

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4671823号
(P4671823)

(45) 発行日 平成23年4月20日(2011.4.20)

(24) 登録日 平成23年1月28日(2011.1.28)

(51) Int.Cl. F I
GO 1 N 33/86 (2006.01) GO 1 N 33/86
GO 1 N 33/48 (2006.01) GO 1 N 33/48 B

請求項の数 19 (全 22 頁)

(21) 出願番号	特願2005-273200 (P2005-273200)	(73) 特許権者	390014960
(22) 出願日	平成17年9月21日(2005.9.21)		シスメックス株式会社
(65) 公開番号	特開2006-119126 (P2006-119126A)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号
(43) 公開日	平成18年5月11日(2006.5.11)	(74) 代理人	100109793
審査請求日	平成20年9月4日(2008.9.4)		弁理士 神谷 恵理子
(31) 優先権主張番号	特願2004-278851 (P2004-278851)	(72) 発明者	奥田 昌宏
(32) 優先日	平成16年9月27日(2004.9.27)		兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
(33) 優先権主張国	日本国(JP)	(72) 発明者	山本 能人
			兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番1号 シスメックス株式会社内
		(72) 発明者	吉岡 章
			奈良県奈良市高畑町1458-3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 血液凝固因子の不活化方法及び血液凝固因子不活化試料

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

第V因子及び第VII因子の少なくともいずれか一方を含む試料をイミノジ酢酸基(-N(CH₂COOR)₂、Rが水素又は金属イオンを示す)を有する化合物と接触させて、該試料中の第V因子及び第VII因子の少なくともいずれか一方を、不活化型に変化させる工程を含む血液凝固因子の不活化方法。

【請求項2】

前記イミノジ酢酸基のRが、一価の金属イオンである請求項1に記載の不活化方法。

【請求項3】

前記一価の金属イオンが、ナトリウムイオンである請求項2に記載の不活化方法。

10

【請求項4】

前記イミノジ酢酸基を有する化合物が、前記イミノジ酢酸基を有する担体である請求項1~3のいずれかに記載の不活化方法。

【請求項5】

前記イミノジ酢酸基を有する担体が、前記イミノジ酢酸基を有する陽イオン交換樹脂又は前記イミノジ酢酸基を有する顆粒状アガロースゲルである請求項4に記載の不活化方法。

【請求項6】

前記接触処理は、前記試料に対して、前記担体を5w/v%以上となる割合で行なう請求項4又は5に記載の不活化方法。

【請求項7】

20

前記試料が血漿である請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の不活化方法。

【請求項 8】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の不活化方法により得られた、不活化型の第 V 因子及び不活化型の第 V I I I 因子の少なくともいずれか一方を含有する血液凝固因子不活化試料。

【請求項 9】

さらに、フォンヴィルブランド (von w i l l e b r a n d t) 因子を含有する請求項 8 に記載の血液凝固因子不活化試料。

【請求項 10】

前記フォンヴィルブランド因子は、リストセチンコファクター活性を有している請求項 9 に記載の血液凝固因子不活化試料。

10

【請求項 11】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の不活化方法により得られた、不活化型の第 V 因子及び不活化型の第 V I I I 因子の少なくともいずれか一方を含有する血漿である請求項 8 ~ 10 のいずれかに記載の血液凝固因子不活化試料。

【請求項 12】

検体処理用血漿を用いて、血液検体に含まれる血液凝固因子の活性を測定する方法であって、

血液検体、凝固時間を測定するための測定試薬及び検体処理用血漿を混合して測定用試料を調製する工程；

前記測定用試料における凝固時間を測定する工程；及び

20

前記凝固時間に基づいて血液凝固因子の活性を算出する工程；

を含み、

前記検体処理用血漿が、請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の不活化方法により得られた、不活化型の第 V 因子及び不活化型の第 V I I I 因子を含有する血液凝固因子不活化血漿を含む血液凝固因子活性の測定方法。

【請求項 13】

前記血液凝固因子不活化血漿が、イミノジ酢酸基 (- N (C H 2 C O O R) 2 、 R は水素又は金属イオンを示す) を有する化合物と血漿を接触させる処理により得られたものである請求項 12 に記載の測定方法。

【請求項 14】

30

前記測定試薬がプロトロンビン時間測定試薬であって、

前記血液凝固因子の活性を算出する工程において、第 V 因子の活性を算出する請求項 12 又は 13 の測定方法。

【請求項 15】

前記検体処理用血漿は、さらに活性型に変化可能な第 V I I I 因子を含み、

前記測定試薬がプロトロンビン時間測定試薬であり、

前記血液凝固因子の活性を算出する工程において、第 V 因子の活性を算出する請求項 12 又は 13 に記載の測定方法。

【請求項 16】

40

前記検体処理用血漿は、さらに活性型に変化可能な第 V 因子を含み、

前記測定試薬が、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬であり、

前記血液凝固因子の活性を算出する工程において、第 V 因子の活性を算出する請求項 12 又は 13 に記載の測定方法。

【請求項 17】

前記検体処理用血漿は、さらに活性型に変化可能な第 V I I I 因子を含み、

前記測定試薬が、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬であり、

前記血液凝固因子の活性を算出する工程において、第 V 因子の活性を算出する請求項 12 又は 13 に記載の測定方法。

【請求項 18】

前記血液検体が、血漿である請求項 12 ~ 17 のいずれかに記載の測定方法。

50

【請求項 19】

請求項 1 ~ 6 のいずれかに記載の不活化方法により得られた、不活化型の第 V 因子及び不活化型の第 V I I I 因子を含有する血液凝固因子不活化血漿に、活性型変換可能な第 V 因子又は活性型変換可能な第 V I I I 因子が添加されてなる検体処理用血漿。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、血液凝固因子の不活化方法、及び不活化型の血液凝固因子を含有する血液凝固因子不活化試料に関する。また本発明は、前記血液凝固因子不活化試料を用いた血液凝固因子活性の測定方法、及び当該測定方法に用いる検体処理用血漿に関する。

10

【背景技術】

【0002】

先天性又は後天性血液凝固異常を検査するために血液凝固検査が行なわれる。ここで、先天的な凝固異常として有名な血友病は、血液凝固第 V I I I 因子又は第 I X 因子の欠乏によって起る疾患である。

【0003】

血液凝固異常の検査としては、A P T T (活性化部分トロンボプラスチン時間)、P T (プロトロンビン時間)、フィブリノゲンの定量などがある。血液凝固異常の原因を明らかにするためには、各々の血液凝固因子を測定する必要がある。その方法として、A P T T や P T に基づいて、血液凝固因子の活性を測定する方法が挙げられる。

20

【0004】

ここで、A P T T や P T に基づく凝固因子の活性測定は、各凝固因子欠乏血漿に検査しようとする血液検体を加えて、凝固時間の延長の有無、程度を測定する方法であることから、血液凝固検査には、検査対象とする凝固因子が欠乏している血漿が必要とされる。

【0005】

A P T T や P T の測定に用いる凝固因子欠乏血漿としては、先天的欠乏症のヒト等のほ乳動物の血漿、あるいは正常血漿に所定の凝固因子と結合する抗体を用いた免疫吸着法により所定の凝固因子を除去した人工的欠乏血漿が用いられている。

【0006】

取得容易という点から、人工的欠乏血漿の利用が高まっているが、免疫吸着法による凝固因子の人為的除去は、使用する抗体の調製が困難であったり、第 V 因子又は第 V I I I 因子あるいはフォンヴィルブラント因子 (V W F) が除去されたり、大量の抗体を用いて長時間の吸着除去処理することが必要であるため、製造コストが高いという問題がある。

30

【0007】

免疫吸着法以外に、特許文献 1 (特開 2 0 0 2 - 9 0 3 6 1) に、ヒト血漿と合成ポリマーとを混合させて、凝固因子を吸着除去する方法が提案されている。しかし、この方法では、第 V 因子又は第 V I I I 因子あるいはフォンヴィルブラント因子 (V W F) が除去されるという問題がある。

【0008】

【特許文献 1】特開 2 0 0 2 - 9 0 3 6 1 号

40

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0009】

本発明は、以上のような事情に鑑みてなされたものであり、その目的は、従来の血液凝固因子を吸着除去する方法とは全く異なる新規な方法、すなわち、試料中の血液凝固因子の不活化を、短時間で効率よく行なうことができる方法を提供することにある。また、本発明の目的は、従来の凝固因子欠乏血漿のような血液凝固因子が欠乏している試料とは全く異なる新規な試料、すなわち、不活化型の血液凝固因子を含有する血液凝固因子不活化試料を提供することにある。さらに、本発明の血液凝固因子不活化試料を用いた血液凝固因子の活性測定方法及び当該方法に用いる検体処理用血漿を提供する。

