

# トロンボチェック TTO リコンビナント試薬の概要

シスメックス株式会社 学術部 岸本 哲也  
向出 佳恵  
新井 信夫  
杉山 透

## はじめに

トロンボテスト (TTO) は、肝臓で合成される複合凝固因子 (第Ⅱ, 第Ⅶ, 第Ⅹ因子) および PIVKA (Protein Induced by Vitamin K Absence or Antagonist) を含めた総合的な凝固活性を測定する検査項目であり、ワルファリンなどの経口抗凝固薬のモニタリングを目的として測定される<sup>1)</sup>。同様の目的で測定される項目としてプロトロンビン時間 (PT) があり、臨床検査の場において広く用いられているが、TTO も依然として測定されるケースが多く、PT と並んで重要な項目として認知されている。

## 開発の背景

TTO 試薬の組成は通常、ウシ大脳由来組織因子 (TF), バリウム吸着牛血漿および Ca からなる<sup>2)</sup>。当社では 1990 年にウシ大脳由来組織因子を主成分とした複合因子・T<sup>「コグサイ」</sup>を発売し、広く血液凝固検査分野において使用されてきた。

近年になり、米国・欧州や日本においても狂牛病 (BSE) が発生し、試薬原料となるウシ由来材料の入手が困難となる事態がしばしば発生しており、試薬

原料の安定供給、および安定した性能の原材料を確保する必要性から、遺伝子組換えウシ組織因子 (以下、rbTF) による試薬の開発が待たれていた。

今回、当社ではカイコ蛹を宿主としてバキュロウイルス系で発現させたリコンビナントウシ TF を用いた TTO 試薬、トロンボチェック TTO リコンビナント試薬 (以下、TTO リコンビナント試薬) を開発し、発売を開始した<sup>3,4)</sup> (図 1)。

## 試薬の概要および特長

TTO リコンビナント試薬は、ウシ組織因子のタンパク質をコードする cDNA を特殊なバキュロウイルスへ組み込み、カイコ蛹に感染させることにより産生させた rbTF を試薬原料として用いた凍結乾燥試薬である。rbTF の発現に関する詳細は別報を参照されたい<sup>5)</sup>。

本試薬は以下の特長を有する。

- ①原料組織因子に起因するロット間差を低減している。
- ②従来品 (天然のウシ組織因子) と良好な相関性と同等レベル以上の凝固因子感受性を有する。



図 1. トロンボチェック TTO リコンビナント試薬

## 試薬の基本性能

TTO リコンビナント試薬の基本的性能について全自動血液凝固分析装置 CS-2000*i* (シスメックス社; 以下, CS-2100*i*) および CA-1500 (シスメックス社; 以下, CA-1500) を用いて検討した。なお, 対照試薬として複合因子・T (ブルー) (シスメックス社) を用いた。

## 1. TTO リコンビナント試薬の同時再現性および日差再現性

正常域血漿と異常域血漿による同時再現性 (n = 20), 日差再現性 (7 日間) の結果は秒数, 活性%において CV2% 以下の良好な結果が得られた (表 1 および図 2)。

