

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第5123496号
(P5123496)

(45) 発行日 平成25年1月23日 (2013. 1. 23)

(24) 登録日 平成24年11月2日 (2012. 11. 2)

(51) Int. Cl. F I
GO 1 N 33/86 (2006. 01) GO 1 N 33/86
GO 1 N 33/96 (2006. 01) GO 1 N 33/96
GO 1 N 33/48 (2006. 01) GO 1 N 33/48 K

請求項の数 11 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2006-165559 (P2006-165559)	(73) 特許権者	398032751
(22) 出願日	平成18年6月15日 (2006. 6. 15)		シーメンス・ヘルスケア・ダイアグノステ
(65) 公開番号	特開2006-349684 (P2006-349684A)		ィックス・プロダクツ・ゲーエムベーハー
(43) 公開日	平成18年12月28日 (2006. 12. 28)		ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (
審査請求日	平成21年4月22日 (2009. 4. 22)		番地なし)
(31) 優先権主張番号	102005028018.8	(74) 代理人	100091731
(32) 優先日	平成17年6月16日 (2005. 6. 16)		弁理士 高木 千嘉
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(74) 代理人	100127926
			弁理士 結田 純次
		(74) 代理人	100105290
			弁理士 三輪 昭次
		(72) 発明者	マティーアス・ヴィルケンス
			ドイツ連邦共和国35037マルブルク、
			ビーゲンシュトラーセ35

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固試験の標準化のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

a) 別々の標準血液凝固時間が予め決められた、少なくとも2つの校正物質の血液凝固時間を、同一の試験系で測定する検体として測定し、そして

b) 予め決められた標準血液凝固時間と試験系で測定した校正物質の血液凝固時間とを割当てることによってプロットした基準曲線を用いて、検体の測定された血液凝固時間を標準化血液凝固時間へと変換する、

検体の標準化血液凝固時間の測定方法。

【請求項 2】

プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、トロンビン時間 (TT)、バトロキソピン時間 (BT) およびエカリン時間 (ECT) から成る群からの標準化血液凝固時間の測定のための、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

血漿検体の標準化血液凝固時間の測定のための、請求項 1 または 2 に記載の方法。

【請求項 4】

血漿を基にした校正物質が用いられる、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載の方法。

【請求項 5】

血漿プールを基にした校正物質が用いられる、請求項 1 ~ 4 のいずれかに記載の方法。

【請求項 6】

血液凝固系に影響を及ぼす物質を含有する検体の標準化血液凝固時間の測定のための、

10

20

請求項 1 ~ 5 のいずれかに記載の方法。

【請求項 7】

抗凝固性物質を含有する検体の標準化血液凝固時間の測定のための、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

検体がヘパリン、ヘパリノイド、ヒルジン、アルガトロバン、メラガトランおよび天然または合成の活性化第 10 因子阻害剤から成る群からの物質を含有する、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

少なくとも 1 つの校正物質が定義された量の抗凝固性物質を含有している、請求項 7 または 8 に記載の方法。

10

【請求項 10】

少なくとも 1 つの校正物質が、ヘパリンの添加後に、0.1 ~ 1.0 IU/mL 濃度のヘパリンを有する、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

基準曲線が内挿法または外挿法を用いてプロットされる、請求項 1 ~ 10 のいずれかに記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

20

本発明は血液凝固診断の技術分野に属し、そしてインビトロ血液凝固試験の標準化のための方法に関する。

【背景技術】

【0002】

血液凝固試験は、インビトロで（すなわちヒトまたは動物の身体外で）のフィブリン生成速度の測定（凝固測定（coagulometry））による、単独の又は多くの血液凝固因子の活性の測定を可能にする。これらの試験の第一の結果は、活性化剤および/または Ca^{2+} イオンを検体または検体混合物中へ添加した時間から、検出可能なフィブリン塊が形成されるまでの通常、数秒で測定できる血液凝固時間である。血液凝固時間はまた、検体中に含まれそしてそれぞれの試験で測定される全ての血液凝固促進性および抗凝固性の因子および物質の影響が寄与する、検体の止血能力すなわち血液凝固性の測度でもある。

30

【0003】

血液凝固時間は用手法または自動化方法によって測定できる。自動測定の場合は、検体/試薬混合物の機械的または光学的な特性、例えば、粘度または濁度の測定が非常に広範に行われている。自動化測定の場合に、検体/試薬混合物の特性が連続的に測定され、そして血液凝固時間が、評価方法の支援による特性の時間依存的変化からの終点（end point）として決定できる。

