

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2010年11月25日(25.11.2010)

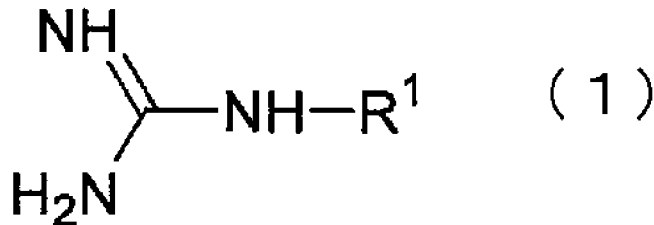
PCT

(10) 国際公開番号
WO 2010/134345 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 33/86 (2006.01) C12Q 1/56 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2010/003401
- (22) 国際出願日: 2010年5月20日(20.05.2010)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2009-121834 2009年5月20日(20.05.2009) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 積水メディカル株式会社(SEKISUI MEDICAL CO., LTD.) [JP/JP]; 〒1030027 東京都中央区日本橋三丁目13番5号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者; および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 森川 千鶴 (MORIKAWA, Chizuru) [JP/JP]; 〒3010852 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内 Ibaraki (JP). 中村 レミ (NAKAMURA, Remi) [JP/JP]; 〒3010852 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内 Ibaraki (JP). 山本 光章 (YAMAMOTO, Mitsuaki) [JP/JP]; 〒3010852 茨城県龍ヶ崎市向陽台三丁目3-1 積水メディカル株式会社つくば研究所内 Ibaraki (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人アルガ特許事務所 (THE PATENT CORPORATE BODY ARUGA PATENT OFFICE); 〒1030013 東京都中央区日本橋人形町1丁目3番8号 沢の鶴人形町ビル Tokyo (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

(54) Title: BLOOD COAGULATION TIME PROLONGING AGENT

(54) 発明の名称: 血液凝固時間延長剤



(57) Abstract: Disclosed is a reagent which can prolong a blood coagulation time satisfactorily, can enhance optical changes, and enables the accurate and high-sensitive test on blood coagulation capability. Specifically disclosed is a blood coagulation time prolonging agent comprising a guanidine compound represented by formula (1) (wherein R¹ represents a hydrogen atom, an amino group, or an alkyl group which may have a substituent) or an acid addition salt thereof as an active ingredient.

(57) 要約: 血液凝固時間を十分に延長し、かつ光学的変化を増強させ、血液凝固能検査を正確かつ高感度に行うことができる試薬を提供する。本発明は、次式(1) (式中、R¹は水素原子、アミノ基又は置換基を有してもよいアルキル基を示す)で表されるグアニジン化合物又はその酸付加塩を有効成分とする血液凝固時間延長剤を提供する。



WO 2010/134345 A1

明 細 書

発明の名称： 血液凝固時間延長剤

技術分野

[0001] 本発明は、フィブリノゲン測定試薬に代表される血液凝固能測定試薬、すなわち血液凝固活性化剤含有試薬及び／又は血液凝固能測定用検体希釈液に用いられる血液凝固時間延長剤、並びにこれを用いた血液凝固能測定試薬に関する。

背景技術

[0002] 血液凝固の機序は、一般的に２つの系に大別される。１つは、血液凝固第ⅩⅠⅠ因子の異物との接触活性化に始まり、多段の反応を経て最終的にトロンビンを生成する内因系、もう１つは、血液凝固第ⅤⅠⅠ因子と組織トロンボプラスチンによる血液凝固第Ⅹ因子の活性化に始まり、同じくトロンビンを生成する外因系である（図１）。いずれの系も最終的には、生成したトロンビンの働きでフィブリノゲンがフィブリンに転化することにより凝固が起こる。こうした血液凝固機序について、異常の有無、又は異常の原因を明らかにするため、血液凝固活性化剤を用いたいくつかの血液凝固能検査があり、臨床検査の現場で広く用いられている。

[0003] 血液凝固活性化剤及びそれを使用した血液凝固能検査には次のようなものがある。

１）トロンビンを使用した血液凝固能検査

フィブリノゲン測定、ＡＴⅠⅠⅠ測定、トロンビン時間測定

２）組織トロンボプラスチンを使用した血液凝固能検査

プロトロンビン時間測定、プロトロンビン時間を用いたⅠⅠ、Ⅴ、ⅤⅠⅠ、Ⅹ因子の活性測定、複合因子測定（トロンボテスト・ヘパプラスチンテスト等）

３）リン脂質を使用した血液凝固能検査

部分トロンボプラスチン時間測定、活性化部分トロンボプラスチン時間

測定、活性化部分トロンボプラスチン時間測定を用いたV I I I、I X、X I、X I I因子、プレカリクレイン、高分子キニノゲンの活性測定、蛇毒時間測定、蛇毒時間測定を用いたX因子の定量、希釈蛇毒時間測定を用いたループスアンチコアグラント（L A）測定、プロテインC活性測定、トロンボプラスチン生成試験

上記1）～3）のいずれの検査においても、患者検体に血液凝固活性化剤等を含む試薬を混合することによる凝固の惹起から最終的にフィブリノゲンがフィブリンに転化し析出するまでの時間を測定する。

[0004] 血液凝固能検査における凝固の検出方法は、力学的検出法と光学的検出法に大別できる。力学的検出法とは反応液中に投入した磁性物等を、磁力等によりモニターし、凝固によって粘性が高くなり磁性物の動きが鈍くなるのを検出する方法である。光学的検出法とは凝固によって反応液が白く濁るのを透過光あるいは散乱光の変化量として検出する方法であり、比較的簡便であることから最も広範に利用されている。これらは、現在では一般的に自動化装置により検出されている。散乱光検出法で得られる散乱光の強度変化曲線の一例を図2に示す。図中、A点は血液凝固活性化剤を含む試薬を混合することにより凝固が惹起された点を示し、その後多段の反応を経てフィブリン析出が開始することにより、B点以降、散乱光強度の変化が現れる。次々にフィブリノゲンが消費され、反応液中でほぼ枯渇すると散乱光強度の変化は無くなり、C点のごとく曲線は平坦になり、凝固は終了する。このような散乱光の強度変化曲線を元に、公知の算出パラメータにより凝固時間が算出される（特許文献1）。ここで、散乱光の強度変化量の極大値を ΔH とすると、 ΔH が大きい方が、凝固検出が鋭敏となり、より正確な検出が可能となることは自明である。それ故使用される血液凝固能測定試薬は光学的変化量が大きく表示されるような特性を持つものが望ましい。しかし、A点からC点までの変化があまりに短時間に起こる場合、精度良く凝固時間を測定することができない。そこで通常、凝固時間を延長させる物質を添加して、凝固時間が所望の長さになるよう調節する。血液凝固時間延長剤として、特許文献