50

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の血液凝固因子の不活化方法は、第V因子及び第VII因子の少なくともいずれか一方を含む試料をイミノ酢酸基（ $-N(CH_2COOR)_2$ 、Rが水素又は金属イオンを示す）を有する化合物と接触させて、該試料中の第V因子及び第VII因子の少なくともいずれか一方を不活化型に変化させる工程を含む。

【0011】

前記イミノ酢酸基のRは一価の金属イオンであることが好ましく、前記一価の金属イオンはナトリウムイオンであることが好ましい。

【0012】

前記イミノ酢酸基を有する化合物は、前記イミノ酢酸基を有する担体であってもよく、この場合、前記イミノ酢酸基を有する陽イオン交換樹脂又は前記イミノ酢酸基を有する顆粒状アガロースゲルであることが好ましい。また、担体を用いる場合の前記接触処理は、前記試料に対して前記担体を5w/v%以上となる割合で行なうことが好ましい。

10

【0013】

本発明の不活化方法で用いられる前記試料は、血漿であることが好ましい。

【0014】

本発明の血液凝固因子不活化試料は、不活化型の第V因子及び不活化型の第VII因子の少なくともいずれか一方を含有するものである。

20

【0015】

さらに、フォンヴィルブランド（von willebrandt）因子を含有することが好ましく、前記フォンヴィルブランド因子は、リストセチンコファクター活性を有していることが好ましい。

【0016】

本発明の血液凝固因子活性の測定方法は、不活化型の第V因子及び不活化型の第VII因子を含有する血液凝固因子不活化血漿を含む検体処理用血漿を用いて、血液検体に含まれる血液凝固因子の活性を測定する方法であって、血液検体、凝固時間を測定するための測定試薬及び検体処理用血漿を混合して測定用試料を調製する工程；当該測定用試料における凝固時間を測定する工程；及び当該凝固時間に基づいて血液凝固因子の活性を算出する工程を含む。

30

【0017】

前記血液凝固因子不活化血漿は、イミノ酢酸基（ $-N(CH_2COOR)_2$ 、Rは水素又は金属イオンを示す）を有する化合物と血漿を接触させる処理により得られたものであることが好ましく、前記血液検体が血漿であることが好ましい。

【0018】

本発明の血液凝固因子活性の測定方法の具体的態様としては、

(1) 前記測定試薬がプロトロンビン時間測定試薬であって、前記血液凝固因子の活性を算出する工程において、第V因子の活性を算出する方法；

(2) 前記検体処理用血漿は、さらに活性型に変化可能な第VII因子を含み、前記測定試薬がプロトロンビン時間測定試薬であり、前記血液凝固因子の活性を算出する工程において、第V因子の活性を算出する方法；

40

(3) 前記検体処理用血漿は、さらに活性型に変化可能な第V因子を含み、前記測定試薬が、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬であり、前記血液凝固因子の活性を算出する工程において、第V因子の活性を算出する方法；

(4) 前記検体処理用血漿は、さらに活性型に変化可能な第VII因子を含み、前記測定試薬が活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬であり、前記血液凝固因子の活性を算出する工程において、第V因子の活性を算出する方法が挙げられる。

【0019】

本発明の検体処理用血漿は、不活化型の第V因子及び不活化型の第VII因子を含有

50

する血液凝固因子不活化血漿に、活性型変換可能な凝固第Ⅴ因子又は活性型変換可能な凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子が添加されてなるものである。

【発明の効果】

【0020】

本発明の血液凝固因子の不活化方法は、試料とイミノジ酢酸基を有する化合物とを接触させる接触処理により、試料に含まれる第Ⅴ因子及び第ⅤⅠⅠⅠ因子の少なくともいずれか一方を不活化型に変化させることができるので、簡便で効率的である。

【0021】

また、前記血液凝固因子の不活化方法を利用することで、少なくともVWFに実質的に影響を与えることなく、第Ⅴ因子又は第ⅤⅠⅠⅠ因子が不活化型に変化した状態で残存する試料を得ることができる。つまり、得られた血液凝固因子不活化試料には、従来の吸着除去により得られる凝固因子欠乏血漿とは異なり、第ⅤⅠⅠⅠ因子及び/又は第Ⅴ因子が不活化型に変化した状態で含まれており、さらに、VWFについては実質的に影響を受けることなく、残存している。

10

【0022】

さらに、このような血液凝固因子不活化試料を、従来の凝固因子欠乏血漿に代えて、血液凝固因子活性の測定方法に使用することができる。これにより、別途VWFを添加しなくても、フォンビルブラント病と血友病Aを区別して判定することができる。

【発明を実施するための最良の形態】

【0023】

〔血液凝固因子の不活化方法〕

本発明の血液凝固因子の不活化方法は、試料をイミノジ酢酸基($-N(CH_2COOR)_2$ 、Rが水素又は金属イオンを示す)を有する化合物と接触させて、該試料中の第Ⅴ因子及び第ⅤⅠⅠⅠ因子の少なくともいずれか一方を、不活化型に変化させる工程を含む。

20

【0024】

本発明で用いられる試料としては、第Ⅴ因子又は第ⅤⅠⅠⅠ因子の少なくとも一方を含有するものであれば特に限定されず、例えば、ヒト等のほ乳動物の血漿、血清、全血などが挙げられる。さらに、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子-VWF複合体等の血液凝固因子製剤を含む溶液が挙げられる。尚、血液凝固因子製剤には、血液から抽出又は精製されたものと遺伝子組み換え技術により調製されるものがある。

30

【0025】

本発明で接触処理に用いられる前記イミノジ酢酸基($-N(CH_2COOR)_2$)は、式中のRがH又は金属イオンであり、好ましくは金属イオンであり、より好ましくは一価の金属イオンである。一価の金属イオンとしては、例えば、ナトリウムイオンやカリウムイオンが挙げられる。

【0026】

前記化合物は、前記イミノジ酢酸基を官能基として有するものであれば特に限定されず、有機化合物であっても無機化合物であってもよい。また、前記化合物には、官能基を導入する種々の方法により、直接的に又はスペーサーやカップリング剤などを介して間接的にイミノジ酢酸基が結合している化合物も含まれる。要するに、接触処理に用いた際に第Ⅴ因子及び第ⅤⅠⅠⅠ因子の少なくともいずれか一方を不活化することが可能な、イミノジ酢酸基を有する化合物であればよい。このような化合物としては、例えば担体が挙げられる。具体的には、陽イオン交換樹脂や顆粒状アガロースゲルなど有機化合物より構成される担体、磁性ビーズ、シリカ粒子、モノリス型シリカカラムなど無機化合物より構成される担体が挙げられる。

40

【0027】

イミノジ酢酸基を有する陽イオン交換樹脂とは、水や溶媒に不溶な三次元網状樹脂に、官能基としてイミノジ酢酸基($-N(CH_2COOH)_2$)を含む陽イオン交換できる樹脂で、アルカリ金属、アルカリ土類金属、重金属等を選択的に吸着できる樹脂である。

【0028】

50

陽イオン交換樹脂は、多孔性球状粒子（ビーズタイプ）でもよいし、微視的空孔を有するフィルム状（イオン交換膜）であってもよい。陽イオン交換樹脂の基礎となる高分子母体は、特に限定しないが、一般にスチレン - ジビニルベンゼン共重合体が用いられる。イオン交換膜の場合には、陽イオン交換樹脂の微粉末を造膜性の結合剤（ポリエチレン、ポリスチレン、フェノール樹脂などの熱可塑性、熱硬化性樹脂）を用いてコロイド状に分散させた状態で膜状に成型した不均質型；膜状を維持するための高分子（ポリエチレン、ポリプロピレン、ポリ塩化ビニル、フッ素樹脂など）と陽イオン交換性基をもつ高分子（ポリスチレン誘導体、ポリアクリル酸、ポリエチレンイミン、ポリビニルピリジン誘導体など）とを混合したり、橋かけさせた半均質型；スチレン - プタジエン共重合体膜に陽イオン交換基を導入したものや、陽イオン交換基を含む熱可塑性高分子を成型し成膜したものである均質型のいずれでもよい。要するに、短時間で原料となる試料に含まれる凝固因子に、活性型変換を不能とするような化学的变化を与え得るように、十分な接触面積が確保されていればよい。

