

全自動血液凝固測定装置 CS-2000*i* を用いた リストセチンコファクター活性 (VWF:RCo) 測定機構の最適化の検討

新井 信夫, 向出 佳恵, 杉山 透, 船越 國宏

シスメックス株式会社学術部：神戸市西区室谷 1-3-2 (〒 651-2241)

要 旨

我々は、VWF:RCo 測定を全自動血液凝固測定装置 CS-2000*i* (CS-2000*i*; シスメックス社)へ適応させるため、スターラーバーを挿入した反応キュベットとマグネットによる攪拌機能を CS-2000*i* に搭載した。本測定においては、スターラーバーの形状 (直径, 長さ) とその攪拌スピードが、良好な測定データが得られるかどうか大きく影響することから、これを最適化するために種々の検討を実施した。再現性や検量線の傾きなどを含めて総合的に評価した結果より、スターラーバーの直径は 1.2mm, 長さは 3.8mm, 攪拌スピードは 900 rpm を測定条件として設定した。測定成績については、2 濃度のコントロール血漿を用いた同時再現性は、正常域が CV 4.4%, 異常域が CV 3.3% と良好であった。また、希釈直線性では、サンプルの希釈倍率を変更することで 5 ~ 330% の範囲で直線性が確認された。VWF:RCo 低活性サンプルを用いた検出限界では、活性値 5% の検出限界を確認した。用手法とは相関が認められ、低活性値域では高活性値域に比べて、両測定法において測定値がより近似していた。

本装置は VWF:Ag, FVIII:C および VWF:RCo の測定に対応していることから、VWD 診断のために有用な情報を提供できると考えられる。

キーワード 全自動血液凝固測定装置 CS-2000*i*, VWF, VWF:RCo

はじめに

von Willebrand 病 (VWD) は、von Willebrand Factor (VWF) の遺伝子異常に基づく VWF の量的、質的異常に起因する出血性疾患である。本疾患では、血液凝固第Ⅷ因子分子中の高分子量部の第Ⅷ因子リストセチンコファクター活性 (VWF:RCo) が低下または欠如していることが知られている¹⁻³⁾。VWF の測定法には、活性 (または機能) を測定する方法と抗原量を測定する方法があり、VWF の機能的測定法としては、出血時間や血小板粘着能が古くから用いられてきたが、特異性と定量性に難点があることから、現在では VWF:RCo 測定およびリストセチン惹起血小板凝集 (ristocetin induced platelet aggregation; RIPA) 検査が広く行われている。また、VWF の抗原量の測

定には、抗ヒト VWF ポリクローナル抗体を用いた免疫電気泳動法があるが、最近ではポリクローナル抗体をラテックス粒子に感作させたラテックス凝集法による簡便な測定法へ置き換わってきている^{4,5)}。VWF:RCo 測定は、VWF をリストセチン存在下で血小板を凝集させる生物活性として測定する感度の高い二次スクリーニング検査であるが、用手法または血小板凝集計 (および一部の血液凝固測定装置) で実施され、汎用の血液凝固測定装置では実施できない項目であった。我々は、全自動血液凝固測定装置 CS-2000*i* (CS-2000*i*; シスメックス社) の開発において、検出部に攪拌機構を設け、汎用の血液凝固測定装置による VWF:RCo の測定を可能とした⁶⁾。今回、CS-2000*i* における攪拌機構の最適化について報告する。

測定原理

VWF:RC₀ 試薬は、安定化ヒト血小板、リストセチンおよび EDTA を含んだ凍結乾燥品である。測定原理は、血漿中の VWF と試薬中のリストセチンおよび安定化ヒト血小板によって凝集反応が起こることを利用しており、この凝集反応に伴って生じる反応液の濁度変化を光学的に測定する(図1)。測定値は、正常血漿を用いて作成した検量線から活性%として算出される。CS-2000*i* では、サンプルと試薬を持続的に攪拌するスターラー攪拌機構を検出部に搭載した(図2)。

