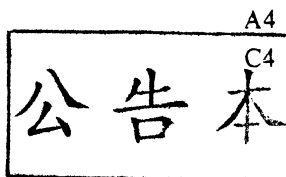


申請日期	85. 12. 20.
案 號	85115740
類 別	G01N 21/49. 33/48

(以上各欄由本局填註)



514724

發明專利說明書

一、發明 新 型	中 文	確認及定量血小板以及利用全血樣品測量血小板活化狀態之高度靈敏，準確且精密之自動化方法與裝置
	英 文	"HIGHLY SENSITIVE, ACCURATE AND PRECISE AUTOMATED METHOD AND DEVICE FOR IDENTIFYING AND QUANTIFYING PLATELETS AND FOR DETERMINING PLATELET ACTIVATION STATE USING WHOLE BLOOD SAMPLES"
二、發明 人	姓 名	1.大衛 茲曼歐威克 2.葛瑞哥利 姆 柯里拉 3.艾德華 傑 西勒汀頓 4.艾維恩 沙伯瑞那 查普曼 5.林恩 帕塞提那 1-5.均美國
	國 籍	
三、申請人	住、居所	1.美國紐約州孟塞市史莫利路8號 2.美國紐澤西州孟特克萊爾市卡普大道97號 3.美國紐約州布瑞斯特市橡樹街35號 4.美國紐約州克洛頓胡德森市史西尼路19K號 5.美國紐約州摩洛市洛納克4號
	姓 名 (名稱)	美商拜耳公司
三、申請人	國 籍	美國
	住、居所 (事務所)	美國紐約州泰瑞唐市班尼迪克街511號
三、申請人	代 表 人 姓 名	尤金尼 西蒙納里

裝

訂

線

(由本局填寫)

承辦人代碼：
大 類：
I P C 分類：

A6
B6

本案已向：

國（地區） 申請專利，申請日期： 案號： ， ☐有 ☒無主張優先權
美 1995. 12. 28 08/581,293

有關微生物已寄存於： ，寄存日期： ，寄存號碼：

（請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄）

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明(1)

發明範圍

本發明係關於血小板分析及定量之改良方法，其使用自動化之血液學系統。特別地，本發明關於一種高獲得率方法，其可被使用於正常及異常血液樣品以具有相較其它方法較高之準確度及精密度來測定特別的一些參數，血小板計數，血小板體積，血小板成分濃度或密度，以及血小板乾重。

發明背景

雖然半-及全-自動化分析儀系統目前已常規地使用於測量血液血小板計數，此技藝中所認知的是現行的血動化血小板測量及定量方法仍受到不準確，缺乏精密度，及缺少再現性等問題所阻礙。此在異常血液樣品之分析中特別明顯，如得自罹患許多血液惡病質及血栓異常，如血小板減少症(血液血小板數目減少)，血小板增多症及其類似者所困擾之個體或病人之樣品。數種血小板計數準確度控制中之困難及挑戰的理由可歸因於1)病人血小板計數及大小有相當大的動態差異；2)小尺寸的血小板；3)接受分析之樣品中存在血小板大小之干擾粒子；及4)活體外老化時血小板之行爲。

血小板分析及定量在血小板減少症個體之例子中可能特別困難，其血液樣品中具有減少或低數目的血小板。此情況往往肇因於針對癌症病人，其具有降低血栓傾向，常使用之處理及治療。此外，罹患一些免疫疾病，尤其是自體免疫疾病，如特發性血小板減少紫斑症(ITP)之個體往往遭

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (2)

遇到血小板損傷及破壞，其導致血小板數目減少。進而，罹患惡性貧血之個體亦具有減少數目之血液血小板。例如得自血小板減少症個體之樣品中，與近似於約150,000-400,000/微升正常範圍之血小板數目相較下，其血小板數目往往少於50,000/微升 (J. C. Dacie及 S. M. Lewis, 1984, Practical Haematology, 6th Edition, Churchill Livingstone, London)。

事實上，正確的血小板計算隨著廣泛應用於血小板減少症病人之血小板取代治療的出現而變得更加重要。此外，許多更複雜的血小板功能研究，如血小板活化及/或黏著測量，之發展與應用需要準確及精密的血小板計數作為實驗室血液學試驗不可或缺的一部分。同時，針對輸血所製備之血小板包裝的品質保證需要可利用且適當之準確血小板計數步驟 (R. K. Wertz及 J. A. Koepke, 1977, Am. J. Clin. Path., 68(1):195-201)。

此技藝中所需要的是更準確，精密，且靈敏之方法以供正常與異常血液樣品之血小板參數的偵測，識別，定量，及定性。此外，可使用全血樣品加以施行之準確及精密的血小板分析方法可以除去一些方法中經由差別性離心或沉澱技術以最初製備富含血小板血漿之需要。此全血血小板分析方法可能有利於診斷未預期之血小板異常症，且有利於監測正常個體及處於疾病發作及療程或疾病進行期間之病人血小板計數及參數。此外，使用於可改良訊號解析及血小板識別，特別是在低血小板計數之例子中的自動化

(請先閱讀背面之注意事項再填本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (3)

系統之方法為此技藝所需。本發明如上所述提供此技藝該類優點及改良。

兩種全自動化血小板計數及大小區分方法為現在已知且被嫻於此技藝者所採用。一種為隙縫阻抗方法。懸浮水溶液中之全血血小板在其通過位於兩個電極間之狹窄隙縫時被偵測到，因此相對於懸浮培養基，其粗略地依照血小板體積之比例增加隙縫中的電阻。因此，血小板電波提供血小板計數及血小板體積。在隙縫阻抗方法中血小板係以其大小為基礎而與紅血球細胞區別，因為血小板整體上較紅血球細胞整體為小。此方法之一些應用中，血小板計數及大小測量係經由數學分析血小板大小分佈之形狀而加以改善。這些分佈符合對數-常態曲線且合適曲線之參數提供血小板計數及大小。雖然此處理之目的係為了排除粒子碎片及小型紅血球細胞，其存在會扭曲對數-常態血小板體積分佈，此類污染粒子及細胞仍無法完全被排除。

第二種全自動化方法為雷射光散射方法。此方法中，懸浮水溶液中之全血血小板在其遮斷雷射光束時被偵測到，其因此使得投射光以特定角度散射至可見光偵測器被放置之路徑中。血小板訊號電波提供體積訊息及計數，因為血小板體積被認為與散射強度成比例。已被設計並採用來施行此類光線散射方法之自動化流式細胞分析儀器實例為H.TM系統儀器(商業命名TECHNICON H.TM系統為商業上可利用，如H.TM1，H.TM2，H.TM3，及其類似者，由此中受讓人所售)及ORTHO ELT-8(Ortho Diagnostics)。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (4)

ORTHO ELT-8系統中，血小板係簡單地經由單一圓錐角上之散射強度差異而與紅血球細胞作區別。TECHNICON H•™系統中，血小板亦基於單一圓錐角上之散射強度區分大小；然而它們係基於其特別的散射強度進入一對適當選擇之偵測器中而與紅血球細胞作區別。雖然血小板散射強度分佈為對數-常態，第二種雷射光散射方法並不會因為符合經由使用對數-常態曲線所得到之數據而改善計數或大小區分。此方法中之血小板碎片係由散射強度落於選擇閾值以下之訊號所組成。

如上所述，隙縫阻抗方法係基於粒子大小，以及基於血小板大小之對數-常態分佈而區別血小板與紅血球細胞及粒子碎片。在血小板與其它粒子大小重疊之情形中，這些差異模糊不清，且此方法最好的地方是認識此失誤。甚而，光線散射方法係基於二次元邊界，當紅血球細胞變小或其斷裂時其可能會交叉，因此亦使得不同的細胞群之間的差異模糊不清，而區別血小板與紅血球細胞。

用於血小板識別之第三種，半-自動化方法包括雷射光散射及螢光之組合以區別血小板與紅血球細胞及粒子碎片。懸浮水溶液中之全血血小板利用血小板-特異性抗體加以標定，如CD42A。接著抗體被結合至螢光團，如異硫氰酸螢光素(FITC)。標幟之血小板在其通過螢光流式細胞分析器時，如Becton Dickinson FACScan(Becton Dickinson)，會使投射光線及螢光散射。血小板及血小板大小之粒子係基於二次元散射型式(向前散射及側邊散射)而與紅血球細胞作

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (5)

區別。這些"被限制"出入之細胞進而基於螢光強度加以分類；只有血小板表現明顯的螢光(W. Groner等人, 1994, Blood, No. 10 Supplement, 687a; R. Dickerhof及A. von Ruecker, 1995, Clin. Lab. Hematol., 17:163-172)。

雖然上述最後兩種方法允許血小板與其它紅血球細胞形態以及與碎片作區分，它們並不提供絕對的血小板計數。甚而，它們並不測量血小板大小，因為沒有簡易的方法能校正針對此目的之方法及施行該方法之系統。此外，標定技術花費人力且相當昂貴。

除了識別及定量血液樣品中之血小板外，用以測量血小板活化(或活化狀態)之簡單，便宜，準確且可再現之方法為此技藝所需。血小板之活化狀態如下所述為血小板功能的一項重要參數。

血小板活化為血小板的基本功能性質，因為活化血小板在止血及血栓中扮演不可或缺的角色。當靜脈傷害發生時，內皮下的表面被曝露於受傷位置，其導致活化血小板黏著至次內皮表面。接著血小板顆粒釋出，血小板聚集及血栓形成。血栓係由纖維素，血小板聚集物及紅血球細胞所組成。

活化血小板與靜止血小板顯著不同，其中前者表現與黏著過程有關之表面醣蛋白。同時，活化血小板釋出顆粒成分並進行如碟-至-球形狀改變及聚集等過程。膨脹亦與形狀改變有關。

血栓形成為血管受傷正常反應之一部份。然而，增加之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (6)

血栓活性亦發生於，伴隨負面效果，如週邊血管疾病(D. V. Devine等 人，1993, Arteriosclerosis and Thrombosis, 13: 857-62), cardiac ischemia (D. McTavish等 人，1990, Drugs, 40:238; G. DiMinno等 人，1985, J. Clin. Invest., 75:328)，糖尿病 (D. Tschoepe等 人，1991, Seminars in Thrombosis and Hemostasis, 17:433-438)及狹心症 (R. C. Becker等 人，1994, Coronary Artery Dis., 5:339)等情況中。亦知以濃縮物形式保存之血庫血小板在貯存期間變得活化且因此失去其一些效力 (H. M. Rinder及 E. L. Snyder, 1992, Blood Cells, 18:445)。此外，血液透析及牽涉體外血液循環之手術步驟已知會引起血小板活化 (如，J. C. Reverter等 人，1994, J. Lab. Clin. Med., 124:79; Y. T. Wachtfogel等 人，1993, J. Thoracic and Cardiovascular Surg., 106:1-10; R. E. Scharf等 人，1992, Arteriosclerosis and Thrombosis, 12:1475-1487)。因此，活體內確認及監測血小板活化狀態之能力提供本發明所得到之方便且有利之篩選技術。

血小板活化已使用螢光流式細胞分析法進行研究 (如 S. J. Shattil等 人，1987, Blood, 70:307; C. S. Abrams等 人，1990, Blood, 75:128; L. Corash, 1990, Blood Cells, 16:97-108)。使用螢光技術，利用血小板活化後被表現或進行形狀改變之位於血小板表面的醣蛋白之特異性螢光-結合抗體進行標幟血小板。流式細胞分析器所計算之螢光-陽性次數代表活化血小板之數目；每次的螢光強度代表每個細胞表面的標幟位置數目。雖然此技術為特異且靈敏的，其在數方面亦屬

五、發明說明(7)

不便，即其為昂貴的；樣品準備為費時的；且數據分析並非自動化。進而，尚無標準方法被建立以設定螢光-陽性閾值；部分係由於閾值位置之專斷本質而部分是由於實驗設計之差異性。

血小板活化亦經由密度-梯度分析進行研究(B. van Oost等人，1983, Blood, 62:433-38)。血小板之密度在其被活化時下降，主要是由於膨脹及其次由於 α -與緻密-顆粒之釋出(S. Holme等人，1981, J. Lab. Clin. Med., 97: 610-22; S. Holme等人，1988, J. Lab. Clin. Med., 112:223-231)，其較血小板細胞質更為緻密。結果，活化血小板樣品在密度-梯度分離中要比非活化樣品具有較高百分比的低密度血小板。密度-梯度分離技術為費時且需要熟練的技術員。進而，測量每個密度-梯度分管中的血小板數目需要一個細胞計數器。

因此，提出一種用於測量血小板活化之新穎，不昂貴且靈敏之吸收光線散射技術的本發明可將進步及方便提供給此技藝。測量血小板活化之本方法為自動化且因此對於臨床應用為有效且省時的。

發明摘述

本發明提供一種用於定量及分析全血樣品中血小板之靈敏，準確，及精密的方法，且其特別有利於分析得自個體具有異常血液狀況個體之血液樣品，其對於血液血小板之數目及/或識別有不利影響。本發明亦提供一種用於血小板識別及分析之快速，簡單，且不昂貴的方法，系統及裝置。本發明之一項目的為提供血小板分析之改良方法，其使

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (8)

用自動化血液學系統以搜集血小板數據，包括血小板計數，大小，成分濃度及乾重。本發明之另一項目的為提供一種針對血小板計數準確度之高獲得率或高-擴大率方法及裝置，其提供更多血小板分析數據且與採用螢光強度，散射強度，及隙縫阻抗以區別血液樣品中非血小板與血小板之方法相較下更便宜又容易地提供結果。

本發明之另一項目的為提供一種血小板計數，訊號解析及識別之方法，其對於具有血小板計數約為自每微升1,000至少於約50,000血小板之血液樣品而言為敏靈且準確的。尤其，本發明提供用於血小板減少症樣品之改良血小板計數準確度。

本發明之另一項目的為得到細胞圖結果，其提供血小板-大小區域中粒子-形態分佈之良好描繪及詳細敘述。

本發明之另一項目的為提供一種修飾及改善現行自動化血液學分析儀之裝置，其經由加入至少兩個通道以施行改良之血小板計數及分析方法。該修飾或改善加裝了一個低數散射角度/高獲得擴大率通道以及一個高散射角度/高獲得擴大率通道至現行系統並加上基於Mie散射理論之訊號分析以達成施行本發明之方法及裝置。

本發明之另一項目的為允許微細胞型紅血球及紅血球細胞片斷之確認及定量。

本發明之進一步目的為經由測量血小板成分濃度(MPC)而提供血小板活化程度之決定。依據本發明，MPC值與血小板活化狀態相關。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

良

五、發明說明(9)

本發明之一項目的為提供血小板乾重之測定，其為血小板可活化性之預測。

本發明之另一項目的為提供血小板成分濃度之決定，其允許試管內測量血液樣品之年齡。

本發明所提供之進一步目的及優點將經由下文之詳細描述而更加明顯。

繪圖敘述

繪圖的附屬圖形被呈現以進一步描述本發明並經由澄清其不同方面而協助了解。下文中所述之散射/散射細胞圖係得自於本發明之裝置及方法被採用於血小板之測定及分析時，其使用依據本發明自動化血液學分析儀之電-光學偵測系統。在下文所呈現之繪圖中， $RBC=10^6/\text{微升單位}$ 之紅血球細胞計數； $PLT=10^3/\text{微升單位}$ 之血小板計數； $MPV=\text{毫微微升}(f1)$ 中平均血小板體積； $MP+C$ 相等於 $MPC=\text{克/分升單位}$ 之平均血小板成分濃度；且 $MP+M$ 等於 $MPM=\text{微微克}(pg)$ 單位之平均血小板乾重。

圖1說明散射/散射細胞圖上之血小板體積(V)相對於折射指數(n)(即 V/n)圖。細胞圖中呈現的每條線代表如分析中所決定及如圖3敘述中所確認之特殊粒子型態。

圖2A，2B，及2C分別顯示n-戊烷，n-己烷，及n-庚烷油滴之散射/散射細胞圖。細胞圖中呈現的每條線代表如分析中所決定及如圖3敘述中所確認之特殊粒子型態。

圖3證明不同粒子之位置，即，紅血球細胞，大型血小板，紅血球細胞形骸，血小板，紅血球細胞片斷，及粒子-形

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (10)

態標示散射/散射細胞圖中之原始碎片。此敘述亦可應用於圖4，5，6，8及13中所示之細胞圖。

圖4說明使用本發明之血小板決定方法及系統呈現正常樣品結果輸出之代表性細胞圖及柱狀圖。

圖5A說明得自懸浮於紅血球細胞稀釋劑(如TECHNICON RBC稀釋劑)中之K₃EDTA-抗凝固血液樣品之血小板分析代表性細胞圖。

圖5B說明得自懸浮於等張性磷酸緩衝鹽水(PBS)之K₃EDTA-抗凝固血液樣品之血小板分析代表性細胞圖。欲被了解的是樣品係在室溫下進行分析，即使其未曾被保存於室溫。

圖6A說明得自懸浮於紅血球細胞稀釋劑(如TECHNICON RBC稀釋劑)之ACD-抗凝固血液樣品分析的代表性細胞圖。圖6B說明得自懸浮於等張性磷酸緩衝鹽水(PBS)之ACD-抗凝固血液樣品分析的代表性細胞圖。

圖7A為呈現正常血液供給者樣品之平均血小板乾重(MPM)相對時間之代表圖形。MPM係針對保存於室溫下24小時之久的正常樣品相對1小時之久的正常樣品進行測定。圖7B顯示呈現異常血液供給者樣品之平均血小板乾重相對時間的代表圖形。MPM係針對保存於室溫下28小時之久的異常樣品相對4小時之久的異常樣品進行測定。

