



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 103688177 B

(45)授权公告日 2017.07.04

(21)申请号 201280029832.5

专利权人 积水医疗株式会社

(22)申请日 2012.06.15

(72)发明人 家子正裕 森川千鹤 服部惠子

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103688177 A

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

(43)申请公布日 2014.03.26

代理人 金世煜 苗堃

(30)优先权数据

2011-135174 2011.06.17 JP

(51)Int.Cl.

G01N 33/86(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.12.17

(56)对比文件

CN 1336178 A, 2002.02.20,

US 4877741, 1989.10.31,

CN 101903030 A, 2010.12.01,

香川和彦. 血液凝固補正試験.《検査と技術》.2006,第34卷(第8期),

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/065434 2012.06.15

审查员 刘迎鸣

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/173260 JA 2012.12.20

(73)专利权人 学校法人东日本学园

地址 日本北海道

权利要求书1页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

狼疮抗凝物检测用血液凝固时间的测定方法

(57)摘要

本发明提供一种血液凝固时间的测定方法,其即使对于华法林服用者、维生素K缺乏者或者肝功能不全患者的血液试样,也不受到血液凝固因子缺乏的影响,与ISTH的推荐法相比,能够容易且敏感度良好地进行LA检测。一种狼疮抗凝物检测用血液凝固时间的测定方法,其特征在于,在血液凝固时间的测定前或者测定时,向血液试样中添加含有血液凝固因子的缓冲液组合物来测定血液凝固时间。

1. 辅助试剂在制备狼疮抗凝物检测用血液凝固时间测定用试剂盒中的应用,其特征在于,在血液凝固时间的测定前或者测定时,向血液试样中添加辅助试剂,测定血液凝固时间,所述辅助试剂以含有血液凝固因子的缓冲液组合物为主成分,与狼疮抗凝物检测用血液凝固时间测定用试剂组合使用,所述血液凝固因子选自FII、FVIII、FIX、FX以及FXII中的1种或2种以上。

2. 根据权利要求1所述的应用,其中,选自FII、FVIII、FIX、FX以及FXII中的1种或2种以上的血液凝固因子中,至少1种是FX。

3. 根据权利要求1所述的应用,其中,血液凝固因子是FII。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的应用,其中,狼疮抗凝物检测用血液凝固时间测定用试剂被用于活化部分凝血活酶时间或者稀释拉塞尔蛇毒时间的测定。

5. 根据权利要求1所述的应用,其中,血液试样是全血或者血浆。

6. 根据权利要求1所述的应用,其中,血液试样来自选自华法林服用者、维生素K缺乏者以及肝功能不全患者中的被检者。

7. 根据权利要求1~3中任一项所述的应用,其中,在血液凝固时间的测定前或者测定时,向血液试样中添加辅助试剂。

8. 根据权利要求1所述的应用,所述狼疮抗凝物检测用血液凝固时间测定用试剂盒,含有以下的(A)和(B):

(A) 活化部分凝血活酶时间测定用试剂或者稀释拉塞尔蛇毒时间测定用试剂,

(B) 以含有血液凝固因子的缓冲液组合物为主成分的辅助试剂,所述血液凝固因子选自FII、FVIII、FIX、FX以及FXII中的1种或2种以上。

9. 根据权利要求8所述的应用,其中,选自FII、FVIII、FIX、FX以及FXII中的1种或2种以上的血液凝固因子中,至少1种是FX。

10. 根据权利要求8所述的应用,其中,血液凝固因子是FII。

11. 根据权利要求8所述的应用,其中,血液试样是全血或者血浆。

12. 根据权利要求8所述的应用,其中,血液试样来自选自华法林服用者、维生素K缺乏者以及肝功能不全患者中的被检者。

13. 根据权利要求8所述的应用,其中,在血液凝固时间的测定前或者测定时,向血液试样中添加(B)以含有血液凝固因子的缓冲液组合物为主成分的辅助试剂,所述血液凝固因子选自FII、FVIII、FIX、FX以及FXII中的1种或2种以上。

狼疮抗凝物检测用血液凝固时间的测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种以检测狼疮抗凝物为目的,测定被检血液试样的血液凝固时间的方法。

背景技术

[0002] 血液凝固时间测定是测定从将由血液凝固因子的活化剂(以下,有时也简称为活化剂)和/或 Ca^{2+} 等构成的血液凝固时间测定用试剂添加于样品血液或样品血液混合物的时刻,到形成可检测的纤维蛋白凝块为止的时间(血液凝固时间:以下,有时也简称为凝血时间。另外,有时也将纤维蛋白凝块的形成简称为凝固),是为了筛选血液凝固体系异常的有无,或者测定各个血液凝固因子的活性而实施的。作为典型的例子,有凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶时间等的血液凝固试验。以下,在本说明书中,有时也将血液凝固因子简称为凝血因子。

[0003] PT是从向被检血浆中添加组织凝血活酶和 Ca^{2+} 的混合液到凝固为止的时间,是综合性地检查与外源性凝血机制有关的第VII因子、第X因子、第V因子、凝血酶原、纤维蛋白原等的凝血活性的时间。另外,APTT是从向被检血浆中添加足够量的磷脂以及活化剂(高岭土、无水硅酸、鞣花酸等)和适量的 Ca^{2+} 到凝固为止的时间,是综合性地检查与内源性凝血机制有关的第XII因子、第XI因子、前激肽释放酶、高分子激肽原、第IX因子、第VIII因子、第X因子、第V因子、凝血酶原、纤维蛋白原等的凝血活性的时间。通常,这些血液凝固试验中的异常是指凝血时间延长。血液凝固体系的异常反映生物体内的出血趋势或者血栓趋势(血液凝固趋势)的先兆或结果。

[0004] 作为该凝血时间的延长原因,认为是:1)血液凝固因子的缺乏或者降低;2)存在针对构成血液凝固体系的血液成分的抗体;3)存在针对血液凝固时间测定用试剂中的成分的抗体;4)存在针对构成血液凝固体系的血液成分与血液凝固时间测定用试剂中的成分的复合体的抗体;5)阻碍血液凝固反应的药剂的给药等。

[0005] 但是,仅进行血液凝固时间的测定时,无法鉴别凝血时间的延长原因是例如单纯由于凝血因子缺乏而引起的血液凝固活性的降低,还是针对构成血液凝固体系的成分或者血液凝固时间测定用试剂中的成分等的抗体(抑制因子)阻碍凝血反应而引起的血液凝固活性的降低等。另一方面,因该延长原因的不同,导致治疗方针不同,所以该延长原因的鉴别是重要的。因此,为了鉴别该延长原因,进行血液凝固补正试验(以下,有时也称为“混合试验”或“Mixing test”),即,向被检血浆中添加正常血浆,将其血液凝固时间被补正(正常化)的程度制图并进行判定(非专利文献1)。

