

全自動血液凝固測定装置 CS シリーズを用いた血小板凝集能測定の紹介

坂寄 輔^{*1}, 渡邊 ゆり^{*1}, 中島 享子^{*1}, 三澤 絵梨^{*1},
小林 克史^{*2}, 黒野 浩司^{*1}, 新井 信夫^{*1}, 高岡 秀成^{*1}

*1 シスメックス株式会社 凝固プロダクトエンジニアリング本部：神戸市西区高塚台 4-4-4 (〒651-2271)

*2 HYPHEN BioMed SAS

要 旨

透過光法による血小板凝集能検査はゴールドスタンダード法であるが、専用の半自動測定装置で測定するのが主流であった。全自動血液凝固測定装置の CS シリーズ（以下、CS シリーズ；シスメックス社）で血小板凝集能の測定が可能となり、これまで人が実施していた検体および試薬の分注が自動化され、より精度の高い結果が期待できる。

本稿では、CS シリーズにおける血小板凝集能検査の測定フローおよびシスメックス社より販売を開始したレボヘム ADP、レボヘム コラーゲン、レボヘム エピネフリン、レボヘム アラキドン酸、レボヘム リストセチンを使用して、国際血栓止血学会が推奨している試薬濃度での同時再現性、オンボード安定性、基準範囲について報告する。

同時再現性の結果は、正常試料で全ての試薬で CV 5% 以内、異常試料で CV 10% 以内であった。全ての試薬でオンボードは 10 時間まで安定であった。基準範囲は全ての試薬で 60% 以上であった。

CS シリーズの血小板凝集能測定は、ルーチンの凝固検査と同じ装置で血小板凝集能の測定が可能であること、装置がグローバルに普及していることから、これまで課題であった検査の標準化への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, CS シリーズ, レボヘム

はじめに

血小板凝集能検査の標準法である透過光法の測定は、1962 年に Born によって開発され¹⁾、その後、血小板凝集能検査のゴールドスタンダード法として、先天性出血性疾患の診断、血栓傾向の確認、抗血小板薬の薬効の確認やモニタリングなどの用途で使用されている^{2,3)}。

ゴールドスタンダードといわれている本法であるが、血小板凝集能検査は、検体である多血小板血漿 (Platelet Rich Plasma: PRP) および乏血小板血漿 (Platelet Poor Plasma: PPP) の調製条件や使用試薬の終濃度が施設によって様々であるとの問題点が指摘されている^{2,3)}。そこで、透過光法を用いた血小板凝集能検査の標準化に向けて、2013 年に国際血栓止血学

会標準化委員会 (International Society Thrombosis and Haemostasis; ISTH (以下、ISTH)) より、推奨測定法が発表され⁴⁾、これまで統一されていなかった、検体調製・使用する試薬の終濃度に関する推奨事項が提唱された。しかし、推奨事項には透過光法の血小板凝集能検査の臨床的有用性は先天性出血性疾患のみであり、血栓リスクの評価や抗血小板薬のモニタリングの臨床的有用性は現時点ではなく、今後のさらなる研究が必要であると記載されている。

これまでの血小板凝集能の測定は、凝集検出およびデータ解析は自動で実施されるが、検体と試薬の分注を測定者が実施する半自動測定装置が主流であった。しかし、2015 年に全自動血液凝固測定装置 CS シリーズ（以下、CS シリーズ；シスメックス社）に搭載された血小板凝集能測定機能では、検体と試薬

の分注が自動化され、これまでの半自動測定装置の煩雑さと誤差が低減されており、標準化への一助になることが期待される(表1)。また、同年にシスメックス社より5種類の血小板凝集能測定試薬の発売を開始し、血小板凝集能検査のラインナップを充実させてい

る(図1)。

本稿では、CSシリーズにおける血小板凝集能の測定の紹介とISTHで推奨されている試薬濃度における基礎性能(同時再現性、オンボード安定性)および健常人の基準範囲の評価を報告する。

