

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第4440452号
(P4440452)

(45) 発行日 平成22年3月24日(2010.3.24)

(24) 登録日 平成22年1月15日(2010.1.15)

(51) Int.Cl.

F I

G O 1 N 33/86 (2006.01)

G O 1 N 33/86

C 1 2 Q 1/37 (2006.01)

C 1 2 Q 1/37

請求項の数 4 (全 6 頁)

(21) 出願番号 特願2000-353408 (P2000-353408)
 (22) 出願日 平成12年11月20日(2000.11.20)
 (65) 公開番号 特開2002-156379 (P2002-156379A)
 (43) 公開日 平成14年5月31日(2002.5.31)
 審査請求日 平成19年10月17日(2007.10.17)

(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 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 三木 隆

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 溶液で安定でかつ効率的に活性化する A P T T 測定用試薬

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

活性化剤としてエラグ酸を含有する、活性化部分トロンボプラスチン時間測定用の液状試薬の凝固時間の経時的変化を抑制する方法であって、凝固時間の経時的変化の抑制剤として塩化アルミニウムを含有することを特徴とする、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬の凝固時間の経時的変化を抑制する方法。

【請求項 2】

活性化剤としてエラグ酸を含有する、活性化部分トロンボプラスチン時間測定用の液状試薬であって、凝固時間の経時的変化の抑制剤として塩化アルミニウムを含有することを特徴とする、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬。

【請求項 3】

塩化アルミニウムを、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬の凝固時間の経時的変化を抑制する有効量添加した請求項 2 に記載の試薬。

【請求項 4】

銅化合物をさらに含有する、請求項 2 又は 3 に記載の試薬。

【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血液凝固能測定用試薬及び血液凝固能の検査用試薬に関する。より詳しくは、活性化部分トロンボプラスチン時間（以下 A P T T という）測定用

試薬組成物に関する。

【 0 0 0 2 】

【従来の技術】

A P T Tの測定は、内因性凝固機序に関係する、凝固第VIII因子、IX因子、XI因子、XII因子等の血液凝固因子の異常を鋭敏に反映し、内因系止血異常のスクリーニングとして必須の検査手段である。

体外診断薬で用いられるA P T T測定用試薬は、古くからタンニン酸から誘導させるエラグ酸、カオリン、又はセライト等を活性化剤として用いている。調製方法として、エラグ酸溶液に銅、ニッケル、コバルト類を混合させて活性化する方法が報告されている（米国特許3,486,981、R.E.Speckら、特表平5 - 5 0 6 3 0 9、R.E.Speckら）。また、銅を用

10

いる方法は、既にP.E.Bockらにより報告されている（Biochemistry,8,7258,1981.）。しかし、これらの金属イオンを用いてエラグ酸を活性化させるA P T T測定用試薬を調製する方法は、溶液中での安定性、検体の希釈直線性の面とプレカリクレインに対する反応性で劣ることが問題となっている。

【 0 0 0 3 】

【解決すべき課題】

本発明の課題は、A P T T測定用試薬にあって、検体の希釈直線性、溶液状態での安定性に優れ、プレカリクレインの反応性の高い試薬組成物を提供することである。

【 0 0 0 4 】

【課題を解決する手段】

20

本発明者らは種々添加物の検討を行い鋭意研究を重ねた結果、A P T T測定用試薬にあって、アルミニウム化合物を含有させることにより上記課題を解決しうることを見出し、本発明を完成した。

【 0 0 0 5 】

つまり、本発明は、

- 1．アルミニウム化合物を含有させることを特徴とする活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬組成物、
 - 2．アルミニウム化合物が少なくとも塩化アルミニウムを含む前項1記載の試薬組成物、
 - 3．アルミニウム化合物を、試薬組成物の保存安定化有効量添加した前項1又は2記載の試薬組成物、
 - 4．アルミニウム化合物の添加する濃度が、10～100 $\mu\text{mol/L}$ である前項1～3の何れか1に記載の試薬組成物、
 - 5．前項1～4のいずれか1に記載の試薬組成物を用いた活性化部分トロンボプラスチン時間の測定方法、
- からなる。