圖8A，8B，及8C說明經由數種自動化方法，即本發明之PLT1系統(圖8A)，TECHNICON H•™2系統(圖8B)，及Coulter STKS系統(圖8C)，所得到之異常樣品的血小板體積

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再
裝
訂
線)

五、發明說明 (11)

(MPV)柱狀圖。

圖 9A-9D 說明使用 TECHNICON H • TM2 系統或 Coulter STKS 系統所得到之平均血小板體積 (MPV) 相對異常血小板 (PCT) 計數測定 (PLT 計數 <20,000/微升)。圖 9A 顯示 TECHNICON H • TM2 系統使用 4 小時之久的異常血液樣品所得之結果。圖 9A 中， $r=0.59$ ； $Syx=0.88$ (請定義 r 及 s_{yx})；斜率 = 0.14；且截距 = 4.5。圖 9B 顯示 TECHNICON H • TM2 系統使用 28 小時之久的異常血液樣品所得到之結果。圖 9B 中， $r=0.72$ ； $Syx=0.54$ ；斜率 = 0.13；且截距 = 3.29。圖 9C 顯示 Coulter STKS 系統使用 4 小時之久的異常血液樣品所得到之結果。圖 9C 中， $r=0.13$ ； $Syx=0.95$ ；斜率 = 0.02；且截距 = 8.06。圖 9D 顯示 Coulter STKS 系統使用 28 小時之久的異常血液樣品所得到之結果。圖 9D 中， $r=0.66$ ； $Syx=1.09$ ；斜率 = 0.18；且截距 = 6.31。

圖 10A 及 10B 說明使用本發明的新穎 PLT1 系統及方法所得之平均血小板體積 (MPV) 相對異常血小板減少性血小板 (PCT) 計數測定 (PLT 計數 <20,000/微升)。圖 10A 顯示 PLT1 系統使用 4 小時之久的異常血液樣品所得到之結果。圖 10A 中， $r=0.32$ ； $Syx=0.89$ ；斜率 = 0.06；且截距 = 10.02。圖 10B 顯示 PLT1 系統使用 28 小時之久的異常血液樣品所得到之結果。圖 10B 中， $r=0.32$ ； $Syx=1$ ；斜率 = 0.07；且截距 = 11.79。

圖 11A，11B，及 11C 說明使用不同的自動化方法，即 TECHNICON H • TM2 系統，Coulter STKS 系統，及本發明之新穎 PLT1 系統施行於正常血液樣品所得到之平均血小板

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再
裝
訂)

裝

訂

線

五、發明說明 (12)

體積 (MPV)相對血小板 (PCT)計數測定。圖 11A顯示 TECHNICON H •TM2系統使用1小時之久的正常血液樣品所得到之結果。圖 11B顯示 Coulter STKS系統使用1小時之久的正常血液樣品所得之結果。圖 11C顯示本發明之 PLT1系統使用1小時之久的正常血液樣品所得之結果。

圖 12A及 12B顯示使用 PLT1方法及系統所得到針對異常樣品之平均血小板乾重 (MPM)及平均血小板成分濃度 (MPC)準確度數據。圖 12A說明室溫下進行貯存及分析之 28小時之久的異常樣品相對4小時之久的異常樣品之 MPM準確度數據。圖 12A中， $r=0.75$ ； $Syx=0.13$ ；斜率 $=0.74$ ；截距 $=0.49$ ；4小時平均值為 2.04；且 28小時平均值為 1.99。圖 12B說明室溫下 28小時之久的異常樣品相對4小時之久的異常樣品之 MPC準確度數據。圖 12B中， $r=0.35$ ； $Syx=1.3$ ；斜率 $=0.3$ ；截距 $=12$ ；4小時平均值為 22.1；且 28小時平均值為 18.7。

圖 13A，13B，及 13C說明血小板體積 (MPV)柱狀圖，其相對於表 8 中異常性血小板減少症樣品 #70 所呈現之結果。圖 13A代表使用本發明 PLT1分析方法所得到之柱狀圖；圖 13B代表使用 TECHNICON H •TM2分析系統所得到之柱狀圖；圖 13C代表使用 Coulter STKS系統之分析方法所得到之柱狀圖。

圖 14A至 14D顯示依據本發明之新穎光線散射方法與螢光方法間對於測定血小板活化之比較。圖 14A-D證明本發明之新穎光線散射方法(圖 14C及 14D)及螢光方法(圖 14A及 14B)以相似方式探測檸檬酸鈉處理及 EDTA處理之血液樣品

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (13)

的凝血-相關性血小板活化。本發明方法之劑量反應曲線以標準樣式呈現MPC增加(圖14C)並以"倒置"樣式呈現MPC下降(圖14D)。倒置與標準樣式曲線皆呈現相同的結果，但前者方向允許較直接視覺比較兩種方法的結果(即圖14B直接地與圖14D作比較)。

發明詳述

本發明提供一種靈敏且準確的血小板定量及定性方法，其可應用於自動化血液學分析儀系統。本發明進而提供一種用以施行如上所述之血小板定量及定性方法的裝置。如本文中所使用，血小板通常被縮寫為"PLT"。本文中常使用之其它縮寫如下：RBC為紅血球細胞；MPM為平均血小板乾重；MPV為平均血小板體積；MPC為平均血小板成分濃度；TCP為血小板減少症或血小板減少症，且TCPS為使用於得自血小板減少症病人之異常血液樣品名稱；MCV為平均細胞體積；MCHC為平均細胞血紅素濃度；且HCT為血球容積。

適合與本發明一起使用之現行自動化血液學分析儀系統型式經由H•™系統加以示範，其TECHNICON H•™1，H•™2，H•™3及類似之商業命名下為商業上可利用，由此中之受讓人所售。該類系統中，血小板(或粒子)偵測係經由測量光線散射之電-光學方式以及經由測量電阻抗之電學方式得到。對於嫻於此技藝者，TECHNICON H•™自動化分析儀系統關於紅血球細胞及血小板分析之操作原則在本文中加以說明以清楚地描述為了產生本發明而對該系統所作

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (14)

之改變。這些系統中，紅血球細胞及血小板在單一的光學測量通道中一起進行分析，其包括一個氬-氬雷射光來源，一個流槽，及兩個光學偵測器。作為其正常操作步驟之部分，自動化系統將2微升($2\mu\text{l}$)之全血懸浮於1.25毫升之TECHNICON HTM系統RBC稀釋劑中，其為等體積地球化紅血球細胞以使其可適當地使用如本文所解釋之Mie散射理論進行分析的試劑溶劑。適合使用於本發明之血小板分析及方法及系統的紅血球細胞球化試劑及稀釋劑見述於S. S. Fan等之美國專利編號5,284,771，5,360,739及5,411,891；G. Colella等人之美國專利編號5,350,695及5,438,003；及Kim及Ornstein之美國專利編號4,575,490及4,412,004。

然而約10微升該懸浮液之水流被包覆於相似折射指數之試劑液體中，即TECHNICON HTM系統RBC/嗜鹼性球界面活性劑被覆。RBC/嗜鹼性球被覆為一種"被動性"試劑，其不會直接與血球細胞作用，但包圍且中心化流槽中之液流。其亦提供分析之單純粒子處理。例如RBC/嗜鹼性球界面活性劑被覆試劑組合物包括無機鹽，如氯化鈉，7.7克/升；磷酸鈉，二鹼價，2.4克/升；磷酸鈉，單鹼價，0.3克/升；聚乙氧基化物非離子性，非溶血性界面活性劑Pluronic P-105，1.0克/升；抗-氧化試劑，如3,3'硫代二丙酸，0.10克/升；及抗微生物劑，如Proclin 150，0.40克/升，pH約在7.0-7.5且克分子滲透壓濃度約在285-305 mOsmol/公斤。

當包覆之細胞液流通過流槽時，懸浮液中的紅血球細胞與血小板會散射一些入射的雷射光。兩個偵測器感應到相

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

象

五、發明說明 (15)

關於入射軸之特定角度間隔的散射光線。偵測器訊號被擴增，就正常樣品而言，以使紅血球細胞所產生之平均訊號位在紅血球細胞相關訊號振幅範圍的中間。依據本發明，光線散射強度係在兩個光通道中的兩個錐形角之間進行測量，其增加第一個及第二個光通道訊號獲得率以產生足以解析樣品中血小板與非血小板的兩種散射強度測量。第一個光通道訊號值係得自高角偵測器獲得率之增加且第二個光通道訊號值係得自低角偵測器獲得率之增加，因此產生低及高角輸出的新穎高獲得率型式。同時依據本發明，該系統呈現來自延著散射/散射細胞圖之X軸約5至20度，7至15度較佳，且5至15度最佳之散射度訊號。此外，該系統呈現來自延著散射/散射細胞圖之Y軸約1至7度，1至5度較佳，且2至3度最佳之散射度訊號。這些訊號被使用來決定紅血球細胞參數，加體積及血紅素濃度，如本文中進一步之敘述。

紅血球細胞一般為雙凹圓盤，其散射性質對於其通過上述光學系統流槽的方向為敏感的。為了消除粒子方向對於訊號強度之影響，紅血球細胞在TECHNICON H•™系統RBC稀釋劑中進行球化(如Kim及Ornstein之美國專利編號4,575,490及4,412,004)。進而，Mie散射理論，其提供球化粒子(如球化紅血球細胞)之角度散射強度樣態，可預測散射強度對於折射指數以及細胞體積為敏感的。因此，具有相同體積但具有不同折射指數之兩個粒子將具有不同的散射樣態。由於紅血球細胞折射指數線性依賴細胞血紅素濃度

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (16)

(R. Barer及 S. Joseph, 1954, Quarterly Journal of Microscopical Science, 95:399-423), 其每個細胞間各不相同, 單一圓錐角間距的散射強度測量是不可能唯一地決定細胞體積, 即使是球化紅血球細胞。因此, 為獨特地測定紅血球細胞之體積, 有需要測量至少兩個分開的圓錐角間距的散射強度。細胞血紅素濃度係以兩角測量之附屬方式加以測定。

使用Mie理論之互除法提供相關於特定體積及折射指數之粒子的角度散射型式。關於紅血球細胞大小及濃度的有利範圍(即分別為約30-80 fl及約19-49克/分升), 曾測量過一對一之間的一致性存在於1)2-3度及5-15度時的散射強度配對之間, 及2)紅血球細胞之體積及濃度間(Tycko之美國專利範圍編號4,735,504)。對於TECHNICON H•™系統, 相關性配置係以平面基質之形式排列。基質的指數係由X-及Y-通道訊號值所組成且基質之表值相關於體積及濃度。球化粒子之電磁散射理論(即Mie理論)已詳細描述於, 例如, M. Kerker, 1969, In: The Scattering of Light, Academic Press。

在自動化應用Mie表之前, 該系統將超過預先決定之訊號閾值的所有粒子計算為紅血球細胞。然後其使用上述的兩個圓錐角測量以定名為紅血球細胞或血小板。此兩種粒子形態佔據不同區域的體積/折射指數面積, 紅血球細胞要大得多且具有顯著較高的折射指數。然而, 這些系統中現在使用的訊號獲得率提供血小板與非血小板, 如紅血球細胞形骸, 紅血球細胞片斷及細胞碎片, 不良的區別。此外

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

結

五、發明說明 (17)

，現行的隙縫阻抗方法，其依賴大小之不同以區別血小板及其它粒子，並不能適當地區別血小板與紅血球細胞片斷或碎片，其具有類似於血小板之體積。

相反地，現行的電-光學儀器依賴單角-間距測量以決定血小板體積。現行的H•TM系統中，血小板體積被認為與5-15度散射強度成正比。事實上，如本文中將敘述的，此強度隨著活體外樣品年齡，因血小板膨脹而下降(參見實施例1)。結果當真正平均血小板體積上升時被報告為平均血小板體積下落。同時，單角方法可將實際上具有相同體積但不同密度(即折射指數)之血小板報告為不同體積。進而，電-光學與隙縫阻抗儀器二者往往低估血小板減少症樣品的MPV值，因為這些異常樣品中低訊號碎片典型地佔總粒子計數的重要部分。

由於本發明者之部分努力為得到更加靈敏，準確，且精密之血小板分析以供施行於自動化分析系統，如TECHNICON H•TM分析儀系統，使用TECHNICON H•TM1之試驗站如本文中所述進行修改及配置以搜血小板集數據，其使用本發明中所述之方法及系統，包括X-及Y-紅血球細胞光通道訊號之擴大(擴大訊號獲得率)。

用以施行本發明血小板區別分析之新配置自動化系統在本文中被稱為本發明之PLT1系統及方法。為了血小板的準確分析，Mie散射理論被使用來發現如本中所述之適當增加擴大因子。第一，體積與折射指數範圍係針對Mie分析進行選擇。選擇之體積範圍約1至60 fl(fl=微毫升=10⁻¹⁵公

五、發明說明 (18)

升)，且1至30 fl較佳。此範圍被選擇來包含所有正常及大多數異常樣品之血小板大小 (J. M. Paulus, 1975, Blood, 46(3):321-336)。選擇之折射指數範圍約為1.340至1.400，1.350至1.400為較佳。低限值係基於血小板要比其血漿介質具有較高折射指數之觀察(否則它們將不會被看見)且血漿的折射指數典型地大於約1.345，如折射法所測定。上限值係基於大多數血小板要比紅血球細胞，其折射指數很少低於1.390(23克/分升之細胞血紅素濃度)，較不緻密(因此具有較低的折射指數)之觀察。該限制擴展至約1.400較佳以代表與一些紅血球細胞同樣緻密之小部分血小板。基於這些體積及折射指數及Mie理論，標準的H•™系統X-通道訊號被增加或擴大約8至15倍，約12倍較佳，且Y-訊號被增加或擴大約20至35倍，依據本發明約30倍較佳。

當這些訊號獲得率擴大時，在如2至3度及如5至15度之光線散射強度適合於解析血小板與干擾物質，如細胞碎片，紅血球細胞片斷，及紅血球細胞形骸。同時，紅血球細胞在此方法中被清楚地識別，因為其訊號出現於飽和通道X=99，Y=99。因此，本發明所述之組合式散射測量提供與現行自動化方法相較下較為準確的血小板計數，尤其是針對血小板減少症樣品，其中干擾部分典型地增加。進而，依據本發明產生之散射/散射細胞圖允許視覺評估樣品中所包含血小板之數目，平均大小，及平均折射指數。該細胞圖亦提供視覺評估可能存在於樣品中之其它血小板大小粒子之數目及形態。

五、發明說明 (19)

此外，在本發明之另一方面，本發明特有之兩角散射測量可區別已釋出其顆粒之血小板(即活化血小板)與未釋出者，因為活化形式之血小板要比未活化形式具有較低的折射指數。現行的自動化儀器無法作此區別。

甚而，高擴大率允許本發明之血小板測定系統在血小板上施行Mie理論，因此提供基於理論而非經驗觀察的血小板體積及折射指數資訊。在PLT1試驗站系統中，依據本發明所測量之五項參數為紅血球細胞計數(RBC計數， 10^6 /微升)，血小板計數(PLT計數， 10^3 /微升)，平均血小板體積(MPV，fl)，平均血小板乾重(MPM，微微克)，及平均血小板成分濃度或密度(MPC，克/分升)。

卻被了解的是，本文中所述血小板測定的新發現方法及其在自動化試驗系統中測試之前，MPM及MPC之分析性測量參數先前在此技藝中所知及所使用之自動化血小板分析與測量方法及系統中未有可採用的。因此，本發明之方法及系統提供樣品準確且完整之血小板分析，其包括血小板計數，平均血小板體積，平均血小板乾重，及平均血小板成分濃度。此外，本發明在其提供如下文進一步說明之完整血小板分析的同時亦提供樣品的紅血球細胞計數。

本發明之高擴大率方法與其它方法在關於血小板計數及大小準確度，靈敏度，及定性與定量再現性上進行比較。其它比較性方法包括散射強度(如TECHNICON H•TM2系統，Bayer Corporation, Tarrytown, NY)，隙縫阻抗(如Coulter STKS Model系統，Coulter Electronics, Dade, Fla.)，相位差

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (20)

顯微鏡，及組織學血液抹片概算。

PLT1之高擴大率系統

依據本發明之一方面，本發明之血小板識別及定量方法與系統採用新近決定之高擴大率方法。針對本發明獨特發展之該測量係以修飾之TECHNICON H•™1系統進行，其被稱為PLT1模式或模範系統/方法，因為其對於血小板施行獨特的測量及定量參數且其與此技藝中現行的自動化系統及裝置明顯不同。對於紅血球細胞分析，PLT1系統之X-通道訊號被擴大約表面值的12倍且Y-通道被擴大約30倍。

因此，如上文所述且依據本發明，Mie散射理論表係針對約1至30 fl及約1.350至1.400折射指數之球體進行製作。該表與紅血球細胞分析所使用者為同一格式。相關於該表之體積/折射指數(V/n)圖顯示於圖1。X-及Y-通道獲得率係使用n-戊烷(n=1.3577)，n-己烷(n=1.3776)及n-庚烷(n=1.3884)之懸浮液滴進行標準化。五十毫升之每種碳氫化物均與1毫升之RBC/Baso被覆劑進行振盪達10秒且檢體經由直接細胞分析法進行分析，即檢體在其通過流槽前並未進一步進行稀釋。體積/折射指數圖，其包括衍生自表之三種碳氫化物分別的恒定折射指數曲線，與液滴所形成之真實曲線一起被呈現於報告螢幕上。需要時訊號獲得率被調整且檢體進行再操作，直到每種碳氫化物之真實曲線覆蓋住其相關之表-衍生曲線。所產生之型式實例被呈現於圖2。因此，依據本發明，血小板係經由出現於體積/折射指數圖中而與非血小板進行特異地解析且進而基於血小板折射