表1. 半自動測定装置とCSシリーズの血小板凝集能測定の比較

測定フロー	半自動	CSシリーズ
検体の採取	手作業	手作業
PPPとPRPの準備	手作業	手作業
キュベットへのPPPとPRPの分注	手作業	自動
キュベットへの試薬の分注	手作業	自動
測光	自動	自動
解析・結果出力	自動	自動



図1. 血小板凝集能試薬ラインナップ(レボヘムシリーズ)

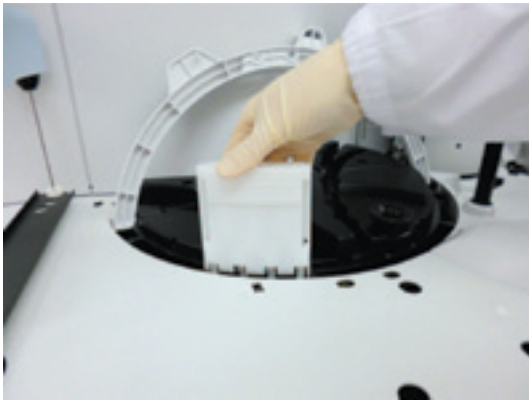
CSシリーズにおける血小板凝集能の測定

1. サンプルチューブ SB・試薬の準備

血小板凝集能の測定には専用のスターラーバー入りサンプルチューブ（サンプルチューブ SB）が必要である。サンプルチューブ SB は試薬テーブルの回

りにある専用の設置場所（分注テーブル）にセットする。試薬は、目的とする最終濃度の 8 倍の濃度になるように調製し、ルーチンの項目と同じように試薬テーブルへセットする（**図 2**）。

1) サンプルチューブ SB のセット CS-5100 にセットしている写真



2) サンプルチューブ SB 設置の確認



3) 試薬の準備



図 2. CS シリーズにおける血小板凝集能の測定（サンプルチューブ SB・試薬の準備）

2. PPP と PRP の準備と測定オーダー

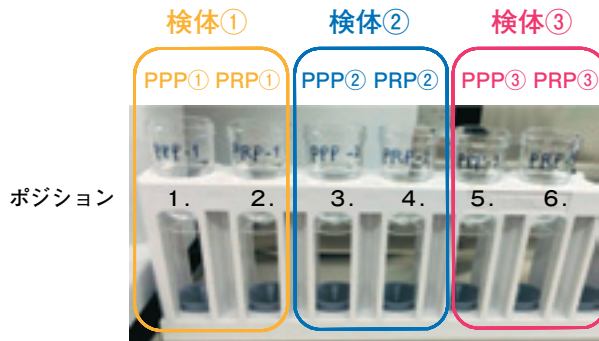
測定に用いる PPP と PRP をサンプルラックの 1 と 2 の位置に、同様に次の検体の PPP と PRP は 3 と 4 というようにサンプルラック内の奇数位置に PPP を偶数位置に PRP を設置する (図 3)。

測定オーダーは血小板凝集能専用の測定オーダー画面から、測定する項目を選択する。血小板凝集能の測定は、PT, APTT, D-Dimer などの凝固・線溶項目測定中も可能となっている。

3. 測定結果・解析

測定結果はジョブリストで、PPP および PRP の吸光度、最大凝集率が確認できる。結果の詳細画面では、凝集波形やその他の解析情報 (AUC や最大加速度など) が確認できる (図 4)。

1) PPP と PRP の準備



PPP: サンプルラック奇数位置
(チューブ位置1, 3, 5, 7, 9)
PRP: サンプルラック偶数位置
(チューブ位置2, 4, 6, 8, 10)

2) オーダー (血小板凝集能専用オーダー画面)



図 3. CS シリーズにおける血小板凝集能の測定 (PPP と PRP の準備と測定オーダー)

1) 結果表示画面 (ジョブリスト)



2) 結果表示画面 (詳細)

