

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号
特許第5596124号
(P5596124)

(45) 発行日 平成26年9月24日(2014.9.24)

(24) 登録日 平成26年8月15日(2014.8.15)

(51) Int.Cl.
GO 1 N 21/64 (2006.01)

F I
GO 1 N 21/64 B

請求項の数 20 (全 14 頁)

(21) 出願番号	特願2012-504653 (P2012-504653)	(73) 特許権者	511241158
(86) (22) 出願日	平成22年3月25日 (2010.3.25)		ニコルス, イアン エイ.
(65) 公表番号	特表2012-523006 (P2012-523006A)		N I C H O L L S, I a n A.
(43) 公表日	平成24年9月27日 (2012.9.27)		スウェーデン王国 エス-39247 カ
(86) 国際出願番号	PCT/SE2010/050326		ルマル, ステーニヴィクスヴェーゲン 1
(87) 国際公開番号	W02010/117320		6
(87) 国際公開日	平成22年10月14日 (2010.10.14)	(73) 特許権者	511241169
審査請求日	平成25年3月22日 (2013.3.22)		カールソン, ビョルン セー., ゲー.
(31) 優先権主張番号	0950225-3		K A R L S S O N, B j o r n C., G
(32) 優先日	平成21年4月7日 (2009.4.7)		.
(33) 優先権主張国	スウェーデン (SE)		スウェーデン王国 エス-39359 カ
			ルマル, ヴィオールヴェーゲン 11
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 サンプル中の薬剤を検出するための方法及び装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトの血液又は血漿から成るサンプル（116）中に存在するビタミンK拮抗性抗凝固剤を測定するための方法であって、前記方法が：

光の吸収を通して前記抗凝固剤を活性化するために、光源（114）からの光を前記サンプル（116）に照射するステップ（304）であって、前記サンプル（116）の活性化により前記サンプル（116）から蛍光放射をもたらすステップと、

前記サンプル（116）からの前記蛍光放射を測定するステップ（306）と、
前記サンプル（116）の前記蛍光放射の蛍光寿命（ τ_1 ）を判定するステップ（308）と、

前記蛍光寿命（ τ_1 ）での前記蛍光放射の強度（ A_1 ）を判定するステップ（310）と、

前記蛍光寿命（ τ_1 ）での前記蛍光放射の強度（ A_1 ）の関数として、前記抗凝固剤の量（c）を判定するステップ（312）と、
を具備することを特徴とする方法。

【請求項2】

さらに、前記サンプル（116）の前記蛍光放射の第2の蛍光寿命（ τ_2 ）を判定するステップ（308b）と、

前記第2の蛍光寿命（ τ_2 ）での前記蛍光放射の強度（ A_2 ）を判定するステップ（310b）と、

前記第2の蛍光寿命 (τ_2) での前記蛍光放射の強度 (A_2) の関数として、前記抗凝固剤の量 (c) を判定するステップ (312b) と、
を具えることを特徴とする請求項1に記載の方法。

【請求項3】

さらに、前記サンプル (116) の前記蛍光放射の第3の蛍光寿命 (τ_3) を判定するステップ (308c) と、

前記第3の蛍光寿命 (τ_3) での前記蛍光放射の強度 (A_3) を判定するステップ (310c) と、

前記第3の蛍光寿命 (τ_3) での前記蛍光放射の強度 (A_3) の関数として、前記抗凝固剤の量 (c) を判定するステップ (312c) と、
を具えることを特徴とする請求項2に記載の方法。

10

【請求項4】

前記量 (c) を判定するステップ (312) が、少なくとも1の蛍光寿命 (τ_1 ; τ_2 ; τ_3) の強度 (A_1 ; A_2 ; A_3) と特定の量値 (c_{ref}) に関する既知の強度値 (A_{ref1} ; A_{ref2} ; A_{ref3}) とを比較するステップを具えることを特徴とする請求項1乃至3のいずれか1項に記載の方法。

【請求項5】

前記量 (c) を判定するステップ (312) が、少なくとも1の蛍光寿命 (τ_1 ; τ_2 ; τ_3) と特定の量値 (c_{ref}) に関する既知の蛍光寿命 (τ_{ref1} ; τ_{ref2} ; τ_{ref3}) とを比較するステップを具えることを特徴とする請求項1乃至4のいずれか1項に記載の方法。

20

【請求項6】

前記量 (c) を判定するステップ (312) が、特定の量値 (c_{ref}) に関する既知の強度値 (A_{ref1} ; A_{ref2} ; A_{ref3}) に、蛍光寿命 (τ_1 ; τ_2 ; τ_3) の少なくとも1の強度 (A_1 ; A_2 ; A_3) をフィッティングするように回帰分析を使用するステップを具えることを特徴とする請求項1乃至5のいずれか1項に記載の方法。

【請求項7】

前記量 (c) を判定するステップ (312) が、少なくとも1の蛍光寿命 (τ_1 ; τ_2 ; τ_3) と特定の量値 (c_{ref}) に関する少なくとも1の既知の蛍光寿命 (τ_{ref1} ; τ_{ref2} ; τ_{ref3}) との間の相関関係を使用するステップを具えることを特徴とする請求項1乃至6のいずれか1項に記載の方法。

30

【請求項8】

前記サンプル (116) からの蛍光放射を測定するステップ (306) が、時間分解蛍光分光測定を実行するステップを具えることを特徴とする請求項1乃至7のいずれか1項に記載の方法。

