(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第6033084号
(P6033084)
(45)発行日　平成28年11月30日(2016.11.30)　(24)登録日　平成28年11月4日(2016.11.4)

(51)Int.Cl.		F I		
C12Q 1/48	(2006.01)	C12Q	1/48	Z
C12Q 1/56	(2006.01)	C12Q	1/56	
G01N 33/96	(2006.01)	G01N	33/96	

請求項の数 6　(全 12 頁)

(21)出願番号	特願2012-532469 (P2012-532469)
(86)(22)出願日	平成22年6月17日 (2010.6.17)
(65)公表番号	特表2013-506429 (P2013-506429A)
(43)公表日	平成25年2月28日 (2013.2.28)
(86)国際出願番号	PCT/EP2010/003667
(87)国際公開番号	WO2011/042072
(87)国際公開日	平成23年4月14日 (2011.4.14)
審査請求日	平成25年4月22日 (2013.4.22)
審判番号	不服2015-17681 (P2015-17681/J1)
審判請求日	平成27年9月29日 (2015.9.29)
(31)優先権主張番号	102009048199.0
(32)優先日	平成21年10月5日 (2009.10.5)
(33)優先権主張国	ドイツ(DE)

(73)特許権者　510259921
シーメンス　ヘルスケア　ダイアグノスティクス　プロダクツ　ゲゼルシヤフト　ミツト　ベシユレンクテル　ハフツング
ドイツ連邦共和国　３５０４１　マールブルグ、エミール－フォン－ベーリング－シュトラーセ　７６
(74)代理人　100075166
弁理士　山口　巖
(74)代理人　100133167
弁理士　山本　浩
(72)発明者　クリスト、ゲアリンデ
ドイツ連邦共和国　３５０４３　マルブルク　アム　フォーゲルヘルト　１１

最終頁に続く

(54)【発明の名称】血漿に基づく参照材料を用いた第ＸＩＩＩ因子の測定方法

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
試験バッチ中のＮＡＤ（Ｐ）Ｈ又はチオ－ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ及びセレノ－ＮＡＤ（Ｐ）Ｈからなる群から選ばれるＮＡＤ（Ｐ）Ｈ類縁体の酸化的消費に基づき、活性化された第ＸＩＩＩａ因子のトランスグルタミナーゼ活性を測定し、前記測定された測定値を、参照材料を用いて測定される参照値と比較する、血漿試料中の第ＸＩＩＩ因子の定量的測定方法において、少なくとも、標準（１００％）より低減された第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照材料として、血漿のみからなる参照材料を用いることを特徴とする、測定方法。
【請求項２】
前記標準（１００％）より低減された第ＸＩＩＩ因子活性を示す少なくとも１つの参照材料が、標準血漿と第ＸＩＩＩ因子欠失血漿との混合物からなる、請求項１に記載の方法。
【請求項３】
前記標準（１００％）より低減された第ＸＩＩＩ因子活性を示す少なくとも１つの参照材料が、単離された第ＸＩＩＩ因子が添加されている第ＸＩＩＩ因子欠失血漿からなる、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項４】
更なる参照材料として、第ＸＩＩＩ因子欠失血漿からなる第ＸＩＩＩ因子活性を示さない参照材料を用いる、請求項１～３のいずれか１項に記載の方法。
【請求項５】

更なる参照材料として、標準血漿からなる標準（１００％）の第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照材料を用いる、請求項１～４のいずれか１項に記載の方法。
【請求項６】
更なる参照材料として、単離された第ＸＩＩＩ因子が添加されている標準血漿からなる標準（１００％）より高められた第ＸＩＩＩ因子活性を示す少なくとも１つの参照材料を用いる、請求項１～５のいずれか１項に記載の方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、インビトロ診断の分野の発明であり、血漿に基づく参照材料を用いた血液凝固因子ＸＩＩＩ（第ＸＩＩＩ因子、Ｆ　ＸＩＩＩ）の測定方法及び前記方法を実施するための試験キットに関する。
【背景技術】
【０００２】
第ＸＩＩＩ因子は、血液凝固カスケードの最後に作用する血液凝固因子であり、持続的な創傷閉塞のために重要な役割を果たす。血液凝固の最終段階、即ち、フィブリン形成、において、トロンビンは、フィブリノーゲンを分解する。こうして生じたフィブリンモノマーは、自然発生的に凝集して長い繊維を形成し、最終的に、可溶性のフィブリンポリマーからなる緻密で分枝した網状構造を形成する。第ＸＩＩＩ因子も、また、トロンビンにより活性化され、それにより、第ＸＩＩＩａ因子が生じる。第ＸＩＩＩａ因子は、このフィブリンポリマーの架橋を引き起こし、それにより、このフィブリン塊を、機械的に、より安定とし、より変形できなくし、プラスミンによる分解に対して、より耐性とする。先天性又は後天性の第ＸＩＩＩ因子欠損症は、出血傾向、創傷治癒障害及び流産を引き起こすことがある。その臨床的な重要性の故に、第ＸＩＩＩ因子欠損症を除外するか又は確認するための第ＸＩＩＩ因子の測定は、血液凝固診断の重要な要素である。
【０００３】
触媒として不活性なプロ酵素である第ＸＩＩＩ因子の活性形である第ＸＩＩＩａ因子は、トランスグルタミナーゼであり、このトランスグルタミナーゼは、フィブリン分子のリシル－及びグルタミニル－アミノ酸側鎖の間での分子間アミド結合の形成によるフィブリンポリマーの三次元的な架橋を触媒する。この反応の際に、アンモニア（NH_3）又はアンモニウムイオン（NH_4^+）が遊離される。簡潔にするために、以後、「アンモニア」の用語を、アンモニア及びアンモニウムイオンの両方について、使用する。このアンモニア発生の現象が、第ＸＩＩＩ因子の測定のための多様な試験方法で利用される。
非特許文献１には、繊維素を除去した血漿試料中での第ＸＩＩＩ因子の測定方法が記載しており、そこでは、試料の第ＸＩＩＩ因子は、トロンビンにより活性化されて第ＸＩＩＩａ因子になる。更に、この試料を、第ＸＩＩＩａ因子による分子間アミド結合の形成のための基質の役割をするβ－カゼイン及びエチルアミンと、混合する。この反応の際に遊離するアンモニアを定量的に検出するために、この試料を、更にＮＡＤＰＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸ヒドリド）及びＮＡＤＰＨ依存性の指示反応（インジケーター反応）の成分、つまりグルタメートデヒドロゲナーゼ（ＧＬＤＨ）及びα－ケトグルタレートと混合する。アンモニアが存在する場合には、ＧＬＤＨは、α－ケトグルタレートをグルタメートに変換する。この反応は、付加的にＮＡＤＰＨを消費し、ＮＡＤＰＨが酸化された形態のＮＡＤＰ＋（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸）が生成する。ＮＡＤＰ＋は、ＮＡＤＰＨとは異なる吸収スペクトルを有するので、この試験バッチの吸収（吸光度又は光学密度）は、ＮＡＤＰＨ消費に比例し、従って、アンモニア量に比例し、従って、第ＸＩＩＩ因子量又は第ＸＩＩＩ因子活性に比例して、変化する。別法として、この試験バッチにおいて、ＮＡＤＰＨの代わりにＮＡＤＨを使用することもできる。ＮＡＤＰ＋とは対照的に、ＮＡＤＰＨは、約２６０ｎｍにおける吸収極大の他に、約３４０ｎｍにおいて吸収極大を有する。吸収極大の正確な位置は、一般に、多様なパラメータ、特に溶液の誘電率及びｐＨ値、に依存する。一般に、ＮＡＤＰＨの吸収極大は、