2では塩化ナトリウムを初めとするアルカリ金属又はアルカリ土類金属のハロゲン化物塩が、特許文献3ではプロピオン酸ナトリウムが例示されている。しかしこのような従来の血液凝固時間延長剤は、同時に添加量依存的に ΔH を減少させる負の効果が大きいことが問題となっていた。

[0005] これら従来法の問題点を解決する目的で、ポリエチレングリコール、ポリビニルアルコール、高分子多糖などの高分子物質を添加した試薬を用いる方法が提案されている（特許文献4及び5）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：特開平8－15263号公報
特許文献2：特許2994557号公報
特許文献3：特許3330685号公報
特許文献4：特許3074611号公報
特許文献5：特開平5－60763号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] しかしながら、試薬に高分子物質を添加する方法は、試薬自体の粘性を高めてしまい、ピペットや試薬プローブによる試薬分取精度が低下するという問題、未凝固と凝固時の濁度差が十分に得られず、十分な光学的变化の増強が得られないという問題があった。

従って本発明の課題は、血液凝固時間を所望の時間に延長し、かつ光学的变化を増強させるような組成の試薬を提供することにある。このことによって、血液凝固能検査の正確性向上に寄与することができる。

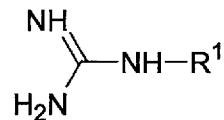
課題を解決するための手段

[0008] そこで本発明者は、種々の化合物を用いて光学的变化を増強させる血液凝固時間延長剤を探索してきたところ、特定の構造を有するグアニジン化合物又はその塩が、血液凝固時間の延長作用に加えて、凝固時の光学的变化を増

強させる作用を有し、これを血液凝固能測定試薬の添加剤として用いれば、血液凝固能が正確かつ高感度で測定できることを見出し、本発明を完成した。

[0009] すなわち、本発明は、次式（１）

[0010] [化1]



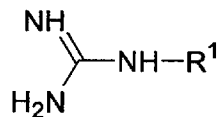
[0011] （式中、R¹は水素原子、アミノ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す）で表されるグアニジン化合物又はその酸付加塩を有効成分とする血液凝固時間延長剤を提供するものである。

[0012] また、本発明は、上記の血液凝固時間延長剤を含有することを特徴とする血液凝固活性化剤含有試薬又は血液凝固能測定用検体希釈液を提供するものである。

[0013] さらに、本発明は、上記の血液凝固時間延長剤を含有し、血液凝固活性化剤がトロンビンであることを特徴とするフィブリノゲン測定用血液凝固活性化剤含有試薬又はフィブリノゲン測定用検体希釈液を提供するものである。

[0014] また一態様において、本発明は、血液凝固時間を延長させるための、次式（１）

[化2]



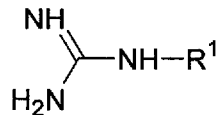
（式中、R¹は水素原子、アミノ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す）で表されるグアニジン化合物又はその酸付加塩の使用を提供するものである。

一実施形態において、上記グアニジン化合物又はその酸付加塩は、血液凝固活性化剤とともに使用される。別の実施形態において、上記グアニジン化

合物又はその酸付加塩は、血液凝固能測定用検体希釈液とともに使用される。

[0015] また一態様において、本発明は、血漿検体に、次式（１）

[化3]



（式中、 R^1 は水素原子、アミノ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す）で表されるグアニジン化合物又はその酸付加塩を添加することを含む、血液凝固時間を延長する方法を提供するものである。

一実施形態において、上記グアニジン化合物又はその酸付加塩は、血液凝固能測定用検体希釈液とともに添加される。別の実施形態において、上記グアニジン化合物又はその酸付加塩は、血液凝固活性化剤とともに添加される。

[0016] また一態様において、本発明は、血漿検体と、血液凝固活性化剤と、上記グアニジン化合物又はその酸付加塩とを含有する反応液を調製する工程；及び、反応液の凝固時間を測定する工程を含む、血液凝固能測定方法を提供するものである。

また一態様において、本発明は、当該血漿検体を用いた凝固時間の測定値と、当該血漿検体の代わりに希釈標準液を用いて同様に凝固時間を測定して得られた測定値とを比較することによる、血漿検体中のフィブリノゲン濃度を求める方法を提供するものである。

発明の効果

[0017] 本発明の血液凝固時間延長剤を用いれば、光学的変化が増強されるため、フィブリノゲン測定、PT、APTT等の血液凝固能が、正確に測定できる。

図面の簡単な説明

[0018] [図1]臨床検査における血液凝固の機序を模式的に示す。

[図2] 血液凝固能測定の際、散乱光検出法で得られる散乱光強度変化曲線の一例を示す。

[図3] 各化合物の添加量と凝固時間の関係を示す。

[図4] 各化合物の添加によって凝固時間を調整したときの、凝固時間と散乱光強度変化量極大値の関係を示す。

[図5] 従来法試薬と本発明試薬による散乱光強度変化曲線を示す。

発明を実施するための形態

[0019] 本発明の血液凝固時間延長剤は、前記式（１）で表される化合物又はその塩を有効成分とするものである。式（１）中、 R^1 は、水素原子、アミノ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す。ここで、アルキル基としては、炭素数１～６のアルキル基が好ましく、特に炭素数２～５のアルキル基が好ましい。当該アルキル基に置換し得る基としては、カルボキシ基、アルコキシカルボニル基、アミノ基が挙げられ、カルボキシ基とアミノ基の両者、又はアルコキシカルボニル基とアミノ基の両者が置換している場合が好ましい。

[0020] 式（１）で表される化合物の具体例としては、グアニジン、アミノグアニジン、アルギニン、アルギニンアルキルエステルが挙げられ、このうち、光学的変化増強作用が大きく、正確な測定ができる点でアミノグアニジンが特に好ましい。また式（１）の化合物の酸付加塩としては、塩酸塩、硫酸塩、硝酸塩、リン酸塩、スルファミン酸塩等が挙げられる。

