

CSシリーズに搭載された抗血小板薬の効果確認の研究用指標 PAL の基礎評価と既存装置に搭載されている指標との比較検討

定方 智美^{*1}, 坂寄 輔^{*2}, 渡邊 ゆり^{*2}, 兒玉 るみ^{*1},
足立 絵里加^{*1}, 石原 智子^{*1}, 矢田 恵梨香^{*1}, 三島 清司^{*1}, 長井 篤^{*1}

*1 島根大学医学部附属病院 検査部：島根県出雲市塩冶町 89-1 (〒 693-8501)

*2 シスメックス株式会社 第一エンジニアリング本部

要 旨

透過光法による血小板凝集能検査は先天性出血性疾患の診断や抗血小板薬の効果確認に使用されている。抗血小板薬の効果確認については既存の血小板凝集能測定装置には様々な指標が搭載されているが、全自動で測定可能な CS シリーズにはこのような指標が搭載されていなかった。

本稿では CS シリーズでの血小板凝集能検査の基礎評価に加え、新たに搭載された抗血小板薬の研究用の効果確認指標である PAL (Platelet Aggregation Level) について、既存装置に搭載されている指標 (既存 2 濃度法) との比較検討を行ったので報告する。

同時再現性の結果は ADP とコラーゲンの血小板凝集惹起物質による最大凝集率, PAL とともに CV が 7.0% 以内であった。オンボード安定性は ADP とコラーゲンで最大凝集率, PAL とともに 10 時間まで安定であった。PAL と既存 2 濃度法の相関性は ADP で $y=0.88x+1.16$, $r=0.90$, コラーゲンで $y=0.95x+0.17$, $r=0.89$ であった。PAL と既存 2 濃度法を 3 分類した際の一致率は ADP で 84.1%, コラーゲンで 82.2% であった。

CS シリーズで新たに搭載された PAL は良好な基礎性能を有していた。また、既存の指標である既存 2 濃度法と相関性を示すことが確認できた。CS シリーズはルーチン項目と同じ装置で血小板凝集を測定できることから血小板凝集能検査の普及に寄与できるのではないかと期待される。

キーワード 血小板凝集, 透過度法, 抗血小板薬, Platelet Aggregation Level (PAL)

はじめに

透過光法 (Light Transmission Aggregometry; 以下, LTA 法) を使用した血小板凝集能検査は、古くから血小板無力症や von Willebrand 病などの先天性疾患の鑑別に使用されている。また、脳梗塞や心筋梗塞の治療薬として使用されているアスピリンやクロピドグレル、シロスタゾールなどの抗血小板薬投与の適応、治療効果のモニタリングを目的として使用されている¹⁾。抗血小板薬のなかでも ADP 受容体拮抗薬

のクロピドグレルは抑制効果が強い患者群と弱い患者群が存在し、反応性の違いによって臨床経過に影響することが報告されている²⁾。そのためモニタリングによって患者に応じた薬剤・投与量の決定が重要であり、薬効確認の目的で検査がオーダーされるケースが多い³⁾。

