

WO 2017/169261 A1



OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

明 細 書

発明の名称：

血液凝固系解析システム、血液凝固系解析方法及び血液凝固系解析用プログラム

技術分野

[0001] 本発明は、血液凝固系解析システム、血液凝固系解析方法及び血液凝固系解析用プログラムに関する。

背景技術

[0002] 生体内での血栓形成（凝固）及び溶解（線溶）は、複雑なカスケード反応により進行し、その反応には、凝固因子、フィブリノーゲン、フィブリン等を含む多数の分子成分、及び血管内皮細胞、血小板等の細胞成分の両方が関与する。

[0003] 凝固及び線溶に関わる疾患や傷害の治療あるいは予防においては、患者の血液凝固能及び線溶能を把握するために様々な検査が行われる。それら凝固及び線溶検査は、各種凝固因子、フィブリノーゲン、Dダイマーなどの凝固・線溶反応系に関与する特定分子の量を測定する定量検査、及び反応系全体あるいはその一部の働きの程度を評価する機能検査に大別することができる。

[0004] 凝固反応系は、組織因子と活性化凝固第VII因子の複合体形成を端緒とする機序（外因系）、及び異物との接触等の原因による第XII因子の活性化を端緒とする機序（内因系）に分かれており、両者は第X因子の活性化の段階で合流する。

[0005] なお、以下では血栓止血分野の慣習に従い、凝固因子を因子番号のローマ数字の先頭にFを付けて表記し、それが活性化されている場合は末尾にaを付すことにする。例えば、第XII因子、活性化第VII因子はそれぞれFXII、FVIIaと表記する。

[0006] 生成したFXaはプロトロンビン（FII）を活性化してトロンビン（FIIa）へと転換し、トロンビンの作用でフィブリノーゲンはフィブリンに転換される

。生成したフィブリンはお互いに重合し、更にFXIIIaの作用により不溶性の安定化フィブリンと呼ばれる3次元ネットワーク構造を形成する。このネットワーク構造に主として赤血球が巻き込まれた構造体が血栓であり、血小板もその構造形成に寄与する。ひとたび血栓が形成されると、凝固が亢進し過ぎるのを抑制するために線溶反応系が働き始め、止血の役割を果たし終えた血栓はやがて溶解される。

[0007] 外因系凝固能と内因系凝固能の機能検査として、それぞれプロトロンビン時間（PT）と活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）が広く普及している。これらの検査では、それぞれ外因系と内因系凝固反応を惹起する物質（例えば、それぞれ組織因子とエラグ酸）を大過剰に添加し、短時間で検査結果が得られるようにしている。プロトロンビン時間と活性化部分トロンボプラスチン時間の正常値は、それぞれおよそ10秒と30～40秒である。従って、これらの検査は著しい凝固能の低下、すなわち出血傾向を評価するのに好適であるが、逆に著しい凝固能の亢進、すなわち血栓傾向、あるいは凝固能の微妙な変化を評価するのには適していない。また、前記の検査は血液試料を遠心分離して得られる血漿を用いて行われるが、生体内の凝固反応において重要な役割を果たす血小板・赤血球等の細胞成分が遠心分離により除去されるため、検査結果が実際の臨床的病態と齟齬することも多い。

[0008] 別の機能検査として、トロンボエラストグラフィー及びトロンボエラストメトリーがあり、それぞれTEG 5000（登録商標、ヘモネティスク社）及びROTEM delta（登録商標、ティムイノベーションズ社）として実用化されている。

[0009] TEG 5000では、測定容器であるカップに全血検体を注入し、検査目的に応じた惹起物質を添加したうえで、容器の上部よりワイヤーで吊るされた棒状のピンを浸漬し、容器に対して定常的な往復角運動（典型的には10秒間で4.45度の範囲を往復する運動）を与える。凝固反応の進行に伴い検体の粘弾性が増加し、カップとピンの相対運動は小さくなり、従ってピンの回転変位は増加する。この回転変位を装置内の光学系を用いて経時的に記録することで、

トロンボエラストグラムと呼ばれる波形が得られる。カップではなくピンに対して往復角運動が与えられるという違いはあるものの、ROTEM deltaも基本的に同一の原理に基づいている。前記プロトロンビン時間や活性化部分トロンボプラスチン時間が凝固の終点検出法であるのに対して、トロンボエラストグラフィーやトロンボエラストメトリーは、凝固開始から血栓形成、更にはその後の線溶までの一連のプロセスをひとつの装置で経時的にモニタリングできるという利点がある。

[0010] 前記トロンボエラストグラフィーやトロンボエラストメトリーは、凝固カスケード反応の最終段階であるフィブリン生成に注目し、そのネットワーク形成（凝固）と溶解（線溶）のプロセスを検体の粘弾性を通じてモニタリングすることで、フィブリン生成に至るまでの反応系全体の働きを包括的に検査しているということができる。

[0011] しかし、トロンボエラストグラフィーやトロンボエラストメトリーは、（１）測定が自動化されておらず、検査結果が測定者の手技に依存する、（２）振動の影響を受けやすい、（３）品質管理（QC）手順が煩雑で、QC用試薬が高価である、（４）出力信号（トロンボエラストグラム）の解釈に熟練を要する等の理由が、十分な普及を阻む第一の原因であると考えられる、等の問題がある。更に、外因系や内因系の各凝固因子の欠乏に対して、それほど高い感度を示さないため、医療現場のニーズを満足できない場合がある。

[0012] 一方、近年、血液凝固測定を簡便且つ正確に評価することができる手法として、血液凝固過程の誘電測定を行う方法が考案された（特許文献１、特許文献２）。この手法は、１組の電極対等からなるコンデンサー状の試料部に血液を充填し、それに交流電場を印加して血液の凝固過程に伴う誘電率の変化を測定する方法である。この手法を用いることで、簡便に凝固及び線溶反応のプロセスをモニタリングできることが示されている（非特許文献１）。

先行技術文献

特許文献

[0013] 特許文献１：特開2010-181400号公報（特許第5691168号公報）

特許文献2：特開2012-194087号公報（特許第5768422号公報）

[0014] 非特許文献1：Y. Hayashi et al., Analytical Chemistry 87(19), 10072-10079 (2015)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0015] 周術期以外においては、外因系あるいは内因系凝固因子が多少不足しても直ちに止血困難となることは無く、例えば、血友病患者においてFVIIIやFIXの不足によりその重症度が分類されるが、重症とされるのは健常者と比較して上記因子が1%以下である場合であり、5~40%もあれば軽症に分類され日常生活に支障は無い。一方、人工心肺を用いた心臓手術等の場合は、出血の原因を特定して適切な処置を行うことが重要であり、凝固因子の不足が健常者と比較して数十%であっても、その不足を感度良く反映する検査法が求められている。しかし、既存の包括的血液凝固検査はそこまでの感度は無く、また、各凝固因子の定量測定は血漿の分離等の手間がかかるため、医療現場のニーズにマッチしない。

[0016] そこで、本願発明者らは、例えば上記特許文献1、特許文献2に記載された血液凝固系解析手順・装置等に新たな手順・装置を追加することにより、外因系凝固因子あるいは内因系凝固因子の不足及び／又は機能低下を高感度に評価可能なシステムを提供するべく鋭意研究を行い、本技術を完成するに至った。

課題を解決するための手段

[0017] すなわち、本技術は、
血液試料の血液凝固系測定を行う血液凝固系測定装置と、
前記血液凝固系測定装置による測定の結果から、凝固パラメータを抽出する凝固パラメータ抽出部及び
前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する血液凝固評価部、
を含む血液凝固系解析装置と、

を備え、

前記血液凝固系測定装置による測定は、外因系加速条件及び内因系加速条件で行われる、

血液凝固系解析システムを提供する。

前記血液凝固系解析装置は、前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価するフィブリノーゲン評価部を更に備えることができる。

また、前記血液凝固系測定装置は、血液試料の電気的特性を測定する血液電気的測定装置、又は血液試料の凝固塊の弾性変化を測定する。

血液試料の電気的特性を測定する血液電気的測定装置の場合、前記電気的特性は誘電率である。また、凝固パラメータは、前記誘電率によるクロット時間及びクロット強度を用いる。

本技術の血液凝固系解析システムは、前記血液凝固評価部に、前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の凝固因子の量及び／又は機能の程度を評価させる。

また、前記凝固因子は全般的凝固因子及び／又は共通系凝固因子であり、前記全般的凝固因子は外因系凝固因子及び／又は内因系凝固因子である。

[0018] また、本技術は、

血液試料の血液凝固系測定を外因系加速条件及び内因系加速条件で行う測定工程と、

前記血液凝固系測定の結果から凝固パラメータを抽出するパラメータ抽出工程と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する凝固評価工程と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価するフィブリン評価工程と、

を含む血液凝固系解析方法を提供する。

前記血液凝固系解析方法は、前記外因系加速条件で得られた血液凝固系測

定の結果と、前記内因系加速条件で得られた血液凝固系測定の結果との差分を用いて解析を行うことができる。

[0019] 更に、本技術は、血液試料の血液凝固系測定の結果から凝固パラメータを抽出する工程機能と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する工程機能と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価する工程機能と、
をコンピュータに実現させるための血液凝固系解析用プログラムを提供する。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]血液凝固系解析システムの構成を示す模式図である。