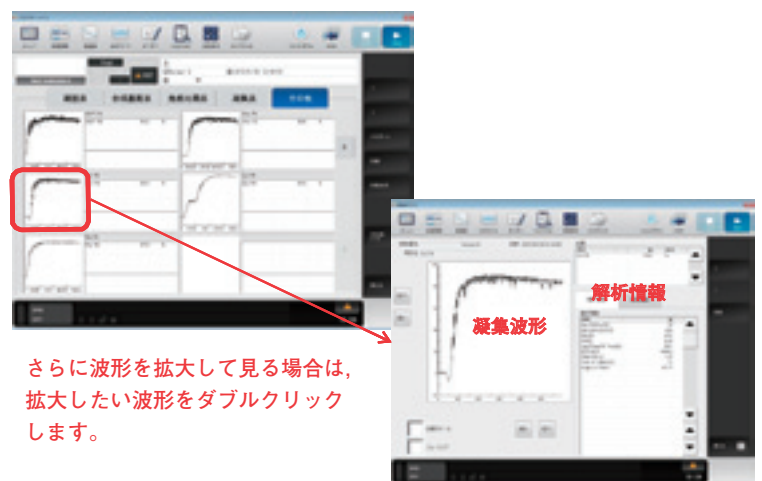


図 4. CS シリーズにおける血小板凝集能の測定 (測定結果・解析)

試料および方法

1. 対象

シスメックス社の倫理委員会にて承認さ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を用いて採血し、200 × gで10分間または120 × gで15分間遠心した後の上清の一部を回収してPRPとし、正常試料とした。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。

正常試料に対して終濃度1 mMになるようにアセチルサリチル酸（和光純薬工業社）を添加し、30分以上静置したものを異常試料とした。

2. 測定装置

再現性およびオンボード安定性の試験は全自動血液凝固測定装置CS-2400（シスメックス社）を用いた。

基準範囲の試験は血小板凝集能検査を測定可能な全自動血液凝固測定装置CS-5100, 2400, 2500, 2000*i*, 2100*i*（シスメックス社）を用いた。

3. 測定試薬

シスメックス社より販売している血小板凝集能試薬のレボヘム ADP, レボヘム コラーゲン, レボヘム エピネフリン, レボヘム アラキドン酸, レボヘム リストセチンを用いた。試薬の最終濃度はISTHの推奨法で提唱されている濃度を用いた（表2）。

4. 方法および結果

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(%)から変動係数(CV%)を求めた(アラキドン酸凝集は異常試料測定時の活性がほぼ0%になること、リストセチン凝集はアセチルサリチル酸では活性が低下しないことから、正常試料のみの測定とした)。

ADP凝集のCV(%)は正常試料で3.4、異常試料で9.6であった。コラーゲン凝集のCV(%)は正常試料で3.3、異常試料で4.8であった。エピネフリン凝集のCV(%)は正常試料で3.6、異常試料で6.4であった。アラキドン酸凝集およびリストセチン凝集の正常試料のCV(%)はそれぞれ3.8、4.2であった（表3）。

表2. 測定試薬および測定濃度

	試薬名称 (シスメックス社)	最終試薬濃度
ADP	レボヘム ADP* ¹	2 μM
コラーゲン	レボヘム コラーゲン* ¹	2 μg/mL
エピネフリン	レボヘム エピネフリン* ¹	5 μM
アラキドン酸	レボヘム アラキドン酸* ²	1 mM
リストセチン	レボヘム リストセチン* ²	1.2 mg/mL

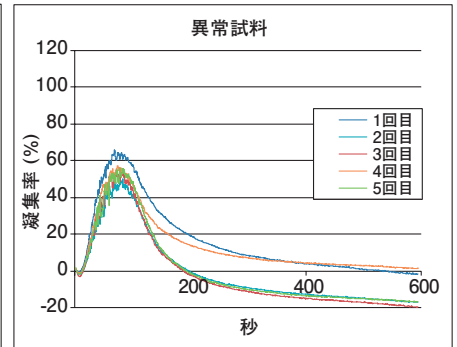
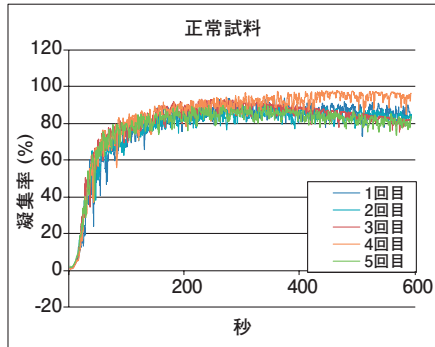
*1: 体外診断用医薬品

