

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第4526152号  
(P4526152)

(45) 発行日 平成22年8月18日(2010.8.18)

(24) 登録日 平成22年6月11日(2010.6.11)

(51) Int.Cl.

G O 1 N 33/86 (2006.01)

F 1

G O 1 N 33/86

請求項の数 4 (全 5 頁)

(21) 出願番号 特願2000-63945 (P2000-63945)  
 (22) 出願日 平成12年3月8日 (2000.3.8)  
 (65) 公開番号 特開2001-255332 (P2001-255332A)  
 (43) 公開日 平成13年9月21日 (2001.9.21)  
 審査請求日 平成19年2月16日 (2007.2.16)

(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 100088867  
 弁理士 西野 卓嗣  
 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  
 (72) 発明者 菊川 紀弘  
 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 浅尾 徳彦  
 兵庫県神戸市西区高塚台4丁目3-2  
 国際試薬株式会社 西神工場内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】プロトロンビン時間測定試薬

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

リン脂質、組織因子および水溶性のニッケル化合物を含有することを特徴とするプロトロンビン時間測定試薬。

## 【請求項 2】

水溶性のニッケル化合物が塩化ニッケル、硝酸ニッケル又は酢酸ニッケルから選ばれる少なくとも1又は2以上の化合物を含有することを特徴とする請求項1に記載のプロトロンビン時間測定試薬。

## 【請求項 3】

請求項1又は2に記載の化合物の濃度が0.1~5.0 mmol/Lであることを特徴とするプロトロンビン時間測定試薬。 10

## 【請求項 4】

請求項1~3のいずれか1項に記載のプロトロンビン時間測定試薬を用いることを特徴とするプロトロンビン時間測定方法。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

## 【発明の属する技術分野】

本発明は臨床検査に用いられるプロトロンビン時間測定試薬及びプロトロンビン時間測定方法に関する。

## 【0002】

**【従来の技術】**

血液凝固能検査の中でプロトロンビン時間測定(PT)は、血液凝固因子であるII、V、VII、X因子の活性を総合的に検査するものであり、凝固能検査のスクリーニング検査及び経口抗凝固薬の効果判定検査として広く実施されている。PTの測定は、組織因子又は組織因子を含むヒト又は動物由来の組織トロンボプラスチンと適当な濃度のカルシウムイオンが主成分である測定試薬に、被検血漿を加え、血液凝固時間を測定することにより行われる。試薬成分であるヒト又は動物由来の組織トロンボプラスチンは通常脳あるいは胎盤といった臓器から抽出される。抽出源となる臓器には血液凝固因子を含む血液成分が含まれている。このため、血液凝固因子を混在させないで組織トロンボプラスチンを抽出することは困難であり、血液凝固因子の活性を感度よく反映する試薬を調製することは困難であった。とりわけVII因子と組織トロンボプラスチンは複合体を形成するため、VII因子活性を感度よく反映する組織トロンボプラスチンを調製することが極めて困難であった。

**【0003】**

感度の良い組織因子又は組織トロンボプラスチンを含有する試薬を調製することはこの分野に携わる研究者の最大の課題であり、組織トロンボプラスチンを抽出、調製する方法が今までにも示されていたが(特許公告平3-39267、公表特許公告平3-503534、公開特許公告平成10-330400、米国特許3,983,004)、何れも実用的に満足の行くものではなかった。

**【0004】**

**【解決しようとする課題】**

本発明の課題は、血液凝固因子活性を感度良く測定できるプロトロンビン時間測定試薬を提供することである。

**【0005】**

**【解決する手段】**

本発明者らは鋭意研究を重ねた結果、組織因子又は動物器官より抽出した組織トロンボプラスチンとニッケル化合物を混合させることにより、飛躍的に感度の良い試薬すなわち、WHO参照品と同等の感度を示す ISI 値が 1.5 以下であり、さらに、外因系凝固因子に対する感受性が高い試薬を調製できることを見出し本発明を完成させるに至った。また目標とする ISI 値は 1.5 以下に限定されるもので無く当業者が適宜目的に応じ設定可能である。その他条件についても同様に当業者が適宜目的に応じ設定可能である。

**【0006】**

本発明は、リン脂質、組織因子および水溶性のニッケル化合物を含有させることを特徴とするプロトロンビン時間測定試薬に関するものである。上記ニッケル化合物が塩化ニッケル、硝酸ニッケル又は酢酸ニッケルから選ばれる少なくとも 1 又は 2 以上の化合物を含有することを特徴とするプロトロンビン時間測定試薬に関するものである。上記化合物の濃度が 0.1 ~ 5.0 mmol/L であることを特徴とするプロトロンビン時間測定試薬に関するものである。上記プロトロンビン時間測定試薬を用いることを特徴とするプロトロンビン時間測定方法に関するものである。

**【0007】**

組織因子は、ヒト又は動物由来の組織トロンボプラスチンに含まれており、さらに遺伝子組換えにより作成することもできる。組織因子の遺伝子組換えによる作成は、遺伝子組換えにより得られた組織因子タンパク質にリン脂質を加えることにより組織因子としての活性が発現される。また、組織トロンボプラスチンは一般にヒト胎盤又はウサギ或いは牛脳から抽出される。ウサギ脳を用いる場合には、ウサギ脳をアセトンで脱水したアセトン粉末を、適当な緩衝液で抽出される。牛脳もアセトン粉末から抽出したり、新鮮脳をミンチにして直接抽出することもある。抽出した組織トロンボプラスチンは適当な濃度に調整されて、カルシウムイオン及び安定化、賦型剤等を添加して凍結乾燥されるのが一般的である。場合によっては、液状で保存されることもある。

