

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3600667号
(P3600667)

(45) 発行日 平成16年12月15日(2004.12.15)

(24) 登録日 平成16年9月24日(2004.9.24)

(51) Int. Cl.⁷

F I

GO 1 N 33/86

GO 1 N 33/86

請求項の数 17 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願平7-289448	(73) 特許権者	398032751
(22) 出願日	平成7年11月8日(1995.11.8)		デイド・ベーリング・マルブルク・ゲゼル
(65) 公開番号	特開平8-220101		シャフト・ミット・ベシユレンクテル・ハ
(43) 公開日	平成8年8月30日(1996.8.30)		フツング
審査請求日	平成14年10月29日(2002.10.29)		ドイツ連邦共和国 マルブルク/ラーン (
(31) 優先権主張番号	P4439756:9		番地なし)
(32) 優先日	平成6年11月9日(1994.11.9)	(74) 代理人	100091731
(33) 優先権主張国	ドイツ(DE)		弁理士 高木 千嘉
		(74) 代理人	100087930
			弁理士 佐藤 辰男
		(74) 代理人	100080355
			弁理士 西村 公佑
		(72) 発明者	ミヒアエル・クラウス
			ドイツ連邦共和国デー 35041マルブ
			ルク. アム・ツイーゲンベルク8
			最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 欠損凝固V因子を検出する試験方法で使用するためのキャリブレータ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

犬もしくは兔由来の血漿またはそのV因子含有フラクションおよびヒト血漿を含有することを特徴とする欠損凝固V因子検出のための試験法で使用するキャリブレータ。

【請求項2】

正常なヒト血漿で得られるのとは異なった結果を、F.V - 依存またはF.V a - 依存試験法で生じる種からの血漿を使用する請求項1記載のキャリブレータ。

【請求項3】

A P C 依存検定法で、犬もしくは兔由来の血漿が凝血時間の短縮または凝血時間と同等のパラメータの低減を生じる請求項1記載のキャリブレータ。

【請求項4】

犬もしくは兔由来のV因子を含むクエン酸添加血漿または血漿フラクションを使用する請求項1記載のキャリブレータ。

【請求項5】

ヒト血漿がヒトクエン酸添加血漿である請求項1～4記載のキャリブレータ。

【請求項6】

ヒトクエン酸添加血漿に対する犬または兔のV因子含有添加物の濃度をキャリブレータの反応性が添加物なしのものと明確に異なるように選択する請求項1～5記載のキャリブレータ。

【請求項7】

添加物を凝血時間が未反応ヒトクエン酸添加血漿で得られる凝血時間とは少なくとも20%異なっているように選択される請求項6記載のキャリブレータ。

【請求項8】

添加物を凝血時間が未反応ヒトクエン酸添加血漿で得られる凝血時間とは少なくとも50%異なっているように選択される請求項6記載のキャリブレータ。

【請求項9】

タンパク質C / タンパク質S系の機能効率を検査する凝固試験のための請求項1～8記載のキャリブレータの使用。

【請求項10】

Va因子を分解する活性化タンパク質Cの能力を検査する凝固試験のための請求項1～8記載のキャリブレータの使用。

【請求項11】

活性化タンパク質Cを外因により添加する請求項9記載の使用。

【請求項12】

試料のタンパク質Cが活性化される請求項9記載の使用。

【請求項13】

フィブリノクロットの形成により、そして(または)合成トロンビン基質の変換による色素形成により生成されるトロンビンの量を測定する凝固試験での請求項1～8記載のキャリブレータの使用。

【請求項14】

犬もしくは兎由来の血漿または犬もしくは兎由来の血漿からのV因子含有フラクションを添加することにより、ヒト血漿を補完する凝固検定法で使用する請求項1～8記載のキャリブレータの製法。

【請求項15】

犬もしくは兎由来の血漿が兎由来の血漿である請求項1～8記載のキャリブレータ。

【請求項16】

ヒト血漿またはある種の変異を示すヒトV因子の代替品としての犬もしくは兎由来の血漿または犬もしくは兎由来の血漿からのV因子含有フラクションの欠損凝固V因子検出のための試験法における使用。

【請求項17】

変異ヒトV因子が、ヒト活性化タンパク質Cにより、開裂されていないか、またはゆるやかにのみ開裂されている請求項16記載の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本発明は、活性化タンパク質CによるV因子の分解を検知する凝固試験でキャリブレータとして使用し得る血漿、かかる血漿の調製およびその使用に関する。