【0004】

このタイプの血液凝固試験の典型的な例は、プロトロンビン時間（PT）（これはまた迅速試験（Quick test）もしくはトロンボプラスチン時間ともよばれている）、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、トロンビン時間（TT）、バトロキサピン時間（BT）またはエカリン時間（ECT）である。これらの試験およびこれらの変法は、通常、血液凝固系の部分的な範囲（sub-range）での異常性のスクリーニングのため（スクリーニング試験、全体試験、検索試験）、または個別の因子の活性測定のために用いられる [Barthels, Mおよびvon Depka, Mの総説：Das Gerinnungskompndium (The Coagulation Compendium), Georg Thieme Verlag Stuttgart, 2003]。この血液凝固系の異常は、出血傾向または血液凝固傾向をもたらす可能性があり、これには、例えば（a）非常に低いまたは非常に高い濃度または活性を有する血液凝固因子、（b）血液凝固因子の変異体、（c）非常に低いまたは非常に高い濃度または活性を有する阻害因子、（d）阻害因子の変異体、または（e）血液凝固系の構成成分に対する抗体が含まれる。

40

50

【 0 0 0 5 】

スクリーニング試験は、臨床業務において、出血性または易凝固性の素因の診断のため、そしてまた、血液凝固系に影響を及ぼす医薬による治療の監視のために主として用いられている。例えば、A P T Tの測定は、一方では「内因性経路 (intrinsic pathway)」を介して開始され、そして共通経路 (common pathway) へとつながっており、そして血液凝固因子の、第 8 因子、第 9 因子、第 1 1 因子、第 1 2 因子、プレカリクレイン、高分子キニノーゲン、第 5 因子、第 1 0 因子、第 2 因子およびフィブリノーゲンから成っている、血液凝固カスケードの一部の異常をスクリーニングするために用いられている。正常値を超える A P T Tの結果、すなわち延長された血液凝固時間は、1 またはそれ以上のこれらの因子の異常を示し得、例えば A 型血友病としても知られている第 8 因子の欠損を示し得る。他方、A P T Tはまた、例えばヘパリンのような抗凝固剤の存在に対して高感度で反応し、それゆえにヘパリン治療の監視のためにも使用される。

10

【 0 0 0 6 】

血液凝固試験の結果を医学的に評価するために、患者検体の試験結果と「基準範囲」(正常範囲ともよばれる)とを比較する。この血液凝固試験の基準範囲は、多くの明らかな健常人(好ましくは 2 0 人以上)で試験を行うことによって決定される。健常人の幾人かは低い試験値を、幾人かはいくらか高い値を示すだろうが、ほとんどの値は平均値の周辺に分散する。試験結果を X 軸上に、および人数を Y 軸上にプロットすれば、理想的な場合には正常分布が得られる。統計的手法を用いて、下限のおよび上限の基準限界が、通常、全ての健常人の 9 0 % が存在するような範囲で決定される。したがって、原則として、基準範囲(正常範囲)は、基準となる健常人で測定される値の 9 0 % を含む。特定の環境下において、各種の、例えば年齢または性別に依存する基準範囲を試験のために規定する必要がある。

20

【 0 0 0 7 】

患者検体の結果が基準範囲と異なる場合は、これは止血平衡(hemostatic equilibrium)の障害を示す可能性がある。血液凝固時間をより長くする方向性での A P T Tの基準範囲からの逸脱は、例えば第 8 因子の欠損を示し; 血液凝固時間をより短くする方向性での P Tの基準範囲からの逸脱は、例えば第 2 因子の増加を示し、これは例えば第 2 因子遺伝子のプロモーター領域における第 2 因子の合成の増加をもたらすような変異によるものである。

30

【 0 0 0 8 】

血液凝固系に影響を及ぼすような医薬による治療、例えば抗凝固剤による治療の監視において、その患者の血液凝固系を特定の標的のサイズへと調節することが重要である。これに関連して、この薬物治療は患者検体の試験結果が定義された「治療的」範囲に入るまで変えられる。この治療的範囲は原則的に多数の臨床試験により決められる。これに関連して、最大の治療効率および最小の望ましくない副作用が、診断試験結果の値の特定の範囲または医薬の特定の濃度範囲に関連して設定される。

【 0 0 0 9 】

抗凝固剤、例えばヘパリンの投与による血液凝固性の治療的抑制は、血栓寒栓発症の予防または治療において重要な役割を果たしている。この抗凝固能力は、臨床において、望ましくない血栓寒栓の発症数によって決定される。抗凝固剤の望ましくない副作用は出血性合併症である。したがって、抗凝固剤治療の制御に適切な試験値の治療的範囲とは、血栓寒栓および出血性合併症が最小となることが臨床試験で明らかとなった試験の測定範囲である。

40

【 0 0 1 0 】

止血性血清試験の試験結果が変動しやすく、そのために問題なく比較できるわけではないということが知られている。この変動は、とりわけ、種々の試薬の使用および血液凝固時間の技術的測定の違いによるものである。例えば、多数の組織トロンボプラスチンがプロトロンビン時間(PT)の測定のために利用可能である。全く同一の血漿検体の P Tは、用いた組織トロンボプラスチンに依存して、2 倍も異なる場合がある。例え特定の組織ト