表 1. 同時再現性

CS-2000 <i>i</i>					CA-1500				
	コアグトロール IX		コアグトロール IX			コアグトロール IX		コアグトロール IX	
	(sec)	(%)	(sec)	(%)		(sec)	(%)	(sec)	(%)
1	31.8	121.3	42.9	44.1	1	31.5	114.4	42.8	43.4
2	31.5	125.7	42.6	44.9	2	31.5	114.4	42.4	44.4
3	31.4	127.3	42.4	45.5	3	31.4	115.7	42.5	44.2
4	31.4	127.3	42.7	44.6	4	31.4	115.7	42.3	44.7
5	31.5	125.7	42.7	44.6	5	31.5	114.4	42.6	43.9
6	31.4	127.3	42.6	44.9	6	31.3	117.0	42.6	43.9
7	31.4	127.3	42.7	44.6	7	31.2	118.3	43.0	42.9
8	31.4	127.3	42.6	44.9	8	31.6	113.1	42.6	43.9
9	31.4	127.3	42.5	45.2	9	31.4	115.7	42.6	43.9
10	31.4	127.3	42.6	44.9	10	31.6	113.1	42.4	44.4
11	31.7	122.7	42.9	44.1	11	31.4	115.7	42.5	44.2
12	31.5	125.7	42.5	45.2	12	31.3	117.0	42.5	44.2
13	31.4	127.3	42.6	44.9	13	31.1	119.7	42.7	43.6
14	31.4	127.3	42.5	45.2	14	31.3	117.0	42.7	43.6
15	31.4	127.3	42.7	44.6	15	31.3	117.0	42.7	43.6
16	31.3	128.8	42.3	45.7	16	31.3	117.0	42.9	43.1
17	31.3	128.8	42.8	44.4	17	31.2	118.3	42.8	43.4
18	31.3	128.8	42.5	45.2	18	31.4	115.7	43.2	42.4
19	31.4	127.3	42.5	45.2	19	31.1	119.7	43.2	42.4
20	31.4	127.3	42.5	45.2	20	31.2	118.3	42.6	43.9
Avg.	31.44	126.76	42.61	44.90	Avg.	31.35	116.36	42.68	43.70
SD	0.12	1.86	0.15	0.42	SD	0.15	1.93	0.25	0.63
CV	0.39%	1.47%	0.36%	0.95%	CV	0.47%	1.66%	0.58%	1.44%
Max.	31.8	128.8	42.9	45.7	Max.	31.6	119.7	43.2	44.7
Min.	31.3	121.3	42.3	44.1	Min.	31.1	113.1	42.3	42.4
Range	0.5	7.5	0.6	1.6	Range	0.5	6.6	0.9	2.3

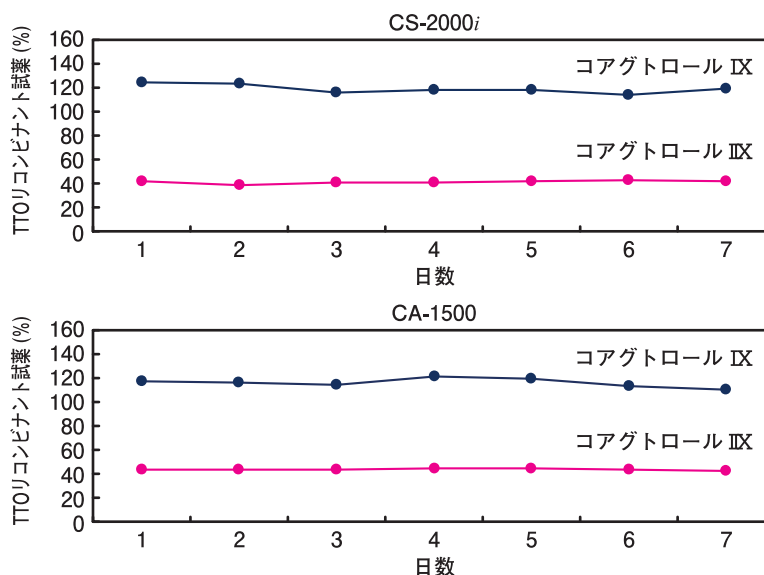


図 2. 日差再現性

## 2. 相関性

正常血漿および患者血漿，ならびにワルファリン投与患者血漿を用いてTTOリコンビナント試薬と対照試薬との相関性を活性%にて確認した。 $r=0.988$ ,  $y=0.950x+2.713$  (CS-2000i),  $r=0.992$ ,  $y=0.904x+3.836$  (CA-1500)と良好な相関性を示した(図3)。

## 3. ヘパリン感受性

未分画ヘパリンをコントロール血漿に添加してTTOリコンビナント試薬のヘパリン感受性をCS-2000iで確認した。未分画ヘパリン1IU/mLまで活性%に変動は見られなかった(図4)。