本院で使用している既存の血小板凝集能測定装置 (A 社) は、血小板凝集惹起物質として ADP とコラーゲンを使用する。「薬効判定モード」では、各々 2 濃

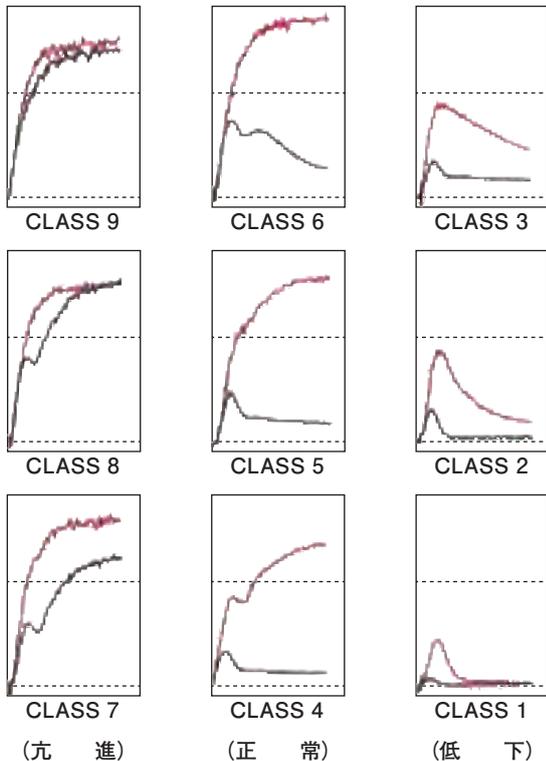
度の凝集パターンから測定結果を濃度解析法（以下、既存2濃度法）により9クラスに分類し、抗血小板薬の投与量を「軽度」、「適度」、「過度」領域と判定する（図1）。国内で最もシェアの高い装置シリーズである³⁾。血小板凝集能検査での主流な報告形式は最大凝集率であるが、先天性疾患の鑑別とは異なり、薬効確認においては微妙な変動から効果の有無を判定しなければならない。既存2濃度法のように高・低の2濃度試薬で測定した場合、それぞれの濃度での変動を反映して結果が算出されるため、より細かく凝集率の変化を捉えることが可能である。しかしながら、既存の血小板凝集能測定装置は血小板凝集能検査の専用測定機器であるため、測定は限られた施設でしか行うことができない。また、測定には多血小板血漿（Platelet Rich Plasma；以下、PRP）と乏血小板血漿（Platelet Poor Plasma；以下、PPP）の試料作製や惹起物質の調製、試料と惹起物質の用手分注が

必要など自動化されていないため、測定に時間を要するものであった。

2015年に汎用機器である全自動血液凝固測定装置CS-2400、CS-2500、CS-5100（以下、CSシリーズ（本稿では前述の3機種をCSシリーズと表現する）；シスメックス）において、LTA法を用いた血小板凝集能の測定が可能となった⁴⁾。CSシリーズでは試料（PPP、PRP）および惹起物質の分注が自動化されており、薬効確認における指標が確立されれば薬効検査の効率化、また標準化につながる。しかしながら、CSシリーズにはA社の血小板凝集能測定装置に備わっている既存2濃度法のような薬効確認に対する指標は搭載されていなかった。そこで、CSシリーズでの血小板凝集能検査の基礎的検討に加え、新規解析法であるPlatelet Aggregation Level（以下、PAL）⁵⁾が薬効評価に有用な指標となり得るかどうかを検討するため、既存2濃度法との比較評価を行ったので報告する。

正常パターン設定

** ADP標準クラス分類 **



薬効パターン設定

** COLLAGEN薬効クラス分類 **

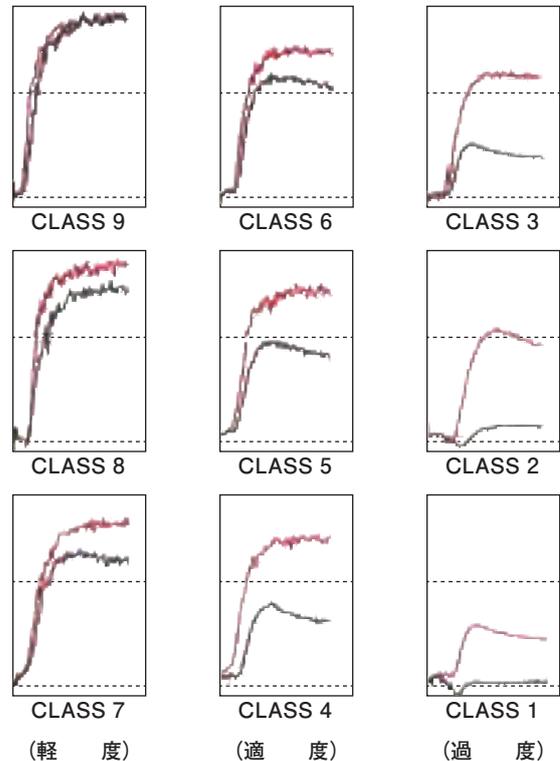


図1. クラス分類（A社の血小板凝集能測定装置）

対象・装置・試薬・評価項目

1. 対象

当院にて抗血小板薬療法の効果確認を目的として血小板凝集能のオーダーがあった63検体と、シスメックス株式会で得られた健常人ボランティア採血の4検体を対象として測定を行った。試料は3.2%クエン酸ナトリウム加採血管を用いて採血し、200g×10分間または100g×10分間、遠心した後の上清の一部を回収してPRPとし、残りの血液を1,500g×15分間または2,000g×10分間遠心した後に上清を回収したものをPPPとした。なお、本研究は鳥根大学倫理審査委員会（通知番号2217）とシスメックス株式会社倫理審査委員会（承認番号2016-09）の承認を受けて行った。