[0006] 以往,混合试验例如如下实施。

[0007] 准备相对于被检血浆,以正常血浆的混合比例成为0%、20%、50%、80%、100%的方式添加、混合正常血浆而制备得到的试样,进行APTT的测定。将其结果制成图(横轴:混合后的正常血浆的比例或者被检血浆的比例(%),纵轴:凝血时间(秒)),根据该图的形状目视鉴别、判定凝血时间的延长原因。例如,被检血浆缺乏凝血因子时,少量添加正常血浆(在图1

(A)为20%)时,使凝血时间大幅度缩短,接近于测定正常血浆100%时的值,因此显示出与连接被检血浆100%与正常血浆100%的点的直线(虚线)相比向下凸出的曲线(图1(A))。

[0008] 被检血浆中存在凝血因子抑制因子时,即使提高正常血浆的添加比例,该凝血因子抑制因子也使添加的正常血浆中的凝血因子失活,所以由添加正常血浆产生的凝血时间的改善程度小,显示向上凸出的曲线(图1(B))。

[0009] 作为影响血液凝固时间测定用试剂的感受性的凝血因子抑制因子,已知有狼疮抗凝物(以下,LA)。LA被定义为一种不阻碍每个凝血因子活性地阻碍体外的磷脂依赖性凝血反应的免疫球蛋白,而并非单一的抗体。由于凝血反应中必须存在磷脂,所以通常很多血液凝固时间测定用试剂中含有丰富的磷脂。LA与该试剂中的磷脂反应,将其消耗,结果阻碍凝血反应而使凝血时间延长,所以经常发现像PT、APTT这样的凝血检查的结果异常。但是,LA因磷脂的种类(来源、磷脂的组成等)不同而反应强度不同,所以根据所使用的血液凝固时间测定用试剂,LA阳性・阴性的判定结果也不同。

[0010] 非专利文献1:检查与技术,Vol.34,no.8,2006年8月,p735-742

[0011] 非专利文献2:Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection,Journal of Thrombosis and Haemostasis,7:pp1737-1740,2009

发明内容

[0012] 作为抗凝血疗法,紧急时,使用有速效性且可静脉内给药的肝素,通过长期给药来预防时,使用作为口服抗凝血药的华法林。其中,已知华法林通过对生物体内的维生素K的作用进行拮抗,从而抑制血液凝固因子中的第II因子(凝血酶原)、第VII因子、第IX因子、第X因子在肝脏中的生物合成。因此,对于华法林服用者、维生素K缺乏者、或者肝功能不全患者(肝硬化、暴发型肝炎、或者慢性肝炎患者等)而言,在基于以往的混合试验的血液凝固时间的延长原因的确认方法中,不明确是由于LA等抗磷脂抗体引起的凝血时间的延长,还是由于基于华法林的作用、维生素K的缺乏、或者肝功能不全的血液凝固因子的缺乏而引起的凝血时间的延长,难以鉴别原因。该问题在接受华法林给药进而为LA阳性的情况下更为深刻。这是因为确认或者怀疑LA阳性并开始抗凝血疗法时,LA的检测和其消长的监视、追踪是重要的,但无法正确地进行。

[0013] 国际血栓止血学会(ISTH)推荐,在进行LA检测时,为了补充不足的凝血因子,向被检血浆中混合等量的健康者血浆后进行测定。此处,对于所使用的健康者血浆,进行二次离心处理,以使血小板数低于107/mL,且各家自行制备所有血液凝固因子的活性几乎为100%的血浆而使用(非专利文献2)。但是,血液凝固因子中,还有活性非常不稳定且容易失活的血液凝固因子,所以将所有血液凝固因子的活性几乎100%地保持地制备健康者血浆是非常困难的,存在不容易稳定获得的问题。另外,在健康者血浆的制备中,虽然储留(存积)、混合的人数越多,越能够使凝血因子活性的每个人的波动平均化,但因设备而导致无法确保健康者的人数,血浆提供者出现偏差,所以还存在批次间的品质产生差别的问题。进而,使用健康者血浆的方法不仅会稀释被检血浆中的LA,有时也会添加健康者血浆中所含的妨碍LA测定的物质(来自磷脂、血小板的膜破碎物等),特别是LA呈弱阳性时,还存在可能发生假阴性化的问题。

[0014] 因此,迫切期望开发一种血液凝固时间的测定方法,该方法即使对于华法林服用

者、维生素K缺乏者或者肝功能不全患者,也不受血液凝固因子的缺乏的影响,与上述ISTH的推荐法相比,可容易且敏感度良好地进行LA检测。

[0015] 本发明人等进行了深入的研究,其结果发现,通过在将特定的血液凝固因子而不是健康者血浆添加于被检试样(例如血浆)后测定血液凝固时间,从而即使不使用健康者血浆,也能够简便且敏锐地测定检测用的血液凝固时间,从而完成了本发明。

[0016] 即,本发明提供一种LA检测用血液凝固时间的测定方法,其特征在于,在血液凝固时间的测定前或者测定时,向血液试样中添加含有血液凝固因子的缓冲液组合物来测定血液凝固时间。

[0017] 另外,本发明提供一种辅助试剂,其以含有血液凝固因子的缓冲液组合物为主成分,且与狼疮抗凝物检测用血液凝固时间测定用试剂组合使用。

[0018] 进而,本发明提供一种狼疮抗凝物检测用血液凝固时间测定用试剂盒,其含有以下的(A)、(B)。

[0019] (A)活化部分凝血活酶时间测定用试剂或者稀释拉塞尔蛇毒时间测定用试剂

[0020] (B)以含有血液凝固因子的缓冲液组合物为主成分的辅助试剂。

[0021] 根据本发明方法,即使来自华法林服用者、维生素K缺乏者或者肝功能不全患者(肝硬化、暴发型肝炎、或者慢性肝炎患者等)的血液试样等缺乏维生素K依赖性凝血因子(FII、FVII、FIX、以及FX),也能够简便且敏锐地确认LA的有无。因此,能够决定具有LA的患者的正确治疗方针。另外,由于不需要准备健康者血浆,所以也能够消除以往成为问题的健康者血浆的批次间差别、难以稳定获得的问题。此外,本发明方法特别值得一提之处是,能够简便且敏锐地检测目前为止即使利用健康者血浆的混合试验也可能漏检的LA。这是无法根据将以往的健康血浆的添加置换为各个血浆成分的添加这样的单纯构思来预测的、完全预料不到的效果。