30

【 0 0 0 6 】

【発明の実施の形態】

本発明の試薬は、広く既知のA P T T測定用試薬に適用できる。A P T T測定用試薬とは、P T T（部分トロンボプラスチン）測定用試薬（セファリン含有）に、カオリン、セライト、エラグ酸等の活性化剤を添加した試薬である。

40

【 0 0 0 7 】

すなわち本発明は、

（1）活性化剤としてエラグ酸を含有する、活性化部分トロンボプラスチン時間測定用の液状試薬の凝固時間の経時的変化を抑制する方法であって、凝固時間の経時的変化の抑制剤として塩化アルミニウムを含有することを特徴とする、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬の凝固時間の経時的変化を抑制する方法、

（2）活性化剤としてエラグ酸を含有する、活性化部分トロンボプラスチン時間測定用の液状試薬であって、凝固時間の経時的変化の抑制剤として塩化アルミニウムを含有することを特徴とする、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬、

（3）塩化アルミニウムを、活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬の凝固時間の経

50

時的变化を抑制する有効量添加した前項 2 に記載の試薬、

(4) 銅化合物をさらに含有する、前項 2 又は 3 に記載の試薬、からなる。

【0008】

その使用量は、試薬組成物の液状での保存安定化効果の確認により選定され、保存安定化有効量添加される。液状での添加の好ましい態様としては、1~1000好ましくは10~100 μ mol/Lの添加量である。

【0009】

組成物は、アルミニウム化合物単独の添加でもよいが、他の金属化合物との併用も可能である。そのような金属化合物としては、好ましくは銅化合物（硫酸銅等）、鉄化合物（塩化第二鉄等）、マンガン化合物（塩化マンガン等）が例示され、より好適な化合物は銅化合物が挙げられる。

10

【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】

【実施例 1】

（A P T T 測定用試薬の調製方法）

エラグ酸は、東京化成、SIGMA、FLUKA、和光純薬、ICNから市販品として購入することができる。エラグ酸を0.025gを秤量し、0.001M水酸化ナトリウム液 1 Lで溶解した。これに50 μ mol/Lになるように各種重金属を混合し、さらに、この溶液にトリスを0.22g、ヘプスを1.45g溶解させてエラグ酸溶液とした。別のガラス容器にウサギ脳由来セファリン（Bell and Alton法、Nature, 174, 880 (1954)）を0.01g秤量し、上記エラグ酸溶液でセファリンを溶解して A P T T 測定用試薬を調製した。尚、セファリンは、精製リン脂質または合成リン脂質を用いても調製することができる。

20

【0011】

（凝固アッセイ方法）

試料50 μ Lを採取し37℃で60秒間加温した。調製された A P T T 測定用試薬を 50 μ L混合し、さらに37℃で180秒間加温活性化した。20mM塩化カルシウム液を50 μ L混合し、凝固時間を測定した。尚、本測定は全自動血液凝固分析装置Coagrex-700を用いて行った。

【0012】

（実験例 1）

上記の調製法及びアッセイ法を使い、各種金属化合物の添加による効果を検討した。その結果、表 1 に示す各種金属化合物によるエラグ酸混合物の活性化効果についての成績が得られた。

30

【0013】

表 1 に示すとおり、正常試料であるコアグトロールNを検体として、凝固時間をCoagrex-700を用いて測定した結果、硫酸銅、塩化マンガン、塩化アルミニウム、塩化第 2 鉄で活性化効果が認められた。さらに、コアグトロールNを生理的食塩水で順次希釈し、2 倍希釈液及び 4 倍希釈溶液を試料として、コアグトロールNの希釈直線性を最小二乗法で回帰分析した。その結果、塩化アルミニウムの場合の希釈直線性が最も優れていた。また、ブレカリクレイ欠乏症患者血漿では塩化アルミニウムが凝固時間の延長が優れ、硫酸銅、塩化マンガン、塩化第 2 鉄は同等レベルの延長度合いの悪い反応性を示した。一方、塩化第 2 鉄はエラグ酸と黒色のキレートを呈し沈殿物を生じた。