【請求項9】

前記ビタミンK拮抗性抗凝固剤が、クマリンの合成誘導体であることを特徴とする請求項1乃至8のいずれか1項に記載の方法。

【請求項10】

前記ビタミンK拮抗性抗凝固剤が、ワルファリンであることを特徴とする請求項1乃至9のいずれか1項に記載の方法。

40

【請求項11】

ヒトの血液又は血漿から成るサンプル (116) に存在するビタミンK拮抗性抗凝固剤を測定するための装置であって、前記装置が：

光の吸収を通して前記抗凝固剤を活性化するために、前記サンプル (116) に光を照射する (304) よう構成された光源 (114) であって、前記サンプル (116) の活性化により前記サンプル (116) から蛍光放射をもたらす光源 (114) と、

前記サンプル (116) からの前記蛍光放射を測定するよう構成された測定手段 (120, 122, 124) と、

少なくとも1のプロセッサ (130) と、

50

を具備しており、前記プロセッサ（１３０）が、

前記サンプル（１１６）の前記蛍光放射の蛍光寿命（ τ_1 ）を判定し、

前記蛍光寿命（ τ_1 ）での前記蛍光放射の強度（ A_1 ）を判定し、

前記蛍光寿命（ τ_1 ）での前記蛍光放射の強度（ A_1 ）の関数として、前記抗凝固剤の量（ c ）を判定するよう構成されていることを特徴とする装置。

【請求項１２】

さらに、前記１のプロセッサ（１３０）が、

前記サンプル（１１６）の前記蛍光放射の第２の蛍光寿命（ τ_2 ）を判定し、

前記第２の蛍光寿命（ τ_2 ）での前記蛍光放射の強度（ A_2 ）を判定し、

前記第２の蛍光寿命（ τ_2 ）での前記蛍光放射の強度（ A_2 ）の関数として、前記抗凝固剤の量（ c ）を判定するよう構成されることを特徴とする請求項１１に記載の装置。

10

【請求項１３】

さらに、前記１のプロセッサ（１３０）が、

前記サンプル（１１６）の前記蛍光放射の第３の蛍光寿命（ τ_3 ）を判定し、

前記第３の蛍光寿命（ τ_3 ）での前記蛍光放射の強度（ A_3 ）を判定し、

前記第３の蛍光寿命（ τ_3 ）での前記蛍光放射の強度（ A_3 ）の関数として、前記抗凝固剤の量（ c ）を判定するよう構成されることを特徴とする請求項１２に記載の装置。

【請求項１４】

さらに、前記プロセッサ（１３０）が、少なくとも１の蛍光寿命（ τ_1 ； τ_2 ； τ_3 ）の強度（ A_1 ； A_2 ； A_3 ）と特定の量値（ c_{ref} ）に関する既知の強度値（ A_{ref1} ； A_{ref2} ； A_{ref3} ）とを比較することによって、前記量（ c ）を判定するよう構成されることを特徴とする請求項１１乃至１３のいずれか１項に記載の装置。

20

【請求項１５】

さらに、前記プロセッサ（１３０）が、少なくとも１の蛍光寿命（ τ_1 ； τ_2 ； τ_3 ）と特定の量値（ c_{ref} ）に関する既知の蛍光寿命（ τ_{ref1} ； τ_{ref2} ； τ_{ref3} ）とを比較することによって、前記量（ c ）を判定するよう構成されることを特徴とする請求項１１乃至１４のいずれか１項に記載の装置。

【請求項１６】

さらに、前記プロセッサ（１３０）が、特定の量値（ c_{ref} ）に関する既知の強度値（ A_{ref1} ； A_{ref2} ； A_{ref3} ）に、蛍光寿命（ τ_1 ； τ_2 ； τ_3 ）の少なくとも１の強度（ A_1 ； A_2 ； A_3 ）をフィッティングするように回帰分析を使用することによって、前記量（ c ）を判定するよう構成されることを特徴とする請求項１１乃至１５のいずれか１項に記載の装置。

30

【請求項１７】

さらに、前記プロセッサ（１３０）が、少なくとも１の蛍光寿命（ τ_1 ； τ_2 ； τ_3 ）と特定の量値（ c_{ref} ）に関する少なくとも１の既知の蛍光寿命（ τ_{ref1} ； τ_{ref2} ； τ_{ref3} ）との間の相関関係を使用することによって、前記量（ c ）を判定するよう構成されることを特徴とする請求項１１乃至１６のいずれか１項に記載の装置。

【請求項１８】

時間分解蛍光分光測定を実行することによって、前記サンプル（１１６）からの前記蛍光放射を測定するよう構成されていることを特徴とする請求項１１乃至１７のいずれか１項に記載の装置。

40

【請求項１９】

前記ビタミンＫ拮抗性抗凝固剤が、クマリンの合成誘導体であることを特徴とすることを特徴とする請求項１１乃至１８のいずれか１項に記載の装置。

【請求項２０】

前記ビタミンＫ拮抗性抗凝固剤が、ワルファリンであることを特徴とする請求項１１乃至１９のいずれか１項に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

50

【0001】

本発明の分野は、サンプル中のビタミンK拮抗性抗凝固剤の存在を測定するための方法及び装置に関する。

【背景技術】

【0002】

今日において、薬理活性の薬剤が、作用部位で治療濃度に達しこれを保持する場合、体内のみで有効である。溶解度、分配係数、浸透性、タンパク結合といった薬剤学的性質が、体内での沈着に寄与し、多くの場合、これらの特性は臨床転帰の重要な決定要因である。また、薬剤の発見における組み合わせ化学の近年の成功は、薬剤学的性質を判断するための迅速且つ資源を節約する方法とした関心を高めている。

10

【0003】

薬剤の活性及びその沈着方法に影響を及ぼすため、血清タンパク質への薬剤の結合は特に重要である。「遊離薬物」の仮説によれば、非結合の薬剤のみが薬理活性を与え、沈着は多くの場合薬剤の結合によって変えられる。このため、血清タンパクに関する薬剤の親和性を知ることが重要である。