PRPの凝集活性を低下させた添加試料を調製するため、ADPの添加剤としてP2Y₁₂阻害薬であるカングレロールを終濃度が0.05μMとなるように、またコラーゲンの添加剤としてCOX-1阻害薬であるアスピリンを終濃度が1.0μMとなるようにPRPの5%の容量を添加した。また、抗血小板薬を添加しない健常人ボランティアのPRPを未添加試料とした。

2. 測定装置

血小板凝集能の測定機器は検討法に全自動血液凝固測定装置CS-2100i（以下、CS；シスメックス）を用い、対照法としてA社の血小板凝集能測定装置を用いた。

3. 測定試薬

試薬（惹起物質）はADPとコラーゲンを用いて測定した。検討法にはレボヘムADPおよびレボヘムコラーゲン（ともにシスメックス）を用い、試料添加後の終濃度がADPは1μMと10μM、コラーゲンは1μg/mLと5μg/mLとなるように調製した。対照法にはA社の装置で使用するADPおよびコラーゲンを用い、それぞれ終濃度がADP1μMと10μM、コラーゲン2μg/mLと5μg/mLとなるように調製した。

4. Platelet Aggregation Level (PAL)

PALはADPとコラーゲンのそれぞれ2濃度の凝集波形の大きさを反映するよう数値化され、100段階で表示される。

ADPで測定された結果はADP induced PAL（以下、APAL）として、コラーゲンで測定された結果はCollagen induced PAL（以下、CPAL）として報告される。

対照法である既存2濃度法の値は装置上の画面では1から9の9段階の結果表示であるが、装置からCSVデータを出力し、小数点以下1桁までの結果を抽出した。

方法

1. 同時再現性

未添加および添加試料をそれぞれ5回連続測定し、最大凝集率（%）・APAL・CPALの変動係数（CV%）を求めた。

2. オンボード安定性

測定の10、8、4時間前に調製した試薬（試薬10h、8h、4h）を順次CSの試薬テーブルに設置していき、測定直前に調製した試薬（試薬0h）と同時に未添加および添加試料をそれぞれ2回測定した。最大凝集率（%）・APAL・CPALについて試薬10h、8h、4hと試薬0hの結果を比較し、その差を求めた。

3. 相関性

抗血小板薬療法の効果確認を目的として血小板凝集能のオーダーがあった検体をA社の血小板凝集能測定装置で測定した後にCSで測定し、PALと既存2濃度法の相関性を求めた。

4. 一致率

PALは0.0～2.9を「低」、3.0～6.9を「中」、7.0～10.0を「高」に、既存2濃度法は1.0～3.9を「低」、4.0～6.9を「中」、7.0～9.9を「高」と分類し、一致率を求めた。

結果

1. 同時再現性

ADP 測定 of CV は、未添加試料 1 μ M の最大凝集率で 4.8% (Mean \pm SD : 82.9 \pm 4.0), 10 μ M の最大凝集率で 2.9% (Mean \pm SD : 91.2 \pm 2.6), APAL で 0.0% (Mean \pm SD : 10.0 \pm 0.0) であった。対して添加試料では 1 μ M の最大凝集率で 4.8% (Mean \pm SD : 29.6 \pm 1.4), 10 μ M の最大凝集率で 5.9% (Mean \pm SD : 77.8 \pm 4.6), APAL で 3.8% (Mean \pm

SD : 7.6 \pm 0.3) であった (表 1 A)。

コラーゲン測定 of CV は未添加試料で 1 μ g/mL の最大凝集率で 3.2% (Mean \pm SD : 90.4 \pm 2.9), 5 μ g/mL の最大凝集率で 1.6% (Mean \pm SD : 92.1 \pm 1.5), CPAL で 0.5% (Mean \pm SD : 10.0 \pm 0.1) であった。対して添加試料では 1 μ g/mL の最大凝集率で 7.0% (Mean \pm SD : 30.6 \pm 2.1), 5 μ g/mL の最大凝集率で 2.1% (Mean \pm SD : 78.5 \pm 1.6), CPAL で 3.8% (Mean \pm SD : 5.4 \pm 0.2) であった (表 1 B)。