10

【 0 0 2 9 】

前記イミノ酢酸基を有する顆粒状アガロースゲルとは、顆粒状に形成されたアガロースゲルであり、官能基としてイミノ酢酸を有するアガロースゲルである。具体的には、Amersham Biosciences社製のセファロースやBio Rad社製のバイオゲルなどが挙げられる。

【 0 0 3 0 】

試料と上記イミノ酢酸基を有する化合物とを接触させる接触処理の方法は、特に限定しないが、例えば、イミノ酢酸基を有する担体の場合、容器中にイオン交換樹脂と試料をいれて、所定時間攪拌混合する方法、イオン交換樹脂を充填したカラムに試料を流す方法などが挙げられる。

20

【 0 0 3 1 】

接触処理に使用するイミノ酢酸基を有する化合物の量は、その種類に応じて適宜設定される。例えば、イミノ酢酸基を有する化合物がイミノ酢酸基を有する担体の場合、接触処理は、試料（体積）に対して担体（質量）が5 w / v % 以上となる量で行なうことが好ましい。5 w / v % 未満では、血液凝固因子の不活化型への変化が不十分であったり、処理に長時間を要する可能性がある。

【 0 0 3 2 】

さらに、接触処理の時間は、使用するイミノ酢酸基を有する化合物の種類、量によって適宜設定される。例えば、イミノ酢酸基を有する化合物がイミノ酢酸基を有する陽イオン交換樹脂の場合、試料に対する担体が5 w / v % 程度であれば2 ~ 6 時間、10 w / v % 程度であれば1 ~ 4 時間程度で、接触処理しない場合と比べて、活性を1 % 以下にまで不活化することができる。また、イミノ酢酸基（R がナトリウムイオン）を有するセファロースでは、試料に対する担体が10 ~ 20 w / v % 程度であれば3 ~ 4 時間で活性を1 % 以下にまで不活化することができる。

30

【 0 0 3 3 】

以上のような接触処理により、試料に含まれる第V因子及び第V I I I 因子の少なくともいずれか一方を、不活化型に変化させることができる。試料として、第V因子及び第V I I I 因子の双方を含む試料、例えば正常血漿を用いた場合は、第V因子及び第V I I I 因子の双方が不活化型となる。ここで、不活化型の血液凝固因子とは、活性化型に変化することができない血液凝固因子のことである。

40

【 0 0 3 4 】

上記不活化方法における接触処理は、第V因子、第V I I I 因子に対する影響は互いに独立的である。従って、この不活化方法を採用することにより、他の因子に影響を与えることなく、第V因子のみ、第V I I I 因子のみが不活化型に変化した試料（血液凝固因子不活化試料）を得ることができる。

【 0 0 3 5 】

第V因子とは、分子量33万の糖タンパクで、X a 因子、プロトロンピン、リン脂質、

50

Ca^{2+} とともにプロトロンビナーゼ複合体を形成し、Xa因子によるプロトロンビンの活性化を上昇させる補酵素として働く。第V因子は、トロンピンによりArg(709番)、Arg(1018番)、Arg(1545番)のC末端側が開裂して、活性型V因子となる。しかし、上記不活化方法で不活化された第V因子は、活性型へ変換できない。イミノ酢酸基を有する化合物との接触処理により、第V因子がいかなる化学変化を受けるかは明らかではないが、おそらく、因子の活性型へ変換する部分が化学的又は立体構造的に変化したため、あるいは活性型へ変換する部分の一部が脱落したため、あるいはその他の部分の化学的変化若しくは一部脱落のために活性化しようとする部分が変化したためと考えられる。

【0036】

また、第VII因子は、分子量33万の糖タンパクで、IXa因子、X因子、リン脂質、 Ca^{2+} とともにテンナーゼ複合体を形成し、IXa因子によるX因子の活性化を上昇させる補酵素として働く。トロンピンによりArg(372番)、Arg(740番)、Arg(1689番)のC末端側が開裂して、活性型VII因子となる。しかし、上記不活化方法で不活化された第VII因子は、活性型へ変換できない。イミノ酢酸基を有する化合物との接触処理により、第VII因子がいかなる化学変化を受けるかは明らかではないが、おそらく、因子の活性型へ変換する部分が化学的又は立体構造的に変化したため、あるいは活性型へ変換する部分の一部が脱落したため、あるいはその他の部分の化学的変化若しくは一部脱落のために活性化しようとする部分が変化したためと考えられる。しかし、接触処理により、第VII因子におけるVWF結合能には影響を与えないと考えられる。試料として、VWFを含む血漿等を用いて、接触処理を行なった試料(処理済血漿)では、VWFが含まれ、そのVWFは第VII因子が正常である血液と同様に、リストセチンコファクター活性(Rco活性)を示すことができるからである。

【0037】

このように、本発明の血液凝固因子不活化方法では、試料中に含まれる第V因子及び第VII因子を活性型に変換できない、所謂不活型に変化させることにより、試料中の第V因子、第VII因子が活性を示さなくなる。つまり、従来の免疫吸着法による第V因子、第VII因子の吸着除去とは異なり、第V因子、第VII因子が変化した状態で残存し、第V因子又は第VII因子に対する抗体が反応できる形で試料中に存在する。

【0038】

〔血液凝固因子不活化試料〕

本発明の血液凝固因子不活化試料は、上記本発明の不活化方法を利用して得られるもので、第V因子及び第VII因子の少なくともいずれか一方が不活化型の試料である。

【0039】

試料として血漿を用いる場合、第V因子及び第VII因子の少なくともいずれか一方が不活化型に変化した血漿を得ることができる。また、試料として正常血漿(第V因子及び第VII因子を含む血漿)を用いた場合、第V因子及び第VII因子が不活化した血液凝固因子不活化血漿を得ることができる。正常血漿を試料として用いた血液凝固因子不活化血漿は、従来の免疫吸着除去法による第V因子、第VII因子の吸着除去とは異なり、正常血漿中に含まれていた第V因子及び第VII因子が不活化型に変化した状態で残存している。さらに、第V因子又は第VII因子に対する抗体が反応できる形で存在する。さらにまた、この血液凝固因子不活化血漿にはVWFが残存しており、血液凝固因子不活化血漿中の第VII因子はVWFと結合して複合体を形成することが可能であり、Rco活性を有している。

【0040】

ここで、VWFとは、血小板膜タンパク質GPIIbと血管内皮下組織の間に介在して結合させる接着因子として、止血初期の血小板粘着にかかわる。また、循環血液中では第VII因子と非共有結合による複合体を形成し、第VII因子の安定化に寄与する。

【0041】

尚、本発明の血液凝固因子不活化試料がVWFを含む場合、第VII因子が正常であ

10

20

30

40

50

る血漿と同様に、R c o活性を示すV W Fを含んでもよいし、V W FがR c o活性を有していなくてもよいし、V W Fが化学的又は立体構造的に変化したものや一部脱落したものを含んでいるものも包含する。

【 0 0 4 2 】

〔血液凝固因子活性の測定方法〕

本発明の血液凝固因子不活化方法を正常血漿に適用して得られる、第V因子及び第V I I I因子の双方とも不活化された本発明の血液凝固因子不活化血漿を用いて、血液検体に含まれる血液凝固因子の活性を測定することができる。

すなわち、本発明の血液凝固因子活性の測定方法は、不活化型の第V因子及び不活化型の第V I I I因子を含有する血液凝固因子不活化血漿を含む検体処理用血漿を用いて、血液検体に含まれる血液凝固因子の活性を測定する方法であって、血液検体、凝固時間を測定するための測定試薬及び検体処理用血漿を混合して測定用試料を調製する工程；前記測定用試料における凝固時間を測定する工程；及び前記凝固時間に基づいて血液凝固因子の活性を算出する工程を含む。

10

【 0 0 4 3 】

前記血液凝固因子の活性は、測定しようとする特定の凝固因子について正常な血液検体又は血液検体の標準品とを比較することにより算出することができる。正常な血液検体としては、例えば、健常人より採取した血液、該血液から調製された血漿などが挙げられる。また、血液検体の標準品としては、例えば、市販されている標準血液や標準血漿などが挙げられる。算出された血液凝固因子の活性の有無により、血液検体中の血液凝固因子の有無を知ることができる。また、血液凝固因子の活性の値により、血液検体中の血液凝固因子の存在量を知ることができる。さらに血液凝固因子の有無や存在量により、血液検体中の血液凝固因子の異常の有無を知ることができる。