40

【0014】

表 1 各種金属化合物とエラグ酸の混合物の活性化効果

金属化合物	凝固時間	PK-dep	希釈直線
無添加	N. D.	N. D.	N. D.
塩化ニッケル	175秒	194秒	N. D.
塩化亜鉛	N. D.	N. D.	N. D.
硫酸銅	27秒	87秒	0.9921
塩化マグネシウム	N. D.	N. D.	N. D.
塩化第二鉄	36秒	93秒	0.9845
塩化コバルト	98秒	62秒	N. D.
塩化マンガン	35秒	57秒	0.9896
塩化カルシウム	52秒	63秒	N. D.
塩化アルミニウム	31秒	218秒	0.9998

N. D. : 検出及び計算できず

PK-dep: プレカリクレイン欠乏症患者血漿

【 0 0 1 5 】

(実験例 2)

選択された金属化合物類で調製された A P T T 測定用試薬の保存安定化性を、同様に検定した。その結果、表 2 に示す安定化効果についての成績が得られた。

【 0 0 1 6 】

表 2 選択された金属化合物類で調製された A P T T 測定用試薬の安定化効果

金属化合物	37℃, 0日	37℃, 7日	37℃, 14日
硫酸銅	29.7秒	27.3秒	24.4秒
塩化アルミニウム	31.7秒	31.2秒	31.5秒
塩化マンガン	35.5秒	31.9秒	30.1秒

【 0 0 1 7 】

表 2 に示すとおり、正常血漿であるコアグトロール N を試料として、A P T T 測定用試薬の 37℃ 下における保存安定性を観察した結果、硫酸銅と塩化マンガンは凝固時間の経時的変化を与えるのに対して、塩化アルミニウムは凝固時間の変動を与えず一定した効果が得られ、安定性が極めて優れていた。

【 0 0 1 8 】

(実験例 3)

実験例 2 で安定性に優れていた塩化アルミニウムと安定性に問題があった硫酸銅で混合調製された A P T T 測定用試薬の保存安定性を同様に検定した。その結果、表 3 に示す安定化効果についての成績が得られた。

【 0 0 1 9 】

表 3 塩化アルミニウムと硫酸銅で調製された A P T T 測定用試薬の安定化効果

金属化合物	37℃, 0日	37℃, 7日	37℃, 14日
硫酸銅	29.6秒	27.9秒	23.7秒
塩化アルミニウム	31.2秒	31.0秒	31.2秒
混合	30.5秒	30.2秒	30.1秒

【 0 0 2 0 】

表 3 に示すとおり、硫酸銅と塩化アルミニウムを混合してエラグ酸を活性化させた場合であっても 37 における溶液の安定性は保持され、塩化アルミニウム添加により安定化されていることが明らかとなった。

【 0 0 2 1 】

(実験例 4)

塩化アルミニウムと硫酸銅で調製された A P T T 測定用試薬の性能を検定した。その結果、表 4 に示す成績が得られた。

【 0 0 2 2 】

表 4 に示すとおり、塩化アルミニウムと硫酸銅で調製された A P T T 測定用試薬を用いた場合は、3 度の試行においていずれも硫酸銅単独で調製した測定試薬よりも優れた検体希釈直線性と安定性およびプレカリクレイン欠乏血漿における著しい凝固時間の延長を示した。このことにより、アルミニウム化合物の添加により、検体直希釈直線性、安定性およびプレカリクレイン欠乏血漿における著しい凝固時間の延長が保持されることが明らかとなった。

10

【 0 0 2 3 】

表 4 塩化アルミニウムと硫酸銅で調製された A P T T 測定用試薬の性能

試行例	希釈直線性	37℃, 0日	37℃, 14日	PK-dep
1	0.9994	29.9秒	30.1秒	198.3秒
2	0.9997	30.4秒	30.2秒	180.2秒
3	0.9995	29.4秒	29.8秒	202.9秒

20

【 0 0 2 4 】

【 発明の効果 】

以上のように、本発明によれば希釈直線性、溶液状態での安定性に優れ、プレカリクレインに対する反応性の高い A P T T 測定用試薬組成物が提供でき、凝固時間の測定において感度の向上が可能となる。

フロントページの続き

- (56)参考文献 特公平07-051078(JP,B2)
特表平05-506309(JP,A)
特開昭59-091899(JP,A)
特開昭50-085393(JP,A)
特開平11-166932(JP,A)
特表平10-503008(JP,A)
化学大事典1 縮刷版,共立出版株式会社,1963年,P.1018

(58)調査した分野(Int.Cl.,DB名)

G01N 33/86

C12Q 1/37