[図2]血液凝固系解析装置の構成を示す模式図である。

[図3]第1の実施形態における血液凝固系測定から血液凝固解析の工程を示すフローチャートである。

[図4]第1の実施形態におけるクロット時間（CT）のパラメータ抽出方法を示す図である。

[図5]第1の実施形態における健常者血液におけるクロット時間（CT）の組織因子濃度依存性を示すグラフである。

[図6]第1の実施形態における外因系及び内因系条件下の血液凝固系測定のデータの解析工程を示すブロック図である。

[図7]第1の実施形態における外因系及び内因系条件下の血液凝固系測定のデータの解析工程を示すブロック図である。

[図8]第1の実施形態における外因系及び内因系条件下の血液凝固系測定のデータの解析工程を示すブロック図である。

[図9]第1の実施形態における血液凝固系測定のデータの解析例を示すグラフである。

[図10]第1の実施形態における外因系及び内因系条件下の血液凝固系測定（R

OTEM) のデータの解析結果を示す図である。

[図11]第2の実施形態における外因系及び内因系条件下の血液凝固測定データの解析結果を示すグラフである。

[図12]第3の実施形態における血液凝固系測定データの解析例を示すグラフである。

[図13]第4の実施形態における外因系条件下の血液凝固系測定データの解析例を示すグラフである。

[図14]第4の実施形態における内因系条件下の血液凝固系測定データの解析例を示すグラフである。

[図15]第4の実施形態における外因系条件下の血液凝固系測定データの解析例を示すグラフである。

[図16]第4の実施形態における内因系条件下の血液凝固系測定データの解析例を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本技術を実施するための好適な形態について説明する。なお、以下に説明する実施形態は、本技術の代表的な実施形態を示したものであり、これにより本技術の範囲が狭く解釈されることはない。なお、説明は以下の順序で行う。

1. 血液凝固系解析システム

1-1. 血液凝固系測定装置

1-2. 血液凝固系解析装置

2. 第1の実施形態（血液凝固因子欠乏血漿を使用した実験例）

2-1. 概要

2-2. 実験

2-3. 凝固パラメータの抽出

2-4. 凝固しているか否かの判定

2-5. フィブリノーゲン低値か否かの判定

2-6. 全般的凝固因子低下又は共通系凝固因子低下の判定

2-7. 外因系凝固因子又は内因系凝固因子低下

2-8. ローテーショントロンプエラストメトリー (ROTEM) での実験結果

3. 第2の実施形態

(血液凝固因子欠乏を評価する解析法1)

3-1. 概要

3-2. 実験

3-3. 解析

4. 第3の実施形態

(血液凝固因子欠乏を評価する解析法2)

4-1. 概要

4-2. 実験

4-3. 解析

5. 第4の実施形態

(VII因子 (外因系) 欠乏血漿とVIII因子 (主に内因系) 欠乏血漿、及び十分に洗浄した健常者赤血球を用いた実験)

5-1. 概要

5-2. 実験

5-3. 結果

6. 血液凝固系解析用プログラム

[0022] <1. 血液凝固系測定システム>

本技術に係る血液凝固系解析システムを図1に示す。

本システム1000は、血液凝固系測定装置100と血液凝固系解析装置200とを含む。

血液凝固系測定装置100は、特に限定されないが、例えば、血液試料の電気的特性を測定する血液電氣的測定装置、又は血液試料の凝固塊の弾性変化を測定する血液凝固能測定装置を用いることができる。

[0023] 前記血液電氣的測定装置の具体例としては、例えば、前記特許文献1又は2の血液凝固過程の誘電測定を行う装置が挙げられる。

前記血液凝固能測定装置の具体例としては、トロンボエラストグラフィー（TEG（登録商標））血液凝固分析装置（ヘモネティクス社）、ローテーショントロンボエラストメトリー（ROTEM（登録商標））血液凝固分析装置（日本フィンガルリンク社）等が挙げられる。

[0024] 前記血液凝固系解析装置 200 は、前記血液凝固系測定装置 100 による測定の結果から、凝固パラメータを抽出する凝固パラメータ抽出部及び前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する血液凝固評価部を含む。

[0025] 前記血液凝固系測定装置 200 の模式図を図 2 に示す。

測定結果表示部 201 は、前記血液凝固系測定装置 100 から得られた結果を表示する。

血液凝固パラメータ抽出部 202 は、前記測定結果を、例えばグラフ化する等の処理を行い、該グラフから血液凝固を評価するのに適切な、グラフの傾きや接点、差分等、具体的にはクロット時間や誘電クロット強度をパラメータとして抽出する。

血液凝固評価部 203 は、前記血液凝固パラメータから抽出されたパラメータに基づいて、血液凝固の程度等を評価する。

フィブリノーゲン評価部 204 は、前記血液凝固の程度等の評価に基づいて、フィブリノーゲンの量や機能の程度を評価する。

出力部 205 は、以上の結果を表示又は印字等を行い、システムの操作者に知らせる。

[0026] < 2. 第 1 の実施形態（血液凝固因子欠乏血漿を使用した実験例） >

2-1. 概要

本実験例の工程を、図 3 のフローチャートに示す。

本実験例は、外因系加速条件（EX）及び内因系加速条件（IN）の少なくとも 2 つのアッセイによる血液凝固系測定を実施（S101）することから始まる。

EX アッセイに用いる外因系凝固促進試薬としては、例えば組織トロンボプ

ラスチン、組織因子等があり、INアッセイに用いる内因系凝固促進試薬としては、例えばエラグ酸、カオリン等がある。

[0027] 次に、血液凝固系測定結果から凝固パラメータを抽出後（S102）、それに基づいて血液試料の凝固状態を分類し、外因系凝固能低下又は内因系凝固能低下と判定された場合にはさらに追加の解析工程により外・内因系凝固能についてより詳細な解析を実施する（S103～S112）。

[0028] ここでは、外因系凝固因子の欠乏状況を下記の工程に従うことで高感度に評価できることを例示するため、外因系凝固因子であるFVIIが欠乏した血漿を購入し、それに健常者血漿を異なる割合で加えて実験を行った。また比較のため、ローテーショントロンプエラストメトリー（以下、「ROTEM」ともいう。）の測定も行った。

[0029] 2-2. 実験

凍結保存されたFVII因子欠乏血漿（購入品）は室温の水にスピッツを浸すことで融解し、試料の調整に用いた。

健常者ボランティアからの全血検体をクエン酸を抗凝固剤として含む真空採血管を用いて採血した。ここで、FVII因子欠乏血漿と混合した時の血液型ミスマッチによる赤血球凝集を防ぐためにO型の健常者ボランティアから採血を行った。

[0030] この血液をまず遠心分離によって赤血球と血漿成分とに分け、赤血球にはPBSを過剰に加えて洗浄し、遠心分離で上澄みを捨てる作業を2回繰り返した。こうして得られた洗浄赤血球に、FVII因子欠乏血漿と取分けておいた健常者血漿を加えることで疑似的なFVII因子欠乏血液を作製した。ここで、試料作製に用いたFVII因子欠乏血漿と健常者血漿の割合は、100:0、95:5、90:10、及び 0:100の4種類である。このFVII因子欠乏の程度が違う4種類の試料を用いて測定を行った。なお、前述のように2回繰り返して行った赤血球の洗浄によっても完全に除去できない凝固因子は、赤血球と一緒に試料に混入するので、因子欠乏血漿と健常者血漿の割合が100:0の試料であっても実際には数%のFVII因子が入っていることに注意が必要である。

[0031] 血液凝固系測定は、血液の誘電率を測定する前記血液電氣的測定装置を用いて、外因系（以下、EXともいう。）及び内因系（以下、INともいう。）アッセイについて実施した。また同一血液試料をROTEM（EX-TEM：外因系、及びIN-TEM：内因系アッセイ）でも測定した。

[0032] 前記血液電氣的測定装置による誘電率の測定の具体的な手順は下記の通りである。

まず、調整した血液試料を容器（洗浄及び乾燥済みの採血管）に入れ、それを前記血液電氣的測定装置の血液試料設置部にセットする。EX試薬（組織因子と塩化カルシウム）を所定量入れた血液電氣的測定装置専用測定カートリッジ、及び、IN試薬（エラグ酸と塩化カルシウム）を所定量入れた血液電氣的測定装置専用測定カートリッジを、該装置の測定部にセットする。

[0033] 前記血液電氣的測定装置の専用測定カートリッジは、チタン製の電極をポリプロピレン樹脂にインサート成形したものであり、2枚の対向する電極面がコンデンサーとして働き、血液を専用測定カートリッジに注入するとこの電極間を血液が満たすことになるので、血液の電気特性（誘電率）を計測することが可能である。

[0034] 前記血液電氣的測定装置の測定部は37℃に温調されており、測定中の検体は37℃に保たれる。前記血液電氣的測定装置の制御部（制御ソフトウェア）より測定開始を実行すると、装置に内蔵された分注部（分注ロボット）により、所定量の血液検体が検体設置部にセットされた採血管から測定部に設置された専用測定カートリッジ内に分注され、自動ピペティング動作により試薬と血液が混合される。そして、血液凝固に伴う誘電率変化が経時的測定され、記録部に保存される、測定結果表示部201にも結果が表示される。

[0035] 2-3. 凝固パラメータの抽出

前記血液電氣的測定装置を用いた場合、血液試料の誘電率の測定結果から、凝固パラメータ抽出部202は、少なくともクロット時間（以下、CTということがある。）と誘電クロット強度（以下、DCSということがある。）を抽

出する (S102)。

その方法は特に限定されないが、例えば、図4に示すグラフのように、CTとして10MHzに於ける誘電率の変化が極小値（矢印の1）を与える時間を用いることができる。また、DCSとして1MHzにおけるピークからの減少幅をもとに算定することができる。別な方法でCTを決めることも可能で、例えば誘電率変化を特徴付ける外挿線の交点（矢印の2）や、閾値に達した点（矢印の3）等を選ぶことができる。DCSについても同様に、10MHzにおける誘電率の変化の幅等を用いても良い。

[0036] 2-4. 凝固しているか否かの判定

極端な凝固能の低下や、治療等に用いたヘパリンの未中和等の影響等により、血液試料が凝固しない場合がある。その判定を、血液凝固評価部203が、例えば10MHzの誘電率変化において、誘電率の立ち上がりが見えない場合や、CTの極端な延長によって行うことができる (S103)。