３３５～３４５ｎｍの範囲内にある。従って、試験バッチの吸収値の変化を、通常、約３４０±５ｎｍの波長で測定することにより、試料中の第ＸＩＩＩ因子の定量的測定が可能になる。

【０００４】

特許文献１又は非特許文献２には、遊離されたアンモニアにより第ＸＩＩＩ因子を定量する同様の方法が記載されている。特許文献１には、フィブリンを含有する血漿試料中の第ＸＩＩＩ因子を、前処理なしに、測定する方法が記載されている。反応バッチ中で障害となるフィブリン塊の形成を妨げるために、この試料は、更にフィブリン凝集阻害剤と混合される。この試料の第ＸＩＩＩ因子は、Ca^{2+}イオンの存在下で、トロンビンによって活性化されて、第ＸＩＩＩａ因子となる。更に、この試料を、第ＸＩＩＩａ因子による分子間アミド結合の形成のための役割をする合成グルタミン含有ペプチド及びグリシンエチルエステルと混合する。この反応の際に遊離するアンモニアを定量的に検出するために、この試料を、更にＮＡＤＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドヒドリド）及びＮＡＤＨ依存性の指示反応の成分、つまり、グルタメートデヒドロゲナーゼ（ＧＬＤＨ）及びα－ケトグルタレート、と混合する。アンモニアの存在で、ＧＬＤＨは、α－ケトグルタレートをグルタメートに変換する。この反応は、更にＮＡＤＨを消費し、ＮＡＤＨの酸化された形態であるＮＡＤ＋を生じる。ＮＡＤ＋は、ＮＡＤＨとは異なる吸収スペクトルを有するので、この試験バッチの吸収は、ＮＡＤＨ消費に比例し、従ってアンモニア量に比例し、従って第ＸＩＩＩ因子の酵素活性に比例して、従って第ＸＩＩＩ因子量に比例して、変化する。別法として、この試験バッチにおいて、ＮＡＤＨの代わりにＮＡＤＰＨを使用することもできる。３４０ｎｍの波長における試験バッチの吸収の変化を測定することにより、試料中の第ＸＩＩＩ因子の定量的測定が可能になる。特許文献１に記載された試験原理に基づき市販されている試験は、シーメンス　ヘルスケア　ダイアグノスティクス　プロダクツ　ゲゼルシヤフト　ミツト　ベシユレンクテル　ハフツング社のＢｅｒｉｃｈｒｏｍ（登録商標）第ＸＩＩＩ因子試験である。

【０００５】

簡潔にするために、ＮＡＤＨのリン酸化された形及びリン酸化されていない形の両方に言及する場合には、つまり、ＮＡＤＨ及びＮＡＤＰＨに同様に言及する場合には、「ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ」の用語を使用する。酸化された状態でのＮＡＤＨのリン酸化された形及びリン酸化されていない形の両方を表現する場合には、つまり、ＮＡＤ＋及びＮＡＤＰ＋の両方に同様に言及する場合には、「ＮＡＤ（Ｐ）＋」の用語を使用する。

【０００６】

上述の試験法において、ＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨの代わりに、ＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨの類縁体、いわゆるＮＡＤ（Ｐ）Ｈ類縁体、を使用することも可能である。３５０ｎｍを超える波長に吸収極大を有する類縁体が好適である。類縁体とは、生理学的物質の生物学的作用を模倣する物質、即ち、本発明の場合、例えば、ＮＡＤ（Ｐ）＋又はＮＡＤ（Ｐ）Ｈと同様に、補基質として機能することができる物質である。この場合、酸化された形態及び還元された形態で異なる吸収極大を有し、ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ類縁体の吸収極大が３５０ｎｍを超える波長にある類縁体が重要である。ニコチンアミド基が他の基によって置換された構造類縁体が使用するのが好適である。この場合、環式化合物が好適であり、ヘテロ環式化合物が特に好適であり、ピリジン類縁体、例えば、３－アセチルピリジン、３－（カルボ）アルデヒドピリジン、チオニコチンアミド、セレノニコチンアミド等、が更に特に好適である。

