

全自動血液凝固測定装置 CS-5100 に搭載された新規解析法のグレーディングカーブに対する有用性検討と検査ワークフローへの効果検証

樋口 正一^{*1}, 大橋 恵子^{*1}, 中村 岬^{*1}, 高橋 裕^{*1},
 小黒 徳也^{*1}, 北野 圭介^{*2}, 坂寄 輔^{*2}, 水沢 直人^{*1}, 阿部 博史^{*3}

*1 医療法人 立川メディカルセンター 立川総合病院 臨床検査科：新潟県長岡市旭岡 1 丁目 24 番地（〒 940-8621）

*2 シスメックス株式会社 第一エンジニアリング本部

*3 医療法人 立川メディカルセンター 立川総合病院 脳神経外科

要 旨

当院では抗血小板薬の薬効評価を目的として、血小板凝集能検査半自動装置に搭載されている 4 濃度法の解析指標として Grade Type（以下、G-Type）を使用している。このたび全自動血液凝固測定装置 CS-5100（シスメックス；以下、CS-5100）に血小板凝集能検査の研究用の新規解析指標である Platelet Aggregation Level（以下、PAL）が搭載された。そこで CS-5100 の ADP 試薬による ADP induced PAL（以下、APAL）とコラーゲン試薬による Collagen induced PAL（以下、CPAL）に対して、各試薬による G-Type を比較することにより相関性検討を行った。また、CS-5100 で試薬と検体の分注が自動であることによる検査ワークフローへの効果検証を行った。相関性検討の結果、APAL との相関係数は $r=0.78$ となり、CPAL との相関係数は $r=0.88$ となった。また CS-5100 を使用することにより実質作業時間が 1 検体測定時に 3 分以上、3 検体連続測定時に 12 分以上短縮された。凝固検査の汎用装置である CS-5100 に PAL が搭載されたことで、PAL の臨床有用性、臨床実用のエビデンスが集積されれば、さらなる血小板凝集能検査の広がりや検査ワークフローの改善が期待される。

キーワード 血小板凝集, 抗血小板薬, PAL (Platelet Aggregation Level), G-Type (Grade Type)

はじめに

血小板の機能を抑制する抗血小板薬療法は虚血性脳血管障害、虚血性心疾患などの疾患や、経皮的冠動脈形成術などの術後の血栓・塞栓形成の抑制のために使用される。P2Y₁₂ 阻害薬、シクロオキシゲナーゼ（COX-1）阻害薬、ホスホジエステラーゼ（PDE3）阻害薬などが抗血小板薬として知られており、それぞれが異なる機序により血小板に作用する¹⁾。また、抗血小板薬を服用しているにも関わらず、個体差によって十分な抑制効果が得られない患者も存在することが知られている²⁾。そのことから、血小板凝集能検査は先天性出血性疾患の診断や血栓傾向の確認

だけでなく、抗血小板薬の薬効確認に使用する施設も多い³⁾。

抗血小板薬の薬効確認では、薬剤ごとに適切な凝集惹起物質（試薬）を選択する必要がある。また、複数濃度の試薬を使用する場合も多く、複数の結果から総合的に判断しなければならない。そこで結果の判断をサポートするために、4 つの試薬濃度の測定結果から得られる、血小板の凝集に対する感受性の指標が開発された（4 濃度法）⁴⁾。まず横軸に試薬濃度、縦軸に試薬添加から 5 分後の凝集率をプロットし、各点を直線で結んだ折れ線グラフをグレーディングカーブと呼ぶ。次にグレーディングカーブと不可逆的凝集が生じたと判断できる凝集率の交点

から、グレーディングカーブ上のポイントを算出する。グラフ中の-2～3に分割された6つのエリアに対して、そのポイントが存在するエリアから血小板の凝集に対する感受性を判定する（グレードタイプ（Grade Type：以下、G-Type））（図1）。G-Typeは-2～3の6段階で表され、G-Type -2は過剰の抑制を示し、G-Type 3は強度の亢進を表す⁵⁾。

これまでの血小板凝集能検査は専用機でのみ測定が可能であったが、2015年から全自動血液凝固測定装置CS-5100（シスメックス；以下、CS-5100）において血小板凝集能の測定が可能となり、これまで血

小板凝集能測定できなかった施設でも測定が可能となっている⁶⁾。さらに、2濃度の試薬濃度の測定結果から得られる研究用の新規解析指標としてPlatelet Aggregation Level（以下、PAL）が開発された⁷⁾。PALは得られた2つの凝集波形全体を統合し、解析することによって算出される指標であり、0.0～10.0の100段階で表される（図2）。

そこで今回、筆者らは新たに開発されたPALとG-Typeを比較することにより、PALの相関性検討を行った。さらに、CS-5100において試料作製以降が自動になったことによる作業工数への影響を調査した。

