

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第4509341号  
(P4509341)

(45) 発行日 平成22年7月21日 (2010. 7. 21)

(24) 登録日 平成22年5月14日 (2010. 5. 14)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 33/86 (2006. 01)

G O 1 N 33/86

G O 1 N 33/48 (2006. 01)

G O 1 N 33/48

B

G O 1 N 33/96 (2006. 01)

G O 1 N 33/96

B O 1 D 15/08 (2006. 01)

B O 1 D 15/08

B O 1 J 20/26 (2006. 01)

B O 1 J 20/26

H

請求項の数 6 (全 8 頁)

(21) 出願番号 特願2000-286307 (P2000-286307)  
 (22) 出願日 平成12年9月21日 (2000. 9. 21)  
 (65) 公開番号 特開2002-90361 (P2002-90361A)  
 (43) 公開日 平成14年3月27日 (2002. 3. 27)  
 審査請求日 平成19年8月28日 (2007. 8. 28)

(73) 特許権者 390014960  
 シスメックス株式会社  
 兵庫県神戸市中央区脇浜海岸通1丁目5番  
 1号  
 (74) 代理人 100088904  
 弁理士 庄司 隆  
 (72) 発明者 日裏 久英  
 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際  
 試薬株式会社 研究開発センター内  
 (72) 発明者 奥田 昌宏  
 兵庫県神戸市西区室谷1丁目1-2 国際  
 試薬株式会社 研究開発センター内  
 審査官 山村 祥子

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 凝固因子欠乏血漿およびその製造方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトまたは動物血漿から血液凝固因子欠乏血漿を製造する方法において、  
 凝固第Ⅴ因子及び凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子を吸着する機能を有する合成吸着剤またはキレート樹脂とヒトまたは動物血漿とを混合し、前記血漿中の凝固第Ⅴ因子及び凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子を前記合成吸着剤またはキレート樹脂に吸着させる吸着工程、及び  
 前記吸着工程で得られた混合液から、前記凝固第Ⅴ因子及び凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子を吸着した合成吸着剤またはキレート樹脂を除去する除去工程、  
 を含む、血液凝固因子欠乏血漿の製造方法。

【請求項 2】

前記除去工程で得られた血漿に、ヒトまたは動物由来の凝固第Ⅴ因子または凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子を添加する添加工程をさらに含む請求項 1 に記載の血液凝固因子欠乏血漿の製造方法。

【請求項 3】

前記合成吸着剤またはキレート樹脂を、血漿容量の 0.5 ~ 50 W / V % で用いることを特徴とする請求項 1 または 2 に記載の血液凝固因子欠乏血漿の製造方法。

【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか 1 に記載の方法によって製造された血液凝固因子測定用の凝固因子欠乏血漿。

【請求項 5】

10

20

請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 に記載の方法によって製造された血液凝固因子欠乏血漿、及び、正常血漿を含む血液凝固検査の精度管理用血漿。

【請求項 6】

請求項 4 に記載の血液凝固因子測定用凝固因子欠乏血漿を用いることを特徴とする血液凝固因子測定方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、臨床検査診断薬の分野でとりわけ血液凝固因子測定用の凝固因子欠乏血漿の製造方法、血液凝固検査用精度管理用血漿の製造方法および血液凝固因子測定試薬に利用される。

10

【0002】

【従来の技術】

血液凝固検査は先天的または後天的な血液凝固異常を検査するため、広く行なわれている。先天的な凝固異常として有名な血友病は、血液凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子または第ⅠⅩ因子の欠乏によって起こる疾患である。

【0003】

血液凝固異常の原因を検査するためにはそれぞれの血液凝固因子（以下、単に「凝固因子」という。）を測定する必要がある。凝固因子の測定は各凝固因子欠乏血漿に被検血漿を加えて、凝固時間を測定することにより行なわれている。該凝固因子測定に用いる凝固因子欠乏血漿は、先天的欠乏症のヒトまたは動物の血漿を用いるか、或いは各凝固因子に対する抗体を用いた人工的な免疫吸着法で製造され提供されている。

20

【0004】

この、凝固因子欠乏血漿の取得にあたり、先天的欠乏症の患者から血漿を入手することは患者に大きな負担を強いることになるという問題がある。この問題を解決するために考え出されたのが免疫吸着法であるが、免疫吸着法に使用する抗体の調製が非常に困難であったり、大量の抗体を用いて長時間の処理によって調製されるため、欠乏血漿の製造に多大な費用を要し、更に原料血漿そのものが失活するといった問題があった。また因子によっては吸着効率が悪く、欠乏度の高い欠乏血漿が製造できないといった問題もあった。特に第Ⅴ因子または第ⅤⅠⅠⅠ因子欠乏血漿を製造するのは困難であった。

