

全自動血液凝固測定装置 CN-6000 における血小板凝集レベルの基礎的検討および多血小板血漿の調製に関する情報提供

坂寄 輔^{*1}, 江頭 舞^{*2}, 中島 享子^{*1}, 河野 麻衣^{*1}, 北野 圭介^{*2}, 岩崎 陽介^{*3}

*1 シスメックス株式会社 臨床戦略・学術本部 臨床戦略第二部：神戸市西区高塚台 4 丁目 4 番地の 4 (〒 651-2271)

*2 シスメックス株式会社 診断薬エンジニアリング本部

*3 シスメックス株式会社 臨床戦略・学術本部 学術部

抗血小板薬治療は古くから血栓症発症予防として有用な治療として使用されており、ADP 受容体阻害薬およびアセチルサリチル酸（以下、アスピリン）を使用する二剤併用療法が標準的な治療法である。また、近年のステント技術の発展に伴い抗血小板薬治療の管理の重要性はますます増している。抗血小板薬治療の効果判定の指標として、我々は ADP 受容体阻害薬およびアスピリンの効果確認を目的とするそれぞれ ADP induced PAL（以下、APAL）および Collagen induced PAL（以下、CPAL）という血小板凝集レベルの指標を開発し、既存の全自動血液凝固測定装置に搭載している。全自動血液凝固測定装置を用いた血小板凝集能測定は、それまで主流であった半自動測定装置による非常に煩雑な検査の効率化を実現し、血小板凝集能測定の標準化が期待される方法である。今回、これまでの全自動血液凝固測定装置が保有していた機能に、試薬溶解後の使用濃度への段階希釈の自動化機能を新たに搭載した全自動血液凝固測定装置 CN-6000（シスメックス株式会社：以下、CN-6000、シスメックス）における APAL および CPAL の同時再現性評価を行った。加えて、既存装置である全自動血液凝固測定装置 CS-5100（以下、CS-5100、シスメックス）と比較検討した。

同時再現性（ $n = 5$ ）は APAL および CPAL で、正常試料において CV（%）が 3% 以内、異常試料では 8% 以内であった。また、CS-5100 との相関性（ $n = 85$ (APAL), $n = 82$ (CPAL)）は、APAL で $r = 0.971$ 、CPAL で $r = 0.994$ と極めて良好な結果が得られた。

また、試料として用いる多血小板血漿（以下、PRP）の情報提供を目的として、国際血栓止血学会が推奨している PRP 調製方法に準拠した際の PRP の吸光度（以下、mOD）の評価を実施した。PRP の波長 660 nm における mOD の正常基準範囲を算出したところ、PRP の評価開始時点の mOD から乏血小板血漿（PPP）の mOD を差し引いた値は 400.7 ~ 786.9 であった。

今回の我々の結果から、CN-6000 における血小板凝集レベルである APAL および CPAL は良好な再現性および既存装置である CS-5100 との良好な相関が示された。CN-6000 は試薬溶解後の使用濃度への段階希釈の自動化による手技間差の軽減が期待できることから、今後の血小板凝集能検査の標準化へさらなる一助になると考えられる。

キーワード

血小板凝集, 透過光法, CN-6000, レボヘム, 自動化, 抗血小板薬, PAL (Platelet Aggregation Level)

はじめに

透過光法 (Light Transmission Aggregometry : 以下, LTA) を測定原理とした *in vitro* の血小板凝集能検査は 1962 年に Born によって開発されて以来¹⁾, ゴールドスタンダードとして血小板無力症や von Willebrand 病などの先天性血小板機能異常症の診断に用いられてきた²⁾. また, 近年は抗血栓療法疾患マネジメントとして, COX-1 の阻害薬であるアセチルサリチル酸 (以下, アスピリン) や P2Y12 受容体の阻害薬であるクロピドグレルやプラスグレルに代表される抗血小板薬の効果を確認する目的として用いられている. 抗血小板薬の薬理学的作用は個人差があることが知られている. 例えば, クロピドグレルでは CYP2C19 遺伝子多型によりアジア人では約 20% で効果が現れない不応症が報告されている^{3~5)}. アスピリンでは抗血小板作用が減弱する患者を Aspirin resistance と呼び, その原因としては COX-1 や血小板の機能に影響する SNPs, 炎症やメタボリックシンドロームが報告されている^{6~8)}. また, 日本人においては, 薬効が減弱した患者が 27% 存在したとの報告もある⁹⁾. そのため抗血小板薬の不応症評価や中止・継続の指標として血小板凝集能検査を確認することは臨床的にも重要と考えられる.

LTA による測定は, 遠心条件を変えることで得られる 2 種の試料である多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma: 以下, PRP) と乏血小板血漿 (Platelet Poor Plasma: 以下, PPP) が必要である. さらに熟練技師による試薬および試料の調製や分注が必要な半自動測定装置が主流であるため, 多くの時間を要する非常に煩雑な検査である. 近年, シスメックス株式会社 (以下, シスメックス) が開発した PT, APTT, Fbg, AT, D ダイマーなどのルーチン検査で使用されている全自動血液凝固測定装置 CS-5100, CS-2400, CS-2500, CS-2000i, CS-2100i (シスメックス) では, 血小板凝集能測定が可能となり¹⁰⁾, 既存の半自動測定装置との比較検討が数多く実施され, 一定の相関があること, 半自動測定装置に比べて全自動血液凝固測定装置で同時再現性の精度が向上していることが報告されている^{11~15)}.