20

【 0 0 4 4 】

前記測定試薬としては、プロトロンビン時間（P T）を測定するP T測定試薬、又は活性化部分トロンボプラスチン時間（A P T T）を測定するA P T T測定試薬を用いることができる。

【 0 0 4 5 】

前記血液検体としては、全血や血漿を用いることができる。全血と血漿のいずれを用いるかは、測定で使用する試薬や装置などに応じて適宜選択すればよい。なお、吸光度などの光学的情報に基づいて凝固時間を測定する場合、血液検体としては血漿を用いることが望ましい。

30

【 0 0 4 6 】

P Tとは、血液検体に組織トロンボプラスチンとカルシウムを加えて凝固するまでの時間で、組織トロンボプラスチンとカルシウムの添加により、第V因子、第V I I I因子、第X因子の関与のもと、プロトロンビンがトロンビンとなり、フィブリノーゲンをフィブリンに転化して凝塊が形成される。従って、プロトロンビン、第V因子、第V I I I因子、第X因子の欠損又は異常、フィブリノーゲンの減少によって凝固時間が延長する。

【 0 0 4 7 】

P T測定試薬とは、主成分として、血液凝固誘因のための組織トロンボプラスチン及びカルシウムイオンを含んでいる試薬である。組織トロンボプラスチンとしては、ウサギ、ウシ、ヒトなどの脳、胎盤から抽出もしくは精製したもの又は遺伝子組み換え技術により調製したものが用いられ得る。また、組織トロンボプラスチン及びカルシウムの他、緩衝液、防腐剤、安定化剤などが添加されていてもよい。

40

【 0 0 4 8 】

A P T Tとは、血液検体に、リン脂質、活性化剤及びカルシウムイオンを添加して凝固するまでの時間で、第V I I I因子、第V因子の欠損、異常により凝固時間が延長する。また、P Tの測定結果とあわせて、P Tが正常でA P T Tが延長の場合には第V I I I因子欠損、P T及びA P T Tの双方が延長の場合には第V因子欠損と判定することができる。

50

【 0 0 4 9 】

A P T T 測定試薬とは、主成分として、血液凝固誘因のためのリン脂質、活性化剤およびカルシウムイオンを含有している。リン脂質の由来としては、合成リン脂質、ウサギ、ウシなどの脳やヒトの胎盤などから有機溶媒で抽出したものと大豆由来のものを用いることができる。A P T T 試薬における活性化剤とは、第XI因子や第XII因子を活性化するものであり、例えばカオリン、セライト、シリカ、エラジン酸を挙げることができる。また、上記主成分のほかに緩衝剤、防腐剤、安定化剤が添加されていてもよい。

【 0 0 5 0 】

本発明の測定方法の具体的態様としては、下記 a) ~ d) の態様が挙げられる。なお、ここでは、血液検体として血漿を用いる場合の具体的態様を示す。

10

a) 検体処理用血漿として、不活化型の第V因子及び不活化型の第V I I I 因子を含有する血液凝固因子不活化血漿（第V & V I I I 不活化血漿）を使用し、前記測定試薬としてP T 測定試薬を用いて、第V因子の活性を測定する。

具体的には、第V & V I I I 不活化型血漿と正常血漿を混合し、この混合液に測定用試薬であるP T 測定試薬を添加し、凝固時間を測定する。この混合液において段階的に希釈した正常血漿を用いて、因子活性と凝固時間の関係を示す検量線を作成する。一方、被検血漿と前記第V & V I I I 不活化血漿とを混合してなる混合液（被検血漿含有混合液）に、P T 測定試薬を添加し、凝固時間を測定する。先に作成した検量線と前記混合液の凝固時間に基づいて、被検血漿に含まれる第V因子の活性を算出することができる。

【 0 0 5 1 】

20

b) 検体処理用血漿として、第V & V I I I 不活化血漿に、活性型に変化可能な凝固第V I I I 因子を添加してなる検体処理用血漿を使用し、測定試薬としてP T 測定試薬を用いて、第V因子の活性を測定する。

第V & V I I I 不活化血漿に、活性型に変化可能な凝固第V I I I 因子を添加してなる検体処理用血漿は、第V因子不活化型で、第V I I I 因子は活性型に変化可能な血漿である。この検体処理用血漿と被検血漿とを混合してなる混合液（被検血漿含有混合液）に、P T 測定試薬を添加し、凝固時間を測定する。段階的に希釈した正常血漿を用いて作成した検量線及び被検血漿含有混合液の凝固時間に基づいて、被検血漿に含まれる第V因子の活性を算出することができる。

【 0 0 5 2 】

30

c) 検体処理用血漿として、第V & V I I I 不活化血漿に、活性型に変化可能な凝固第V因子を添加してなる検体処理用血漿を使用し、測定試薬としてA P T T 測定試薬を用いて、第V I I I 因子の活性を測定する。

すなわち、第V & V I I I 不活化血漿に、活性型に変化可能な第V因子を添加してなる検体処理用血漿は、第V I I I 因子が不活化型で、第V因子は活性型に変化可能な血漿である。この検体処理用血漿と被検血漿とを混合してなる混合液（被検血漿含有混合液）に、A P P T 測定試薬を添加し、凝固時間を測定する。段階的に希釈した正常血漿を用いて作成した検量線及び被検血漿含有混合液の凝固時間に基づいて、被検血漿に含まれる第V因子の活性を算出することができる。

【 0 0 5 3 】

40

d) 検体処理用血漿として、第V & V I I I 不活化型血漿に、活性型に変化可能な凝固第V I I I 因子を添加してなる検体処理用血漿を使用し、測定試薬としてA P T T 測定試薬を用いて、第V因子の活性を測定する。

すなわち、第V & V I I I 不活化型血漿に、活性型に変化可能な第V I I I 因子を添加してなる検体処理用血漿は、第V因子が不活型で、第V I I I 因子は活性型に変化可能な血漿である。この検体処理用血漿と被検血漿とを混合してなる混合液（被検血漿含有混合液）に、A P P T 測定試薬を添加し、凝固時間を測定する。段階的に希釈した正常血漿を用いて作成した検量線及び被検血漿含有混合液の凝固時間に基づいて、被検血漿に含まれる第V因子の活性を算出することができる。

【 0 0 5 4 】

50

以上のような態様の測定方法は、従来から使用されている凝固因子欠乏血漿を用いて血液凝固因子の活性測定方法に代えて、採用することができる。

本発明の測定方法で検体処理用血漿として使用する血液凝固因子不活化血漿又は検体処理用血漿の調製に使用する血液凝固因子不活化血漿においては、上述のように、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子が不活化型となっているが、第ⅤⅠⅠⅠ因子におけるⅤⅤⅤ結合部位に関する実質的影響が少ない、ないしはほとんどないためか、ⅤⅤⅤが残存し、しかもⅤⅤⅤ活性を有している。従って、従来の凝固因子欠乏血漿を用いた活性測定方法と比べて、以下のような有利な点がある。

【0055】

ⅤⅤⅤの質的、量的異常に基づくフォンヴィルブラント病では、第ⅤⅠⅠⅠ因子の安定性が失われ、その血中濃度が低下するため、検査では、出血時間の延長、第ⅤⅠⅠⅠ因子活性、ⅤⅤⅤ量の低下ないし異常、ⅤⅤⅤ活性の低下及びリストセチンを用いた血小板凝集能の低下といった症状を示し、第ⅤⅠⅠⅠ因子欠損、活性の低下を原因とする血友病Aとは異なるものである。従って、第ⅤⅠⅠⅠ因子欠損による血友病の正確な判定のためには、フォンヴィルブラント因子が活性を失うことなく、血液凝固因子不活化血漿中に存在し、且つ第ⅤⅠⅠⅠ因子のみが欠乏又は活性型への変換不能であるものであることが好ましい。この点、免疫吸着除去法で製造された凝固因子欠乏血漿を凝固因子活性測定に用いられる検体処理用血漿として使用する場合、別途ⅤⅤⅤを添加して測定に使用する必要があったのに対し、本発明の検体処理用血漿では、ⅤⅤⅤ活性を有するままでⅤⅤⅤが残存しているため、別途ⅤⅤⅤを添加しなくてもよい。