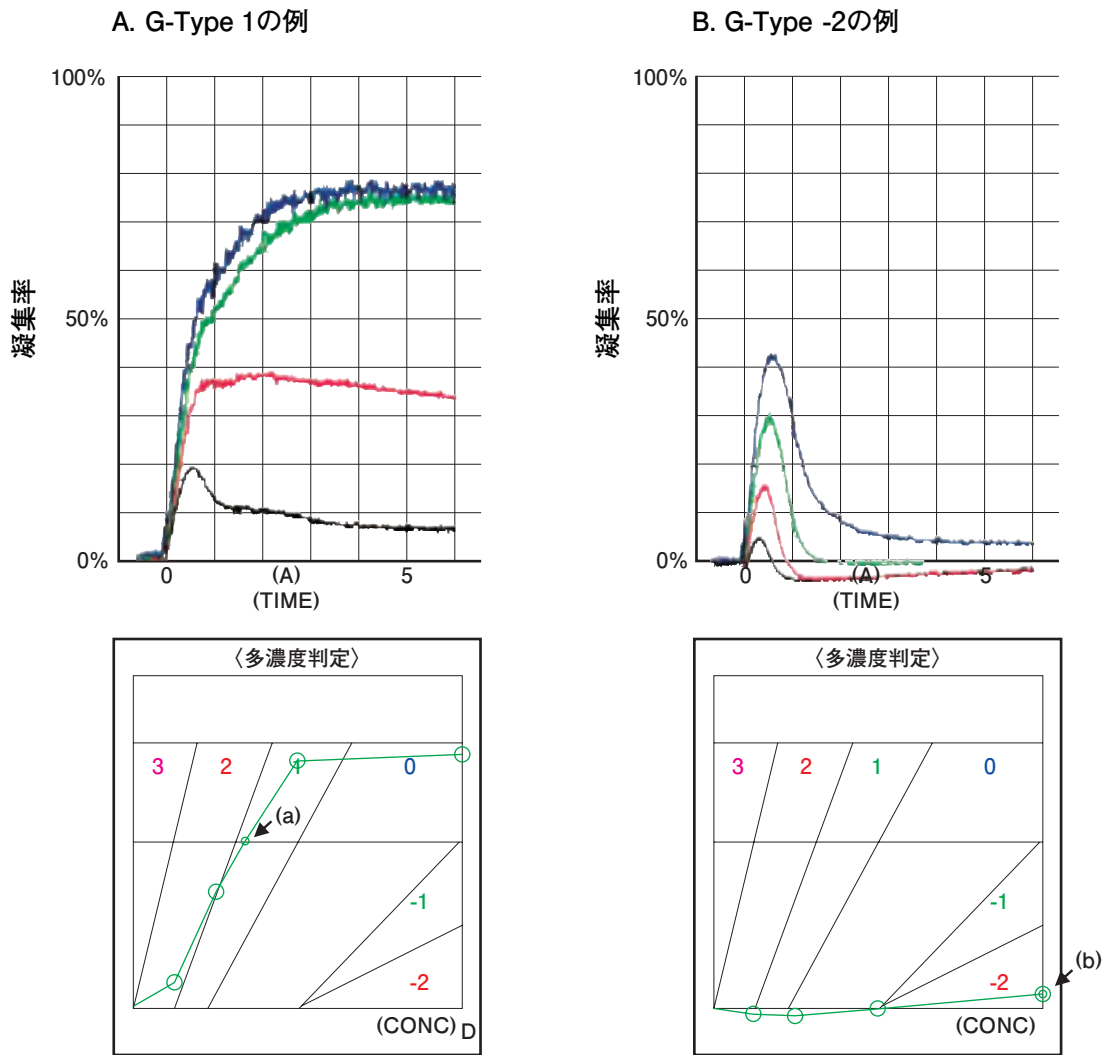


図1. 4濃度法による凝集波形とグレーディングカーブの例

上段：凝集波形，下段：グレーディングカーブ。グレーディングカーブと不可逆的な凝集が生じたと判断できる凝集率との交点(a)，もしくは縦軸との交点(b)が存在するエリアによってG-Typeを決定する。