LTA による測定結果の解釈は非常に複雑で, 一定の技量が求められる. 特に抗血小板薬の効果確認の

場面においては, 凝集波形の変化が血小板の先天性機能異常ほど明確ではないことから, 非常に判断が難しい. それを解決するために, 2 濃度法という概念が提唱されており¹⁶⁾, 日本では既に一部の装置にこれらの概念を取り入れてスコアリング指標が研究用指標として備わっており, 多くの施設で使われている¹⁷⁾. そこで, 我々もシスメックスの全自動血液凝固測定装置を用いて抗血小板薬の効果確認への応用を目指した新たなスコアリングシステムである Platelet Aggregation Level (以下, PAL) を開発した¹⁸⁾. PAL は血小板惹起物質として ADP を使用した場合は ADP induced PAL (以下, APAL), コラーゲンを使用した場合は Collagen induced PAL (以下, CPAL) として指標を算出する装置付帯機能である. APAL, CPAL はともに 2 濃度の凝集波形の面積値である Area Under the Curve (以下, AUC) をベースに, 独自の指標を入れることで算出される指標である (図 1, 2). APAL および CPAL と既に日本で使用されていた 2 濃度法との比較検討も行われており, それぞれ良好な結果を示していた^{18~20)}.

近年, 新たに全自動血液凝固測定装置 CN-6000 (シスメックス: 以下, CN-6000) が発売された^{21, 22)}. CN-6000 の血小板凝集能測定には新たな機能が付加され, 測定前の試薬調製において既存の全自動血液凝固測定装置では人による作業であった試薬溶解後の使用濃度への段階希釈が自動化された. その機能により, 血小板凝集能検査のワークフローが改善され, 作製テスト数と使用濃度を入力し試薬原液と希釈液を装置内にセットすれば, 自動で段階希釈後の試薬が調製される²³⁾ (表 1). CN-6000 と CS-5100 との血小板凝集能測定としての比較検討は既に報告されており, 国際血栓止血学会が提唱している先天性機能異常症鑑別スクリーニングのための試薬濃度²⁴⁾ を用いた場合, 極めて良好な結果を示した²³⁾. また, CN-6000 においても既存の全自動血液凝固測定装置と同様, APAL および CPAL の機能が備わっている (図 3).

今回我々は, CN-6000 の APAL および CPAL において, 同時再現性, CS-5100 との相関性試験を検討した. また血小板凝集に用いる試料の情報提供を目的として, PPP および PRP の吸光度 (以下, mOD) について調査したため, その結果について報告する.

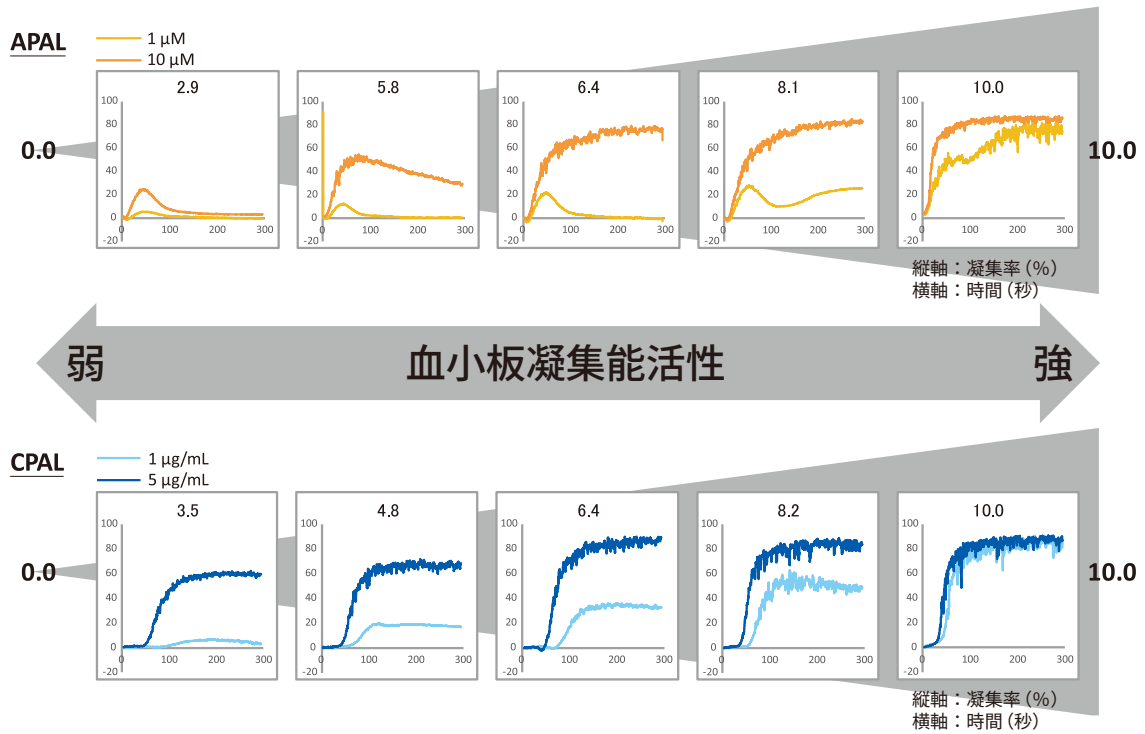


図 1. PAL のスコアリングと凝集波型の例

APAL, CPAL はそれぞれ ADP, コラーゲン 2 濃度による凝集波型結果から算出され, 血小板凝集能活性に従い数字が変化する.