附图说明

[0022] 图1是表示基于以往方法的混合试验的结果的模式图。图1(A)表示凝血因子缺乏症的图形,图1(B)表示凝血因子抑制因子型的图形,图1(C)表示凝血时间的延长原因不明确时的图形。

[0023] 图2是表示分别以未处理血浆A和添加正常血浆的血浆A为样本时的混合试验的结果的图。

[0024] 图3是表示分别以未处理血浆B和添加正常血浆的血浆B为样本时的混合试验的结果的图。

[0025] 图4是表示以添加有辅助试剂1-4的血浆A为样本时的混合试验的结果的图。

[0026] 图5是表示以添加有辅助试剂1-4的血浆B为样本时的混合试验的结果的图。

具体实施方式

[0027] 本发明的LA检测用血液凝固时间的测定方法的特征在于,在血液凝固时间的测定前或者测定时,向血液试样中添加含有血液凝固因子的缓冲液组合物。

[0028] 本发明方法所使用的血液试样优选全血或者血浆,通常,向从被检者采集的血液中加入枸橼酸钠等抗凝血剂来制备。在这些血液试样中,对于将以往难以进行LA检测的来

自被检者的血液试样作为对象的情况,本发明方法特别有用。作为这样的血液试样,可举出来自华法林服用者、维生素K缺乏者、肝功能不全患者的血液试样。

[0029] 作为血液凝固时间的测定手段,即,血液凝固时间测定用试剂,只要是对LA显示感受性的磷脂依赖性的血液凝固时间测定用试剂或测定手段即可,可以使用测定凝血酶原时间(PT)、活化部分凝血活酶时间(APTT)、稀释PT(dPT)、稀释APTT(dAPTT)、高岭土凝血时间(KCT)、以及稀释拉塞尔蛇毒时间(dRVVT)等的公知的试剂。这些试剂中,例如,测定凝血酶原时间(PT)的试剂的主成分是钙和组织凝血活酶,测定活化部分凝血活酶时间(APTT)的试剂的主成分是磷脂、接触因子活化剂(高岭土、无水硅酸、鞣花酸等阴性带电体)以及钙,测定高岭土凝血时间(KCT)的试剂的主成分是高岭土和钙,测定稀释拉塞尔蛇毒时间(dRVVT)的试剂的主成分是拉塞尔蛇毒、磷脂。这些成分可以适当地作为独立的试剂使用,或者作为被混合而成的试剂使用。另外,作为上述试剂,均可以使用市售品。作为PT测定用试剂,例如市售有COAGPIA(注册商标)PT-S(SEKISUI MEDICAL公司制)、Thrombocheck PT Plus(Sysmex公司制)、以及STA试剂Series PT(Roche Diagnostics公司制)等。作为APTT测定用试剂,例如市售有COAGPIA(注册商标)APTT-N(SEKISUI MEDICAL公司制)、ThrombocheckAPTT-SLA(Sysmex公司制)、APTT Liquid RD以及PTT LA试剂“RD”(Roche Diagnostics公司制)等。作为试剂的形态,可举出使用时被溶解的干燥形态、或者溶液形态。

[0030] 也可以将这些试剂中的1种以上与本发明的含有血液凝固因子的缓冲液组合物(辅助试剂)组合而制成试剂盒。

[0031] 在这些血液凝固时间测定用试剂中,PT、APTT或者dRVVT在LA检测敏感度方面优选。另外,测定PT或者APTT时,优选采用正常血浆与被检血浆的混合试验。测定dRVVT时,特别是也可以不进行混合试验。

[0032] 作为本发明所使用的含有血液凝固因子的缓冲液组合物,可举出含有被认为被检血液试样缺乏的血液凝固因子中的至少1种的缓冲液组合物,优选含有选自FII、FVII、FVIII、FIX、FX、FXI以及FXII中的1种或2种以上的缓冲液组合物,进一步优选至少含有选自FII、FVII、FIX以及FX中的1种或2种以上的缓冲液组合物。此外,测定PT时,优选含有选自FII、FVII以及FX中的1种或2种以上的缓冲液。测定APTT时,优选含有选自FII、FVIII、FIX、FX、FXI以及FXII中的1种或2种以上的缓冲液组合物,特别优选含有选自FIX和FX中的1种或2种以上的缓冲液组合物。另外,测定dRVVT时,优选含有选自FII和FX中的1种或2种以上的缓冲液组合物。应予说明,向被检试样中添加本发明的缓冲液组合物时,试样被该缓冲液组合物稀释,试样中的血液凝固因子浓度降低而影响凝血时间时,可以根据所使用的试剂,预选使上述缓冲液组合物中含有需要填补的血液凝固因子。例如,在APTT、dAPTT以及KCT中,可以预先含有FVIII、FXI以及FXII,在PT中,可以预先含有FVII,在dRVVT中,可以预先含有FX。

[0033] 此处,作为缓冲液,可以适当使用HEPES等的Good缓冲液等公知的缓冲液。缓冲液的pH只要是不使缓冲液组合物中含有的血液凝固因子失活的pH即可,优选pH6~9,更优选pH6.5~8.0。另外,缓冲液的浓度只要可保持保存中的缓冲能力即可,优选5mM~100mM,更优选5mM~50mM。

[0034] 就该缓冲液组合物中的血液凝固因子的浓度而言,作为向血液试样中添加该缓冲

液组合物后的血液凝固因子的浓度,优选0.01U/mL~10U/mL的范围,进一步优选0.1U/mL~5U/mL的范围。血液试样与缓冲液组合物的混合比例只要考虑缓冲液组合物中的血液凝固因子的浓度而适当设定即可。作为基于缓冲液组合物的血液试样的稀释倍率,优选3倍以下,更优选2倍以下。

[0035] 应予说明,可以向该缓冲液组合物中适当添加公知的物质作为血液凝固因子的稳定化剂。例如,可以添加日本特公平06-050999号公报中公开的甘氨酸甘氨酸、甘氨酸甘氨酸甘氨酸等。另外,也可以以不损害本发明的效果为限度地适当添加保存剂、离子强度调节剂等。