[0021] 本発明の血液凝固時間延長剤は、血液凝固時間を延長させるだけでなく、血液凝固能測定における反応液の濁度変化を増強させる作用を有する。このことは、血液凝固の最終産物であるフィブリン網の形成状態がより強固となることを示している。従って、本発明の血液凝固時間延長剤は、濁度変化を直接検出する光学的検出法、フィブリン網の形成状態を磁性物等でモニターする力学的検出法等に使用でき、光学的検出法に使用するのが好ましい。ここで、光学的検出法には散乱光量検出法と透過光量検出法があるが、散乱光量検出法に使用するのが好ましい。

[0022] 本発明の血液凝固時間延長剤を適用することができる血液凝固能検査は、患者検体に血液凝固活性化剤等を含む試薬を混合することによる凝固の惹起から最終的にフィブリノゲンがフィブリンに転化し析出するまでの時間を測定するものであればよい。例としては、フィブリノゲン測定、A T I I I 測定、トロンビン時間測定、プロトロンビン時間測定、プロトロンビン時間を用いた I I、V、V I I、X 因子の活性測定、複合因子測定（トロンボテスト・ヘパプラスチンテスト等）、部分トロンボプラスチン時間測定、活性化部分トロンボプラスチン時間測定、活性化部分トロンボプラスチン時間測定を用いた V I I I、I X、X I、X I I 因子、プレカリクレイン、高分子キニノゲンの活性測定、蛇毒時間測定、蛇毒時間測定を用いた X 因子の定量、希釈蛇毒時間測定を用いたループスアンチコアグラント（L A）測定、プロテイン C 活性測定、トロンボプラスチン生成試験、その他凝固異常検出等が挙げられる。

[0023] 上記血液凝固能検査の測定は、検体に、血液凝固活性化剤含有試薬（例えば、フィブリノゲン測定においてはトロンビン含有試薬）を添加し、フィブリンが析出するまでの時間を測定するものである。検体は、必要に応じて検体希釈液で適宜希釈される。本発明の血液凝固時間延長剤は、測定系に含まれていればよく、血液凝固活性化剤含有試薬に含有させてもよいし、検体希釈液に含有させてもよい。すなわち、本発明の血液凝固時間延長剤は、例えばフィブリノゲン測定においては、トロンビン含有試薬に含有させてもよいし、検体希釈液に含有させてもよい。

上記血液凝固活性化剤含有試薬は、上記血液凝固能検査に使用されるものであればよい。例えば、トロンビン含有試薬、組織トロンボプラスチン含有試薬、リン脂質含有試薬等が挙げられる。また、上記検体希釈液は、上記血液凝固能検査に使用されるものであればよい。例えば、MES、B i s - T r i s、ADA、P I P E S、A C E S、M O P S O、B E S、M O P S、T E S、H E P E S、D I P S O、T A P S O、P O P S O、H E P P S O、E P P S、T r i c i n e、B i c i n e、T A P S、C H E S などのグ

ッド緩衝液、クエン酸緩衝液、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、イミダゾール緩衝液、バルビタール緩衝液、生理食塩液、水等を挙げることができる。

[0024] 本発明の血液凝固時間延長剤は、血液凝固検査において精度良く測定可能な凝固時間が得られるように反応液中に含有させることが好ましい。例えば、フィブリノゲン測定の場合、正常血漿（濃度約300mg/dL）を測定したとき、5～50秒、好ましくは7～20秒、さらに好ましくは9～15秒の凝固時間が得られるように反応液中に含有させることが好ましい。血液凝固時間延長剤としてアミノグアニジンを用いる場合は、フィブリノゲン測定の反応液中の濃度、すなわち検体・検体希釈液・トロンビン含有試薬の混合液中の濃度は、10～500mM、好ましくは20～200mM、さらに好ましくは30～120mMである。検体希釈液中に含有させる場合検体希釈液中の濃度は、10～900mM、好ましくは30～400mM、さらに好ましくは、50～200mMである。

プロトロンビン時間測定の場合、正常血漿（活性約100%）を測定したとき、9～60秒、好ましくは9～30秒、さらに好ましくは10～16秒の凝固時間が得られるように反応液中に含有させることが好ましい。活性化部分トロンボプラスチン時間測定においては正常血漿を測定したとき、15～80秒、好ましくは15～60秒、さらに好ましくは20～50秒の凝固時間が得られるように反応液中に含有させることが好ましい。その他の血液凝固能検査に関しても、測定方法に適した凝固時間が得られるように反応液中に含有させればよい。

[0025] 血液凝固能検査に用いる検体希釈液及び血液凝固活性化剤含有試薬を含む血液凝固能測定試薬には、本発明の血液凝固時間延長剤以外に、公知の高分子多糖類、及び合成高分子類を含有することができる。

[0026] 高分子多糖類の具体例としては、デキストラン40、デキストラン70、デキストラン200000、デキストラン500000等のデキストラン、フィコール等を例示することができる。また、これら高分子多糖類は1種もしくは2種以上を組み合わせ用いることができる。これら高分子多糖類の

添加量は、前記血液凝固能測定試薬中の濃度が0.01～10W/V%であることが好適で、より好ましくは0.1～5W/V%である。

合成高分子類の具体例としては、ポリビニルアルコール500、ポリビニルアルコール1500、ポリビニルアルコール2000等のポリビニルアルコール、ポリエチレングリコール1500、ポリエチレングリコール2000、ポリエチレングリコール4000、ポリエチレングリコール6000、ポリエチレングリコール8000、ポリエチレングリコール20000等のポリエチレングリコール及びポリビニルピロリドン等を挙げることができる。これら合成高分子類は1種もしくは2種以上を組み合わせる用いることができる。これら合成高分子類の添加量は、特に限定されないが、前記血液凝固能測定試薬中の濃度が0.01～10W/V%であることが好適で、より好ましくは0.1～5W/V%である。

[0027] 前記血液凝固能測定試薬には、本発明の血液凝固時間延長剤以外にも緩衝剤、カルシウムイオン、抗凝固薬のアンタゴニスト等を含有することもできる。

[0028] 緩衝剤の具体例としては、pH4～9の範囲に緩衝能をもつ緩衝剤を適宜選択して用いる。例えば、MES、Bis-Tris、ADA、PIPES、ACES、MOPSO、BES、MOPS、TES、HEPES、DIPSO、TAPSO、POPSO、HEPPSO、EPPS、Tricine、Bicine、TAPS、CHESなどのグッド緩衝剤、クエン酸、リン酸、酢酸、イミダゾール、バルビタール、GTA等から1種もしくは2種以上を組み合わせる選択し用いることができる。これら緩衝剤の添加量は、緩衝能を有する量であれば特に限定されないが、前記血液凝固能測定試薬中の濃度が1～1000mMであることが好適で、より好ましくは5～500mMである。