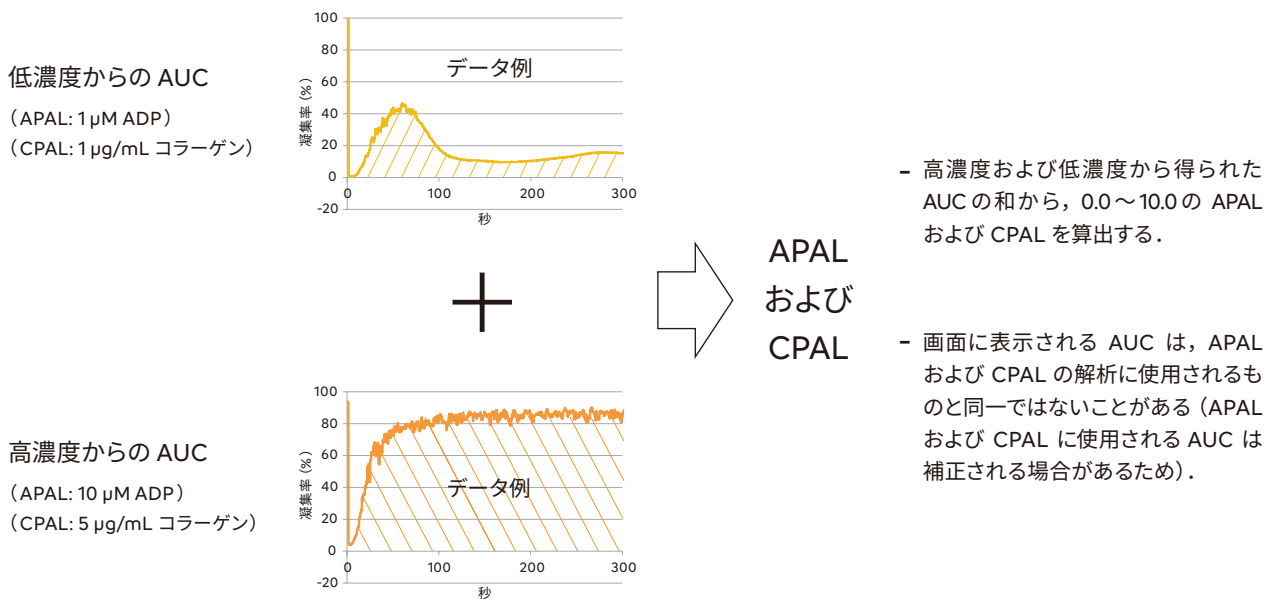


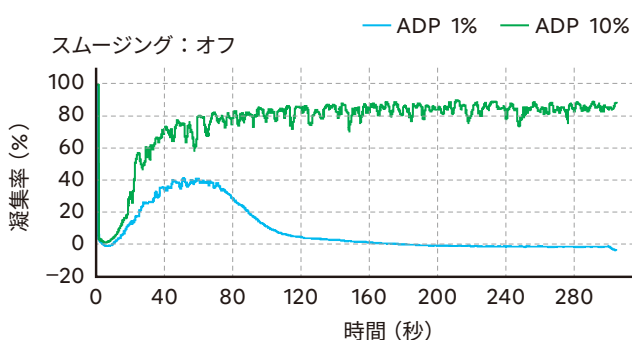
図 2. APAL および CPAL の解析方法の概要

表 1. 血小板凝集能検査のワークフローの比較

測定フロー	半自動	CS-5100	CN-6000
検体採取	マニュアル	マニュアル	マニュアル
PPP と PRP の準備	マニュアル	マニュアル	マニュアル
試薬の段階希釈の調製	マニュアル	マニュアル	自動
キュベットへのスターラーセット	マニュアル	不要	不要
キュベットへの PPP, PRP 分注	マニュアル	自動	自動
キュベットへの惹起剤添加	マニュアル	自動	自動
測光	自動	自動	自動
結果出力	自動	自動	自動

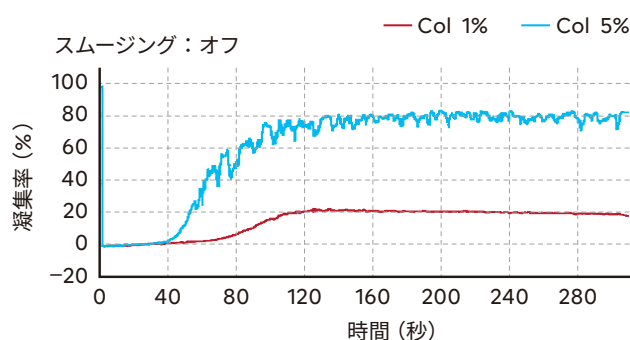
半自動からの変更について赤字で示した。

A. APAL



<2 濃度による判定>
APAL : 8.3

B. CPAL



<2 濃度による判定>
CPAL : 5.7

図 3. 装置から抽出した APAL および CPAL 結果の例

実験材料および方法

1. 対象

本研究はシスメックス株式会社の倫理委員会（承認番号：2019-09 および 2015-78）の承認を得て行われた。社内ボランティアの健常人から 3.2%クエン酸ナトリウム加採血管である Venoject II® Rtubes（テルモ株式会社）を用いて採血し、国際血栓止血学会が報告している推奨事項の条件に準拠した評価を行うため²⁴⁾、2 本分の血液を 10 mL の血液遠心用として滅菌丸底スピッツ（栄研化学株式会社）に分取し、高速冷却遠心機 Model 7000（久保田商事株式会社）を用いて、200 × g で 10 分間遠心した後の上清の一部を回収して PRP とした。残りの血液を 1,500 × g で 15 分間遠心した後に上清を回収したものを PPP とした。

回収後に何も添加していない状態の PRP を正常試料とした。正常試料に対して終濃度 0.1 ~ 1.0 mM にな

るようにアスピリン（富士フィルム和光純薬株式会社）を添加したサンプル、または終濃度 0.01 ~ 0.2 μM になるようにカングレロール（AdooQ BioScience）を添加したサンプルを異常試料とした。相関性試験の試料についても上記の方法で測定範囲に跨るよう

2. 測定装置および試薬

測定装置として、同時再現性および相関性試験は CN-6000、相関性試験の対照装置として CS-5100 を用いた。

測定試薬はレボヘム ADP、レボヘム コラーゲン（シスメックス）を用いた。試薬の終濃度は APAL および CPAL が自動算出される濃度¹⁸⁾である ADP は 1 μM と 10 μM、コラーゲンは 1 μg/mL と 5 μg/mL になるよう CN-6000 装置内で自動調製した。