【0002】

【従来の技術および発明が解決しようとする課題】

第一に、血液中での凝固系は、血流をその供給されるべき組織に持続させることを確保するものであり；第二に、この系は創傷閉鎖を行って傷害に対して反応し、これによって生体の完全な状態を維持することを確保するものである。凝固が活性化されると、段階的にそれ自体活性化するプロテアーゼのカスケード様系によって、活性プロテアーゼトロンビンが最終的に形成される。トロンビンの形成は初めのうちは極めて低いが、タンパク質分解開裂により補因子V因子およびVII因子をトロンビンが活性化するので、この形成はトロンビン自体により促進される。それぞれ、プロテアーゼXa因子およびIXa因子と共に、これらの活性化補因子はりん脂質表面で活性酵素/補因子複合体を形成し、しかもこれらの複合体の活性は個々のプロテアーゼの活性よりも約1000の係数で高いものである。この正のフィードバック機序はほぼ爆発的に生じて大量のトロンビンを形成する。トロンビンはフィブリノーゲンをフィブリンに変換し、普通には創傷閉鎖、創傷治癒が

行われる。生命の危険がある凝固の拡大、ひいては生体の血管系の閉鎖、すなわち血栓症の誘起を防止するには、活性プロテアーゼの阻害、またプロテアーゼ供給阻止が必要である。体内では、活性プロテアーゼは共有結合複合体の形成によるプロテアーゼ阻害剤で作用中性化される。プロテアーゼ供給の阻止はトロンビン自体で開始される。このためには、トロンピンは膜タンパク質トロンボモジュリンに結合し、酵素前駆体タンパク質Cを活性プロテアーゼタンパク質Ca (APC)に変換する。APCはその一部では補因子タンパク質Sと共に複合体を形成し、この複合体は活性補因子VIIa因子およびVa因子をタンパク質分解で開裂し、それによって不活性化する。このようにしてAPCはこれらの補因子がもたらす強力な促進効果を阻止する。

【0003】

上述したタンパク質C / タンパク質Sの系は重要な抗凝血機序を表している。このことは、遺伝性または後天性タンパク質Cまたはタンパク質Sの欠乏または欠損を有する人は血栓症、殊に再発性静脈血栓症に極めて罹りやすいと言う事実によって確認された (Esmon, C.T. TCM 2: 214-219, 1992年)。
タンパク質Cおよびタンパク質Sに加えて、その他の因子も系の活性に対して影響を及ぼすことができる。これらの因子にはフォン・ヴィレブランド因子および因子IXa (Rick, M.E. 等, J. Lab. Clin. Med. 115: 415-421, 1990年)が含まれ、これらの因子は因子VIIaをタンパク質分解による分解から防護することができる。

【0004】

後天性欠損はまたルプス抗凝血剤 (Lupus anticoagulants) の形成に因ることもある。これらは、りん脂質に対向し、かつプロテアーゼ / 補因子複合体のりん脂質表面への結合 (適切な機能のために必要である) を阻害する抗体である (Amer, L. 等, Thromb. Res. 57巻, 247-258頁, 1990年)。
最後に、V因子の変異体はごく最近に報告され、このものは最早APCで不活性化され得ないか、または少なくともごく低い程度で不活性化され得るだけである (Bertina, R.M. 等, Nature 369巻, 64-67頁, 1994年)。

【0005】

タンパク質C自体を除いて、タンパク質C / タンパク質Sの系に対するこのような阻害は通常のスクリーニング法 (Amer, L. 等, 1990年) の変法、すなわち活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の変法 (この変法を以下APCT時間 (APCT) と称する) を用いて診断学上比較的容易に検出することができる。APTTを測定するためには、血漿試料を例えばシリカ、カオリンまたはガラスのような界面活性剤を含む試薬およびりん脂質の等容量と接触させる。この混合物を2、3分間 + 37 でインキュベートする。この間に、カルシウム依存ではない凝固系の因子 (XII因子、XI因子およびIX因子) が活性化される。カルシウムイオンを加えた後、凝固カスケードの残りが活性化され、トロンピンが形成される。生成するトロンピン量を、天然基質フィブリノーゲンがクロットに変換されることによるか、または色素形成基質からの発色団の遊離により、測定する。このAPTTからAPCTへの変更は、カルシウムイオンと同時に活性化タンパク質Cを添加することを伴っている。上述の如く、APCはVIIaおよびVa補因子を破壊するので、タンパク質C / タンパク質S系の機能効率に依存しているトロンピンの形成に減速が生じてくる。