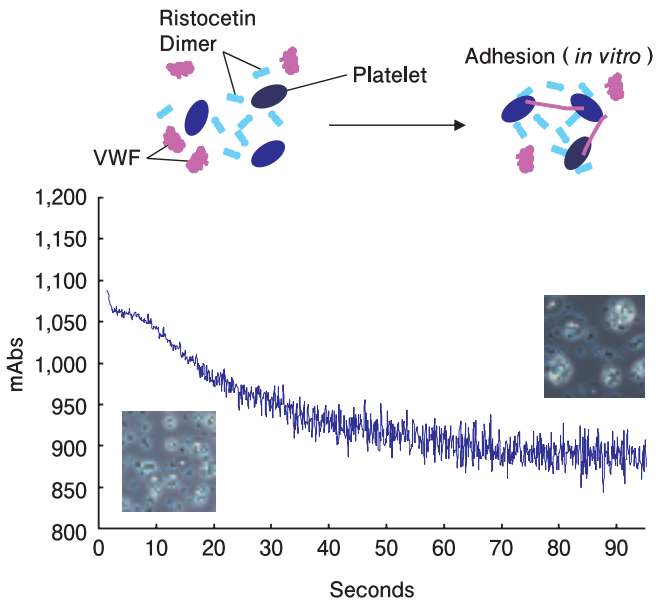


図1. VWF:RC₀ 試薬測

検討方法

1. 使用装置

全自動血液凝固測定装置 CS-2000*i* (シスメックス社)

2. 使用試薬

- ① BC フォンビレブランド試薬 (SIEMENS 社)
- ② 血液凝固試験用標準ヒト血漿 (SIEMENS 社)
- ③ コントロール血漿 N (SIEMENS 社)
- ④ コントロール血漿 P (SIEMENS 社)

3. 方法

各種サイズ(直径, 長さ)のスターラーバーを用いて、最適な形状と攪拌スピードの条件設定を行った後、設定した条件における測定性能の基礎的検討を実施した。

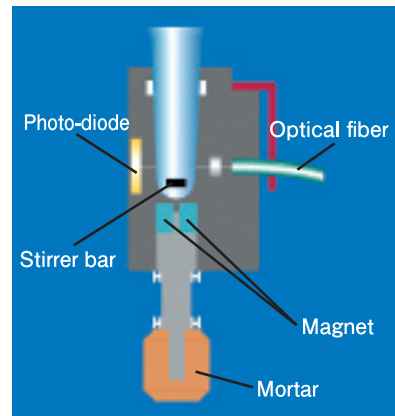
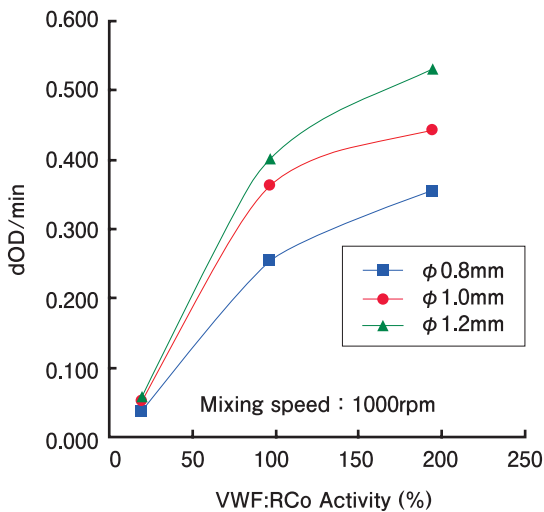


図2. キュベット攪拌機構

測定条件の設定

1. スターラーバーの形状 (直径)

3種類の太さ(直径0.8, 1.0, 1.2mm)のスターラーバーを用意し、それぞれの検量線と比較した。スターラーバーの直径が大きくなるほど、吸光度変化量(dOD/min)が大きくなる傾向が見られた。したがって、直径は各活性ポイントにおいて最も大きい変化量が得られた1.2mmに設定した(図3)。