1) 同時再現性

同時再現性は、正常および異常試料を用いて、5回連続測定して得られた最大凝集率（%）とAPALおよびCPALの変動係数（CV%）を求めた。

2) 相関性

CN-6000 および CS-5100 を用いて ADP およびコラーゲンでそれぞれ 85 例および 82 例に対してそれぞれ 1 回ずつ測定し、最大凝集率（%）と APAL および CPAL の回帰式と相関係数を求めた。

3) PPP および PRP の 95%信頼区間

正常試料 130 例を CN-6000 で測定した結果から、PPP、PRP の測光初期の mOD および PPP と PRP の測光初期の mOD の差について、解析ソフトウェアである Analyse-it (Analyse-it Software, Ltd.) を用いて 95%信頼区間を求めた。

4) PRP の mOD と血小板数の比較検討

正常試料 70 例の PRP の mOD と血小板数を測定した。mOD および血小板数をそれぞれ 1 回ずつ測

定し、回帰式と相関係数を求めた。mOD は CS-5100 のデータを使用した。血小板数は多項目自動血球分析装置 XS シリーズ (XS-1000i, シスメックス) で算出した。

結果

1) 同時再現性

同時再現性の CV（%）は、ADP 凝集の 1 μM 最大凝集率として正常試料で 2.1%、異常試料で 5.6%、10 μM 最大凝集率として正常試料で 1.8%、異常試料で 4.8%、APAL として正常試料で 0.0%、異常試料で 4.3%であった。コラーゲン凝集の 1 μg/mL 最大凝集率として正常試料で 1.4%、異常試料で 7.3%、5 μg/mL 最大凝集率として正常試料で 1.9%、異常試料で 1.6%、CPAL として正常試料で 0.0%、異常試料で 4.3%であり（表 2）、既存の全自動血液凝固測定装置と同等の結果であった²⁸⁾。

表 2. 同時再現性の結果

A. ADP

	正常試料			カングレロール スパイクサンプル		
	1 μM 最大凝集率 (%)	10 μM 最大凝集率 (%)	APAL	1 μM 最大凝集率 (%)	10 μM 最大凝集率 (%)	APAL
run 1	92.2	90.8	10.0	20.2	63.6	5.3
run 2	90.9	93.6	10.0	19.1	70.0	5.7
run 3	93.6	91.1	10.0	17.9	66.4	5.2
run 4	89.0	91.0	10.0	19.6	72.0	5.3
run 5	89.6	94.2	10.0	17.8	68.2	5.1
Mean	91.1	92.1	10.0	18.9	68.0	5.3
SD	1.9	1.6	0.0	1.1	3.2	0.2
CV%	2.1	1.8	0.0	5.6	4.8	4.3

B. コラーゲン

	正常試料			アスピリン スパイクサンプル		
	1 μg/mL 最大凝集率 (%)	5 μg/mL 最大凝集率 (%)	CPAL	1 μg/mL 最大凝集率 (%)	5 μg/mL 最大凝集率 (%)	CPAL
run 1	90.9	93.7	10.0	30.7	75.3	5.4
run 2	90.2	91.3	10.0	26.5	72.4	4.8
run 3	91.4	88.9	10.0	28.5	75.4	5.1
run 4	92.3	91.2	10.0	25.6	74.5	5.0
run 5	93.5	91.1	10.0	26.8	74.4	5.1
Mean	91.7	91.2	10.0	27.6	74.4	5.1
SD	1.3	1.7	0.0	2.0	1.2	0.2
CV%	1.4	1.9	0.0	7.3	1.6	4.3

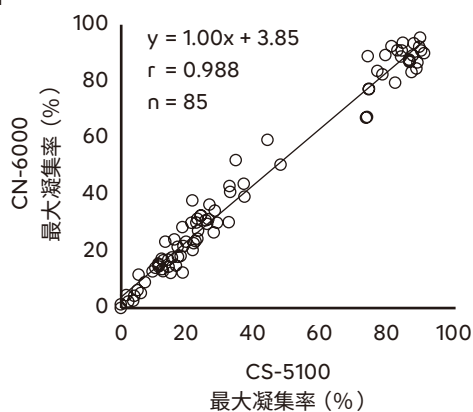
2) 相関性

CN-6000 と CS-5100 の相関性は、ADP 凝集の 1 μM 最大凝集率として $y = 1.00x + 3.85$, $r = 0.988$, ADP 凝集の 10 μM 最大凝集率として $y = 0.89x + 11.44$, $r = 0.955$, APAL として $y = 0.91x + 0.94$, $r = 0.971$ であった。コラーゲン凝集の 1 μg/mL 最大

凝集率として $y = 1.02x - 0.83$, $r = 0.996$, 5 μg/mL 最大凝集率として $y = 0.99x + 0.66$, $r = 0.972$, CPAL として $y = 1.00x - 0.08$, $r = 0.994$ であり、極めて良好な相関関係であった (図 4)。