[0037] 特に、EXとINアッセイ共に凝固しない場合、凝固しない血液試料（極端な凝固遅延も含む）として判定する (S104)。

なお、EXアッセイの試薬として用いる組織因子の終濃度（血液との混合後）を0.3~3 pMの範囲で変化させて測定し、またCTを10MHzの極小値を与える時間と定義した場合、健常者のCTは8分以下となることを別途行った実験より見出した（図5）。また0.3pMよりも低濃度の組織因子でも測定したところCTは多少延長し、組織因子を全く加えない場合でCTの平均は 10.3 ± 1.27 分であった。この結果をもとに、前記の「CTの極端な延長」として例えばCTが18分以上と定義することもできる。この閾値は健常者血液に組織因子等の活性化剤を加えない場合のCTの平均値に標準偏差の6倍を加えたものである。

INアッセイ（内因系の加速アッセイ）に関しても前記と同様の検証を実施すれば「CTの極端な延長」の評価基準（閾値等）を決めることができる。

[0038] 2-5. フィブリノーゲン低値か否かの判定

EX及びINアッセイにおいて、一般にDCSにはフィブリン形成による寄与と血小板による寄与の両方が含まれている。しかし、フィブリノーゲンが極端に

低値でフィブリン形成が十分起こらない場合には、血小板数や血小板機能が正常であってもDCSは低値となる。この発見を利用し、EX及びINアッセイ両方においてDCSが共に低値であれば、フィブリノーゲン低値であることが推定される（S105、S106）。このような判定は、例えばフィブリノーゲン評価部204が行う。

[0039] また、より好ましくは血小板の寄与を人工的に完全に阻害した、血小板阻害アッセイ（以下、PIアッセイともいう。）を行うことでフィブリン形成による寄与のみを正確に評価することができるので、フィブリノーゲン低値であるかどうかの推定に有効である。このようなPIアッセイとしては、外因系あるいは内因系を加速する試薬のうちのどちらか（あるいは両方）に加えて、サイトカラシンD等の血小板凝集を阻害する試薬を用いることで実現できる。

[0040] 2-6. 全般的凝固因子低下又は共通系凝固因子低下の判定

EX及びINアッセイにおいて、凝固による誘電率変化が始まってから一定のレベルに達するまでに時間が掛かる場合は、凝固因子の不足及び／又は機能の低下が考えられる（S107）。特に、EX及びINアッセイ両方でそのような状態が見られる場合は、全般的凝固因子の量及び／又は機能の全般的な低下、又はFX、プロトロンビン、FV等凝固反応の下流に位置する共通系凝固因子の量及び／又は機能の低下、もしくはその両方が想定される（S108）。

[0041] このような解析は、血液凝固系評価部203で行ってもよく、図6に示すEX及びINアッセイのデータ加工工程（S1071）、血液凝固の程度の評価値算定工程（S1072）、及びその評価値出力工程（S1073）によって実施することができる。各工程について以下に詳述する。なお、本技術はこれに限定されるものではない。

[0042] 図6の「データ加工工程」（S1071）とは、例えばデータの規格化の工程であり、一例として図7のようなサブ工程、すなわち補正数値Aの算定工程（S10711）、補正数値Bの算定工程（S10712）、補正数値A及びBを用いた規格化工程（S10713）からなってもよい。

[0043] また、「評価値算定工程」(S1072)は、例えば図8のようなサブ工程、すなわち基準カーブ設定工程(S10721)、基準カーブとの比較工程(S10722)、比較結果の数値化工程(S10723)から構成されてもよい。

[0044] 以下、図6～図8に示した解析工程の具体例を述べるが、本技術はこれに限定されない。

[データ加工工程](S1071)

まず、例えば10MHzでの誘電率データ(ε)を規格化する。より好ましくは、誘電率の極小値($\varepsilon_{\min}$)（「補正数値A」、S10711）と極大値($\varepsilon_{\max}$)（「補正数値B」、S10712）の2点を用いて下記の式(1)に従って規格化する(S10713)。

[0045] [数1]

$$\varepsilon_{\text{Normalized}} = (\varepsilon - \varepsilon_{\min}) / (\varepsilon_{\max} - \varepsilon_{\min}) \quad \text{式(1)}$$

[0046] なお、 $\varepsilon_{\min}$ として誘電率の極小値を必ずしも用いることは無く、例えば、誘電率の変化（勾配）が最大となる点に於ける誘電率等を選ぶこともできる。

また、 $\varepsilon_{\max}$ として誘電率の極大値ではなくても良く、誘電率の増加が落ちてきた時刻以降（例えば、測定開始から30分後等）での誘電率の値や、その近辺での平均値等を用いることもできる。

[0047] [評価値算定工程](S1072)

次に、得られた $\varepsilon_{\text{Normalized}}$ について、例えばCT以降のデータの立ち上がりがどれくらいブロードであるかを数値化するために、CTで垂直に立ち上がる仮想カーブ（ステップパルス形状であり、例えば、時刻 $t < CT$ の区間では $y = \varepsilon_{\min}$ 、 $t \geq CT$ の区間で $y = \varepsilon_{\max}$ となるもの（「基準カーブ設定工程」、S10721）との差分を取り（「基準カーブとの比較工程」、S10722）、その積分（級数和）カーブ(ε_{Sum})を下記式(2)のように算出する（「比較結果の数値化工程」、S10723）。

[0048]

[数2]

$$\varepsilon_{Sum}(n) = a \sum_{n=n_{CT}}^{n_{CT}+x} (1 - \varepsilon_{Normalized}(n)) \Delta t \quad \text{式 (2)}$$

ただし、

$$\varepsilon_{Sum}(n < n_{CT}) = 0$$

[0049] ここで、aは任意のスケーリング定数、nCTはCTを与える測定ポイント、 Δt は測定ポイント間の時間（時間間隔）である。

図9は、こうして得られた ε_{Sum} を例示したものである。 ε_{Sum} の終値（例えば測定開始後30分での値）は、CT以降で凝固反応がゆっくり進むほど大きくなり、すなわち、凝固因子の欠乏に敏感であることが分かった。さらに、（ ε_{Sum} ）カーブの形状はどの因子が欠乏しているかによって変化するので、例えば、増加の傾きや、一定以上の増加が継続する時間的長さ等、そこに注目した更に詳細な解析も可能である。

[0050] こうして得られた ε_{Sum} を用いて次の判定を行うことができる。

もし、EXアッセイにおける ε_{Sum} とINアッセイで得られた ε_{Sum} が共に高値であれば、外因系、内因系共に凝固反応の進展が緩慢であることを意味し、それは、外・内因系両方の凝固因子の全般的な欠乏か、もしくは、FX、プロトロンビン、FV等、凝固反応の下流に位置する共通系因子の欠乏が、もしくはその両方が想定される。

[0051] 2-7. 外因系凝固因子又は内因系凝固因子低下

前記「2-6. 全般的凝固因子低下又は共通系凝固因子低下の判定」において、外因系又は内因系どちらかの ε_{Sum} が高値であれば、高値であった凝固経路に係る因子が不足及び／又は機能低下していることが分かる。また低値となった方に係る凝固因子と、共通系の凝固因子は共に不足及び／又は機能低下していないことが分かる（S110）。その結果は、外因系及び／又は内因系凝固の評価結果として出力することができる（S111）。

[0052] 図9は、前記「2-2. 実験」に記述した方法によって人為的にFVIIの欠乏試料を作製して実験した結果であり、FVII濃度依存的に ε_{Sum} が変化するこ

とが明らかになった。

また、外因系と内因系両方において ε Sum が低値であれば、凝固因子の不足及び／又は機能低下を否定することができる (S112)。その場合でも、臨床的に出血が続く場合には、外科的な問題か血小板の問題かのどちらかであると言える。

[0053] 2-8. ローテーショントロンボエラストメトリー (ROTEM) での実験結果
前記血液電氣的測定装置で用いた測定と同じ試料をROTEMの外因系アッセイ (EX-TEM) と内因系アッセイ (IN-TEM) とで測定した結果が図10である。FVII因子欠乏血漿100%の試料と、それ以外の試料とにおいて、違いを見出すことができた。

よって、血液凝固能測定装置 (ROTEM) は、本技術の血液凝固系測定装置に用い得ることが明らかとなったが、データの見易さ、感度、FVII因子濃度依存性を敏感に評価できる点等を考慮すると、血液試料の電氣的特性を測定する血液電氣的測定装置の方がより好ましい。

[0054] <3. 第2の実施形態 (血液凝固因子欠乏を評価する解析法1)>

3-1. 概要

外因系凝固経路又は内因系凝固経路のどちらかの機能が低下することが懸念される場合、外因系凝固アッセイと内因系凝固アッセイとを比較することにより、その状態を詳しく解析することができる。特に、体外循環を伴う心臓手術等で外因系凝固因子の消耗が懸念される場合等に適用すると効果的である。

[0055] 3-2. 実験

本解析法の有用性を示す実験は、前記<2. 第1の実施形態 (血液凝固因子欠乏血漿を使用した実験例)>の「2-2. 実験」と同様の手順で実施した。

[0056] 3-3. 解析

解析の工程は、前記第1の実施形態と同様であるが、前記第1の実施態様の「2-6. 全般的凝固因子低下又は共通系凝固因子低下の判定」に係る工

程について以下のように行うことができる。

[0057] まず、前記式（１）に従い、EX及びINアッセイについてそれぞれ規格化したカーブ $\varepsilon_{\text{Normalized}}$ を得る。次に、この $\varepsilon_{\text{Normalized}}$ についてINアッセイとEXアッセイの差分カーブ（ ε_d ）を算定する。ここで、INアッセイにおけるCTとEXアッセイにおけるCTが異なる場合には、CTを基準とした差分カーブとなるように時間軸の補正を行うこともできる。そして、得られた ε_d について、前記式（２）と同様の計算によって積分（級数和）カーブ（ $\varepsilon_d\text{Sum}$ ）を算定する。

図１１は、このようにして得た実験解析結果を例示したものである。

[0058] < ４．第３の実施形態（血液凝固因子欠乏を評価する解析法２） >

４－１．概要

血液凝固に伴う誘電率の変化を一連の解析工程に従って過渡現象として表現できる形式に変換し、そのカーブをフーリエ（ラプラス）変換することにより周波数領域で凝固因子の欠乏等に特徴的な応答を解析する。