50

ロンボプラスチンを使用した場合でも、一つの検体の血液凝固時間は、製造者に依存し、製造者のバッチに依存し、さらに特定の環境下では、個々のバッチのボトルにさえ依存して、異なる。さらに、血液凝固時間の自動化測定において、測定機器それ自体、および血液凝固検出の様式が血液凝固時間へ影響を及ぼす。異なった機器で、同じ組織トロンボプラスチンを用いた、全く同一の検体の測定は異なった試験結果を与える。

【0011】

実際には、それぞれの検査室は、用いる血液凝固試験のための独自の内部検査基準および治療的範囲を設定している。治療する医師により試験結果の評価が可能となるために、実際の試験結果の他に、検査室独自の試験の基準範囲または治療的範囲に関する情報もまた追加して与えられなければならない。

10

【0012】

従来技術においては、試験結果間の試薬 - 、製造者 - 、バッチ - 、および機器 - 依存性の差異を補正する目的で、種々の標準化方法が知られている。試験結果の標準化および試験結果の比較可能性は、種々の理由により特に有利である。一方では、それにより、広範囲で実施された臨床試験に関わる異なった検査室で測定された試験結果を互いに比較することを可能にし、他方では、患者の試験結果の解釈が著しく簡略化される。

【0013】

慣用の標準化方法は、正常血漿の希釈（正常の%としての標準化、例えば、迅速試験）、比率形成（比率での標準化）、および標準比率の形成（プロトロンビン試験における国際標準比率（INR））を基礎にしている。

20

【0014】

正常血漿の希釈を用いる場合、最初に基準血漿プール（正常血漿プール）を、原則的に、少なくとも20人の明白に健康なドナーの血漿から調製する。この標準の活性または止血能力は正常の100%と定義される。適切なマトリクスにおけるこの標準血漿の希釈を準備する。例えば、正常血漿プールの1部を適切な緩衝液の2部と混合し（1:2希釈）、正常の33.33%の活性と定義する。正常血漿プールおよびこのプールの希釈シリーズを、標準化された試験系を用いて測定して、正常の%として定義された活性を生々の測定値に割り当てることで、基準曲線（検量曲線）をプロットする。次に患者検体について、生々の値を標準化された試験系で測定し、最終的に、基準曲線を用いて計算値または標準化された試験結果、すなわち正常の%、に変換することができる。

30

【0015】

比率形成を基にした標準化方法において、原則的に2つの方法が識別される。最初の方法は、2つの異なった試験をそれぞれの検体に対して行い、そして結果を互いに対する比率で記録する。基準範囲および治療的範囲をこの比率について決定することができる。第二の方法は、患者検体の結果および正常血漿プールの結果を同じ試験系で測定し、そしてこの比率を形成する。そうした方法は、例えばプロトロンビン時間（PT）の標準化のために存在し、ここでプロトロンビン比（PR）は正常血漿のPTに対する患者検体のPTの比率を示している（ $PR = \text{患者PT} / \text{正常PT}$ ）。

【0016】

プロトロンビン比（PR）のさらなる標準化のために、基準トロンボプラスチンが世界保健機関（WHO）によってつくられ、それに他のトロンボプラスチンを用いて測定されたプロトロンビン比を適合させることにより、測定された該PRが国際標準比率（INR）へと変換できる。WHOトロンボプラスチン試薬の感度と比較したトロンボプラスチン試薬の感度測定のために、INRを式 $INR = PR^{ISI}$ に従って計算できるように、補正因子の国際感度指数（ISI）が導入された。WHOトロンボプラスチン試薬について、INRを $= PR$ となるように、ISI値は1.0と定義される。全ての他のトロンボプラスチンについては、ISI値は製造者によって知らされる。

40

【0017】

そうした努力にかかわらず、現在までに、一連の血液凝固試験において、例えば、活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、トロンビン時間（TT）、パトロキソピン時間（

50

BT) またはエカリン時間 (ECT) において、信頼できる標準化は可能となっていない。明らかに、過去において、プロトロンビン時間に倣って、患者検体の APTT と正常血漿の APTT との間の比を形成することにより、APTT を標準化しようという試みがなされており、そして APTT 比に関する治療的範囲は 1.5 ~ 2.5 と定義することが試みられた。しかし、この方法は、標準値 (APTT 比) が測定結果の受容できる比較可能性を保証するためには変動が余りに大きすぎるために、決して受け入れられなかった [Brill-Edwards, P 等 (1993) Establishing a therapeutic range for heparin therapy. *Ann Intern Med.* 119 (2), 104-109]。代わりに、プロトロンビン時間に関する INR の計算に倣って、基準試薬を用いて APTT の標準化を確立しようという試みがなされてきた [Reed, S. V. 等 (1994) An attempt to standardize the APTT for heparin monitoring, using the P.T. ISI/INR system of calibration. *Results of a 13 centre study. Thromb. Res.* 74 (5), 515-522; van der Velde, E.A. および Poller, L. (1995) The APTT monitoring of heparin - the ISTH/ICSH collaborative study. *Thromb Haemost.* 73 (1), 73-81]。しかしながら、結果は、測定結果の受容できる比較可能性を達成できなかったために、著しく失望させられるものであった。