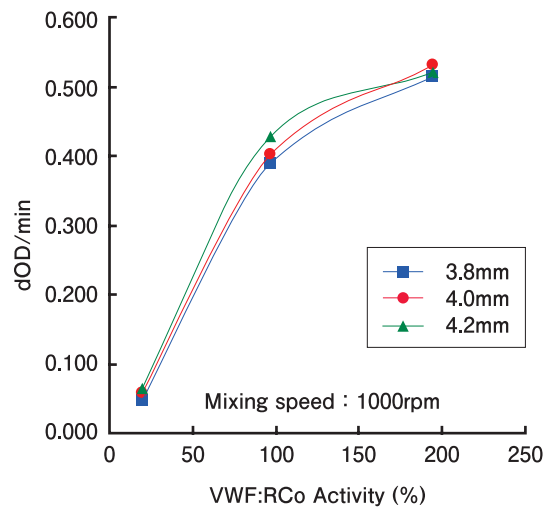
n=5

直径	dOD/min			
	VWF:RCo	19.7%	97%	194%
φ 0.8mm	Mean	0.0365	0.2552	0.3531
	CV (%)	19.9	5.6	7.1
φ 1.0mm	Mean	0.0517	0.3621	0.4432
	CV (%)	15.3	7.8	8.3
φ 1.2mm	Mean	0.0581	0.4023	0.5313
	CV (%)	5.3	4.2	8.9

図3. スターラーバーの形状 (直径)

2. スターラーバーの形状 (長さ)

3種類の長さ(3.8, 4.0, 4.2mm)のスターラーバーを用意し、攪拌スピード1,000 rpm (rotation per minute)にて、それぞれの検量線と比較することによって、最適な長さを選択した。それぞれの長さにおいて、吸光度変化量はほぼ同等となり、大きな差は見られなかった(図4)。再現性、吸光度変化量およびキュベット内径などを考慮して、長さは3.8mmに設定した。



n=5

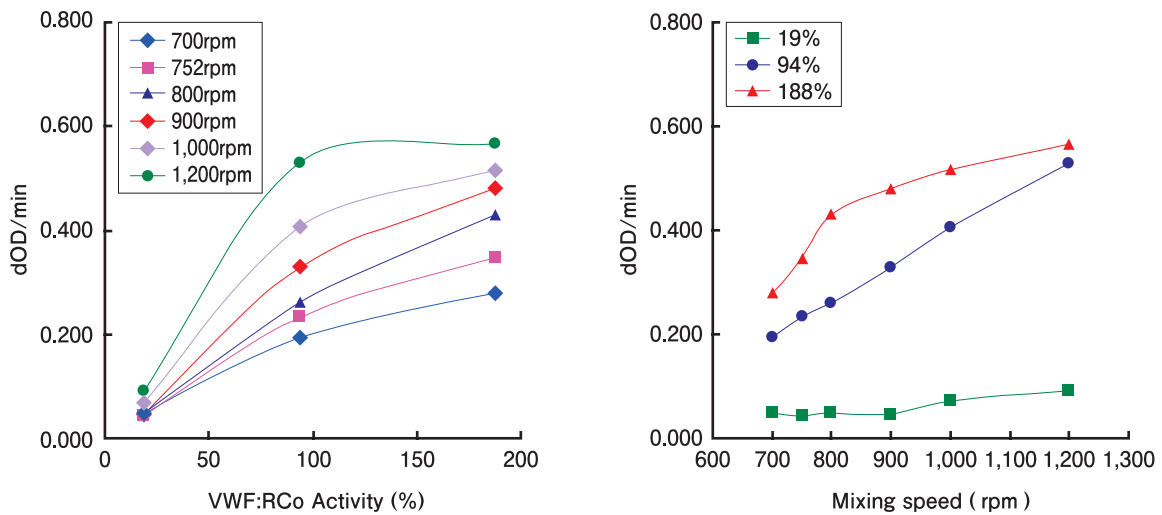
長さ	dOD/min			
	VWF:RCo	19.7%	97%	194%
3.8mm	Mean	0.0474	0.3887	0.5134
	CV (%)	4.0	4.0	6.9
4.0mm	Mean	0.0581	0.4023	0.5313
	CV (%)	5.3	4.2	8.9
4.2mm	Mean	0.0655	0.4285	0.5205
	CV (%)	7.2	9.2	9.4

図4. スターラーバーの形状 (長さ)