[0029] カルシウムイオンとしては、塩化カルシウム、乳酸カルシウム、グルコン酸カルシウム、グルクロン酸カルシウム、酒石酸カルシウム等の水溶性のカルシウム化合物が用いられる。これらカルシウム化合物は1種又は2種以上

を組み合わせ使用することができる。カルシウム化合物の使用量は、凝固反応を補助できる量であれば良く、特に限定されないが、前記血液凝固能測定試薬中の濃度が5 mM～100 mMであることが好適で、より好ましくは10 mM～50 mMである。

[0030] 抗凝固剤のアンタゴニストとしては、プロタミン、ポリブレン (Polybrene) (ヘキサジメトリンブロマイド) 等が用いられる。これら抗凝固剤のアンタゴニストは1種又は2種以上を組み合わせ使用することができる。抗凝固剤のアンタゴニストの使用量は、検体血漿に含まれる抗凝固剤、例えばヘパリン等を十分に中和できる量であれば良く、特に限定されないが、前記血液凝固能測定試薬中の濃度が 10^{-5} ～ 10^{-2} W/V%であることが好適で、より好ましくは 5×10^{-4} ～ 5×10^{-3} W/V%である。

[0031] また、前記血液凝固能測定試薬は液状品、凍結品又は乾燥品であってもよく、さらに乾燥品は精製水又は緩衝液を添加することにより溶解される。

また前記血液凝固能測定試薬には適当な防腐剤を添加してもよい。防腐剤としては、シプロフロキサシン、プロピオン酸、安息香酸ナトリウム、アジ化ナトリウム、プロクリン300等の中から1種もしくは2種以上を組み合わせ選択し用いることができる。また、必要に応じて塩化ナトリウム等の塩や、アミノ酸、糖等の一般的な安定化剤等を含ませてもよい。

上記に記載の濃度は、溶液品中の濃度を記載しているが、乾燥品等は使用時に水又は緩衝液等で溶解したときの濃度を記載している。

[0032] 本発明の血液凝固能測定試薬を用いて血液凝固能を測定するには、常法に従えばよい。フィブリノゲン測定を例にとれば、標準液を検体希釈液で5倍、10倍、20倍に希釈する（希釈倍率は適宜調整することが可能である）。次に各希釈標準液2容を37℃で3分間加温し、予め37℃に加温したトロンビン試薬1容を加え、凝固時間を測定する。次に各々の希釈標準液の測定値をグラフにプロットする。血漿検体を検体希釈液で10倍希釈し（希釈倍率は適宜調整することが可能である）、希釈検体を同様に測定し、得られた凝固時間をもとに、グラフから濃度を求めることができる。

実施例

[0033] 以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳細に説明するが、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

[0034] 実施例 1

(1) 凝固時間延長作用の確認

トロンビン時間法で血漿検体中のフィブリノゲン濃度を測定する場合、一般的にトロンビンを血漿に添加して凝固時間を測定し、フィブリノゲン濃度既知の標準液による検量線から濃度を求める。手順としては、検体血漿 10 μ L に対して 90 μ L の検体希釈液を添加・混合した後、血液凝固活性化剤含有試薬として 50 μ L のトロンビン含有試薬を添加し、凝固時間を測定する。

[0035] 本実施例では、血漿検体として市販正常血漿（コアグトロール N、Sysmex 社製）を、トロンビン含有試薬としてコアグピア Fbg トロンビン試薬（積水メディカル社製）を、また凝固時間測定装置として全自動血液凝固時間分析装置 コアグレックス 800（Sysmex 社製）を使用した。本機器は、散乱光検出法を採用しており、凝固時間とともに、散乱光強度の経時変化データをも取得することができる。

[0036] 検体希釈液として、HEPES 緩衝液（pH 7.5）を用いた場合、市販正常血漿は数秒で凝固した（4.6 秒）。血液凝固時間延長剤として、アミノグアニジン塩酸塩を HEPES 緩衝液（pH 7.5）に添加すると、従来法である塩化ナトリウム及び臭化ナトリウムと同様に、添加濃度依存的に凝固時間が延長した（図 3 に結果を示す）。すなわち、本発明は従来法と同等の凝固時間延長作用を有することが分かる。

[0037] (2) 光強度変化量の確認

散乱光強度変化量の極大値を ΔH として算出し、凝固時間との関係を図 4 に示した。凝固時間が延長するのに伴い、従来法である塩化ナトリウム及び臭化ナトリウムでは ΔH が著しく低下するのに対し、本発明では ΔH は大きいまま維持された。すなわち、同程度の凝固時間で比較すると、従来法に比

べ本発明のほうで散乱光強度の変化量が増大し、凝固時間をより正確に測定できることが分かる。

[0038] 実施例 2

同程度の凝固時間が得られるように、血液凝固時間延長剤の添加濃度を調節した検体希釈液（H E P E S 緩衝液 p H 7 . 5）を用いて、実施例 1 と同様に正常市販血漿を測定した。従来法と本発明の散乱光強度変化量極大値の ΔH と、測定の同時再現性の比較結果を、表 1 に示した。従来法と比較して、本発明の血液凝固時間延長剤、すなわちアルギニン塩酸塩、アルギニンメチルエステル、グアニジン塩酸塩、グアニジンリン酸塩、グアニジンスルファミン酸塩、アミノグアニジン塩酸塩が ΔH を飛躍的に向上させ、さらに測定の精度（同時再現性等）についても向上させていることがわかる。また、測定の精度（同時再現性等）向上効果については、アミノグアニジン塩酸塩が特に優れていることが判明した。

[0039]

[表1]