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (21)

指數之典型高氏分佈進行解析。

如PLT1方法所施行之RBC計數如H•TM系統利用TECHNICON校準器，依據製造商之說明進行校正。RBC計數校正因子，其主要來自稀釋作用，亦被施用至血小板計數(如利用H•TM系統)，因為樣品中的血小板及紅血球細胞被給予相同的稀釋因子。然而，依據本發明並與比較性的自動化方法相較下，沒有獨立的血小板-計數校正因子可被施用於PLT1系統及方法中。因此，PLT1與其它技術間的血小板計數差異將不會被比較性目的之人為校正因子所掩蓋。

PLT1系統被設計來處理全血樣品，其採用水力學，氣體力學，化學，反應時間，及RBC/PLT通道之計算時間。同時，血小板通道訊號係得自使用於RBC/PLT通道中相同的一對光學偵測器；然而上述用以測量及決定血小板所得到之增加訊號獲得率擴大為PLT1系統所特有且並非技藝中目前所使用之系統與方法之一部分。此系統之獲得率訊號如說明進行分析並例示於下文：

下列訊號代表非血小板(即RBC或"其它")，當1)其位在V/n圖之外側(這些代表"其它")；2)其使得偵測器飽和($X=99$ ， $Y=99$)(這些代表RBC)；或3)其位於 $X<80$ ， $Y=99$ 之通道內(這些代表"其它")。靠近原點之圖上方至左側訊號代表細胞碎片。較大訊號，其包括位於 $X<80$ ， $Y=99$ 通道內者，代表紅血球細胞形骸。飽和訊號係來自RBC及非常大型血小板。圖下方至右側之訊號亦來自RBC片斷(參見圖3)。

圖上的剩餘訊號可如下分析：第一，該系統使用Mie換算

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (22)

表計算X=18或以上之通道內訊號的平均折射指數及標準差(SD)。該系統將V/n圖上低於X=18通道之訊號自此部分分析排除，因可能為碎片污染。然後，任何具有介於約平均值之+2及-1.8 SD折射指數值之粒子訊號被命名為血小板。其餘的粒子訊號被稱為"其它"。此得到三種粒子形態之計數，即PLT(P)，RBC(R)及"其它"(O)。由此系統所偵測之粒子數目，稱為 V_{sig} ，要比分析粒子之數目來得大。因此，P，R，及O代表每種粒子形態的相對數目而非每種形態的真實原始計數。為了得到原始計數，該系統施行以下換算：

$$N_r=(R/(R+P+O)) \times V_{sig}; N_p=(P/(R+P+O)) \times V_{sig};$$

$N_o=(O/(R+P+O)) \times V_{sig}$ ；其中 N_r =原始紅血球細胞計數； N_p =原始血小板計數； N_o =原始"其它"計數；且 V_{sig} =測得粒子之總數。然後原始計數針對"偶合事件"進行校正，即二或多個粒子同時出現於偵測器通道內，偵測器將其計算為單一粒子。關於偶合事件，"其它"被假設行為如PLT且因此在偶合-校正計算中與它們成為一組。偶合之頻率可經由Poisson統計算加以準確預測，其為嫻於此技藝者所知者。校正之原始RBC，PLT，及"其它"計數被稱為RBC'，PLT'及其它'。最後，RBC校正因子被施用至RBC'，PLT'及其它'以得到以下值：RB(10^6 /微升)；PLT(10^3 /微升)；及其它(10^3 /微升)。

曾想像改良之PLT1自動化方法及系統之體積與折射指數動態範圍可有效地被擴展至操作飽和通道X=99，Y=99中偶而出現之大型且緻密之PLT。PLT1確認這些為紅血球細胞

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (23)

。此可經由向下擴展現行的H•™系統Mie換算表至V<8 fl且n<1.400而達成。PLT1系統中所採用之RBC/PLT通道擴大可提供大型血小板訊號之適當解析以使擴展表格之應用提供準確的V及n值。

本發明之PLT1系統係基於Mie表計算平均血小板體積(MPV, fl)及平均折射指數。該系統亦從折射指數與體積之平均值得到平均血小板成分濃度(MPC, 克/分升)及平均血小板乾重(MPM, 微毫克), 如下所示:

$$MPC(\text{克/分升}) = (\text{平均折射指數} - 1.333) / (0.0018 / (\text{克/分升}))$$

，其中1.333=水的折射指數且0.0018(克/分升)=平均折射指數(RI)增量。將被嫻於此技藝者所認知且在下文進一步討論的是，RI增量值在此等式中被視為一常數以消除其在個別細胞間之差異。

$$MPM(\text{微毫克}) = MPC(\text{克/分升}) \times MPV(\text{fl}) / 100 (\text{注意克/分升})$$

$$= 100 \times \text{微克/fl}$$

平均折射指數增量值係基於血小板乾重之主要成分為蛋白質(57%)，脂肪(19%)，及碳水化合物(8.5%)之事實(Wintrobe's Clinical Hematology, 第19版, 1993, 515頁)。這些成分的折射指數增量分別為0.00187/(克/分升)，0.0017/(克/分升)，及0.00143/(克/分升)(S. H. Armstrong等人, 1947, J. A. C. S., 69:1747-1753; R. Barer及S. Joseph, 1954, Quarterly Journal of Microscopical Science, 95:399-423)。使用這些成分之相對濃度而分配一平均折射指數增量至血小板可得到0.0018/(克/分升)的值。關於少量之成分，一些具

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (24)

有較高之折射指數增量而一些具有較低之增量。這些成分之平均增量不被預期會明顯改變分配值。注意0.0018/(克/分升)亦為此技藝中文獻所分配給原生質的值(R. Barer及S. Joseph, 1954, Quarterly Journal of Microscopical Science, 95: 399-423)。除了報告RBC及PLT計數, MPV, MPC及MPM外, 本發明之系統呈現血小板體積, 血小板成分濃度, 及血小板乾重之頻率柱狀圖(圖4)。

PLT1系統及方法可使用如RBC/PLT通道方法所用之相同化學藥劑, 其被現行TECHNICON H•™系統所採用; 所使用之球化劑不會對血小板產生不利影響或作用。甚而, 對於收集於K₃EDTA抗凝劑中且依照本發明進行分析之血小板並不需要額外的球化作用。例如圖5A說明本發明之PLT1系統及方法針對K₃EDTA中抗凝固且之後懸浮於RBC稀釋溶液中的血小板所得到之PLT1散射/散射細胞圖。如此技藝中所報告, K₃EDTA可球化血小板, 雖然並完全(S. Holme及S. Murphy, 1980, J. Lab. Clin. Med., 96: 480-493, G. V. R. Born, 1970, J. Physiol., 209: 487-511)。圖5B說明懸浮於等張性磷酸緩衝鹽水(PBS)中之相同樣品的第二小部分之PLT1散射/散射細胞圖。經由比較圖5A及5B可觀察到, 得自本發明方法及系統之兩個細胞圖具有相同的外觀。甚而, 報告之參數值亦相同, 位於儀器之誤差極限內。這些結果證明紅血球細胞球化劑對於本發明方法提供準確RBC計數及血小板參數之結果並非必需。

此外, 圖6A及6B顯示得自相同供給者之血小板的相關配

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (25)

對PLT1-產生散射/散射細胞圖，除了商業上可利用之酸/檸檬酸/右旋糖(ACD)溶液被使用作為抗凝劑外。與K₃EDTA相反的是，ACD已知不會球化血小板(S. Holme及S. Murphy, 1980, J. Lab. Clin. Med., 96:480-493. G. V. R. Born, 1970, J. Physiol., 209:487-511. G. V. R. Born et al., 1978, J. Physiol., 280:193-212. M. Frojmovic 及 R. Panjwani, 1976, Biophys. J., 16:1071-1089)。再次地，該細胞圖具有相同的外觀，雖然樣品懸浮於ACD中會導致細胞圖比懸浮於K₃EDTA中樣品所得到者顯著更分散。此分散性質係由於流槽內非球化血小板之隨意方向且對於使用本發明系統及方法所得到結果的靈敏度及準確度沒有不利影響。這些結果證明紅血球細胞稀釋劑不會球化血小板；事實上，血小板球化作用並非本發明中結果準確度之所需。

如本文中所述，本發明第一次證明球化血小板，類似紅血球細胞，在選擇的測量條件下"有效地"作為均質球體，即使血小板並非完全的球化且包含不同形態，數目，及折射指數之顆粒。在本發明之前，此分析方法被認為僅對球化，均質之粒子有效(參見，如D. H. Tycko之美國專利編號4,735,504)。

本發明之另一方面為應用Mie散射理論至血小板分析之兩角散射測量，其使用適合於紅血球細胞分析之相同或相似角度間距。在本發明之前，嫻於此技藝者已知選擇用於紅血球細胞分析之一對圓錐角範圍係特異於此細胞形態，因為，即使對於紅血球細胞，並非所有配對角均可提供準

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (26)

確分析(參見 Tycko之美國專利編號 4,735,504)。進而，Tycko之分析被顯示僅對球化紅血球細胞有效，其典型地約比血小板大10倍(即紅血球細胞之MCV=85 fl，相對血小板MCV=8.5 fl)；因此，紅血球細胞提供更大的分析訊號。同時，直到本文中所述發明之時間，嫻於此技藝者已知僅有該兩角間距足以分析均質且完全球化粒子，且其假設不完全球化粒子需要至少三角間距以供分析。本發明第一次證明上述參數(即配對之圓錐角及兩角間距)，其先前僅被使用於紅血球細胞分析，對於不完全球化且非均質粒子，如具有正常體積範圍為約2-20 fl血小板之準確且靈敏的決定及測量亦為有效的。

現行的自動化方法(如 TECHNICON HTM系統及 Tycko之美國專利編號 4,735,504中所述)僅被設計用於紅血球細胞分析，例如用於決定紅血球細胞體積及細胞血紅素濃度。相反地，本發明之PLT1方法如本文中所述及例示可方便地允許血小板與紅血球細胞同時分析。通常，PLT1方法第一次證明一自動化系統，如HTM系統，可經配置以供同一光學系統中，依據本發明之新穎方法學，同時決定及分析血小板與紅血球細胞，而無須犧牲任何測定之準確度及精密度。獨立的血小板及紅血球細胞Mie理論分析可施行於經由依據本發明之單一對光學偵測器所收集之訊號上，因為全血樣品中的血小板是在訊號擴大情況下並利用特別適合於PLT1系統及方法中血小板細胞形態之Mie散射理論表進行分析，而血液樣品中的紅血球細胞則在擴大情況下並利用

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (27)

特別適合於紅血球細胞之Mie散射理論表進行分析。

僅有本發明之PLT1方法及系統提供自動化測量平均血小板乾重(MPM)，其以每個細胞為基礎或作為樣品平均。原則上，MPM(不是每個細胞乾重或其分佈)可從測量平均血小板成分濃度，MPV及%血小板水分加以決定，如下所示：

$MPM(pg) = \text{平均總血小板重量}(pg) \times (100 - \% \text{水}) / 100$ ，其中
 $\text{平均總血小板重量}(pg) = \text{平均血小板密度}(克/毫升 = pg/fl) \times MPV(fl)$

然而，這些決定同時需要血小板密度測量(D. G. Penington等人, 1976, Br. J. Hematol., 34:365-376; L. Corash等人, 1997, Blood, 49(1):71-85; C. B. Thompson等人, 1982, Br. J. Hematol., 50:509-519; 及L. Corsh等人, 1984, Blood, 64(1):185-193)及%水測量(F. Gorstein等人, 1967, J. Lab. and Clin. Med., 70:938-950)；這些測量很繁瑣，費時，且不適合於高生產自動化。

由PLT1系統及方法所決定之平均MPM值可與基於血小板密度，MPV，及%血小板水分之已建立平均值所作的間接估計進行比較。此技藝中一般同意針對抗凝固於ACD中並以stractan梯度加以分離之血小板的平均血小板密度約為1.065克/毫升(D. G. Penington等人, 1976, Br. J. Hematol., 34:365-376; L. Corash等人, 1977, Blood, 49(1):71-85; C. B. Thompson等人, 1982, Br. J. Hematol., 50:509-519; 及L. Corash等人 1984, Blood, 64(1):185-193)且MPV約為6.5 fl(E. A. Trowbridge等人, 1985, Clin. Phys. Physiol. Meas., 6(3):221-

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (28)

238; L. Corash 等人, 1977, Blood, 49(1):71-85; C. B. Thompson 等人, 1982, Br. J. Hematol., 50:509-519)。然而, 此技藝衍生之MPV值係基於利用球化聚苯乙烯小珠加以校正之裝置所作的隙縫阻抗測量。因此, 針對非球化ACD血小板之MPV估計為常規性地低(N. B. Grover等人, 1969, Biophys. J., 9:1398; J. Hurley, 1974, Biophys. J., 10:74)。全部其它條件均相等時, 針對K₃EDTA-血小板所作的隙縫阻抗測量更為準確。這些測量型式得到新鮮(約1小時壽命)樣品之MPV值約為8.5 fl(E. A. Trowbridge等人, 1985, Clin. Phys. Physiol. Meas., 6(3):221-238)。

關於K₃EDTA除了球化血小板外是否膨脹血小板一點在此技藝中尚有爭議(參見, 例如 S. Holme及 S. Murphy, 1980, J. Lab. Clin. Med., 96:480-493; E. A. Trowbridge等人, 1985, Clin Phys. Physiol. Meas., 6(3):221-238; G. V. R. Born, 1970, J. Physiol., 209: 487-511; G. V. R. Born, 1978, J. Physiol., 280:193-212)。曾有報告K₃EDTA血小板之密度梯度測量得到平均密度1.060克/毫升(H. H. K. Watson及 C. A. Ludlam, 1986, Br. J. Hematol., 62:117-124)。比較該值與ACD-血小板之1.065克/毫升值, 建議K₃EDTA膨脹血小板約達8%。以此基礎, "未膨脹"血小板之MPV=7.8 fl(其與基於血小板容積測量(S. Karparkin及 A. Charmatz, 1969, J. Clin. Invest., 48:1073-1082)以及與光學顯微鏡(M. Frojmovic及 R. Panjwani, 1976, Biophys. J., 16:1071-1089))之發表值非常合理一致。使用7.8至8.5 fl作為MPV範圍, 平均總血小板重量

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (29)

範圍為 8.31 pg 至 9.05 pg。%血小板水含量之估計值分布自 74.6% 至 77% (F. Gorstein 等人, 1967, J. Lab. Clin. Med., 70:938-950; S. Karpatkin, "Composition of platelets", In: Hematology. 第二版, 1977. McGraw-Hill, N. Y., 1176-1178 頁)。此得到 MPM 範圍 1.91 pg 至 2.30 pg。使用 LPT1 所得到之平均值 2.02 位於此範圍內。相反地, 最高的 MPM 發表值, 2.8 pg (S. Karpatkin, "Composition of platelets", In: Hematology. 第二版, 1977, McGraw-Hill, N. Y., 1176-1178 頁), 遠在此範圍之外, 此外, 該值不可能在生理基礎上, 因為其相等於 32.9 克/毫升至 35.9 克/毫升之成分濃度範圍, 其與紅血球細胞成分濃度之範圍重疊--35 克/毫升至 38 克/毫升--MCHC=32 克/分升至 35 克/分升 (J. W. Harris 及 R. W. Kellermeyer, 1972, In: The Red Cell, 第二版, Harvard University Press, 282 頁)。

因此, 具有平均密度之血小板應在正常紅血球細胞群之低密度部分被找到。然而如一般施行所示, 事實並非如此。

另一方面, 血小板活性之測量, 如本發明方法及系統所提供, 為臨床上有用的。目前, 螢光流式細胞分析法 (G. I. Johnston 等人, 1987, Blood, 69(5):1401-1403; J. N. George 等人, 1986, J. Clin. Invest., 78:340-348); 血小板密度測量 (D. G. Pennington 等人, 1976, Br. J. Hematol., 34:365-276; L. Corash 等人, 1977, Blood, 49(1):71-85; A. J. Friedhoff 等人, 1978, Blood, 51(2): 317-323; C. B. Thompson 等人, 1982, Br. J. Hematol., 50: 509-519 及 L. Corash 等人, 1984, Blood, 64(1): 185-193); 及 MPV 測定 (C. B. Thompson 等人, 1983, J. Lab. Clin.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (30)

Med., 101:205-213)被使用來預測血小板活性。如上文所提到，這些方法中的第一種，螢光流式細胞分析法，為繁瑣，費時且昂貴的。第二種方法，血小板密度測量，同樣不直接。第三種方法，MPV測定，為不直接且受到收集與貯存條件之影響。因此，一種用於預測血小板活性之簡單，快速，不昂貴且健全之方法為此技藝所需要的。