[0036] 在本发明方法中,在血液凝固时间的测定前或者测定时,向血液试样中添加含有上述血液凝固因子的缓冲液组合物。此处,在血液凝固时间的测定前添加缓冲液组合物,相当于血液试样的前处理。即,向血液试样中添加上述缓冲液组合物,对血液试样进行前处理,接着使用血液凝固测定用试剂测定血液凝固时间。另一方面,在血液凝固时间的测定时添加,相当于对血液凝固测定用试剂的一部分添加上述缓冲液组合物来测定血液凝固时间。这些添加时期中,从容易确保缓冲液组合物中含有的凝血因子的保存稳定性的方面考虑,优选在血液凝固时间的测定前向血液试样中添加上述缓冲液组合物。

[0037] 作为血液凝固时间的测定方法,例如可以优选通过使用如下方法来检测凝固,即,向血液试样中添加含有钙和磷脂的试剂(血液凝固时间测定用试剂)而发生血液凝固反应,以物理方式测定与该血液凝固反应相伴而发生变化的透射光变化或者散射光变化等光学变化、测定试样的粘度。

[0038] 作为钙,优选使用无机酸与钙的盐。作为这样的钙盐,可举出氯化钙等。另外,作为无机酸与钙的盐以外的钙盐,可举出乳酸钙。血液凝固时间测定用试剂中的钙的浓度可以根据血液凝固时间测定法的种类而适当设定。例如,对于APTT测定法而言,优选为20mM~25mM左右,对于PT测定法而言,优选为10mM~12.5mM。

[0039] 作为磷脂,可以优选使用以往以来血液凝固时间测定用试剂所使用的磷脂。磷脂的脂肪酸侧链没有特别限定,但是优选棕榈酸、油酸、硬脂酸。作为该磷脂,可举出磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰胆碱等。另外,磷脂也可以是来自牛脑、兔脑、人胎盘、大豆等的天然磷脂,或者通过基因重组而制成的磷脂。测定试样中的磷脂的浓度例如优选在APTT试剂中为1 μ g/mL~200 μ g/mL,在PT试剂中为10 μ g/mL~300 μ g/mL,在dRVVT测定试剂中为1 μ g/mL~300 μ g/mL。

[0040] 血液凝固时间测定用试剂的pH可以通过考虑与本发明的缓冲液组合物混合时的pH而适当设定,作为该测定用试剂本身的pH,优选pH6.0~8.0,更优选为pH7.0~7.6,可以使用以往的血液凝固时间测定用试剂所使用的缓冲剂来适当调节。作为该缓冲剂,例如可举出HEPES或者TRIS等,但并不限于此。

[0041] 上述血液凝固时间测定用试剂中除含有上述成分以外,还可以含有以往公知的血液凝固时间测定用试剂所含的成分。作为这样的成分,例如可举出活化剂、蛇毒、组织因子等。作为活化剂,可举出鞣花酸、高岭土、硅藻土、胶体二氧化硅、无水硅酸、氧化铝、镁等。作为蛇毒,可举出拉塞尔(Russell)蛇毒、Textarin蛇毒、Ecarin蛇毒等。作为组织因子,可举出兔脑、来自人胎盘、来自牛脑等的天然和基因重组的组织凝血活酶。

[0042] 本发明方法也可以适用于非专利文献1记载的血液凝固补正试验(混合试验)。即,

适用于向被检血液试样中添加正常血液试样,将其血液凝固时间被补正的程度制图来判定的方法。

[0043] 更详细而言,例如,向被检血浆中以1:1加入作为正常血浆的Pooled Normal Plasma(Precision Biologic Inc制;以下,简称为PNP)或者本发明的缓冲液组合物并稀释,将由此得到的试样作为被检试样。向该被检试样中添加正常血浆,准备以正常血浆的比例为0%、20%、50%、80%、100%的方式混合制备的试样,进行APTT的测定。将其结果绘制成图(横轴:混合后的正常血浆的比例或者被检血浆的比例(%),纵轴:凝血时间(秒)),可以根据该图的形状目视判定。

[0044] 如果使用本发明方法,则通过单纯地进行上述缓冲液组合物的添加以外,仅进行以往的血液凝固时间的测定,从而即使是来自华法林服用者、维生素K缺乏者或者肝功能不全患者的血液试样,也能够正确地检测、判定LA的有无。

[0045] 含有上述血液凝固因子的缓冲液组合物可以作为与狼疮抗凝物检测用血液凝固时间测定用试剂组合使用的辅助试剂来使用。

[0046] 另外,(A)活化部分凝血活酶时间测定用试剂或者稀释拉塞尔蛇毒时间测定用试剂,与(B)以含有血液凝固因子的缓冲液组合物为主成分的辅助试剂的组合,作为狼疮抗凝物检测用血液凝固时间测定用试剂盒有用。

[0047] 实施例

[0048] 通过以下实施例进一步详细说明本发明,但本发明不限于以下实施例。

[0049] 实施例1

[0050] 将被检血浆用表1记载的辅助试剂稀释为1:1,将得到的稀释试剂作为样本,实施通常的混合试验,比较图中曲线的形状。

[0051] <测定项目>

[0052] (1)APTT筛选试验

[0053] 使用PTT LA试剂“RD”(Roche Diagnostics公司制),利用血液凝固自动分析装置STA-R(Roche Diagnostics公司制)实施测定。判定中,使用试剂的所附说明书所记载的cutoff值。该试剂是使用含有作为磷脂的脑磷脂、作为接触因子活化剂(阴性带电体)的二氧化硅的PTT LA试剂、和另外自制的氯化钙溶液进行测定的试剂,能够与本发明的含有血液凝固因子的缓冲液组合物(辅助试剂)组合用于本发明的方法。

[0054] (2)dRVVT试验

[0055] 使用LA测试“Gradipore”(医学生物学研究所社制)试剂,利用血液凝固自动分析装置STA-R实施测定。判定中,使用试剂的包装说明书所记载的cutoff值。该试剂由含有拉塞尔蛇毒和磷脂的试剂1、含有拉塞尔蛇毒和过量磷脂的试剂2构成,能够与本发明的含有血液凝固因子的缓冲液组合物(辅助试剂)组合用于本发明的方法。

[0056] (3)磷脂中和法试验

[0057] 使用STACLOT LA(Roche Diagnostics公司制),利用血液凝固分析装置ST4(Roche Diagnostics公司制)实施测定。判定中,使用试剂的包装说明书所记载的cutoff值。