*2: 研究用試薬

表3. 同時再現性の結果

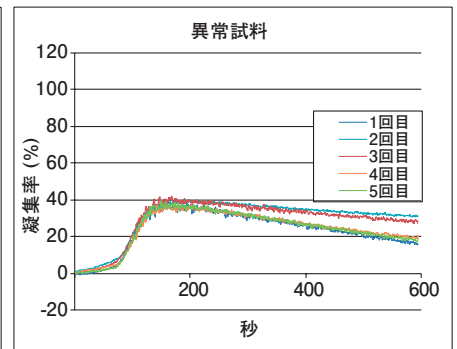
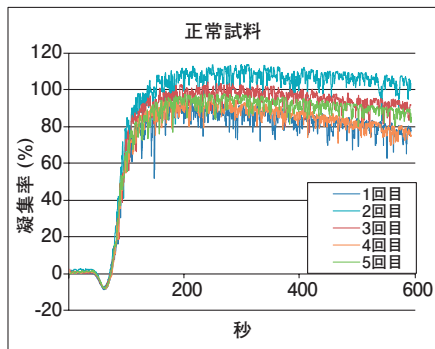
A. ADP [最大凝集率(%)]

測定回数	正常試料	異常試料
1	94.1	65.3
2	89.5	50.3
3	93.3	54.9
4	97.5	57.4
5	90.3	56.3
Mean	92.9	56.8
SD	3.2	5.4
CV	3.4%	9.6%



B. コラーゲン [最大凝集率(%)]

測定回数	正常試料	異常試料
1	92.5	37.8
2	100.0	40.5
3	100.0	42.1
4	95.3	37.5
5	97.5	39.7
Mean	97.1	39.5
SD	3.2	1.9
CV	3.3%	4.8%



C. エピネフリン [最大凝集率(%)]

測定回数	正常試料	異常試料
1	90.6	42.1
2	96.0	38.0
3	96.5	38.0
4	89.0	38.9
5	94.5	43.6
Mean	93.3	40.1
SD	3.3	2.6
CV	3.6%	6.4%

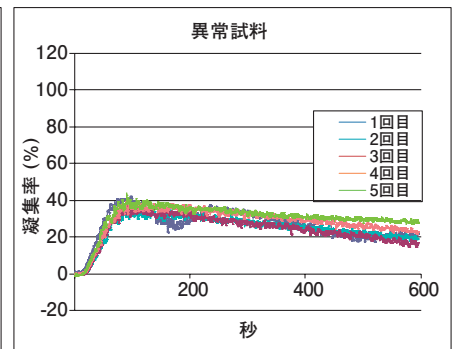
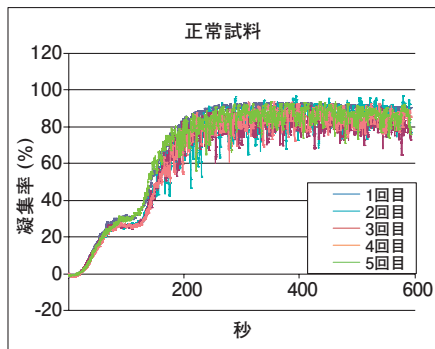
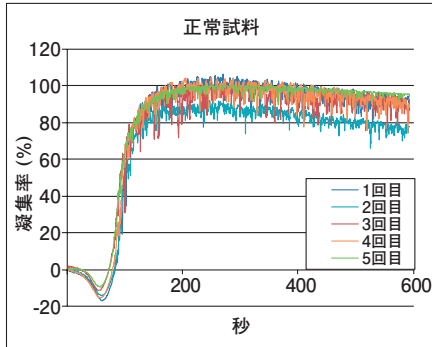