		ΔH	凝固時間	測定値の変動係数
従来法①	塩化ナトリウム:145mM	2348	10.7	4.47%
従来法②	臭化ナトリウム:110mM	2174	11.3	*
従来法③	臭化カリウム:105mM	2127	11.4	*
従来法④	塩化カリウム:135mM	2170	10.8	*
従来法⑤	塩化リチウム:135mM	2305	10.8	*
本発明の方法①	グアニジン塩酸塩:90mM	4575	10.3	3.39%
本発明の方法②	グアニジンリン酸塩:30mM	4217	10.4	2.36%
本発明の方法③	グアニジンスルファミン酸塩:55mM	5167	11.2	3.29%
本発明の方法④	アミノグアニジン塩酸塩:90mM	3480	9.7	1.94%
本発明の方法⑤	アルギニン塩酸塩:55mM	3529	10.3	2.77%
本発明の方法⑥	アルギニンメチルエステル:17mM	6130	11.0	3.22%

従来法②～⑤は1重測定、他は10重測定
*算出不能

[0040] 実施例 3

血液凝固時間延長剤として塩化ナトリウムを含む検体希釈液を従来法 A、従来法 A に、更に光強度変化量増強剤としてポリエチレングリコール（分子量 20000）（以下、PEG20000 という）を含有させた検体希釈液を従来法 B とし、血液凝固時間延長剤と光強度変化量増強剤を兼ねたアミノグアニジン塩酸塩（本発明）を採用した検体希釈液と比較した。なお、いずれの場合も緩衝液としては HEPES 緩衝液（pH 7.5）を用いた。また、従来法 B では、PEG20000 の添加量が多いと粘性が高まり、分取精度が低下するおそれがあることから、添加濃度は 0.1% とした。それぞれの検体希釈液を使用して、実施例 1 と同様に市販正常血漿の凝固時間を測定した結果、図 5 に示すような散乱光の強度変化曲線を得た。また、凝固時間

と ΔH を表2に示した。PEG20000を添加した従来法Bでは、添加しなかった従来法Aに比べ、散乱光強度の変化量が大きくなったが、本発明の採用により散乱光強度変化量はさらに飛躍的に向上し、凝固時間をより正確に測定できることが分かる。

[0041] [表2]

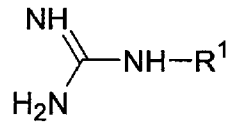
	従来法 A	従来法 B	本発明
凝固時間延長剤	NaCl 150mM	NaCl 150mM	アミノグアニジン 塩酸塩 90mM
光強度変化量増強剤	-	PEG20000 0.1%	
凝固時間	11.6秒	10.4秒	10.4秒
光強度変化量 ΔH	2194	2244	3444

3重測定の平均値

請求の範囲

[請求項1] 次式（１）

[化1]



（式中、 R^1 は水素原子、アミノ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す）で表されるグアニジン化合物又はその酸付加塩を有効成分とする血液凝固時間延長剤。

[請求項2] フィブリノゲン測定用血液凝固時間延長剤である請求項１記載の血液凝固時間延長剤。

[請求項3] R^1 が、水素原子、アミノ基、アルキル基、カルボキシル基とアミノ基が置換したアルキル基、又はアルコキシカルボニル基とアミノ基が置換したアルキル基である請求項１又は２記載の血液凝固時間延長剤。

[請求項4] 請求項１～３のいずれか１項記載の血液凝固時間延長剤を含有することを特徴とする血液凝固活性化剤含有試薬。

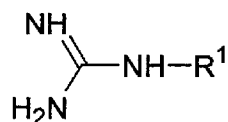
[請求項5] 血液凝固活性化剤がトロンビンであるフィブリノゲン測定用の請求項４記載の血液凝固活性化剤含有試薬。

[請求項6] 請求項１～３のいずれか１項記載の血液凝固時間延長剤を含有することを特徴とする血液凝固能測定用検体希釈液。

[請求項7] フィブリノゲン測定用検体希釈液である請求項６記載の血液凝固能測定用検体希釈液。

[請求項8] 血液凝固時間を延長させるための、次式（１）

[化2]



(式中、R¹は水素原子、アミノ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す)で表されるグアニジン化合物又はその酸付加塩の使用。

[請求項9] フィブリノゲン測定において血液凝固時間を延長させるための、請求項8記載の使用。

[請求項10] R¹が、水素原子、アミノ基、アルキル基、カルボキシル基とアミノ基が置換したアルキル基、又はアルコキシカルボニル基とアミノ基が置換したアルキル基である、請求項8又は9記載の使用。

[請求項11] 血液凝固活性化剤とともに使用される、請求項8～10のいずれか1項記載の使用。

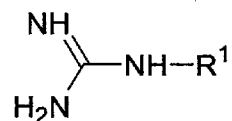
[請求項12] 血液凝固活性化剤がトロンビンである請求項11記載の使用。

[請求項13] 血液凝固能測定用検体希釈液とともに使用される、請求項8～10のいずれか1項記載の使用。

[請求項14] 検体希釈液がフィブリノゲン測定用検体希釈液である請求項13記載の使用。

[請求項15] 血漿検体に、次式(1)

[化3]