【０００７】

試験バッチ中のアンモニア生成の検出に基づく、第ＸＩＩＩ因子活性を測定するための先行技術による上述の方法及び他の方法には、第ＸＩＩＩ因子濃度の低い試料において、しばしば、第ＸＩＩＩ因子活性が余りにも高く測定されるという欠点がある。それどころか、免疫学的方法及び他の方法によって第ＸＩＩＩ因子が検出できなかった重度の後天性第ＸＩＩＩ因子欠乏症を患う患者の血漿試料中において、Ｂｅｒｉｃｈｒｏｍ（登録商標）第ＸＩＩＩ因子試験を用いて、８～１４％の第ＸＩＩＩ因子活性が検出されたことが観

察された（非特許文献３）。しかしながら、第ＸＩＩＩ因子濃度の低い試料中では特に、第ＸＩＩＩ因子活性の正確な測定は、第ＸＩＩＩ因子濃度を有する患者の可能な限り最善の治療のための本質的な前提条件である。

【０００８】

第ＸＩＩＩ因子活性が誤って余りにも高く測定された原因は不明である。考えられる原因として、第ＸＩＩＩａ因子とは無関係な、ＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨの消費が議論されており、この消費は、恐らくは、患者試料中に含まれ、ＮＡＤＨ若しくはＮＡＤＰＨを補因子として利用する酵素により引き起こされるか、又は患者試料中で、やはり、第ＸＩＩＩａ因子とは無関係なＮＡＤＨ若しくはＮＡＤＰＨの消費を生じさせる非特異的なアンモニア発生により引き起こされると考えられる（非特許文献４）。第ＸＩＩＩ因子活性が誤って余りにも高く測定されたこの問題の解決のために、Ａｊｚｎｅｒ及びＭｕｓｚｂｅｋは、患者試料の第２試験試料を、並行試験において、ヨードアセタミドと混合し、第ＸＩＩＩ因子活性を測定することを、提案している。ヨードアセタミドは、活性化された第ＸＩＩＩ因子のトランスグルタミナーゼ活性を阻害する。この並行試験において測定される吸光度の変化は、第ＸＩＩＩａ因子とは無関係なＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨの消費に対応し、この吸光度の変化を、ヨードアセタミドで処理されていない正規の試験混合物で測定された活性から差し引くことができる。このようにして、正規の試験混合物中で測定された第ＸＩＩＩ因子活性を、修正することができる。

【０００９】

しかしながら、第ＸＩＩＩ因子活性を修正するこの方法の問題点は、患者の各試料を、２回、つまり、１回はヨードアセタミドなしで、もう１回はヨードアセタミドを用いて、測定しなければならないことである。このような措置は、試験すべき試料の数を２倍にするだけではなく、第ＸＩＩＩ因子測定のコストをも２倍にする。更に、ヨードアセタミドの使用が凝固分析においてルーチン使用に適しているかどうか明らかではない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【００１０】

【特許文献１】欧州特許公開第３３６３５３Ａ２号明細書

【非特許文献】

【００１１】

【非特許文献１】Ｍｕｓｚｂｅｋ，Ｌ．ｅｔ　ａｌ．著［Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．（１９８５）３１（１），３５－４０］

【非特許文献２】Ｆｉｃｋｅｎｓｃｈｅｒ　ｅｔ　ａｌ．著（Ｔｈｒｏｍｂ　Ｈａｅｍｏｓｔ．１９９１，６５（５）：５３５－４０）

【非特許文献３】Ｌｉｍ，Ｗ．ｅｔ　ａｌ．著，Ｊ　Ｔｈｒｏｍｂ　Ｈａｅｍｏｓｔ　２００４；２：１０１７－１０１９

【非特許文献４】Ａｊｚｎｅｒ，Ｅ及びＭｕｓｚｂｅｋ，Ｌ著；Ｊ　Ｔｈｒｏｍｂ　Ｈａｅｍｏｓｔ　２００４；２：２０７５－２０７７

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【００１２】

従って、本発明の根底をなす課題は、特に、第ＸＩＩＩ因子濃度の低い又は第ＸＩＩＩ因子活性の低い血漿試料において、並行試料の第ＸＩＩＩ因子活性を測定することなく、第ＸＩＩＩ因子を正確に測定することを可能にする、第ＸＩＩＩ因子の測定のための薬剤及び方法を提供することであった。