表3. 同時再現性の結果

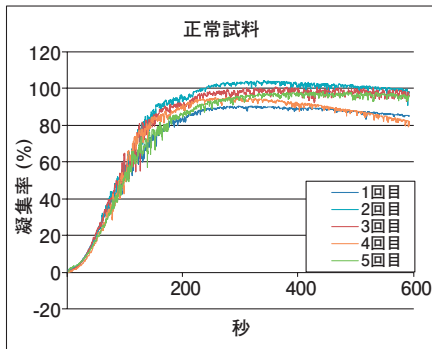
D. アラキドン酸 【最大凝集率 (%)】

測定回数	正常試料
1	100.0
2	91.6
3	100.0
4	100.0
5	100.0
Mean	98.3
SD	3.8
CV	3.8%



E. リストセチン 【最大凝集率 (%)】

測定回数	正常試料
1	90.4
2	100.0
3	100.0
4	94.6
5	97.8
Mean	96.6
SD	4.1
CV	4.2%



2) オンボード安定性

オンボード安定性は0時間および10時間の2ポイントで最大凝集率(%)を用いて評価した。血小板凝集能測定を試料は経時的に活性が変化することから、測定の10時間前に試薬を準備して装置に設置したもの(オンボード10時間の試薬)と、対照として測定時に調製したもの(オンボード0

時間の試薬)を準備して正常および異常試料を同時に測定することで評価した。

オンボード安定性はADP, コラーゲン, エピネフリン, アラキドン酸, リストセチンそれぞれの凝集能検査において0時間と10時間での変動がすべて最大凝集率で5%以内であり安定であった(表4)。

表4. オンボード安定性の結果

A. ADP [最大凝集率(%)]

	正常試料		異常試料	
	0時間	10時間	0時間	10時間
1	85.6	81.8	58.2	55.6
2	82.0	85.7	51.4	47.7
Mean	83.8	83.8	54.8	51.7
差(0時間 - 10時間)		0.0		3.1

B. コラーゲン [最大凝集率(%)]

	正常試料		異常試料	
	0時間	10時間	0時間	10時間
1	96.5	96.4	51.9	47.9
2	91.3	86.9	54.2	57.0
Mean	93.9	91.7	53.1	52.5
差(0時間 - 10時間)		2.3		0.6

C. エピネフリン [最大凝集率(%)]

	正常試料		異常試料	
	0時間	10時間	0時間	10時間
1	92.1	89.5	38.2	35.3
2	86.9	92.7	43.9	38.0
Mean	89.5	91.1	41.1	36.7
差(0時間 - 10時間)		-1.6		4.4

D. アラキドン酸 [最大凝集率(%)]

	正常試料	
	0時間	10時間
1	100.0	100.0
2	99.0	100.0
Mean	99.5	100.0
差(0時間 - 10時間)		-0.5

E. リストセチン [最大凝集率(%)]

	正常試料	
	0時間	10時間
1	81.7	73.8
2	89.5	88.6
Mean	85.6	81.2
差(0時間 - 10時間)		4.4

3) 基準範囲

健常人125例の検体から、ADP凝集96例、コラーゲン凝集85例、エピネフリン凝集82例、アラキドン酸凝集44例、リストセチン凝集42例を測定した。平均±2SDではずれ値を1回除外し、専用のソフトウェアであるAnalyse-it (Analyse-it Software,Ltd.)を用いて基準範囲(95%信頼区間)を

求めた。

基準範囲はADP凝集で60～104%(91例)、コラーゲン凝集で82～103%(83例)、エピネフリン凝集で64～108%(75例)、アラキドン酸凝集で75～105%(43例)、リストセチン凝集で79～96%(39例)であった(表5、図5)。

表5. 基準範囲の結果(一覧)

	検体数(n=)	基準範囲(最大凝集率(%))
ADP	91	60～104
コラーゲン	83	82～103
エピネフリン	75	64～108
アラキドン酸	43	75～105
リストセチン	39	79～96