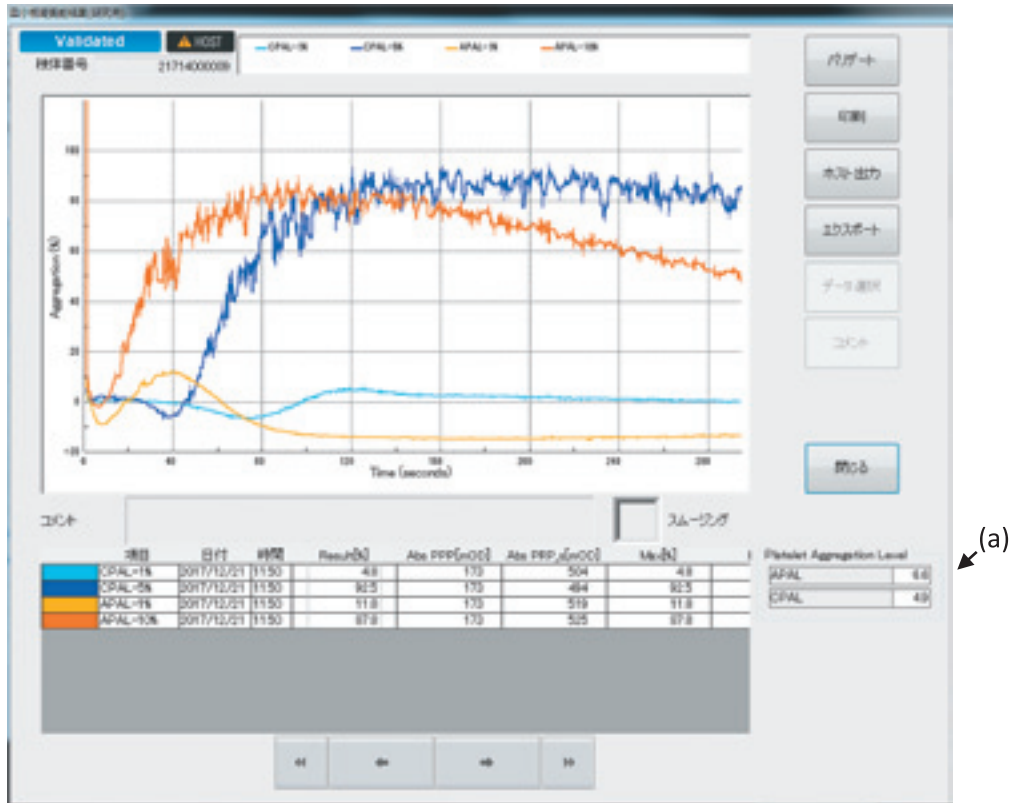


図2. CS-5100の血小板凝集能結果画面例

ADP2濃度(橙系グラフ)とコラーゲン2濃度(青系グラフ)の測定結果画面例。PALは画面右下(a)に表示される。

方法

1. 対象と試料

当院にて、抗血小板薬の効果の確認を目的として血小板凝集能の測定オーダーがあった69検体を対象とした。3.2%クエン酸ナトリウム加採血管を使用して採血し、430gで7分間遠心した際の上清を分取して多血小板血漿(Platelet Rich Plasma: PRP)とした。さらに、残りの血液を2,330gで8分間遠心した際の

上清を分取して乏血小板血漿(Platelet Poor Plasma: PPP)とした。なお、本研究は医療法人立川メディカルセンター倫理委員会の承認を受けて行った。

2. 使用装置

本研究の評価法の装置としてCS-5100を使用し、対照法の装置として既存の血小板凝集能測定装置(A社)を使用した。

3. 使用試薬

評価法の試薬としてレボヘム ADP, レボヘム コラーゲン (ともにシスメックス), 対照法の試薬として A 社の ADP およびコラーゲンを使用した. 試薬終濃度は評価法で ADP が $1,10 \mu\text{M}$, コラーゲンが $1, 5 \mu\text{g/mL}$ となるように調製した. また対照法で ADP が $1, 2, 4, 8 \mu\text{M}$, コラーゲンが $0.25, 0.5, 1, 2 \mu\text{g/mL}$ となるように調製した (表 1).

4. 相関性データの解析方法

1) 測定全領域 (G-Type : -2 ~ 3) における PAL と G-Type の相関性

CS-5100 において ADP, コラーゲン各 2 濃度の測定結果より総合的に算出される ADP induced PAL (以下, APAL) および Collagen induced PAL (以下, CPAL) と, 血小板凝集能測定装置 (A 社) において ADP, コラーゲン各 4 濃度の測定結果より血小

板の凝集に対する感受性を分類表現する G-Type を解析対象とした. 以上の各装置の結果 APAL, CPAL : $0.0 \sim 10.0$ と G-Type : -2 ~ 3 の相関係数を算出した.

2) 経験上, 出血が懸念される領域と周辺 (G-Type が -2 ~ -1) における PAL と細分化した G-Type の相関性と判定一致率

当院の臨床医の経験上, G-Type -2 をさらに目視で 10 段階に細分化した際に, -2.4 以下の場合には出血リスクがあると考えている. そのため G-Type -1 ~ 3 の場合はそのままの数値を検査システム経由で臨床側へ返し, G-Type -2 の場合は臨床側で G-Type を目視で 10 段階に細分化できるように, 印刷物を臨床へ返す運用をしている. そのため本研究では G-Type が -1 以下となった検体に関して, 「細分化 G-Type」として目視により少数点以下第一位までの値を付与した (図 3). そして, APAL, CPAL : $0.0 \sim 10.0$ と