【課題を解決するための手段】

【００１３】

上記課題は、標準の１００％より低い第ＸＩＩＩ因子活性のための参照材料として、もっぱら血漿を使用することにより、解決される。

【図面の簡単な説明】

【００１４】
【図１】標準血漿のための希釈媒体としてＮａＣｌ溶液を用いる先行技術による、ＮＡＤＨに基づくＢｅｒｉｃｈｒｏｍ（登録商標）第ＸＩＩＩ因子試験又はチオ－ＮＡＤＨに基づく第ＸＩＩＩ因子試験の較正曲線。
【図２】標準血漿のための希釈媒体として第ＸＩＩＩ因子欠失血漿を用いる、本発明によるＮＡＤＨに基づくＢｅｒｉｃｈｒｏｍ（登録商標）第ＸＩＩＩ因子試験又はチオ－ＮＡＤＨに基づく第ＸＩＩＩ因子試験の較正曲線。
【図３】標準血漿のための希釈媒体としてＮａＣｌ又は第ＸＩＩＩ因子欠失血漿を用いて実施した、ＮＡＤＨに基づくＢｅｒｉｃｈｒｏｍ（登録商標）第ＸＩＩＩ因子試験による、種々の第ＸＩＩＩ因子活性の試料の復元率の比較。
【図４】標準血漿のための希釈媒体としてＮａＣｌ又は第ＸＩＩＩ因子欠失血漿を用いて実施した、チオ－ＮＡＤＨに基づく第ＸＩＩＩ因子試験による、種々の第ＸＩＩＩ因子活性の試料の復元率の比較。
【発明を実施するための形態】
【００１５】
血漿試料中の第ＸＩＩＩ因子を測定する公知の方法の場合には、通常、例えば、一般に少なくとも２０人の明らかに健康な提供者の血漿からなる標準血漿プールが、参照材料として使用される。この標準血漿の第ＸＩＩＩ因子活性が１００％として、即ち標準として、定義されるか、又は、国際参照血漿の第ＸＩＩＩ因子活性と比較され、それにより、この標準血漿に第ＸＩＩＩ因子活性値を割り当てることができる。より低い第ＸＩＩＩ因子活性（＜１００％）を示す参照血漿を準備するために、この標準血漿の希釈物が調製される。希釈媒体として、通常、例えば０．９％ＮａＣｌ溶液のような、水溶液が使用される。例えば、標準血漿１部を適切な緩衝剤の２部と混合し（１：２希釈）、これが標準の３３．３３％の第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照血漿として定義される。標準化されるべき第ＸＩＩＩ因子試験を用いて標準血漿及び標準血漿の一連の希釈物を測定することにより、参照血漿曲線（較正曲線）が作成される。これにより、（例えば標準の％で）定義された第ＸＩＩＩ因子活性が、測定された生の値に割り当てられる。患者試料について、標準化されたこの試験系において、生の値を測定することができ、これを、参照曲線を手掛かりとして、例えば標準の％として、較正された値又は標準化された試験結果に、最終的に換算することができる。
【００１６】
第ＸＩＩＩ因子活性の標準値（１００％）及び血漿だけからなる標準値を下回る（＜１００％）第ＸＩＩＩ因子活性について参照を適用することにより参照曲線が得られ、この参照曲線により、活性化された第ＸＩＩＩａ因子のトランスグルタミナーゼ活性を、試験バッチ中のＮＡＤ（Ｐ）Ｈ消費を手掛かりとして、測定する方法を用いて、特に、第ＸＩＩＩ因子濃度又は第ＸＩＩＩ因子活性が低い血漿試料中の第ＸＩＩＩ因子の正確な測定が可能になることが、確認された。
【００１７】
本発明の主題は、試験バッチ中における酸化的ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ消費を手掛かりとして、活性化された第ＸＩＩＩａ因子のトランスグルタミナーゼ活性を測定し、この測定値を、参照材料を用いて測定される参照値と比較することによって、血漿試料中の第ＸＩＩＩ因子を定量的に測定する方法であって、少なくとも、標準に対して低減された第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照材料が血漿からなるものである、血漿試料中の第ＸＩＩＩ因子を定量的に測定する方法である。
【００１８】
試験バッチ中の酸化によるＮＡＤ（Ｐ）Ｈ消費によって、活性化された第ＸＩＩＩａ因子のトランスグルタミナーゼ活性を測定する、血漿試料中の第ＸＩＩＩ因子の定量的測定方法とは、例えば、
血漿試料を
Ｉ．　第ＸＩＩＩ因子を第ＸＩＩＩａ因子に活性化するための物質又は物質混合物、

ＩＩ．　少なくとも１つのグルタミニル基を有する、第ＸＩＩＩａ因子受容基質、
ＩＩＩ．　第ＸＩＩＩａ因子のためのアミノ基供与基質、
ＩＶ．　ＮＡＤ（Ｐ）Ｈ又はＮＡＤ（Ｐ）Ｈ類縁体、及び
Ｖ．　アンモニアの存在下に、ＮＡＤ（Ｐ）ＨをＮＡＤＰ＋に酸化することができる薬剤、
と、混合し、前記試験バッチの吸収値の変化を測定する方法である、と解釈すべきである。

【００１９】
第ＸＩＩＩ因子を第ＸＩＩＩａ因子へと活性させるための物質としては、特にトロンビン、例えばヒト又はウシ由来のトロンビン、又は、好適にはカルシウムイオンの存在で、組み換えにより製造されたトロンビン、が適している。同様に、試料中に含まれるプロトロンビンを直接的に又は間接的に活性化してトロンビンとし、このトロンビンが次いで更に第ＸＩＩＩ因子を活性化することにより、第ＸＩＩＩ因子の活性化に間接的に作用する物質又は物質混合物、例えば第Ｘａ因子、ヘビ毒のエカリン、又は、組織因子、リン脂質及びCa^{2+}イオンからなる混合物、が適している。

【００２０】
「少なくとも１つのグルタミニル基を有する、第ＸＩＩＩａ因子のための受容基質」とは、例えばアミノ酸グルタミン酸アミドからの、少なくとも１つのグルタミニル基を有するポリペプチド又は擬似ペプチド（Ｐｅｐｔｉｄｍｉｍｅｔｉｋｕｍ）であると解釈すべきである。公知の第ＸＩＩＩａ因子受容基質は、例えばβ－カゼイン及び多数の合成ペプチドである。適切な合成ペプチドは、例えば欧州特許公開（ＥＰ－Ａ２）第３１４０２３号明細書に、記載されている。

【００２１】
「第ＸＩＩＩａ因子のためのアミノ基供与基質」とは、特に第１級アミンであると解釈すべきである。好適な第１級アミンは、エタノールアミン、プトレシン、カダベリン、ジアミノエタン、アミノエタンである。特に好適な第１級アミンは、グリシンエチルエステル又はグリシンメチルエステルである。