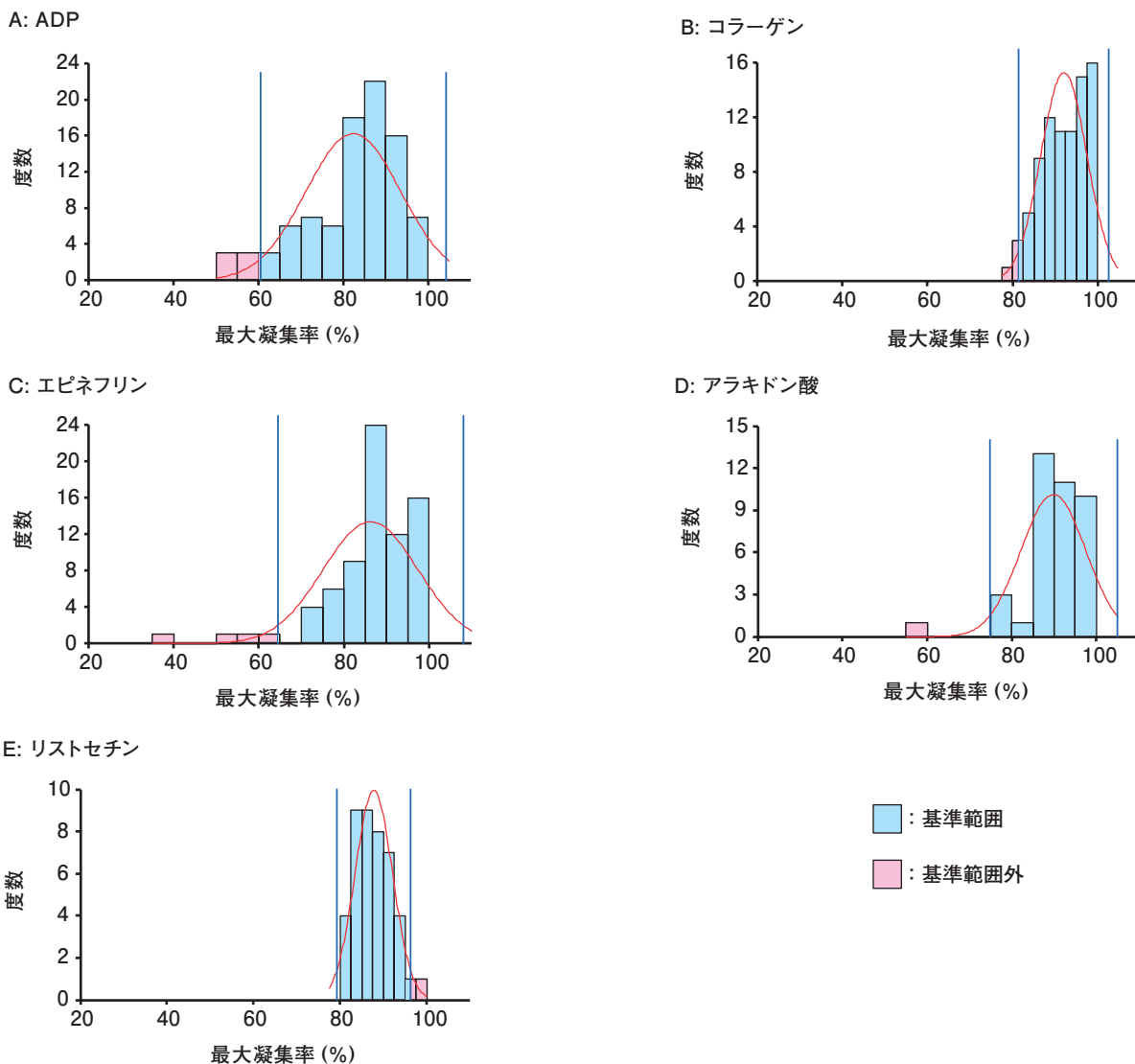


図5. 基準範囲の結果

考 察

ISTH より推奨されている試薬濃度における本法の同時再現性は正常試料で CV が 5% 以内、異常試料で 10% 以内であり、良好な結果であった (表 3)。また、オンボード安定性の結果では、10 時間まで安定であり、検査室における実運用においても問題がないと考えられる (表 4)。