30

【0005】

【解決しようとする課題】

本発明の課題は、先天的欠乏症の患者血漿を用いることなく、また、免疫吸着法とは異なる手法を用いることにより、迅速に効率良く凝固因子欠乏血漿を製造する方法を提供することである。本発明のさらなる課題は、原料血漿そのものが失活していない凝固因子欠乏血漿、凝固因子測定用凝固因子欠乏血漿もしくは精度管理用血漿、またはこれらの血漿を含む測定試薬キットを提供することである。

【0006】

【解決する手段】

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、ヒトまたは動物の血漿に、特定の凝固因子を吸着する機能を有する合成ポリマーを混合することにより、該特定の凝固因子が効率よく吸着除去されることを見出した。さらに、かかる手段により得られた凝固因子欠乏血漿を用いることにより、凝固因子測定用凝固因子欠乏血漿もしくは精度管理用血漿を簡単に製造できることを見出し、本発明を完成させるに至った。

40

【0007】

すなわち、本発明は、

1. ヒトまたは動物血漿から血液凝固因子欠乏血漿を製造する方法において、

凝固第Ⅴ因子及び凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子を吸着する機能を有する合成吸着剤またはキレート樹脂とヒトまたは動物血漿とを混合し、前記血漿中の凝固第Ⅴ因子及び凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子を前記合成吸着剤またはキレート樹脂に吸着させる吸着工程、及び

50

前記吸着工程で得られた混合液から、前記凝固第Ⅴ因子及び凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子を吸着した合成吸着剤またはキレート樹脂を除去する除去工程、

を含む、血液凝固因子欠乏血漿の製造方法、

２．前記除去工程で得られた血漿に、ヒトまたは動物由来の凝固第Ⅴ因子または凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子を添加する添加工程をさらに含む前項１に記載の血液凝固因子欠乏血漿の製造方法、

３．前記合成吸着剤またはキレート樹脂を、血漿容量の０．５～５０Ｗ／Ｖ％で用いることを特徴とする前項１または２に記載の血液凝固因子欠乏血漿の製造方法。

４．前項１～３のいずれか１に記載の方法によって製造された血液凝固因子測定用の凝固因子欠乏血漿。

５．前項１～３のいずれか１に記載の方法によって製造された血液凝固因子欠乏血漿、及び、正常血漿を含む血液凝固検査の精度管理用血漿。

６．前項４に記載の血液凝固因子測定用凝固因子欠乏血漿を用いることを特徴とする血液凝固因子測定方法、

からなる。

【０００８】

【発明の実施の形態】

本発明における特定の凝固因子とは、例えば凝固第Ⅴ因子および／または凝固第ⅤⅠⅠⅠ因子をいう。原料血漿の活性は、正常人の血漿の凝固因子活性を１００％として、その相対活性で表される。

【０００９】

本発明において、動物血漿中の特定の凝固因子を吸着する機能を有する合成ポリマーとは、該凝固因子を吸着する性質を有するものであればよく、特に限定されないが、好ましくは該凝固因子との関係において合成ポリマーの構造により少なくとも疎水性結合、イオン結合、水素結合またはVan der Waals力のいずれか１または２以上の結合能により該凝固因子を吸着する機能を有するポリマーをいい、より好ましくは主として疎水性結合により該凝固因子を吸着する機能を有するポリマーをいう。

【００１０】

ヒトまたは動物血漿中の特定の凝固因子を吸着除去するための合成ポリマーとして、ポリスチレン、ポリジビニルベンゼン、ジビニルベンゼン-スチレン共重合体またはポリアクリル、およびこれらのポリマーの少なくとも一部に置換基を有しているものが例示される。

【００１１】

上記合成ポリマーの例として、ポリスチレンラテックス、ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体ラテックス、ダイヤイオン（登録商標）HPシリーズ（HP10,HP20,HP,21,HP30,HP40,HP50）、ダイヤイオン（登録商標）SP800シリーズ（SP800,SP825,SP850,SP875）、ダイヤイオン（登録商標）SP200シリーズ（SP205,SP206,SP207）、ダイヤイオン（登録商標）HPM1G及びHP2MG、アンバーライト（登録商標）XADシリーズ（XAD-2,XAD-4,XAD-16,XAD-2000,XAD-7HP）、ムロキレート（登録商標）、ダウエックス（登録商標）A-1、アンバーライト（登録商標）CGシリーズ（CG50,CG120,CG400）、アンバーライト（登録商標）IRCシリーズ（IRC50,IRC76）、ダイヤイオン（登録商標）CRシリーズ（CR10,CR11,CR20,CRB02）、および合成高分子吸着マット等が挙げられる。