【００２２】
「ＮＡＤＨ」とは、化合物ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドヒドリドの省略形である。ＮＡＤＨ消費とは、本発明の目的において、ＮＡＤＨをＮＡＤ＋（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド）に酸化することであると解釈すべきである。「ＮＡＤＨ」の概念は幅広く解すべきであり、ＮＡＤＨと同様に酸化可能であって酸化された形態では還元された形態とは異なる光学特性を示すのでその消費を測光的に測定することができる、以下のＮＡＤＨ類縁体をも含む。ＮＡＤＰＨ（ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸ヒドリド。ＮＡＤＰ＋に酸化可能である。）、チオ－ＮＡＤＨ（チオ－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドヒドリド。チオ－ＮＡＤ＋に酸化可能である。）、チオ－ＮＡＤＰＨ（チオ－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸ヒドリド。チオ－ＮＡＤＰ＋に酸化可能である。）、セレノ－ＮＡＤＨ（セレノ－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドヒドリド。セレノ－ＮＡＤ＋に酸化可能である。）及びセレノ－ＮＡＤＰＨ（セレノ－ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸ヒドリド。セレノＮＡＤＰ＋に酸化可能である。）。ＮＡＤＨ又はＮＡＤＰＨを使用する場合、ＮＡＤ＋又はＮＡＤＰ＋への酸化による吸光度の変化が、約３４０ｎｍの波長で測定される。チオ－ＮＡＤＨ、チオ－ＮＡＤＰＨ、セレノ－ＮＡＤＨ又はセレノ－ＮＡＤＰＨを使用する場合、チオ－ＮＡＤ＋、チオ－ＮＡＤＰ＋、セレノ－ＮＡＤ＋又はセレノ－ＮＡＤＰ＋への酸化による吸光度の変化は、約３４０ｎｍ～約４３０ｎｍの波長で測定される。

【００２３】
「アンモニアの存在でＮＡＤＨをＮＡＤ＋に酸化することができる薬剤」とは、好適には、酵素／基質系であり、この酵素／基質系は、酵素及び前記酵素のための基質を含有してなり、ここで、前記酵素は、前記基質に触媒的に作用し、これにより、アンモニアの存在下に、ＮＡＤＨをＮＡＤ＋に酸化するか又は上記のＮＡＤＨ類縁体を酸化する。好適な

酵素／基質系は、例えば、グルタメートデヒドロゲナーゼ／ケトグルタレート系又はアラニンデヒドロゲナーゼ／ピルベート系又はセリン－２－デヒドロゲナーゼ／３－ヒドロキシピルベート系又はバリンデヒドロゲナーゼ／３－メチル－２－オキソブタノエート系又はロイシンデヒドロゲナーゼ／４－メチル－２－オキソペンタノエート系又はグリシンデヒドロゲナーゼ／グリオキシレート系又はリシンデヒドロゲナーゼ／１，２－ジデヒドロピペリジン－２－カルボキシレート系又はフェニルアラニン／フェニルピルベート系又はアスパルテートデヒドロゲナーゼ／オキサロアセテート系又はグルコース－６－ホスフェート－デヒドロゲナーゼ／Ｄ－グルコノ－１，５－ラクトン－６－ホスフェート系である。

【００２４】

本発明による方法の好適な実施態様の場合には、この血漿試料を、更にフィブリン凝集阻害剤と、混合する。フィブリン凝集阻害剤は、トロンビンにより誘導されたフィブリンモノマーの凝集を抑制する物質である。このようにして、フィブリノーゲン含有の試料中でのフィブリン凝血塊の発生を抑制する。そうしないと、このフィブリン凝血塊が試験バッチの吸収測定に不利な影響を及ぼしかねないためである。好適なフィブリン凝集阻害剤は、合成ペプチド、例えば、配列Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ－Ｐｒｏ（Ｐｅｎｔａｐｈａｒｍ社（スイス国）のＰｅｆａｂｌｏｃ（登録商標）ＦＧとして市場で入手可能である。）を有するペプチド、である。フィブリン凝集阻害剤として使用することができる他の有利なペプチド、配列Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ－Ｐｒｏ－Ａｌａを有する特に好適なペプチド、は、欧州特許公開第４５６１５２Ａ２号明細書に記載されている。

【００２５】

他の実施態様においては、試料を、更に、ヘパリンを中和する物質、例えば臭化ヘキサジメトリン（Ｐｏｌｙｂｒｅｎｅ（登録商標）としても公知）、と混合し、ヘパリンのトロンビン阻害作用を排除する。ヘパリンは、例えばヘパリン治療された患者の試料中に存在することがあり得る。

【００２６】

試料と混合して試験バッチにされる成分Ｉ～Ｖは、それぞれ別個に、つまり別個の試薬の形で、順に、試料と混合することができるが、これらの成分は、唯一のピペット工程で試料と混合される唯一の試薬の形に統合することもできる。この１つの試薬又はこれらの複数の試薬は、好適には、上記物質が溶かされている緩衝マトリックスを含有することができる。適切な緩衝マトリックスは、例えば、ＨＥＰＥＳ、ビシン、ＮａＣｌ、アルブミン及び／又は、例えばアジ化ナトリウムのような、保存剤、を含有し、好適には６．０～９．０、特に好適には６．５～８．５、のｐＨ値を有する。カルシウムイオンは、第ＸＩＩＩ因子の活性化のために必要であるので、緩衝マトリックスは、更にカルシウム塩、好適には塩化カルシウム、を含有する。１つの試薬又は複数の試薬と試料との混合は、手作業で又は自動凝固測定装置中で、実施することができる。

【００２７】

本発明による方法において、アンモニアの存在下にＮＡＤＨをＮＡＤに酸化することができる薬剤としてグルタメートデヒドロゲナーゼ／ケトグルタレート系を使用する場合に、試験バッチに添加されるグルタメートデヒドロゲナーゼの量は、試験バッチ中のこの最終濃度が２～５００　ＩＵ／ｍＬ、好適には５～２５０　ＩＵ／ｍＬ、となるように選択される。

【００２８】

試料材料として、特にフィブリノーゲン含有血漿が適している。しかしながら、脱フィブリン血漿中でも、本発明による方法により、第ＸＩＩＩ因子を測定することができる。

【００２９】

試験バッチの吸収変化（ΔＥ）の測定は、測定されるべき試験バッチを透過するように光線を送る光源と透過された光の強度を測定し電気信号に変換するする検出器とを備えた測光器を用いて行なう。吸収変化の測定は、ＮＡＤＨ若しくはＮＡＤＰＨ又はチオ－ＮＡＤＨ、チオ－ＮＡＤＰＨ、セレノ－ＮＡＤＨ若しくはセレノ－ＮＡＤＰＨが使用されるか