3. 攪拌スピード

直径 1.2mm, 長さ 3.8mm のスターラーバーを用い, 700, 752, 800, 900, 1,000, 1,200rpm の 6 段階の攪拌スピードについて検討した. VWF:RCo 活性値と吸光度変化量を攪拌スピード毎にプロットすると, 攪拌スピードが速くなるほど吸光度変化量は大きくなる傾向にあった. しかし, 高回転数では, 検量線が高濃度 VWF:RCo で傾きが抑えられる傾向にある. また,

攪拌スピードと吸光度変化量のグラフを見ると 700, 1,200rpm では, VWF:RCo 活性値 94%と 188%における吸光度変化量の差が小さく, 分解能が劣る結果であったが, 800, 900, 1,000 rpm では各活性%において, 良い分解能を示した. この内, 900rpm が最も良い再現性 (CV 4.9 ~ 6.8%) を示したことから, 攪拌スピードは 900rpm に設定した (図 5).



n=5

攪拌 スピード	dOD/min			
	VWF:Rco	18.8%	94%	188%
700rpm	Mean	0.048	0.193	0.280
	CV (%)	5.8%	8.0%	13.7%
752rpm	Mean	0.043	0.234	0.346
	CV (%)	25.7%	6.6%	6.7%
800rpm	Mean	0.048	0.261	0.431
	CV (%)	15.0%	3.5%	8.0%
900rpm	Mean	0.045	0.329	0.480
	CV (%)	6.8%	4.9%	5.1%
1000rpm	Mean	0.070	0.406	0.516
	CV (%)	26.5%	7.1%	2.4%
200rpm	Mean	0.092	0.530	0.567
	CV (%)	7.3%	5.0%	7.7%

図 5. 攪拌スピード

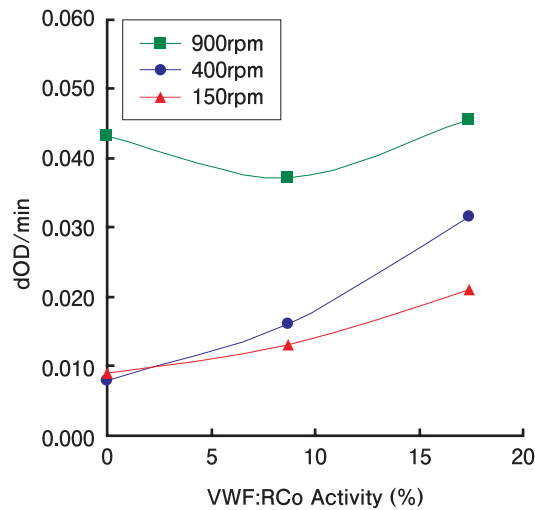
4. 低活性値領域における攪拌

20%以下の低活性値領域での検出感度を向上する目的で、試薬添加から測光までのラグフェーズ(0～15秒)の攪拌スピードについて検討を行った。VWF:RCo 活性値0%, 8.7%, 17.4%のサンプルを900, 400, 150rpmの3段階の攪拌スピードにて測定した。VWF:RCo 活性値と吸光度変化量のグラフを見ると、「3. 攪拌スピード」で設定した攪拌スピード900rpmはVWF:RCo 活性値0%と17.4%における吸光度変化量に差はほとんど見られないが、400rpm

では活性値の上昇に伴いに吸光度も増加を示した。この結果から、ラグフェーズの攪拌スピードは400rpmに設定した(図6)。

5. 測定条件の設定

以上の検討結果をもとに、CS-2000iにおけるVWF:RCoの測定条件を設定した(表1)。測定は、10～50%の測定範囲をカバーするlowモードと予め4倍希釈したサンプルを使用して40～200%の測定範囲をカバーするmediumモードの2つを選択可能とした。



n=5

ラグフェーズ 攪拌スピード	dOD/min				Sensitivity 17.4%～0%
	VWF:RCo	0%	8.70%	17.40%	
900rpm	Mean	0.043	0.037	0.046	0.003
400rpm	Mean	0.008	0.016	0.032	0.024
150rpm	Mean	0.009	0.013	0.021	0.012