【００１２】

本発明において、ヒトまたは動物血漿中の特定の凝固因子を吸着除去するための合成ポリマーは、全血漿量に対し、好ましくは０．５～５０Ｗ／Ｖ％、より好ましくは５～２０Ｗ／Ｖ％で用いられる。

【００１３】

本発明によって製造される凝固因子欠乏血漿は、上記に例示されたポリマーから選ばれた１または２種類以上の合成ポリマーをヒトまたは動物血漿に混合し、該合成ポリマーに該凝固因子を吸着させたのち、ろ過または遠心除去等の方法で該合成ポリマーを除去するこ

10

20

30

40

50

とにより得られる。

【0014】

本発明における凝固因子欠乏血漿とは、ヒトまたは動物血漿中の特定の凝固因子の残存率が、吸着前の該凝固因子に対して5%以下、好ましくは1%以下、より好ましくは、0.5%以下となるまで除去された血漿をいう。より具体的には凝固第Ⅴ因子および/または凝固第ⅤⅢⅢⅢ因子の残存率が吸着前の各凝固因子に対し5%以下、好ましくは1%以下より好ましくは、0.5%以下となるまで除去された血漿をいう。凝固第Ⅴ因子欠乏血漿または、凝固第Ⅴ因子および凝固第ⅤⅢⅢⅢ因子欠乏血漿は凝固第Ⅴ因子の測定に重要であり、凝固第ⅤⅢⅢⅢ因子欠乏血漿は凝固第ⅤⅢⅢⅢ因子の測定に重要である。

【0015】

さらに、本発明は上記凝固因子欠乏血漿による凝固因子測定用試薬または凝固検査の精度管理用血漿をも含む。また、本発明はかかる凝固因子測定用試薬および/または凝固検査の精度管理用血漿を含む凝固因子測定用キットにも及ぶ。

【0016】

本発明をより具体的に説明するために、以下の実施態様を例に詳細に説明する。

健常人から抗凝固剤として3.8%クエン酸を用いて採血された正常ヒトプール血漿に合成ポリマーであるアンバーライトXAD-2を血漿容量の0.5~50W/V%、より好適には5~20W/V%を加え、室温で30分から3時間攪拌する。この操作により、凝固第Ⅴ因子及び第ⅤⅢⅢⅢ因子の欠乏した血漿が調製できる。投入するアンバーライトXAD-2の量と処理時間を調整することにより欠乏度を任意に製造することが可能である。より高い欠乏度を求める場合には、上記の操作を複数回繰り返すことも可能である。

【0017】

このようにして製造した血漿を凝固因子測定用試薬としての第Ⅴ因子欠乏血漿として用いる場合には、調製した血漿をそのまま用いることも可能であるが、さらに適宜緩衝液、安定化剤等を加えて凍結乾燥し、第Ⅴ因子欠乏血漿として保存して用いることもできる。

【0018】

本発明により製造した第Ⅴ因子欠乏血漿を用いて被検検体の第Ⅴ因子活性を測定するには、第Ⅴ因子欠乏血漿および5~10倍に生理食塩水または緩衝液で希釈した被検検体を等量混合したものに、プロトンピン時間測定試薬（例えば、市販品トロンボチェックPT、国際試薬株式会社製）を加え、凝固時間を測定することにより行なう。またプロトンピン時間測定試薬ではなく活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬（例えば、市販品トロンボチェックAPTT、国際試薬株式会社製）を用いて凝固時間を測定するためには、別途調製、精製したヒトまたは動物由来の凝固第ⅤⅢⅢⅢ因子の適当量を本発明により製造した血漿に加えて第Ⅴ因子欠乏血漿として利用することも可能である。

【0019】

本発明により調製した血漿を凝固因子測定用試薬としての第ⅤⅢⅢⅢ因子欠乏血漿として用いる場合には、製造した血漿に、ヒトまたは動物由来の精製第Ⅴ因子を適量添加することにより製造できる。製造した第ⅤⅢⅢⅢ因子欠乏血漿はそのまま用いるか、或いは適宜緩衝液、安定化剤等を加えて凍結乾燥し、第ⅤⅢⅢⅢ因子欠乏血漿として保存して用いることもできる。

