

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5738864号
(P5738864)

(45) 発行日 平成27年6月24日(2015. 6. 24)

(24) 登録日 平成27年5月1日(2015. 5. 1)

(51) Int.Cl.

F I

GO 1 N 33/53 (2006.01)

GO 1 N 33/53 L

GO 1 N 33/543 (2006.01)

GO 1 N 33/543 5 9 3

請求項の数 16 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2012-528272 (P2012-528272)
 (86) (22) 出願日 平成22年9月9日(2010. 9. 9)
 (65) 公表番号 特表2013-504070 (P2013-504070A)
 (43) 公表日 平成25年2月4日(2013. 2. 4)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2010/005548
 (87) 国際公開番号 W02011/029600
 (87) 国際公開日 平成23年3月17日(2011. 3. 17)
 審査請求日 平成25年7月17日(2013. 7. 17)
 (31) 優先権主張番号 102009040881. 9
 (32) 優先日 平成21年9月9日(2009. 9. 9)
 (33) 優先権主張国 ドイツ(DE)

(73) 特許権者 512059855
 アンドレアス・ヘティック・ゲーエムベー
 ハー・ウント・コー・カーゲー
 ドイツ・7 8 5 3 2・トゥットリンゲン・
 フォーレンシュトラッセ・1 2
 (74) 代理人 100108453
 弁理士 村山 靖彦
 (74) 代理人 100064908
 弁理士 志賀 正武
 (74) 代理人 100089037
 弁理士 渡邊 隆
 (74) 代理人 100110364
 弁理士 実広 信哉

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 共振器を利用した血小板の機能決定方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

接着異常または凝集異常を決定するための方法であって、
 血小板含有液体試料を活性化する工程；
 前記血小板含有液体試料と接触する測定表面を有する共振器の振動パラメーターを時間に対して測定する工程；
 前記振動パラメーターを時間に対して記録する工程；
 前記記録された振動パラメーターの特徴的な曲線を時間に対して分析する工程；
 前記記録された振動パラメーターの前記特徴的な曲線の前記分析に基づいて、血小板の接着および血小板の凝集を含む血小板の機能を決定する工程；
 前記特徴的な曲線を分析する前記工程に基づいて、接着異常の存在または凝集異常の存在を決定する工程；
 を含み、
 前記特徴的な曲線を分析する前記工程が、接着および凝集の両方に関して絶対的な血小板の機能異常を示す、前記振動パラメーターが時間に対して変化しないかどうかを決定することを含み、
 前記特徴的な曲線を分析する前記工程が、前記血小板が接着および凝集の両方に関して機能的であると考えられることを示す、前記振動パラメーターが時間に対して実質的に指数関数的に変化するかどうかを決定することを含み、
 前記特徴的な曲線を分析する前記工程が、前記血小板の機能が凝集に関して機能異常であ

10

20

るが接着に関して機能的であることを示す、前記振動パラメーターが時間に対して実質的に直線的に変化するかどうかを決定することを含む、方法。

【請求項 2】

前記振動パラメーターが、前記共振器の前記測定表面の共鳴周波数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】

前記共振器の減衰および / または増幅を前記振動パラメーターとして使用することの特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 4】

前記血小板の機能が、様々な活性化部分を誘発させる様々な活性剤を添加することによって、より詳細に決定されることを特徴とする、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 5】

前記活性化部分が各阻害剤の添加によってブロックされることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

個々の受容体の活性化および阻害化が、機能不全を示す受容体の同定を可能にすることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

個々の受容体または個々の受容体グループの阻害化または活性化が、特定の抗体またはその部分を介して、あるいはレクチン、核酸の断片などの他の特定の結合分子を介して成し遂げられることを特徴とする、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

個々の受容体の活性化および阻害化が、機能不全を示す受容体の同定を可能にすることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 9】

個々の受容体または個々の受容体グループの阻害化または活性化が、特定の抗体またはその部分を介して、あるいはレクチン、核酸の断片などの他の特定の結合分子を介して成し遂げられることを特徴とする、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 10】

接着異常または凝集異常を決定するための方法であって、
血小板含有液体試料と接触する測定表面を有する共振器の振動パラメーターを時間に対して測定する工程であって、前記血小板含有液体試料が、非-活性化血小板含有液体試料である、工程；