[0058] (4)混合试验

[0059] 使用PTT LA试剂“RD”(Roche Diagnostics公司制),利用血液凝固自动分析装置CP2000(SEKISUI MEDICAL公司制)实施测定。使用Pooled Normal Plasma(以下PNP,

Precision Biologic Inc.)作为正常血浆。样本混合比例设定为0%、10%、20%、50%、100%，使用CP2000的混合试验功能，采用自动稀释进行测定。判定如下进行：绘图，如果向上凸出，则为阳性。难以判定的为判定保留。

[0060] (5)混合试验变型

[0061] 将被检血浆用PNP或者后述的辅助试剂1-4进行1:1稀释，将得到的稀释试剂放入样本杯，置于CP2000，与(4)同样地实施测定。判定如下进行：绘图，如果向上凸出，则为阳性。难以判定的为判定保留。

[0062] <本发明的缓冲液组合物：辅助试剂>

[0063] 将HBS (50mM HEPES pH7.5, 150mM氯化钠)作为基础溶液，向其中添加表1所示的血液凝固因子，制备各辅助试剂。血液凝固因子全部使用Haematologic Technologies Inc.的血液凝固因子。

[0064] 表1

[0065] 辅助试剂组成

	人凝血因子 IX	人凝血因子 X	人凝血因子 XII	人凝血因子 VIII
[0066] 辅助试剂1	2U/mL	2U/mL	-	-
辅助试剂2	2U/mL	2U/mL	-	1U/mL
辅助试剂3	2U/mL	2U/mL	2U/mL	-
辅助试剂4	2U/mL	2U/mL	2U/mL	1U/mL

[0067] <被检血浆>

[0068] 被检血浆A、B均是从接受华法林给药的患者采集的血浆。

[0069] <结果>

[0070] 如表2所示，血浆A在APTT筛选试验、dRVVT试验、以及磷脂中和法的所有LA检查中为阳性。血浆B在APTT筛选试验、dRVVT试验中为阳性。

[0071] 表2

[0072] LA试验结果与判定

项目	APTT筛选		dRVVT				磷脂中和法			
单位	sec	判定	sec	sec	比	判定	sec	sec	Δsec	判定
[0073] cutoff值	47				1.3				8	
血浆A	143.0	阳性	220.4	82.5	2.67	阳性	132.0	86.0	46.0	阳性
血浆B	57.4	阳性	77.9	54.8	1.42	阳性	47.7	47.8	-0.1	阴性

[0074] 如表3中未处理栏、图2左图、图3左图所示，对于血浆A、B，混合试验中均有向下凸出的趋势，为LA阴性。在混合试验变型中，在通常被推荐的使用正常血浆(PNP)的方法中，血浆A为几乎接近直线的S型的图，难以判定是向上凸出还是向下凸出(表3中添加正常血浆栏、图2右图)。与此相对，使用本发明的辅助试剂1~4时，血浆A为明显的向上凸出的图，能够容易地判定为阳性(表3中辅助试剂栏、图4)。血浆B均明显向下凸出，能够判定为阴性(表3中辅助试剂栏、图5)。

[0075] 表3

[0076] 混合试验和混合试验变型

[0077]

样本		判定	样本比例				
被检血浆	处理		0%	10%	20%	50%	100%
血浆A	未处理	阴性	34.1	49.4	57.4	88.2	166.1
	添加正常血浆	判定保留	34.6	43.4	47.3	60.0	87.8
	添加辅助试剂1	阳性	34.2	45.1	46.6	55.2	73.8
	添加辅助试剂2	阳性	34.2	42.4	43.7	46.4	46.0
	添加辅助试剂3	阳性	34.2	44.2	45.9	53.8	71.3
	添加辅助试剂4	阳性	34.2	41.4	41.9	42.6	42.2
血浆B	未处理	阴性	34.4	35.3	36.4	40.3	56.6
	添加正常血浆	阴性	33.2	33.6	33.9	35.9	39.7
	添加辅助试剂1	阴性	34.1	33.6	34.0	35.8	47.0
	添加辅助试剂2	阴性	34.1	33.5	32.6	31.5	35.0
	添加辅助试剂3	阴性	34.1	33.2	33.2	32.4	37.3
	添加辅助试剂4	阴性	34.1	32.1	30.7	27.6	28.6

[0078] 根据本发明,血浆A的混合试验的阴性判定为由华法林给药引起的假阴性,实际上能够容易地判断为LA阳性。这是以往的混合试验或者混合试验变型所做不到的。另外,关于血浆B,在APTT筛选试验、dRVVT试验中为阳性,但均为由华法林投药引起的假阳性,实际上能够判断为LA阴性。

[0079] 实施例2

[0080] 相对于被检血浆9.5容量,添加、混合后述辅助试剂0.5容量,制备测定试样,实施dRVVT试验,求出凝血时间之比。

[0081] <测定项目>

[0082] (1) dRVVT试验

[0083] 作为血液凝固时间测定用试剂,使用DVVtest(注册商标)和DVVconfirm(均为Sekisui Diagnostics公司制),利用血液凝固自动分析装置CP2000(SEKISUI MEDICAL公司制),使用测定试样的培养时间216秒、APTT凝固点参数,进行dRVVT试验。本实施例中的cutoff值(t/c)设为1.3以下,进行LA的检测、判定。该试剂由含有拉塞尔蛇毒、磷脂以及钙的DVVtest(注册商标)试剂,含有拉塞尔蛇毒、过量磷脂以及钙的DVVconfirm试剂构成,能够与本发明的含有血液凝固因子的缓冲液组合物(辅助试剂)组合用于本发明的方法。

[0084] <本发明的缓冲液组合物:辅助试剂>

[0085] 以FX的浓度为表4的行所记载的浓度的20倍浓,FII的浓度为表4的列所记载的浓度的20倍浓的方式组合FX、FII,溶解于HBS,制备如28所述的辅助试剂。FX、FII均使用Haematologic Technologies Inc.的试剂。

[0086] <被检血浆>

[0087] LA阴性且没有华法林给药的血浆:使用AK Calibrant A(Sysmex公司制)作为LA阴性且有华法林给药的血浆:L(-)W(-)血浆;使用AK Calibrant D(Sysmex公司制)作为LA阳性且没有华法林给药的血浆:L(-)W(+)血浆;使用Lupus anticoagulant plasma(TRINA公

司制)作为LA阳性且没有华法林给药的血浆:L(+)W(-)血浆:使用Lupus anticoagulant plasma (BUSICOM公司制)作为LA阳性且有华法林给药的血浆:L(+)W(-)血浆。

