

新規開発したレボヘム AT, レボヘム プロテイン C, レボヘム プラスミノゲン, レボヘム $\alpha 2$ -アンチプラスミンの基礎的評価

大谷 春華^{*1}, 坂寄 輔^{*1}, 北野 圭介^{*1}, 道下 雅人^{*1},
村上 真澄^{*1}, 江頭 舞^{*1}, 嘉藤 伸一^{*2}, 新井 信夫^{*1}, 高岡 秀成^{*2}

*1 シスメックス株式会社 第一エンジニアリング本部：神戸市西区高塚台 4-4-4 (〒651-2271)

*2 シスメックス株式会社 第二エンジニアリング本部

要 旨

合成基質法を測定原理とするレボヘム AT, レボヘム プロテイン C, レボヘム プラスミノゲン, レボヘム $\alpha 2$ -アンチプラスミンを新規開発した。これらの試薬群は試薬調製が不要な液状試薬であり、弊社装置の測定アプリケーションを最適化し、酵素試薬と基質試薬の使用量を等量にすることによって、既存試薬で発生していた試薬の廃棄を削減した。また、サンプルカップ用バーコードを同梱することで、サンプルカップでの試薬使用においてもロット管理を実施することが可能となった。今回、これら 4 試薬の基礎的評価を実施したので報告する。

検量線作成の結果から検量線の傾きが既存試薬と比べて大きく、1.6～3.7 倍感度が高い傾向が示された。同時再現性における変動係数 (CV) は正常域で 2% 以下、異常域で 6% 以下と良好な結果を示した。直線性試験ではそれぞれ 150% まで良好な直線性を示した。ヘモグロビン、ビリルビン、トリグリセリドなどの干渉物質による影響は見られなかった。オンボード安定性はそれぞれ 7 日間安定であった。臨床検体を用いた既存試薬との相関性は、すべての項目で相関係数が 0.99 以上と良好であった。

今回の評価結果から、新規に開発した本試薬群は既存試薬に比べて高い感度を有し、良好な基礎性能を確認できた。また、試薬組成の改良による安定性の向上やサンプルカップ用バーコードの同梱などユーザビリティについても向上させており、日常検査に有用であると考えられた。

キーワード

アンチトロンビン, プロテイン C, プラスミノゲン, $\alpha 2$ -アンチプラスミン, 合成基質法, ユーザビリティ

はじめに

アンチトロンビン (以下, AT), プロテイン C (以下, PC), プラスミノゲン (以下, PLG), $\alpha 2$ -アンチプラスミン (以下, $\alpha 2$ -AP) は、表 1 に示すような病態・疾患の際に異常値を示すことが知られている¹⁾。これらの項目は、合成基質法を測定原理とした試薬と汎用の血液凝固測定装置での自動測定が可能である。

これまで当社は AT, PC, PLG, $\alpha 2$ -AP の項目において、凍結乾燥品であるベリクロームシリーズお

よび液状品であるエルシステムシリーズ (PC 除く) を販売してきた。ベリクロームシリーズにおいては試薬調製に時間を要すること、また、エルシステムシリーズにおいては生化学分析装置向けに開発された試薬を血液凝固測定装置に適用した経緯があり、酵素試薬の廃棄が発生するという課題を抱えていた。

これらの課題を解決するため、新たな AT, PC, PLG, $\alpha 2$ -AP 試薬を開発した。本試薬群は試薬調製が不要な液状試薬であり、装置の測定アプリケーションを最適化し酵素試薬と基質試薬の使用量を等量にすることによって、これまで発生していた酵素

試薬の廃棄を削減した。また、サンプルカップ用バーコード(図1)を同梱することで、これまでサンプルカップ使用時にはできなかったロット管理が実施で

きるようになり、試薬管理におけるユーザーの手間を削減している。今回、これらの製品群の基礎的評価を行ったので報告する。

表1. 異常値を示す病態・疾患

測定項目	異常値を示す病態・疾患
AT	新生児 先天性の欠乏症, 異常症 DIC 敗血症 肝機能障害 ネフローゼ症候群 妊娠高血圧症候群 エストロゲン製剤, L-アスパラキナーゼ投与
PC	乳幼児 先天性の欠乏症, 異常症 肝機能障害 ビタミンK欠乏症 ワルファリン内服 DIC
PLG	DIC 肝障害 異常プラスミノゲン血症
α 2-AP	線溶亢進型DIC