[0059] ４－２．実験

本解析法の有用性を示す実験は、前記< ２．第１の実施形態（血液凝固因子欠乏血漿を使用した実験例） >の「２－２．実験」と同様の手順で実施した。

[0060] ４－３．解析

解析の工程は、前記第１の実施形態と同様であるが、前記第１の実施態様の「２－６．全般的凝固因子低下又は共通系凝固因子低下の判定」に係る工程について以下のように行うことができる。

[0061] まず、前記式（１）に従い、規格化したカーブ $\varepsilon_{\text{Normalized}}$ を得る。

次に、得られた $\varepsilon_{\text{Normalized}}$ について、例えばCT以降のデータの立ち上がりがどれくらいブロードであるかを数値化するために、CTで垂直に立ち上がる仮想カーブとの差分を取る（ $\delta\varepsilon$ ）。ここで、前記第１の実施態様との違いは積分（級数）カーブとしての表示ではなく、各時間における差分カーブを得るところである。

[0062] 図12はこのようにして得た実験解析結果の特徴例を示したものである。

図12の特徴は、時刻 $t = CT$ で立ち上り、その後減衰していくカーブ形状である。このカーブ形状は、例えば欠乏した凝固因子の種類によって変化する。この変化をより効果的に解析するため、図12のカーブを過渡現象を表す波形として考えてフーリエ（ラプラス）変換を行い、周波数軸のスペクトルを得る。欠乏した凝固因子の種類によって、特徴的な周波数応答が得られる。

[0063] 以上はEXアッセイに関して実施した解析であるが、同様の解析をINアッセイ等に対しても実施することができ、さらにEXアッセイの解析結果とINアッセイの解析結果を比較することでより正確に凝固状態を判定することができる。

[0064] <5. 第4の実施形態（VII因子（外因系）欠乏血漿とVIII因子（主に内因系）欠乏血漿、及び十分に洗浄した健常者赤血球を用いた実験）>

5-1. 概要

前記実施形態1及び実施形態2では、外因系凝固因子であるFVIIが欠乏した血漿を用いた実験を行ったが、本実験例では主に内因系凝固経路に係るFVIIIの欠損血漿も用い、FVIIが欠乏した血漿を用いた場合と直接比較が出来るプロトコルで実験を実施した。また、赤血球の洗浄によっても完全に除去できない凝固因子が、赤血球と一緒に試料に混入するのを極力防ぐために、洗浄回数を5回に増やした。更に、健常者血漿から血小板を取り除くためにフィルターを用いた。

[0065] 5-2. 実験

凍結保存されたFVII因子欠乏血漿（購入品）及びFVIII因子欠乏血漿（購入品）は室温の水にスピッツを浸すことで融解し、試料の調整に用いた。健常者ボランティアからの全血検体をクエン酸を抗凝固剤として含む真空採血管を用いて採血した。ここで、各因子欠乏血漿と混合した時の血液型ミスマッチによる赤血球凝集を防ぐためにO型の健常者ボランティアから採血を行った。この血液をまず遠心分離によって赤血球と血漿成分とに分け、赤血球にはP

BSを大過剰に加えて洗浄し、遠心分離で上澄みを捨てる作業を5回繰り返した。

[0066] こうして得られた洗浄赤血球に、FVII因子欠乏血漿又はFVIII因子欠乏血漿と、取分けておいた健常者血漿（血小板をフィルターによって除去したもの）を加えることで疑似的なFVII因子欠乏血液及びFVIII因子欠乏血液を作製した。ここで、試料作製に用いたFVII因子欠乏血漿と健常者血漿の割合は、100:0、95:5、90:10の3種類、同様にFVIII因子欠乏血漿と健常者血漿の割合は、100:0、95:5、90:10の3種類、さらに欠乏血漿を含まないもの、すなわち0:100の計7種類の試料を用意し、測定を行った。

測定は、前記血液電氣的測定装置を用いてEX及びINアッセイについて実施した。また、同一検体を前記電気凝固能測定装置であるROTEM（EX-TEM：外因系、及びIN-TEM：内因系アッセイ）で測定した。

[0067] 5－3．結果

測定された誘電率を前記式（1）に従い規格化したところ、外因系凝固因子であるFVII欠乏血漿を用いて外因系アッセイ（EX）を行った場合には、明らかな凝固遅延が見られ（図13）、内因系アッセイ（IN）を行った場合には、凝固遅延は見られなかった（図14）。逆に、主に内因系凝固に係る因子であるFVIII欠乏血漿を用いて外因系アッセイ（EX）を行った場合には、凝固遅延は見られず（図15）、内因系アッセイ（IN）を行った場合に明らかな凝固遅延が見られた（図16）。

このように、活性が低下している因子の種類が違うと、EX及びINアッセイにおいて違いが見えるので、患者の凝固状態を詳しく解析することが可能であることが示された。

[0068] 更に、第1の実施形態～第3の実施形態で示した一連の解析を本データに行うことも可能で、それによって第1の実施形態～第3の実施形態ですでに述べた効果が再確認できることは明らかである。

[0069] <6．血液凝固系解析用プログラム>

本技術は、前記第1の実施形態～第4の実施形態における解析方法等をコ

ンピュータに行わせる血液凝固系解析用プログラムを提供する。

該プログラムは、例えば、磁気ディスク、光ディスク、光磁気ディスク、フラッシュメモリ等の記録媒体に格納されていてもよく、また、ネットワークを介して配信することもできる。該プログラムはこのような形態をとることにより、前記血液凝固系測定装置に外付けしたパーソナルコンピュータにより実行でき、あるいは前記血液凝固系測定装置に内蔵されたコンピュータにより実行できる。

[0070] なお、本技術は、以下の構成をとることもできる；

〔１〕血液試料の血液凝固系測定を行う血液凝固系測定装置と、

前記血液凝固系測定装置による測定の結果から、凝固パラメータを抽出する凝固パラメータ抽出部及び

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する血液凝固評価部、

を含む血液凝固系解析装置と、

を備え、

前記血液凝固系測定装置による測定は、外因系加速条件及び内因系加速条件で行われる、

血液凝固系解析システム。

〔２〕前記血液凝固系解析装置は、前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価するフィブリノーゲン評価部、

を備える〔１〕に記載の血液凝固系解析システム。

〔３〕前記血液凝固系測定装置は、血液試料の電気的特性を測定する血液電氣的測定装置、又は血液試料の凝固塊の弾性変化を測定する血液凝固能測定装置である、〔１〕又は〔２〕に記載の血液凝固系解析システム。

〔４〕前記電気的特性は誘電率である、〔３〕に記載の血液凝固系解析システム。

〔５〕前記凝固パラメータは、前記誘電率によるクロット時間及びクロット

強度である、〔４〕に記載の血液凝固系解析システム。

〔６〕前記血液凝固評価部は、前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の凝固因子の量及び／又は機能の程度を評価する、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の血液凝固系解析システム。

〔７〕前記凝固因子は全般的凝固因子及び／又は共通系凝固因子である、〔６〕に記載の血液凝固系解析システム。

〔８〕前記全般的凝固因子は外因系凝固因子及び／又は内因系凝固因子である、〔７〕に記載の血液凝固系解析システム。

〔９〕血液試料の血液凝固系測定を外因系加速条件及び内因系加速条件で行う測定工程と、

前記血液凝固系測定の結果から凝固パラメータを抽出するパラメータ抽出工程と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する凝固評価工程と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価するフィブリン評価工程と、
を含む血液凝固系解析方法。

〔１０〕前記外因系加速条件で得られた血液凝固系測定の結果と、前記内因系加速条件で得られた血液凝固系測定の結果との差分を用いて解析を行う、請求項９に記載の血液凝固系解析方法。

〔１１〕

血液試料の血液凝固系測定の結果から凝固パラメータを抽出する工程機能と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する工程機能と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価する工程機能と、
をコンピュータに実現させるための血液凝固系解析用プログラム。

符号の説明

[0071]	1 0 0	血液凝固系測定装置
	2 0 0	血液凝固系解析装置
	2 0 1	測定結果表示部
	2 0 2	凝固パラメータ抽出部
	2 0 3	血液凝固評価部
	2 0 4	フィブリノーゲン評価部
	2 0 5	出力部
	1 0 0 0	血液凝固系解析システム

請求の範囲

- [請求項1] 血液試料の血液凝固系測定を行う血液凝固系測定装置と、
前記血液凝固系測定装置による測定の結果から、凝固パラメータを抽出する凝固パラメータ抽出部及び
前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する血液凝固評価部、
を含む血液凝固系解析装置と、
を備え、
前記血液凝固系測定装置による測定は、外因系加速条件及び内因系加速条件で行われる、
血液凝固系解析システム。
- [請求項2] 前記血液凝固系解析装置は、前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価するフィブリノーゲン評価部、
を備える請求項1に記載の血液凝固系解析システム。
- [請求項3] 前記血液凝固系測定装置は、血液試料の電気的特性を測定する血液電気的測定装置、又は血液試料の凝固塊の弾性変化を測定する血液凝固能測定装置である、請求項1に記載の血液凝固系解析システム。
- [請求項4] 前記電気的特性は誘電率である、請求項3に記載の血液凝固系解析システム。
- [請求項5] 前記凝固パラメータは、前記誘電率によるクロット時間及びクロット強度である、請求項4に記載の血液凝固系解析システム。
- [請求項6] 前記血液凝固評価部は、前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の凝固因子の量及び／又は機能の程度を評価する、請求項1に記載の血液凝固系解析システム。
- [請求項7] 前記凝固因子は全般的凝固因子及び／又は共通系凝固因子である、請求項6に記載の血液凝固系解析システム。
- [請求項8] 前記全般的凝固因子は外因系凝固因子及び／又は内因系凝固因子で

ある、請求項 7 に記載の血液凝固系解析システム。

[請求項9] 血液試料の血液凝固系測定を外因系加速条件及び内因系加速条件で行う測定工程と、

前記血液凝固系測定の結果から凝固パラメータを抽出するパラメータ抽出工程と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する凝固評価工程と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価するフィブリン評価工程と、