表 1. 同時再現性

A. ADP

測定回数	最大凝集率% (1 μ M)		最大凝集率% (10 μ M)		APAL	
	未添加試料	添加試料	未添加試料	添加試料	未添加試料	添加試料
1	79.3	29.3	95.0	83.0	10.0	7.8
2	85.2	31.5	92.8	78.0	10.0	7.6
3	79.0	30.6	89.0	75.2	10.0	7.5
4	82.5	28.5	90.6	81.3	10.0	7.9
5	88.3	28.2	88.8	71.5	10.0	7.2
Mean	82.9	29.6	91.2	77.8	10.0	7.6
SD	4.0	1.4	2.6	4.6	0.0	0.3
CV	4.8%	4.8%	2.9%	5.9%	0.0%	3.8%

B. コラーゲン

測定回数	最大凝集率% (1 μ g/mL)		最大凝集率% (5 μ g/mL)		CPAL	
	未添加試料	添加試料	未添加試料	添加試料	未添加試料	添加試料
1	90.5	29.8	94.4	78.0	10.0	5.4
2	90.2	31.1	91.3	78.2	9.9	5.4
3	86.9	30.7	90.6	76.1	10.0	5.2
4	89.6	27.7	92.5	80.5	10.0	5.4
5	94.9	33.6	91.5	79.4	10.0	5.8
Mean	90.4	30.6	92.1	78.5	10.0	5.4
SD	2.9	2.1	1.5	1.6	0.1	0.2
CV	3.2%	7.0%	1.6%	2.1%	0.5%	3.8%

2. オンボード安定性

0時間の測定と比較した時の最大凝集率の差はADP1 μ Mで10.9%以下, ADP10 μ Mで4.7%以下,

コラーゲン1 μ g/mLで8.3%以下, コラーゲン5 μ g/mLで5.9%以下であった. PALの差はAPALで0.2以下, CPALで0.5以下であった(表2, 図2).

表2. オンボード安定性

A. ADP

最大凝集率% (1 μ M)	未添加試料				添加試料			
	0時間	4時間	8時間	10時間	0時間	4時間	8時間	10時間
1	93.3	94.7	91.0	83.5	23.8	24.2	24.0	23.0
2	95.9	91.1	89.5	84.0	22.7	23.3	23.7	22.3
Mean	94.6	92.9	90.3	83.8	23.3	23.8	23.9	22.7
差 (0時間 - n時間)		1.7	4.3	10.9		-0.5	-0.6	0.6

最大凝集率% (10 μ M)	未添加試料				添加試料			
	0時間	4時間	8時間	10時間	0時間	4時間	8時間	10時間
1	90.6	89.5	95.2	92.3	72.1	65.4	71.4	65.2
2	91.9	88.5	90.9	84.5	70.3	67.9	68.3	67.7
Mean	91.3	89.0	93.1	88.4	71.2	66.7	69.9	66.5
差 (0時間 - n時間)		2.3	-1.8	2.8		4.5	1.3	4.7

APAL	未添加試料				添加試料			
	0時間	4時間	8時間	10時間	0時間	4時間	8時間	10時間
1	10.0	10.0	10.0	10.0	6.4	6.0	6.6	6.0
2	10.0	10.0	10.0	10.0	6.1	6.5	6.1	6.1
Mean	10.0	10.0	10.0	10.0	6.2	6.2	6.4	6.0
差 (0時間 - n時間)		0.0	0.0	0.0		0.0	-0.1	0.2