前記振動パラメーターを時間に対して記録する工程；

前記記録された振動パラメーターの特徴的な曲線を時間に対して分析する工程；

前記記録された振動パラメーターの前記特徴的な曲線の前記分析に基づいて、血小板の接着および血小板の凝集を含む血小板の機能を決定する工程；

前記特徴的な曲線を分析する前記工程に基づいて、接着異常の存在または凝集異常の存在を決定する工程；

を含み、

前記特徴的な曲線を分析する前記工程が、接着および凝集の両方に関して絶対的な血小板の機能異常を示す、前記振動パラメーターが時間に対して変化しないかどうかを決定することを含み、

前記特徴的な曲線を分析する前記工程が、前記血小板が接着および凝集の両方に関して機能的であると考えられることを示す、前記振動パラメーターが時間に対して実質的に指数関数的に変化するかどうかを決定することを含み、

前記特徴的な曲線を分析する前記工程が、前記血小板の機能が凝集に関して機能異常であるが接着に関して機能的であることを示す、前記振動パラメーターが時間に対して実質的に直線的に変化するかどうかを決定することを含む、

10

20

30

40

50

方法。

【請求項 1 1】

前記振動パラメーターが、前記共振器の前記測定表面の共鳴周波数であることを特徴とする、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記振動パラメーターが、前記共振器の減衰および / または増幅であることを特徴とする、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 3】

非活性化液体試料の時間に対して振動パラメーターの変化が存在する場合に、血小板が接着できるとみなされることを特徴とする、請求項 1 0 に記載の方法。

10

【請求項 1 4】

非活性化液体試料の振動パラメーターの変化が存在する場合に、血小板が接着できるとみなされることを特徴とする、請求項 1 1 に記載の方法。

【請求項 1 5】

非活性化液体試料の時間に対して振動パラメーターの変化が存在する場合に、血小板が接着できるとみなされることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

【請求項 1 6】

非活性化液体試料の振動パラメーターの変化が存在する場合に、血小板が接着できるとみなされることを特徴とする、請求項 1 2 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

20

【技術分野】

【0 0 0 1】

本発明は、請求項 1 のプリアンブルにおいて特定される血小板の機能とそのタイプの決定方法に関する。

【背景技術】

【0 0 0 2】

凝固を可能にするために、一次止血および二次止血の両方が完全に機能的である必要がある。二次止血を検査するたくさんの方が既に知られている。しかしながら、血小板の接着および凝集にさらに分けることが可能である一次止血に関しては、特定の血小板機能を決定するための十分で正確な分析方法は、いまだ、先行技術において開示されていない。

30

【0 0 0 3】

先行技術にしたがって、止血を検査するための血液分析は可能である。しかしながら、これらの検査は、機能不全であるのが一次止血の接着段階なのか、または凝集段階なのか、あるいは凝集がどのような態様で阻害されているのかを決定するために使用することができない。

【0 0 0 4】

血小板が接着を介して振動水晶振動子(vibrating quartz crystal)の表面に吸着するように調製できることが知られている。このような吸着の質(quality)を測定することは可能であるが、かかる測定によっては機能不全の凝集は特に何ら同定され得るわけではない。

40

【0 0 0 5】

「Real-Time Monitoring of Adhesion and Aggregation of Platelets using Thickness Shear Mode Sensors」との表題をつけられた公表文献には、振動水晶振動子を使用する目的を有する、血小板の接着および凝集の凝固相の分析が開示される。この文献にて説明されるように、異なる相、接着および凝集の質(quality)は、振動水晶振動子を用いて検出可能である。しかしながら、接着および凝集に関しての血小板の機能性を検査するという課題は解決しない。この刊行物からは、凝集の成就が高周波数および / または減衰の変化を生じさせるので、正常な凝集を、不十分な血小板の接着性とかなり良好に区別することが可能であることが理解される。同様に、血小板の凝集能力を決定することが理解され