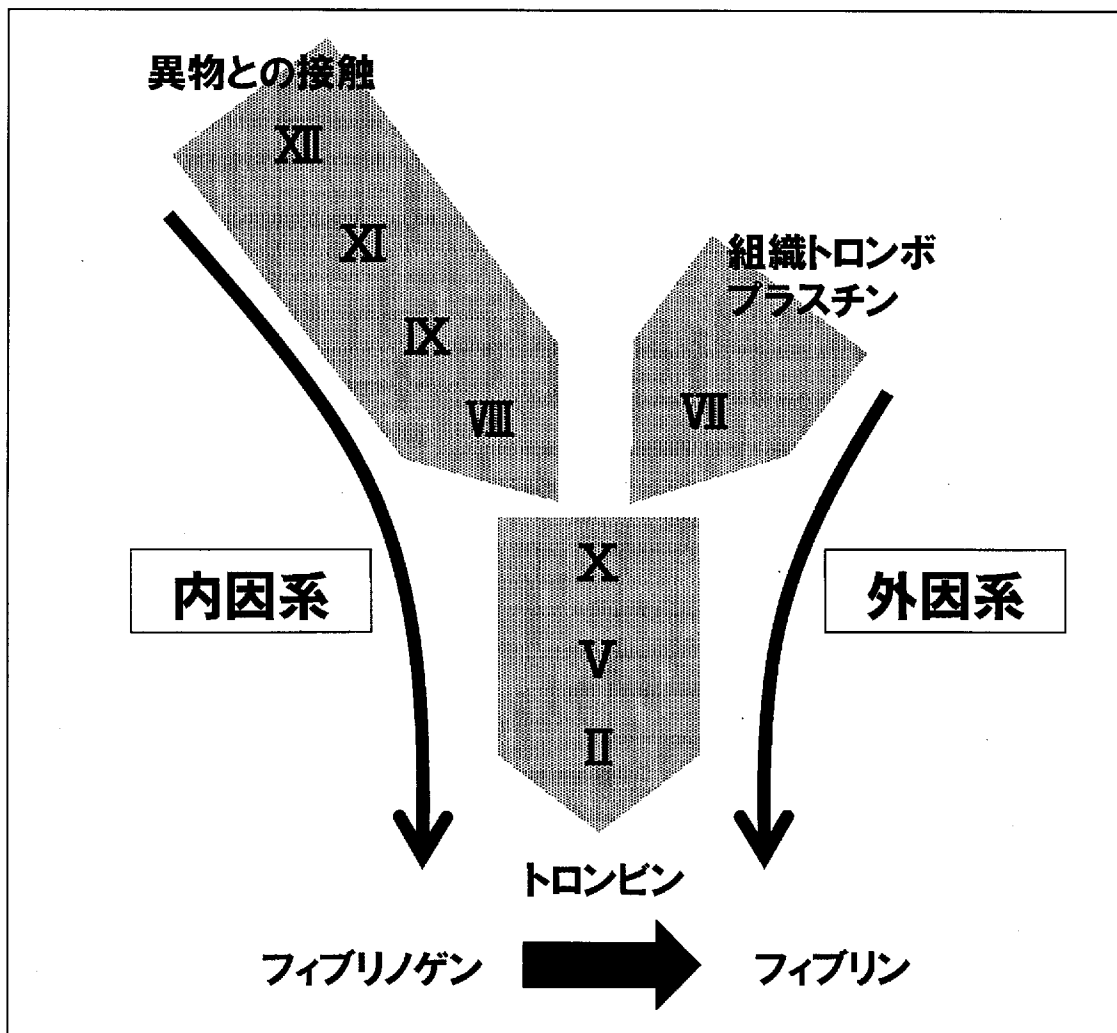
(式中、R¹は水素原子、アミノ基又は置換基を有していてもよいアルキル基を示す)で表されるグアニジン化合物又はその酸付加塩を添加することを含む、血液凝固時間を延長する方法。

[請求項16] R¹が、水素原子、アミノ基、アルキル基、カルボキシル基とアミノ基が置換したアルキル基、又はアルコキシカルボニル基とアミノ基が置換したアルキル基である、請求項15記載の方法。

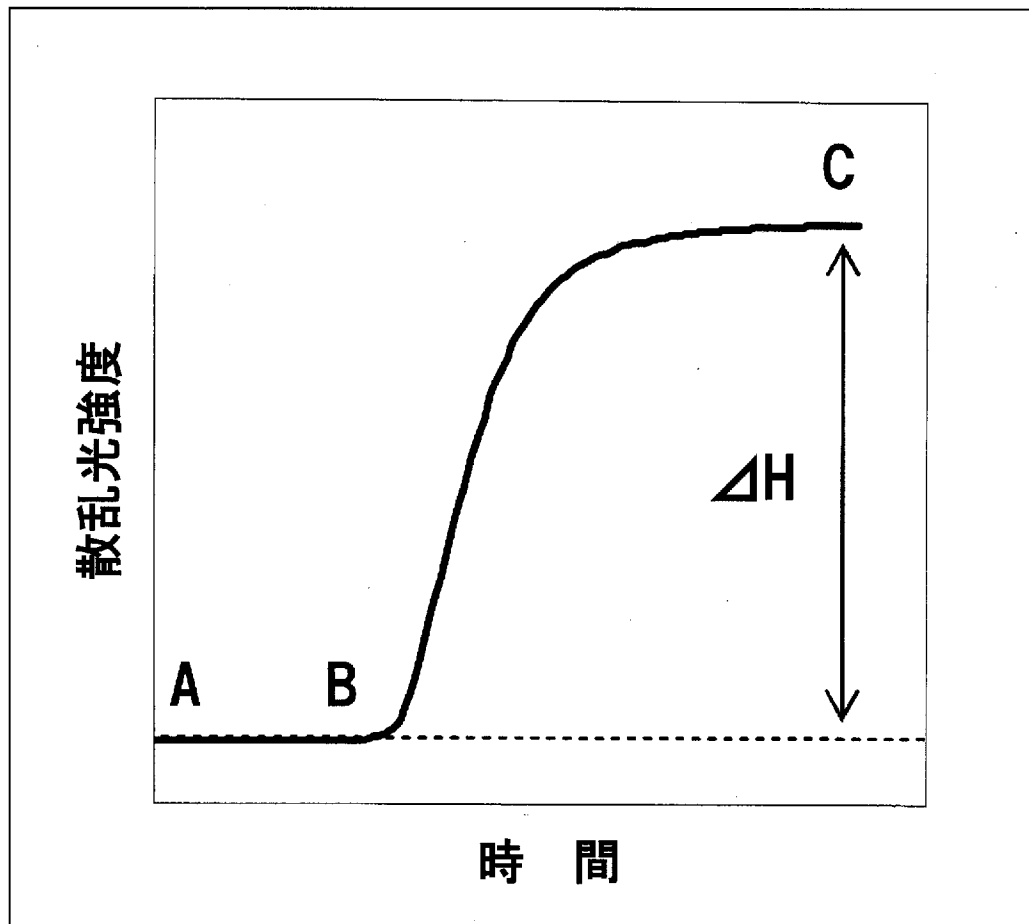
[請求項17] 前記グアニジン化合物又はその酸付加塩が血液凝固能測定用検体希釈液とともに添加される、請求項15記載の方法。

- [請求項18] 前記検体希釈液がフィブリノゲン測定用検体希釈液である請求項 17 記載の方法。
- [請求項19] 前記グアニジン化合物又はその酸付加塩が血液凝固活性化剤とともに添加される、請求項 15 記載の方法。
- [請求項20] 血液凝固活性化剤がトロンビン含有試薬である請求項 19 記載の方法。
- [請求項21] 下記工程を含む血液凝固能測定方法：
血漿検体と、血液凝固活性化剤と、請求項 15 記載のグアニジン化合物又はその酸付加塩とを含有する反応液を調製する工程；及び
反応液の凝固時間を測定する工程。