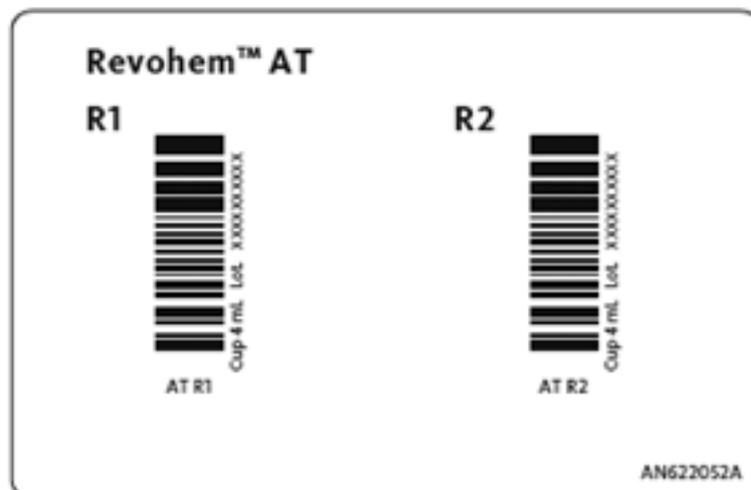


図1. サンプルカップ用バーコードの一例

材料および方法

1. 対象

標準品にコアグトロール N (シスメックス) および血液凝固試験用標準ヒト血漿 (シスメックス) を用いた。正常域および異常域のコントロール試料として血液凝固試験用コントロール血漿 N および P (ともにシスメックス) を用いた。正常検体には、凝血学的検査で異常を認めない購入血漿 (Precision BioLogic) を用いた。また、AT, PC, PLG, α 2-AP の異常検体には購入血漿 (TRINA BIOREACTIVES) を用いた。

2. 測定装置

全自動血液凝固測定装置 CS-5100²⁾ (シスメックス) および PC の相関性評価に全自動血液凝固測定装置 CS-2000i³⁾ (シスメックス) を用いた。

3. 測定試薬

測定項目および試薬を表 2 に示した。

4. 検討方法

1) 検量線

標準品を添付文書とおりに溶解し、検量線を作成した。標準品には、ベリクローム プロテイン C

では血液凝固試験用標準ヒト血漿を、その他の試薬ではコアグトロール N を用いた。

2) 同時再現性

血液凝固試験用コントロール血漿 N および P を 20 回連続測定し、同時再現性を確認した。

3) 直線性

高値活性と低値活性の試料を混合して 9 段階の試料を作製し、理論値と実測値の関係性を検討した。

4) 干渉物質の影響

干渉チェック・A プラス (シスメックス) を用いてヘモグロビンおよび抱合型ビリルビンを、イントラリポスを用いてトリグリセリドの影響を確認した。レボヘム AT では未分画ヘパリン (ノボヘパリン; 持田製薬) の影響も確認した。

5) オンボード安定性

開封した試薬を装置内に設置し、7 日間の試薬安定性を確認した。設置に際し、 α 2-AP 試薬のみ蒸発防止用のキャップ (試薬キャップ S) を用いて安定性を確認した。測定試料には血液凝固試験用コントロール血漿 N および P を用い、0 日目の測定値からの変動率を確認した。

6) 相関性

購入患者検体 50 例以上を用いて、既存試薬との相関性を検討した。

表 2. 測定項目および試薬

測定項目	評価試薬	対照試薬
AT	レボヘム AT	エルシステム・ATⅢ
PC	レボヘム プロテイン C	ベリクローム プロテイン C
PLG	レボヘム プラスミノゲン	エルシステム・PLG
α 2-AP	レボヘム α 2-アンチプラスミン	エルシステム・APL

結果

1) 検量線

活性値と dOD/min, または活性値と Log [dOD/min] による一次回帰式を各試薬間で比較した。AT では, レボヘム AT : $y=0.0087x+1.9211$, エルシステム・AT III : $y=-0.0028x+0.5603$, PC では, レボヘム プロテイン C : $y=0.0013x+0.0017$, ベリクローム プロテイン C : $y=0.0008x+0.0008$, PLG では, レボヘム プラスミノゲン : $y=0.0044x-0.0033$, エルシ

テム・PLG : $y=0.0012x-0.0007$, α 2-AP では, レボヘム α 2-アンチプラスミン : $y=-0.0029x-0.3104$, エルシステム・APL : $y=-0.0015x-0.6663$ となった(図2)。すべての項目において, 新規開発試薬は検量線の傾きが既存試薬に比べて大きくなった。

2) 同時再現性

正常域および異常域コントロール血漿を 20 回連続測定した各試薬の変動係数 (CV) は, 正常域で 0.8 ~ 1.8%, 異常域で 0.8 ~ 5.3% と良好であった(表3)。