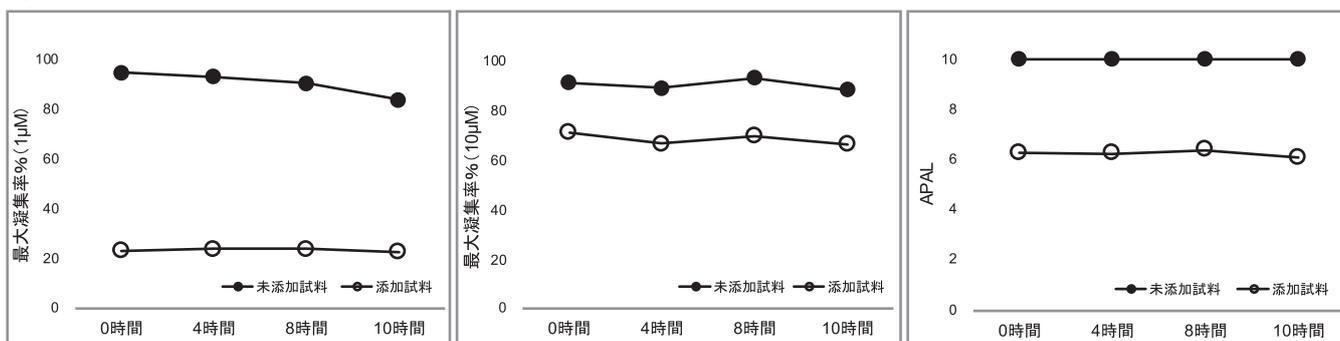
B. コラーゲン

最大凝集率% (1 μ g/mL)	未添加試料				添加試料			
	0時間	4時間	8時間	10時間	0時間	4時間	8時間	10時間
1	85.9	86.2	85.2	80.7	25.7	21.7	22.8	16.4
2	86.5	83.6	82.0	82.5	25.6	22.8	23.2	18.4
Mean	86.2	84.9	83.6	81.6	25.7	22.3	23.0	17.4
差 (0時間 - n時間)		1.3	2.6	4.6		3.4	2.7	8.3

最大凝集率% (5 μ g/mL)	未添加試料				添加試料			
	0時間	4時間	8時間	10時間	0時間	4時間	8時間	10時間
1	87.7	85.8	88.1	85.7	79.2	70.5	75.7	70.6
2	84.6	90.8	85.5	84.6	76.1	73.1	77.3	75.0
Mean	86.2	88.3	86.8	85.2	77.7	71.8	76.5	72.8
差 (0時間 - n時間)		-2.1	-0.6	1.0		5.9	1.2	4.9

CPAL	未添加試料				添加試料			
	0時間	4時間	8時間	10時間	0時間	4時間	8時間	10時間
1	9.8	9.2	9.4	9.0	4.1	3.8	4.1	3.7
2	9.4	9.5	9.2	9.1	4.4	3.9	4.1	3.8
Mean	9.6	9.3	9.3	9.1	4.3	3.8	4.1	3.8
差 (0時間 - n時間)		0.3	0.3	0.5		0.4	0.2	0.5

A. ADP



B. コラーゲン

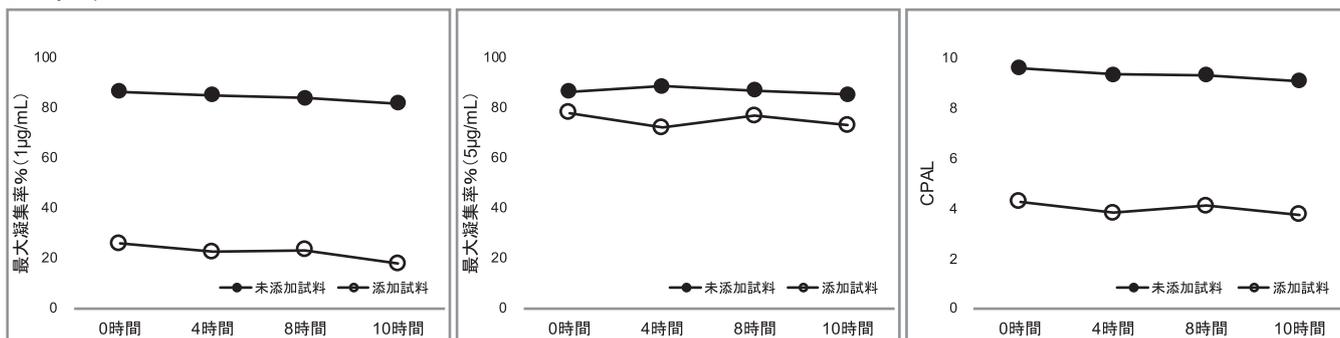


図2. オンボード安定性

3. 相関性

ADP測定でCSとA社の血小板凝集能測定装置の最大凝集率の相関は1 µMで $y=1.20x-6.01$, $r=0.80$ (n=63), 10 µMで $y=0.83x+13.73$, $r=0.78$ (n=63)であった。APALと既存2濃度法の相関は $y=0.88x+1.16$, $r=0.90$ (n=63)であった(図3A)。