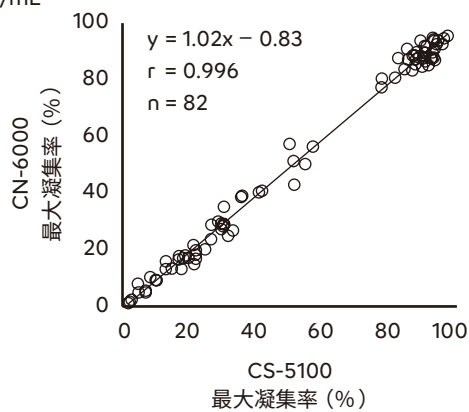
A. ADP

a. 1 μM

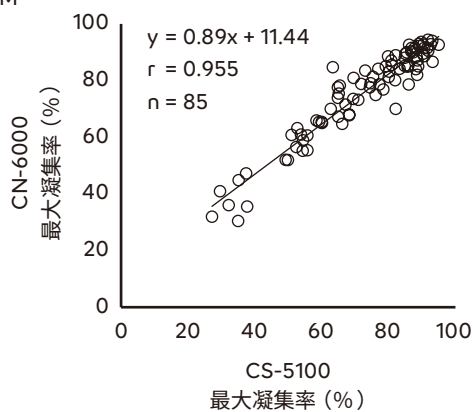


B. コラーゲン

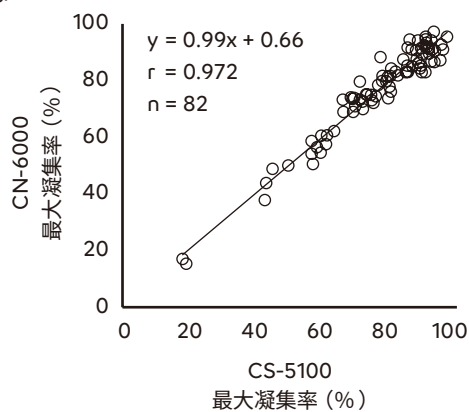
a. 1 μg/mL



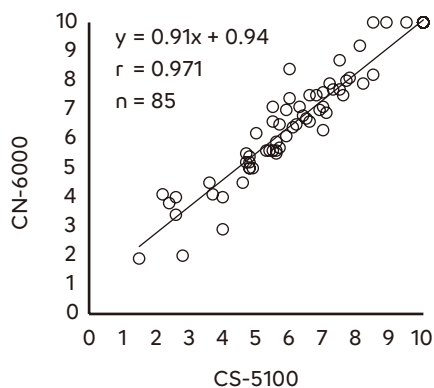
b. 10 μM



b. 5 μg/mL



c. APAL



c. CPAL

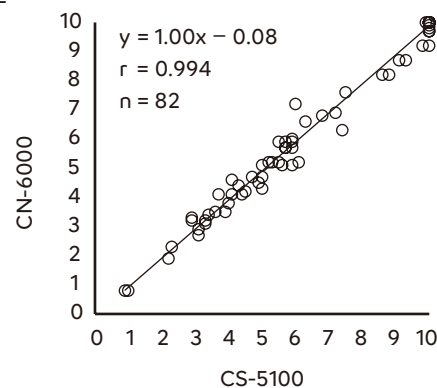


図 4. CN-6000 と CS-5100 の相関関係

3) PPP および PRP の正常基準範囲

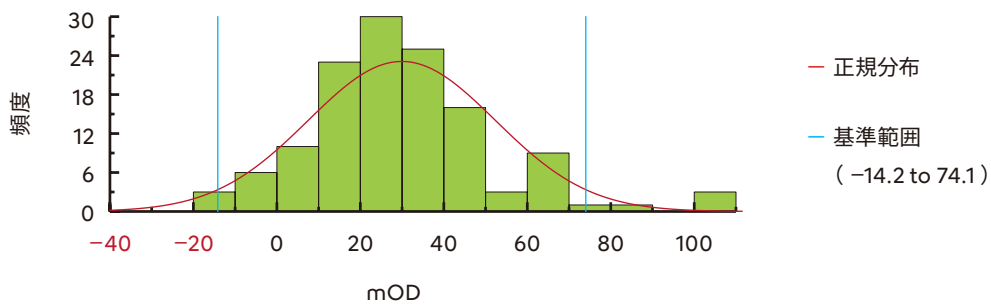
PPP, PRP の初期の mOD および PRP の初期の mOD から PPP の mOD を差し引いた値の 95% 信頼区間はそれぞれ -14.2 ~ 74.1, 419.0 ~ 828.4, 400.7 ~ 786.9 であった (図 5)。これにより, 国際血栓止血学会が推奨しているサンプル調製の条

件に準拠して調製したサンプルでの正常基準範囲における信頼区間を得ることができた。

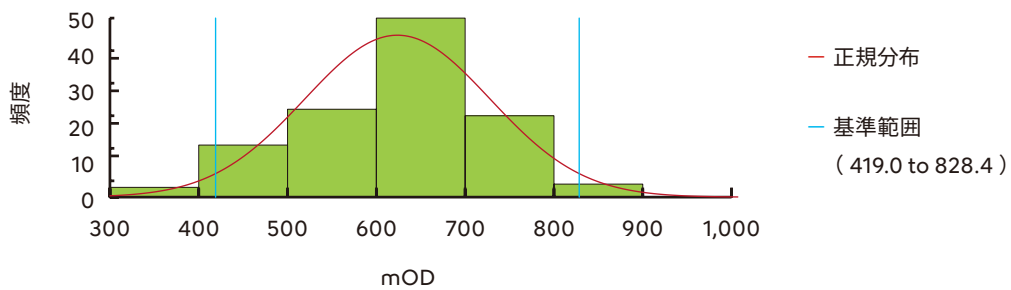
4) PRP の mOD と血小板数の比較検討

PRP の mOD と血小板数 ($\times 10^4/\mu\text{L}$) の相関は $y = 5.71x + 336.92$, $r = 0.570$ であり, 一定の相関関係があることが確認できた (図 6)。