【0004】

このような薬剤の一例は、クマリンに由来するビタミンK拮抗性抗凝固剤であるワルファリンである。ワルファリンは、心臓発作及び脳卒中といった血栓疾患の治療で広く使用されている臨床的に重要な薬剤である。この薬剤の作用のメカニズムは、血液の凝固に重要な酵素ビタミンK依存性還元酵素（VKOR）の抑制に基づいている。血漿の中への導入される場合、99%のワルファリンが、血漿輸送タンパク質、血清アルブミン（HSA）に結合すると報告されている（Yacobira, Clin. Pharmacol. Ther. 1976, 19, 552-558）。HSAが多形を呈するという事実により、且つ治療濃度域が非常に狭いという事実により、薬剤投与の効果の注意深いモニタリングを実施する必要がある。

20

【0005】

さらに、例えば、食物摂取及び新陳代謝率といった他の因子がワルファリンの抗凝固性の効果に影響を及ぼすものとされている。現在のところ、ワルファリンによるVKORの抑制が、凝固時間（プロトロンビン時間）を測定する間接的な方法によって測定されている。このような方法の自己モニタリングは問題があるため、例えば患者の血液中のワルファリンの存在の量又は濃度の判定に関する、理想的には強固且つ高感度な代替的な方法の開発が望ましい。

30

【0006】

透析、限外ろ過、円偏光二色性、及び外因性蛍光を含むタンパク質結合測定に関する他の方法が提案されていることに留意されたい。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記の観点から、上述の方法及び従来技術の改良を提供するのが本発明の目的である。特に、患者の中のワルファリンといったビタミンK拮抗性抗凝固剤の量を効果的に検出するための方法及び装置を提供するのが目的である。

40

【0008】

このため、サンプル中のビタミンK拮抗性抗凝固剤を測定するための方法が提供されており、この方法は：光の吸収を通して抗凝固剤を活性化するために、光源からの光をサンプルに照射するステップであって、サンプルの活性化によりサンプルから蛍光放射をもたらすステップと；サンプルからの蛍光放射を測定するステップと；サンプルの蛍光放射の蛍光寿命を判定するステップと；蛍光寿命での蛍光放射の強度の関数として、抗凝固剤の量を判定するステップと；を具える。

【0009】

上記の蛍光寿命及び強度は、第1の蛍光寿命及び第1の強度と称され、このケースでは

50

、本方法は：サンプルの蛍光放射の i) 第 2 の又は i i) 第 2 及び第 3 の蛍光寿命を判定するステップと；各蛍光寿命での蛍光放射の強度を判定するステップと；各蛍光寿命での蛍光放射の強度の関数として、抗凝固剤の量を判定するステップと；を具える。

【0010】

また、ワルファリンの量を判定するステップが、濃度値が量値に関連するため、ワルファリンの濃度を判定する可能性を具える。したがって、この場合「量」は、濃度値がサンプルの容量値と組み合わせて量値を用いて判定される限り、「濃度」として解釈され、その逆もまたいえる。

【0011】

本発明の別の態様によれば、サンプルに存在するビタミン K 拮抗性抗凝固剤を測定するための装置が提供され、この装置は：光の吸収を通して抗凝固剤を活性化するために、サンプルに光を照射するよう構成された光源であって、サンプルの活性化によりサンプルから蛍光放射をもたらす光源と；サンプルからの蛍光放射を測定するよう構成された測定手段と； i) サンプルの蛍光放射の蛍光寿命を判定し、 i i) 蛍光寿命での蛍光放射の強度を判定し、 i i i) 蛍光寿命での蛍光放射の強度の関数として、抗凝固剤の量を判定するよう構成された少なくとも 1 のプロセッサと；を有する。

10

【0012】

独創的な装置は、独創的な方法に関連して上記又は以下の態様のうちの任意のものを実行するよう構成された手段を具えており、対応する利点を有する。特に、強度に関連する第 2 又は第 2 及び第 3 の蛍光寿命が量を見積もるために判定且つ使用される。

20

【0013】

手短に述べると、ワルファリンのクマリン環状構造の蛍光特性により (de Mello ら, J. Phys. Chem. 1994, 98, 6054-6058)、このような薬剤の時間分解蛍光分光検出を可能にする。

【0014】

一連の理論的且つ分光学的研究を用いた近年の研究 (Karlsson ら, J. Phys. Chem. B 2007, 111, 10520-10528) は、ワルファリンの複雑な特性、特にその媒体依存の異性体を強調するが、例えばワルファリンの直接的判定のための分光学に基づく方法がなぜ公開されないかを示している。

【0015】

30

ワルファリンの分子環境、異性体分布及び分光学的特性間の関係の解明が、ワルファリン検出及び定量化方法を開発するための原理を予想外に提供し、これは、例えば血漿中でタンパク質に結合された状態又は自由な状態といった様々な状態のワルファリンの違いを識別できる。

【0016】

示すように、本発明は、血漿中でタンパク質に結合した又は自由なワルファリンの時間分解蛍光分光検出及び定量化を提供する。さらに詳細には、これは、血液凝固に関するワルファリンの効果の効果的且つ直接的なモニタリングのための新規な代替的方法を促進する。