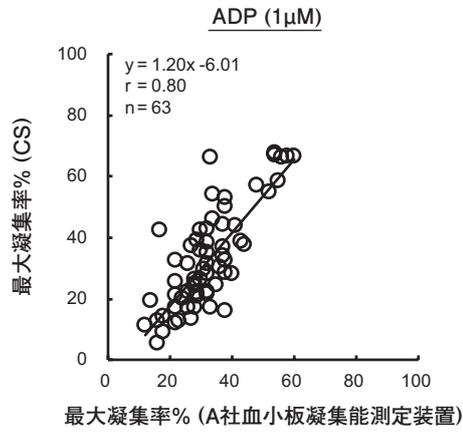
コラーゲン測定でCSとA社の血小板凝集能測定装置の最大凝集率の相関は低濃度(CS: 1 µg/mL, A社

の血小板凝集能測定装置: 2 µg/mL)で $y=0.86x+7.64$, $r=0.90$ (n=45), 5 µg/mLで $y=0.60x+35.75$, $r=0.75$ (n=45)であった。CPALと既存2濃度法の相関は $y=0.95x+0.17$, $r=0.89$ (n=45)であった(図3B)。

4. 一致率

PALと既存2濃度法の一一致率はADPで84.1%(図4A), コラーゲンで82.2%であった(図4B)。

A. ADP



B. コラーゲン

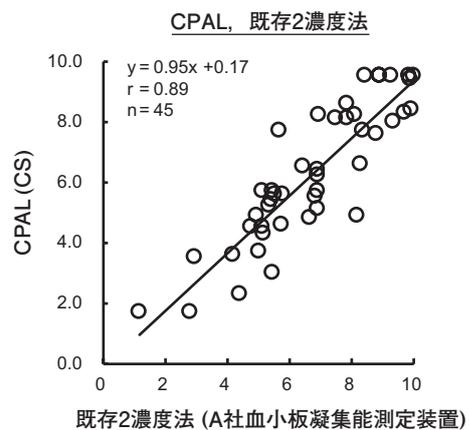
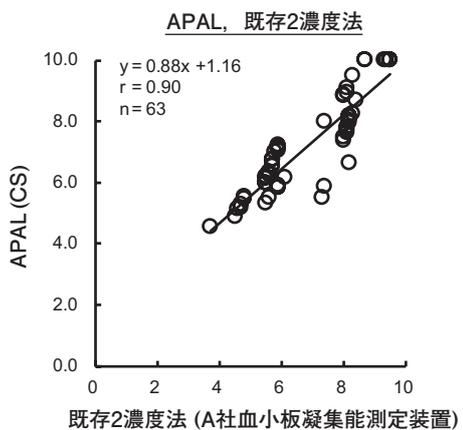
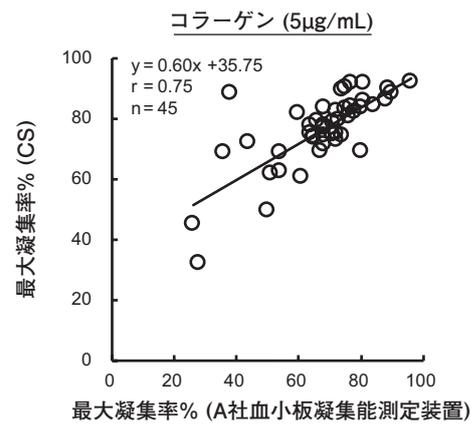
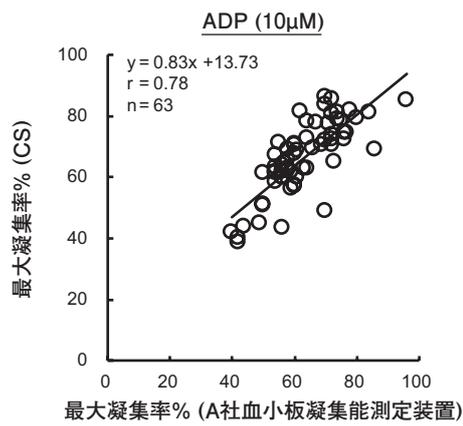
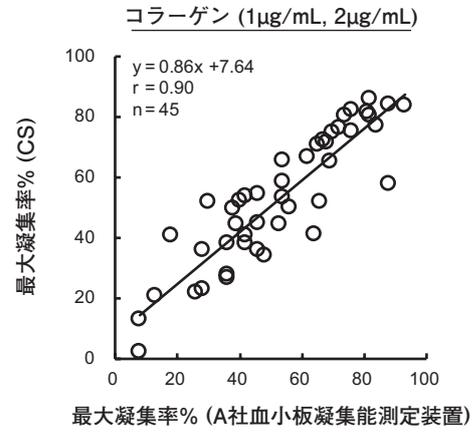


