

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月21日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590618

研究課題名（和文）新しい測定原理に基づく血小板凝集能検査の自動化法ならびに全血法の開発

研究課題名（英文）Development of automated device for the assessment of platelet aggregation using Platelet-rich plasma and whole blood samples.

研究代表者

佐藤 金夫（SATO KANEKO）

山梨大学・医学部・助手

研究者番号：20242662

研究成果の概要（和文）：現在の薬効評価法はADPやアラキドン酸の使用で最大4人の血小板凝集能を測定可能である。一方、本法では最大24人の測定が可能であり多検体を同時処理でき、大幅な省力化が可能である。コスト面では、マイクロプレートはディスポタイプで1枚100～200円程度で一測定あたり1～2円で済む。従来法では96検体の測定で消耗品代のコストが6000円程度かかり、本法は圧倒的に低コストである。また、測定試料も少量のため、少ない採血量で同等の情報を得ることができる。

研究成果の概要（英文）：Platelet aggregometer based on the optical density method can be measured up to 4 tests, which is induced by ADP or arachidonic acid. The new automated device can be measured up to 24 tests induced by the agonists. The new device have results under lower efforts, lower costs and small sample volume than the optical density method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：臨床検査医学・検査血液学

1. 研究開始当初の背景

アスピリンに代表される抗血小板療法は動脈血栓症の二次予防ならびに一次予防に欠くことのできない治療法であり、大規模臨床試験により、その意義は確立されている。しかしながら、アスピリンが動脈血栓症を低減する効果はたかだか20～30%である。一方で、非弁膜症性心房細動のある脳梗塞または一過性虚血発作患者における抗凝固療法の脳梗塞低減効果は60～80%であっ

た。このような低減効果の差異は、疾患の違い、患者背景、薬剤の特性などそれぞれに大きく異なる部分があり同一基準で論ずることに異論はあるが、抗凝固療法においてはPT-INRにより患者ごとに薬剤が至適濃度になるようモニタリングされていることが高い低減効果をもたらした可能性が考えられる。そのため、抗血小板療法においても適切なモニタリングをおこなうことで治療効果の向上が期待できるが未だ実証されてい

ない。

その原因として、現在の血小板凝集能検査は手間と時間の割に処理できる検体数が限られるため効率が悪く多検体処理が困難である、保険点数の切り下げにより試薬や消耗品のコストをカバーできない、などが挙げられる。現状では、専門のスタッフを雇い研究費で対応している施設が多く、検査室が医師の需要に対応できていない状況がある。

2. 研究の目的

現在、日本で普及している血小板機能評価法は **Born GVR** によって開発された血小板凝集能測定法（透過光法、吸光度法）を原理とする血小板凝集能であり、この方法では測定試料や試薬の分注をマニュアルで行うため測定が煩雑である、多検体処理に対応した装置がない、消耗品のコストが高い、などの難点があり、抗血小板薬の薬効モニタリングを実施している施設は少ない。海外においては **Verify Now (Accumetrics 社)** や **PFA-100 (dadebehring 社)** といった装置が抗血小板薬のモニタリングに利用され一定の評価を得つつあり、抗血小板療法におけるモニタリングの重要性について議論がされている。一方で海外の装置は消耗品が大変高価で6千～8千円にのぼり、日本の医療保険制度ではそのコストをカバーできないことから（血小板凝集能検査は50点）、国内販売の動きはない。そのため、多検体処理ができ、かつ低コストで測定できる新しい機構の血小板凝集能測定装置の開発を通じて自動化法の構築を試みる。この測定系をベースに、測定試料として全血を使用した測定系を開発を試みた。

3. 研究の方法

(1) 凝集装置の組み立て。

ウェル部分に光を通過させるための穴を開けた金型を作成し、マイクロプレートミキサー（テレシェイク1型、株式会社アイシス）に固定した。さらにLEDと受光素子をその上下に取り付け（図1）、連続的に吸光度変化をモニタできるようにして、96ウェルマイクロプレートを設置した。

(2) 血液の処理。

インフォームドコンセントを得た健康人から、3.8%クエン酸ナトリウム1容に9容の血液を肘静脈より採取した。処理した血液は1100rpmで12分間遠心し、上清を分離して多血小板血漿（PRP）とした。さらに3000rpmで10分間遠心し、上清を分離して乏血小板血漿（PPP）とした。