【図面の簡単な説明】

40

【0017】

ここで、添付の概略図を参照して、例として本発明の実施例を説明することとする。

【0018】

【図 1】図 1 は、ビタミン K 拮抗性抗凝固剤を検出するための本発明に係る装置を示す。

【図 2】図 2 は、図 1 の装置を組み込んだユーザー機器を示す。

【図 3】図 3 は、本発明の一実施例に係る測定及び分析方法のフローチャートを示す。

【図 4】図 4 は、様々な蛍光寿命及び強度値におけるワルファリンの量を示す。

【図 5】図 5 は、ワルファリン療法の下で患者から採取されたサンプルについて測定された、様々なワルファリンの量及び強度値における様々な蛍光寿命の分布を示す。

【発明を実施するための形態】

50

【0019】

図1を参照すると、ビタミンK拮抗性抗凝固剤を検出するための装置102が、ワルファリン又は他のクマリン誘導体といった薬剤の存在に関して分析されるサンプル116を含む容器118を有する。

【0020】

サンプル116に励起光のパルス照射する励起光源114が提供されている。光源114は、好適にはパルスレーザであるが、発光ダイオードでもよい。光源駆動及び制御ユニット112はレーザ出力供給部を含んでおり、フォトンタイミングユニット124にトリガ信号110を発生させるよう構成される。励起光の繰り返し率は、次の励起パルスの前にサンプル116の蛍光が実質的に遅れ得るよう十分に低い。例えば約1MHzのパルス周波数が一般に適切である。パルス励起光の継続時間は、信頼性のある寿命測定を得るために蛍光色素分子（すなわち、薬剤）の蛍光寿命よりも顕著に短い。

10

【0021】

典型的な蛍光色素分子は、0.02乃至20nsの範囲の蛍光寿命を有しており、光パルスの適切な長さは0.001nsのオーダーである。パルスの周波数は、試験されるサンプルのために典型的に調整されるパラメータの一例である。さらに、光源114及び光源駆動及び制御ユニット112は、例えばサンプル中の蛍光色素分子の量、必要とする結果の精度等を説明するために、パルスの数及び励起光の強度といった他のパラメータの調整をし易くする。上記の特性及び駆動及び制御ユニットを備えた、例えば、パルスレーザ又は発光ダイオードといった光源は、当技術分野で周知であり市販されている。

20

【0022】

照射される蛍光光子を検出する目的を有する光検出器120が、サンプル116を含む容器118に隣接して配置されている。様々な光学素子がサンプル118と検出器120との間に配置されている。例えば、いくつかのレンズを使用して、サンプル118から集められる蛍光の量を最大限にして、検出器120に光を集光する。さらに、ダイクロイックミラー及びフィルタを使用して波長の範囲を選択して励起光が検出器120に達するのを防止でき、蛍光色素分子の蛍光スペクトルに対応する波長の範囲を有する光のみを検出器120に到達させる。

【0023】

また、光学素子を使用して、蛍光ビームをいくつかのビームに分岐でき、異なる検出器に向けられる。このようなビーム分岐は、例えば、ビーム分割キューブ又は多重分岐光ファイバを使用することによって、様々な方法で達成し得る。このような素子は、当技術分野で周知であり、市販されている。

30

【0024】

光検出器120は、好適には、フォトン計測光電子増倍管(PMT)を具えるが、アバランシェフォトダイオードといった他の検出器を使用できる。検出器120からの信号は、一般に、プリアンプ122で増幅される。増幅後、信号は、信号から望ましくないノイズを除去してPMTのフォトンによって発生する電気パルスのみを残す弁別器ユニットを通過し得る。そして、弁別器ユニットは、フォトンタイミングユニット124に結合される。

40

【0025】

フォトンタイミングユニット124は、高速のアナログデジタル変換器(A/D変換器)及びデータ点を記憶するためのメモリを具える。上述のように、励起毎に、励起光パルスによって生じる2以上のフォトン、光検出器120及びフォトンタイミングユニット124によって記録することが可能である。PMTによって検出されるフォトン出力パルスを引き起こし、パルスが集められる毎に(6乃至10といった)適切な数のデータ点の時間内のPMTパルスの位置を特定する。

【0026】

収集されるデータ点は、フォトンタイミングユニット124の中又は代替的に外部のコンピュータ130の中に存在するソフトウェアプログラムモジュールとして実現される到

50

達時間判定モジュール126によって分析され、蛍光光子の到達時間を判定する。到達時間の判定に関する適切なアルゴリズムの例は当技術分野で周知であり、現在市販されている機器で実施される。

【0027】

分析モジュール132は、到達時間判定モジュール126からのフォトン到達時間のデータセットを受信且つ分析するよう構成される。このモジュール132は、好適には、コンピュータ130で実施されコンピュータ130で実行されるソフトウェアプログラムモジュール131である。コンピュータ130は関連するメモリデバイス（図示せず）を具えたマイクロプロセッサであるが、従来型のPCとすることができる。マイクロプロセッサ130には、システム102の他のユニットに接続された通信手段（図示せず）が設けられている。

10

【0028】

また、測定制御のためのソフトウェアプログラムモジュール133が、マイクロプロセッサ130に設けられマイクロプロセッサ130で実行される。当業者が理解するように、ソフトウェアモジュール126、132及び133の組み込み及び実行は、様々な方法且つ様々なコンピュータ構成で行われる。例えば、測定制御ユニット133を、実験室での条件に適したPCで実行でき、到達時間判定モジュール126をフォトンタイミングユニットの中に組み込むことができ、特定の目的のマシンの分析モジュール132を特定の分析に要する高い計算スピードのために設計し得る。

20

【0029】

光検出器120、プリアンプ122及びフォトンタイミングユニット124を、サンプル116からの蛍光発光を測定するよう構成するように測定手段として組み合わせることができる一方、コンピュータ130を下記の方法を実施するソフトウェア命令を実行するプロセッサとすることができる。