50

る。しかしながら、この方法では、周波数の偏差がADPの添加のみならず血小板の濃度、振動水晶振動子表面の結合強度および血小板の接着性に依存するので、血小板の接着と凝集の能力の間において信頼できる区別をすることができない。結果として、この方法は周波数の低下が生じるか否かを単に決定できるだけであり、血小板自身の接着が、ある条件下で、既に強い周波数の低下を引き起こし得るので、偽陽性の決定が為され得る。US2005/0015001 A1もまた上述に説明したことを基本的に開示する。

【 0 0 0 6 】

「A New Method for Continuous Measurement of Platelet Adhesion under Flow Conditions」との表題をつけられた刊行物は、血小板の接着が測定可能であることを開示するが、機能不全の分析に対する測定とは関係がなく、凝集の機能の評価と測定を組み合わせ

10

【 0 0 0 7 】

「Potential of Vibrating Quartz Crystal Sensors for Inline Haemostasis Testing」(ドイツ語から翻訳)との表題をつけられた講義集のシート24は、血小板の機能の評価を可能にする、2つの周波数曲線を示す。そのうちの1つの図は、活性化された血液の振動水晶振動子の測定中の周波数低下を示し、2つ目の曲線は抑制された血液の場合には周波数低下が見られなかったことを示す。これは、機能が振動パラメーターの挙動に由来し得ることを示すに過ぎない別の方法である。しかしながら、これらの文書には、評価される機能が、振動水晶振動子の表面への物質の接着、凝集または他の何らかの性質の吸着を示すかどうかは示されていない。かかる開示を集めても明確な機能を割り当てることはできないであろう。

20

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 0 8 】

【特許文献 1】US2005/0015001 A1

【非特許文献】

【 0 0 0 9 】

【非特許文献 1】Real-Time Monitoring of Adhesion and Aggregation of Platelets using Thickness Shear Mode Sensors

【非特許文献 2】A New Method for Continuous Measurement of Platelet Adhesion under Flow Conditions

30

【非特許文献 3】Potential of Vibrating Quartz Crystal Sensors for Inline Haemostasis Testing

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 1 0 】

本発明の目的は、細胞凝固のどの部分が不完全であるかに関して評価を示すことを可能にする方法を提供することである。

【課題を解決するための手段】

【 0 0 1 1 】

かかる目的は請求項 1 において特徴付けられる特性によって達成される。

40

【 0 0 1 2 】

既知の方法では、共振器の振動パラメーターは一次止血パラメーターを決定するために測定される。前記共振器の表面を、血小板を含む液体試料と接触させる。これにより、血小板または他の血液成分を振動水晶振動子の表面に吸着させることとなり、それによってその振動挙動に影響が与えられる。

【 0 0 1 3 】

本発明によれば、血小板の機能を決定するために、液体試料を共振器の表面に適用し、1つまたは複数の振動パラメーターの特性および/または動態(kinetics)の分析を実施して、次いで、それを、血小板の機能を評価するための基準として使用する。この特性に基

50

づいて、さらに、全体的な機能不全、または血小板の接着もしくは凝集の機能障害との区別が為される。この目的のために、時間に対する振動パラメーターの曲線の特性が評価され、かかる評価に照らして、どの細胞凝固部分(cellular coagulation branch)が不完全であるかに関して評価が行われる。この方法により、共振器を用いた診断的な調査が可能になる。

【0014】

どの凝固部分が不完全であるかをいったん確立した後は、対応する薬物療法の正確な調整が可能となるので、これは非常に有利である。一般に、これらの試験方法は、細胞凝固(cellular coagulation)に関する莫大な情報のプールを提供する。十分に計画された薬物療法は患者の副作用を明確に低減し、有意なコスト削減を可能にする。

10

【0015】

全般的に、本発明の第一の実施態様において、振動パラメーターは共振周波数を元に分析される。あるいは、共振器の減衰および/または増幅を分析することもまた可能である。特に、この目的のために、基本振動が調べられる。

【0016】

測定を開始した後に、血小板を含む液体試料を振動水晶振動子に適用する。時間に対する振動曲線に変化がなければ、血小板機能が不完全であると推定される。これは、こういった血小板が表面に接着することができないことを意味する。結果として、凝集もまた不可能である。接着が不可能な場合には血液凝固が生じないために、さらなる試験は不要である。このようにして、こういった機能不全は接着の異常に対応する。