【0056】

尚、本発明の活性測定方法に用いられる検体処理用血漿又は検体処理用血漿の調製に使用する血液凝固因子不活化血漿としては、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子が100%不活化されたものでなくてもよい。検体処理用血漿中の第Ⅴ因子又は第ⅤⅠⅠⅠ因子の不活化の程度は、接触処理前の試料に含まれる活性型の因子を100%としたとき、80%以上であればよく、好ましくは95%以上であり、より好ましくは99%以上である。

【0057】

さらに、本発明の活性測定方法に用いられる検体処理剤又は血液凝固因子不活化血漿と、従来のPT試薬とを組合わせて、PT測定試薬キットとして使用することができる。また、本発明の活性測定方法に用いられる検体処理剤又は血液凝固因子不活化血漿と、従来のAPTT試薬とを組み合わせ、APTT時間測定試薬キットとして使用することができる。

【実施例】

【0058】

〔測定方法〕

(1) 第Ⅴ因子の活性(%)測定

測定試料5 μ l及びオーレンペロナール緩衝液45 μ lをキュベットにとり、これに、第Ⅴ因子欠乏血漿(シスメックス社、神戸)を50 μ l添加混合して、37 $^{\circ}$ Cで1分間加温した。

【0059】

この混合物に、プロトロンビン時間測定試薬として、トロンボチェックPT(シスメックス社、神戸)100 μ lを添加混合して、凝固時間を血液凝固分析装置コアグレックス800(島津製作所、京都)で測定した。

【0060】

(2) 第ⅤⅠⅠⅠ因子の活性(%)測定

測定試料10 μ l及びオーレンペロナール緩衝液40 μ lをキュベットにとり、これに、第ⅤⅠⅠⅠ因子欠乏血漿(シスメックス社、神戸)50 μ lを添加混合して、37 $^{\circ}$ C、1分間加温した。

【0061】

この混合物に、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬として、トロンボチェック

10

20

30

40

50

A P T T - S L A (シスメックス社、神戸) 5 0 μ l を混合し、3 7 ° C、3 分間加温し、2 0 m M の C a C l ₂ を 5 0 μ l 添加後、凝固時間をコアグレックス 8 0 0 (島津製作所、京都) で測定した。

【 0 0 6 2 】

(3) 第 V I I I 因子の検出

第 V I I I 因子の存在有無の確認は、British Journal of Haematology, 1994, 86, 106 - 111 に記載された方法に従って行った。ここに記載されている方法では、第 V I I I 因子に対するポリクローナル抗体を用いた E L I Z A 法により、測定サンプル中の第 V I I I 因子を検出する。

【 0 0 6 3 】

(4) V W F の検出

測定試料 1 0 μ l をキュベットにとり 3 7 ° C で 3 分加温した後、V W F 試薬緩衝液 (R I) (D a d e - B e h r i n g 社、ドイツ) を 2 0 0 μ l 添加し、3 7 ° C、5 分加温した。次いで、V W F 試薬ラテック液 (R 2) (D a d e - B e h r i n g 社、ドイツ) を 1 0 0 μ l 添加して得られた混合液の吸光度 7 0 0 n m をコアグレックス 8 0 0 (島津製作所、京都) で測定した。

【 0 0 6 4 】

(5) V W F の R c o 活性の測定

測定試料 1 0 0 μ l をスライド判定板に採取し、これに V W F リストセチンコファクター活性測定用試薬 (D a d e - B e h r i n g 社、ドイツ) 2 0 0 μ l を滴下した。スライド判定板を 3 分間攪拌し、凝集を認めたときに陽性 (活性有り) と判定する。

【 0 0 6 5 】

ブランクには生理食塩水を用いた。標準品には、ヒト正常血漿 S H P (D a d e - B e h r i n g 社、ドイツ) を用い、生理食塩水で順次 2 倍、4 倍、8 倍、および 1 6 倍に希釈したときの凝集度合いを目視により観察し、以下の基準に従って判定した。すなわち、ヒト正常血漿 S H P 原液と同程度の凝集を示したものを「 4 +」、ヒト正常血漿 S H P の 2 倍希釈液と同程度の凝集を示したものを「 3 +」、ヒト正常血漿 S H P の 4 倍希釈液と同程度の凝集を示したものを「 2 +」、ヒト正常血漿 S H P の 8 倍希釈液と同程度の凝集を示したものを「 1 +」、ヒト正常血漿 S H P の 1 6 倍希釈液同程度もしくはそれ以下の凝集を示したものを「 - 」と判定した。

【 0 0 6 6 】

(陽イオン交換樹脂の種類と第 V 因子、第 V I I I 因子に対する影響)

表 1 に示すような陽イオン交換樹脂を用いた。

【 0 0 6 7 】

10

20

30

【表1】

陽イオン交換樹脂の種類		メーカー
名称	官能基タイプ	
アンバーライトIR120B Na	スルホン酸型	オルガノ株式会社
アンバーライトIR124 Na	スルホン酸型	オルガノ株式会社
アンバーライト200CT Na	スルホン酸型	オルガノ株式会社
アンバーライトIRC50	カルボン酸型	オルガノ株式会社
アンバーライトIRC76	カルボン酸型	オルガノ株式会社
アンバーライトIRC748	イミノジ酢酸型	オルガノ株式会社
ムロマック A-1	イミノジ酢酸型	室町化学株式会社
ムロマック B-1	イミノジ酢酸型	室町化学株式会社

10

20

30

40

【0068】

ヒト新鮮血漿10mlを、表1に示す陽イオン交換樹脂(ビーズタイプ)の1種1g(10w/v%)と混合し、室温で2時間攪拌を行い、接触処理済血漿を得た。

【0069】

この処理済血漿の第V因子の活性、第VII因子の活性を、上記方法に従って測定した。第V因子の活性、第VII因子の活性は、接触処理していない標準品(シスメック

50

ス社製のコアグトロールN)を測定した場合に得られる凝固時間に基づく活性を100%としたときの割合として算出した。測定結果を図1に示す。図中、縦軸は、第VII因子の活性(%)を示す。

【0070】

図1から、スルホン酸型陽イオン交換樹脂では、第V因子、第VII因子いずれも活性が大部分残っていた。また、カルボン酸型陽イオン交換樹脂では、凝固第V因子については10%程度まで活性を低減させることができたが、凝固第VII因子については40%程度活性が残っていた。一方、イミノ酢酸型陽イオン交換樹脂では、第V因子、第VII因子のいずれに対しても、活性がほとんど消失していた。

【0071】

また、イミノ酢酸型陽イオン交換樹脂との接触処理済血漿については、第VII因子の活性測定、第VII因子の検出、VWFの検出、Rco活性の測定を行なった。第VII因子の活性は、接触処理していないヒト血漿を測定した場合の凝固時間に基づく活性を100%として、各接触処理済血漿の活性を算出した。また、第VII因子の検出及びVWFの検出においては、接触処理していないヒト血漿を測定した場合に得られる各測定結果を100%含有の場合として、接触処理済血漿の第V因子の含有率(%)、VWF含有率(%)を示した。測定結果を表2に示す。

【0072】

【表 2】

陽イオン交換樹脂	VIII因子活性	VIII因子含有率	VWF含有率	VWF Rco 活性
ムロマックA-1	0.58	95.3	76.8	4+
ムロマックB-1	0.29	86.1	70.0	4+
アンバーライトIRC748	0.29	57.1	42.5	3+

10

20

30

【0073】

40

表2から、第VIII因子活性がほとんど失われているのに対し、第VIII因子は残存していた。またVWFも残存し、しかもRco活性を示していた。

【0074】

〔イミノ酢酸イオン交換型樹脂の濃度と接触時間の関係〕

ヒト新鮮血漿100mlと、イミノ酢酸型イオン交換樹脂（ムロマック A-1）を、イオン交換樹脂濃度0w/v%、2.5w/v%、5.0w/v%、7.5w/v%、10.0w/v%となるように混合し、処理前、接触処理時間を0.5時間、1.0時間、1.5時間、2.0時間とした場合の、第VIII因子の活性、第V因子の活性を調べた。第VIII因子の活性、第V因子の活性は、接触処理していない標準品（シスメックス社製のコアグトロールN）を測定した場合に得られる凝固活性を100%として算出し