**【0008】**

10

20

30

40

50

ニッケル化合物を添加する工程は特に限定されないが、上記の最終調製物または抽出液に含ませておくこともできる。添加する濃度は0.1~5.0mmol/Lであり、とりわけ0.5~3.0mmol/Lが好適である。添加するニッケル化合物の種類は特に限定されないが、塩化ニッケル、硝酸ニッケル等の無機化合物及び酢酸ニッケル等の有機ニッケル化合物等の中から選ばれる。

## 【0009】

## 【実施例】

以下に実施例を挙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。

## 【0010】

10

## 【実施例1】

ウサギ脳をアセトンで脱水したウサギ脳アセトン粉末3gを生理食塩水100mLに懸濁し、45℃で30分間攪拌した後、5,000回転で10分間遠心分離してその上清をトロンボプラスチン抽出原液とした。抽出原液4容と0.1mmol/L NaCl、12.0mmol/L 乳酸カルシウムを含む50mmol/L HEPES-Tris緩衝液(pH7.35)1容を混合してPT測定試薬とした。調製試薬に1mmol/Lの種々の金属化合物を添加し、コントロール血漿のPTを測定し、国際感度指数(ISI)及びVII因子欠乏血漿のPT比を求めた。その結果を表1に示した。

## 【0011】

## 【表1】

20

表1：各種金属化合物の感度指標改善効果

金属化合物 (1mmol/L)	ISI 値	VII因子欠乏血漿の PT 比
無添加	1.80	2.52
塩化ニッケル	1.38	6.22
塩化亜鉛	1.86	2.72
硫酸銅	1.74	2.61
硫酸バリウム	1.55	3.75
塩化マグネシウム	1.93	2.29
塩化第二鉄	1.83	2.45
塩化コバルト	1.82	2.27
塩化マンガン	1.91	2.57
塩化クロム	1.85	2.67
塩化アルミニウム	1.65	3.06

30

## 【0012】

以上の結果、塩化ニッケルが特異的にISI値を小さくしVII因子欠乏血漿に対するPT比を大きくする効果があり、PT試薬の感度の改善に有効であることが判った。

## 【0013】

40

## 【実施例2】

実施例1で用いた無添加のPT試薬に、塩化ニッケル、酢酸ニッケル、硝酸ニッケルを各1mmol/L添加してISI値及びVII因子欠乏血漿のPT比の改善効果を実施例1と同様にコントロール血漿のPTを測定して調べた。その結果を表2に示した。

## 【0014】

## 【表2】

表 2 : 各種ニッケル化合物の感度指標改善効果

Ni 化合物 (1 mmol/L)	ISI 値	VII 因子欠乏血漿の PT 比
無添加	1. 78	3. 21
塩化ニッケル	1. 35	6. 15
硝酸ニッケル	1. 41	6. 39
酢酸ニッケル	1. 38	6. 46

## 【0015】

10

以上の結果いずれのニッケル化合物でも ISI 値及び VII 因子欠乏血漿の PT 比の改善効果が認められ、ニッケルイオンが PT 試薬の感度の改善に有効であることが判った。

## 【0016】

## 【実施例 3】

塩化ニッケルの濃度を変化させて、実施例 1 と同様に操作して、ニッケルイオンの濃度効果を調べた。その結果を表 3 に示した。

## 【0017】

## 【表 3】

表 3 : 感度指標に及ぼす塩化ニッケルの濃度の影響

20

塩化ニッケル (mmol/L)	正常域 (秒)	ISI 値	VII 欠乏因子血漿の PT 比
0	12. 0	1. 75	2. 91
0. 1	12. 0	1. 70	3. 42
0. 5	12. 1	1. 65	4. 62
1. 0	12. 3	1. 48	5. 61
3. 0	13. 4	1. 35	6. 45
5. 0	14. 4	1. 21	7. 86
10. 0	17. 3	1. 11	9. 82
20. 0	19. 5	1. 07	11. 14

30

## 【0018】

以上の結果、塩化ニッケル濃度の増加と共に ISI 値の低下及び VII 因子に対する感度、すなわち高感度化効果が観測されたが、5 mM を超える濃度では、正常血漿の PT が大幅に延長するため適当な濃度として塩化ニッケル 0. 1 ~ 5. 0 mmol/L の範囲で効果的であり、とりわけ 0. 5 ~ 3. 0 mmol/L が好適であることが判った。

## 【0019】

## 【発明の効果】

組織因子又は組織トロンボプラスチンとニッケルイオンを含有させることにより血液凝固活性を感度よく測定可能となった。

40

---

フロントページの続き

審査官 浅野 美奈

(56)参考文献 特開昭59-091899(JP,A)

特表平05-506309(JP,A)

特公平03-039267(JP,B2)

特表平11-514101(JP,A)

特開昭62-240616(JP,A)

特開昭62-239989(JP,A)

特開昭63-083670(JP,A)

特開昭63-083669(JP,A)

SANFORD LEIKIN, SAMUEL P. BESSMAN, The Effects of Various EDTA Complexes on Coagulation, Blood, 米国, the American Society of Hematology, 1956年 5月11日, Vol.11/No. 10, 916-923

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G01N 33/48-98

CAplus/MEDLINE(STN)

JSTplus/JMEDplus/JST7580(JDreamII)