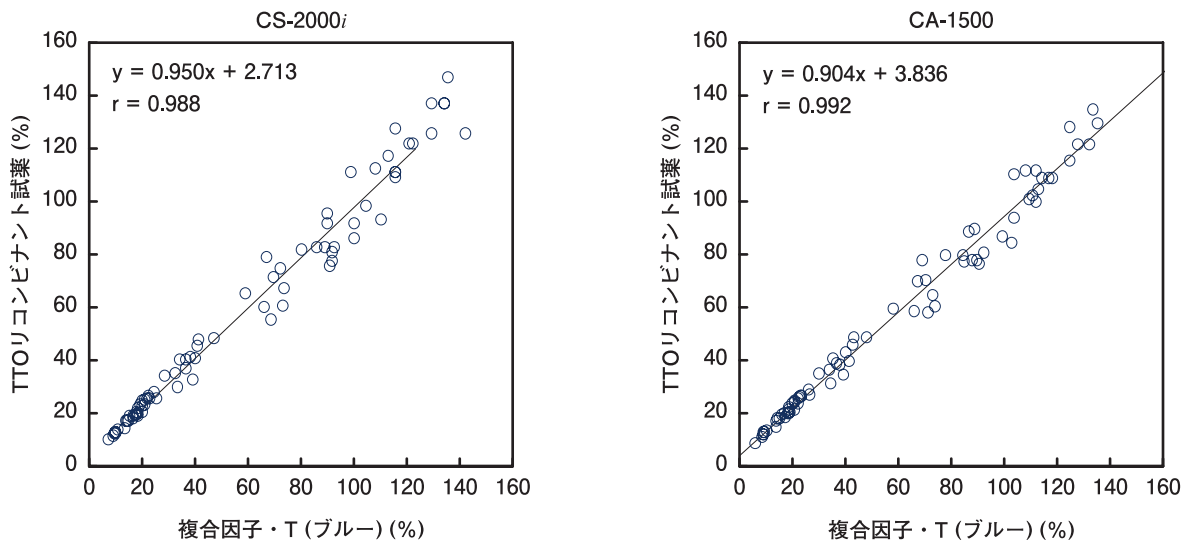


図3. 相関性

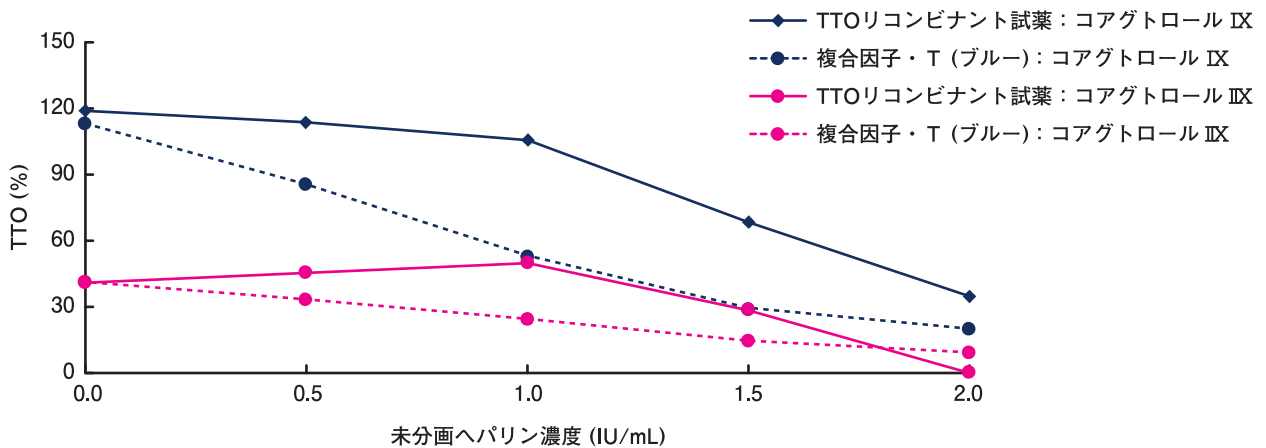


図4. ヘパリン感受性

4. 因子感受性

健康人プール血漿に第Ⅱ因子欠乏血漿，第Ⅴ因子欠乏血漿，第Ⅶ因子欠乏血漿，第Ⅹ因子欠乏血漿をそれぞれ混合した希釈系列を作成しTTOリコンビ