を含む血液凝固系解析方法。

[請求項10] 前記外因系加速条件で得られた血液凝固系測定の結果と、前記内因系加速条件で得られた血液凝固系測定の結果との差分を用いて解析を行う、請求項 9 に記載の血液凝固系解析方法。

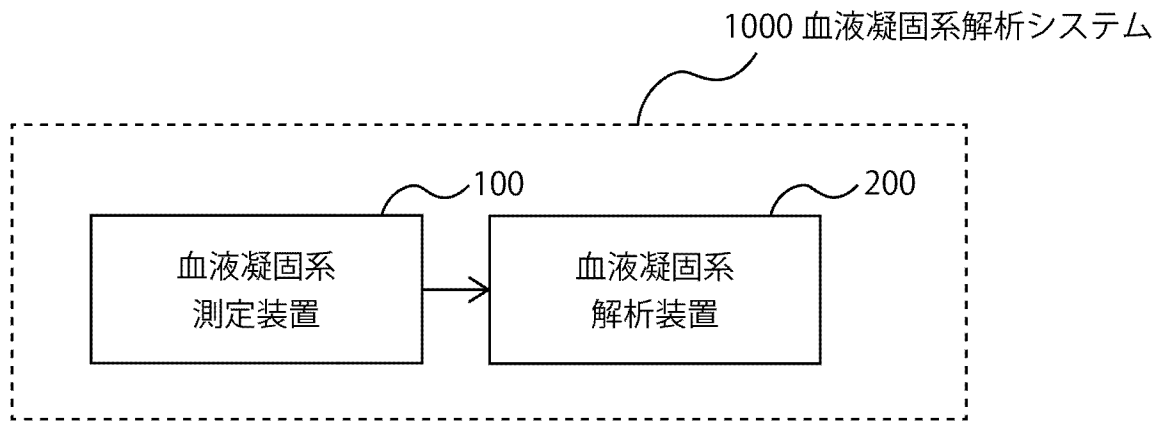
[請求項11] 血液試料の血液凝固系測定の結果から凝固パラメータを抽出する工程機能と、

前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料の血液凝固の程度を評価する工程機能と、

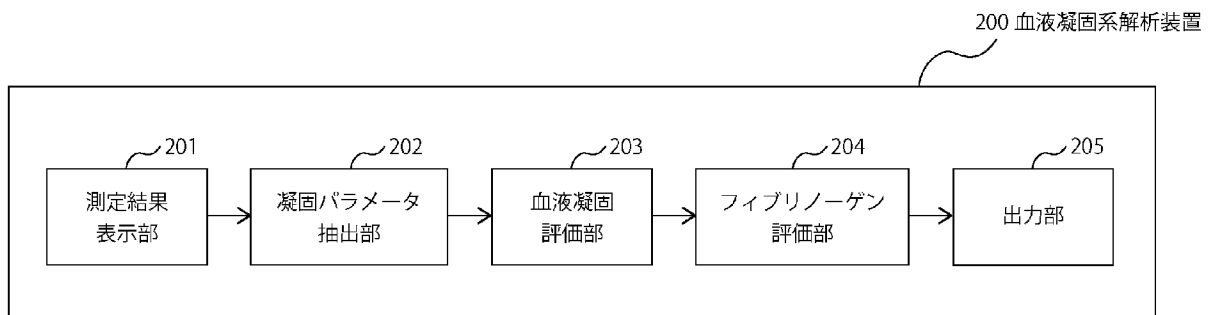
前記凝固パラメータに基づいて前記血液試料のフィブリノーゲンの量及び／又は機能の程度を評価する工程機能と、

をコンピュータに実現させるための血液凝固系解析用プログラム。

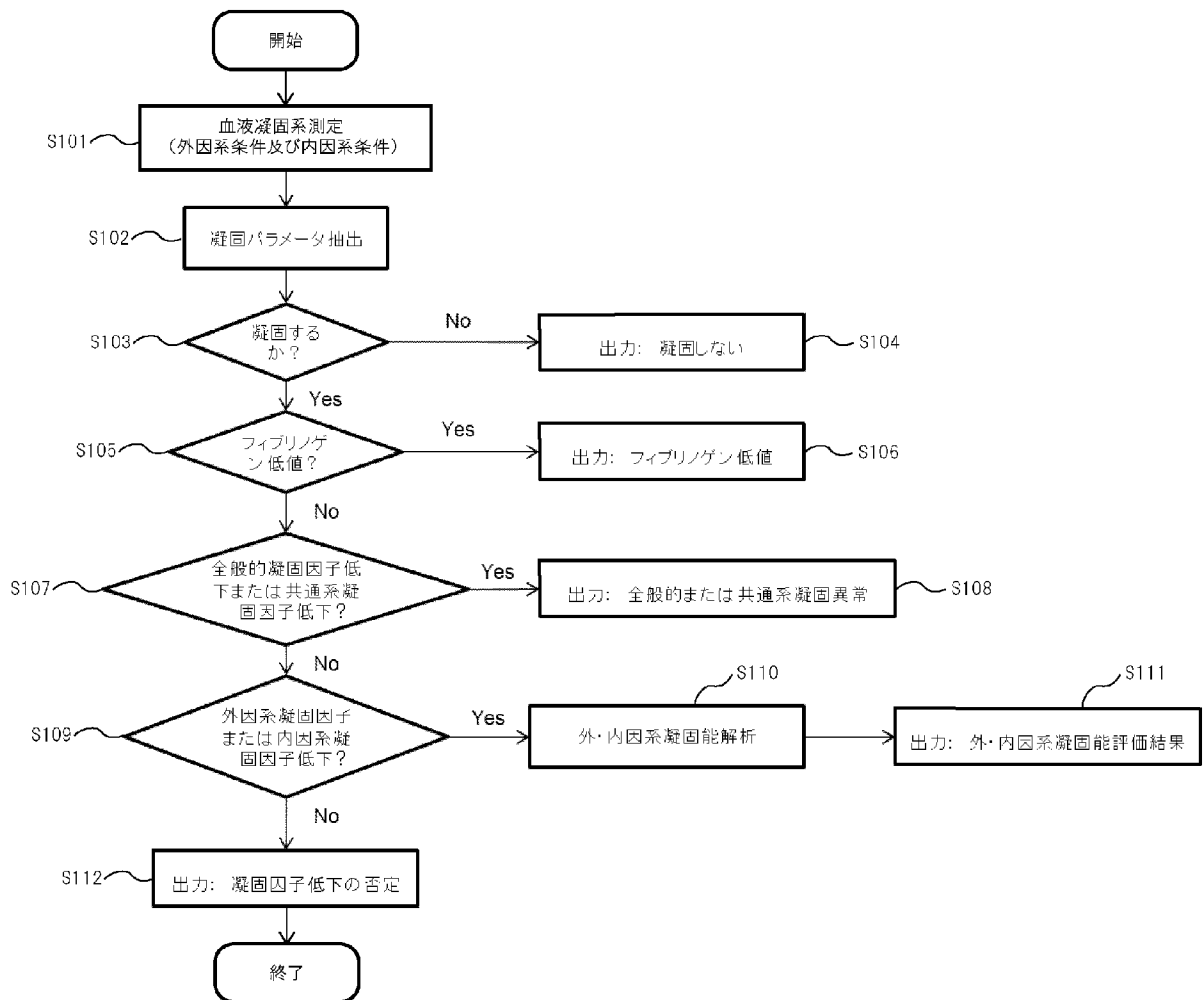
[図1]



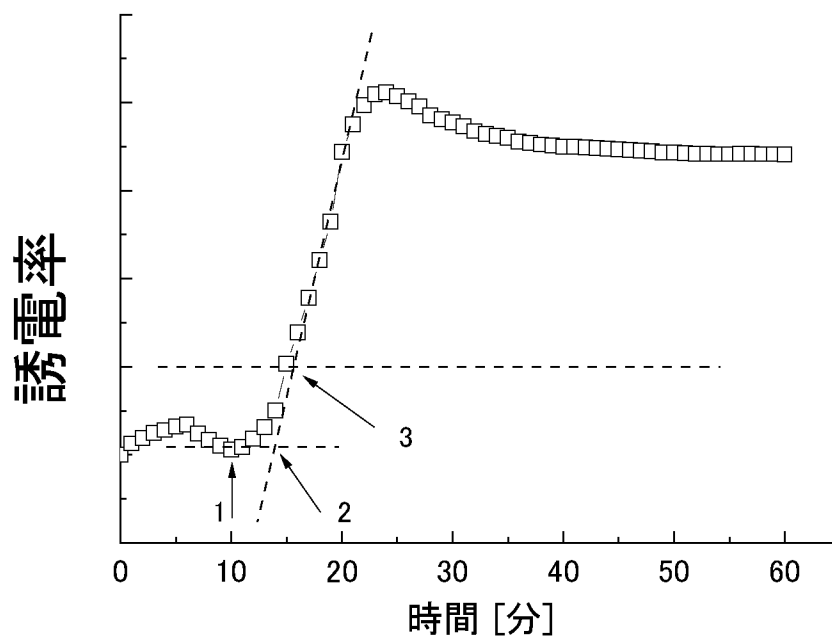
[図2]