基準範囲については、ADP 凝集およびエピネフリン凝集で他の 3 項目よりも範囲が広い傾向が観察された (図 5-A, C)。試薬濃度は異なるものの現在報告されている基準範囲の評価結果も同様に ADP 凝集およびエピネフリン凝集は基準範囲の幅が他の項目に比べて広いこと⁵⁾、原因が不明確なエピネフリン刺激に対する不応答者が日本人では 16% いるという報告もあることから、本結果においても同様の傾向が示されたと推察する。ISTH の推奨している試薬濃度で異常を示した場合に、別の濃度を用いて確認試験をするように推奨していることから、確認試験に移る基準として今回算出された基準範囲が参考になるのではないかと考える。

血小板凝集能測定の標準化に向けて

CS シリーズにおける血小板凝集能測定は既に本邦、海外において既存装置との評価が行われており、概ね良好な結果が報告されている⁷⁻¹¹⁾。

ISTH が血小板凝集能検査に関する推奨法を発行したことで、これまで施設間で統一されていなかった検体採取、PPP と PRP の調製方法および先天性出血性疾患の診断における試薬濃度については、標準化に向かうことが期待される。しかしながら、臨床での使用頻度が高い抗血小板薬の薬効の確認やモニタリング^{2, 3)}に関する試薬濃度やその方法については、国際的に標準化されていないのが実態である。本邦においては、複数の試薬濃度の結果を組み合わせることで、臨床医が簡単に抗血小板薬の薬効の確認やモニタリングの判断に使用するソフトウェアを搭載した装置も販売されており¹²⁾、臨床で使用されている¹³⁾。ただし、その方法論は上記装置のみ、さらに本邦のみで利用可能であり、文献的には欧米や

アジアいずれにおいても本邦を除いた他の国では抗血小板薬の薬効の確認やモニタリングの透過光法による血小板凝集能検査には、最大凝集率や凝集波形などの結果を用いて判断しているのが現状と考えられる²⁾。

抗血小板薬の薬効の確認やモニタリングについては、PRP や PPP を用いる透過光法以外にも全血を使用した様々な装置が販売されているが¹⁴⁾、装置ごとに異なる検出原理や異なる形式での結果算出・判断基準のため、標準化への課題は多い。

CS シリーズの血小板凝集能測定は、ルーチンの凝固検査と同じ装置で血小板凝集能の測定が可能であること、装置がグローバルに普及していることから、世界中で同じ装置・指標を用いた評価が可能となった。今後、薬効の確認やモニタリングの標準化に向けての一助になればと考えている。

まとめ

CS シリーズにおける血小板凝集能測定の同時再現性、オンボード安定性は良好であり、検体・試薬分注の自動化によって、従来の半自動測定装置の煩雑さを低減し、検査技師の省力化が期待できる新しい機能であることが考えられた。

(本稿は、日本臨床検査自動化学会 第 47 回大会 (2015 年 10 月, 横浜) および第 47 回日本臨床検査医学会学術集会 (2015 年 11 月, 岐阜) で発表した内容をまとめたものです^{15, 16)})

参考文献

- 1) Born GV. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal. *Nature* 1962; 194: 927-9
- 2) Cattaneo M et al. Results of a worldwide survey on the assessment of platelet function by light transmission aggregometry: a report from the Platelet Physiology Subcommittee of the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost.* 2009; 7: 1029
- 3) 佐藤金夫 他. アンケートに見る血小板凝集能検査測定法の現状 - 血小板凝集能検査の標準化に向けて. *日本検査血液学会雑誌*. 2008; 9(2); 167-177