【0030】

しかしながら、装置102は、好適には、図2に示すように小さな携帯ユニット202に組み込むことができる。このユニット202は、取扱説明及び「オン／オフ」、「測定実施」等の命令を介してデバイスを動作させるためのボタン206、208の操作のためのLCDディスプレイ204を有する。容器210は、サンプルを受容するためにデバイス202の正面に設けられており、図1の装置の残りの要素が、携帯用デバイス202の内部に設けられている。好適には、デバイス202は、内部バッテリーによって電力を供給されるが、アダプタユニットもまた使用できる。

30

【0031】

下記のように、蛍光寿命の非常に特定な値及び関連する強度値が、ワルファリンが検出すべき薬剤のケースで判定され、これにより装置102の構成要素を最適化できることで、デバイス202で使用する場合により小さくなる。

【0032】

図3を参照すると、本装置を実施する方法が説明されており、この方法は、サンプル116に存在するワルファリンといったビタミンK拮抗性抗凝固剤を測定するためのステップを実施する。

40

【0033】

この方法は、ソフトウェア命令、すなわち、ここで開示された方法を実行するためのコンピュータプログラムコードとして実施され、Java（登録商標）、C、及び／又はC++といった高レベルのプログラミング言語又はインタープリタ型言語といった他のプログラミング言語で書かれているが、これらに限定されない。いくつかのモジュール又はルーチンをアセンブリ言語又はマイクロコードに書くことができ、性能及び／又はメモリ使用量を高めることができる。さらに、本方法の機能的ステップのいくつか又は総ての機能を、別々のハードウェア構成要素、1又はそれ以上のアプリケーションに特有な集積回路、又はプログラムされたデジタル信号プロセッサ又はマイクロコントローラを用いて実施できることが明らかである。

50

【0034】

本方法では、まず、サンプル116に、光の抗凝固剤による吸収を通して抗凝固剤を活性化させる光源114から光を照射する304。サンプル116の活性化によりサンプル116から蛍光放射が生じ、この蛍光放射が測定される306。次に、蛍光放射の蛍光寿命 τ_1 を判定し308、その後、蛍光寿命 τ_1 での蛍光放射の強度 A_1 を判定する310。最後に、抗凝固剤の量又は濃度 c を蛍光寿命 τ_1 での強度 A_1 の関数として判定する312。

【0035】

サンプル116の蛍光放射の第2の蛍光寿命 τ_2 を判定でき308b、これは第1の蛍光寿命 τ_1 の判定と同時に終わる。第2の蛍光寿命 τ_2 での蛍光放射の強度 A_2 もまた（第1の強度 A_1 の判定と同時に且つ同じ方法で）判定される310b。このケースでは、抗凝固剤の量 c を判定する際に、 τ_1 及び A_1 の使用と同じ方法で τ_2 及び A_2 の値を用いることによって、量が第2の蛍光寿命 τ_2 での第2の強度 A_2 の関数として判定される312b。第2の蛍光寿命での強度を考慮することによって、ワルファリンの様々な状態（例えば、非結合のワルファリン又はタンパク質に結合したワルファリン）が異なる蛍光寿命を有して現れるため、ワルファリンの量のより「正確な」予測が可能となる。

【0036】

同じ目的のために、第3の蛍光寿命 τ_3 及び第3の強度 A_3 を判定でき、同じような方法で使用できる。これは、様々な個人に関して最良の（固有の）治療濃度域を判定する際にHSAへのワルファリンの結合を考慮する場合に、第2の寿命 τ_2 及び強度 A_2 とともに特に関連がある。

【0037】

いくつかの寿命と強度との関連が、時間分解蛍光分光法測定によって試験の際に示され、PBS（リン酸緩衝食塩水）でのHSAへのワルファリンの結合が調査された。

【0038】

これらの試験の際に、334nmでの活性化が、3つの明らかに区別できる $\tau_1 < 100$ ps、 $\tau_2 = 1 - 1.5$ ns及び $\tau_3 = 3 - 4$ nsからなる蛍光寿命を具えるワルファリン及びHSAの脱プロトン化形式の相互作用に関する情報を出すことが観察された。334nmの活性化に関して、HSAは活性化しない一方、ワルファリンの脱プロトン化形式が観察される放射に寄与する。PBS中の分離したワルファリンは、非分解の活性化状態の寿命、すなわち $\tau_1 \leq 100$ psを与えた。これらの試験から、測定される最も短い蛍光寿命（ τ_1 ）が、バルクの溶媒にアクセス可能な溶液中のワルファリンの自由な非結合部に由来することが分かり、2つの長い寿命（ τ_2 、 τ_3 ）がHSAへの結合状態に由来することが分かった。したがって、いくつかの寿命を使用することで、それぞれの患者について適切なワルファリンの投与を判断する際の精度が改善されることが分かった。

【0039】

量 c の判定は、少なくとも1の蛍光寿命 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 の強度 A_1 、 A_2 、 A_3 と、特定の（既知の）量 c_{ref} に関連する既知の強度値 A_{ref1} 、 A_{ref2} 、 A_{ref3} との比較を含む。同じような方法で、 c の判定が、少なくとも1の蛍光寿命 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 と特定の量 c_{ref} に関連する既知の蛍光寿命 τ_{ref1} 、 τ_{ref2} 、 τ_{ref3} との比較を含む。

【0040】

さらに、このような比較演算を図4のグラフに示しており、x軸はヒトの血液のサンプル中に存在する（ワルファリンの量に関連する）ワルファリンの量を示し、y軸はワルファリンの量（ c_{ref} ）のパーセンテージとして測定された強度値（ A_{ref1} 、 A_{ref2} 、 A_{ref3} ）を示し、すなわち、 A_{ref1} 、 A_{ref2} 及び A_{ref3} の和が100%又は1.00である。各強度（振幅）は、ある程度一定な蛍光寿命（ τ_{ref1} 、 τ_{ref2} 、 τ_{ref3} ）に関連するため、どのくらいの量のワルファリンがタンパク質に結合され及び結合されていないかを判定することが可能である。