20

【0017】

対照的に、振動パラメーターが時間に対して多かれ少なかれ直線的に低下する場合、血小板は基本的には接着できると結論付けられる。接着は阻害剤の添加によって阻むことが可能である。例えば、接着は、GPIIb/IIIa受容体をブロックすることによって阻める。したがって、試料がその接着性に関して陽性といったん分析された場合、人工的に抑制された血小板の機能の試験を繰り返して、結果を検証することが可能となる。

【0018】

本方法によれば、振動水晶振動子に適用される非活性の液体試料に含有される血小板は、振動パラメーターの低下に基づいて接着できると評価される。

【0019】

液体試料に含有される血小板の凝集能力の試験のために、液体試料はまず活性化されなければならない。試料の活性化は活性剤を添加することによって実施する。活性剤は、試料の適用のちょっと前に添加されるか、または、振動水晶振動子はその表面に活性剤を既に取り込んで含むかのいずれでもよい。かかる場合、本方法にしたがって、振動パラメーターは時間に対しても記録される。例えば、指数関数型の、時間に対する振動パラメーターの急落が検出される場合、血小板は凝集が可能であると判明する。

30

【0020】

活性化された試料での振動水晶振動子の振動挙動が非活性な試料でのそれと同一である場合、血小板は接着できるが、凝集できないと判明する。診断は凝集の異常となる。

【0021】

さらに、様々な活性剤を添加することによって、どの血小板受容体が機能不全であるかが決定され得る。したがって、様々な活性化経路が、対応する活性化経路の機能不全を絞り込むことを可能にする、例えば、フォン・ヴィレブランド因子(vWF)、アラキドン酸(AA)、アデノシン二リン酸(ADP)またはフィブリノゲンの添加によって誘発され得る。

40

【0022】

このような絞り込みは、良好な血小板凝集において様々な受容体がブロックされることによって達成され得る。調査しようとする1つの受容体を除くすべての受容体をブロックする場合、活性化された試料の凝集挙動を測定することによって、この受容体が不完全であるかどうかを確立することが可能となり、振動パラメーターの曲線が接着を示唆する場合、ブロックされていないかかる受容体は不完全であるとみなされ得る。

50

【 0 0 2 3 】

特に、個々の受容体を活性化することおよびブロックすることは、機能不全の受容体の同定を可能にする。さらに、特定の抗体またはその部分による個々の受容体グループのブロックまたは活性化もまた想定される。さらに、レクチンまたは核酸断片などの他の特定の結合分子によっても、かかる機能の同定が達成され得る。

【 0 0 2 4 】

例えば、フィブリノゲンなどの活性剤が振動水晶振動子の表面中に既に取り込まれている場合には、さらに有利であることが判明している。全体的な装置がより単純な設計から為され得るという理由のために、試料の活性化から実際の測定までの期間を可能な限り短かく保持しなければならないという問題がこれにより回避される。したがって、血小板は、フィブリノゲン層に接着することにより活性化され、次いで凝集を生じさせる。

10

【 0 0 2 5 】

本発明のさらなる有利性、特徴およびなし得る適用は、図面に描写される実施形態と組み合わせ、続く記載から自明である。本発明はこれより図面を参照してより詳細に記載される。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 2 6 】

【図 1】血小板の機能を決定するための方法のフローチャートである。

【図 2】機能不全、接着および凝集の場合の振動パラメーターの各経過の概略図である。

【発明を実施するための形態】

20

【 0 0 2 7 】

図 1 は血液試料における血小板の機能の測定方法のフローチャートである。まず、活性化されておらず、接着性がブロックされている血小板を振動水晶振動子に適用する。例えば、Abciximabによってコラーゲン受容体またはGPIIb-IX受容体をブロックすることによって接着性を人工的に抑制可能である。これは、振動水晶振動子表面への血小板の接着を防ぐことにより、共振周波数の影響を受けない基準曲線を生み出す。