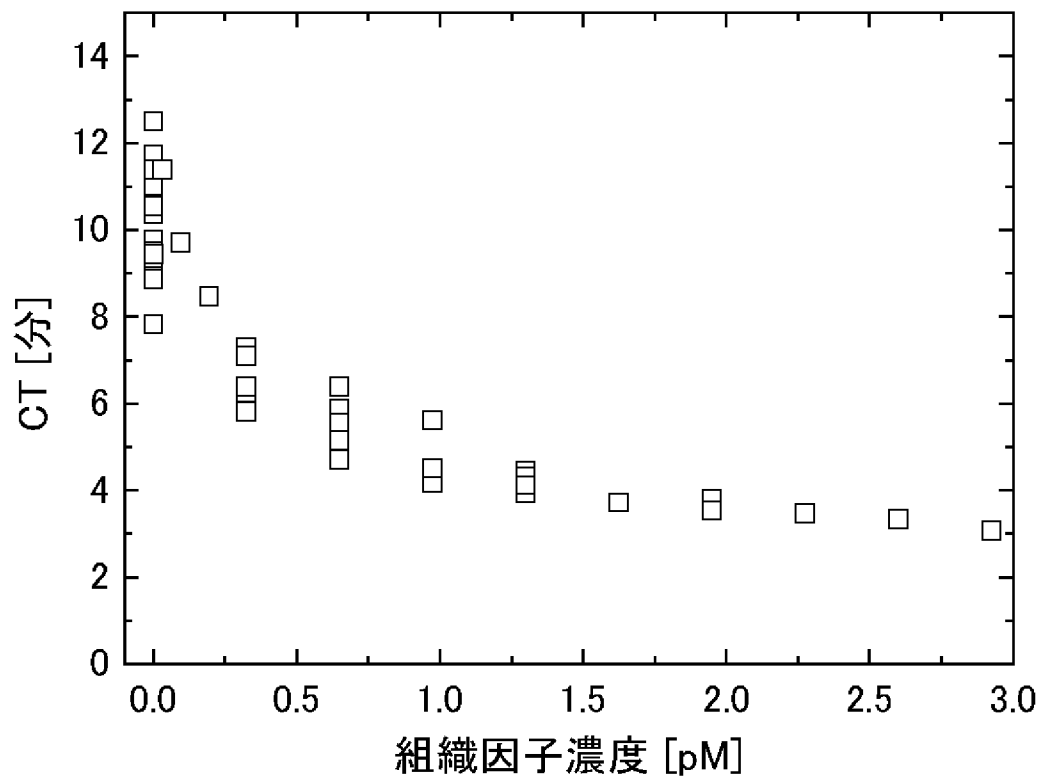
[図3]



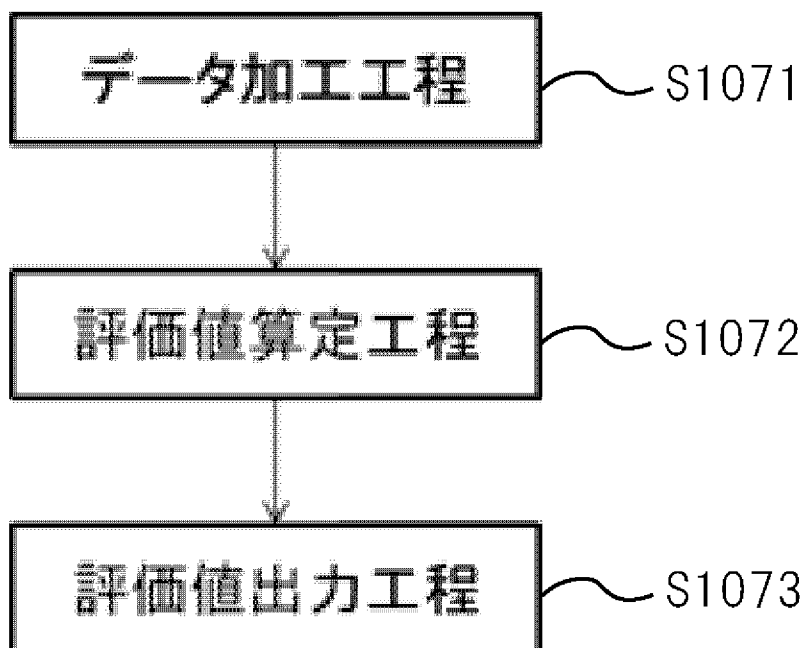
[図4]



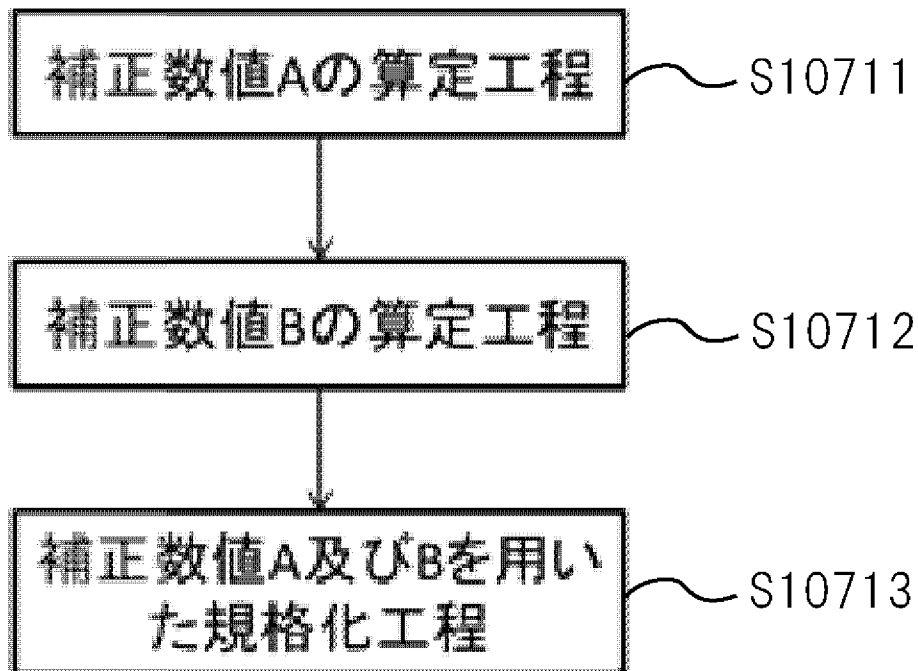
[図5]



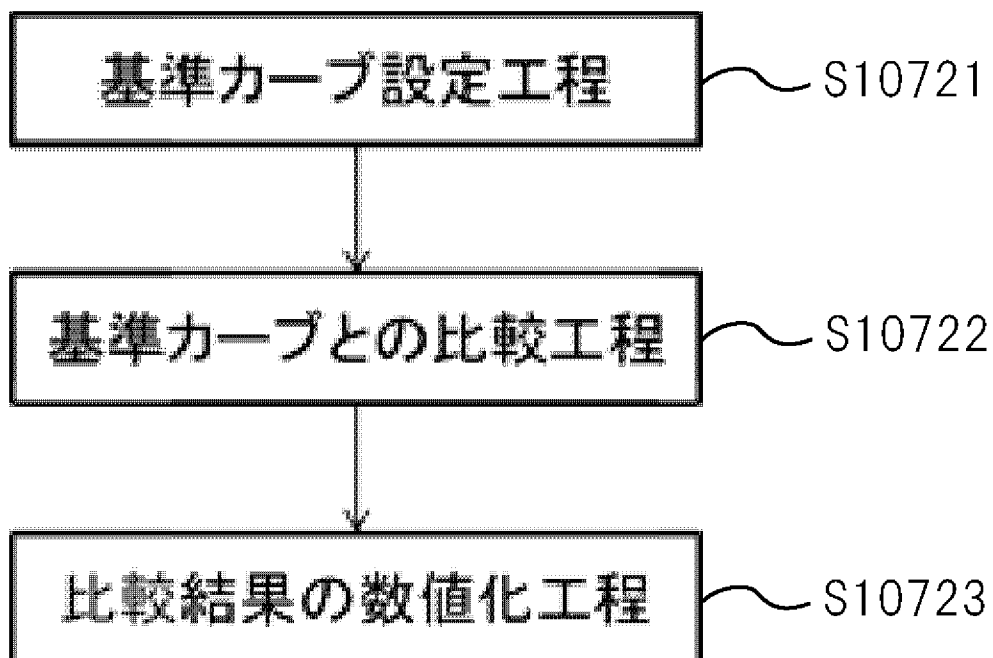
[図6]



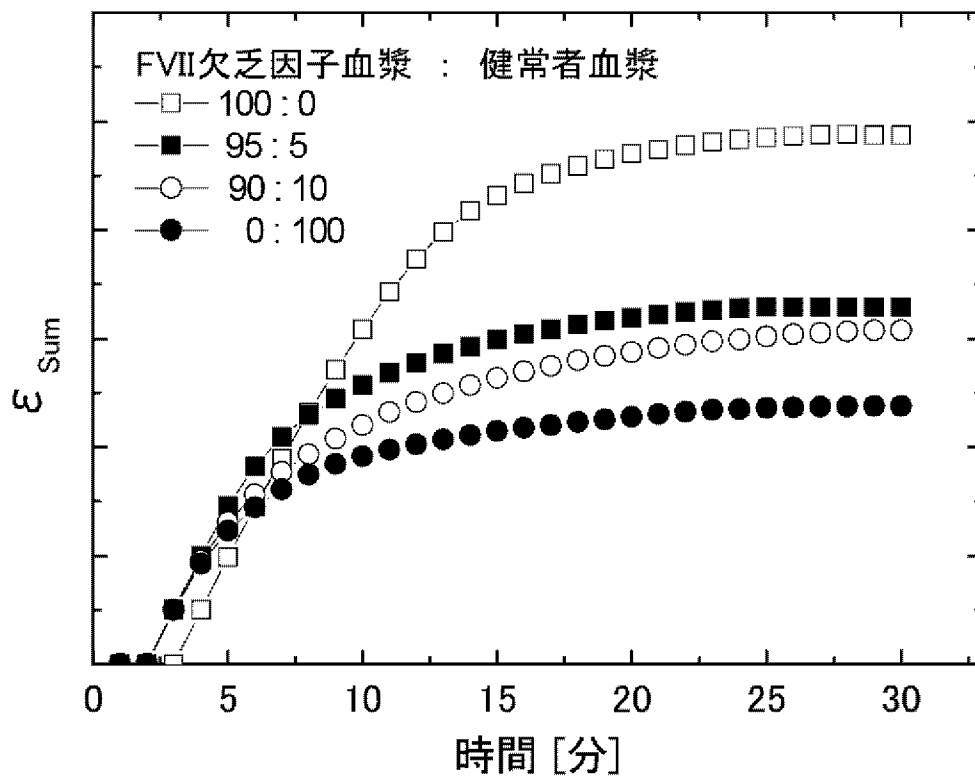
[図7]