どうかに応じて、約３４０ｎｍ～約４３０ｎｍの波長の光で行なわれる。単位時間当たりで変化する吸収は、第ＸＩＩＩ因子活性と相関する。ＮＡＤＨ又はＮＡＤＨ類縁体の消費による試験バッチの吸収（Ａ）の低下は、特に反応速度論の線形の範囲内で、第ＸＩＩＩ因子活性に正比例する。

【００３０】

まず、血漿試料について測定された測定値は、生データであり、これを引き続き、参照材料を用いて測定された参照値と比較する。参照材料とは、本発明の範囲内で、第ＸＩＩＩ因子濃度又は第ＸＩＩＩ因子活性が知られている材料であると解釈すべきである。

【００３１】

本発明において、少なくとも、標準に対して低減された（標準の＜１００％）第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照材料は、血漿からなる。「血漿」とは、単数又は複数の提供者、好適にはヒトの提供者、の血液の液状の、細胞不含の部分であると解釈すべきであり、この血漿は、凝固分析において、通常、そうであるように、抗凝血防止した全血から、細胞性の血液成分を分離することにより得られる。全血試料中の凝血を抑制するために、全ての血液試料は、採血の間に、頻繁に、抗凝血剤、有利には、クエン酸ナトリウム溶液、と混合される。他の通常の抗凝血剤は、ナトリウムヘパリン、リチウムヘパリン、ＥＤＴＡ又はシトレートーホスフェートーデキストロース（ＣＰＤ）である。全ての血漿は、必然的に一定体積割合の抗凝血剤を含む。

【００３２】

標準血漿とは、明らかに健康な複数の提供者の血漿の混合物（血漿プール）を表わす。標準血漿は、定義されたとおり、第ＸＩＩＩ因子濃度及び従って１００％の第ＸＩＩＩ因子活性を示す。第ＸＩＩＩ因子欠失血漿は、標準の第ＸＩＩＩ因子活性を全く有しないか又は第ＸＩＩＩ因子活性が標準の１％未満である血漿である。第ＸＩＩＩ因子欠失血漿は、例えば、対応する表現型を有する患者から又は特異的な抗体を用いて標準血漿から第ＸＩＩＩ因子を選択的に免疫吸着（Ｉｍｍｕｎａｄｓｏｒｐｔｉｏｎ）することにより、得ることができる。完全を期するために、種々の標準血漿の実際の第ＸＩＩＩ因子活性は、製造元、バッチ、充填物等によって変化することを指摘しておく。標準血漿の実際の第ＸＩＩＩ因子活性は、第ＸＩＩＩ因子のための国際標準血漿との比較により決定される。標準血漿の実際の第ＸＩＩＩ因子活性は、一般に、国際標準血漿の８０％～１２０％の間にある。

【００３３】

標準に対して低減された第ＸＩＩＩ因子活性を示す本発明による参照材料は、標準血漿と第ＸＩＩＩ因子欠失血漿との混合物からなっていてもよい。このため、標準血漿は、第ＸＩＩＩ因子欠損血漿と、得られる混合物が所望の第ＸＩＩＩ因子活性を示すような割合で、混合される。例えば、標準血漿１部を第ＸＩＩＩ因子欠失血漿２部と混合して（１：２希釈物）、標準の３３．３３％の第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照材料が得られる。標準に対して低減された第ＸＩＩＩ因子活性を示す本発明による参照材料は、更に、所望の第ＸＩＩＩ因子活性が達成される量で、精製された、つまり単離された、第ＸＩＩＩ因子が添加された第ＸＩＩＩ因子欠失血漿からなっていてもよい。ヒトの、動物の、又は組み換えにより製造された、第ＸＩＩＩ因子が適している。第ＸＩＩＩ因子活性を有しない（≦１％）本発明による参照材料は、好適には、第ＸＩＩＩ因子欠失血漿からなる。

【００３４】

本発明において、標準値を下回る（＜１００％）第ＸＩＩＩ因子活性の参照値の測定のために又は参照曲線の作成のために、血漿からなる参照材料だけが使用される。好適な実施態様において、標準値（１００％）に相当する第ＸＩＩＩ因子活性の参照値の測定のために、標準血漿からなる参照材料が使用される。同様に好適な実施態様において、標準値を上回る（＞１００％）第ＸＩＩＩ因子活性の参照値の測定のため又は参照曲線の作成のために、単離された第ＸＩＩＩ因子が、標準値を上回る所望の第ＸＩＩＩ因子活性が達成されるような量で、添加されている標準血漿からなる参照材料が使用される。

【００３５】

本発明の他の主題は、第ＸＩＩＩ因子の定量的測定方法を実施するのに適した参照材料を調製するための、第ＸＩＩＩ因子欠失血漿の使用である。上述のように、この第ＸＩＩＩ因子欠失血漿は、血漿からなり且つ標準値を下回る（＜１００％）第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照材料の調製のために、標準血漿の希釈媒体として使用することができる。しかしながら、この第ＸＩＩＩ因子欠失血漿は、精製された、即ち単離された、第ＸＩＩＩ因子が、標準値を下回るか又は上回る所望の第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照材料が生じるような量で、添加されるマトリックスとしても使用することができる。

【００３６】

本発明の他の主題は、標準血漿と第ＸＩＩＩ因子欠失血漿との混合物からなるか、又は、精製された、即ち単離された、第ＸＩＩＩ因子が、標準値を下回る第ＸＩＩＩ因子活性を示すような量で、添加されている第ＸＩＩＩ因子欠失血漿からなる、標準に対して低減された（＜１００％）第ＸＩＩＩ因子活性を示す参照材料である。本発明による参照材料は、液状の形態又は凍結乾燥された形態で、提供され得る。