表 1. CS-5100 と A 社血小板凝集能測定装置の測定内容の比較

		CS-5100	A社 (4濃度法)
必要な最低PRP量 (2試薬使用時)		560 μL	1,600 μL
試薬終濃度	ADP	1, 10 μM	1, 2, 4, 8 μM
	コラーゲン	1, 5 $\mu\text{g/mL}$	0.25, 0.5, 1, 2 $\mu\text{g/mL}$
算出結果	ADP	APAL (0.0~10.0)	G-Type (-2~3)
	コラーゲン	CPAL (0.0~10.0)	G-Type (-2~3)

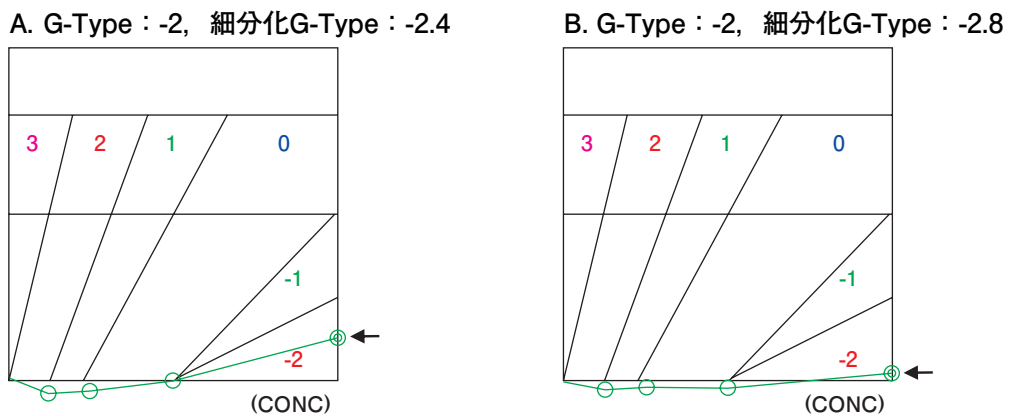


図 3. グレーディングカーブから目視による細分化 G-Type 付与の例

G-Type -1, -2 の場合にグレーディングカーブと縦軸との交点の高さから G-Type を細分化.

細分化 G-Type : -3.0 ~ -1.0 の相関係数を算出した。
 また、細分化 G-Type -2.4 をカットオフとし、ROC
 解析により算出した APAL : 4.5, CPAL : 2.2 を PAL
 のカットオフとした際の判定一致率を算出した。

5. 結果報告までの時間および実質作業時間の比較

CS-5100 と血小板凝集能測定装置 (A 社) を使用し
 て 1 検体測定, および 3 検体連続測定を行った際の
 測定開始直後から、結果報告時間と検査技師が拘束
 される実質作業時間の比較を行った。PPP の遠心完
 了時点から計測を開始し、装置の画面に結果が表示
 された時点で計測を終了して結果報告時間とした。
 そして結果報告時間から、検査者が作業せずに装置
 のみが自動で動作している時間を差し引いたものを
 実質作業時間とした。

結果

1. 測定全領域における PAL と G-Type の相関性

APAL と G-Type の相関性 (n=65) は $y=1.25x+6.36$,
 相関係数 $r=0.78$ であった (図 4 A)。また CPAL と
 G-Type の相関性 (n=61) は $y=1.40x+4.93$, 相関係数
 $r=0.88$ であった (図 4 B)。

2. G-Type が -1 ~ -2 における PAL と細分化 G-Type の相関性

APAL と細分化 G-Type の相関性 (n=43) は $y=1.75x$
 $+8.30$, 相関係数 $r=0.71$ であった (図 4 C)。また CPAL
 と細分化 G-Type の相関性 (n=15) は $y=1.25x$
 $+5.18$, 相関係数 $r=0.50$ であった (図 4 D)。