【0018】

抗凝固剤を用いた治療の監視のための血液凝固試験の標準化が無いことは特に問題となる。この問題提示 (problematology) は、APTT の助けによるヘパリン治療の監視を代表的な例として示し、本明細書において明らかにする。

【0019】

ヘパリンは血液凝固系を即時に濃度依存的様式で阻害する。非分画ヘパリン (UFH) および低分子量ヘパリン (LMWH) が使用される。ヘパリン治療は既存のまたは急性型で存在している血栓症の発症の場合に行われる。ヘパリンによる予防は血栓症の発症を抑制する。調節されたヘパリン濃度 (IU/mL にて) は慣用的に、ヘパリン治療およびヘパリンによる予防の両方のための治療的範囲として示される。したがって、0.3 ~ 0.7 IU/mL の治療的範囲がヘパリン治療に適用され、そして 0.05 ~ 0.25 IU/mL の治療的範囲がヘパリンによる予防に適用される。

【0020】

ヘパリン、特に非分画ヘパリンによる治療および予防は、一方ではヘパリン濃度を直接測定する方法によって、また他方では、ヘパリンの血液の凝固能力への影響を測定する血液凝固試験を用いて、監視することができる。

【0021】

ヘパリン濃度の直接的な測定は、例えば、患者検体の活性化第 10 因子に対する阻害活性が測定される「活性化第 10 因子を基にした方法、または抗 - 活性化第 10 因子方法」により行うことができる。この試験は、国際ヘパリン標準を用いて標準化することができ、そしてそれにより、標準化された比較可能な結果が、ミリリットル当りの国際単位 (IU/mL) で表した濃度値の形で与えられる。しかしながら、ヘパリン濃度を測定するためのこの方法は、必要な試験系が高価で多くの検査室では利用できないために、日常的な診断においては受け入れられていない。

【0022】

その代わりに、ヘパリン治療の監視は、現在では、APTT の測定によって行われている。APTT によるヘパリン治療の監視において、APTT が治療的範囲の結果をもたらすようにヘパリン投与を制御することが重要である。APTT 値の試験系に依存する変動のために、APTT 値のための標準化された治療的範囲は存在せず、それぞれの試験系のために治療的範囲を決定する必要がある。非分画ヘパリンのための APTT 試験の治療的範囲を決定するために、基本的に 2 つの可能性がある [Nelson, D. E. (1999) Current considerations in the use of the APTT in monitoring unfractionated heparin. *Clin Lab Sci.* 12 (6), 359-64; Olson, J. D. 等 (1998) College of American Pathologists Conference XXXI on laboratory monitoring of anticoagulant therapy: laboratory monitoring of unfractionated heparin therapy. *Arch Pathol Lab Med.* 122 (9), 782-9

10

20

30

40

50

8]。

【0023】

「生体外 (ex vivo) 方法」で、ヘパリン処置された患者の群の血漿検体が採取される。それぞれの検体のヘパリン濃度 (IU/mL) は活性化第10因子試験を用いて測定し、そしてAPTTは一つの試験系を用いて決定する。続いて、2つのデータ組 (IU/mL単位でのヘパリン濃度、および秒単位でのAPTT) の間で線形回帰を行う。APTT試験系における治療的範囲は、0.3 ~ 0.7 IU/mLのヘパリン濃度範囲に対応する値の範囲である (実施例1も参照されたい)。生体外方法は比較的複雑でありまた高価でもある。これは相対的に多数の利用可能な患者および正常検体、およびヘパリン濃度の測定のための活性化第10因子を基礎とした方法の利用可能性を前提にしている。

10

【0024】

生体外方法の上記の欠点のために、「インビトロ (in vitro)」方法が、検査室実務で確立されてきた。このAPTT試験の治療的範囲の決定のための方法において、正常血漿プールは標準量のヘパリンで処理され (「スパイクされ」)、そのように調製された検体のAPTTが測定される。しかしながら、インビトロ検体 (例えば、ヘパリンでスパイクした正常血漿) は、同一のヘパリン濃度で、生体外検体と比較して他の血液凝固時間をもたらし得ることを、無条件で考慮に入れなければならない。したがって、インビトロ方法によるAPTT試験の治療的範囲の決定に関して、他の制限を検量用検体のヘパリン含量のために考慮に入れなければならない。文献では、生体外方法での0.3 ~ 0.7 IU/mLのヘパリン濃度範囲は、インビトロ方法での0.2 ~ 0.4 IU/mLに割り当てられている。ヘパリン治療に関する治療的APTT範囲の測定のためのインビトロ方法は限られた情報の値を用いた近似的方法である。