図3. 相関性

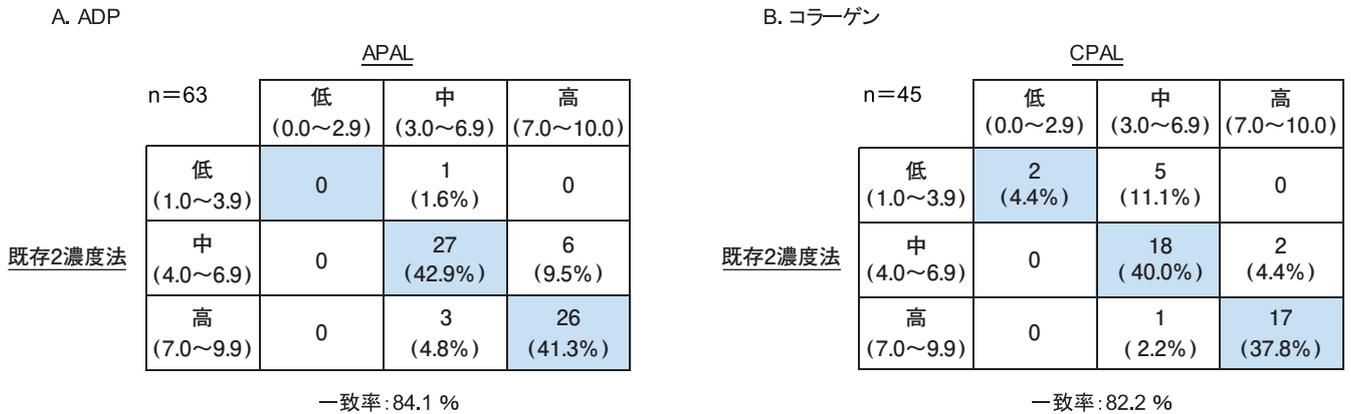


図4. 一致率

考 察

今回 CS と A 社の血小板凝集能測定装置で同時に血小板凝集能の測定を行い、CS の基礎的性能評価と新規解析法である PAL の検討を行った。

CS の同時再現性の結果は良好であった。オンボードでの惹起物質の安定性は時間の経過に伴い活性も少しずつ低下していたが、1 日の検査開始から終了までを 8 時間と仮定した場合は調整直後からの差は最大でも 5% 以内であった。以上のことから血小板凝集能の日常臨床検査として十分な基本性能を有していると考えられた。

惹起物質の濃度については、コラーゲン低濃度域は CS で 1 $\mu\text{g/mL}$ 、A 社の血小板凝集能測定装置で 2 $\mu\text{g/mL}$ を使用している。過去の最大凝集率の評価結果からも、CS の方がやや高い傾向があるため⁶⁾、2 濃度の結果から算出される CPAL と既存 2 濃度法で一致率が高くなるように調整を行っている。血小板は惹起物質や機械的刺激などの様々な刺激により活性化されることが知られており¹⁾、試薬の組成やキュベットの形状、またスターラーの形状・回転速度などの違いによる凝集への影響が低濃度では特に大きいのではないかと考えられる。そのような特性を踏まえた濃度設定によって同等の値を得られるこ

とが、図 3 の最大凝集率と CPAL、既存 2 濃度法の相関結果で確認された。

PAL と既存 2 濃度法の一一致率については、APAL では 84.1%、CPAL では 82.2% であった。薬効判定は 3 分類（低・中・高）した中で既存 2 濃度法と比較して 1 段階高い評価になる検体を APAL で 7 件・CPAL で 7 件、1 段階低い評価になる検体を APAL で 3 件・CPAL で 1 件認めたが、概ね同等の結果が得られた。一方、他施設での同様の評価結果は CPAL の方が既存 2 濃度法よりも低い傾向であったことから⁷⁾、装置間差または試薬のロット間差がある可能性も考えられた。

CS で新たに開発された指標である PAL はこれまで多くの施設で使用されてきた A 社の血小板凝集能測定装置に搭載されている既存 2 濃度法との相関性が認められた。近年、抗血小板薬低反応性、即ち抗血小板薬を使用しているにも関わらず血栓ができ、血小板機能が抑制されない患者は生命予後が不良であるといった報告がある⁸⁾。このことから血小板凝集能検査できめ細かい治療効果のモニタリングを行い、抗血小板薬の適切な種類・量を投与することが大変有用であることが示唆される。CS シリーズは既に多くの施設で凝固線溶系ルーチン項目の測定装置とし

