)。マラリア患者の染色された赤血球の比率も正常人より有意的に高く、($1.87 \pm 0.72\%$ 、 $P = 0.001$)、染色された赤血球の比率が1%より少ない唯一な場合はスライド上にただ一つの輪状のマラリア原虫であることが判明した。

【0017】

さらに、球状赤血球症患者の染色された赤血球の比率は正常人より有意的に高く、($3.02 \pm 1.12\%$ 、 $P = 0.000$)、8名のサンプル全てが染色された赤血球の比率が1%以上のものとして示された。遺伝的球状赤血球症患者と自家免疫性溶血性貧血症患者間には有意的な差がなかった。

本発明で浸透圧脆弱性検査結果2名の遺伝的球状赤血球症患者の場合0.52%の食塩水で溶血が開始され、0.6%の食塩水では溶血が現れなかったものの、夫々赤血球の5.06%と2.24%が抗血色素により染色された。残りの1名が遺伝的球状赤血球症患者のサンプルは0.62%で溶血が開始され、赤血球の3.40%が0.6%の食塩水で抗血色素で染色されて、患者の父親のサンプルは0.5%で溶血が開始されたものの、赤血球の4.04%が0.6%の食塩水で抗血色素で染色された。

際立つ卵型赤血球症患者2名は染色された赤血球が夫々2.20%と2.21%であった。

【0018】

以前に脾臓除去手術を受けた患者の染色された赤血球の比率は正常人と近似していた ($0.78 \pm 0.24\%$ 、 $P = 0.069$)。多数の壊れた赤血球 (平均 4.42%) と有核赤血球が末梢血液で発見されたものの、壊れた赤血球の数は抗血色素により染色された赤血球の比率と相関関係が無かった ($P = 0.853$)。

鉄分欠乏症患者は全て染色された赤血球の比率が1%以下のものとして示された ($0.59 \pm 0.11\%$)。

【0019】

前記のように実施される本発明の検査方法により現れた結果、壊れた赤血球細胞が血色素の損失無しに、いかにして血液内を循環することができたかは明らかにされていない。壊れた赤血球は細胞質の損失が生ずるので我々は壊れた赤血球を抗血色素の抗体で染色しようと試みた。しかしながら、等張液では染色されなかった。従って、赤血球を貯蔵液と0.6%の食塩水に放置することにより、損傷した細胞質の一時的な保護膜を通じて血色素を露出させようとした。濃度がさらに低い貯蔵液では一部正常赤血球も抗血色素で染色されたものの、これは0.6%の食塩水以下の貯蔵液で放置する場合、正常赤血球も損傷し得ることを意味するものである。さらに2%までの食塩水と同じ固定液での放置は正常サンプルとM A H A サンプル全て赤血球が抗血色素に染色されなかった。歪んだ赤血球は損傷した細胞質を通じて血色素を露出させることができなかった。

【0020】

正常人の染色された赤血球の比率は $0.55 \pm 0.23\%$ であって、M A H A 患者は正常人よりも有意に高かった ($2.95 \pm 2.95\%$ 、 $P = 0.000$)。壊れた赤血球の数は抗血色素によって染色された赤血球の比率と高い相関関係があった ($r = 0.637$ 、 $P = 0.000$)。本発明の実験で流細胞分析法は洗浄または *lysing step* が不要であり、結果は20分以内に容易に得られる。血液塗抹での壊れた赤血球の数を数えることはかなりの手間が掛かり、たまには歪んだ赤血球との区別がつかなくなる。しかしながら、本発明の実験が簡便で迅速な方法を用いることにより、壊れた赤血球の正確な測定が可能となる。

【0021】

しかも、脾臓除去手術を受けた患者の場合のように多数の壊れた赤血球が細胞内溶血症の

10

20

30

40

50

臨床的症狀無しに発見される場合がたまにある。このような場合顕微鏡検査だけでは壊れた赤血球の重要性を決定することが不可能である。本実験の流細胞分析法を用いる場合、脾臓除去手術を受けた患者に存在する古い壊れた赤血球は検出されなかった。脾臓は損傷した細胞等を循環から除去させる役割をするため、脾臓除去手術を受けた患者は壊れた赤血球が生き残ることができ、損傷された細胞質が持続的に治療でき得るほどの十分な時間の間血液内を循環することができる。前記本発明の実験の際、壊れた赤血球の流細胞分析検出法は脾臓除去手術を受けた患者に発生するM A H Aを診断し、モニターし得る唯一な方法となり得るであろう。

【0022】

さらに、マラリア患者の染色された赤血球の比率は正常人より有意的に高かった(1.87 ± 0.72%, P = 0.001)。マラリアはマラリア原虫により誘発される寄生性の疾病である。従って損傷した赤血球の一部が血液内を循環していることを発見した。風土性地域でこの方法を用いることにより、発熱患者の繰返し検査を通じてマラリアの診断にも貢献するであろう。

球状赤血球症患者の染色された赤血球の比率は正常人より有意的に高く(3.02 ± 1.12%, P = 0.000)。8名全てが染色された赤血球の比率が1%以上として現れた。

【0023】

本発明の検査方法において、遺伝的球状赤血球症患者と自家免疫性溶血性貧血症患者の間では染色された赤血球の比率の差が無かった。このような球状赤血球の変化は従来にも研究されてきており、細胞質膜の幾つかの構造的欠陥が報告されている。その欠点等は抗血色素抗体を通過させ得る程の十分な大きさのものと見える。