20

【0025】

現在までに、APTT、TT、BT、およびECTを測定する試験は、単独で数秒で評価される血液凝固時間を与えてきており、その結果は常に検査室特有の試験系、すなわち、試薬、試薬のバッチ、ボトル間の変動、試験方法、自動化、測定機器、測定方法および評価方法に依存している。したがって、この試験結果の全体での比較可能性はほとんど与えられない。

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

30

【0026】

したがって本発明は、血液凝固試験の標準化を可能にし、そして異なった (検査室ごとの) 試験系により測定された試験値の、全体としての比較可能性を保証するインビトロ方法を利用可能にしようという目的に基づいている。

【課題を解決するための手段】

【0027】

本発明の解決は、特許請求の範囲に記載した物および方法を利用できるようにすることにある。

【0028】

「血液凝固時間」という用語は、本発明の意味においては、インビトロ血液凝固試験の試験結果を意味するものと理解されるべきであり、そこでの活性化剤および/またはCa²⁺イオンの検体または検体混合物への添加からのタイムスパンは、秒単位で、フィブリン塊の形成が検出可能になるまで、または発色性基質が用いられる場合は、活性化剤および/またはCa²⁺イオンの検体への添加からのタイムスパンは、所定の吸光度の変化率が達成されるまで、測定される。発色性基質の使用は、例えば、PTの測定のための方法において知られている (例えば、EP14 039 A1を参照する)。

40

【0029】

本発明の方法は、検体の測定された血液凝固時間 (第一の試験結果、実測値) を、検量曲線 (基準曲線) を用いて、標準化された血液凝固時間 (標準化試験結果、名目値) に変換することによる、検体の標準化された血液凝固時間の測定を可能にする。

50

【0030】

プロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、トロンビン時間 (TT)、パトロキソビン時間 (BT) およびエカリン時間 (ECT) から成る群からの標準化血液凝固時間の測定のための方法は特に好ましい。

【0031】

少なくとも2つの校正物質が利用可能なことが検量曲線のプロットングのために必要であり、ここでそれぞれの校正物質のために別々の標準血液凝固時間が、秒単位で予め決められる。用いることのできる校正物質の数は上方には制限されない。

【0032】

校正物質の標準血液凝固時間の決定 (事前決定) は種々の方法で行うことができる。一つの可能性は単一の血液凝固試験の実施で校正物質の標準血液凝固時間を決定することであり、この試験実施は特定の検査室独自の血液凝固試験系の所定の条件下で行われる (すなわちこの標準化血液凝固時間は、特定の測定機器上で特定の試薬のバッチの特定の活性化剤を用いて測定される)。例えば、校正物質の APTT の測定のための特定の APTT 試薬バッチの使用、およびそれらの特定の条件下で、APTT 標準血液凝固時間として測定された APTT の割当てが可能である。他の可能性は校正物質の標準血液凝固時間を、1つの血液凝固試験の複数の試験結果を平均化して、確定することである。好ましくは、異なった活性化剤バッチをこのために使用する。しかしながら、例えば、異なった APTT 活性化剤 (カオリンまたはエラグ酸または珪土等) のような、代替りの活性化剤のタイプもまた使用できる。次に、例えば、平均値を個別の試験の実施で測定された血液凝固時間から作成でき、そして標準血液凝固時間として校正物質へと割当てることができる。好ましくは、基準曲線のプロットングのために用いられる全ての校正物質の標準血液凝固時間が確定されそして同一の様式で割当てられる。

【0033】

好ましくは、基準曲線のプロットングのためには、異なった止血能力およびそのために異なった標準血液凝固時間により識別される、校正物質のキットが用いられる。他の好ましいキットは、希釈溶液 (例えば、緩衝液) の異なった容積で希釈して、同様に異なった止血能力により識別される連続する校正物質を調製できる、確定した所定の標準血液凝固時間を有する単一の校正物質 (ストック校正物質) を含む。好ましくは、希釈溶液は本発明のキット中にストック校正物質と一緒に含まれている。

【0034】

検量曲線のプロットングは、検体の血液凝固時間が測定される同じ検査室独自の試験系中で、校正物質の血液凝固時間を測定することにより行われる。予め決められた校正物質の標準血液凝固時間を付随の測定された血液凝固時間に割当て、そして内挿または外挿することによって、基準曲線がプロットされ、ここで、例えば、標準血液凝固時間 (名目値) が X 軸上にプロットされ、そして測定された血液凝固時間 (実測値) が Y 軸上にプロットされる。検体の測定された血液凝固時間は基準曲線を用いて標準血液凝固時間に変換される。