ナント試薬および対照試薬で測定したところ，両試薬ではほぼ同じ傾きの検量線となった。また，第Ⅴ因子に対する感受性は見られなかった(図5)。

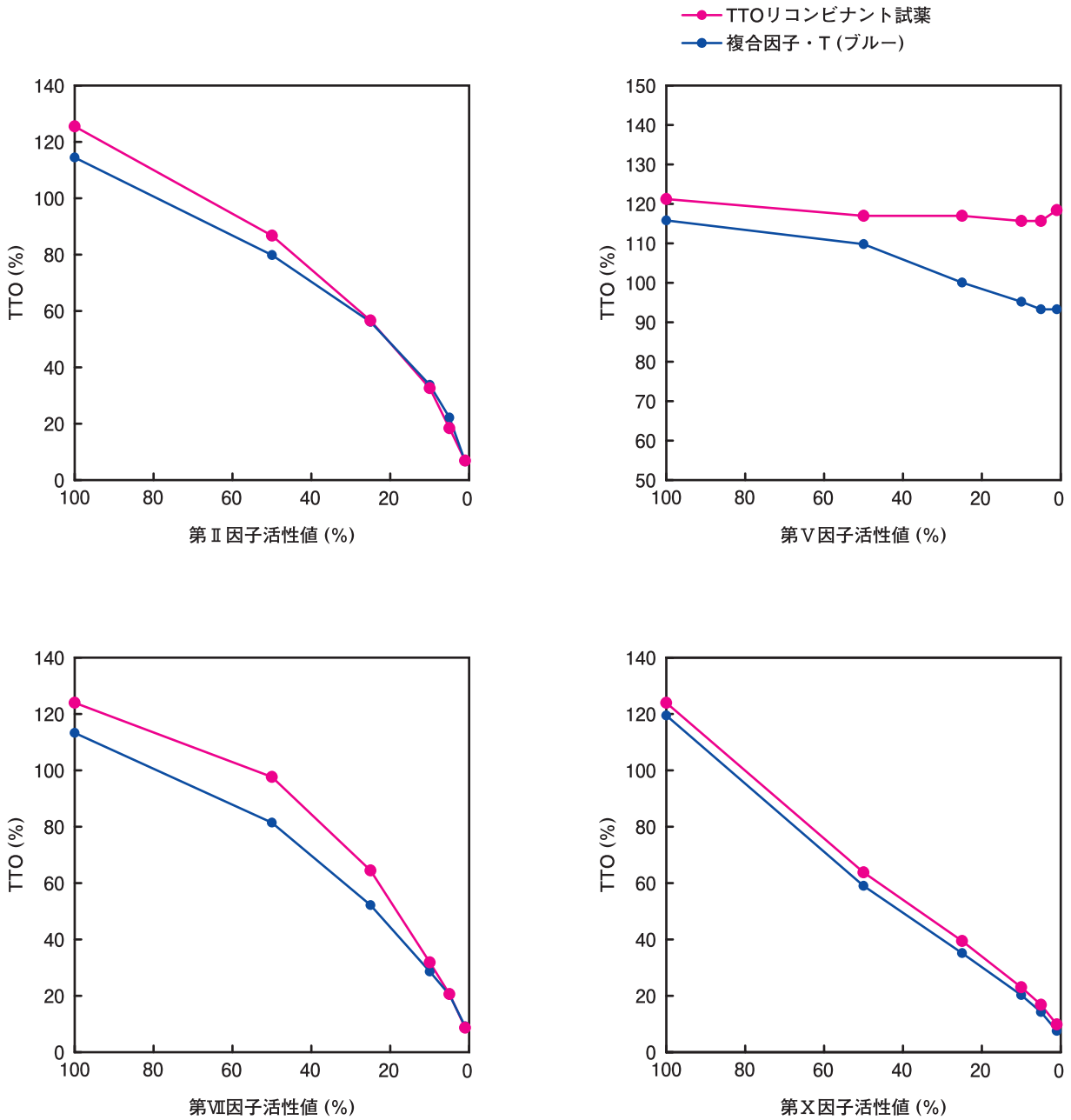


図5. 因子感受性

## おわりに

血液凝固検査用試薬は、その原料として動物（哺乳類）あるいはヒト由来の原料を使用することが多い。動物由来の原料は動物間での感染症の流行などにより、安定した原料確保が困難となるケースがある。