【0041】

図示するように、図4の強度値及び蛍光寿命は、参照値 A_{ref1} 、 A_{ref2} 、 A_{ref3} 及び τ_{ref1} 、 τ_{ref2} 、 τ_{ref3} に対応し、 A_1 、 A_2 、 A_3 及び τ_1 、 τ_2 、 τ_3 を知ることによって且つこれらの値を参照値と比較することによって、ワルファリンの量を図から読み取ることができる。

【0042】

比較を改善するために、量 c の判定が、蛍光寿命 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 の少なくとも1の（好適には全部の）強度値 A_1 、 A_2 、 A_3 を、特性の量値 c_{ref} に関連する既知の強度値 A_{ref1} 、 A_{ref2} 、 A_{ref3} にフィッティングするための回帰分析の使用を含む。同じことが蛍光寿命 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 に関して適用され、すなわち、量 c の判定が、少なくとも1の蛍光寿命 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 を、特性の量値 c_{ref} に関連する既知の蛍光寿命 τ_{ref1} 、 τ_{ref2} 、 τ_{ref3} にフィッティングするための回帰分析の使用を含む。このような方法での回帰分析の適用は、蛍光寿命 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 と既知の蛍光寿命 τ_{ref1} 、 τ_{ref2} 、 τ_{ref3} との間の相互関係の使用の一例であり、他の方法もまた使用できる。

10

【0043】

また、この方法は、蛍光寿命 τ_1 、 τ_2 、 τ_3 での蛍光放射の強度値 A_1 、 A_2 、 A_3 を判定する際310の確率分布の計算を含んでいる。上記の回帰分析を実施するとともにこのような目的のために、公表されているGNU科学ライブラリーを使用できる。

【0044】

図示するように、サンプルからの蛍光放射の測定は、時間分解蛍光分光法による測定を含む。使用される光源からの光が、実質的に一定の波長を有しており、ワルファリンの活性化に適した、305nm乃至350nmといった又は特に334nmといった、より特定の波長を有する。結果を改善するために、蛍光放射の測定を実行する際にサンプル116を攪拌するが、これは容器が攪拌手段を具えることを意味する。

20

【0045】

図4のグラフを使用して数値的な例を示すために、患者の血液サンプルが、一般に、0.51の測定強度値 A_m を具えた第1の蛍光寿命 τ_1 を示す。このようなケースでは、図4に示す点線のように、ワルファリンの測定量 c_m は6.25 μm である。

【0046】

したがって、第1の蛍光寿命の測定強度が、特定のワルファリン量値（図4のx軸の値）に関連する既知の強度値（図4のy軸の値）と比較される。（第1の蛍光寿命に関する）適切な曲線を使用するため、量の判定もまた測定される蛍光寿命と、特定のワルファリン量値に関連する既知の蛍光寿命（すなわち、図4のグラフの曲線のうちの1）との比較を含む。

30

【0047】

数値例は第1の蛍光寿命を説明しているが、同じものを第2及び第3の蛍光寿命に適用する。当然ながら、結果を改善するために、例えば変動する測定精度のためにわずかに異なる量値を示す場合に、測定値 A_1 、 A_2 、 A_3 に重みを付けて結果を改善するための様々な統計的な方法を使用できる。

【0048】

ワルファリンの量から濃度が判定される場合に、ワルファリンの量が、量が判定されるサンプルの容量によって分割される。さらに、ワルファリンの状態（非結合又は結合タイプのワルファリン）を分析するために、 A_1 、 A_2 、 A_3 の分布を使用できる。

40

【0049】

また、ワルファリンの量を使用して、血液の凝集時間を判定できる。しかしながら、凝集時間は、多くの場合、サンプルが採取された患者に関して個別のものであり、ワルファリンの凝集時間と量／濃度値とを関連付けるために経験的方法を使用でき、すなわち、様々なワルファリンの量／濃度を有する血液サンプルのセットについての凝集時間のセットが判定される。しかしながら、このような関連付けが一度なされると、薬剤が治療濃度域内にあるかどうかを判断するのにワルファリンの量／濃度値を知ることが十分である。

50

【0050】

実施例

上記のように、任意のサンプル中の量を判定するために必要なデータ（図4を参照）を作り出す場合に、リン酸緩衝生理食塩水で緩衝化したヒトの血液に関して図1の装置の実験的バージョンを使用した。緩衝液を使用したとしても、人間から直接的に採取される血液に関して同じ結果を得ることに留意されたい。いずれのケースにおいても、実験装置のバージョンが、図1の装置102のような同じ方法で作動する。

【0051】

試験装置のバージョンでは、時間分解蛍光分光法による測定が、時間相関単一光子計数（TCSPC）システム、IBH5000M（Jobin Yvon IBH Ltd., Glasgow, UK）で実施された。振幅 A_i に関連する蛍光寿命（遅延時間） τ_i を、334nm（PBSでのワルファリン-ヒトの血漿の結合試験）及び1.0MHzの繰り返し率で励起パルスが発生させる発光ダイオードNanoLED-17（HORIA Jobin Yvon IBH）を用いて判定した。32nmのスペクトル帯域幅セットを具える単一格子単色光分光器（Model 5000M IBH）を使用した。4048チャンネルでデータを収集し、時間較正は13.4ps/チャンネルであった。TCSPC条件の下でIBH TBX-04光子検出モジュールによって蛍光放射を検出し、機械応答関数の半値全幅（fwhm）は、一般に、約560psであり、脱イオン水に溶解するシリカ粒子（Ludox TMA-34 Sigma-Aldrich）の懸濁液で測定された。