【0035】

特に好ましくは、その血液凝固時間が標準化されている、検体と同じマトリクスを有する校正物質を使用する。本発明の方法は、ヒトまたは動物由来の、クエン酸処理できる血漿検体の血液凝固時間の標準化に特に適している。このために、校正物質は、同様に、血漿、好ましくは血漿プールに基づいていることが好ましく、この場合、例えば、それらはヒトと非ヒト血漿の混合物であってもいい。ヒト血漿を、異なった比率で、例えば、ウサギおよび/またはウシ血漿と混合し、そしてそうした血漿混合物の血液凝固時間を測定することで、当業者は、本発明の方法で使用するための校正物質を調製することができる。この血漿校正物質はさらに、慣用的に血漿校正物質または対照物質の調製で用いられている物質を含むことができる。これには、例えば、トリスまたはヘペスのような緩衝物質、クエン酸塩のような抗凝固性物質、デキストランのような安定化剤、およびアジ化ナトリウムのような保存剤が含まれる。本発明の方法で使用するために、校正物質は液体、凍結

10

20

30

40

50

または凍結乾燥状態で調製することができる。

【 0 0 3 6 】

本発明の方法の特定の実施態様は、血液凝固系に影響する物質を含有する検体の標準血液凝固時間の測定に関する。このタイプの物質は、抗凝固治療の過程で患者へ投与される抗凝固性物質、または臨床試験の過程もしくは類似の研究試験における抗凝固治療での使用のために試験される抗凝固性物質であっていい。それらは、例えば、抗凝固作用を有する医薬または物質であってよく、例えば、非分画型高分子量ヘパリン(UFH)、分画型低分子量ヘパリン(LMWH)、半-もしくは全合成ヘパリノイド(例えば、ダナパロイドまたはオルガラン^(R))のようなヘパリン類; ホンダパリヌクスのような五糖類; クマリ

ン誘導体のようなビタミンK拮抗剤; または、ヒルジン、アルガトロバンもしくはメラガトランのような直接トロンピン阻害剤が挙げられる。さらに、それらは天然型または合成型活性第10因子阻害剤であってよく、ここでは多くの天然型活性第10因子阻害剤の場合、組換え変異体もまた使用することができる。別のやり方でしばしば吸血性動物の唾液から単離される、天然型活性第10因子阻害剤の例には、メキシコ蛭(ヘメンテリア・オフィシナリス)由来のポリペプチドであるアンチスタシン、軟ダニ(オルニトドルス・モウバタ)由来のポリペプチドであるダニ抗凝固ペプチド(Tick Anticodgulant Peptide)、蛭のヒルド・メジシナリス由来のポリペプチドであるヤジン(yagin)、吸血蝙蝠(デスマダス・ロツダス)由来のドラクリンが挙げられる。合成型活性第10因子阻害剤は種々のクラスに属し、ジアミジノ-および二塩基性活性第10因子阻害剤、モノベンズアミジン活性第10因子阻害剤および非ベンズアミジン活性第10因子阻害剤と種々の物がある。抗凝固剤を投与されている患者検体の血液凝固時間の測定の場合は、特に、患者の血液または血漿中の抗凝固剤濃度が治療的範囲に入っているかどうかを測定することが重要である。

10

20

【 0 0 3 7 】

そうした抗凝固剤投与検体の血液凝固時間の標準化のために、インビトロで抗凝固作用を有する所定の量の抗凝固性物質を含有する校正物質の使用が推奨される。ヘパリンで処理した患者検体の血液凝固時間の標準化のために、例えば、所定の量のヘパリンでスパイクした校正物質の使用が推奨される。好ましくは、そうした校正物質は0.1~1.0 IU/mLのヘパリン濃度を有している。

【 0 0 3 8 】

以下の例示的实施態様は本発明の方法を説明するためであり、制限的なものとして理解されてはならない。

30

【実施例】

【 0 0 3 9 】

〔実施例1〕

A P T T 試験系でのヘパリンの治療的範囲の測定(生体外方法)

ヘパリンで処理した患者の血漿検体および正常血漿プールを用いた。それぞれの検体のために、IU/mLで表したヘパリン濃度を、活性第10因子試験(ベリクロム^(R)ヘパリン、デード・ベーリング・マールブルグ、マールブルグ、ドイツ国)中の適切なヘパリン標準について測定した。さらに、それぞれの検体のA P T Tを、同じバッチの活性化剤(リン脂質およびエラグ酸、デード^(R)アクチン^(R)F S L 試薬、デード・ベーリング・マールブルグ、マールブルグ、ドイツ国)を用いて測定した。これらの測定の結果を表1に示した。