潛伏的血小板活性隨著 α -及緻密顆粒之數目與聚集而增加(L. Corash等人, 1977, Blood, 49(1):71-85及L. Corash等人, 1984, Blood, 64(1):185-193)。由於血小板乾重與顆粒含量一致(如上之文獻)，潛伏血小板活性隨著MPM而增加。因此，本發明PLT1方法之一方面係提供一種用於預測血小板活性之簡單，快速，且不昂貴之方法。進而，MPM為一健全參數，因為其分析前被保存長達約24小時，即使是室溫下，它在樣品中會稍微改變。此外，MPM經過時間仍可基於相關係數(r)預測其行為(參見表1)。表1呈現經由PLT1系統及方法所得之正常血液供給者樣品相對時間與溫度(8小時相對室溫(RT)1小時；24小時相對室溫(RT)1小時；室溫8小時相對4°C 8小時；室溫24小時相對4°C 24小時)之MPM及MPC測定。下文呈現之相關表格中，"r"為相關係數；"syx"為估計值之標準差；"X平均"為獨立變數之平均值，且"Y平均"為非獨立變數之平均值。因此新鮮標品之更精密MPM值可經由插補法，給予活體外檢體年齡及貯存溫度，而自老化或保存樣品得到。例如，給予室溫下每24小時下降速率4%，及24小時MPM值2.00 pg，新鮮樣品之MPM

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (31)

將為 2.08 pg。明顯地，PLT1系統對於ACD-及K₃EDTA-抗凝固血液樣品基本上報告相同的MPM值(表2及圖5A及5B)。這是令人驚訝的，因為血小板在ACD中不會被球化而在K₃EDTA中則被球化之事實。因此，本發明之PLT1方法為易變的且提供用於懸浮在兩種抗凝劑中血小板分析的準確及可信之MPM結果。

表1								
正常供給者：平均PLT乾重(MPM)								
準確度數據								
樣品			r	Syx	X平均值	X平均值- Y平均值	斜率	截距
8HR, RT	vs.	1HR	0.94	0.04	2.02	0.03	0.96	0.06
8HR, 4C	vs.	1HR	0.94	0.04	2.02	0.01	0.97	0.04
24HR, RT	vs.	1HR	0.93	0.04	2.02	0.07	0.92	0.09
24HR, RT	vs.	1HR	0.93	0.05	2.02	0.03	1	-0.01
8HR, RT	vs.	8HR, 4C	0.93	0.04	2.01	0.02	0.91	0.16
24HR, RT	vs.	24HR, 4C	0.91	0.05	1.99	0.04	0.84	0.28

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (32)

正常供給者：平均PLT成分濃度(MPC)								
準確度數據								
			r	Syx	X平均值	X平均值-Y平均值	斜率	截距
8HR,RT	vs.	1HR	0.61	0.73	25.6	2.8	0.74	3.97
8HR,4C	vs.	1HR	0.45	0.62	25.6	1.7	0.41	13.4
24R,RT	vs.	1HR	0.6	0.6	25.6	5.7	0.59	4.78
24HR,RT	vs.	1HR	0.37	1.14	25.6	3.7	0.6	6.52
8HR,RT	vs.	8HR, 4C	0.55	0.77	23.9	1.1	0.73	5.35
24HR,RT	vs.	24HR, 4C	0.42	0.68	21.9	2	0.26	14.19

MPC直線地相關於血小板折射指數，其依次直線地相關於血小板密度。以下實施例4之結果，其中依據本發明方法所得之MPC值與螢光流式細胞分析法數據針對正常血小板對血小板激發性凝血之劑量反應進行比較，證明MPC值與PLT活化狀態一致(圖14A-14D)。重要地，本發明用以研究PLT活化之方法為不昂貴，快速且使用非常簡單。此外，數據分析容易進行自動化。甚而，經由採用本發明方法而可得到之訊息基本上在每個儀器間為一致的，如果在不同儀器被使用來施行該方法時。

該方法尤其適合於抗凝固化於檸檬酸鈉或乙二胺四乙酸(EDTA)中，K₃EDTA較佳，血液樣品之分析。嫻於此技藝者所認知的是，檸檬酸鈉與K₃EDTA之溶液可與血液樣品進行混合，或者乾燥形式之檸檬酸鈉或K₃EDTA(即粉末)可被

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (33)

溶解於血液樣品中作為抗凝劑。作為示範性原則，每7毫升試管使用約7至14毫克粉末形式之 K_3EDTA 。檸檬酸鈉常規性地使用每個試管2.0至5克/分升，3.2至3.8克/分升較佳，之溶液，最終比例為1份檸檬酸鈉比9份全血。進一步為嫻於此技藝者所認知的是， K_3EDTA 目前為止為自動化血液學分析最常使用之抗凝劑。關於這點有利的是，對於先前使用抗體測量血小板及活化血小板之方法，其由於EDTA溶液對介於抗體及它所結合之分子結構間的表位結合位置之完整性有不利影響而不能採用含EDTA溶液，本發明提供一項重要的變通。

本發明之另一方面係提供評估MPM值與疾病狀態及/或疾病治療計畫間關係之方法及自動化系統(參見實施例2)。本發明提供一種經由測量MPM以測定如化學治療或放射線治療對於病人血小板顆粒含量之影響的方便方法。目前相信與周邊血小板破壞有關之血小板減少症可導致較正常為大之血小板，而來自減少血小板形成之相同情況則導致正常大小或小型血小板(J. D. Bessman等人, 1982, Am. J. Clin. Pathol., 78:150-153; R. B. Nelson及D. Kehl, 1981, Cancer, 48: 954-956)。進而，增加血小板大小係與心肌梗塞有關(A. Eldor等人, 1982, Br. Med. J., 285:397-400; H. A. Cameron等人, 1983, Br. Med. J. 287:449-451; J. F. Martin等人, 1983, Br. Med. J., 287:486-488)。由於MPV與血小板乾重間的相關性(L. Corash等人, 1977, Blood, 49(1):71-85, 及 L. Corash等人, 1984, Blood, 64(1):185-193)，可預期高MPM值與破壞性血

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (34)

小板減少症有關，而低MPM值與降低血小板形成有關。此外，高MPM可能作為血栓潛伏性之預測。

表2 PLT1系統MPM值(pg)抗凝劑之影響 正常供給者：(1 HR樣品，RT)		
供給者#	K ₃ EDTA	ACD
12	1.938	1.929
8	1.979	2.009
13	2.079	2.041
11	2.03	2.01
14	1.891	1.976
30	1.874	1.94
31	1.878	1.912
32	2.03	2.011
33	2.031	2.06
34	1.914	1.952
80	2.308	2.381
81	1.989	2.012
平均值	1.995	2.019

以下實施例為本發明之說明。其被呈現以進一步幫助了解本發明觀念且決不被解釋為限制本發明之範疇。

實施例

實施例 1

此實施例說明本發明之高獲得率PLT1通道及血小板分析

(請先閱讀背面之注意事項再
本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (35)

方法之施行，如針對約75個正常血液樣品進行試驗(得自Bayer Corporation供給者)。爲了參考性比較本發明之PLT1方法及系統相對此技藝中所習用之方法，血液血小板樣品係使用TECHNICON H•™2自動化分析儀，Coulter STKS分析儀，以及改良，更準確之PLT1系統進行分析。爲了視覺參考，染色血液抹片亦針對每個樣品進行製備。血小板計數，MPV值，及RBC計數在以上列舉之分析模式間進行比較。對自動化方法學爲新穎之兩項參數亦進行數據搜集並經由本發明之PLT1系統及方法將其納入此技藝，即平均血小板乾重(MPM)及平均血小板成分濃度(MPC)。

所有樣品被收集入含K₃EDTA之空容器中。樣品係在室溫下保存1小時，室溫下及4°C下8小時，及室溫下與4°C下24小時後進行分析。

爲了使用TECHNICON H•™2及Coulter STKS系統施行血小板分析，該系統依據製造商之說明書進行標準化及校正。所有樣品均成對操作及分析。此外，樣品成對地在PLT1試驗系統上操作及分析，其如上所述進行標準化及校正。

薄層血液抹片亦針對所有樣品成對進行製備。然後Wright-Giemsa染色經由商業上可利用之Hema-Tek 2000載片染色器(Bayer Corporation)被施用至載片上。該載片被保存以供血小板計數及相對大小參考。

正常血液分析之結果及PLT計數之比較性準確度數據被呈現於表3。MPV之比較性準確度數據被呈現於表4；RBC計數之比較性準確度數據被呈現於表5；且MPM及MPC之

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (36)

比較性準確度數據被呈現於表1。

表3						
正常供給者：PLT計數準確度數據						
PLT1 vs. H2						
樣品	r	Syx	X平均值	X平均值- Y平均值	斜率	截距
1HR	0.97	12	265	-1	0.94	17
8HR,RT	0.96	15	261	-7	0.99	9
8HR,4C	0.96	17	258	-11	1	10
24HR,RT	0.95	17	252	-10	0.98	15
24HR,4C	0.94	19	250	-7	1.04	-4
PLT1 vs. COULTER STKS						
	r	Syx	X平均值	X平均值- Y平均值	斜率	截距
1HR	0.98	12	275	9	0.96	2
8HR,RT	0.97	15	273	5	0.98	0
8HR,4C	0.96	15	273	5	0.98	1
24HR,RT	0.97	13	269	8	0.96	3
24HR,4C	0.94	19	260	3	0.96	7

(請先閱讀背面之注意事項再填寫)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (37)

表4						
正常供給者：MPV準確度數據						
PLT1 vs. H.Ö2						
	r	Syx	X平均值	X平均值 - Y平均值	斜率	截距
1HR	0.6	0.29	9.1	1.1	0.36	4.76
8HR,RT	0.28	0.43	8.3	-0.6	0.19	7.31
8HR,4C	0.46	0.43	8.5	0	0.33	5.37
24HR,RT	0.43	0.43	7.2	-3	0.35	7.62
24HR,4C	0.08	0.67	7.6	-1.6	-0.07	9.85
PLT1 vs. COULTER STKS						
	r	Syx	X平均值	X平均值 - Y平均值	斜率	截距
1HR	0.8	0.22	8.5	0.5	0.41	4.51
8HR,RT	0.76	0.29	8.7	-0.2	0.47	4.76
8HR,4C	0.88	0.23	8.8	0.3	0.58	3.46
24HR,RT	0.63	0.37	9.1	-1.1	0.38	6.73
24HR,4C	0.85	0.36	9.4	0.1	0.67	3.02

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

線

五、發明說明 (38)

表 5								
正 常 供 給 者 : RBC 計 數 準 確 度 數 據								
PLT1 vs. H.Ö2								
			r	Syx	X 平均值	X 平均值- Y 平均值	斜 率	截 距
1HR			0.98	0.1	4.81	0.07	0.96	0.14
8HR,RT			0.98	0.09	4.82	0.08	0.96	0.13
8HR,4C			0.99	0.07	4.83	0.09	0.95	0.17
24HR,RT			0.99	0.09	4.83	0.1	0.94	0.21
24HR,4C			0.98	0.09	4.83	0.09	0.94	0.22
PLT1 vs. COULTER STLS								
			r	Syx	X 平均值	X 平均值- Y 平均值	斜 率	截 距
1HR			0.98	0.1	4.75	0.01	0.96	0.17
8HR,RT			0.98	0.1	4.75	0.01	0.93	0.33
8HR,4C			0.98	0.09	4.75	0.01	0.94	0.28
24HR,RT			0.98	0.1	4.75	0.02	0.94	0.26
24HR,4C			0.98	0.1	4.74	0	0.97	0.15

PLT計數：得自本發明PLT1方法之血小板計數與得自H・™2及STKS系統之計數，兩種均為廣被接受之血小板計數裝置，非常一致。注意PLT1方法中沒有應用血小板計數校正因子，而H・™2及STKS之校正因子分別為0.85及1.02。此建議

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填寫)

裝
訂
線

五、發明說明 (39)

現行的H•TM系統技術在其血小板原始計數中包括明顯數目的非血小板。

MPV：在此技藝中沒有任何現行的MPV測量方法被認為是標準的。因此，各方法間之比較係相關於血小板的定性行為。圖4顯示PLT1方法的典型，正常樣品血小板體積柱狀圖。其呈現血小板體積之對數-常態分佈，與發表之結果一致 (J. M. Paulus, 1975, Blood, 46(3):321-336)。H•^{TM2}及STKS系統之典型血小板體積分佈亦為對數-常態。

對於正常樣品，使用本發明PLT1系統及比較性Coulter STKS系統所得到之MPV值均顯示MPV隨著保存時間而增加，但使用TECHNICON H•^{TM2}系統所得到之值顯示下降 (參見表4)。H•^{TM2}相對STKS及PLT1之型式與Trowbridge等人所報告使用TECHNICON H6000TM系統相對Coulter S+系統所得到之型式一致 (E. A. Trowbridge等人, 1985, Clin. Phys. Physiol. Meas., 6(3):221-2382)。如Trowbridge等人之論文所報告，TECHNICON H6000TM系統 (以及TECHNICON H•^{TM2}系統) 中，血小板體積與高角散射度成正比 (H6000TM中為5-10度且H•^{TM2}系統中為5-15度)。Mie散射理論顯示散射入這些角係對於折射指數敏感，如以上本發明之詳述中所解釋。當血小板在活體外老化時，其因為吸收水分而膨脹且變得較不具折射性 (S. Holme及S. Murphy, 1980, J. Lab. Clin. Med., 96:480-493)。此膨脹降低其高角散射強度，因此使得H6000TM及H•^{TM2}系統在事實上MPV確實增加時卻報告減少之MPV。然而，依據Coulter S+系統及Coulter

(請先閱讀背面之注意事項再填寫此頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (40)

STKS系統以及經由隙縫阻抗裝置所作之測量，血小板體積與電阻成正比。因此，後者系統正確地報告由於膨脹而增加之MPV，因為阻抗在細胞膨脹時增加。由於本發明之PLT1系統使用Mie散射理論以使低-與高-角散射訊號轉換成體積及折射指數，如上文所述，PLT1系統及方法亦正確地報告因膨脹而增加之MPV。

RBC計數：經由本發明PLT1系統所測定之RBC計數與經由TECHNICON H•™2系統及Coulter STKS系統所測定之RBC計數非常一致，後二者為已接受之RBC計數裝置。

MPM：圖4呈現典型及代表性PLT1血小板乾重柱狀圖且顯示樣品內之血小板乾重為對數-常態分佈的。此與電子顯微鏡研究之結果(G. F. Bahr及E. Zeitler, 1965, Lab. Invest., 14(6):217-239)及基於密度梯度測量之結論(L. Corash及B. Shafer, 1982, Blood, 60(1):166-171)互相一致。依據PLT1系統測量，室溫下保存達1小時之正常樣品的典型MPM值為2.02 pg。該值與大多數發表值非常一致，其分別為2.5，2.8，2.06，2.1及2.06 pg(G. F. Bahr及E. Zeitler, 1965, Lab. Invest., 14(6):217-2393; F. Gorstein等人，1967, J. Lab. Clin. Med., 70:938-950; S. Karpatkin, 1977, "Composition of platelets", In: Hematology 第二版，McGraw-Hill. N. Y., 1176-1178頁；T. C. Bithell. 1993, "Platelets and megakaryocytes", In: Wintrobe's Clinical Hematology, 第9版，Vol.1 Lea及Febiger, Philadelphia, PA., 511-529頁；及E. E. Woodside及W. Kocholaty, 1960, Blood, 16:1173-1183)。MPM值在24期間僅稍微下降，

五、發明說明 (41)

即，當樣品被保存於室溫時約3.5%且樣品被保存於4°C時約1.5%(表1)。

MPC：圖4亦顯示典型及代表性PLT1血小板成分濃度柱狀圖，其在新鮮樣品為常態-分佈性(即呈現常態或高氏分佈)。此與密度梯度測量之結果一致(H. H. K. Watson及C. A. Ludlam, 1986, Br. J. Hematol., 62:117-124; J. F. Martin等人, 1983, Br. J. Hematol., 54:337-352)。使用PLT1系統所得到保存於室溫達1小時樣品之平均MPC值為25.6克/分升。為了將該值與發表值之%固體作比較，有必要測定非水性成分之密度。如上所述，相對血小板組合物蛋白質/脂肪/碳水化合物為57/19/8.5且這些成分之個別密度值為1.33克/毫升，0.93克/毫升及1.50克/毫升(R. Barer及S. Joseph, 1954, "General Cytochemical Methods", Quarterly Journal of Microscopical Science, 95:399-423)；因此，固體成分之平均密度為1.26克/毫升。因此，被一分升血小板中25.6克血小板成分所佔據之體積計算如下：

$25.6 \text{ 克} \times (1 \text{ 毫升} / 1.26 \text{ 克}) = 20.3 \text{ 毫升}$ 或 0.203 分升 。每分升之剩餘體積(即水分)為： $1.000 \text{ 分升} - 0.203 \text{ 分升} = 0.797 \text{ 分升}$ 。1克/毫升之密度下，該水體積之質量為79.7克。因此，%固體 $= (25.6 / (79.7 + 25.6)) \times 100 = 24.3\%$ 。若 K_3EDTA 膨脹血小板達8%，如上文所述，則%固體=25.8%。24.3%至25.8%之範圍接近發表值，即23%至25.4%之範圍(F. Gorstein等人, 1976, J. Lab. Clin. Med., 70:938-950; S. Karpatkin, "Composition of Platelets", In: Hematology. 第2版. 1977, McGraw-Hill. N. Y.,

五、發明說明 (42)

1176-1178頁)。

在24小時期間MPC明顯地下降；保存於4°C之樣品下降達14%且保存室溫之樣品達22%(表1)。在不同時間及溫度下測定MPC之統計學呈現於表6。數據顯示室溫下，分別在1，8及24小時分析之樣品MPC值彼此在1.5 SD內沒有重疊。因此，可經由測量其MPC而以87%的可信度決定樣品是否為1，8或24小時之久。因此，MPC值可被用來監測試管內樣品的年齡。不同的血液學參數，如MCV，MCHC，HCT及MPV，均對樣品年齡敏感。結果，在考慮如巨細胞症，血色素過少，貧血及血小板栓塞可能狀況時若忽略樣品年齡且若並未自老化樣品得到準確及可信數據的話，可能會產生錯誤的結論。因此，使用本發明之血小板分析及計數方法與系統而經由MPC值監測樣品年齡被預期具有重要的臨床價值。