【００３７】

本発明の他の主題は、別個のユニットとしての標準血漿と別個のユニットとしての第ＸＩＩＩ因子欠失血漿とを、それぞれ、液状の形態又は凍結乾燥された形態で備える、キットである。標準血漿を用いて、第ＸＩＩＩ因子活性の標準値（１００％）のための参照値を測定することができる。第ＸＩＩＩ因子欠失血漿を用いて、欠失した第ＸＩＩＩ因子活性（０％）のための参照値を測定することができる。必要に応じて使用者が調製することができる２つの血漿の混合物を用いて、標準に対して低減された（＜１００％）第ＸＩＩＩ因子活性のための参照値を測定することができる。

【００３８】

本発明の他の主題は、標準に対して低減された（＜１００％）第ＸＩＩＩ因子活性を有し且つ血漿からなる、好適には標準血漿と第ＸＩＩＩ因子欠失血漿との混合物、からなる、個別のユニットとしての少なくとも１種の参照材料を液状の形態又は凍結乾燥された形態で備えるキットである。好適には、本発明による試験キットは、更に、個別のユニットとしての標準血漿及び／又は個別のユニットとしての第ＸＩＩＩ因子欠失血漿を備える。

【実施例】

【００３９】

実施例１：

第ＸＩＩＩ因子の測定

次の実施例において、血漿試料の第ＸＩＩＩ因子含有量を、活性成分としてＮＡＤＨ又はチオ－ＮＡＤＨを含有する試薬を用いて、測定した。このＮＡＤＨに基づく試薬は、特許文献１又は非特許文献２においてその組成物中で記載されており、シーメンス　ヘルスケア　ダイアグノスティクス　プロダクツ　ゲゼルシヤフト　ミツト　ベシユレンクテルハフツング社（ドイツ国）からＢｅｒｉｃｈｒｏｍ（登録商標）第ＸＩＩＩ因子試薬として販売されている。このチオ－ＮＡＤＨに基づく試薬は、次の組成を有している。

【００４０】

活性剤試薬（ｐＨ８．３）：

・　２９２μＭのチオ－ＮＡＤＨ（Ｏｒｉｅｎｔａｌ　Ｙｅａｓｔ　Ｃｏｍｐａｎｙ、ロッテルダム、オランダ国）

・　ウシのトロンビン（１０ＩＵ／ｍＬ）

・　フィブリン凝集阻害剤としてのＧｌｙ－Ｐｒｏ－Ａｒｇ－Ｐｒｏ－Ａｌａ－アミド（２ｇ／Ｌ）

・　塩化カルシウム（１．２ｇ／Ｌ）

・　臭化ヘキサジメトリン（１０ｍｇ／Ｌ）

・　ウシのアルブミン

・　ビシン緩衝剤（１００ミリモル／Ｌ）

【００４１】

検出試薬（ｐＨ６．５）：

・ グルタメートデヒドロゲナーゼ１６０Ｕ／ｍＬ）
・ 第ＸＩＩＩ因子受容基質としてのＬｅｕ－Ｇｌｙ－Ｐｒｏ－Ｇｌｙ－Ｇｌｎ－Ｓｅｒ－Ｌｙｓ－Ｖａｌ－Ｉｌｅ－Ｇｌｙ－アミド（２．４ｇ／Ｌ）
・ ＡＤＰ
・ グリシンエチルエステル（１．４ｇ／Ｌ）
・ α－ケトグルタレート（２．７ｇ／Ｌ）
・ ウシのアルブミン
・ ＨＥＰＥＳ緩衝剤（１０ミリモル／Ｌ）

【００４２】

この試験のために、ＢＣＳ（登録商標）－ＸＰ凝固分析装置（シーメンス ヘルスケア ダイアグノスティクス プロダクツ ゲゼルシヤフト ミツト ベシユレンクテル ハフツング社、マールブルグ、ドイツ国）で、それぞれの試薬から、活性試薬７５μＬ、検出試薬７５μＬ及び血漿試料１５μＬをキュベット中で合一し、３７℃でインキュベートした。５分後に吸光度の測定を開始した。Ｂｅｒｉｃｈｒｏｍ（登録商標）第ＸＩＩＩ因子試験のＮＡＤＨ試薬を有する試験バッチを、波長３４０ｎｍの光を用いて測定した。チオ－ＮＡＤＨ試薬を有する試験バッチを、波長４０５ｎｍの光を用いて測定した。評価のために、測定開始後の６０秒～３５０秒の時間枠内で１分ごとに吸光度の変化を計算した。較正のため、つまり標準値の測定のため、標準血漿（標準ヒト血漿、シーメンス ヘルスケア ダイアグノスティクス プロダクツ ゲゼルシヤフト ミツト ベシユレンクテル ハフツング社、マールブルグ、ドイツ国）を、１００％ｄ．Ｎ（標準の１００パーセント）の第ＸＩＩＩ因子濃度を有する標準として使用した（第ＸＩＩＩ因子のための国際標準と比較して、この標準血漿は第ＸＩＩＩ因子９５％を含有していた）。より低い第ＸＩＩＩ因子濃度を有する較正点、つまり標準と比べて低減された第ＸＩＩＩ因子活性を表わす参照値は、本発明に従って、この標準を第ＸＩＩＩ因子欠失血漿で希釈するか、又は、先行技術に従って、この標準を０．９％ＮａＣｌ溶液で希釈することにより、得られた。第ＸＩＩＩ因子欠失血漿は、Ｉｎｎｏｖａｔｉｖｅ Ｒｅｓｅａｒｃｈ（ＵＳＡ）から取り寄せるか、又は、第ＸＩＩＩ因子アルファ鎖若しくはベータ鎖に対するモノクローナル抗体を用いて欧州特許公開第０８２６９６５Ａ１号明細書に記載された方法と同様にして調製した。標準よりも高い第ＸＩＩＩ因子濃度を有する較正点、つまり標準と比べて高められた第ＸＩＩＩ因子活性を表す参照値は、試験バッチ中の標準血漿の体積を高めることによって得られる。