APAL : 4.5 と細分化 G-Type : -2.4 をカットオフと

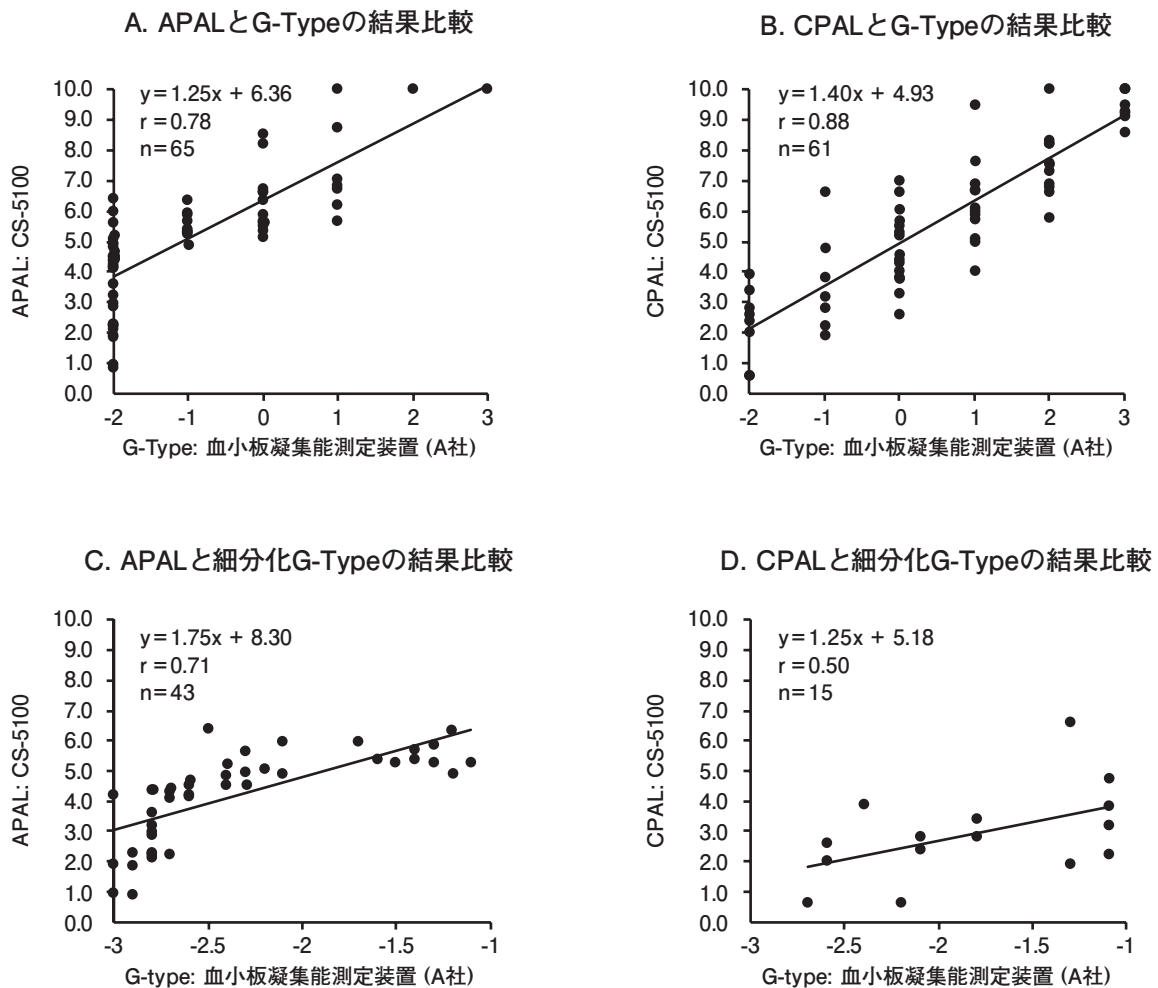


図 4. PAL と G-Type および細分化 G-Type の比較結果

した際の判定一致率は95.4%となった(表2 A)。そしてCPAL:2.2と細分化G-Type:-2.4をカットオフとした際の判定一致率は95.1%となった(表2 B)。

3. 結果報告時間と実質作業時間

1検体測定時のCS-5100の結果報告時間は8分20秒、実質作業時間は0分30秒であった。また血小

板凝集能測定装置(A社)の結果報告時間は8分55秒、実質作業時間は3分50秒であった。

3検体連続測定時のCS-5100の結果報告時間は14分00秒、実質作業時間は0分50秒であった。また血小板凝集能測定装置(A社)の測定結果報告時間は27分30秒、実質作業時間は13分00秒であった(表3)。

表2. 目視による細分化G-Typeのカットオフ値とPALによる判定一致率

A: APALと細分化G-Typeの判定一致率は95.4%.
B: CPALと細分化G-Typeの判定一致率は95.1%.

A. ADP (n=65)		細分化G-Type	
		① (-2.4以下)	② (-2.3~3)
APAL	① (0.0~4.5)	21 32.3%	0 0.0%
	② (4.6~10.0)	3 4.6%	41 63.1%

B. コラーゲン (n=61)		細分化G-Type	
		① (-2.4以下)	② (-2.3~3)
CPAL	① (0.0~2.2)	2 3.3%	1 1.6%
	② (2.3~10.0)	2 3.3%	56 91.8%

表3. 測定結果報告時間と実質作業時間の比較

PPPの遠心完了時点から装置画面上に結果が表示されるまでを結果報告時間、結果報告時間から検査技師が作業せずに装置のみが自動で動作している時間を差し引いたものを実質作業時間とした。