實施例2

此實施例說明本發明擴大獲得率PLT通道(PLT1)與血小板分析方法之施行，如針對約70個異常血液樣品進行之試驗(得自 Memorial Sloan Kettering Cancer Center(MSKCC), New York)。全部樣品具有低於100,000/微升之血小板計數且如實施例1中所述進行分析。此外，血小板計數為經由相位差顯微鏡加以測定，因為自動化血小板計數針對所有血小板減少症樣品之有效性目前尚未完全建立(K. Mayer等人, 1980, Am. J. Clin. Pathol., 74:135-150; P. J. Cornbleet及 S. Kessinger, 1985, Am. J. Clin. Pathol., 83:78-80)。樣品在其收

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (43)

集後約4小時被運送至Bayer Corporation並在到達時於室溫下進行分析。樣品在室溫下貯存28小時後進行再次分析。該結果呈現於下及表7與圖12中。

PLT計數：使用本發明PLT1系統及方法所得到之血小板計數與使用相位差顯微鏡所得到保存於室溫下達4小時樣品之血小板計數互相一致。PLT1血小板計數亦與TECHNICON H•™2系統計數及Coulter STKS系統計數一致，但伴隨明顯例外，其中之一進一步見述於下文實施例3中。

MPV：對於異常樣品，TECHNICON H•™2系統及Coulter STKS系統之結果彼此間的一致性要比與使用PLT1所得到結果來得好，雖然對於正常樣品則反之亦真。此原因在代表性血小板體積柱狀圖進行比較時變得明顯。圖8顯示由TECHNICON H•™2系統及Coulter STKS系統所得到之血小板體積柱狀圖，其包括低通道中的干擾粒子。這些粒子扭曲了對數-常態血小板體積分佈且使得該系統低估MPV值。相反地，本發明之PLT1方法排除大多數的這類干擾粒子，如其對數-常態血小板體積分佈所示。因此，PLT1要比其它系統報告較高的MPV值。此外，圖9A-9D顯示，依據H•™2系統及Coulter STKS系統之測量，MPV直接相關於PLT計數（高達20,000/微升），而圖10A及10B顯示依據PLT1測量，MPV與PLT計數為反比相關。甚而，依據文獻報告，正常樣品及多數血小板減少症樣品之MPV及PLT計數呈現反比相關（J. D. Bessman等人，1982, Am. J. Clin. Path., 78:150-153; J. Levin及 J. D. Bessman, 1983, J. Lab. Clin. Med., 101: 295-

（請先閱讀背面之注意事項再填寫此頁）

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (44)

307; J. D. Bessman等 人 , 1981, Am. J. Clin. Path., 76:289-293; C. Giles, 1981, Br. J. Hematol., 48:31-37)。因此，文獻報告與本發明PLT1系統所得之結果相一致。同時，染色血液玻片薄層上之顯微鏡相對大小測量顯示TCP樣品要比正常樣品包含相對較多的大型血小板。對於正常樣品，所有三種系統顯示MPV及PLT計數為反比相關(圖11)，其與此技藝中所報告之發現一致。

目前，MPV在血小板分析中為主要被忽略之參數，雖然其可被用來區別不同的血液學異常(J. Zeigler等人, 1978, Blood, 51(3):479-486; M. Kraytman, 1973, Blood, 41(4):587-597; J. D. Bessman等人, 1982, Am. J. Clin. Path., 78:150-153; J. Levin及 J. D. Bessman, 1983, J. Lab. Clin. Med., 101:295-307; C. Giles, 1981, Br. J. Hematol. 48:31-37. A. Eldor等 人 , Br. Med. Journal, 1982, 285:397-400. H. A. Cameron等人, Br. Med. Journal, 1983, 287:449-451. J. F. Martin等人, Br. Med. Journal, 1983, 287:486-488. G. A. Threatte, Clin. Lab. Med. 1993, 13(4):937-950)。此技藝忽視MPV值的理由為，在本發明之前，MPV值被認為是不可信的(E. A. Trowbridge等人, 1985, Clin. Phys. Physiol. Meas., 6(3):221-238; G. A. Threatte等 人 , 1984, Am. J. Clin. Path., 81:769-772)，其有以下的可能原因：

1)來自血液樣品貯存條件之明顯差異常發生於傳統TECHNICON H • TM₂系統及隙縫阻抗儀器間之MPV值(E. A. Trowbridge等 人 , 1985, Clin. Phys. Physiol. Meas., 6(3):221-238. G. A. Threatte, 1993, Clin. Lab. Med., 13(4):937-950, U.

五、發明說明 (45)

Lippi等人, 1987, Am. J. Clin. Pathol., 87:391-393) ;

2)傳統的H•™系統或隙縫阻抗裝置均不能報告出血小板減少症樣品之準確MPV，如以上所證明；以及

3)MPV對收集與貯存條件敏感(C. B. Thompson等人, 1983, Am. J. Clin. Path., 80: 327-332; S. Murphy及F. H. Gardner, 1971, J. Clin. Invest., 50:370-377; B. S. Full及 M. B. Zucker, 1965, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 120: 296-301; J. G. White及W. Krivit, 1967, Blood, 30(5):625-635)。

相反地，使用依據本發明PLT1所得到之MPV值因下述理由而具有價值：

1)在不同條件下保存之正常樣品經由獨立方法，即PLT1與隙縫阻抗，所得到結果間之定性與定量一致性將置PLT1與隙縫阻抗MPC測量於更穩固之基礎上；

2)血小板減少症樣品之PLT1 MPV結果與不同條件下之報告文獻結果定性地一致；且

3)PLT1經由測量MPC而監測樣品保存對於MPV之影響，如上文所討論。

(請先閱讀背面之注意事項再
本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (46)

表 6					
正 常 供 給 者 : M P C 統 計 學					
1HR/RT		8HR/RT		24HR/RT	
平均值	25.60899	平均值	22.78007	平均值	19.86133
標準差	0.062196	標準差	0.08726	標準差	0.070337
中間值	25.65	中間值	22.87	中間值	19.825
程式	25.75	程式	22.77	程式	20.13
標準差	0.730638	標準差	1.025071	標準差	0.79577
樣品V	0.533833	樣品V	1.050772	樣品V	0.633249
峰度	0.315031	峰度	-0.19193	峰度	0.33338
偏斜度	-0.06117	偏斜度	-0.25711	偏斜度	0.369063
範圍	3.82	範圍	5.15	範圍	4.01
最小值	23.8	最小值	20.02	最小值	18.11
最大值	27.62	最大值	25.17	最大值	22.12
總和	3534.04	總和	3143.65	總和	2542.25
計數	138	計數	138	計數	128
可信度	0.122989	可信度	0.172551	可信度	0.139184
		8HR/4C		24HR/4C	
		平均值	23.91804	平均值	21.91432
		標準差	0.061206	標準差	0.109467
		中間值	24.03	中間值	22
		程式	24.03	程式	22.58
		標準差	0.719004	標準差	1.223883
		樣品V	0.516966	樣品V	1.497889
		峰度	-0.77856	峰度	-0.79256
		偏斜度	-0.31471	偏斜度	-0.16517
		範圍	3.05	範圍	4.98
		最小值	22.21	最小值	19.39
		最大值	25.26	最大值	24.37
		總和	3300.69	總和	2739.29
		計數	138	計數	125
		可信度	0.12103	可信度	0.216667

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再填)

裝

訂

線

五、發明說明 (47)

RBC計數：PLT1系統與TECHNICON H•™2及Coulter STKS分析模式所得到之結果非常一致。

MPM：醫院樣品之血小板乾重為對數-常態分佈，且此分佈即使對於提供少到150個原始血小板分析訊號之樣品亦為可辨識的(圖8)。對於保存於室溫下達4小時之醫院樣品，典型的MPM值為2.04 pg，其實際上等於室溫下保存達1小時之正常樣品所得到之值。因此，使本發明用之PLT1系統，MPM顯示醫院樣品與正常樣品呈現相同的時間穩定性。

圖7說呈現不同時間及溫度條件下正常樣品之MPM值(Y軸)相對保存於室溫下達1小時樣品之MPM值(X軸)。集中於2 pg之MPM值的單一聚集(正常樣品之平均值)被呈現。圖8呈現異常樣品組之相對圖形並顯示存在兩個聚集--一個集中於2.0 pg且一個在2.3 pg。不同的聚集可能與潛伏血栓活性中的差異有關。醫院樣品，即異常樣品之較高MPM值，顯示這些異常樣品中的血小板要比正常樣品中的血小板具有更大的潛在活性。如上文所述，本發明之血小板分析方法及由此得到之MPM值提供一種評估高MPM值與疾病狀態及/或疾病治療計畫間關係的方法。

MPC：室溫下保存達4小時之異常樣品具有22.1克/分升之典型MPC值(表6)，其比保存於室溫下達8小時之正常樣品之測定值少0.7克/分升。使用PLT1所得到之MPC值呈現與醫院樣品以及正常樣品相同的時間-依賴性。

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (48)

表 7							
異常樣品(TCPS)	4小時之久樣品：準確度數據						
方法		r	Syx	X平均值	X平均值-Y平均值	斜率	截距
PLT1 vs. 手工處理	PLT	0.94	7.4	35.3	0.8	0.9	2.6
H. TM 2 vs. 手工處理	PLT	0.93	8.2	35.3	-1.4	0.95	3.1
STKS vs. 手工處理	PLT	0.92	9.2	35.5	-2.4	1	2.2
PLT1 vs. H. TM 2	PLT	0.98	4.5	36.3	1.4	0.94	0.7
PLT1 vs. STKS	PLT	0.96	5.7	38.4	3	0.87	2.1
H. TM 2 vs. STKS	PLT	0.97	5.4	38.3	1.8	0.9	2.1
PLT1 vs. H. TM 2	MPV	0.3	1	7.2	-2.4	0.27	7.6
PLT1 vs. STKS	MPV	0.66	0.8	8.9	-0.7	0.54	4.8
H. TM 2 vs. STKS	MPV	0.59	0.9	8.8	1.6	0.51	2.7
PLT1 vs. H. TM 2	RBC	0.99	0.06	2.94	0.03	0.97	0.05
PLT1 vs. STKS	RBC	0.99	0.06	2.94	0.03	1.01	0
H. TM 2 vs. STKS	RBC	1	0.04	2.94	0.02	0.98	0.09
異常樣品(TCPS)	28小時之久樣品：準確度數據						
方法	PAR(＃)	r	Syx	X平均值	X平均值-Y平均值	斜率	截距
PLT1 vs. H. TM 2	PLT	0.98	4	34.3	0.9	0.97	0.2
PLT1 vs. STKS	PLT	0.97	4.8	35.5	2.2	0.85	3.2
H. TM 2 vs. STKS	PLT	0.96	5.9	35.5	1.4	0.85	3.9
PLT1 vs. H. TM 2	MPV	0.32	1.2	5.7	-5.6	0.47	8.6
PLT1 vs. STKS	MPV	0.42	1.1	9.1	-2.1	0.37	7.9
H. TM 2 vs. STKS	MPV	0.65	0.7	9.1	-3.4	0.4	2.1
PLT1 vs. H. TM 2	RBC	0.99	0.05	2.96	0.06	0.97	0.02
PLT1 vs. STKS	RBC	0.99	0.05	2.94	0.04	0.96	0.08
H. TM 2 vs. STKS	RBC	1	0.03	2.95	-0.02	0.97	0.09

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁)

訂

五、發明說明 (49)

實施例3

雖然實施例2中所述之異常樣品不論使用何種測量方法均得到相似的血小板計數，小部分的異常樣品根據分析方法會產生非常不同的結果。得自血小板減少症供給者之此類樣品見述於此實施例中。表8呈現比較性血小板計數數據(樣品以成對方式在自動化系統上操作)且圖13呈現三種自動化方法個別得到之柱狀圖。如示，僅本發明之PLT1系統得到成對測量之血小板計數皆與相位差顯微鏡計數一致。TECHNICON H•™2血小板計數約為相位差顯微鏡計數之兩倍。Coulter STKS系統僅在配對中的一組正確地報告血小板計數。同時，Coulter STKS與TECHNICON H•™2之體積柱狀圖並非對數-常態，因為其包括紅血球細胞片斷干擾。因此，這兩個系統提供比基於顯微鏡觀察血液抹片之察真實值較低的MPV值。由PLT1方法及系統所得到之體積柱狀圖為對數-常態，且報告之MPV位在血小板減少症樣品之範圍內且亦與顯微鏡觀察定性方面互相一致。進而，由PLT1系統所決定之血小板成分濃度大約為常態分佈且血小板乾重為對數分佈，因此證明異常樣品中被本發明計數為血小板之粒子同時具有血小板之物理性質。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再
頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (50)

表 8	
異常血小板減少症樣品 (供給者 #70)	
分析方法	血小板計數 (千 / μ l)
相位差	58
PLT1	65/51
TECHNICON H • TM 2	102/90
Coulter STKS	65/-

實施例 4

此實施例描述測量活體外經由凝血試管內活化血小板之劑量反應所施行的實驗。對於這些實驗，血液樣品從非吸煙者且未進行阿司匹靈治療之正常成人供給者抽取。樣品同時收集於檸檬酸鈉與 K₃EDTA 抗凝劑中。基於使用含 K₃EDTA 抗凝劑與使用檸檬酸鈉之結果比較證明 K₃EDTA 對於採用本發明新穎方法之血小板活化研究的用途。

凝血誘發之血小板活化係經由使用藻紅素-結合之單株抗體，CD62-PE，以螢光流式細胞分析法偵測細胞表面增加表現之 α -顆粒蛋白 (GMP-140)。GMP-140 之表現與 α -顆粒之釋出有關。此分析經由納入 Michelson 等人 (A. D. Michelson 等人, 1991, Blood, 77:770-779) 所述之四甘胺酸-L-脯胺醯-L-精胺醯-L-脯胺酸 (GPRP) 而可能實行。GPRP 抑制血小板聚集及纖維蛋白凝結且因此允許個別細胞之分析。

樣品製備：

全血以補充 0.35% 牛血清白蛋白之 PBS 進行 1：10 稀釋。

(請先閱讀背面之注意事項再
裝
本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

五、發明說明 (51)

稀釋全血之小部分(300微升)在 2.5 mM GPRP(最終濃度)存在下進行培育達5分鐘。 α -凝血如圖 14A-D所示以最終濃度 0.002 U/毫升至 0.087 U/毫升被加至試驗樣品。PBS被加至對照組樣品。樣品在室溫下進行培育達15分鐘然後以1%多聚甲醛(於PBS中)進行1:1稀釋並在室溫下進行培育達30分鐘。針對表面受體 GP1bIX之飽和濃度血小板-特異性單株抗體(CD42a, FITC-結合及 CD62-PE)被加至所有經螢光流式細胞分析法分析之樣品,且樣品進行培育達15分鐘。此步驟在經由依據本發明施行之方法進行分析的樣品被省略。PBS在樣品進行分析前被加入達1:600之最終稀釋。

樣品分析

樣品係經由使用 FACStation-CellQuest 取得及分析軟體之 FACScan flow cytometer(Becton Dickinson, San Jose, CA)進行分析,其配置有可在488微毫米操作之氬鐵雷射。FITC及藻紅素之螢光可分別使用525微毫米及575微毫米光譜帶通過濾片加以偵測。血小板係經由其前方散射(FSC)相對側邊散射(SSC)樣態,以及經由FITC-陽性(綠色螢光, FL1)進行確認。活化血小板係經由其PE-陽性(紅色螢光, FL2)加以確認,即FSC相對FL2。

經由光線散射柵及FITC-陽性確認血小板之後,活化標記CD62之結合係經由分析5,000個血小板之PE螢光加以決定。背景結合,其使用表位抗體IgG加以測量,從每個樣品減去。所有樣品之結果被報告為平均螢光強度(FI, 自訂單位)。FI與MPC之比較要比與%陽性之比較更為符合較,因為FI

(請先閱讀背面之注意事項再
裝
訂
線)

五、發明說明 (52)

或MPC皆不需要設定自訂閾值。此外，樣品係在收集兩小時內經由本發明之吸收/光線散射方法進行分析。

本發明方法及螢光流式細胞分析法方法學可經由測量血小板活化相對加入凝血而進行比較(圖14A-14D)。該結果顯示本發明光線散射方法可追以檸檬酸鈉(空白圓圈)及K₃EDTA(空白方格)抗凝之血液樣品的凝血劑量-相關性血小板活化。可觀察到隨著凝血濃度之增加，MPC下降。

實施例5

此實施例描述測量K₃EDTA中的試管內血小板自體-活化所施行的實驗。對於這些實驗，血液樣品從正常成人供給者抽取至K₃EDTA抗凝劑中。樣品如實施例4所述進行製備及分析，但沒有凝血活化且多聚甲醛在指示時間被加入。表9呈現K₃EDTA存在時血小板自體-活化之時間經過。

表9

收集後樣品 固定時間(分鐘)	FI(自訂單位)	MPC(g/dl)
5	26	26.7
10	29	26.4
15	37	26.9
30	87	25.2
45	111	24.7
60	142	24.4

表9顯示保存於EDTA之樣品中血小板經歷自體-活化，其隨著時間增加。因此，基於螢光及基於光線散射測量之血小板活化必須考慮試管內樣品的年齡。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再
裝本頁)