40

【 0 0 4 0 】

【表 1】

表 1

	ヘパリン [IU/ml]	APTT [秒]		ヘパリン [IU/ml]	APTT [秒]
正常 プール	0.00	29.4			
患者	0.60	75.9	患者	0.24	66.4
患者	0.60	75.9	患者	0.25	49.1
患者	0.01	42.5	患者	0.27	55.3
患者	0.02	57.4	患者	0.27	25.8
患者	0.02	34.3	患者	0.31	70.6
患者	0.04	36.2	患者	0.31	41.0
患者	0.05	33.9	患者	0.32	57.5
患者	0.05	34.4	患者	0.32	37.3
患者	0.05	58.1	患者	0.33	55.3
患者	0.05	34.5	患者	0.34	40.1
患者	0.06	49.6	患者	0.34	51.1
患者	0.06	27.1	患者	0.34	72.4
患者	0.06	45.5	患者	0.36	64.8
患者	0.07	27.1	患者	0.36	51.3
患者	0.07	58.8	患者	0.37	75.1
患者	0.07	84.2	患者	0.38	53.7
患者	0.08	36.4	患者	0.39	70.6
患者	0.10	46.5	患者	0.40	51.4
患者	0.11	48.1	患者	0.41	72.3
患者	0.12	52.3	患者	0.43	83.6
患者	0.13	46.5	患者	0.43	70.2
患者	0.17	39.5	患者	0.45	116.4
患者	0.18	42.8	患者	0.49	63.9
患者	0.19	62.8	患者	0.51	64.4
患者	0.22	55.3	患者	0.52	69.3
患者	0.22	67.9	患者	0.54	59.0
患者	0.23	75.2	患者	0.69	73.9

【 0 0 4 1 】

マイクロソフト^(R) エクセル、バージョン 9 7 S R - 2 ソフトウェア (マイクロソフト社、レドモンド、米国) を用いて、2 つのデータ組の線形回帰を行った :

$$A P T T [秒] = a \times \text{ヘパリン} [I U / m L] + b$$

$$a = 5 8 . 4 7$$

$$b = 4 0 . 3 9$$

10

20

30

40

50

【 0 0 4 2 】

最適線を用いて、生体外ヘパリン濃度の一般的に知られている治療的範囲 0.3 ~ 0.7 IU/mL に対応する APTT 値の範囲を測定した。

〔表 2〕

ヘパリン [IU/mL]	回帰線による APTT [秒]
0.3	57.9
0.7	81.3

その結果、治療的範囲は 57.9 ~ 81.3 秒の APTT 値を含んでいた。

【 0 0 4 3 】

〔実施例 2〕

ヘパリン校正物質の調製および APTT の標準化のための本発明の方法で使用されるそれらの離散型標準 APTT の確定

校正物質 1 : 正常血漿プール

20 人の健康人献血者からの血漿を 3.2 % クエン酸ナトリウム中に採取し、プールし、50 mM ヘプス緩衝液 (pH 7.5) で緩衝化し、適切な安定化剤で安定化し、1 mL アリコットに充たしそして凍結乾燥した。使用時、校正物質を 1 mL の 2 回蒸留水を用いて再構成した。

【 0 0 4 4 】

校正物質 2 : ヘパリン - 血漿プール

非分画ヘパリン (リケミン^(R)、ロッシュ・ドイチュランド・ホールディング、グレンザッハ - ビーレン、ドイツ国) の所定の量を、0.6 IU/mL の最終濃度が得られるように、適切な安定化剤溶液に加えた。国際ヘパリン標準を用いて校正した、活性第 10 因子試験 (ベリクロム^(R)ヘパリン、デード・ベーリング・マールブルグ、マールブルグ、ドイツ国) を用いて、ヘパリン溶液中のヘパリン活性を、自動化血液凝固測定装置により測定した。この活性第 10 因子試験は国際ヘパリン標準を用いて校正した。使用時、校正物質を 1 mL の正常血漿プールを用いて再構成した。

【 0 0 4 5 】

2 つの校正物質の標準 APTT の測定のために、それぞれの血漿の APTT を、同じバッチの活性化剤 (リン脂質およびエラグ酸、デード^(R)アクチン^(R) F S L 試薬、デード・ベーリング・マールブルグ、マールブルグ、ドイツ国) を用いて、同じ血液凝固測定装置 (B C S^(R)血液凝固分析機、デード・ベーリング・マールブルグ、マールブルグ、ドイツ国) により測定した。以下の APTT 値が測定された :

〔表 3〕

正常血漿プール	29 秒
ヘパリン血漿プール	80 秒

これにより APTT 値が、別々の標準 APTT (名目値) として、対応する校正物質に割当てられた。

【 0 0 4 6 】

〔実施例 3〕

本発明の方法を用いた標準化 APTT 値の測定

2 つの校正物質 (実施例 2 参照) およびヘパリンで処理した患者の血漿検体の APTT を、いずれかの所望のバッチの活性化剤 (リン脂質およびエラグ酸、デード^(R)アクチン^(R) F S L 試薬、デード・ベーリング・マールブルグ、マールブルグ、ドイツ国) を用いて、いずれかの所望の血液凝固測定装置により測定した。