装置	測定内容	1検体測定時の		連続3検体測定時の	
		結果報告時間	実質作業時間	結果報告時間	実質作業時間
CS-5100	ADP: 1, 10 μM コラーゲン: 1, 5 μg/mL	8分20秒	0分30秒	14分00秒	0分50秒
血小板凝集能測定装置(A社)	ADP: 1, 2, 4, 8 μM コラーゲン: 0.25, 0.5, 1, 2 μg/mL	8分55秒	3分50秒	27分30秒	13分00秒

考 察

これまでのCSシリーズと他社の血小板凝集能測定装置の比較検討において、同一試薬濃度を測定した際の結果は良好であるという報告がある⁸⁾。今回、我々はCS-5100の研究用の新規解析法であるPALと当院でこれまで使用していたA社の血小板凝集能測定装置のG-Typeの比較検討を行った。

全測定域において試薬濃度数および解析方法が異なるAPALとG-Typeの相関係数は $r=0.78$ 、CPALの相関係数は $r=0.88$ であった。また当院独自の出血リスクに対するカットオフを用いた場合の判定一致率はAPALで95.4%、CPALで95.1%となり、今回開

発されたPALはこれまで使用していたA社の血小板凝集能測定装置のG-Typeと同程度の評価結果が得られた。なお、CPALに関してはG-Type -2付近の検体数が少なかったため、今後引き続き検討が必要と考えられる。

また、我々はADPでG-Type -2となる検体のAPALの結果に注目した。G-Typeでは過剰の抑制として一括りで表されるが、今回のAPALでは0.9~6.4と幅を持った結果となった。そのAPALの結果は筆者らが目視で細分化したG-Typeとも相関しており、APALではさらなる細分化が可能であることも伺える(図4 A, C)。実際にG-Type -2であり細分化G-Type -2.8という同一結果の2検体において、APALは3.6