50

た。それぞれ測定結果を図2及び図3に示す。図中、縦軸は活性(%)、横軸は接触処理時間を示す。

【0075】

図2及び図3から、5w/v%以上の条件で、30分以上、好ましくは2時間以上処理すると、第V因子及び第VII因子のいずれの活性も1%以下にまで低下した。

【0076】

〔接触処理における第V因子、第VII因子の独立性の確認〕

先天的に第V因子のみ欠乏した血漿中の第VII因子、先天的に第VII因子のみ欠乏の血漿中の第V因子が、イミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂との接触処理により直接的に不活化されるかどうかを検討した。

10

【0077】

第V因子欠乏血漿(4例：患者1~4)ならびに第VII因子欠乏血漿(4例：患者1~4)は、ジョージ キングバイオメディカル(USA)より購入した。

【0078】

各血漿サンプル1mlに、イミノジ酢酸型イオン交換樹脂(ムロマック A-1)を10w/v%となるように混合して、2時間攪拌処理した。

【0079】

得られた処理済血漿について、第VII因子の活性、第V因子の活性を測定した。第V因子の活性、第VII因子の活性は、接触処理していない標準品(シスメックス社製のコアグトロールN)の凝固時間を活性100%の場合として算出した。測定結果をそれぞれ図4及び図5に示す。

20

【0080】

図4から、第V因子欠乏血漿中の第VII因子活性は接触処理1時間で正常レベル(100%)から10%付近まで低下し、以後2時間から4時間で1%未満となった。また、図5からわかるように、第VII因子欠乏血漿中の第V因子活性は接触処理1時間で正常レベル(100%)から10%付近まで低下し、以後4時間までにはすべての血漿試料で1%未満となった。

従って、本発明のイミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂との接触処理による方法では、第V因子、第VII因子を独立的に不活化型に変化することがわかった。

【0081】

30

〔イミノジ酢酸型イオン交換樹脂との接触処理による第V因子、第VII因子残存の確認〕

純品の第VII因子(Kogenate FS：バイエル薬品：250U/ml)を生理活性食塩水に溶解させてなる溶液(25000%)、及びこの生理活性食塩水溶液を20%イミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂で4時間、接触処理した溶液(処理済溶液)を、還元下及び非還元下の条件でSDS電気泳動にかけた。

【0082】

また、ヒト第V因子(50µg/ml：Hematologic Technology Inc.、米国)を生理活性食塩水で溶解させてなる溶液(15000%)、及びこの第V因子含有溶液を20%イミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂で4時間処理して得られた溶液(処理済溶液)を、それぞれ還元下及び非還元下の条件で、SDS電気泳動にかけた。

40

【0083】

SDSポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、SDS PAGE)はMINI-PROTEIN II電気泳動装置(日本バイオラッド)を用いて行なった。還元下の条件では、試料を1w/v% SDS溶液で4倍に希釈した試料溶液を、5w/v% 2-メルカプトエタノール溶液と共に、56で30分間処理し、0.1w/v% SDSを含む7.5%ポリアクリルアミドゲル上で60V、2.5時間展開させた。一方、非還元下の条件では、同様に試料を1w/v% SDS溶液で4倍に希釈した溶液を、0.1w/v% SDSを含む7.5%ポリアクリルアミドゲル上で同様に60V、2.5時間展開させた。緩衝

50

液には0.02w/v% SDSを含む25mMトリス-192mMグリシン緩衝液(pH 7.5)を用いた。染色には2D銀染色試薬II(第一化学薬品)を用いた。

【0084】

図6(a)は還元下の条件で電気泳動して得られた電気泳動写真であり、図6(b)は還元下の条件で電気泳動して得られた電気泳動写真である。

写真において、レーン1は分子量マーカー、レーン2は接触処理前の第VII因子(Kogenate FS)を含む溶液、レーン3及びレーン4は第VII因子含有溶液の処理済溶液、レーン5は接触処理前のヒト第V因子を含む溶液、レーン6はヒト第V因子溶液の処理済溶液である。

【0085】

図6(a)及び図6(b)の写真中のレーン3、4及び6において、蛋白質のバンドを確認できた。従って、接触処理によっても、第V因子、第VII因子が残存していることが確認できた。

【0086】

〔イミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂処理による第VII因子の活性への影響〕

生理食塩水に、第VII因子とVWF複合体である化血研のCo factor F(100U/ml)を溶解させた第VII因子複合体溶液(10000%、1U/mlが100%に相当)を、イミノジ酢酸型イオン交換樹脂20%と4時間接触させた。処理済溶液について、第VII因子の活性測定、第VII因子の検出、VWFの検出、Rco活性の測定を、上記測定方法に従って行なった。

【0087】

一方、ヒトの正常血漿について、同様の処理を行ない、処理済血漿について第VII因子の活性測定、第VII因子の検出、VWFの検出、Rco活性の測定を行なった。これらの結果を併せて表3に示す。

【0088】

ここで、第VII因子複合体溶液の第VII因子活性は、接触処理していない第VII因子複合体溶液を測定した場合に得られる凝固活性を100%として、接触処理した第VII因子複合体溶液中の第VII因子の活性(%)を算出し、その活性値が1%以上の場合は「+」、1%未満の場合は「-」と判定した。ヒト正常血漿の第VII因子活性は、接触処理していないヒト正常血漿を測定した場合に得られる凝固活性を100%として、接触処理したヒト正常血漿中の第VII因子の活性(%)を算出し、その活性値が1%以上の場合は「+」、1%未満の場合は「-」と判定した。また、第VII因子複合体溶液の第VII因子及びVWFは、接触処理していない第VII因子複合体溶液を測定した場合に得られる各測定結果を100%として、接触処理した第VII因子複合体溶液の第VII因子含有率(%)及びVWF含有率(%)を算出し、それらの値が70%以上の場合は「+」、70%未満の場合は「-」と判定した。ヒト正常血漿の第VII因子及びVWFは、接触処理していないヒト正常血漿を測定した場合に得られる各測定結果を100%として、接触処理したヒト正常血漿の第VII因子含有率(%)及びVWF含有率(%)を算出し、それらの値が70%以上の場合は「+」、70%未満の場合は「-」と判定した。

【0089】

【表3】

原料血漿	VIII因子活性	VIII因子	VWF	VWF Rco 活性
VIII因子複合体溶液	—	+	+	4+
ヒト正常血漿	—	+	+	4+

【0090】

表3から、第VII因子活性は失われているが、第VII因子が残存していること

10

20

30

40

50

がわかる。また、VWFについては残存しており、そのVWFがRco活性を有していることがわかった。つまり、第VII因子とVWFの複合体に対する影響は、正常ヒト血漿による影響と同様の挙動を示すことを確認できた。

【0091】

〔イヌの血友病モデル〕

血液試料として、健常のビーグル犬より採血した血漿を用いた。

このイヌ正常血漿を、イミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂（ムロマック A-1）（20 w/v%）と4.5時間接触処理させた。

【0092】

得られた処理済血漿の第VII因子活性（FVII因子：C）、及び第V因子活性（FV因子：C）を上記測定方法で測定した。接触処理していない標準品（シスメックス社製のコアグトロールN）を測定した場合に得られる凝固活性を100%として、各測定サンプル中の第VII因子の活性（%）又は第V因子の活性（%）を算出した。正常血漿（原料血漿）の結果を図7、処理済血漿の結果を図8に示す。各図の縦軸は各血液凝固因子の活性（%）を示す。

10

【0093】

正常イヌ血漿の第VII因子活性は560%、第V因子活性は876%を示し、その活性はヒトの場合と比較して、それぞれ約6倍および約9倍高かった。しかしながら、処理済血漿では、第VII因子活性5.7%、第V因子活性15.9%まで低下した。

以上のことから、ヒトの血漿に限らず、イヌの血漿においても、接触処理によって第VII因子や第V因子が不活化型に変化することがわかった。

20

【0094】

〔イミノジ酢酸基を有するセファロースを用いた接触処理〕

生理食塩水に、第VII因子とVWFの複合体である化血研のConfact F（財団法人化学及血清治療研究所：100U/ml）を溶解させた第VII因子複合体溶液（10000%、1U/mlが100%に相当）を、イミノジ酢酸基を有するセファロース20%（w/v）と4時間接触処理させた。この接触処理により得られた溶液について、第VII因子の活性測定、第VII因子の検出、VWFの検出及びRco活性の測定を、前記測定方法に従って行なった。一方、ヒトの正常血漿について、同様の接触処理を行ない、得られた血漿について第VII因子の活性測定、第VII因子の検出、VWFの検出及びRco活性の測定を行なった。