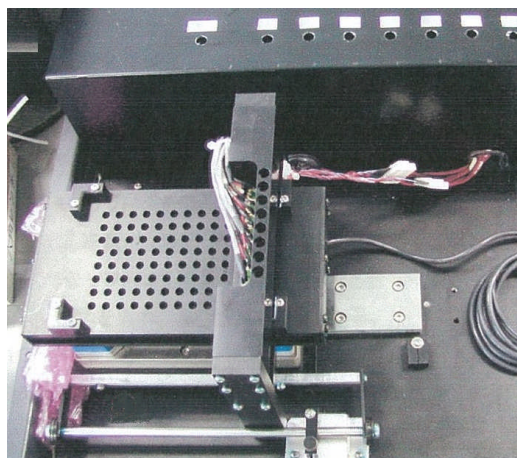


図1

(3) 振盪条件。

マイクロプレートミキサーの回転数を300rpmから1500rpmまで変化させて、振盪条件と血小板凝集能の反応性について検討した。

(4) ADP 惹起血小板凝集。

液量の異なるPRP（50～200 μ L）をマイクロプレートのウェルに分注し、adenosine 5'-diphosphate（ADP）惹起血小板凝集を測定した。マイクロプレートミキサーの振盪条件は300～1200rpmとした。

(5) 測光条件。

振盪による液厚の変化は当初の想定を上回って吸光度変化に大きく影響し、それが原因となってPPPとPRPの吸光度差が逆転することもあった。そこで、液厚の変化を取り除くため、一定間隔で振盪を停止する時間を組み込み、停止している間に吸光度を測光するために振盪プログラムに変更を加えた。

4. 研究成果

(1) 振盪条件。

300～1300rpmの間では良好な振盪が得られたが1300rpmを超えると回転軸から逸脱して振盪を維持できなかった。そのため、以後の実験では、安定的に振盪を維持させるため1200rpm以下で実験を実施した。

(2) ADP 惹起血小板凝集による振盪条件の決定。

PRPの液量が100 μ L以下ではPPPと比較して十分な吸光度差が得られず、凝集能の測定は不可能であった。この原因として回転運動による遠心力でPRPが外側に押しやられて光が通過する中心部分の液厚が減少することが考えられた。

800rpm未満の回転数では、本来生成すべき大きな血小板凝集塊が形成されず、凝集反応に必要な攪拌力が得られていないと考

えられた。

以上の結果より、安定した血小板凝集が得られる測定条件として、PRPの液量は150～200 μ L、を設定し、以後の検討に使用した。

(3) 測光条件.

振盪による液厚の変化は当初の想定を上回って吸光度変化に大きく影響され、そのことが原因となってPPPとPRPの吸光度差が逆転することもあった。そこで、液厚の変化を取り除くため、一定間隔で振盪を停止する時間を組み込むよう振盪プログラムに変更を加えた。

振盪停止をしてから液面が安定するまでに3秒程度を必要とした。また、攪拌により形成された血小板凝集塊の形成を維持するためには持続して20秒以上の攪拌が必要であった。この結果より、22秒間振盪したのち8秒間だけ振盪を停止して測光する条件を決定した。

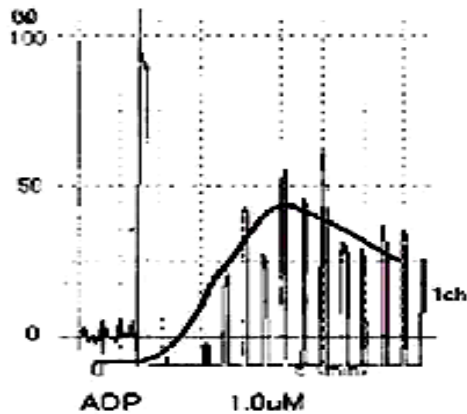


図2

一定間隔で振盪を停止することにより液面が水平な状態を維持でき、吸光度の安定性が向上した。その結果、振盪を停止しているタイミングでの吸光度を結んで移動平均をとることで解離を伴う一次凝集パターンが得られた(図2)。

ここまでの結果より、回転数を1200rpm、22秒振盪して8秒停止、PRP量180 μ Lとし、終濃度が0.5～4.0 μ MとなるADPを加えて濃度依存性を評価した。移動平均をとると、従来法である吸光度法と相似した反応曲線が得られ、新しい測定装置により血小板凝集能を評価することが可能となった(図3)。