[0088] <结果>

[0089] 将结果示于表4。

[0090] FII、FX均未添加(0U/mL)时,判定为:

[0091] L(-)W(-)的血浆为LA阴性;

[0092] L(-)W(+)的血浆为LA阴性;

[0093] L(+)W(-)的血浆为LA阳性;

[0094] L(+)W(+)的血浆为LA阴性;

[0095] 对于L(+)W(+)的血浆,得到LA假阴性的结果。

[0096] 另外,关于L(-)W(+)的血浆,虽为LA阴性,但t/c值为0.62,显示异常值。

[0097] 与此相对,向各被检血浆中添加FII、FX中的任1种以上时,维持L(-)W(-)的血浆、L(-)W(+)的血浆、以及L(+)W(-)的血浆的判定结果,仅使L(+)W(+)的血浆的t/c值增加至cutoff值以上,得到应得的LA阳性的结果。

[0098] 另外,向L(-)W(+)的血浆中添加FII、FX中的任1种以上时,确认了t/c值临近1附近而能够减小华法林给药的影响。如果考虑该成果与L(+)W(+)的血浆的成果,则显示使用本发明的方法的dRVVT试验即使是在华法林给药中也能够正确检测,例如,对华法林给药中的LA治疗效果的监视等极为有用。

[0099] 表4

[0100]

	FII (U/mL)		0	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
FX (U/mL)	LA	W	t/c	t/c	t/c	t/c	t/c	t/c
0	-	-	1.04					1.14
	-	+	0.62					0.86
	+	-	2.21					2.16
	+	+	1.26					2.22
0.1	-	-		1.06	1.08	1.07	1.09	1.11
	-	+		0.84	0.90	0.91	0.94	0.97
	+	-		2.31	2.33	2.36	2.36	2.37
	+	+		1.95	2.21	2.35	2.40	2.43
0.2	-	-		1.09	1.11	1.12	1.11	1.07
	-	+		0.88	0.92	0.90	0.93	0.94
	+	-		2.36	2.43	2.41	2.42	2.28
	+	+		2.10	2.39	2.37	2.54	2.09
0.3	-	-		1.11	1.12	1.11	1.12	1.12
	-	+		0.89	0.98	0.93	0.97	0.99
	+	-		2.37	2.46	2.44	2.43	2.43
	+	+		2.05	2.39	2.40	2.47	2.51
0.4	-	-		1.11	1.11	1.13	1.14	1.14
	-	+		0.87	0.94	0.96	0.99	1.03
	+	-		2.45	2.48	2.48	2.47	2.46
	+	+		2.13	2.30	2.49	2.59	2.58
0.5	-	-	1.11	1.10	1.12	1.12	1.14	1.14
	-	+	0.98	0.97	0.88	0.95	1.00	1.02
	+	-	2.35	2.35	2.37	2.46	2.47	2.45
	+	+	2.06	1.99	2.20	2.43	2.57	2.65

[0101] 根据本发明的方法,即使测定dRVVT试验中有时被判定为LA阴性(假阴性)的LA阳性(+)且有华法林给药(+)的被检者的血浆(L(+)W(+)的血浆),也能够不受华法林给药影响地进行LA阳性的本来的判定。