図6. 低活性値領域における攪拌

表1. VWF:RCo 測定条件の設定

Parameter		Setting Value
Sample Volume		18 μL
Diluent Volume		54 μL
Incubation Time		190 seconds
Detection Time		100 seconds
Stirring Speed	0-15 seconds (Lag phase)	400 rpm
	15-100 seconds (Reaction phase)	900 rpm
Stirring Bar	Diameter	1.8 mm
	Length	3.8 mm

* mediumモードは、4倍希釈した試料を使用する

決定した測定条件における基本性能

1. 同時再現性

2 濃度のコントロール血漿を用いてそれぞれ連続 20 回測定を行い、同時再現性を確認した。正常域コントロール血漿（コントロール血漿 N：CPN）では、CV4.4%，異常域コントロール血漿（コントロール血漿 P：CPP）では、CV3.3%であった（表2）。

2. 直線性

VWF:RCo が高活性の試料をオーレンベロナール緩衝液で段階希釈し、それぞれの試料を測定した。活性値 200%以上および 10%以下については、希釈倍率を変更して測定したところ、5～330%の範囲で直線性が認められた（図7）。

表2. 同時再現性

	VWF:RCo	
	CPN	CPP
	%	%
1	96.4	24.1
2	90.8	24.6
3	80.8	23.4
4	92.8	24.2
5	92.4	23.8
6	96.0	23.4
7	85.6	22.9
8	88.8	24.7
9	92.8	22.5
10	88.4	23.5
11	91.2	23.5
12	90.4	24.0
13	90.0	23.4
14	90.4	24.4
15	88.0	25.1
16	85.2	22.2
17	91.6	22.3
18	83.2	23.4
19	91.2	23.3
20	92.8	23.6
Mean	89.94	23.62
SD	3.93	0.78
CV (%)	4.4%	3.3%

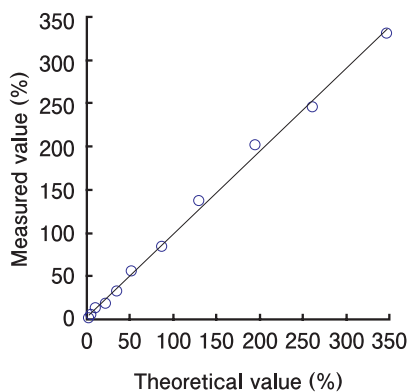


図7. 直線性

3. 検出限界

VWF:RC₀ が低活性の試料をオーレンベロナール緩衝液で段階希釈し、それぞれの試料を測定した。各希釈試料の dOD 平均値 -2SD と 0 濃度試料の dOD 平均値 + 2SD が重ならない活性値を検出限界として求めた。本装置での検出限界は、活性値 5%であった(図8)。

4. 他法との相関

患者血漿 40 例を用いて、用手法との本装置での相関を確認した。結果は、 $r=0.925$, $y=0.933x-0.354$ であった(図9)。

考 察

今回、我々は VWF:RC₀ 測定を全自動血液凝固測定装置 CS-2000i へ適応させるため、スターラーバーを挿入した反応キュベットとマグネットによる攪拌機能を CS-2000i に搭載した。これは、VWF:RC₀ 測定用試薬の組成には安定化ヒト血小板が含まれており、血小板の凝集を促進するためにはキュベット内で攪拌が必要なためである。また、本測定においては、スターラーバーの形状(直径、長さ)とその攪拌スピードが測定データに大きく影響することから、これを最適化するために種々の検討を実施した。

結果、今回検討したスターラーバーにおいては、直径は太いほど、攪拌スピードは速いほど、吸光度変化量が大きくなる傾向にあった。ただし、1.2mm

以上の太さのスターラーバーは、検出部からの光を遮る恐れがあるため、これ以上の直径については検討しなかった。長さの検討においては、検討したサイズ間に大きな差は見られなかった。再現性、検量線の傾きおよびキュベット内径などを含めて総合的に評価した結果より、スターラーバーの直径は 1.2mm、長さは 3.8mm、攪拌スピードは 900 rpm を測定条件として設定した。設定した回転数は市販の多くの血小板凝集計で採用されている 800 ~ 1,200rpm の範囲内であった⁷⁾。しかしながら、試薬の添加直後から 900 rpm の攪拌スピードで測定を行うと、測光を開始するリアクションフェーズ(16 ~ 100 秒)前から、凝集反応が起こり、0%から 20%の低濃度域では感度が悪くなることが判明した。このことから、試薬の添加直後から測光までのラグフェーズ(0 ~ 15 秒)の攪拌スピードをより緩やかな 400 rpm にすることで、凝集反応を起こさずに検体と試薬を攪拌し、低活性値領域の感度が良くなることが確認された。