30

【0095】

第VII因子複合体溶液の第VII因子活性は、接触処理していない第VII因子複合体溶液を測定した場合に得られる凝固活性を100%として、接触処理した第VII因子複合体溶液中の第VII因子の活性（%）を算出し、その活性値が1%以上の場合は「+」、1%未満の場合は「-」と判定した。ヒト正常血漿の第VII因子活性は、接触処理していないヒト正常血漿を測定した場合に得られる凝固活性を100%として、接触処理したヒト正常血漿中の第VII因子の活性（%）を算出し、その活性値が1%以上の場合は「+」、1%未満の場合は「-」と判定した。また、第VII因子複合体溶液の第VII因子及びVWFの検出は、接触処理していない第VII因子複合体溶液を測定した場合に得られる各測定結果を100%として、接触処理した第VII因子複合体溶液の第VII因子含有率（%）及びVWF含有率（%）を算出し、それらの値が70%以上の場合は「+」、70%未満の場合は「-」と判定した。ヒト正常血漿の第VII因子及びVWFの検出は、接触処理していないヒト正常血漿を測定した場合に得られる各測定結果を100%として、接触処理したヒト正常血漿の第VII因子含有率（%）及びVWF含有率（%）を算出し、それらの値が70%以上の場合は「+」、70%未満の場合は「-」と判定した。測定結果を表4に示す。

40

【0096】

【表 4】

原料血漿	VIII因子活性	VIII因子	VWF	VWF Rco 活性
VIII因子複合体溶液	—	+	+	4+
ヒト正常血漿	—	+	+	4+

【0097】

表 4 から、イミノジ酢酸基を有するセファロースを用いた接触処理により得られた第 V I I I 因子複合体溶液及びヒト正常血漿においても、第 V I I I 因子活性は失われているが、第 V I I I 因子が残存していることがわかった。また、V W F については残存しており、それら V W F が R c o 活性を有していることがわかった。つまり、第 V I I I 因子と V W F の複合体に対する接触処理の影響は、ヒト正常血漿に対する影響と同様の挙動を示すことを確認できた。

10

【0098】

〔イミノジ酢酸基を有するセファロースを用いた接触処理：接触処理時間と活性の変化〕
イミノジ酢酸基を有する化合物として、イミノジ酢酸基を有するセファロースである Chelating Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences 社) を水酸化ナトリウム溶液で前処理したものをを用いて、ヒト正常血漿を接触処理した。

水酸化ナトリウム水溶液の前処理により、セファロースが有するイミノジ酢酸基 (- N (C H ₂ C O O R) ₂) の R が H からナトリウムイオンに変わる。

20

【0099】

接触処理は、ヒト正常血漿 100 ml と、イミノジ酢酸基を有するセファロースを、セファロースの濃度が 0 w / v %、5 . 0 w / v %、10 . 0 w / v %、20 . 0 w / v % となるように混合して行った。そして、接触処理前及び各処理時間 (接触処理の時間が 1 . 0、2 . 0、4 . 0 時間) における、第 V I I I 因子の活性及び第 V 因子の活性を前記測定方法に従って測定した。接触処理していない標準品 (シスメックス社製の Coagtrol N) を測定した場合に得られる凝固活性を 100 % として、各測定サンプル中の第 V I I I 因子の活性 (%) 又は第 V 因子の活性 (%) を算出した。

【0100】

第 V I I I 因子の活性の測定結果を図 9 に示し、第 V 因子の活性の測定結果を図 10 に示す。なお、図中、縦軸は、第 V I I I 因子又は第 V 因子の活性 (%) を示し、横軸は接触処理した時間を示す。

30

【0101】

図 9 において、第 V I I I 因子活性は接触処理 1 時間で 10 % 付近まで低下し、以後 2 時間から 4 時間で 1 ~ 5 % までに低下した。また、図 10 において、第 V I I I 因子欠乏血漿中の第 V 因子活性は接触処理 1 時間で 20 ~ 60 % 付近まで低下し、以後 4 時間までにはセファロースの濃度が 5 . 0 w / v % の場合には 20 % にまで低下し、10 . 0 w / v % 及び 20 . 0 w / v % の場合には 1 % 未満にまで低下した。これにより、イミノジ酢酸基を有するセファロースとの接触処理により、血漿中の第 V 因子、第 V I I I 因子の活性が低下することがわかった。

40

【0102】

次に、水酸化ナトリウム溶液による前処理を行わずに、すなわちイミノジ酢酸基の R が H の場合のセファロースを用いて、上記と同様に接触処理し、第 V I I I 因子の活性及び第 V 因子の活性を測定した。前処理したイミノジ酢酸基を有するセファロースを用いて接触処理した場合に得られる測定結果と、前処理していないイミノジ酢酸基を有するセファロースを用いて接触処理した場合に得られる測定結果とを比較すると、第 V 因子及び第 V I I I 因子のいずれの活性も、前処理する場合のほうがより短時間でより低いレベルに活性を低下させる (図示せず)。以上のことから、接触処理に用いるイミノジ酢酸基を有するセファロースについては、イミノジ酢酸基 (- N (C H ₂ C O O R) ₂) の R が H であ

50

るものよりもナトリウムイオンであるもののほうが、接触処理においてより効果的に第Ⅴ因子及び第ⅤⅠⅠⅠ因子を不活化型へ変化することができることがわかる。

【産業上の利用可能性】

【0103】

本発明の不活化方法によれば、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子の活性型への変換を不能とするだけで、第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子は実質的に残存しているので、第ⅤⅠⅠⅠ因子と共同で安定して存在するⅤⅤⅤに影響を与えずに済む。従って、第Ⅴ因子又は第ⅤⅠⅠⅠ因子だけを不活化した血液凝固因子不活化試料を製造できる。

【0104】

しかも本発明の不活化方法では、原料としての血漿をイミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂と接触処理するだけで不活化できるので、従来免疫吸着法による凝固因子欠乏血漿の製造方法と比べても、短時間で効率的に血液凝固因子不活化試料を製造できる。

【0105】

さらにまた、従来因子吸着除去の方法により製造される第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子欠乏血漿では、ⅤⅤⅤを別途添加する必要があったが、本発明の不活化方法を用いることにより、ⅤⅤⅤが活性可能な状態で残存している血液凝固因子不活化試料を得ることができる。

【0106】

従って、本発明の血液凝固因子不活化試料を用いることにより、従来よりも効率的に、しかも低コストで、血液検体における第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子の有無、活性を測定でき、ひいては凝固因子欠損・異常症の診断測定に利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0107】

【図1】陽イオン交換樹脂の種類と第Ⅴ因子、第ⅤⅠⅠⅠ因子の活性との関係を測定した結果を示すグラフである。

【図2】イミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂の濃度及び接触時間と第ⅤⅠⅠⅠ因子活性との関係の測定結果を示すグラフである。