【 0 0 2 8 】

基準曲線を記録した後に、さらなる液体試料を同じ振動水晶振動子または洗浄された振動水晶振動子のいずれかに適用する。この液体試料は、接着に関して受容体がブロックも活性化もされていない血小板を含む。続いて、曲線が分析される。阻害された接着受容体を含む試料の場合よりも、時間に対する共鳴周波数のより大きな急落が存在する場合、次いで、液体試料における血小板は接着できるとみなされ、さらなる測定工程が続く。

30

【 0 0 2 9 】

さらなる工程において、例えば、アデノシン二リン酸(ADP)、フォン・ヴィレブランド因子(vWF)または他の因子などの活性剤を用いて誘導された液体試料を振動水晶振動子の表面に適用する。先の工程における場合に比べて、時間に対する共鳴周波数のより大きな急落が観察される場合、これは、例えばフィブリノゲン活性化が利用された場合、一次凝集が機能的であることを暗示する。次いで、さらなる工程において、活性剤または活性剤によって誘導された試料を添加して、二次凝集を誘発させる。

【 0 0 3 0 】

共鳴周波数の低下が以前よりも明確にはっきりしている場合、二次凝集もまた機能的であるとみなされる。各活性剤の添加が共振器の振動挙動に影響を与えない場合、対応する受容体は機能不全であると推定され得る。

40

【 0 0 3 1 】

このフローは、まず阻害された試料、次いで非活性化された試料、続いて活性化された試料を測定することにより、間にランダムな回数すすぎ工程を伴う、全般的な手順を規定する。これは、さらに、この手順に含められるべき、阻害工程と活性化工程の複数の組み合わせをも可能にする。

【 0 0 3 2 】

これは、欠陥のある細胞凝集部分の正確な決定を可能にする。

50

【 0 0 3 3 】

図2は、時間に対する振動水晶振動子の3つの周波数曲線を示し、それぞれが異なる血小板の機能を示す。第一の周波数曲線は全時間に対して直線である。この場合、周波数の低下は観察することができない。これは、振動水晶振動子の表面に対して血小板が吸着されないか、取るに足らない量の血小板しか吸着されないことを意味する。このような周波数曲線は血小板の機能不全の明確な指標となる。場合により、振動水晶振動子表面への吸着は、Abciximabを添加することによる意図的なブロックによっても阻められる。かかる血小板は、機能不全のため、またはそれらが例えばAbciximabを用いて意図的に阻害されるためのいずれかのために、表面に接着することができない。

【 0 0 3 4 】

10

第二のグラフは時間に対する直線的な周波数の減少を示す。これは、振動水晶振動子の表面に対して、非常に多くの血小板および他の血液成分が徐々に吸着されていることを示す。このような周波数曲線から、接着が生じることが明確に結論付け可能である。

【 0 0 3 5 】

第三のグラフは周波数の急落を示す。かかる曲線は、凝集に関して少なくとも1つの機能性受容体を有する機能的な血小板の存在を示す。凝集のために、血液はまず活性化されなければならない。これは、アデノシン二リン酸(ADP)、フィブリノゲン、またはフォン・ヴィレブランド因子(vWF)を用いて引き起こされ得る。活性化はまた、アラキドン酸(AA)を用いて実現してもよい。使用される活性剤および/または場合により使用される任意の選択的阻害剤に応じて、これは、個々の血小板受容体の機能性の検証を可能にする。