A. PPP



B. PRP



C. PRP-PPP

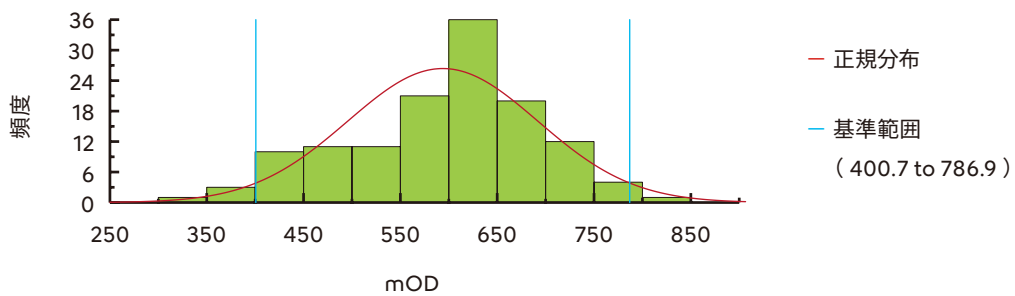


図 5. PPP と PRP からの mOD の基準範囲

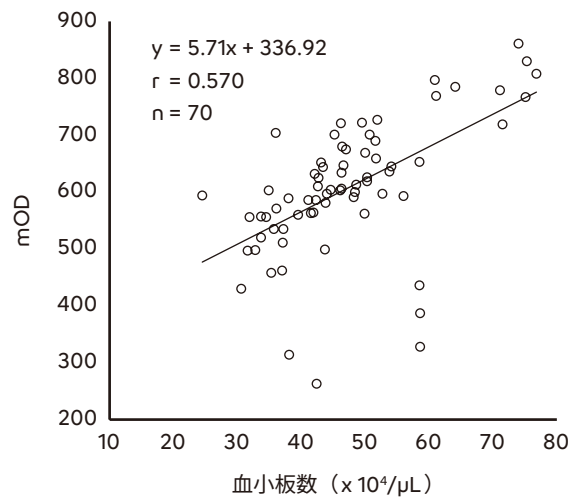


図 6. PRP からの mOD と血小板数の比較

考 察

術前の抗血小板効果が周術期の虚血性・出血性合併症と関係することが報告されている²⁵⁾。東アジア人ではそれ以外の地域の人種と比べて出血リスクが高いことが報告されていることから²⁾、抗血小板薬の効果を確認することは非常に重要である。また、1回の検査での判断は過大・過小評価をしてしまうこと²⁶⁾、複数回の血小板凝集能検査が出血イベント低減に有効であることも報告されていることから²⁷⁾、効率的かつ標準化された手法で血小板凝集能を測定することは非常に重要である。PTやAPTTなどのルーチン検査で使用される全自動血液凝固測定装置において血小板凝集能検査が可能となって以降、専用装置が不要であることに伴うコスト面の利点に加え、測定者間差がないということに伴う再現性の向上が報告されており、今後の検査の標準化が望まれる¹¹⁾。

今回我々は、抗血小板薬の効果確認を補助する目的の指標として開発された、APALおよびCPALのCN-6000における同時再現性と既存装置であるCS-5100との相関性の評価を実施した。APALはADPの高濃度1濃度を用いた測定では鑑別できない抗血小板活性の低下患者を検出できる等の分解能の向上が報告されている²⁸⁾。また、全血を試料とする血小板凝集能測定装置とAPALでは一定の相関が認

められ、既に報告されている全血を試料とする血小板凝集能測定装置の周術期虚血性合併症の閾値に対して一致率は90.9%であり、ランニングコストも25分の1と非常に安価に同等に評価できることが報告されている²⁹⁾。

同時再現性においてはAPALおよびCPALで正常試料のCV(%)が3%以下、異常試料のCV(%)が8%以下であり(表2)、今回のCN-6000の結果はこれまで報告されているCS-5100のAPALの結果²⁸⁾や国際血栓止血学会が提唱している先天性の血小板機能異常の濃度での結果^{10, 11, 23)}と同程度であった。本検討では実施できていないが、臨床現場では抗血小板薬と抗凝固薬が併用されるケースが多くある。リバーロキサバンおよびアピキサバンがADP凝集およびコラーゲン凝集に対して影響がないということは既に報告されており³⁰⁾、APALおよびCPALも同様に影響がないことが考えられる。

CS-5100との相関性の結果は極めて良好であった。また本検討の結果より、共通の正常基準範囲を使用できると考えられる^{18, 28)}。なお、正常基準範囲における人種差が推察されていることから^{28, 31)}、人種ごとに正常基準範囲を取得することが望ましいと考えられる。

血小板凝集能検査において、検体に関する様々な

品質を一定に保つことは信頼性の高い結果を得るために非常に重要である。その中で、今回我々は、国際血栓止血学会が提唱している検体の取扱・遠心条件に関する推奨事項にしたがって調製した際の PPP, PRP および PPP と PRP の mOD の差を評価した (図 5) (遠心条件における詳細情報は、参考文献 32 を参照)。本検討は、図 6 で示したように、mOD と血小板数の間で一定の相関関係があることが推察されたため実施した。一部、mOD と血小板数の間で回帰直線に対して mOD が低値に乖離している検体が見受けられた (図 6)。これは、検体中の血小板以外の濁度を持っている物質 (乳びなど) が影響したと考えられる。結果として、PPP と PRP の mOD の差は 400 から 787 であった (図 5)。PRP の調製は本来、PRP に対しての遠心重力を管理しないといけない。つまり、異なる採血管容量や遠心機を用いた場合に、採血管における PRP の位置と遠心機の中心までの距離が異なると PRP に対する重力が異なることを意味しており、設定を適切に実施する必要がある。今回示した mOD の結果が、異なる容量の採血管や遠心機を変更した際などの遠心条件設定の一助になればと思う。

結 論

CN-6000 の抗血小板薬の効果確認目的の装置付帯指標である APAL および CPAL は良好な同時再現性を有しており、既存装置 CS-5100 との相関も良好であった。抗血小板薬治療における血小板凝集能検査の標準化へのさらなる寄与が期待される。