裝

訂

線

五、發明說明 (53)

實施例 6

此實施例描述測量活體外血小板活化狀態所施行的實驗。對於這些實驗，血液樣品從正常成人供給者及三名糖尿病供給者抽取。樣品被收集至K₃EDTA抗凝劑中。樣品如以上實施例4所述進行製備，除了凝血或多聚甲醛均不加入外。樣品係在收集後7小時進行分析。這些分析結果顯示於表10中。

表10

樣品 ID	FI(自訂單位)	MPC(g/dl)
糖尿病 1	426	21.1
糖尿病 2	563	20.9
糖尿病 3	81	24.2
正常人	ND	23.2

表10顯示MPC與FI測量二者可區別表現血小板活體外活化(糖尿病1及2)與不表現(糖尿病3)之血液樣品。可觀察到FI要比基於圖14A-14D檢查之預期來得高而MPC則較低。此建議全部三個糖尿病樣品均被活化，但第三個樣品比前面兩個較不活化。正常血液樣品之MPC亦被納入以顯示即使是正常樣品，收集於EDTA溶液後7小時所測量之MPC要比新鮮樣品為低。ND表示未測定。MPC值之落下及FI之上升理由為保存於EDTA中之血小板漸行性地隨著時間自體-活化，如以上實施例5所示。然而，MPC以及FI可區別經歷活體內血小板活化及未經歷之樣品。

全部專利申請書，核發專利，發表文章及文獻，以及本文中引用教科書之內容以參考文獻方式全體被納入。

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

(請先閱讀背面之注意事項再
裝訂)

裝

訂

線

五、發明說明 (54)

由於以上組合物及方法可做不同改變而不偏離本發明之
範疇及精神，意欲將以上說明所包含，其呈現於附隨之繪
圖中，或附屬申請專利範圍所定義之所有實體將被解釋為
說明，且無阻制意味。

(請先閱讀背面之注意事項再
本頁)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

四、中文發明摘要 (發明之名稱： 確認及定量血小板以及利用全血樣品測量血小板活化狀態之高度靈敏，準確且精密之自動化方法與裝置)

本發明提供一種高度靈敏且準確之方法及系統以供全血樣品中血小板之識別及定量，其使用自動化之血液學儀器。本發明之方法與系統提供準確測量正常血液樣品及異常血液樣品，如得自血小板減少症病人，之血小板乾重及血小板成分濃度。血小板乾重及血小板成分濃度之測量可用以評估血小板之活化狀態，因為活化血小板與未活化血小板相較下具有可測量之低成分濃度及折光指數。本發明之方法與系統亦允許臨床醫師或熟練的開業醫師依據血小板成分濃度之測量參數決定血液樣品之壽命。

英文發明摘要 (發明之名稱： "HIGHLY SENSITIVE, ACCURATE AND PRECISE AUTOMATED METHOD AND DEVICE FOR IDENTIFYING AND QUANTIFYING PLATELETS AND FOR DETERMINING PLATELET ACTIVATION STATE USING WHOLE BLOOD SAMPLES")

The present invention provides a highly sensitive and accurate method and system for the discrimination and quantification of platelets in a whole blood sample using automated hematology instruments. The method and system of the invention provide the accurate measurements of platelet dry mass and platelet component concentration in both normal blood samples and in abnormal blood samples, such as those from thrombocytopenic patients. The determination of platelet dry mass and platelet component concentration can serve to assess the activation state of platelets since activated platelets possess measurably lower component concentrations and refractive indices than do unactivated platelets. The method and system of the invention also allows the clinician or skilled practitioner to determine the age of a blood sample on the basis of the measured parameter of platelet component concentration.

(請先閱讀背面之注意事項再填寫本頁各欄)

裝

訂

線

經濟部中央標準局員工消費合作社印製

公告本

申請專利範圍

90年11月3日

修正
補充

1. 一種用於基於個別細胞基礎以正確識別正常或異常全血樣品中血小板與其它細胞以及用於定性與定量決定血液血小板參數之自動化方法，其包括以下步驟：

a) 分析小部分之該檢體，基本上一次一個細胞通過集中光源以得到前方光線散射型式，其代表每單位散射角度之散射光強度作為散射角度功能，該光線散射強度係在二光通道中兩角間距進行測量，間距約5至20度高角間距及約1至5度低角間距，其增加第一與第二光通道訊號值得到足以解析該檢體中血小板與非血小板之兩種散射強度測量，其中該第一光通道訊號值係衍生自高角偵測器獲得率之增加且該第二光通道訊號值衍生自低角偵測器獲得率之增加；

b) 轉變該第一與第二光通道光散射訊號獲得率值成為血小板體積值及血小板折射指數值；

c) 將該血小板折射指數值轉換成血小板成分濃度值；

d) 以步驟b)及c)之該血小板成分濃度值與該血小板體積值的結果計算血小板乾重值；

e) 呈現該血小板體積，血小板成分濃度，及血小板乾重之柱狀圖；及

f) 解析該檢體中之該血小板與該非血小板並經由存在於體積相對折射指數圖中之光散射-衍生性血小板訊號而決定該血小板參數。

2. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中基於該血小板折射指數之常態分佈而進一步解析該血小板與該非血小板。

六、申請專利範圍

3. 根據申請專利範圍第3項之方法，其中血小板計數之參數進行測定，且進而包括以下步驟：
 - g) 呈現該血小板體積，血小板成分濃度，及血小板乾重之柱狀圖；及
 - h) 基於粒子體積及折射指數，經由將該血小板置於該體積相對折射指數圖中而決定該血小板計數。
4. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中步驟a)中，該高角偵測器之該獲得率之該增加約為8至15倍且該低角偵測器之該獲得率之該增加約為20至35倍。
5. 根據申請專利範圍第4項之方法，其中於步驟a)中，該高角偵測器之該獲得率之該增加約為12倍且該低角偵測器之該獲得率之該增加約為30倍。
6. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該轉換步驟c)之該血小板成分濃度值係經由將水之折射指數從粒子訊號之計算折射指數減去且將該減法之結果除以平均折射指數增量而測得。
7. 根據申請專利範圍第6項之方法，其中該折射指數增量為0.0018克/分升。
8. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該血小板為非球形。
9. 根據申請專利範圍第8項之方法，其中該血小板大約維持等體積。
10. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中紅血球細胞計數係經由將高-獲得率放大通道 $X=99$ ， $Y=99$ 中之訊號計

六、申請專利範圍

數為紅血球細胞而得到。

11. 根據申請專利範圍第10項之方法，其中該血小板分析及紅血球細胞分析係同時施行。
12. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中體積與折射指數範圍被擴展以防止來自該第一及第二光通道被大而緻密之血小板飽和之錯誤，其經由將標準訊號獲得率條件下所使用之表格向下擴展以提供正常獲得率條件下大型血小板之體積及折射指數之分析。
13. 根據申請專利範圍第4或12項之方法，進而其中該高角偵測器之該獲得率中之該增加約為10倍且該低角偵測器之該獲得率中之該增加約為25倍。
14. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中該二種光線散射測量用於測定血小板之活化狀態，且其中活化血小板要比未活化血小板具有可測量性之較低折射指數及較低之成分濃度(MPC)。
15. 根據申請專利範圍第1或14項之方法，其中血液樣品係利用EDTA或檸檬酸鈉加以抗凝固。
16. 根據申請專利範圍第14項之方法，其中該血小板在活體內或活體外進行活化。
17. 根據申請專利範圍第14項之方法，其中該血小板活化狀態為血小板樣品試管內陳化的功能。
18. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中步驟d)所得到之該血小板成分濃度值決定血液樣品被保存於室溫或4°C下的試管內陳化約1小時至約24小時。

六、申請專利範圍

19. 根據申請專利範圍第1項之方法，其中步驟e)中所得之該血小板乾重值，該血小板計數，及血小板顆粒含量，或其組合，決定進行該治療或處理之病人中該治療或處理之效果。
20. 一種用於基於個別細胞基礎以正確決定正常或異常全血樣品中血小板計數、血小板體積、血小板乾重、及血小板成分濃度等參數以及用於識別血小板與其它細胞之自動化方法，其包括以下步驟：
 - a) 分析等份之該檢體，基本上一次一個細胞通過集中光源以得到前方光線散射型式，其代表每單位散射角度之散射光強度作為散射角度功能，該光線散射強度係在二光通道中兩角間距進行測量，間距約5至20度高角間距及約1至5度低角間距，其增加第一與第二光通道訊號值得到足以解析該檢體中血小板與非血小板之兩種散射強度測量，其中該第一光通道訊號值係衍生自高角偵測器獲得率之增加且該第二光通道訊號值衍生自低角偵測器獲得率之增加；
 - b) 將該第一與第二光通道之光散射訊號獲得率值轉換成血小板體積值及該血小板之折射指數值；
 - c) 將該血小板折射指數值轉換成血小板成分濃度值；
 - d) 以步驟b)及c)之該血小板成分濃度值與該血小板體積值的結果計算血小板乾重值；
 - e) 呈現該血小板體積，血小板成分濃度，及血小板乾重之柱狀圖；及

六、申請專利範圍

- f) 基於粒子體積及折射指數，經由將該血小板放置於該體積相對折射指數圖中而決定該血小板計數。
21. 根據申請專利範圍第20項之方法，其步驟a)中，該高角偵測器之該增加約為8至15倍且該低角偵測器之該增加約為20至35倍。
22. 根據申請專利範圍第21項之方法，其中於步驟a)中，該高角偵測器之該增加約為12倍且該低角偵測器之該增加約為30倍。
23. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中該轉換步驟c)之該血小板成分濃度值係經由將水之折射指數自粒子訊號之計算折射指數減去且將該減去之結果除以平均折射指數增量而測得。
24. 根據申請專利範圍第23項之方法，其中該折射指數增量為0.0018克/分升。
25. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中該血小板為非球形。
26. 根據申請專利範圍第25項之方法，其中該血小板大約維持等體積。
27. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中該紅血球細胞計數係經由將高-獲得率放大通道X=99，Y=99中之訊號計算為紅血球細胞而得到。
28. 根據申請專利範圍第27項之方法，其中該血小板分析及紅血球細胞分析係同時施行。
29. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中體積與折射指數

六、申請專利範圍

範圍被擴展以防止來自第一及第二光線通道被大而緻密之血小板飽和之錯誤，其經由將標準訊號獲得率條件下所使用之表格向下擴展以提供正常獲得率條件下大型血小板之體積及折射指數之分析。

30. 根據申請專利範圍第29項之方法，進而其中該高角偵測器之該增加約為10倍且該低角偵測器之該增加約為25倍。
31. 根據申請專利範圍第20項之方法，其中該二種光線散射測量用於測定血小板之活化狀態，且其中活化血小板要比未活化血小板具有可測量性較低之折射指數及較低之成分濃度(MPC)。
32. 根據申請專利範圍第20或31項之方法，其中該血液樣品係利用EDTA或檸檬酸鈉加以抗凝固。
33. 根據申請專利範圍第31項之方法，其中該血小板在活體內或活體外進行活化。
34. 根據申請專利範圍第31項之方法，其中該血小板活化狀態為血小板樣品試管內陳化的功能。
35. 根據申請專利範圍第20項之方法，其步驟c)所得到之該血小板成分濃度值決定血液樣品被保存於室溫或4℃下的試管內陳化約1小時至約24小時。
36. 根據申請專利範圍第20項之方法，其步驟d)中所得之該血小板乾重值，該血小板計數，及血小板顆粒含量，或其組合，決定進行該治療或處理之病人中該治療或處理之效果。
37. 一種用於正確決定正常或異常全血樣品中血小板計數，

六、申請專利範圍

血小板體積、血小板乾重、及血小板成分濃度等參數以及用於識別血小板與其它細胞之自動化裝置，其包括：

a) 分析等份該檢體之裝置，該分析基本上一次一個細胞通過集中光源以得到前方光線散射型式，其代表每單位散射角度之散射光強度作為散射角度功能，該光線散射強度係在二光通道中兩角間距進行測量，間距約5至20度高角間距及約1至5度低角間距，其增加第一與第二光通道訊號值得到足以解析該檢體中血小板與非血小板之兩種散射強度測量，其中該第一光通道訊號值係衍生自高角偵測器獲得率之增加且該第二光通道訊號值衍生自低角偵測器獲得率之增加；

b) 將該第一與第二光線通道之光散射訊號獲得值轉換成血小板體積值及該血小板之折射指數值之裝置；

c) 將該血小板折射指數值轉換成血小板成分濃度值之裝置；

d) 以b)及c)之該血小板成分濃度值與該血小板體積值的結果計算血小板乾重值之裝置；

e) 呈現該血小板體積、血小板成分濃度及血小板乾重之柱狀圖之裝置；及

f) 基於粒子體積及折射指數經由將該血小板放置於該體積相對折射指數圖中而決定該血小板計數之裝置。

38. 根據申請專利範圍第37項之裝置，其中於a)中，該高角偵測器之該增加約為8至15倍且該低角偵測器之該增加約為20至35倍。

六、申請專利範圍

39. 根據申請專利範圍第38項之裝置，其中該高角偵測器之該增加約為12倍且該低角偵測器之該增加約為30倍。
40. 根據申請專利範圍第37項之裝置，其中該血小板成分濃度值轉換裝置係經由將水之折射指數自粒子訊號之計算折射指數減去且將該減法之結果除以平均折射指數增量而決定該血小板成分濃度。
41. 根據申請專利範圍第40項之裝置，其中該折射指數增量為0.0018克/分升。
42. 根據申請專利範圍第37項之裝置，其中該血小板為非球形。
43. 根據申請專利範圍第37項之裝置，其中該血小板大約維持等體積。
44. 根據申請專利範圍第37項之裝置，其進而包括用於分析該血小板之同時計數紅血球細胞之裝置。
45. 根據申請專利範圍第37項之裝置，其中血小板活化狀態可基於該血小板成分濃度進行測定。
46. 根據申請專利範圍第1或20項之方法，其中完整紅血球細胞分析及血小板分析係同時施行。
47. 根據申請專利範圍第37項之裝置，其進而包括用於同時施行完整紅血球細胞分析及血小板分析之裝置。
48. 一種用於基於個別細胞基礎以正確識別正常或異常全血樣品中血小板與其它細胞以及用於定性與定量決定血液血小板參數之自動化裝置，其包括：
 - a) 用於分析小部分之該檢體之裝置，該分析基本上一

六、申請專利範圍

次一個細胞通過集中光源以得到前方光線散射型式，其代表每單位散射角度之散射光強度作為散射角度功能，該光線散射強度係在二光通道中兩角間距進行測量，間距約5至20度高角間距及約1至5度低角間距，其增加第一與第二光通道訊號值得到足以解析該檢體中血小板與非血小板之兩種散射強度測量，其中該第一光通道訊號值係衍生自高角偵測器獲得率之增加且該第二光通道訊號值衍生自低角偵測器獲得率之增加；

b) 將該第一與第二光線通道光散射訊號獲得值轉換成血小板體積值及該血小板之折射指數值之裝置；

c) 將該血小板折射指數值轉換成血小板成分濃度值之裝置；

d) 以b)及c)之該血小板成分濃度值與該血小板體積值的結果計算血小板乾重值之裝置；及

e) 用於解析該檢體中之該血小板與該非血小板並經由光散射-衍生性血小板訊號之存在於體積相對折射指數圖中而決定該血小板參數之裝置。

49. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其進而包括用以基於該血小板折射指數之常態分佈而進一步解析該血小板與該非血小板之裝置。

50. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其中血小板計數之參數進行測定，且進一步包括：

f) 用以呈現該血小板體積、血小板成分濃度及血小板乾重之柱狀圖之裝置；及

六、申請專利範圍

g)基於粒子體積及折射指數經由將該血小板放置於該體積相對折射指數圖中以決定該血小板計數之裝置。

51. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其中於a)中，該高角偵測器之該獲得率之該增加約為8至15倍且該低角偵測器之該獲得率之該增加約為20至35倍。
52. 根據申請專利範圍第51項之裝置，其中於a)中，該高角偵測器之該獲得率之該增加約為12倍且該低角偵測器之該獲得率之該增加約為30倍。
53. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其中以轉換d)之該裝置所決定之該血小板成分濃度值係經由將水之折射指數自粒子訊號之計算折射指數減去且將該減法之結果除以平均折射指數增量而測得。
54. 根據申請專利範圍第53項之裝置，其中該折射指數增量為0.0018克/分升。
55. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其中該血小板為非球形。
56. 根據申請專利範圍第55項之裝置，其中該血小板大約維持等體積。
57. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其進而包括用於經由將高-獲得率放大通道 $X=99$ ， $Y=99$ 中之訊號計算為紅血球細胞而得到紅血球細胞計數之裝置。
58. 根據申請專利範圍第57項之裝置，其進而包括用於同時施行血小板分析及紅血球細胞分析之裝置。
59. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其進而包括用於擴展

六、申請專利範圍

體積與折射指數範圍以防止來自第一及第二光線通道被大而緻密之血小板飽和之錯誤的裝置，其經由將標準訊號獲得率條件下所使用之表格向下擴展以提供正常獲得條件下大型血小板之體積及折射指數之分析。