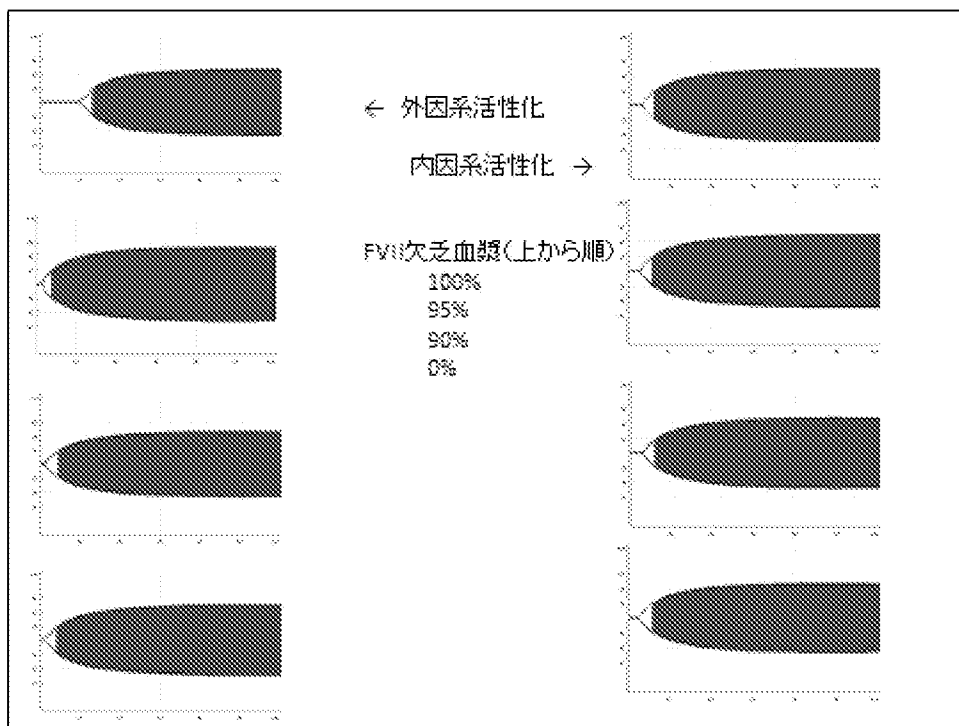
[図8]



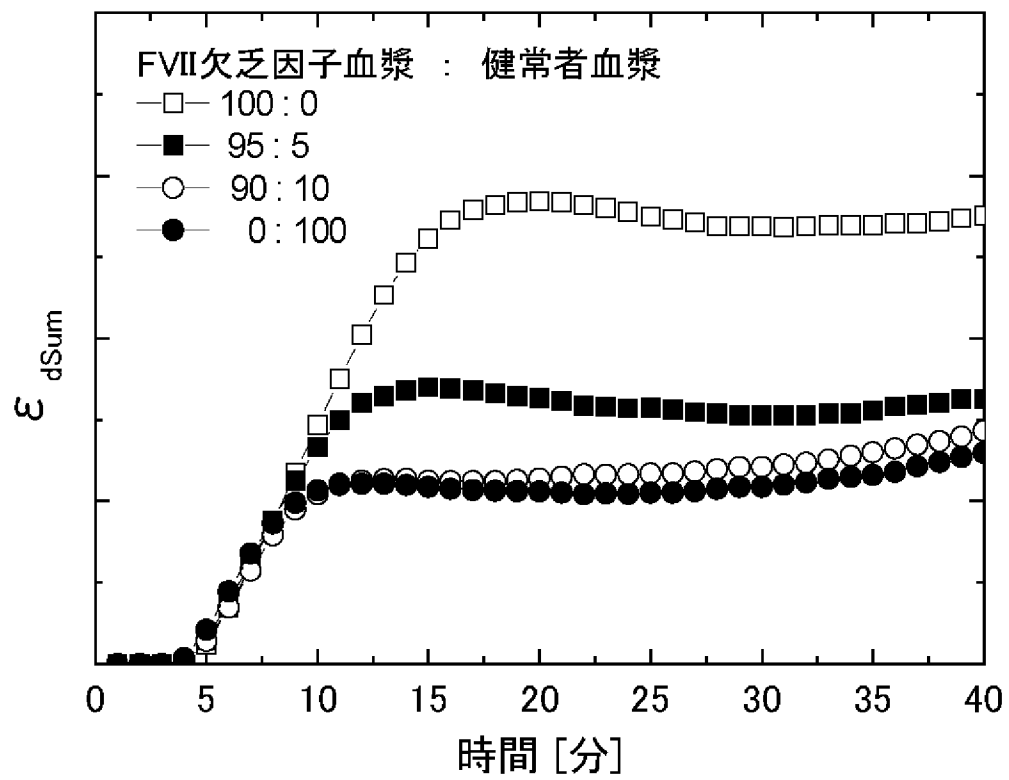
[図9]



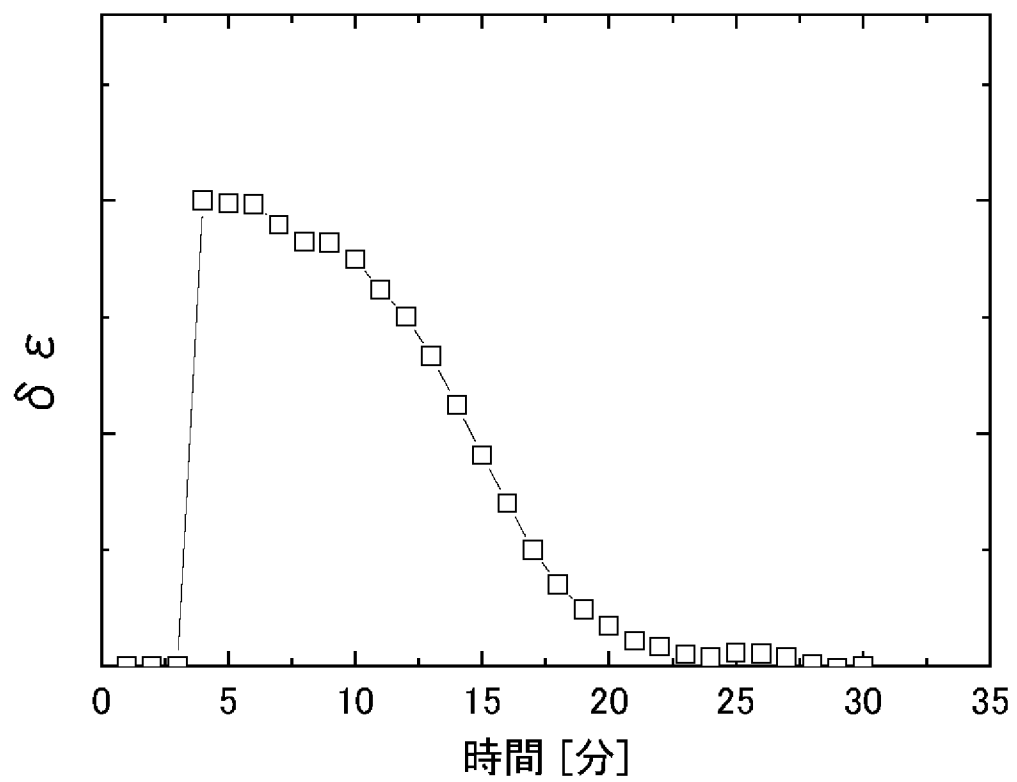
[図10]



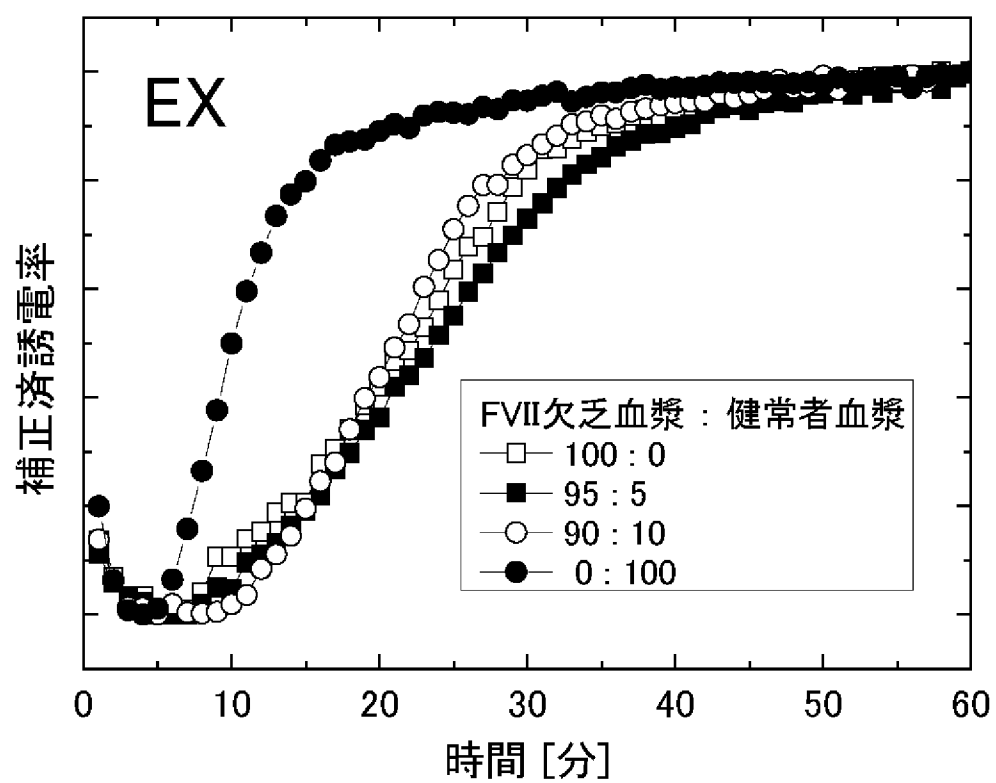
[図11]