TTO リコンビナント試薬は遺伝子組み換えウシ組織因子を使用することにより、動物由来原料から脱却し、試薬の安定的な供給を図っている。また同時にロット間差の低減や安定した性能を実現している。

本試薬の基本性能は良好であり、本試薬の第Ⅱ因子、第Ⅶ因子、第Ⅹ因子に対する感受性は、複合因子・T（ブルー）と同等以上であり、また相関性も良好であった。

未分画ヘパリンを添加した血漿によるヘパリン感受性試験ではヘパリン濃度 1IU/mL までは測定値に

影響を受けず、ワルファリン投与の初期段階でヘパリン投与を実施する場合であっても、その影響を受けず正しくワルファリン療法の正確なモニタリングが可能であると考えられた。

本試薬は 2～8℃ で密栓保存した場合、7 日間の安定性を保っており（表 2）、動物由来の複合因子試薬より保存安定性に優れている。さらにリコンビナント組織因子を試薬原料に用いることにより、試薬のロット間差が低減されていることも大きな特長である（図 6）。

全自動血液凝固分析装置に応用することにより、様々な施設での使用が可能となり、臨床において有用な情報が提供できるものとする。

表 2. 溶解後安定性

		1日目	2日目	3日目	4日目	5日目	6日目	7日目
正常域 コアグトロール IX	測定値 (%)	122.6	118.4	135.0	135.0	131.8	121.2	117.0
	相対値 (%)*	100	97	110	110	108	99	95
異常域 コアグトロール IX	測定値 (%)	45.4	43.2	48.7	48.4	48.4	44.2	43.4
	相対値 (%)*	100	95	107	107	107	97	96

\*相対値 (%) ; 1日目のTTO (%) と比較したときの相対値

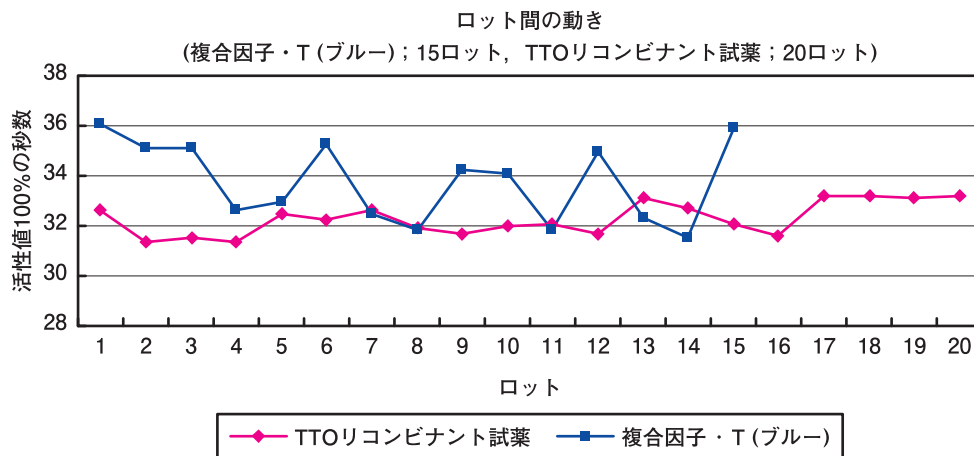


図 6. ロット間差

## 参考文献

- 1) 日裏久英, 西岡良訓, 奥田昌宏. 複合因子の測定. 臨床検査機器・試薬. 1990; 13(4): 595-599.
- 2) Owren PA. A quantitative one-stage method for the assay of prothrombin. Scand J Clin Lab Inv. 1949; 1(1): 81-83.
- 3) Minami S et al. Development of a recombinant bovine tissue factor based TT reagent. Clin Chem Lab Med. 2002; 40, Special Suppl: S198.
- 4) 安原正善 他. 遺伝子組換え牛組織因子の特性とトロンボテスト試薬としての基礎的検討. 日本血栓止血学会雑誌. 2006; 17(5): 222.
- 5) 奥田昌宏 他. カイコ蛹を利用した遺伝子組換えタンパク質の発現と凝固試薬への適用—完全長ウシ組織因子原料の開発と特性—. Sysmex J Web. 2009; 10(2). <http://sysmex-success.com/cs/>