【0006】

凝固診断薬において、結果を標準の百分率によって対照標準曲線から評価するのが通例である。この関係で、健康な血液供給者からの血漿のプールを100%の値とし、一方追加の較正点は通常生理食塩水でこのプールを希釈したものをを用いてプロットする。しかし、このようなアプローチはAPCTの較正には適当ではない。その理由は、血漿の希釈は凝血時間を延長させるからである (実施例1参照) ; しかしながら、タンパク質C / タンパク質Sの系の機能効率を測定する試験では、病理試料の凝血時間が延長される程度は、試

10

20

30

40

50

料の凝固活性が不十分に抑制されているために、左程に大きいものではない。

【0007】

較正を実施するためには、正常な血漿（100%値）を検討すべき因子を除いておいた血漿と混合するのが凝固診断薬で通常のことでもある。この方法はまた実施例1で実証するようにAPCTの較正には適していない。Bertina等の研究（1994年）が明らかにしているように、V因子の変異は不適切に長いAPCTの重要な原因である。V因子欠損血漿は使用し得ない。その理由はこの血漿は該因子の欠損のためにAPTTまたはAPCTで事実上凝固し得ないからである。

理論上は、罹患患者の血液からキャリブレータが得られることも考えられる。しかし、このアプローチは倫理上および技術上の理由から実行可能ではない。

10

変異凝固因子によるその他の凝固障害についても同じような考え方が適用できる。

【0008】

【課題解決のための手段】

従って、本発明の基本的な目的は、罹患患者からの血液供給とは無関係に調製することができるキャリブレータを見い出すところにある。

この目的は特許請求の範囲に記載の態様を提供することにより達成される。

意外にも、ヒト血漿にある種の動物血漿を添加すると濃度依存様式でAPCTでの凝血時間が短縮されることが見い出された（実施例2参照）。この知見は、多くの動物血漿はヒト血漿よりも著しく高い含量でV因子を有していることが知られている（Karges等, Drug Res. 44巻, 793-797頁, 1994年）ので、なお一層意外なことである。従って、変異V因子を含む血漿にヒト以外の血漿を添加すると、変異V因子は添加V因子で遮蔽されているので、短縮APCTを無効としてしまうと予想されていた。しかしながら、正確には反対の効果が認められた（実施例3参照）。得られることがわかった効果は、おそらくは試験に用いたヒト活性化タンパク質Cはヒト以外の凝固因子をタンパク質分解での開裂をなし得ないことによるものである。

20

【0009】

従来から、当業者にとって、動物血漿V因子は既知の前凝固試験法でヒトV因子の如く挙動することが知られていた。従って、動物V因子もまたAPCT試験でヒトV因子に相当する様式で挙動すると予測されていた筈である。意外にも、更に研究の結果、検討した様々の動物種の血漿は、本発明のキャリブレータでの使用適合性が異なっていることが明らかとなった。本発明の教示により、凝血時間の短縮を示すAPCT測定に使用するのに適当な血漿との適合性は簡単な実験によって定めることができる。兎および犬からの血漿またはV因子が特に適当であることがわかったが、一方例えば馬の血漿は左程適切ではない。

30

【0010】

動物V因子製剤は、動物血漿の形態、強化または精製V因子フラクションの形態または遺伝子操作で製造した純粋なV因子の形態で好適に使用される。兎および犬の血漿が特に適当である。

それで、V因子および（または）タンパク質C/タンパク質Sの系の機能効率を検討するための機能試験でV因子の欠損に擬せられているキャリブレータは、ヒト血漿に前述のヒト以外の血漿またはヒト以外の起源のV因子を含むフラクションを添加することによって調製することができる。

40

【0011】

【実施例】

次の実施例は本発明を具体的に説明するためのものである。

以下の略称を使用する。

APCT 活性化タンパク質C時間

APTT 活性化部分トロンボプラスチン時間

DBA ジエチルバルピツール酸アセテート

F.V.-Def. V因子変異を有するヒト血漿

50

SHP 標準ヒト血漿

【0012】

実施例1

健康血液供給者からの血漿プールの希釈によるキャリブレータの調製

凝固時間をSchmitzer & Gross機械コアグロメータ(Amelung
nから入手)を用いて測定した。試薬はすべてBehringwerke A.G.から
入手した。標準ヒト血漿を健康血液供給者からの血漿プールとして用いた。

APTTは次のプロトコールに従って測定した。ヒト胎盤から得られたりん脂質5mlに
ついて、Pathromtin^(R) 1バイアルを界面活性剤としてカオリンの懸濁液
5mlに溶解した。塩化カルシウム溶液(25mM)を使用前+37 に加温した。