全自動血液凝固測定装置 CN-6000：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000001

全自動血液凝固測定装置 CS-5100：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000021

全自動血液凝固測定装置 CS-2500：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000025

全自動血液凝固測定装置 CS-2400：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000024

全自動血液凝固測定装置 CS-2100i：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000019

全自動血液凝固測定装置 CS-2000i：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000020

多項目自動血球分析装置 XS シリーズ (XS-1000i)：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000027

血小板凝集能キット レボヘム ADP：体外診断用医薬品製造販売認証番号 227ABAMX00056000

血小板凝集能キット レボヘム コラーゲン：体外診断用医薬品製造販売認証番号 227ABAMX00057000

参考文献

- 1) Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature*. 1962; **194**: 927-929.
- 2) Kang J, Park KW, Palmerini T, et al. Racial Differences in Ischaemia/Bleeding Risk Trade-Off during Anti-Platelet Therapy: Individual Patient Level Landmark Meta-Analysis from Seven RCTs. *Thromb Haemost*. 2019; **119** (1): 149-162.
- 3) Cattaneo M. New P2Y (12) inhibitors. *Circulation*. 2010; **121** (1): 171-179.
- 4) Bonello L, Tantry US, Marcucci R, et al. Consensus and future directions on the definition of high on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate. *J Am Coll Cardiol*. 2010; **56** (12): 919-933.
- 5) Tantry US, Bonello L, Aradi D, et al. Consensus and update on the definition of on-treatment platelet reactivity to adenosine diphosphate associated with ischemia and bleeding. *J Am Coll Cardiol*. 2013; **62** (24): 2261-2273.
- 6) Colantonio LD, Gamboa CM, Kleindorfer DO, et al. Stroke symptoms and risk for incident coronary heart disease in the REasons for Geographic And Racial Differences in Stroke (REGARDS) study. *Int J Cardiol*. 2016; **220**: 122-128.
- 7) Cattaneo M. Resistance to antiplatelet drugs: molecular mechanisms and laboratory detection. *J Thromb Haemost*. 2007; **5**, Suppl 1: 230-237.
- 8) Cattaneo M. Aspirin and clopidogrel: efficacy, safety, and the issue of drug resistance. *Arterioscler*

- Thromb Vasc Biol. 2004; **24** (11): 1980–1987.
- 9) Ikeda T, Taniguchi R, Watanabe S, et al. Characterization of the antiplatelet effect of aspirin at enrollment and after 2-year follow-up in a real clinical setting in Japan. *Circ J*. 2010; **74** (6): 1227–1235.
 - 10) Sakayori T, Watanabe Y, Nakajima K, et al. Introduction and Evaluation of Light Transmission - Platelet Aggregation Method on the Sysmex CS-series Automated Coagulation Analyzer. *Sysmex J Int*. 2016; **26** (1): 1–10.
 - 11) Ling LQ, Liao J, Niu Q, et al. Evaluation of an automated light transmission aggregometry. *Platelets*. 2017; **28** (7): 712–719.
 - 12) Frère C, Kobayashi K, Dunois C, et al. Assessment of platelet function on the routine coagulation analyzer Sysmex CS-2000i. *Platelets*. 2018; **29** (1): 95–97.
 - 13) Stratmann J, Karmal L, Zwinge B, et al. Platelet Aggregation Testing on a Routine Coagulation Analyzer: A Method Comparison Study. *Clin Appl Thromb Hemost*. 2019; **25**: 1076029619885184.
 - 14) Bret VE, Pougault B, Guy A, et al. Assessment of light transmission aggregometry on the routine coagulation analyzer Sysmex CS-2500 using CE-marked agonists from Hyphen Biomed. *Platelets*. 2019; **30** (4): 540–542.
 - 15) Le Blanc J, Mullier F, Vayne C, et al. Advances in Platelet Function Testing-Light Transmission Aggregometry and Beyond. *J Clin Med*. 2020; **9** (8): 2636.
 - 16) Matsuo T, Ohki Y. Classification of platelet aggregation patterns with two ADP solutions (the double-ADP method) and its clinical application to diabetes mellitus. *Thromb Res*. 1977; **11** (4): 453–461.
 - 17) Satoh K, Shimizu M, Ohara S, et al. Questionnaire survey on platelet aggregation tests in Japan. *Journal of the Japanese Society for Laboratory Hematology*. 2008; **9** (2): 167–177.
 - 18) Sakayori T, Watanabe Y, Kitano K, et al. Evaluating the Utility of a Novel Research Use Index in Platelet Aggregation Analysis Featured in an Automated Blood Coagulation Analyzer to Confirm the Effect of Antiplatelet Drugs. *Sysmex J Int*. 2019; **29** (1): 39–47.
 - 19) Omori Y, Ishida H, Sakayori T, et al. Evaluation of Fully Automated Blood Coagulation Analyzer Equipped with a Novel Analysis Method — Antiplatelet Responsive Index —. *Rinsho Byori*. 2019; **67** (3): 205–211.
 - 20) Sadakata T, Sakayori T, Watanabe Y, et al. Basic Evaluation of PAL Which is an Research Use Index for Confirming the Effect of Antiplatelet Drugs Installed in the CS Series and Comparison Study with the Index Installed in Existing Instrument. *Sysmex J*. 2018; **19** (2): 1–10.
 - 21) Gardiner C, Lane P, Langley K, et al. A comparative evaluation of the CN-6000 haemostasis analyser using coagulation, amidolytic, immuno-turbidometric and light transmission aggregometry assays. *Int J Lab Hematol*. 2020; **42** (5): 643–649.
 - 22) Nguyen G, Lejeune M, Gaaloul M, et al. Performance evaluation of the fully automated random-access multiparameter Sysmex CN-6000 hemostasis analyzer at a core laboratory with a high sample throughput. *Int J Lab Hematol*. 2022; **44** (2): 385–392.
 - 23) Egashira M, Kono M, Nakajima K, et al. The Basic Evaluation of Light Transmission Platelet Aggregation Method on an Automated Coagulation Analyzer CN-6000. *Sysmex J Int*. 2020; **30** (2): 16–24.
 - 24) Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, et al. Recommendations for the Standardization of Light Transmission Aggregometry: A Consensus of the Working Party from the Platelet Physiology Subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost*. 2013; **11** (6): 1183–1189.
 - 25) Delgado Almandoz JE, Crandall BM, Scholz JM, et al. Pre-procedure P2Y12 reaction units value predicts perioperative thromboembolic and hemorrhagic complications in patients with cerebral aneurysms treated with the Pipeline Embolization Device. *J Neurointerv Surg*. 2013; **5**, Suppl 3: iii3–10.
 - 26) Griessenauer CJ, Jain A, Enriquez-Marulanda A, et al. Pharmacy-Mediated Antiplatelet Management Protocol Compared to One-time Platelet Function