測定成績については、2 濃度のコントロール血漿を用いた同時再現性は、正常域が CV4.4%、異常域が CV3.3%と良好であった。また、希釈直線性では、サンプルの希釈倍率を変更することで 5 ~ 330%の範囲で直線性が確認された。VWF:RC₀ 低活性サンプルを用いた検出限界では、活性値 5%の検出限界を確認した。用手法の検出限界である 2%よりは、若干劣る結果であったが、本項目の正常参考範囲が、50 ~ 150%^{8,9)}であることから、この検出限界は VWD を検出するのに十分な感度であると思われる。用手法とは

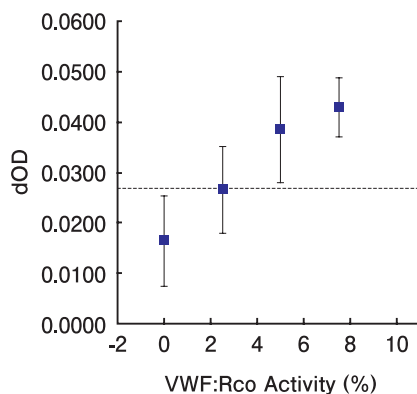


図8. 検出限界

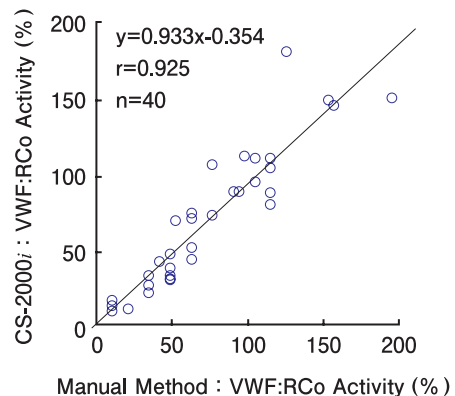


図9. 用手法との相関

相関が認められ、低活性値域では高活性値域に比べて、両測定法において測定値がより近似していた。用手法は分析者の目視による判定のため、分析者間でデータの変動が見られるが、自動分析は分析者に依存しない安定したデータを得られるメリットがある。

VWD 診断の検査項目の中でも、VWF:RCo は感度の高い二次スクリーニング検査であり^{3, 10)}、VWF:Ag や FVIII:C との組み合わせによる病型分類が可能で、いくつかの診断フローの提案がなされている¹¹⁻¹³⁾。本装置は VWF:Ag, FVIII:C および VWF:RCo の測定に対応していることから、VWD 診断のために有用な情報を提供できると考えられる。また、最近では、VWF:Ag や VWF:RCo の増加が脳梗塞、心筋梗塞をはじめとした疾患で上昇し、血管系疾患のリスクファクターであることが示されている^{14, 15)}。VWF は、出血性疾患に対して実施されるばかりではなく、今後は、血栓性微小血管症などの検索にも有用になるとと思われる。

まとめ

今回の検討により、汎用の血液凝固測定装置での VWF:RCo 測定が可能となり、その測定精度もルーチン検査で十分使用可能なものであることが示された。また、CS-2000i は、VWF:Ag, FVIII:C などの測定にも対応しており、これらのデータを組み合わせることで、病型分類などの有用な情報の提供も可能であり、VWD 診断の一助になるものと思われる。