【0020】

本発明により製造した第ⅤⅢⅢⅢ因子欠乏血漿を用いて被検検体の第ⅤⅢⅢⅢ因子活性を測定するには、第ⅤⅢⅢⅢ因子欠乏血漿と5~10倍に生理食塩水または緩衝液で希釈した被検検体を等量混合したものに、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬（例えば、市販品トロンボチェックAPTT、国際試薬株式会社製）を加え、所定時間放置後、20mM塩化カルシウム液を加えて凝固時間を測定することにより行なう。

【0021】

本発明により製造した血漿を精度管理用血漿として用いる場合には、製造した血漿と正常血漿を適当に混合し、所定の凝固時間を示す精度管理用血漿として製造する。製造した血漿は、適宜緩衝液、安定化剤等を加えて凍結乾燥し精度管理用血漿として凝固検査の精度

10

20

30

40

50

管理に用いることができる。

【 0 0 2 2 】

本発明により製造された凝固因子欠乏血漿または精度管理用血漿を用いて凝固因子測定キットを構成することもできる。

【 0 0 2 3 】

本発明を実施するために用いる合成ポリマーはポリスチレン、ポリジビニルベンゼン、ジビニルベンゼン - スチレン共重合体またはポリアクリル（これらのポリマーの少なくとも一部に置換基または官能基を有していることもある）等の骨格を有する合成ポリマー或いは合成樹脂が例示される。より具体的には、例えば、ポリスチレンラテックス、ポリスチレン - ジビニルベンゼン共重合体ラテックス、さらにはイオン交換樹脂、キレート樹脂、或いは合成吸着剤に分類される、ダイアイオンHPシリーズ（HP10,HP20,HP,21,HP30,HP40,HP50）、ダイアイオンSP800シリーズ（SP800,SP825,SP850,SP875）、ダイアイオンSP200シリーズ（SP205,SP206,SP207）、ダイアイオンHPM 1 G及びHP2MG、アンバーライトXADシリーズ（XAD-2,XAD-4,XAD-16,XAD-2000,XAD-7HP）、ムロキレート、ダウエックスA-1、アンバーライトCGシリーズ（CG50,CG120,CG400）アンバーライトIRCシリーズ（IRC50,IRC76）ダイアイオンCRシリーズ（CR10,CR11,CR20,CRB02）および合成高分子吸着マット等が例示される。本発明を実施するために、例示された合成ポリマーの中から選択して、その1種または2種以上を組み合わせ用いることができる。

【 0 0 2 4 】

上記の合成ポリマー或いは合成樹脂の処理血漿に対する投入量と処理時間及び処理回数は、目標とする因子の欠乏度に応じて適宜設定することができる。

【 0 0 2 5 】

【実施例】

以下に実施例をあげて本発明を更に説明するが、本発明は実施例に限定されるものではない。

【 0 0 2 6 】

【実施例 1】

正常ヒトプール血漿 1 0 0 m L に 1 0 g の合成ポリマーであるアンバーライトXAD - 2 樹脂を混和した。室温で1時間ゆっくりと混合した後、樹脂をろ過で取り除き、血漿の各凝固因子を測定した。樹脂を添加しない正常ヒトプール血漿を同様に操作し対照とした。その結果を表 1 に示した。

【 0 0 2 7 】

【表 1】

表 1 アンバライト XAD-2 処理による各凝固因子活性の変動

凝固因子	対照血漿の因子活性	処理血漿の因子活性
フィブリノゲン	255mg/dL	248mg/dL
Ⅱ因子	102%	103%
V因子	88%	>1%
VII因子	97%	101%
VIII因子	82%	> 1%
IX因子	104%	98%
X因子	96%	95%
X I 因子	98%	96%
X II 因子	92%	93%

【 0 0 2 8 】

以上の結果、アンバーライトXAD-2で血漿を処理することにより凝固第V因子と第V I I I 因子が特異的に吸着除去されることが判り、本発明の効果が確かめられた。

## 【 0 0 2 9 】

## 【実施例 2】

実施例 1 で製造した吸着処理血漿を用いて、凝固第 V 因子欠乏血漿として第 V 因子の測定を試みた。対照として、市販の免疫吸着法で調製された凝固第 V 因子欠乏血漿（商品名、データーファイ・ファクター V、デードベ어링社製）を用い、本発明の方法と対照で測定された検体の第 V 因子活性を比較した。

## 【 0 0 3 0 】

測定試薬は市販のプロトロンビン時間測定試薬（商品名、トロンボチェック P T、国際試薬株式会社製）を用い、凝固自動測定機器コアグレックス 7 0 0（島津製作所製）で測定した。10 例の検体の測定結果を表 2 に示した。