【0052】

総ての試験は、励起光に対して90°の角度で主に390nmにおいて（PBS中のワルファリン-ヒトの血漿の結合試験）動態（kinetics）をモニタリングすることによって実施された。時間分解蛍光データを、実験的な応答関数を具える最小自乗適合アルゴリズム及び再畳み込みに基づいて機能するIBH DAS6劣化解析ソフトウェアを用いて分析した。3つの劣化時間は、一般に、満足できる適合結果を得ること、すなわち $\chi^2 \leq 1.2$ を要した。時間（t）依存からの適合結果を、式（2）に関する振幅（ A_i ）及び劣化時間（ τ_i ）として示した。

$$F(t) = A_0 + A_1 e^{-\frac{t}{\tau_1}} + A_2 e^{-\frac{t}{\tau_2}} + A_3 e^{-\frac{t}{\tau_3}}$$

【0053】

新たに凍結した血漿が取得され、初めにヒトの血液がクエン酸塩の添加物とともに試験管に採取された。第2のステップで、血漿が、20分間、室温において3000乃至3500gの遠心力によって分離し、最終的に-80℃で保存された。使用した緩衝液は、pH7.3の0.5Mの Na_2HPO_4 （Scharlau）/ KH_2PO_4 （Merck）及び0.1MのNaClからなる（PBS）であった。

【0054】

蛍光分光測定は、一般に、室温において標準的な石英キュベット（1cmの経路長、3mLの総容量）を用いて連続的な攪拌の下で実行された。蛍光試験の前に、血清血漿タンパク質へのワルファリンの結合を調査するために、新たに凍結された血漿を37℃で解凍し、一定分量（600μL）をPBS（総容量2mL、培養時間10分）中の薬剤の治療濃度域（0.1-14μM）内の様々な量のワルファリンとともに表1に示す。

【0055】

試験によって得られたデータを、以下の表1に示す。

[ワルファリン] μM		寿命 (ns)			振幅 (%)			χ^2
		τ_1	τ_2	τ_3	A_1	A_2	A_3	
血漿 (14 mg/mL)	0	0.07	1.9	8.4	87	7	6	1.04
	0.5	0.07	1.8	7.8	84	11	6	1.09
	10	0.15	1.5	4.3	44	43	14	1.18
HSA (0.65 mg/mL)	10	0.22	1.3	3.7	25	46	29	0.82

表 1

10

【0056】

ここで説明される方法及び装置を検証するために、ワルファリンを処方した患者から採取されたサンプルについてさらなる試験を行っている。このような検証では、（ワルファリンの量が既知の）ヒトの血液のスパイクしたサンプルについて振幅及び寿命が測定される一連の試験が行われた。そして、これらの測定からの結果を、各蛍光寿命における振幅に基づいて、ワルファリンを処方した2人の患者の血中のワルファリンの量を判定するために使用した。

【0057】

以下の表2では、これらの試験からの結果を与えており、ナノ秒の蛍光寿命（ τ_i ）が、（上記の表1のように）血漿中の様々なワルファリンの濃度に関して相対振幅（ A_i ）の対応するパーセンテージ値を与える。これらの値は、3つの測定値の平均値±平均値の標準誤差として与えられる。

20

[ワルファリン] (μM)		蛍光寿命 (ns)			振幅 (%)		
		τ_1	τ_2	τ_3	A_1	A_2	A_3
0.0		0.07 ± 0.01		3.40 ± 0.07	97.2 ± 0.1		2.8 ± 0.1
0.1		0.07 ± 0.01		3.25 ± 0.04	96.8 ± 0.1		3.2 ± 0.1
0.5		0.08 ± 0.00	1.54 ± 0.02	4.54 ± 0.16	94.2 ± 0.2	3.7 ± 0.0	2.1 ± 0.2
1.0		0.08 ± 0.00	1.48 ± 0.04	4.12 ± 0.01	91.5 ± 0.3	5.8 ± 0.2	2.8 ± 0.1
2.0		0.09 ± 0.01	1.43 ± 0.07	3.78 ± 0.09	85.5 ± 1.6	9.9 ± 0.9	4.6 ± 0.8
5.0		0.10 ± 0.00	1.25 ± 0.04	3.22 ± 0.03	75.5 ± 1.3	16.2 ± 0.7	8.4 ± 0.7
10		0.12 ± 0.00	1.27 ± 0.06	3.11 ± 0.04	59.7 ± 2.5	24.9 ± 1.0	15.4 ± 1.6
15		0.14 ± 0.00	1.19 ± 0.09	2.96 ± 0.10	52.6 ± 4.9	27.9 ± 2.0	19.5 ± 3.2
患者番号1		0.10 ± 0.00	1.50 ± 0.04	4.05 ± 0.01	69.4 ± 0.2	21.0 ± 0.2	9.6 ± 0.1
患者番号2		0.06 ± 0.00		2.77 ± 0.02	96.0 ± 0.3		4.0 ± 0.3

表 2

30

【0058】

血液サンプルは、ワルファリンで治療される2人の患者（患者番号1及び患者番号2）から採取された。血液サンプルの検索に関連して、周知のタイプの血液の凝固の測定指標である、患者それぞれの国際標準化比率（INR）を測定した。INR測定値は、患者番号1が3.0のINR値を有する一方、患者番号2が1.9のINR値を有することを示した。

40

【0059】

図5は、表2の数をグラフで示しており、患者に関する測定結果（垂直な点線）を、スパイクされたサンプルの測定値に対して見ることができる。図5に示すように、患者番号1に関する振幅値は、7 μM のワルファリンの量に対応する一方、患者番号2に関する振幅値は、約0.2 μM に対応する。図示するように、試験は、INR、すなわち血液の凝固と血液中のワルファリンの量との間の明らかな相関関係を示す。