60. 根據申請專利範圍第59項之裝置，其中該高角偵測器之該獲得率之該增加約為10倍且該低角偵測器之該獲得率之該增加約為25倍。
61. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其中該二種光線散射測量用於測定血小板之活化狀態，且其中活化血小板要比未活化血小板具有可測量性較低之折射指數及較低之成分濃度。
62. 根據申請專利範圍第61項之裝置，其中該血小板係收集於EDTA或檸檬酸鈉中。
63. 根據申請專利範圍第61項之裝置，其中該血小板係在活體內或活體外進行活化。
64. 根據申請專利範圍第61項之裝置，其中該血小板活化狀態為血小板樣品試管內陳化的功能。
65. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其中c)所得到之該血小板成分濃度值決定血液樣品被保存於室溫或4℃下的試管內陳化約1小時至約24小時。
66. 根據申請專利範圍第48項之裝置，其中e)所得到之該血小板乾重值，該血小板計數，及血小板顆粒含量，或其組合，決定進行治療或處理之病人中該治療或處理之效果。

六、申請專利範圍

67. 根據申請專利範圍第19項之方法，其中該疾病選自癌症、心肌梗塞、血小板缺乏症及減少血小板形成。
68. 根據申請專利範圍第36項之方法，其中該疾病選自癌症、心肌梗塞、血小板缺乏症及減少血小板形成。
69. 根據申請專利範圍第66項之裝置，其中該疾病選自癌症、心肌梗塞、血小板缺乏症及減少血小板形成。

裝

訂

象

圖 1

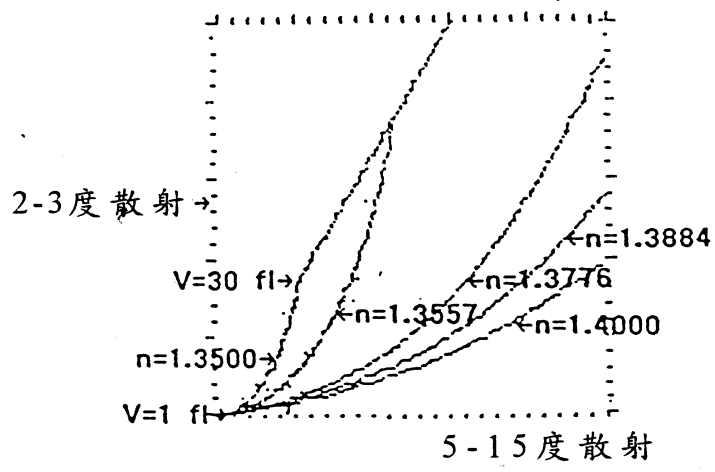


圖 2A

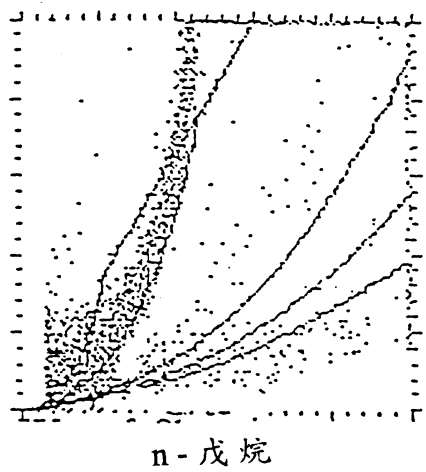


圖 2B

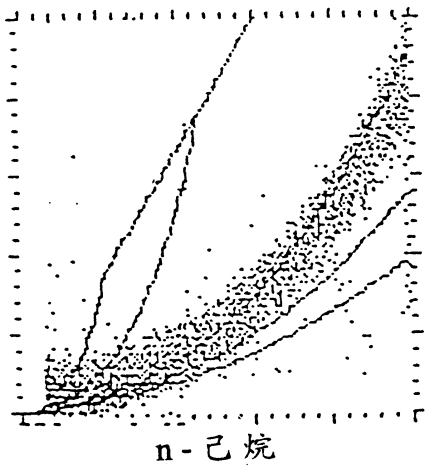


圖 2C

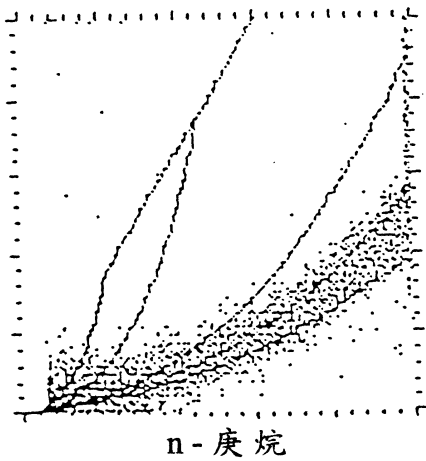


圖 3

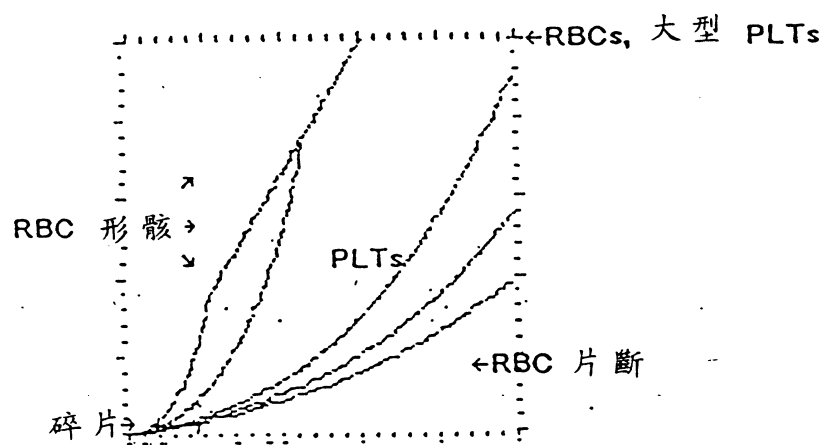


圖 4

正常樣品之結果輸出

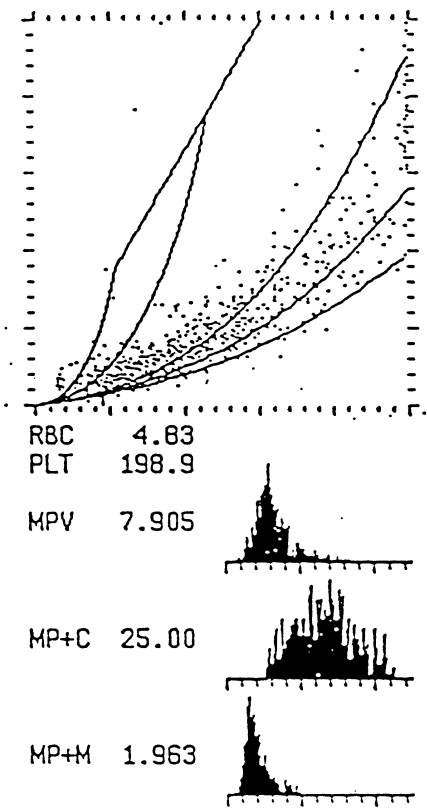


圖 5A

圖 5B

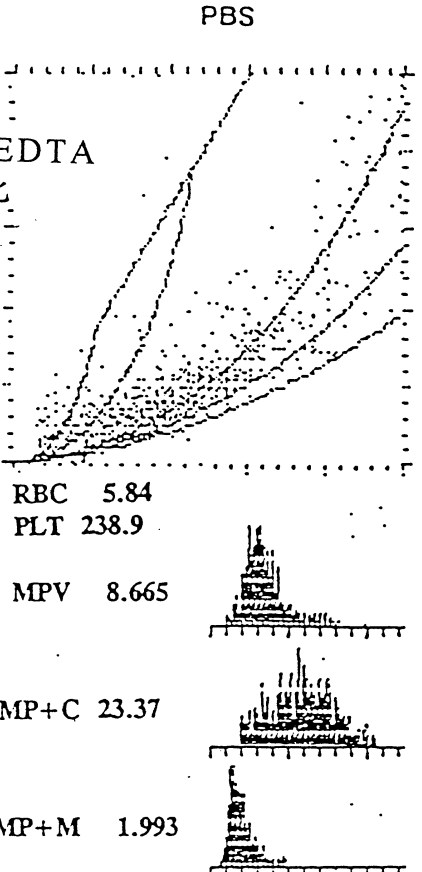
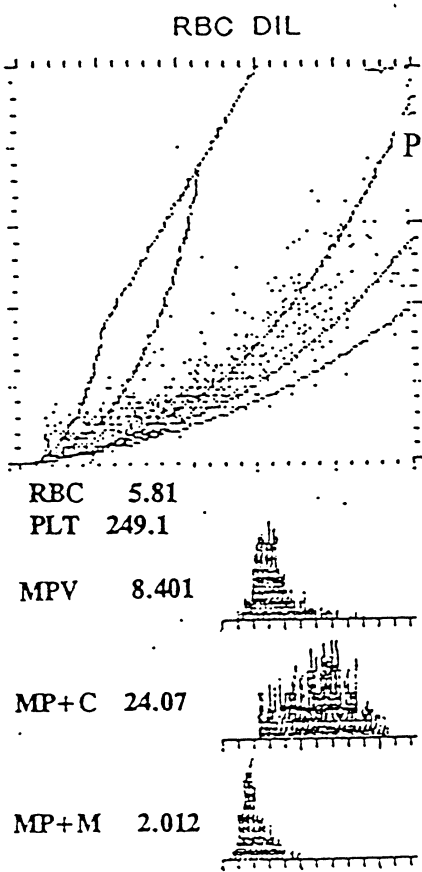