【 0 0 4 7 】

2 つの校正物質について、以下の対の値が、予め決定した標準 APTT の割当て (名目値)、および血漿検体と平行して測定した APTT (実測値) から得られた :

〔表 4〕

	名目値 [秒]	実測値 [秒]
正常血漿プール	29	29.6

10

20

30

40

50

ヘパリン血漿プール 80 103.0

【0048】

基準曲線を二対の値の外挿によりプロットした(図1)。

【0049】

この基準曲線を用いて、血漿検体の測定した当初のAPTT値はこうして標準化APTT値へ変換された(表5参照)。基準曲線のプロットおよび測定値の変換は、血液凝固測定装置により自動的に行われた。

【表2】

表5

測定された APTT [秒]	標準化された APTT [秒]
29.6	29.0
103.0	80.0
103.0	80.0
50.2	43.3
67.2	55.1
44.8	39.6
46.6	40.8
41.2	37.1
35.3	33.0
58.3	48.9
35.3	33.0
59.7	49.9
28.8	28.4
51.4	44.1
28.7	28.4
68.2	55.8
79.0	63.3
42.0	37.6
57.8	48.6
57.6	48.5
63.9	52.8
65.4	53.9
47.8	41.6
59.9	50.1
81.8	65.3
63.6	52.6
76.5	61.6
105.9	82.0

測定された APTT [秒]	標準化された APTT [秒]
93.8	73.6
59.8	50.0
66.1	54.4
27.9	27.8
84.7	67.3
44.9	39.6
80.2	64.2
41.5	37.3
63.9	52.8
41.2	37.1
58.8	49.3
100.4	78.2
82.6	65.8
64.1	53.0
83.7	66.6
69.3	56.6
90.0	71.0
66.1	54.4
94.7	74.2
106.6	82.5
88.2	69.7
122.4	93.5
83.5	66.5
74.1	59.9
108.5	83.8
106.7	82.6
98.5	76.9

10

20

30

40

50

【 0 0 5 0 】

〔実施例 4〕

A P T T の標準化前後での A P T T 試薬の各種バッチでの治療的範囲

2つの校正物質（実施例 2 参照）およびヘパリンで処理した患者の血漿検体の A P T T を、4つの異なったバッチの活性化剤（リン脂質およびエラグ酸、デード^(R)アクチン^(R) F S L 試薬、デード・ペーリング・マールブルグ、マールブルグ、ドイツ国）を用いて、血液凝固測定装置により測定した。実施例 3 に従い、検体のそれぞれのバッチ依存性測定値を、バッチ依存性基準曲線により、標準化 A P T T 値に変換した。患者検体のヘパリン濃度を活性第 1 0 因子試験で測定した（実施例 1 参照）。

【 0 0 5 1 】

最終的に、測定した A P T T 値および標準化 A P T T 値の両方に関して、生体外ヘパリン濃度の一般的に知られている治療的範囲 0.3 ~ 0.7 IU/mL に対応する A P T T 値の範囲を測定した。

【表 3】

表 6

	治療的範囲（生体外ヘパリンの 0.3~0.7 IU/mL）			
	秒で表した A P T T 値の範囲			
	バッチ 1	バッチ 2	バッチ 3	バッチ 4
標準化前	58 - 81	72 - 109	66 - 99	66 - 96
標準化後	66 - 96	64 - 95	67 - 99	66 - 96

【 0 0 5 2 】

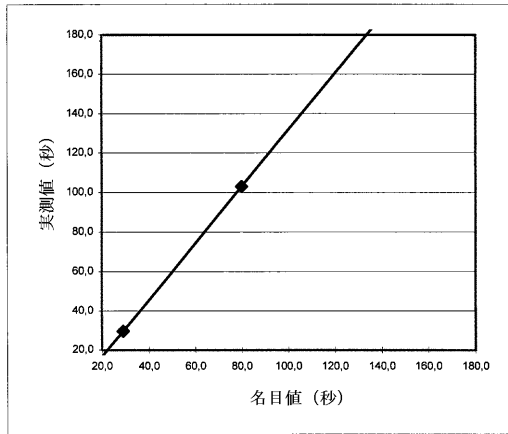
A P T T 値の標準化前には、治療的範囲の上限値は、それぞれバッチ毎に 35% まで違っていた。A P T T 値の標準化後には、治療的範囲の上限値は、それぞれバッチ毎に 4% までしか違っていない。本発明の方法は治療的範囲の統一を可能にし、それにより各種の試験系の結果を標準化後お互いに直接比較することが可能である。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 3 】

【図 1】対の値の外挿によってプロットされた基準曲線を示す。

【図 1】



フロントページの続き

(72)発明者 ノールベルト・ツァンダー
ドイツ連邦共和国35039マルブルク・アン・デアツァールバッハ13

審査官 海野 佳子

(56)参考文献 特開平10-104239(JP, A)
特開平08-068794(JP, A)
国際公開第2005/029093(WO, A1)

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