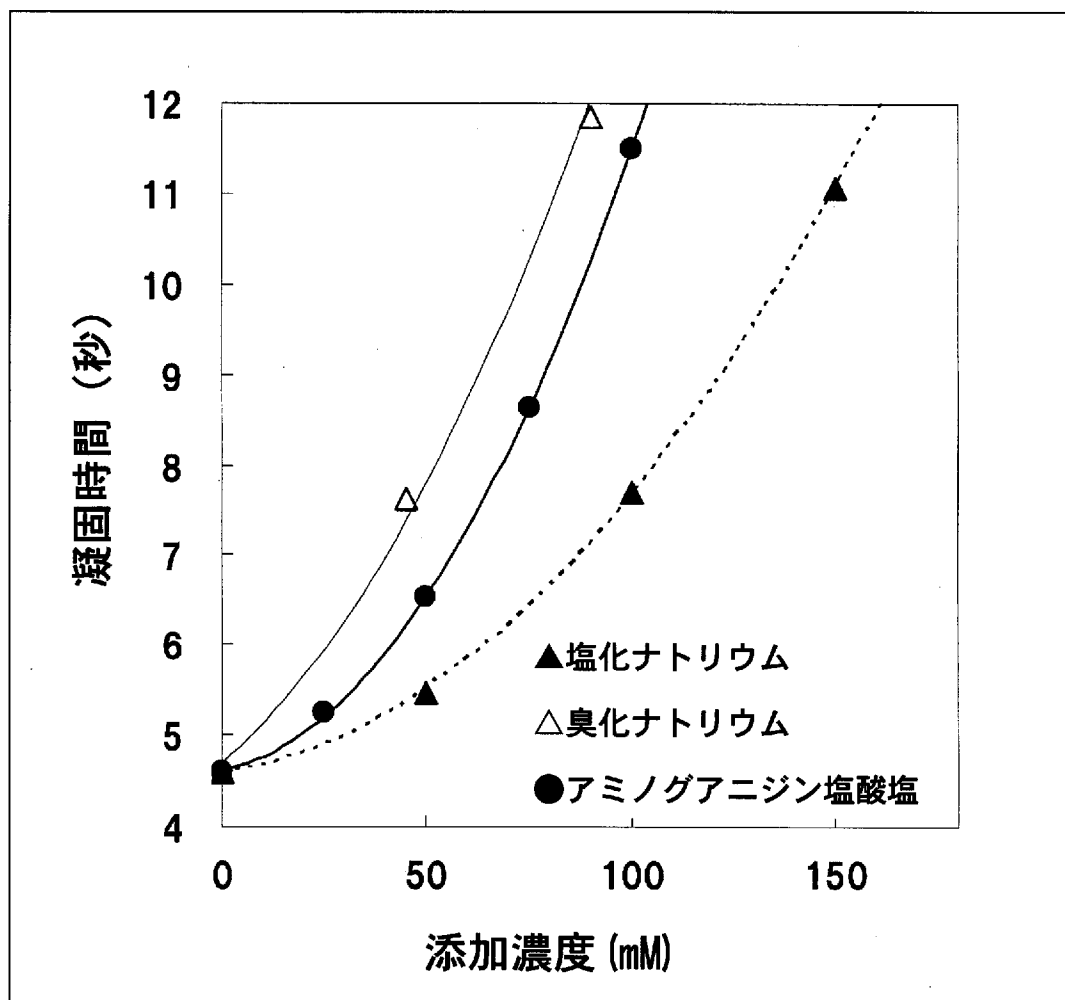
[図1]



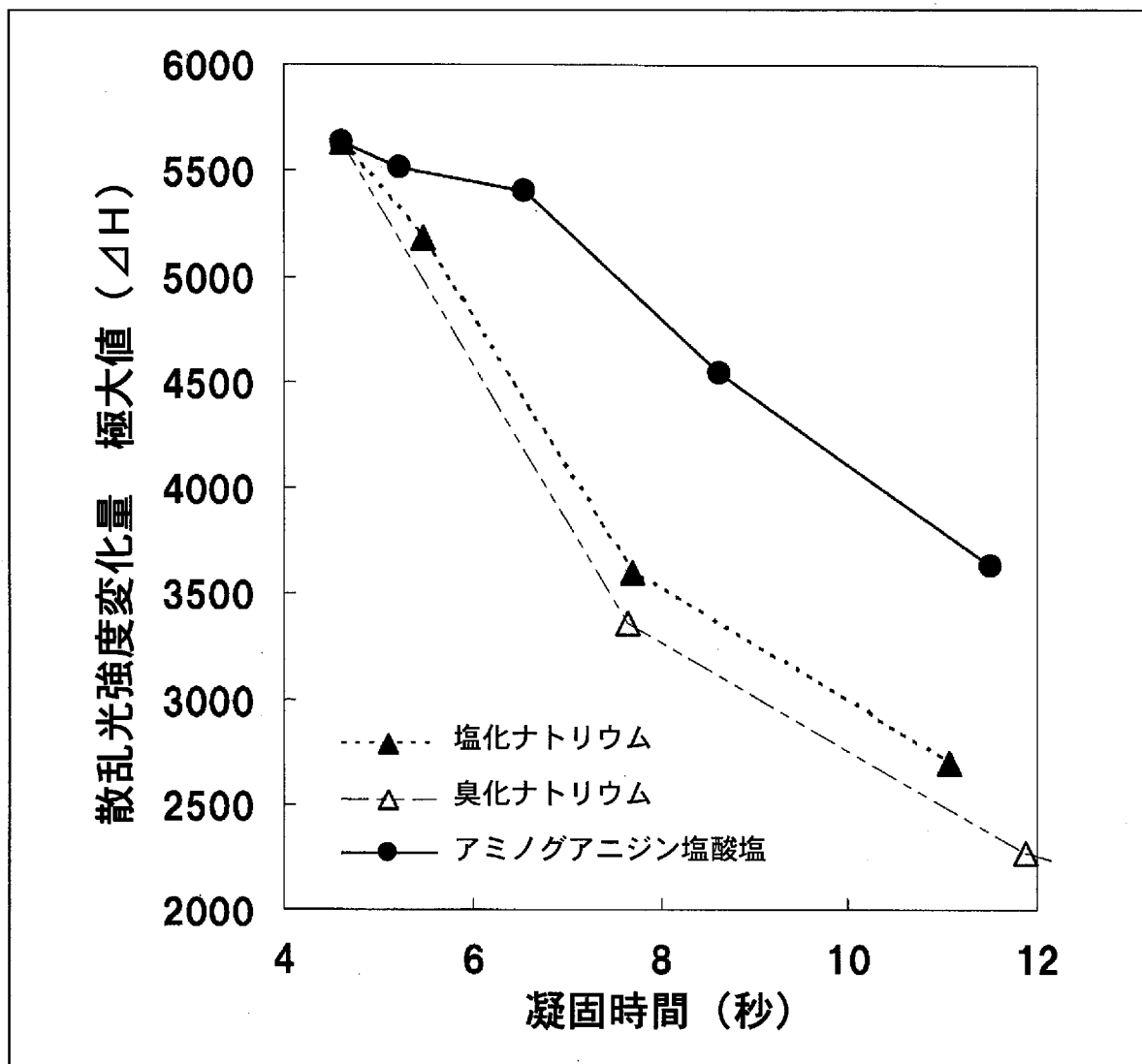
[図2]