圖 6A

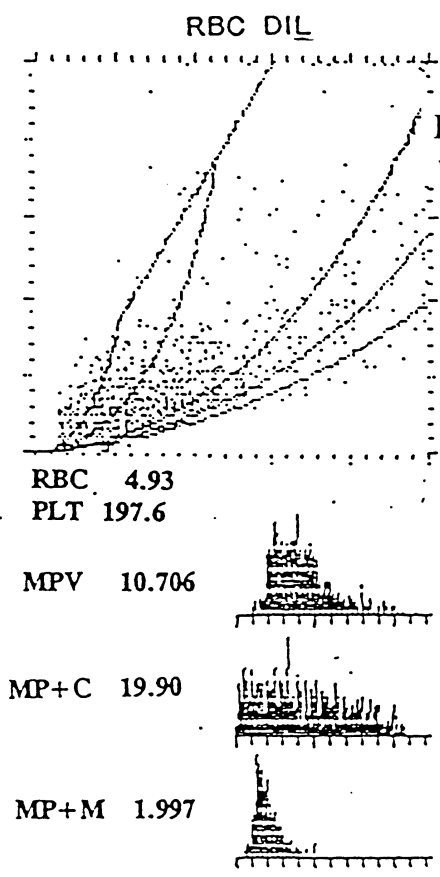


圖 6B

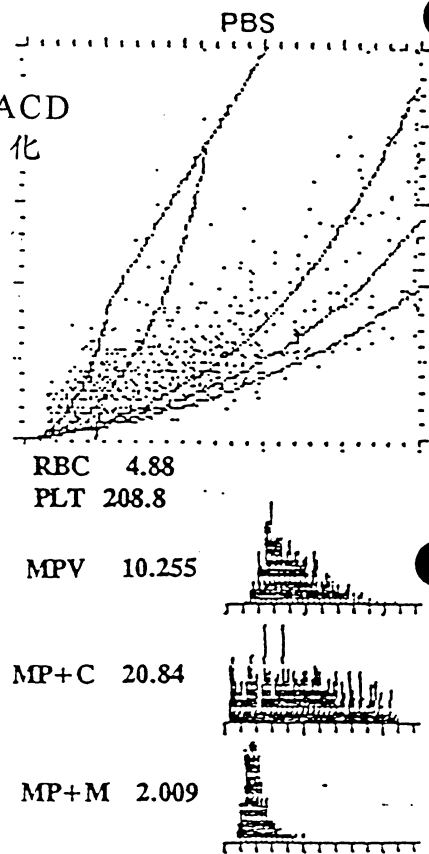


圖 7 A

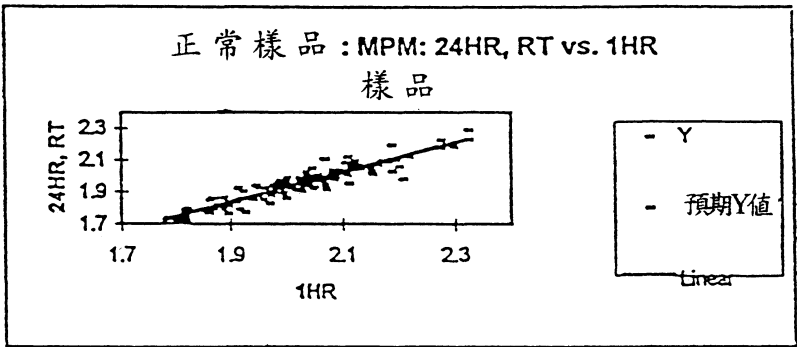


圖 7 B

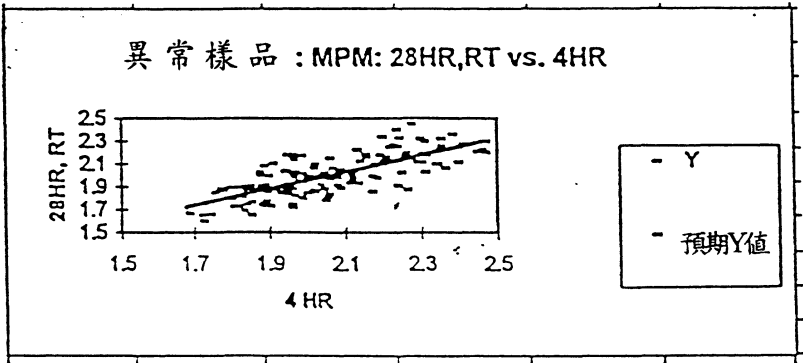


圖 8 A

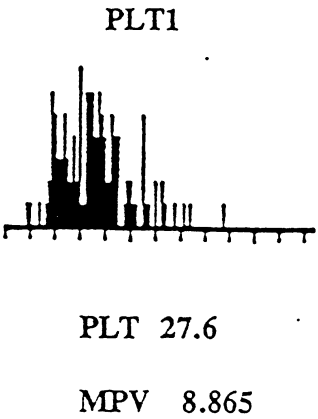


圖 8 B

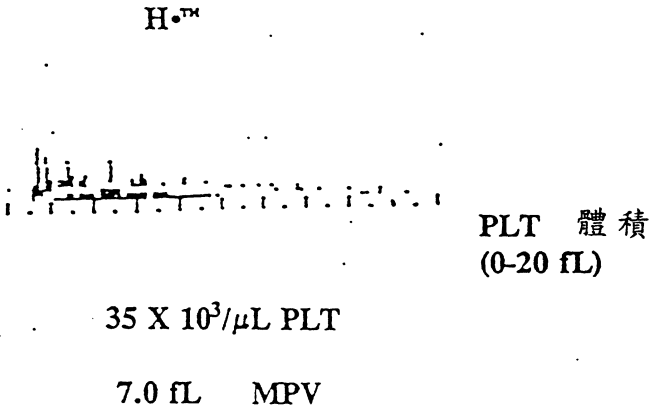


圖 8 C

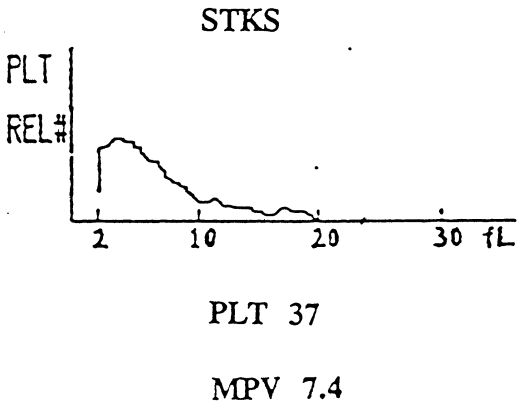


圖 9A

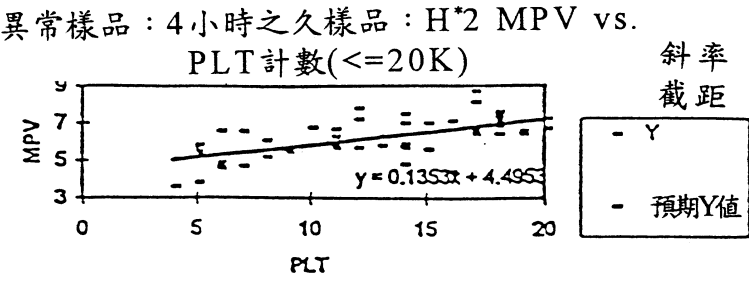


圖 9B

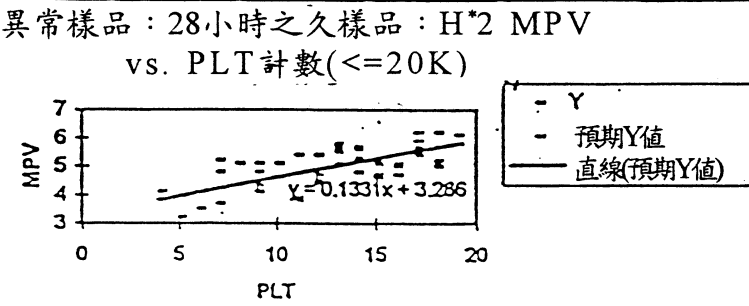


圖 9C

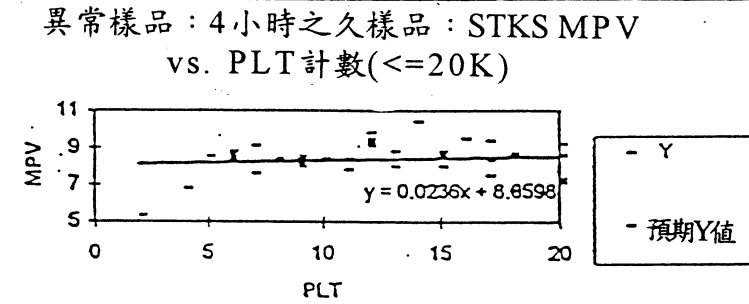


圖 9D

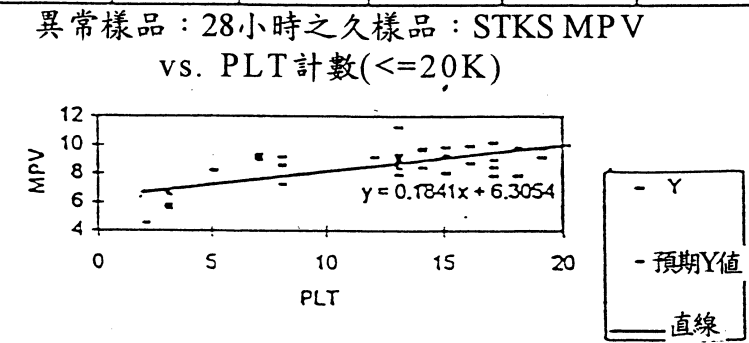


圖 10A

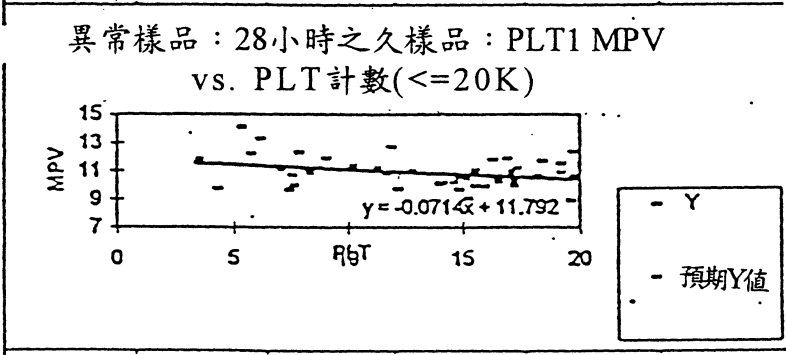
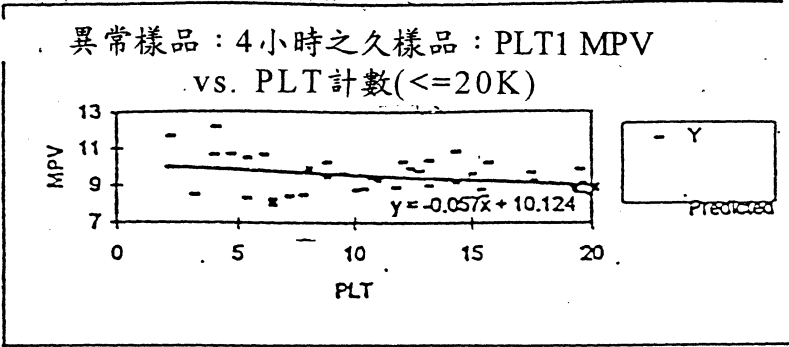


圖 10B

圖 11A

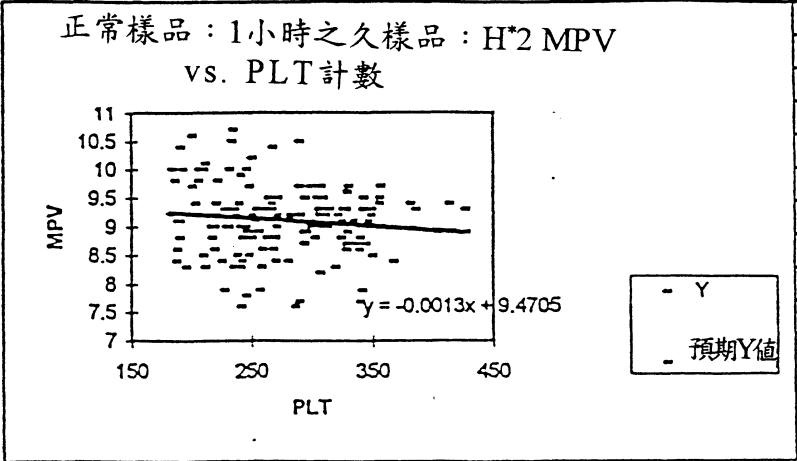


圖 11B

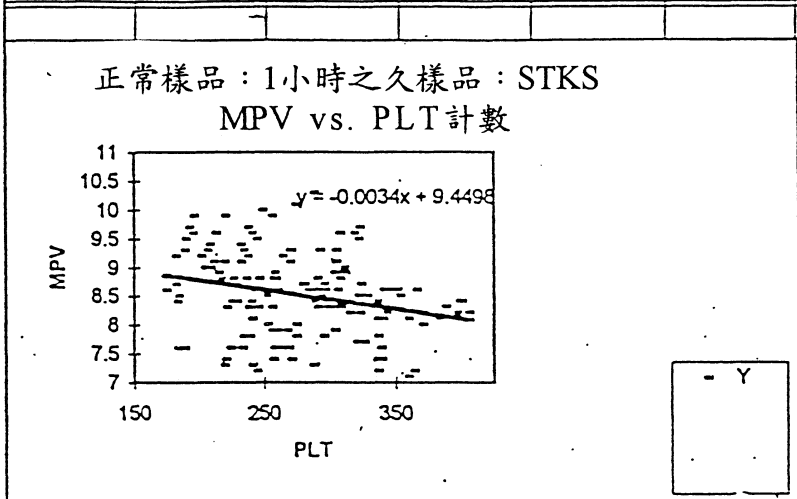


圖 11C

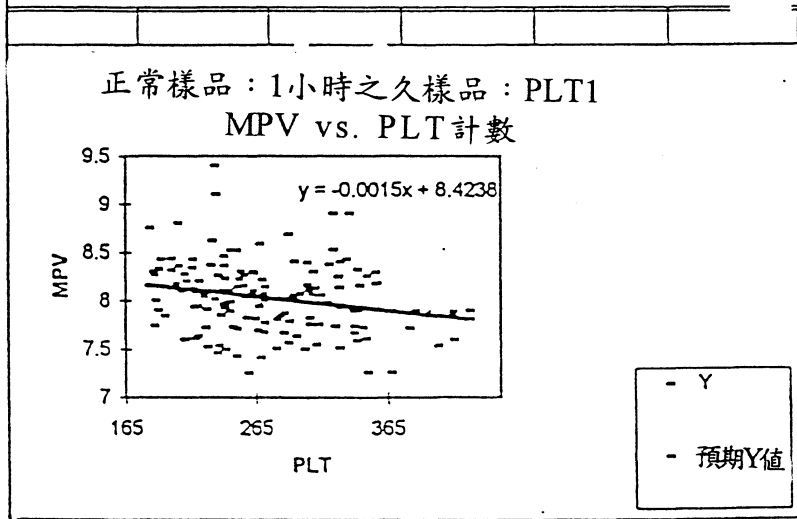


圖 12A

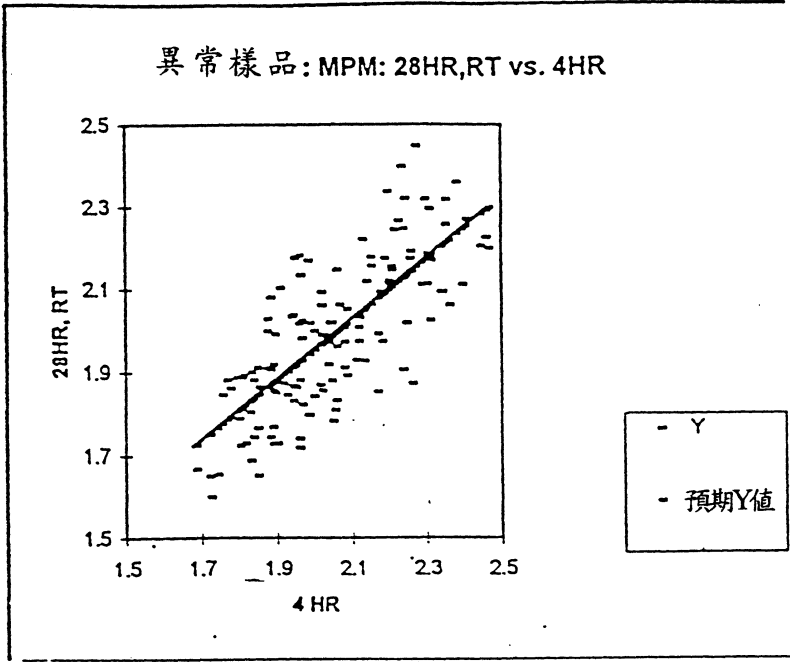


圖 12B

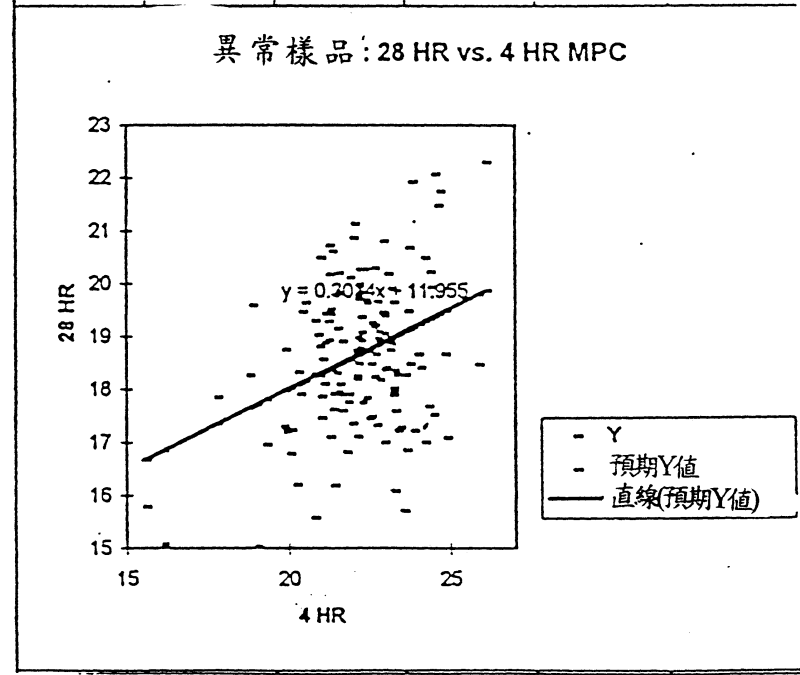


圖 13 A

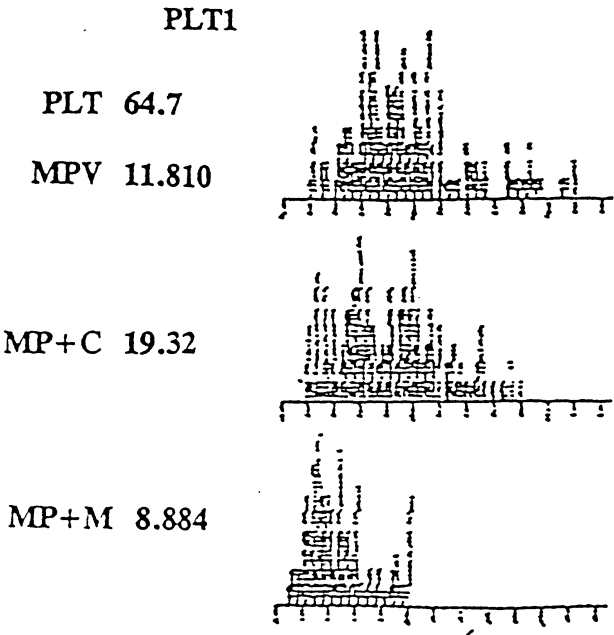
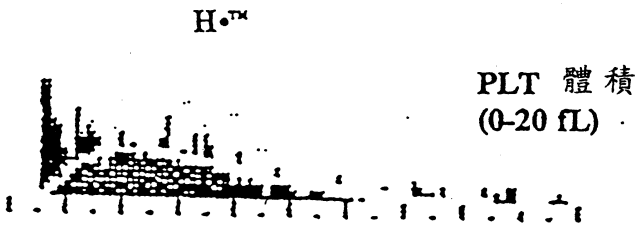


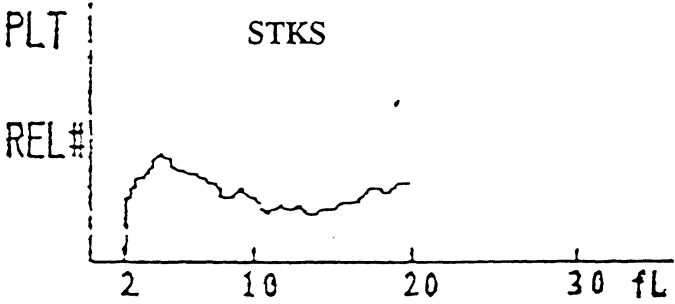
圖 13 B



102 X 10³/μL PLT

6.4 fL MPV

圖 13 C



PLT 65

MPV 6.7

圖 14A

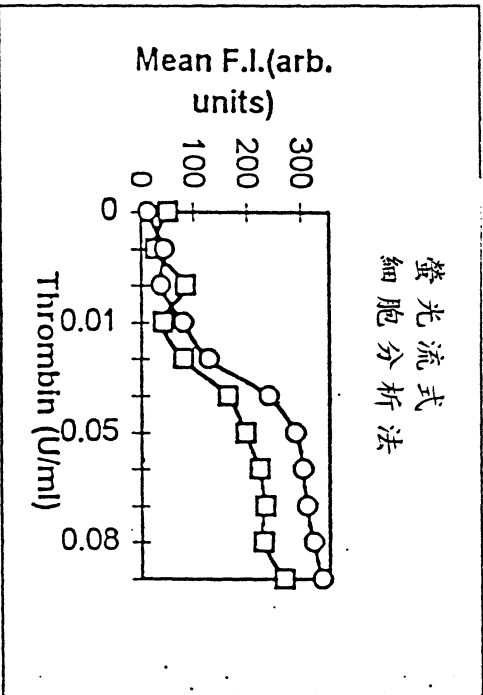


圖 14C

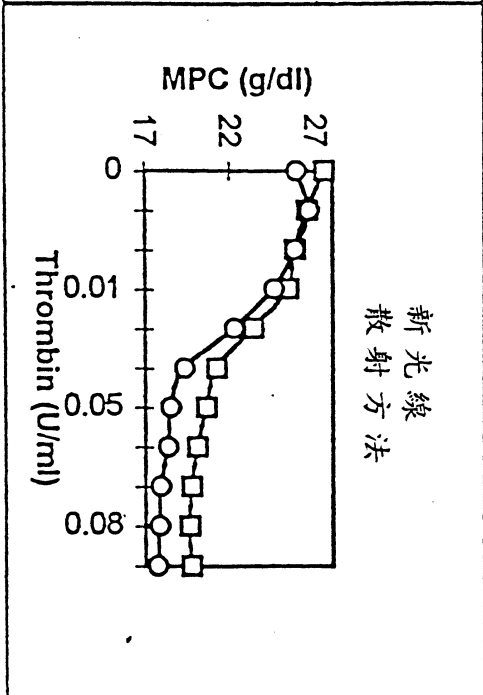


圖 14B

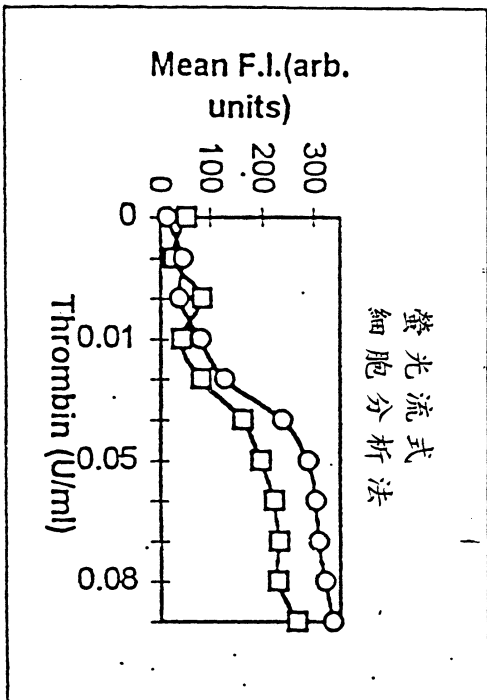
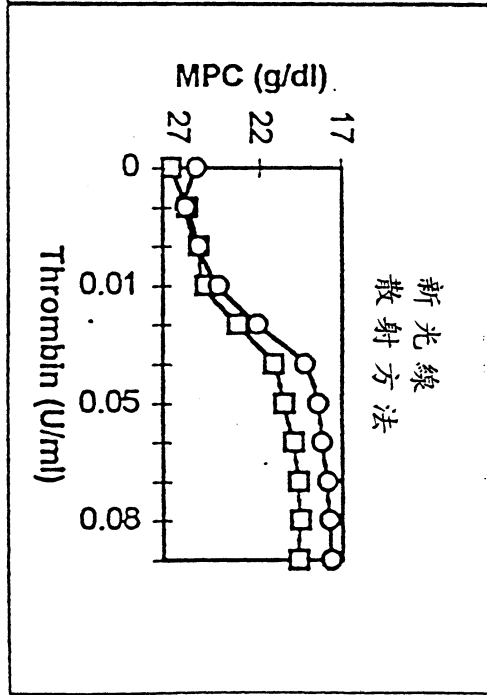


圖 14D



□ K₃EDTA
○ 檸檬酸鈉