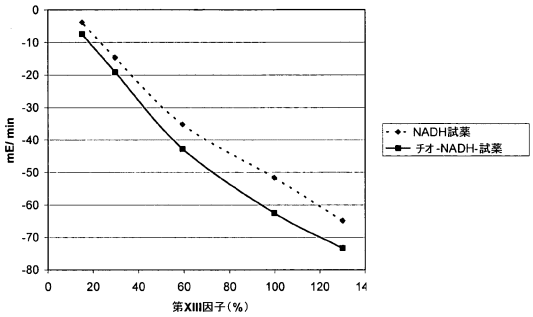
【００４３】

希釈媒体としてＮａＣｌ溶液を用いて、両方の試薬を用いて実施された試験についての典型的な較正曲線は、図１に示されている。希釈媒体として第ＸＩＩＩ因子欠失血漿を用いて、両方の試薬を用いて実施された本発明による試験についての典型的な較正曲線は、図２に示されている。

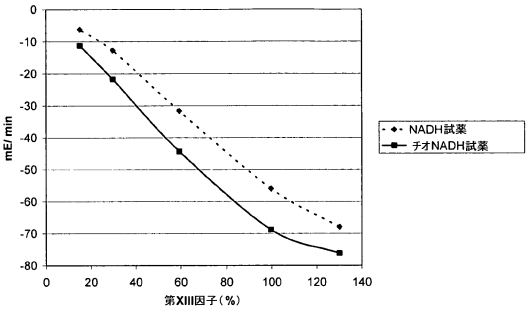
【００４４】

引き続き、両方の試薬を用いて、異なる第ＸＩＩＩ因子含有量を有する試料を測定し、このテスト結果をそれぞれの較正曲線に基づき評価した。これらの試料は、公知の高い第ＸＩＩＩ因子活性を示す血漿プールと第ＸＩＩＩ因子欠失血漿との、種々の比率での、混合により調製した。出発血漿の第ＸＩＩＩ因子活性値並びにこの混合比から、各試料の理論的第ＸＩＩＩ因子活性値を計算した。この試料の測定の後に、実際に測定された測定値と予め理論的に計算された第ＸＩＩＩ因子活性値との比較により、それぞれの試料の百分率で示す回収率を計算した。１００％より大きな復元率は、誤った高すぎる試験結果と同じ意味である。図３に示されているように、ＮＡＤＨに基づくＢｅｒｉｃｈｒｏｍ（登録商標）第ＸＩＩＩ因子試験について、この試験についての標準用の希釈剤として、前記のＮａＣｌの代わりに本発明による第ＸＩＩＩ因子欠失血漿を使用した場合には、この復元率は、２０％より低い第ＸＩＩＩ因子活性を示す試料の場合に、１００％付近であった。図４に示されているように、チオ－ＮＡＤＨをベースとする試験について、低い第ＸＩＩＩ因子含有量を有する試料の復元率の改善が、更にはっきりと現われている。

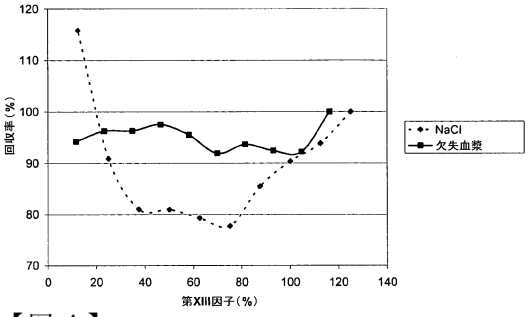
【図１】


mE/ min
第XIII因子(%)
NADH試薬
チオ-NADH-試薬

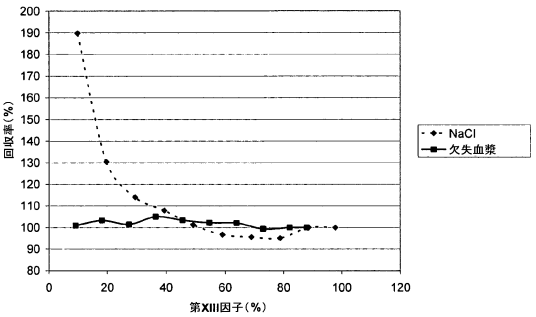
【図２】


mE/ min
第XIII因子(%)
NADH試薬
チオNADH試薬

【図３】


回収率(%)
第XIII因子(%)
NaCl
欠失血漿

【図４】


回収率(%)
第XIII因子(%)
NaCl
欠失血漿

フロントページの続き

(72)発明者　カッペル、アンドレアス
ドイツ連邦共和国　６１４６２　ケーニッヒシュタイン　アム　ヴィーゼンホーフ　９
(72)発明者　ペヒマン、レナ
ドイツ連邦共和国　３５１０２　ローラ　ヴァルトシュトラーセ　１２
(72)発明者　フィッツフム、フランク
ドイツ連邦共和国　３５０９４　ラーンタール　ザントヴェーク　６アー
(72)発明者　ツァンダー、ノルベルト
ドイツ連邦共和国　３５０３９　マルブルク　アルター　キルヒハイナー　ヴェーク　２７

合議体
審判長　佐々木　秀次
審判官　三原　健治
審判官　長井　啓子

(56)参考文献　特開平０１－３０９７００（ＪＰ，Ａ）
特許第３２２４６０７（ＪＰ，Ｂ２）
Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．，１９８５，Ｖｏｌ．３１，Ｎｏ．１，ｐ．３５－４０
Ｔｈｒｏｍｂ．Ｈａｅｍｏｓｔ．，１９９１，Ｖｏｌ．６５，Ｎｏ．５，ｐ．５３５－５４０
Ｃｌｉｎ．Ｃｈｅｍ．，２０００，Ｖｏｌ．４６，Ｎｏ．１２，ｐ．１９４６－１９５５

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｑ　１/００-３/００
ＣＡｐｌｕｓ／ＢＩＯＳＩＳ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＷＰＩＤＳ（ＳＴＮ）