10

【0013】

次のものを測定管に連続して注入した。

Pathromtin^(R) 100µl

血漿試料 100µl

混合物を2分間+37 でインキュベートし、塩化カルシウム溶液100µlを加えて凝
固時間が開始した。同時に、内蔵ストップウォッチのスイッチを入れ、凝固が検出される
までの経過時間を記録した。

APCTは、Behringwerkeから入手したAPC感作試薬を用いて測定した。
APTTについての活性化試薬を調製した。出発試薬は塩化カルシウムおよび活性化タン
パク質Cからなり、これを蒸留水5mlに溶解し、使用前に+37 に加温した。

20

【0014】

次のものを測定管に連続して注入した。

Pathromtin^(R) 100µl

血漿試料 100µl

混合物を3分間+37 で培養し、出発試薬100µlを加えて凝固時間が開始した。同
時に、内蔵ストップウォッチのスイッチを入れ、凝固が検出されるまでの経過時間を記録
した。

生理食塩水またはDBA緩衝液(Behringwerkeから入手)を用いて、SHP
を種々の濃度に希釈し、APTTおよびAPCTを測定した。表1から、APTTおよび
APCT共に使用した培地とは関係なく血漿の希釈を増大するにつれて増大していること
がわかる。従って、この方法は正常な血漿よりも短いAPCTを有するキャリブレータの
調製には適当ではない。

30

【0015】

【表1】

表1：生理食塩水またはDBA緩衝液で希釈した場合の正常なヒトクエン酸添加血漿のAPTTおよびAPCT。数値は秒で表している。NaCl＝生理食塩水希釈；DBA＝DBA緩衝液希釈

媒質	パラメータ	SHP濃度(%)			
		25	50	75	100
NaCl	APTT	85.0	51.5	40.6	38.3
	APCT	>300	233.9	153.8	142.9
DBA	APTT	77.9	48.3	39.0	ditto
	APCT	>300	211.9	160.6	

10

【0016】

20

実施例2

ヒト血漿にヒト以外の血漿を添加することによるキャリブレーションの調製凝固時間を実施例1に記載の如く測定した。

表2に、正常ヒトクエン酸添加血漿(SHP)を兎クエン酸添加血漿または犬クエン酸添加血漿と混合したときに得られる凝固時間(二回測定の平均値)をまとめた。混合物のAPCTはヒト以外の血漿の比率が増大するにつれて短くなるのがわかる。兎血漿の効果は、犬の血漿よりも明らかに顕著なものである。それで、タンパク質C/タンパク質Sの系の欠陥は、ヒト血漿に少量のヒト以外の血漿を加えることにより、APCTに擬することができる。従って、この方法は、適切に定められたキャリブレーションを調製するのに適切である。

30

【0017】

【表2】

表2：正常なヒトクエン酸添加血漿を犬または兎クエン酸血漿と混合したときに得られるAPCT値。数値は秒で表している。

添加物	0	ヒト血漿中の添加物の割合(%)					
		4	8	16	33	50	100
犬	145.3	100.6	76.1	49.4	34.2	27.1	21.2
兎	140.3	60.7	48	39.1	30.7	26.6	25.2

40

【0018】

実施例3

V因子遺伝子に欠陥を有するヒト血漿に対してヒトおよびヒト以外の血漿を加えることによる効果

50

凝固時間は実施例 1 に記載の如く測定した。

正常血漿（SHP：実施例 1 参照）および兔クエン酸添加血漿を、APC がかるうじて不活性化することができる V 因子を含むヒト血漿と様々の濃度で混和し、APCT に対する効果をモニターした（表 3）。予想通り、過剰の正常ヒト血漿は非分解性 V 因子の作用中性化をもたらし、それにより APCT で一層長い凝固時間が観察される。対照的に、少量の兔血漿の添加でも、APCT の更に顕著な短縮が得られ、これはまた正常ヒト血漿でも実証されたとおりである。

【0019】

【表 3】

表 3：ヒト V 因子欠損血漿を正常ヒト血漿または兔血漿と混和

したときに得られる APCT 値。数値は秒で表している。

SHP = 正常ヒト血漿

		V 因子欠損血漿中の添加物の部分(%)					
添加物	0	10	25	50	75	100	
SHP	66.3	69.8	77.5	91.1	111.2	144.0	
	0	1	2.5	5		100	
兔	66.3	59.8	55.4	45.8		44.9	

10

20

フロントページの続き

審査官 加々美 一恵

(56)参考文献 特表平05-500105(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)

G01N 33/48-33/98