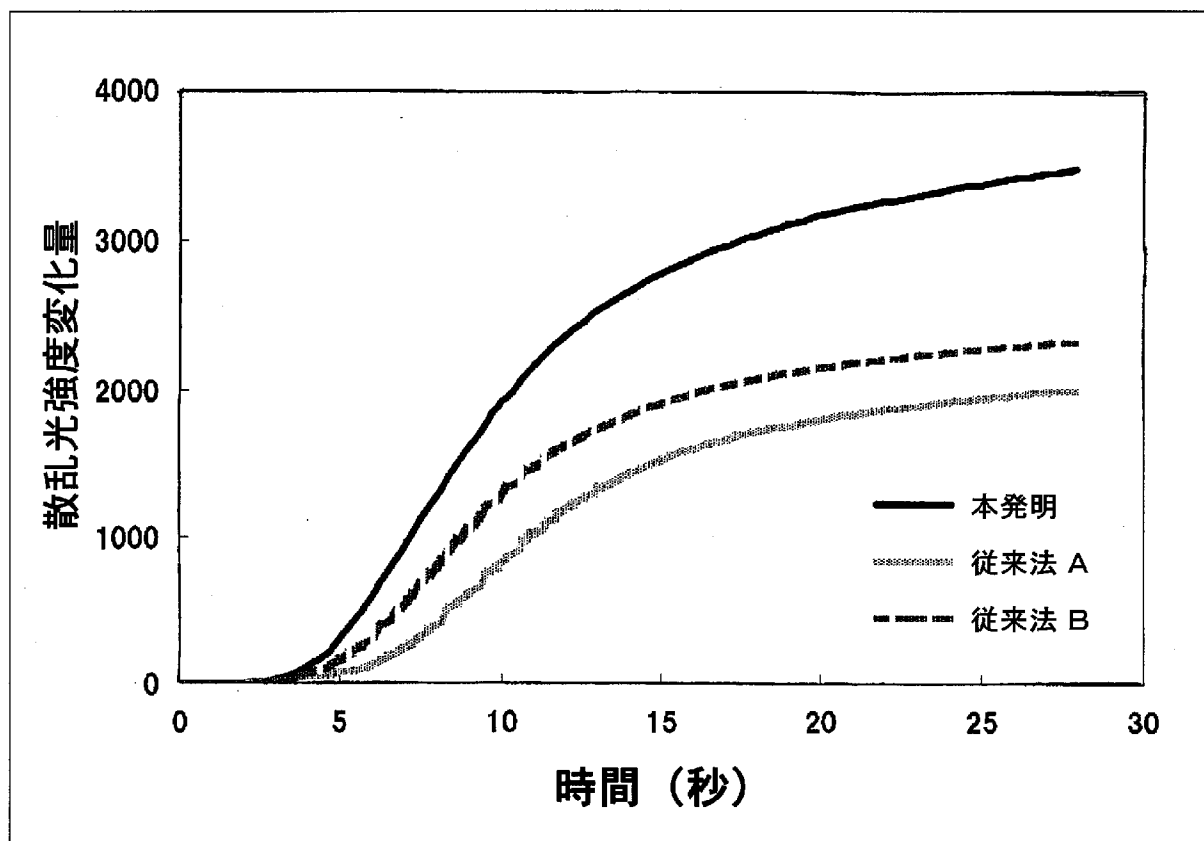
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2010/003401

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N33/86(2006.01) i, C12Q1/56(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, C12Q1/56

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	1996-2010
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2010	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2010

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	JP 2003-344418 A (F. Hoffmann-La Roche AG.), 03 December 2003 (03.12.2003), claim 5 & US 2004/0077092 A1 & EP 1363129 A1 & DE 10222234 A & CA 2428508 A & CA 2428508 A1	1-3, 8, 10 4-7, 9, 11-21
Y	JP 2994557 B2 (Azwel, Inc.), 27 December 1999 (27.12.1999), claim 1 & US 5851836 A & EP 699909 A2 & DE 69524161 D & DE 69524161 T	4-7, 9, 11-21
A	JP 2004-191367 A (Sysmex Corp.), 08 July 2004 (08.07.2004), claims 1, 3 & CN 1504580 A	1-21

☐ 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
02 June, 2010 (02.06.10)Date of mailing of the international search report
15 June, 2010 (15.06.10)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. G01N33/86(2006.01)i, C12Q1/56(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 (I P C))

Int.Cl. G01N33/86, C12Q1/56

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	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 0 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 0 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 0 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)

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
X Y	JP 2003-344418 A (エフ. ホフマンーラ ロシュ アーゲー) 2003. 12. 03, 【請求項 5】 & US 2004/0077092 A1 & EP 1363129 A1 & DE 10222234 A & CA 2428508 A & CA 2428508 A1	1-3, 8, 10 4-7, 9, 11-21
Y	JP 2994557 B2 (株式会社アズウェル) 1999. 12. 27, 【請求項 1】 & US 5851836 A & EP 699909 A2 & DE 69524161 D & DE 69524161 T	4-7, 9, 11-21
A	JP 2004-191367 A (シスメックス株式会社) 2004. 07. 08, 【請求項 1】【請求項 3】 & CN 1504580 A	1-21

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

0 2 . 0 6 . 2 0 1 0

国際調査報告の発送日

1 5 . 0 6 . 2 0 1 0

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

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)

三木 隆

2 J

3 3 1 2

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 2 5 2