遺伝的球状赤血球症を診断するための実験室テストとして、浸透圧脆弱性検査と顕微鏡検査がある。遺伝的球状赤血球症患者の家族において、患者の父母と2名の兄弟は正常的な浸透圧脆弱性を示しているものの、父母の内父は抗血色素により染色された赤血球が増加したことが見出された。このような結果は本実験に伴う損傷された細胞の流細胞分析検出法が浸透圧脆弱性検査よりさらに正確な方法であることを示すものである。

【0024】

自家免疫性疾病等は米国で若い女性と中年の女性等の主要死亡の原因である。自家免疫性溶血性貧血は略10%の全身性紅班性ループス患者に発生するものの、溶血が軽症の場合が一層一般的であり得る。これがこの疾病の唯一な発病徴候でもあり、他の疾病の徴候が現れるのを数年繰り上げることもできる。しかしながら直接抗グロブリンテストが自家免疫性溶血性貧血の唯一な診断方法であるため、損傷された細胞に対しこの流細胞分析機を用いることにより、他の疾病の徴候が現れる前に軽症の溶血症を初期に検査することができる。

卵型赤血球症も亦かなりの遺伝的な疾病であり、機能障害または膜蛋白質欠乏症が報告された。卵型赤血球症患者2名全てより球状赤血球症患者のように抗血色素によって、染色された赤血球が増加したものと現れた。従って、球状赤血球症と卵型赤血球症が主に血管外溶血症で発見されるものの、本実験結果はこれら異形赤血球症の膜の欠陥が貯蔵液で抗血色素抗体が通過するに十分な程大きいことを説明している。

【0025】

本発明の実験で全ての鉄分欠乏性貧血症患者と涙の滴細胞または標的細胞のある患者は抗血色素により染色された赤血球の増加が見られなかった。これはこれら異形赤血球症患者等が損傷された細胞質を通じて血色素を露出するに十分な膜の欠損を有していないことを意味する。結論的に貯蔵液で抗血色素を用いて損傷された赤血球を検出する流細胞検査法は簡便で正確な溶血性貧血診断法である。さらに、溶血性貧血の初期診断を可能にし、重要な壊れた赤血球と重要で無い古い壊れた赤血球との区別に役立つ。

【0026】

【発明の効果】

以上のように、本発明は溶血性貧血検査方法において、生理食塩水貯蔵液で抗血色素を利

10

20

30

40

50

用して損傷された RBCs を検出する流細胞測定法を行い、溶血性貧血の迅速な診断のみならず重要な壊れた赤血球と重要で無い古い壊れた赤血球とを簡単でかつ容易に区別ができるようにすることにより、遺伝、妊娠、中毒、癌、骨髄移植の際、敗血症患者、火傷をした場合、現在患者の赤血球が破損進行中の可否を判断し得ることは勿論、従来の顕微鏡検査方法より精度が高く、時間が経った赤血球と最近に破損された赤血球を正確に診断し得るようにした効果を有するようになった。

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開昭63-122954(JP,A)
特開平02-073157(JP,A)
特開平10-160730(JP,A)
特開平06-027017(JP,A)
特開平07-005171(JP,A)
特表2001-502805(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
G01N 33/48-98

专利名称(译)	溶血性贫血检查方法		
公开(公告)号	JP3631203B2	公开(公告)日	2005-03-23
申请号	JP2001398562	申请日	2001-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	天主教中央医疗中心		
申请(专利权)人(译)	天主教中央医疗中心		
当前申请(专利权)人(译)	天主教中央医疗中心		
[标]发明人	韩庆子		
发明人	韩庆子		
IPC分类号	G01N33/49 G01N33/48 G01N33/53 G01N33/80		
CPC分类号	G01N33/80 Y02A50/58		
FI分类号	G01N33/53.K G01N33/48.P G01N33/49.A G01N33/49.K		
F-TERM分类号	2G045/AA02 2G045/AA07 2G045/AA25 2G045/BB21 2G045/BB24 2G045/CA02 2G045/CA25 2G045/DA50 2G045/FA37 2G045/FB03 2G045/FB07 2G045/GA02		
代理人(译)	大田章男		
优先权	1020000085709 2000-12-29 KR		
其他公开文献	JP2002257823A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

要解决的问题：提供一种溶血性贫血测试方法，不仅可以快速诊断溶血性贫血，还可以通过使用流动细胞测量方法检测患者体内重要的破碎红细胞和不重要的老红细胞，以检测受损的红细胞。在血液中存在破碎的红细胞的情况下，例如在微血管疾病贫血症中，含有抗血红蛋白抗体的生理盐水溶液。解决方案：在从患者体内提取血液后，将外周血2 μ l在常温下在含有与藻红蛋白结合的抗血红蛋白抗体的0.6%盐水中染色15分钟。在不进行清洗的情况下将3ml的盐水溶液加入到外周血2 μ l中，并在测试方法中通过流动池分析仪进行分析。消除了对清洁或溶解过程的需要。快速准确的溶血性贫血测试方法不仅可以准确地测量破碎的红细胞和其他受损的红细胞，还可以检测流式细胞分析仪新发生的受损红细胞。

group	member of cases	meant SD(%)
normal control	107	0.55 \pm 0.23
microangiopathic hemolytic anemia	42	2.95 \pm 2.95
malaria	8	1.87 \pm 0.72
spherocytosis	8	3.02 \pm 1.12
postsplenectomy	8	0.78 \pm 0.24
iron deficiency anemia	4	0.59 \pm 0.11