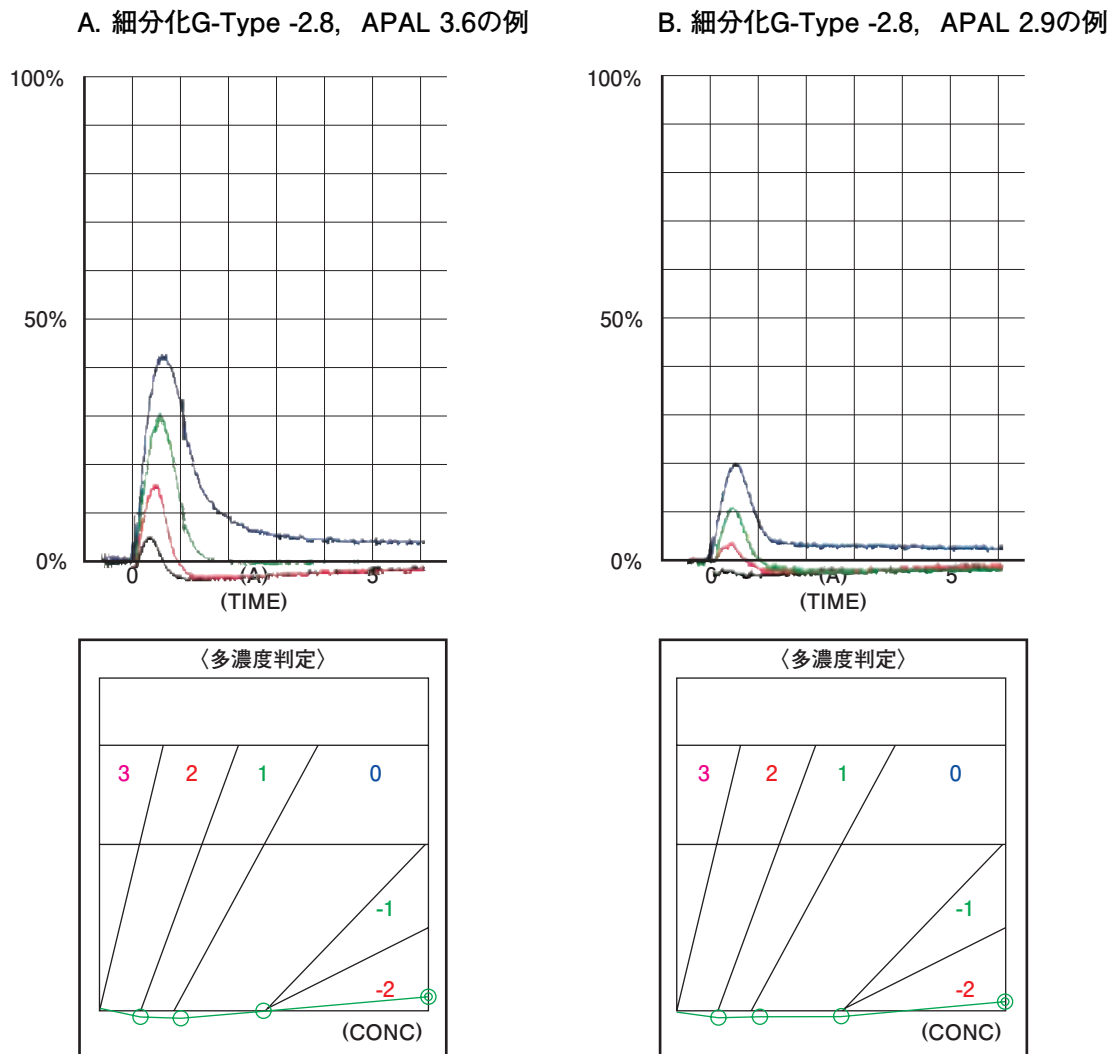


図5. APAL3.6とAPAL2.9におけるG-type -2(細分化G-type -2.8)の凝集波形とグレーディングカーブの比較

と 2.9 であった (図 5)。これは ADP による血小板凝集反応とそれぞれの解析方法に起因すると思われる。血小板凝集能が低下もしくは抑制されている検体で、ADP によって惹起された場合は、一時的に凝集が生じた後に凝集の解離が観察される⁹⁾。グレーディングカーブでは 5 分後凝集率の 1 点を抽出して解析するため、一時的に生じる凝集の検体差を捉えることは難しいと考えられる。しかし、PAL は凝集波形全体から解析される指標であるため、それらの検体が区別されたと考えられる。薬効評価として、これまで一括りに過剰抑制とされていた結果を区別することが可能となるため、臨床症状と凝集能の新たな関係が見いだされる可能性が期待される。

これまで血小板凝集能検査は非常に煩雑であった。CS-5100 では検体分注と試薬分注が自動化され、

1 度に複数検体のオーダーを処理することが可能となった (図 6)。その結果、1 検体を測定する場合の実質作業時間は CS-5100 では 30 秒であり、3 検体を連続測定する場合の実質作業時間は 50 秒であり、いずれも 1 分以内程度の作業時間である (表 3)。さらに検体のバーコード管理も可能となるため、検体の取り違いのリスクの低減が期待できる。このことから、血小板凝集能検査に CS-5100 を使用することで、作業負担の軽減や検体管理などの検査フロー改善が期待される。また、PAL は 2 濃度の惹起剤から求められる指標であることから、4 濃度法と比較すると、テスト数の削減や、必要な PRP 量の削減による患者負担の低減にも寄与しうるシステムと考えられる (表 1)。