【0060】

また、結合／非結合の相対量を測定できる一方、同時にトータルの濃度を得ることが結果から明らかであり、上記のように、最も短い蛍光寿命（ τ_1 ）は一般にワルファリンの非結合部に由来する一方、2つの長い寿命（ τ_2 、 τ_3 ）は結合状態に由来することが分

50

かる。

【0061】

本発明の様々な実施例を説明且つ図示したが、本発明はそれらに限定されず、以下の特許請求の範囲で既定される本発明の範囲内の他の方法でも実施できる。特に、サンプルを励起するための他の技術を用いて本発明を実施し得る。例えば、患者の皮膚又は目に照射し、その後、皮膚／目の薬剤からの蛍光放射を測定する。その次のステップは、サンプルが血液又は他の体液である場合に使用される方法と同じであるが、示したように、「サンプル」は必ずしも患者から取り出され又は採取される必要がない。

【図 1】

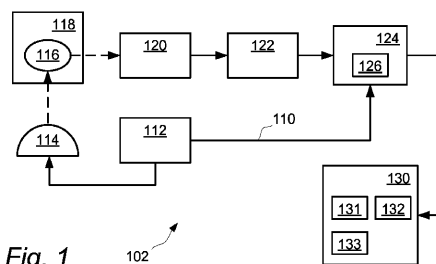


Fig. 1

【図 2】

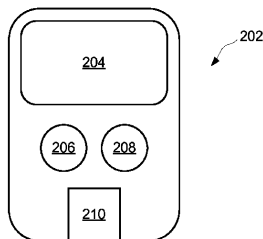


Fig. 2

【図 3】

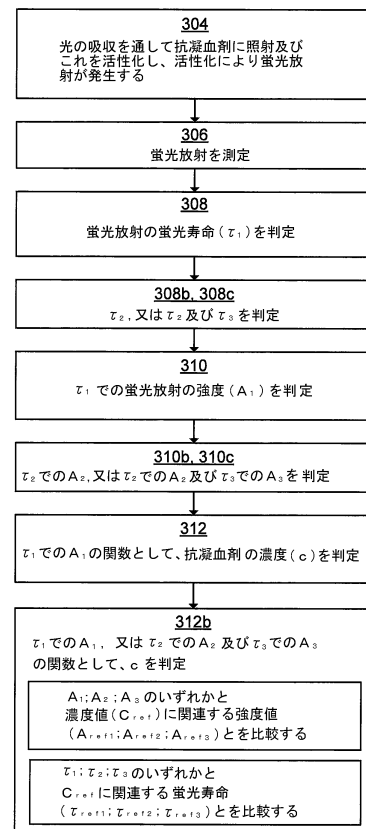


Fig. 3

【図 4】

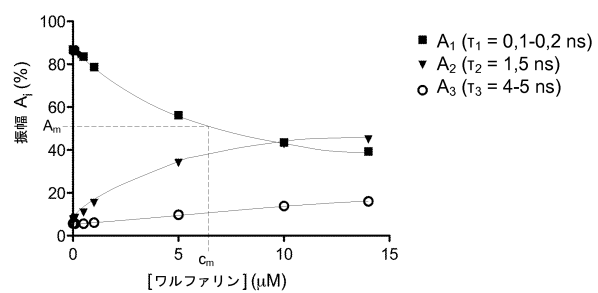


Fig. 4

【図 5】

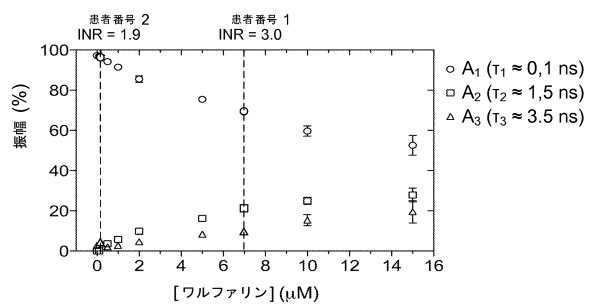


Fig. 5

フロントページの続き

(73)特許権者 511241170

ローセングレン, アンニカ, エム.

ROSENGREN, Annika, M.

スウェーデン王国 エス-39364 カルマル, エルタッパージェン 10

(73)特許権者 511241181

アンデッソン, ペル, オラ

ANDERSSON, Per, Ola

スウェーデン王国 エス-90742 ウメオ, マルモルヴェーゲン 19

(74)代理人 110001302

特許業務法人北青山インターナショナル

(72)発明者 ニコルス, イアン エイ.

スウェーデン王国 エス-39247 カルマル, ステーンヴィクスヴェーゲン 16

(72)発明者 カールソン, ビョルン セー., ゲー.

スウェーデン王国 エス-39359 カルマル, ヴィオールヴェーゲン 11

(72)発明者 ローセングレン, アンニカ, エム.

スウェーデン王国 エス-39364 カルマル, エルタッパージェン 10

(72)発明者 アンデッソン, ペル, オラ

スウェーデン王国 エス-90742 ウメオ, マルモルヴェーゲン 19

審査官 伊藤 裕美

(56)参考文献 特表2007-504462 (JP, A)

特開2007-033159 (JP, A)

再公表特許第2004/090517 (JP, A1)

特表2003-514849 (JP, A)

特開2001-349833 (JP, A)

特開昭61-241639 (JP, A)

KARLSSON B C G, THE SPECTROPHYSICS OF WARFARIN: IMPLICATIONS FOR PROTEIN BINDING, JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B, 米国, AMERICAN CHEMICAL SOCIETY, 2007年 9月 6日, V111 N35, P10520-10528

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 21/62-21/74