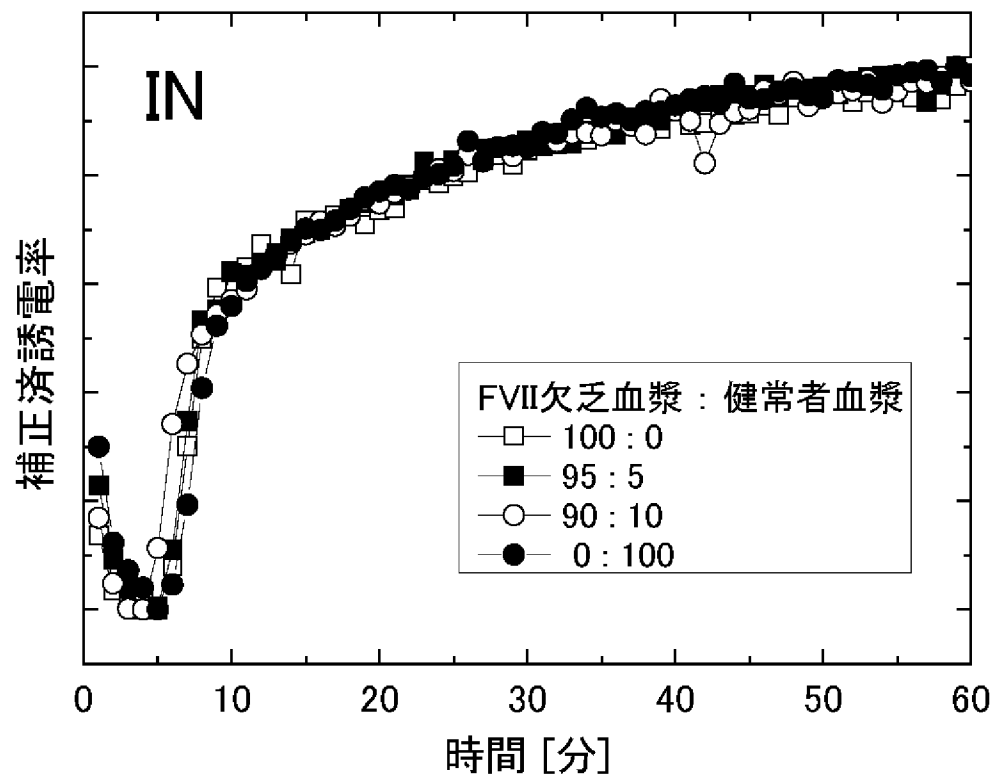
[図12]



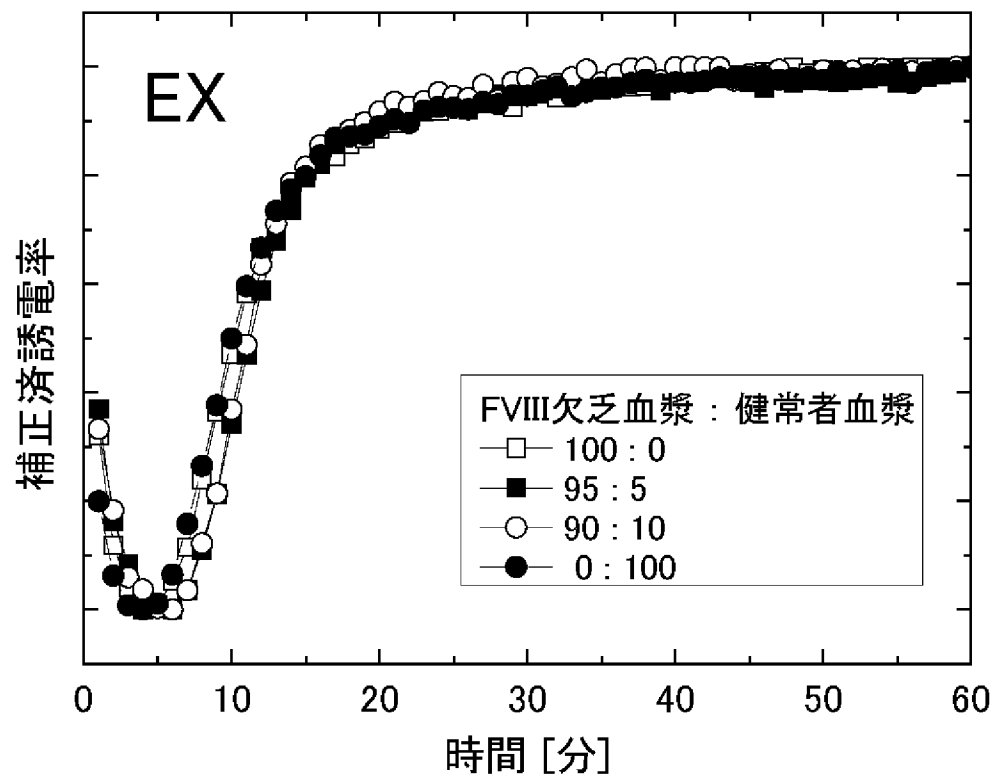
[図13]



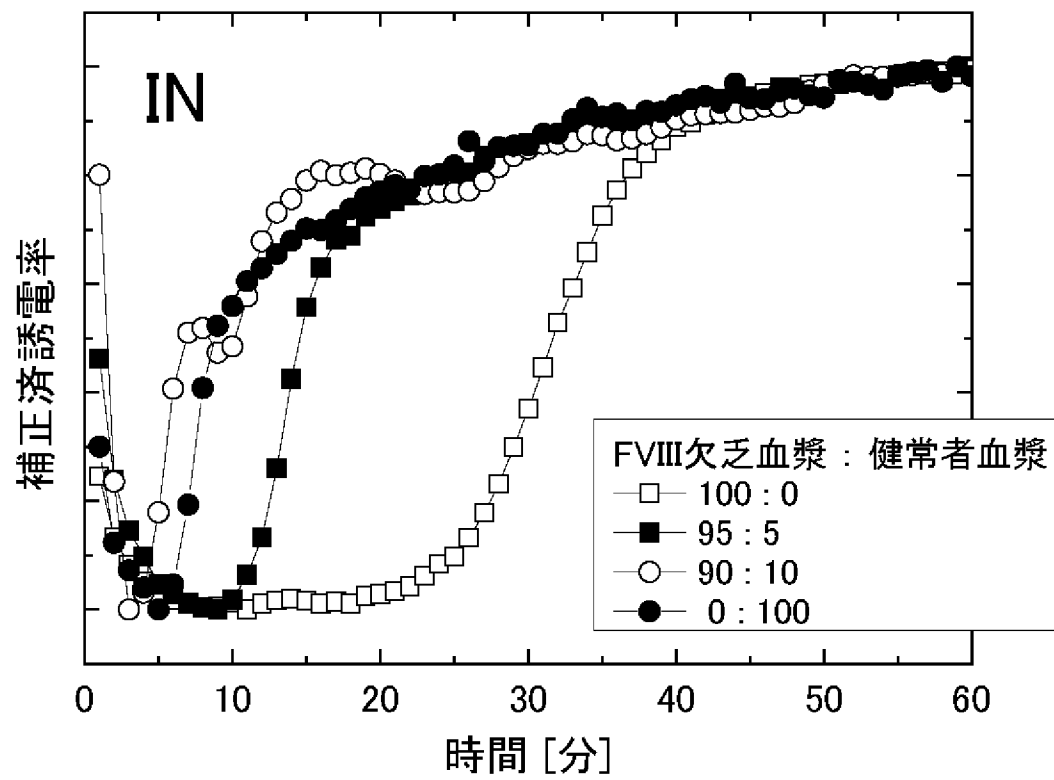
[図14]



[図15]



[図16]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005861

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/86(2006.01) i, G01N27/22(2006.01) i

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)

G01N33/86, G01N27/22

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	WO 2015/159623 A1 (Sony Corp.), 22 October 2015 (22.10.2015), claims; paragraphs [0015] to [0042] & US 2017/0030891 A1 claims; paragraphs [0070] to [0097] & EP 3133390 A1	1-9, 11 10
Y A	TEG6s Ketsueki Gyoko Bunseki Sochi [online], 27 August 2015 (27.08.2015) [retrieval date 21 March 2017 (21.0.2017)], Internet:<URL: http:// teg.haemonetics.com/~media/Sharepoint/Devices/ TEG/Marketing/Brochures/TEG6s_Brochure/COL- COPY-000918-JA_Brochure_TEG6s.pdf.pdf>	1-9, 11 10

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"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)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"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

"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

"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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
21 March 2017 (21.03.17)

Date of mailing of the international search report
04 April 2017 (04.04.17)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/005861

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2013-221782 A (Sony Corp.), 28 October 2013 (28.10.2013), entire text; all drawings & US 2015/0077144 A1 entire text; all drawings & WO 2013/153735 A1 & EP 2836827 A1	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/86(2006.01)i, G01N27/22(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N33/86, G01N27/22

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y A	WO 2015/159623 A1 (ソニー株式会社) 2015. 10. 22, 請求の範囲、段落 0015-0042 & US 2017/0030891 A1 (請求の範囲、段落 0070-0097) & EP 3133390 A1	1-9, 11 10
Y A	TEG6s 血液凝固分析装置 [オンライン], 2015. 08. 27 [検索日 2017. 03. 21], インターネット:<URL: http://teg.haemonetics.com/~media/Sharepoint/Devices/TEG/Marketing/Brochures/TEG6s_Brochure/COL-COPY-000918-JA_Brochure_TEG6s.pdf >	1-9, 11 10

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 03. 2017

国際調査報告の発送日

04. 04. 2017

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

赤坂 祐樹

2 J

3316

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2013-221782 A (ソニー株式会社) 2013. 10. 28, 全文、全図 & US 2015/0077144 A1 (全文、全図) & W0 2013/153735 A1 & EP 2836827 A1	1-11