(4) 本研究の意義

血小板凝集は攪拌しないと著しく反応が減弱するため測定には攪拌が必須であり、攪拌子を必要としない血小板凝集能検査はい

まだ実用化されていない。そこで、回転運動による遠心力で液体(PRP)を攪拌する測定方式の開発を試みて、実用化への目途をつけた。

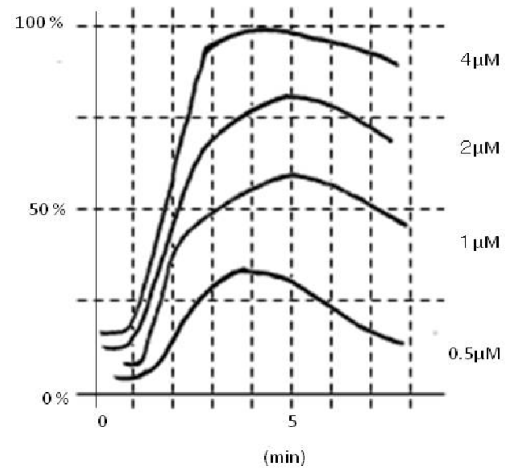


図3

マイクロプレートとミキサーというありふれた組み合わせではあるが、このような測定系で血小板凝集能を測定する試みはなく、着目点が非常に独創的である。

マイクロプレートを利用することで96測定を同時におこなうことができるため、短時間で多検体の血小板凝集能検査を行うことができる。これにより、検査にかかる時間を大幅に節約することができる。また、現行では96件の測定に要する消耗品代(キュベットとスターラーバー)は6000円程度であるが、マイクロプレートは1枚100～200円程度あり、このわずかな費用で96件の測定ができるため、コストを大幅に節約することができる。更に、自動化や多検体処理による省力化によって、抗血小板薬の薬効モニタリングがPT-INRと同様、簡便に実施されることで、抗血小板療法の治療成績向上の一助となることが期待できる。

マイクロプレートウェルは96穴のみならず8穴の製品も市販されており、こちらを使用することで更にコンパクトな装置を設計することが可能となる。装置の小型化により大病院だけでなく、市中の診療所といった小規模の施設においても検査を行いやすくなり、多くの患者が薬効モニタリングの恩恵を享受できる。

(5) 今後の展望

心筋梗塞や脳梗塞などの動脈硬化性疾患の増加に伴い、抗血小板薬を服用する患者は年々増加している。一方で、抗血小板薬を服用しているにも関わらず、血栓症の再発をきたす患者が20～50%にのぼり、これらの

患者では血小板機能が抑制されていないことがその原因の一つと考えられており、薬剤低反応性（抵抗性、ノンレスポnder）などと呼ばれ世界的に大きな問題となっている。

血小板機能評価法には複数あり、世界的にはPOCT (point of care test) と呼ばれる全血を用いた簡易検査が普及しつつある。一方で医療用機器として未承認であることやランニングコストの面から、日本国内では未だに導入していない。そこで、現在の医療資源下で抗血小板薬の薬効評価をする必要があるが、血小板凝集能検査は時間と手間のかかる検査であることから、一部の医療機関で実施されているにすぎない。

今回、開発した装置は同時に10～20人程度の血小板機能を同時に測定できることから、従来法と比較して10倍多く処理することが可能である。その結果、抗血小板薬を服用している患者に対して定期的に薬効モニタリングを実施することで、抗血小板薬の効果を確認するとともに、必要であれば薬剤の増量や他剤への変更をすることでより効果的に血小板機能を抑制し、血栓症の再発予防に大きく寄与できると期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. 尾崎由基男：血小板機能の新しい展開：血栓以外の役割. 臨床病理 (査読有) 2012; 60:52-59

2. Osada M, Kaneko M, Sakamoto M, Endoh M, Takigawa K, Suzuki-Inoue K, Inoue O, Satoh K, Enomoto N, Yatomi Y, Ozaki Y. Causes of thrombocytopenia in chronic hepatitis C viral infection. Clin Appl Thromb Hemost. (査読有) 2012;18:272-80

3. Inoue O, Suzuki-Inoue K, Shinoda D, Umeda Y, Uchino M, Takasaki S, Ozaki Y. Novel synthetic collagen fibers, poly(PHG), stimulate platelet aggregation through glycoprotein VI. FEBS Lett. (査読有) 2009;583:81-7

[学会発表] (計2件)

1. 尾崎由基男：血栓止血領域の診断、治療の最先端を探る 血小板機能検査の現状と課題. 日本医学検査学会. 2011. 6. 4 (東京)

2. 尾崎由基男：血小板機能の新しい展開 血栓以外の役割. 日本臨床検査医学会. 2011. 11. 27 (岡山)

[その他]

ホームページ等

<http://www.med.yamanashi.ac.jp/clinical/clinicallab/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 金夫 (SATO KANEKO)

山梨大学・医学部・助手

研究者番号：20242662

(2) 研究分担者

尾崎 由基男 (OZAKI YUKIO)

山梨大学・大学院医学工学総合研究部・教授

研究者番号：30134539

(3) 連携研究者

なし