10

## 【 0 0 3 1 】

## 【表 2】

表 2 第 V 因子活性の測定結果

検体 No	本発明の方法での 測定結果(活性%)	市販品での測定結 果(活性%)
1	56	57
2	98	96
3	87	87
4	35	34
5	76	76
6	96	98
7	101	97
8	83	86
9	74	72
10	46	44

20

## 【 0 0 3 2 】

以上のように、本発明による第 V 因子欠乏血漿と市販の免疫吸着法との測定値の比較において、ほぼ同等の測定値が得られたことから、本発明の方法により調製された第 V 因子欠乏血漿は第 V 因子測定に有用であることが判り、本発明の有用性が確かめられた。

30

## 【 0 0 3 3 】

## 【実施例 3】

実施例 1 で製造した吸着処理血漿を用いて、凝固第 V I I I 因子欠乏血漿を製造した。予め、牛血漿より公知の方法により、牛第 V 因子を単離精製した牛第 V 因子標品を準備しておき、製造した吸着処理血漿に第 V 因子活性が約 8 0 ~ 1 0 0 % となるように牛第 V 因子標品を添加し、凝固第 V I I I 因子欠乏血漿を製造し、第 V I I I 因子の測定を試みた。対照として、市販の免疫吸着法で製造された凝固第 V I I I 因子欠乏血漿（商品名、データーファイ・ファクター V I I I、デードベ어링社製）を用い、本発明の方法と対照で測定された検体の第 V I I I 因子活性を比較した。

40

測定試薬は市販の活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬（商品名、トロンボチェック A P T T、国際試薬株式会社製）を用い、凝固自動測定機器コアグレックス 7 0 0（島津製作所製）で測定した。10 例の検体の測定結果を表 3 に示した。

## 【 0 0 3 4 】

## 【表 3】

表3 第Ⅷ因子活性の測定結果

検体 No	本発明の方法での測定結果(活性%)	市販品での測定結果(活性%)
1	44	42
2	88	90
3	25	22
4	3	4
5	76	79
6	89	86
7	98	100
8	84	88
9	78	75
10	63	61

10

## 【0035】

以上のように、本発明による第ⅤⅠⅠⅠ因子欠乏血漿と市販の免疫吸着法との測定値の比較において、ほぼ同等の測定値が得られたことから、本発明の方法により製造された第ⅤⅠⅠⅠ因子欠乏血漿は第ⅤⅠⅠⅠ因子測定に有用であることが判り、本発明の有用性が確かめられた。

20

## 【0036】

## 【実施例4】

実施例1で製造した吸着処理血漿に正常プール血漿を3v/v%及び7v/v%を加えそれぞれ精度管理用血漿ⅠⅠⅠ及び精度管理用血漿ⅠⅠとし、安定化剤を加えて凍結乾燥処理し精度管理用血漿を製造した。その精度管理用血漿のプロトロンビン時間(PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)を測定し精度管理用血漿としての有用性を確かめた。その結果を表4に示した。

## 【0037】

## 【表4】

30

表4 精度管理用血漿の測定値

(秒)			
測定項目	正常プール血漿	精度管理用血漿Ⅱ	精度管理用血漿Ⅲ
PT	11.2	16.8	22.6
APTT	29.4	38.7	47.9

## 【0038】

以上の結果、正常プール血漿に比べて精度管理用血漿では凝固時間が延長しており、異常値域の精度管理用血漿として有用であることがわかった。さらに、正常血書の添加割合を変化させることにより、凝固時間を任意に設定できるため、目標の凝固時間を示す精度管理用血漿を人工的に製造することも可能である。したがって本発明は精度管理用血漿の製造にも有用であることが判った。

40

## 【0039】

## 【発明の効果】

本発明により、先天的欠乏症の患者血漿を用いることなく、また、免疫吸着法とは異なる手法を用いることにより、迅速に効率良く凝固因子欠乏血漿の製造方法が提供される。さらに原料血漿そのものが失活していない凝固因子欠乏血漿、凝固因子測定用凝固因子欠乏血漿もしくは精度管理用血漿、またはこれらの血漿を含む測定試薬キットが提供される。

---

フロントページの続き

- (56)参考文献 特開平 0 6 - 0 7 4 9 5 5 ( J P , A )  
特開平 0 3 - 1 8 9 5 5 9 ( J P , A )  
特開平 0 5 - 2 6 2 6 6 4 ( J P , A )  
臨床検査法提要 ( 改訂第 2 9 版 ) , 1 9 8 3 年 , 第 3 7 0 - 3 7 4 ページ

(58)調査した分野(Int.Cl. , D B 名)

G01N 33/48-98

B01D 15/08

B01J 20/26