て使用されていること、検体および惹起物質の分注が自動化され測定の手間が軽減が図れることより、血小板凝集能検査の普及に貢献でき、標準化も行いやすいと考えられる。新たに搭載された研究用新規解析指標の臨床有用性のさらなるエビデンスが集積されることにより、検査値の変化と病態の関連性を容易に検出できる可能性があり、発症抑制や生命予後の改善に寄与できるのではないかと期待される。

(この評価は開発段階の評価であり、CS-2100iにおいて得られた結果のPALが算出されているが、PALを自動算出する機能はCS-2000i / 2100iには搭載されない)

参考文献

- 1) 丸尾理恵, 金子誠. 血小板凝集能検査. 検査と技術. 2015; 43(2): 110-116
- 2) 掃本誠治, 小川久雄. 抗血小板療法に対する日本人の反応性. 心臓. 2012; 44(2): 114-122
- 3) 一般社団法人 日本血栓止血学会 血小板部会, 血小板凝集能検査実施状況のアンケート調査結果, <http://www.jsth.org/com/c1/c1-4/> (参照 2018-1-15)
- 4) 坂寄 輔 他. 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. Sysmex Journal Web. 2016; 17(1): 1-12
- 5) 坂寄 輔 他. 全自動血液凝固解析装置に搭載する抗血小板薬の効果確認指標の開発 Sysmex Journal Web. 2018; 17(1): 1-12
- 6) 佐藤金夫 他. 透過光法を測定原理とした血小板凝集能装置の比較評価. 日本検査血液学会雑誌. 2018; 19(2): 153-162
- 7) 大森由佳里 他. 全自動血液凝固測定装置 (CS シリーズ) の新規解析法を用いた抗血小板薬の効果確認指標に対する有用性検討. 第 64 回日本臨床検査医学会学術集会. 2017; 64 (suppl): 143
- 8) Matetzky et al. Clopidogrel Resistance Is Associated With Increased Risk of Recurrent Atherothrombotic Events in Patients With Acute Myocardial Infarction. Circulation. 2004; 109(25): 3171-3175

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

Tomomi SADAKATA^{*1}, Tasuku SAKAYORI^{*2}, Yuri WATANABE^{*2}, Rumi KODAMA^{*1}, Erika ADACHI^{*1}, Tomoko ISHIHARA^{*1}, Erika YATA^{*1}, Seiji MISHIMA^{*1} and Atsushi NAGAI^{*1}

*1 Central of Clinical Laboratory, Shimane University Hospital, 89-1 Enya-cho Izumo, 693-8501

*2 Engineering 1, Sysmex corporation

SUMMARY

Light transmission aggregometry (LTA) has been used for the diagnosis of congenital bleeding disorders and confirmation of the pharmaceutical benefits of antiplatelet drugs. Although the existing semi-dedicated analyzer includes a parameter which is obtained by the measurements using multiple concentrations of antagonists (current 2 conc. method) to confirm the effect of antiplatelet drugs, the fully automated coagulation CS-series analyzers, which can measure platelet aggregation, does not include such parameter. In this report, we evaluated the basic performance, and conducted a comparison study of, current 2 conc. method and a new scoring parameter named PAL (Platelet Aggregation Level) for the CS-series. Reproducibility results were within 7% CV of both the maximum aggregation rate of ADP and collagen, and the new scoring parameter of APAL and CPAL. On-board stability of both APAL and CPAL was 10 hours.

In the comparison study, the regression equation and correlation coefficient of APAL and current 2 conc. method were $y=0.88x+1.16$, $r=0.90$. Those of APAL and current 2 conc. method were $y=0.95x+0.17$, $r=0.89$. The concordance rates when classifying each result into 3 classes were 84.1% (APAL vs current 2 conc. method) and 82.2% (CPAL vs current 2 conc. method), respectively.

PAL newly installed in the CS-series showed good basic performance. Furthermore, performance equivalent to the existing parameter current 2 conc. method was revealed. The CS-series can perform routine coagulation and platelet aggregation tests with a single analyzer, thus contributing to spread platelet aggregation testing widely.

Key Words Platelet Aggregation, Light Transmission Aggregometry, Antiplatelet Drug, Platelet Aggregation Level (PAL)