【図3】イミノジ酢酸型陽イオン交換樹脂の濃度及び接触時間と第Ⅴ因子活性との関係の測定結果を示すグラフである。

【図4】第Ⅴ因子欠乏血漿の接触処理と第ⅤⅠⅠⅠ因子活性の関係の測定結果を示すグラフである。

【図5】第ⅤⅠⅠⅠ因子欠乏血漿の接触処理と第Ⅴ因子活性の関係の測定結果を示すグラフである。

【図6】SDS電気泳動の結果を示す写真である。

【図7】イヌの正常血漿の第Ⅴ因子活性及び第ⅤⅠⅠⅠ因子活性及び第Ⅴ因子活性の測定結果を示すグラフである。

【図8】イヌの処理済血漿の第Ⅴ因子活性及び第ⅤⅠⅠⅠ因子活性の測定結果を示すグラフである。

【図9】イミノジ酢酸基を有するセファロースを用いた接触処理と第ⅤⅠⅠⅠ因子の活性の測定結果を示すグラフである。

【図10】イミノジ酢酸基を有するセファロースを用いた接触処理と第Ⅴ因子の活性の測定結果を示すグラフである。

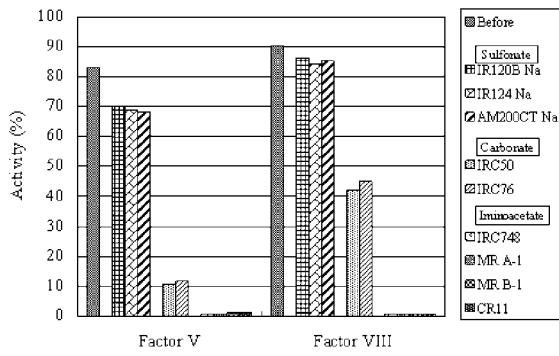
10

20

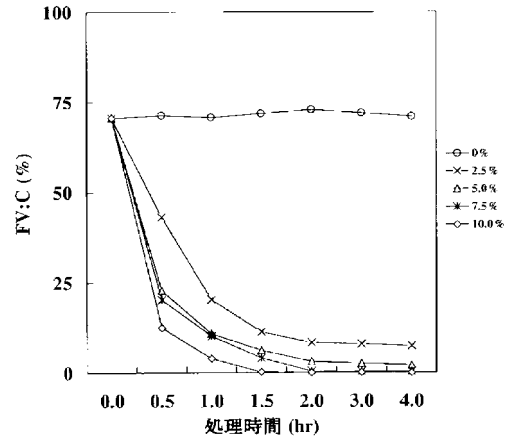
30

40

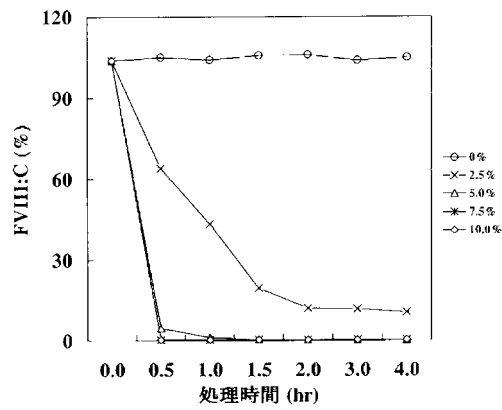
【 図 1 】



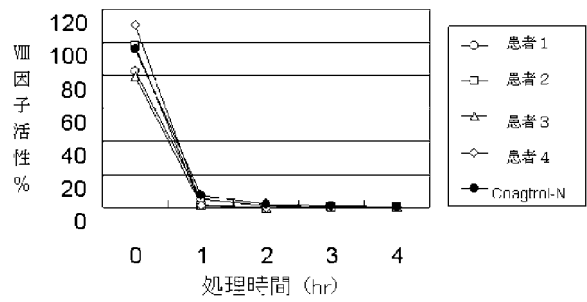
【 図 3 】



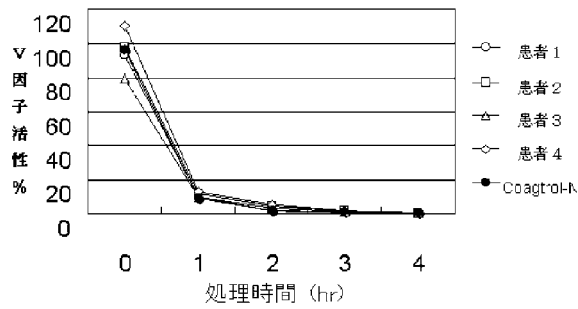
【 図 2 】



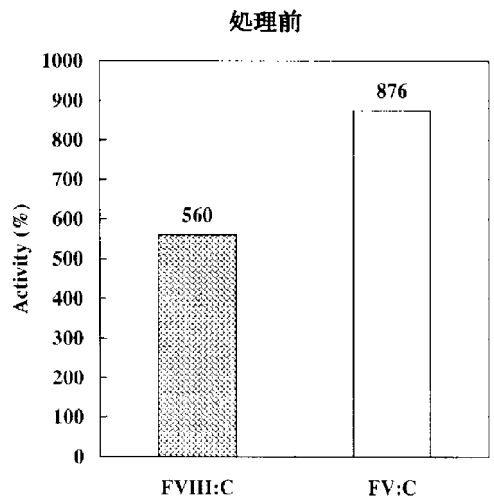
【 図 4 】



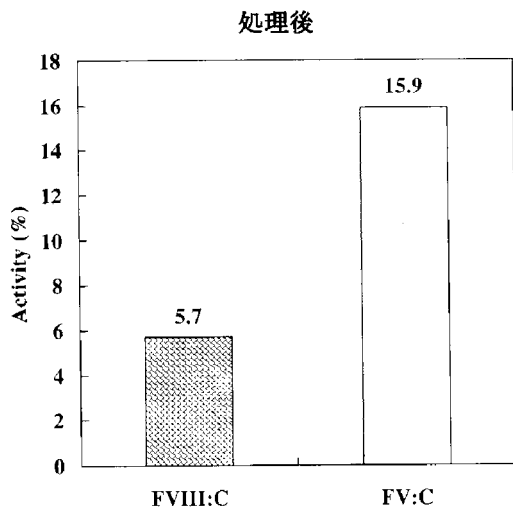
【 図 5 】



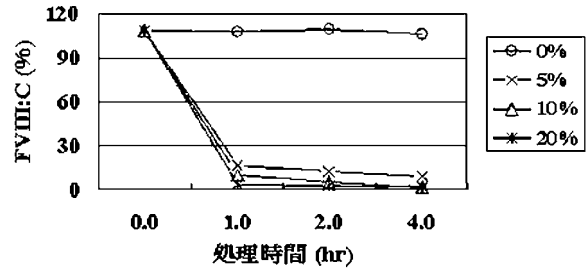
【 図 7 】



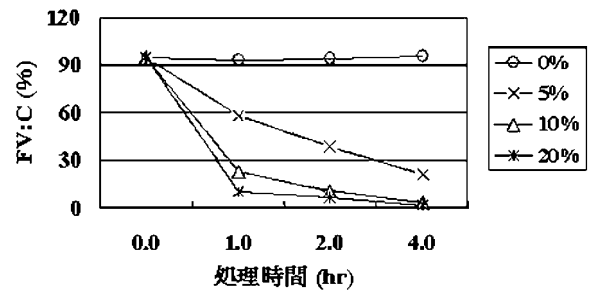
【 図 8 】



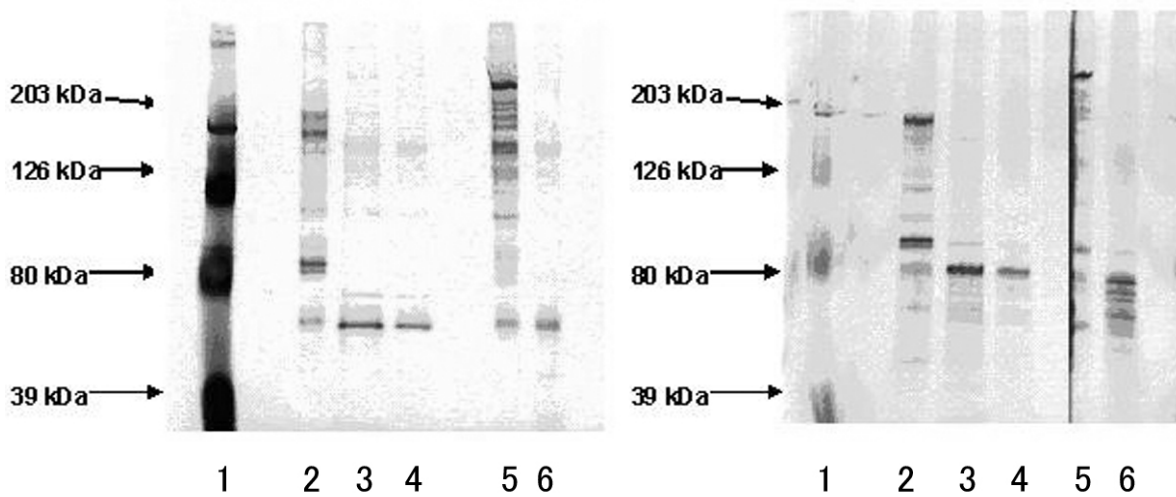
【 図 9 】



【 図 10 】



【 図 6 】



フロントページの続き

(72)発明者 嶋 緑倫

奈良県奈良市西紀寺町32-3

(72)発明者 武山 雅博

奈良県橿原市小網町8-25 リッツパレス101

審査官 山村 祥子

(56)参考文献 特開平10-067668(JP,A)

特開平08-220091(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98