本論文の一部内容は、第 38 回日本臨床検査自動化学会(2006 年 9 月神戸)にて発表した。

参考文献

- 1) 櫻井嘉彦, 藤村吉博. von Willebrand 病. 診断と治療. 1998 ; 86 : 80-86
- 2) Veyradier A, Fressinaud E, Meyer D. Laboratory diagnosis of von Willebrand disease. Int J Clin Lab Res. 1998 ; 28 (4) : 201-210
- 3) Kasper CK. von Willebrand Disease : An introductory discussion for young physicians. ISTH-SSC ; 2005. 57p.
- 4) 福武勝博, 藤巻道男. 血液凝固検査ハンドブック. 東京 : 宇宙堂八木書店 ; 1996. 298p.
- 5) 大森司, 荻尾七臣. 特集 血栓症検査ガイドブック : VWF (von Willebrand factor : フォンビレブランド因子). 血栓と循環. 2004 ; 12 (4) : 144-147
- 6) 新井信夫, 松尾直彦. 全自動血液凝固測定装置 CS-2000i の概要. Sysmex J. 2006 ; 29 : 126-135
- 7) George A. Donna M et al eds. Hemostasis and Thrombosis in the Clinical Laboratory : Test of Platelet Number and Function. Philadelphia ; Lippincott Williams and Wilkins : 1988. 294-295
- 8) 金井正光 編. 臨床検査法提要. 改訂第 32 版. 東京 : 金原出版 ; 2007. 1894p.
- 9) NCCLS. Assays of von Willebrand Factor Antigen and Ristocetin Cofactor Activity ; Approved Guideline. Wayne, PA : 2002. H51-A
- 10) Mary Ng CHUA, Maria Suga A. DIOKO, Lorena SANTOS. Prevalence and Clinico-Hematologic Scenario of Von Willebrand Disease in a Population of Filipinos with Bleed Tendency. Sysmex J Int. 2006 ; 16 (2) : 42-46
- 11) Castaman G et al. von Willebrand's disease in the year 2003 : towards the complete identification of gene defects for correct diagnosis and treatment. Haematologica. 2003 ; 88 (1) : 94-108
- 12) Augusto B. Federici et al. Scientific and Standardization Committee Communication Scientific Report of the Registry on Acquired von Willebrand Syndrome : Recommendations for Diagnosis and Management. Thromb Haemost. 2000 ; 84 : 345-349
- 13) Favaloro EJ. Laboratory assessment as a critical component of the appropriate diagnosis and sub-classification of von Willebrand's disease. Blood Rev. 1999 ; 13 (4) : 185-204
- 14) 市川典子 他. 心血管疾患における血管内皮機能の指標としての血漿 von Willebrand 因子. 日本血栓止血学会誌. 2001 ; 12 (4) : 280-287
- 15) Goto S et al. Enhanced shear-induced platelet aggregation in acute myocardial infarction. Circulation. 1999 ; 99 (5) : 608-613

Optimization of the Mechanism for Measuring Ristocetin Cofactor Activity (VWF:RCo) with the Fully Automated Blood Coagulation Analyzer Sysmex CS-2000*i*

Nobuo ARAI, Kae MUKAIDE, Toru SUGIYAMA and Kunihiro FUNAKOSHI

Scientific Research Division, Scientific Affairs, Sysmex Corporation, 1-3-2 Murotani, Nishi-ku, Kobe 651-2241

SUMMARY

To make it capable of VWF:RCo measurements, we provided a built-in mixing function in the CS-2000*i*, comprising a reaction cuvette in which a magnetic stirrer bar is inserted. The shape (diameter and length) of the stirrer bar and the stirring speed have major impact on data in this measurement. We conducted various investigations for optimizing the assay conditions to obtain good quality data. After comprehensive evaluation including reproducibility and the slope of the calibration curve, we set the stirrer bar diameter at 1.2 mm and length at 3.8 mm and stirring speed at 900 rpm as the assay conditions. Assay results obtained with two levels of control plasma showed good within-run reproducibility, the CV being 4.4% for normal plasma and 3.3% for pathological plasma. When the sample dilution was changed before measurement in the very low and very high activity ranges, dilution linearity was shown in the 5-330% VWF:RCo activity range. The detection limit determined with low VWF:RCo activity samples was found to be 5% activity. The results obtained with the CS-2000*i* were correlated with those of the manual method. The two were especially close in the low activity range.

We believe that the CS-2000*i*, capable of measuring VWF:Ag, FVIII:C and VWF:RCo, can provide useful information for VWD diagnosis.

Key Words

Fully Automated Blood Coagulation Analyzer CS-2000*i*, VWF, VWF:RCo