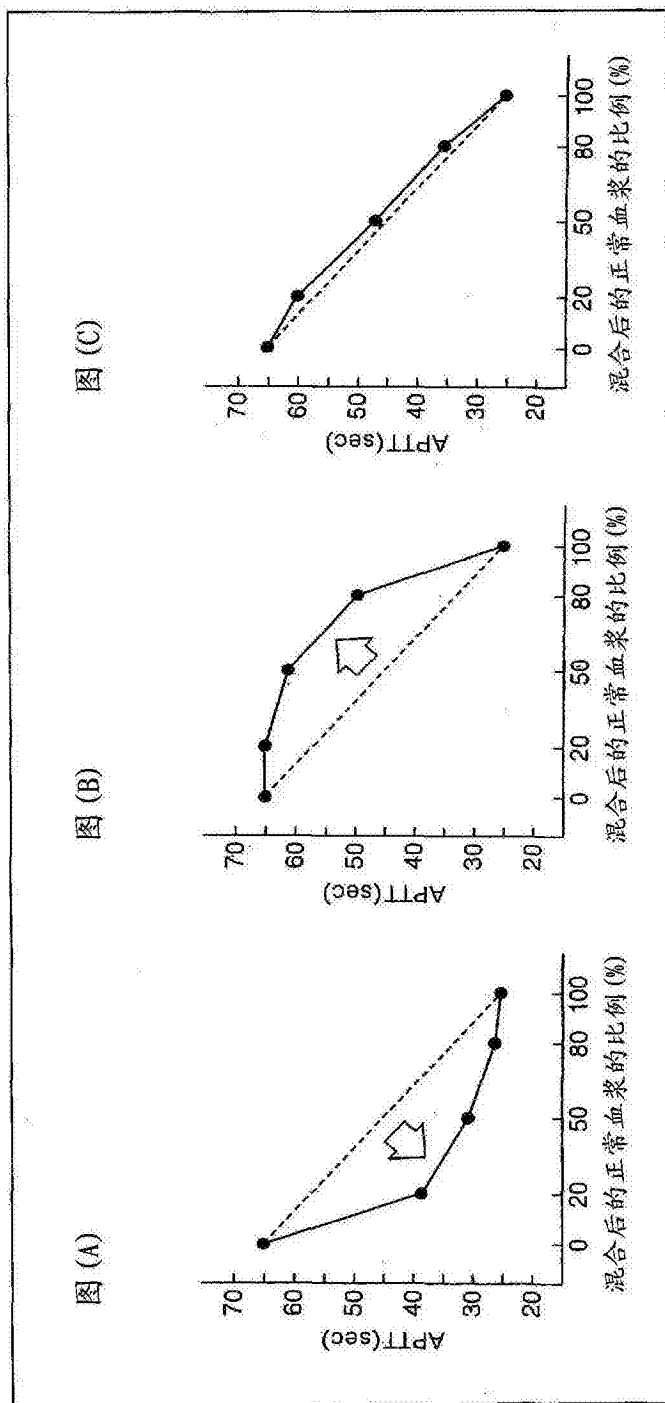


图1

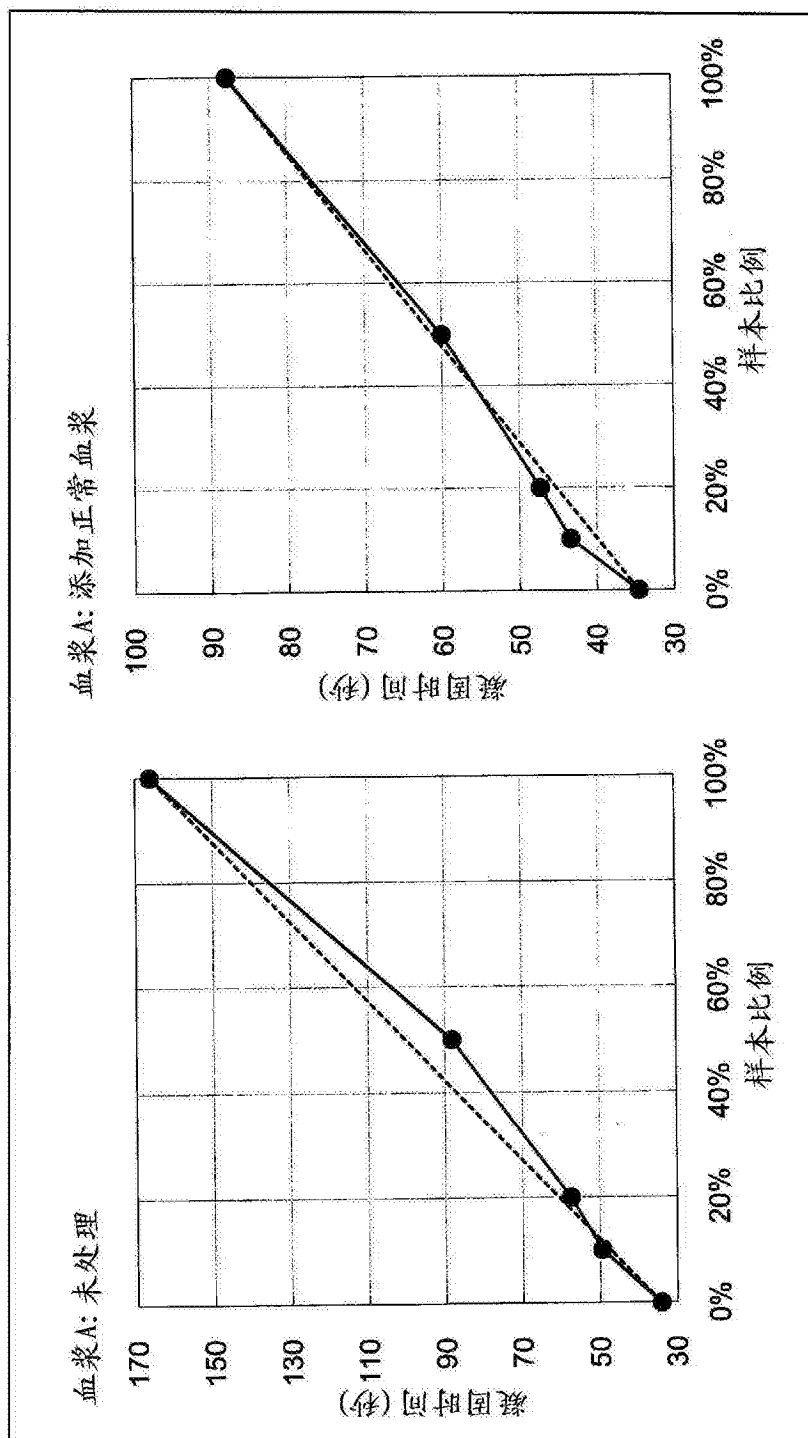


图2

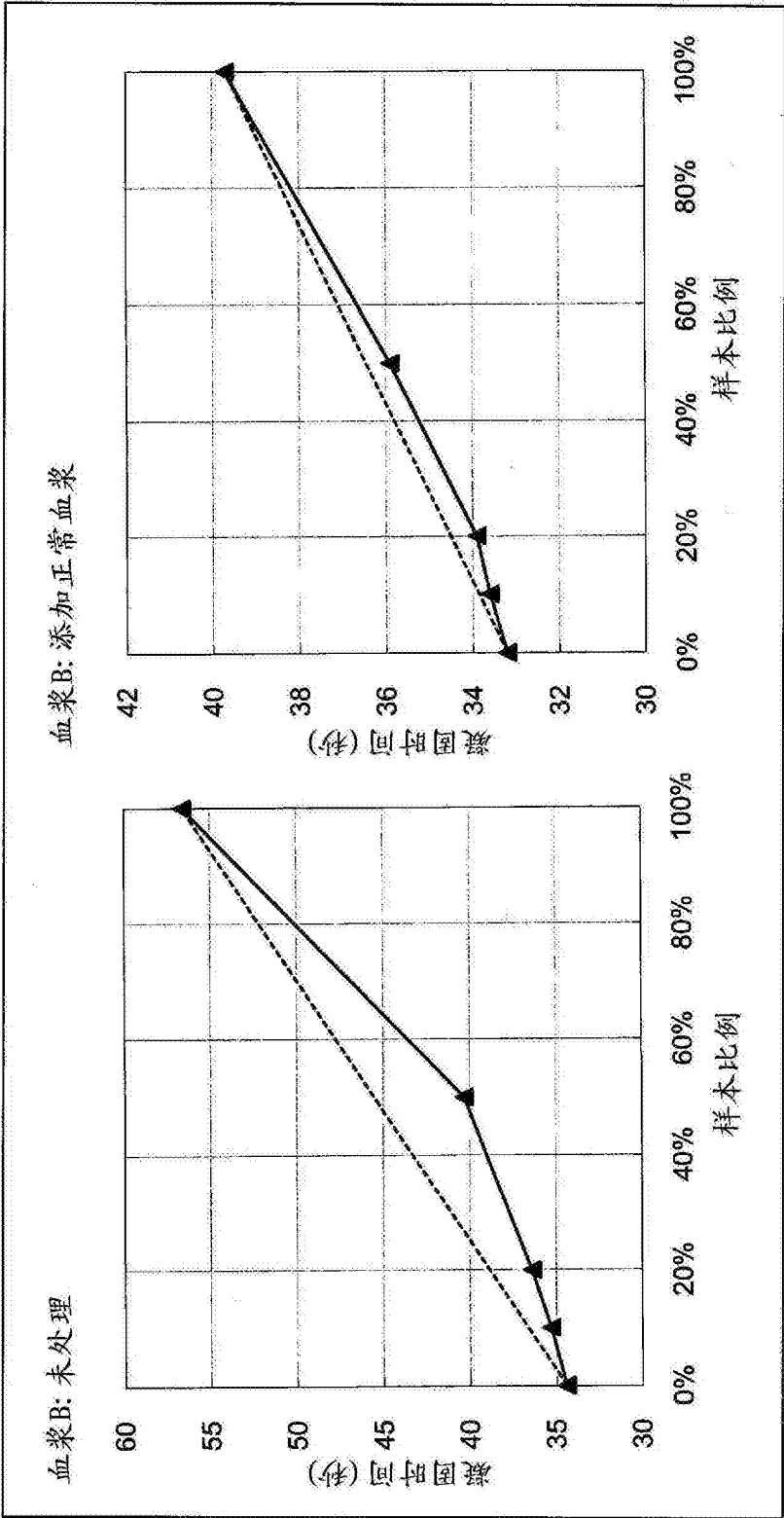