- 4) Cattaneo M 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.* 11 : 1183-9
- 5) Hayward CP et al. An evaluation of methods for determining reference intervals for light transmission platelet aggregation tests on samples with normal or reduced platelet counts. *Thromb Haemost.* 2008 ; 100 (1) : 134-45
- 6) Kambayashi J et al. Prevalence of impaired responsiveness to epinephrine in platelets among Japanese. *Thromb Res.* 1996 ; 81 (1) : 85-90
- 7) Kobayashi K et al. The automation of routine light transmission platelet aggregation on Sysmex CS-2000i [abstract]. *J Thromb Haemost.* 2015 ; 13 (Suppl. 2) : 656
- 8) Lawrie A.S et al. The automation of routine light transmission platelet aggregation. *Int J Lab Hematol.* 2014 ; 36 (4) : 431-8
- 9) Patel I, Precision and throughput light transmission aggregometry on a routine coagulation analyzer. [abstract]. *Int J Lab Hematol.* 2015 ; 37 (Suppl. 2) : 46
- 10) Maruo R et al. Assessment of platelet light transmission aggregometry using the automated coagulation analyzer CS-2000i. [abstract]. APSTH. 2014, O-10.
- 11) 畑山一貴 他. CS2000iによる血小板凝集能の自動化測定 : 従来法との比較検討 (抄). *日本臨床検査自動化学会会誌 (第47回大会抄録集)*. 2015 ; 40 ; 411
- 12) 目黒嵩 他. Aggregation size (凝集面積)解析法を取り入れた新しい血小板凝集能検査の有用性. *機器・試薬*. 1993 ; 16 : 1307-1312
- 13) 榎本由貴子 他. 頸部頸動脈ステント留置術における術前血小板凝集能測定の有用性. *JNET.* 2008 ; 2 : 188-192
- 14) 丸尾理恵, 金子誠. 血小板凝集能検査. *検査と技術*. 2015 ; 43 (2).
- 15) 坂寄輔 他. 全自動血液凝固測定装置 CS シリーズと新規血小板凝集能試薬を用いた血小板凝集能測定の基礎的検討 (抄). *日本臨床検査自動化学会会誌*. 2015 ; 40 (4) : 410-410
- 16) 坂寄輔 他. CS シリーズを用いた国際血栓止血学会推奨の惹起物質濃度における血小板凝集能検査の基準範囲の評価 (抄). *臨床病理*. 2015 ; 63 (suppl) : 225-225

The Introduction and the Basic Evaluation of Light Transmission Platelet Aggregation Method on an Automated Coagulation Analyzer CS-Series.

Tasuku SAKAYORI^{*1}, Yuri WATANABE^{*1}, Kyoko NAKAJIMA^{*1}, Eri MISAWA^{*1},
Katsushi KOBAYASHI^{*2}, Hiroshi KURONO^{*1}, Nobuo ARAI^{*1}, Hidenari TAKAOKA^{*1}

*1 Sysmex Corporation R&D group Hemostasis Product Engineering, 4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe, 651-2271

*2 HYPHEN BioMed SAS

SUMMARY

Light transmission aggregometry LTA is known as a gold standard method of platelet aggregation. However, it has been mainly measured by dedicated semi-automated analyzers. The fully automated coagulation analyzer CS-series has recently been upgraded with new software to perform platelet aggregation, and this software permits to bring more accurate results of platelet aggregation.

In this report, we have evaluated performance of platelet aggregation tests on the CS-series with new software; aggregation imprecision, on-board stability of the reagents and reference intervals using the following agonists: Revohem ADP (2 μ M), Revohem Collagen (2 μ g/mL), Revohem Epinephrine (5 μ M), Revohem Arachidonic acid (1 mM) and Revohem Ristocetin (1.2 mg/mL). Platelet agonists were adjusted according to the recommendations of SSC/ISTH.

Aggregation imprecision for maximal aggregation (%) was CV 5% or less in normal samples and CV 10% or less in abnormal samples. On-board stability of the reagents was until 10 hours on a CS analyzer. Lower limit of the reference intervals for each agonist was 60% or more.

CS-series with new software achieve alone in both automated platelet aggregation and coagulation tests capacities, and this instrument have already been installed in clinical laboratories in different countries. We feel that platelet aggregation tests on this routine coagulation analyzer potentially contribute to generate results of highly standardized platelet function test.

Key Words Platelet Aggregation, LTA (Light Transmission Aggregometry), CS-series, Revohem