20

【 図 1 】

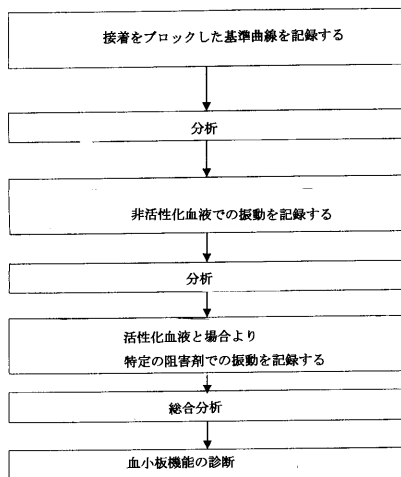


Fig. 1

【 図 2 】

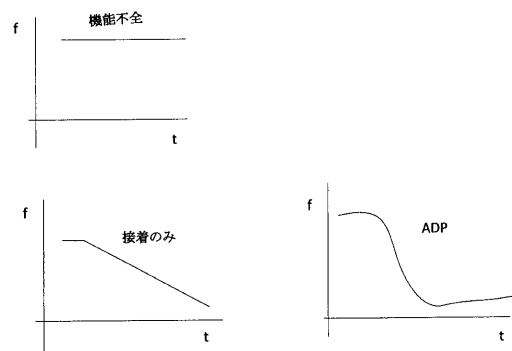


Fig. 2

フロントページの続き

- (72)発明者 フランク・カー・ゲーリング
ドイツ・7 2 3 6 4・オーベルンハイム・ビュールシュトラッセ・1
- (72)発明者 ハンス・ペーター・ヴェンデル
ドイツ・7 2 3 3 6・バーリンゲン・エアレンシュトラッセ・4 7
- (72)発明者 ステファン・ジン
ドイツ・7 1 0 8 3・ヘレンベルク・ラインシュトラッセ・4 / 1
- (72)発明者 ローター・ミュラー
ドイツ・6 5 2 0 5・ヴィースバーデン・ヴェークラッヘ・4 2

審査官 伊藤 裕美

- (56)参考文献 特開平0 8 - 0 8 5 7 2 6 (J P , A)
特開平0 6 - 3 0 8 1 3 0 (J P , A)
WELLE , COMPETITIVE PROTEIN ADSORPTION ON MICRO PATTERNED POLYMERIC BIOMATERIALS, AND V
ISCOELASTIC PROPERTIES OF TAILOR MADE EXTRACELLULAR MATRICES , BIOMOLECULAR ENGINEERING
 , 米国 , ELSEVIER , 2 0 0 7年 2月 9日 , V24 N1 , P87-91
POGLIANI E M , ACTA HAEMATOLOGICA , スイス , 1 9 8 9年 , V81 N1 , P1-4
- (58)調査した分野(Int.Cl. , D B名)
G 0 1 N 3 3 / 5 3 - 3 3 / 5 4 3

专利名称(译)	使用谐振器确定血小板功能的方法		
公开(公告)号	JP5738864B2	公开(公告)日	2015-06-24
申请号	JP2012528272	申请日	2010-09-09
[标]申请(专利权)人(译)	基于EM-安德烈亚斯·F·剔门难UND焦化游戏		
申请(专利权)人(译)	安德烈亚斯Hetikku GMBH UND岛卡格		
当前申请(专利权)人(译)	安德烈亚斯Hetikku GMBH UND岛卡格		
[标]发明人	フランクカーゲーリング ハンスペーターヴェンデル ステファンジン ローターミューラー		
发明人	フランク・カー・ゲーリング ハンス・ペーター・ヴェンデル ステファン・ジン ローター・ミューラー		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N29/036 G01N33/86 G01N2291/0256		
FI分类号	G01N33/53.L G01N33/543.593		
代理人(译)	村山彦 渡边 隆		
审查员(译)	伊藤弘美		
优先权	102009040881 2009-09-09 DE		
其他公开文献	JP2013504070A		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

本发明涉及一种通过测量具有测量表面的谐振器的振动参数来确定止血参数的方法，该测量表面接触含有样品流体的血小板。本发明的特征在于分析振动参数随时间的特征，然后基于该特征评估血小板功能，并且将在粘连病症的存在或聚集病症的存在之间进行区分。

【 図 1 】

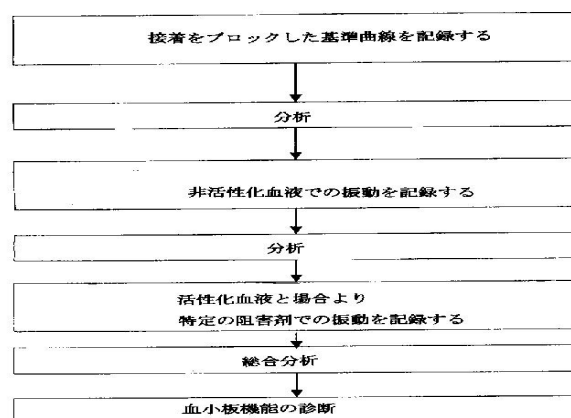


Fig. 1