图3

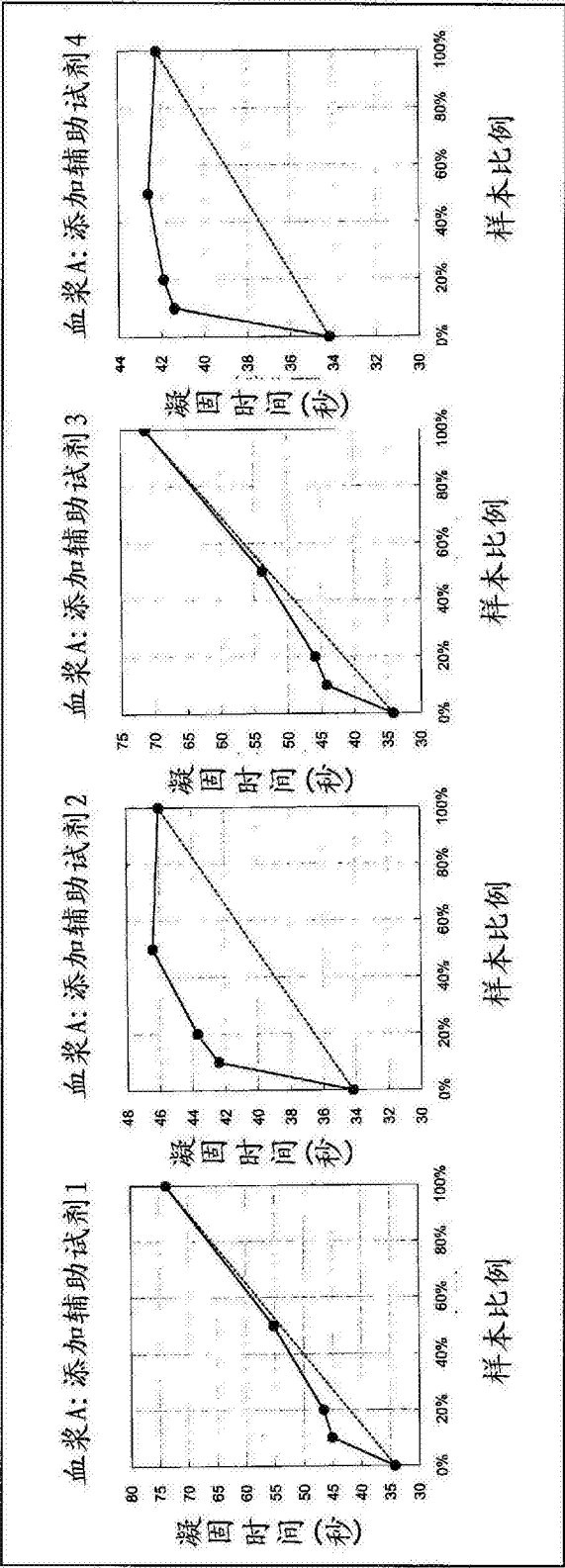


图4

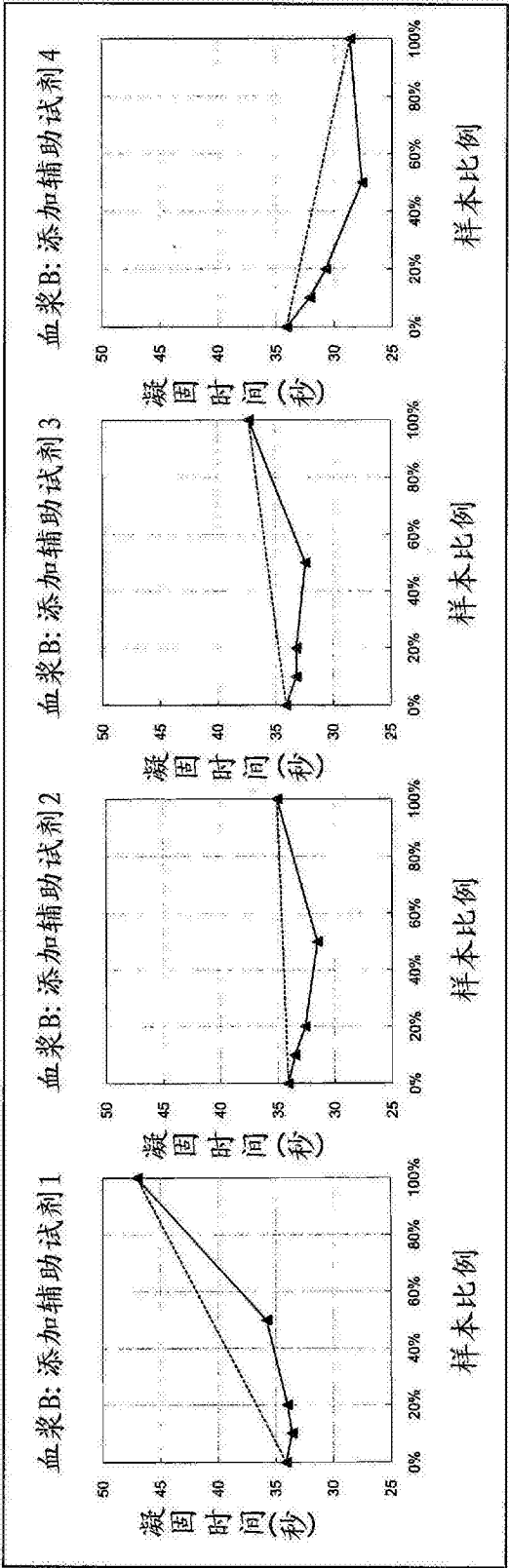


图5