- Testing Prior to Pipeline Embolization of Cerebral Aneurysms: A Propensity Score-Matched Cohort Study. *Neurosurgery*. 2019; **84** (3): 673–679.
- 27) Sibbing D, Aradi D, Jacobshagen C, et al. Guided de-escalation of antiplatelet treatment in patients with acute coronary syndrome undergoing percutaneous coronary intervention (TROPICAL-ACS): a randomised, open-label, multicentre trial. *Lancet*. 2017; **390** (10104): 1747–1757.
- 28) Sakayori T, Kitano K, Watanabe Y, et al. Evaluation of the Newly Developed Adenosine Diphosphate-Induced Platelet Aggregation Level System in Aggregometer on Automated Coagulation Analyzer. *Clin Lab*. 2019; **65** (12) .
- 29) Uematsu K, Sakayori T, Ishida H, et al. Correlation Between the VerifyNow P2Y₁₂ Assay and the Newly Developed APAL System in Neuroendovascular Patients. *Ann Clin Lab Sci*. 2020; **50** (4): 490–496.
- 30) Bánovčín P, Jr., Škorňová I, Samoš M, et al. Platelet Aggregation in Direct Oral Factor Xa Inhibitors-treated Patients With Atrial Fibrillation: A Pilot Study. *J Cardiovasc Pharmacol*. 2017; **70** (4): 263–266.
- 31) Platton S, McCormick Á, Bukht M, et al. A multicenter study to evaluate automated platelet aggregometry on Sysmex CS-series coagulation analyzers-preliminary findings. *Res Pract Thromb Haemost*. 2018; **2** (4): 778–789.
- 32) 佐藤金夫. 出血性疾患診断時の血小板凝集能検査に関する測定手順書 ～全自動血液凝固測定装置 CS シリーズ・CN シリーズ透過光測定法を使用した血小板凝集能検査～. シスメックス株式会社. 2020.

Analytical Evaluation of Platelet Aggregation Level on a Fully Automated Coagulation Analyzer CN-6000, and a Case Study of an Initial Absorbance of Platelet-rich Plasma

Tasuku SAKAYORI^{*1}, Mai EGASHIRA^{*2}, Kyoko NAKAJIMA^{*1}, Mai KONO^{*1},
Keisuke KITANO^{*2} and Yosuke IWASAKI^{*3}

^{*1} Medical Affairs 2, Medical & Scientific Affairs, Sysmex Corporation, 4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe 651-2271, Japan

^{*2} Reagent Engineering, Sysmex Corporation

^{*3} Scientific Affairs, Medical & Scientific Affairs, Sysmex Corporation

Antiplatelet therapy has long been used as a practical treatment to prevent the development of thrombosis disease, and the dual antiplatelet therapy using ADP receptor system inhibitors and acetylsalicylic acid (aspirin) has become standard therapy. With the development of stents in recent years, the management of antiplatelet therapy has become increasingly important.

As parameters that assist in determining the effect of antiplatelet drug therapy, we have developed APAL and CPAL for the purpose of confirming the effect of ADP receptor inhibitors and aspirin respectively, both of which are installed in a fully automated coagulation analyzer.

Measurement of platelet aggregation using a fully automated coagulation analyzer is expected to standardize the measurement procedures, improving the test which has been very complicated when using semi-automated analyzers of the mainstream heretofore, to more efficient one.

In this study, we evaluated the within-run precision of APAL and CPAL on the fully automated blood coagulation analyzer CN-6000 (Sysmex Corporation), which is equipped, in addition to the other existing ones, with new function that automatically dilutes reagents in stepwise way to the used concentration after dissolution. Then we also compared it with the existing instrument, CS-5100 (Sysmex Corporation).

For within-run precision evaluation, the coefficient of variation (CV) of APAL and CPAL was tested with normal and abnormal samples, and the result was less than 3% and 8%, respectively. Also, excellent correlation results were observed against CS-5100, $r = 0.971$ for APAL ($n = 85$) and $r = 0.994$ for CPAL ($n = 82$) respectively.

In addition, for the purpose of providing information on the platelet-rich plasma (hereafter referred to as PRP) used as a sample, the absorbance of PRP was evaluated following the PRP preparation method recommended by the International Society of Thrombosis and Haemostasis. The normal reference range of absorbance at a wavelength of 660 nm ("mOD") of PRP was calculated, and the value ranged 400.7–786.9 for the mOD at the starting point of PRP evaluation minus the mOD of platelet-poor plasma (PPP).

Our study showed that APAL and CPAL, the platelet aggregation levels in CN-6000, are well reproducible and well correlated with the existing instrument, CS-5100. Since CN-6000 is expected to reduce inter-procedural differences by automating stepwise dilution to the used concentration after reagent dissolution, it will be a further aid to standardize the platelet aggregation test in the future.

Key Words

Platelet Aggregation, Light Transmission Aggregometry, CN-6000, Revohem, Automation, Anti-platelet Drug, Platelet Aggregation Level (PAL)