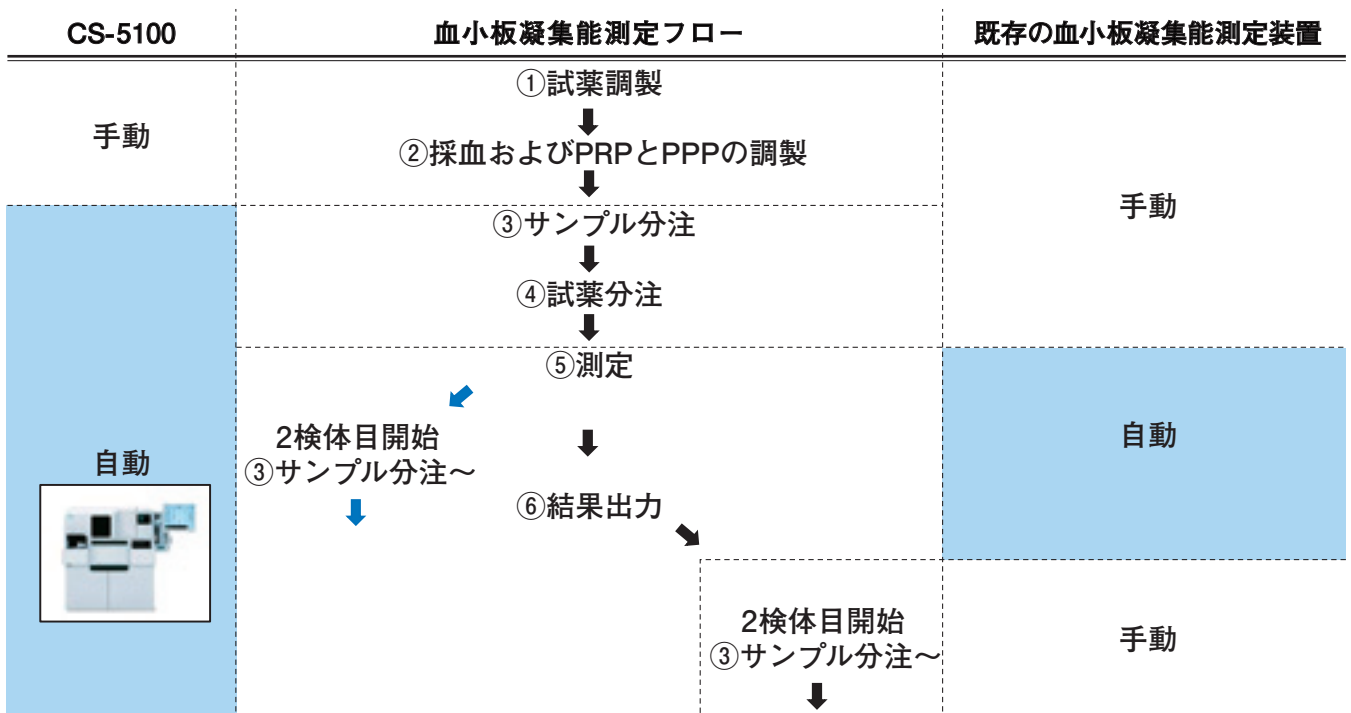


図 6. CS-5100 と既存の血小板凝集能測定装置の複数検体測定時の測定フロー比較

結 語

CS-5100 の新たに開発された研究用の血小板凝集能解析指標である PAL は、従来臨床応用していた専用装置の G-Type との相関性が認められた。また、当院で出血リスクを懸念している領域において、PAL の結果は G-Type 以上に細分化された。さらに、CS-5100 は全自動の凝固検査汎用装置であるため、これまで血小板凝集能検査ができなかった施設でも抗血小板薬の効果確認に関する PAL の臨床有用性の評価が可能となる。また、これまでグレーディングカーブを使用していた施設において検査ワークフローの改善や採血量の低減などが期待できる。

参考文献

- 1) 佐藤金夫, 尾崎由基男. 抗血小板療法患者の薬効モニタリング. CIRCULATION. 2012; 2(12): 52-61
- 2) 高野勝弘, 尾崎由基男. 抗血小板療法のモニタリングと薬剤抵抗性. 脳卒中. 2008; 30: 953-959
- 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 - 血小板凝集能の標準化に向けて. 日本検査血液学会雑誌. 2008; 9(2): 167-177
- 4) 井宮雅宏, 松尾武文. 新しい血小板凝集能パラメータによる慢性期脳梗塞患者の検討. 臨床病理. 1993; 41(8): 923-929
- 5) 間瀬勘史 他. Grading Curve による血小板凝集能検査の評価. 臨床病理. 1992; 40(8): 857-862
- 6) 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
- 7) 坂寄 輔 他. 全自動血液凝固測定装置に搭載した血小板凝集能検査を用いた研究用新規指標の抗血小板療法における薬物効果判定としての有用性の検討. Sysmex Journal Web. 2018; 19(2): 1-10
- 8) 大森由佳里 他. 全自動血液凝固測定装置 CS-2400 による血小板凝集能測定の基礎的検討. 日本臨床検査自動化学会会誌. 2017; 42(5): 607-611
- 9) 丸尾理恵, 金子 誠. 血小板凝集能検査. 検査と技術. 2015, 2; 43(2): 110-116

Evaluation of New Analysis Index for Platelet Aggregation Test by Comparing with Grading Curve and Effect for Laboratory Workflow by Fully Automated Blood Coagulation Analyzer CS-5100

Shoichi HIGUCHI^{*1}, Keiko OHASHI^{*1}, Misaki NAKAMURA^{*1}, Yutaka TAKAHASHI^{*1}, Tokuya OGURO^{*1}, Keisuke KITANO^{*2}, Tasuku SAKAYORI^{*2}, Naoto MIZUSAWA^{*1} and Hiroshi ABE^{*3}

*1 Tachikawa General Hospital, Tachikawa Medical Center, Department of Clinical, 1-24, Asahioka, Nagaoka, Niigata, 940-8621, Japan

*2 Sysmex Corporation, Engineering

*3 Tachikawa General Hospital, Tachikawa Medical Center, Department of Neurosurgery

SUMMARY

In our hospital, we use the G-Type that is the 4 concentration analysis index installed in a semi - automated platelet aggregation analyzer, for the purpose of the evaluation of the antiplatelet drug effects. At this time, the new analysis index of the platelet aggregation test, named PAL, was developed and installed on CS-5100 that is a automated blood coagulation analyzer. Therefore we evaluated the usefulness of APAL and CPAL, ADP induced PAL and Collagen induced PAL, by comparing with G-Type of each reagents. Furthermore, because CS-5100 can dispense reagents and samples automatically, we evaluated the effect for the laboratory workflow. The correlation coefficient were $r=0.78$ (APAL with G-Type) and $r=0.88$ (CPAL with G-Type) , respectively. CS-5100 reduced the working time of technicians by more than 3 minutes at the time of 1 sample measurement, and more than 12 minutes at the time of 3 sample sequential measurements. Because the new analysis index released on CS-5100 that is for the general coagulation test, we expect the platelet aggregation test to be more popular and efficient based on the appropriate evidence of PAL about clinical significance and clinical practice.

Key Words Aggregation, Anti-platelet drug, PAL (Platelet Aggregation Level), G-Type (Grade Type)