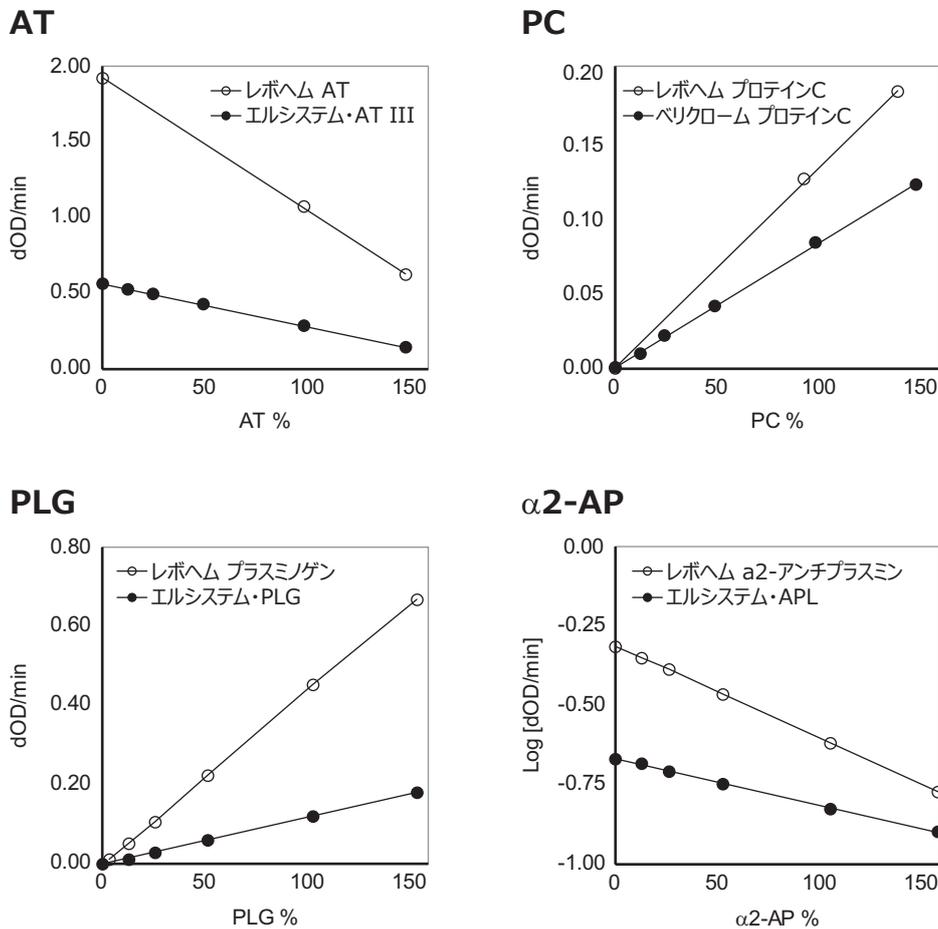


図2. 検量線

表3. 同時再現性

	Normal control				Abnormal control				
	n=20	AT	PC	PLG	α 2-AP	AT	PC	PLG	α 2-AP
MEAN (%)		91.4	87.6	97.2	99.6	32.4	32.0	35.0	35.3
SD		1.5	1.6	0.7	1.6	1.7	0.6	0.3	1.1
CV (%)		1.6	1.8	0.8	1.6	5.3	2.0	0.8	3.0

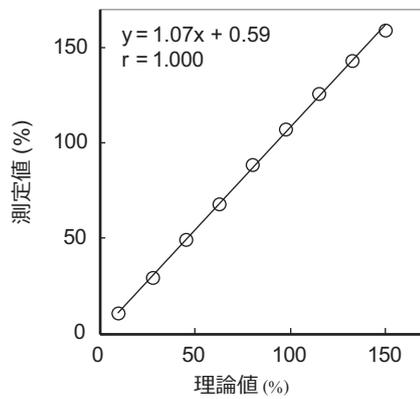
3) 直線性

すべての項目において、理論値との一次回帰式の傾きが0.90～1.10，相関係数(r)>0.999と良好であった(図3)。

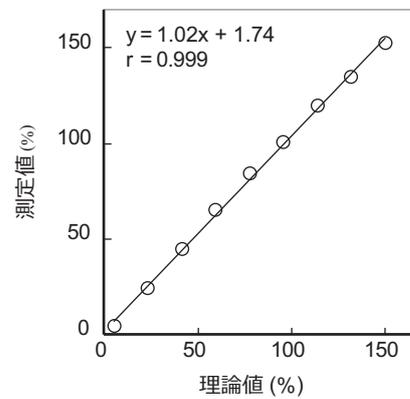
4) 干渉物質の影響

すべての項目において、ヘモグロビンは510mg/dLまで，抱合型ビリルビンは30mg/dLまで，トリグリセリドは300mg/dLまで，ATにおいては，未分画ヘパリンが4.1IU/mLまでそれぞれ測定値に影響しないことが確認できた(図4)。

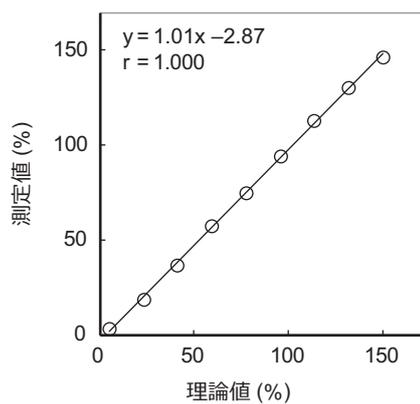
レボヘム AT



レボヘム プロテインC



レボヘム プラスミノゲン



レボヘム α 2-アンチプラスミン

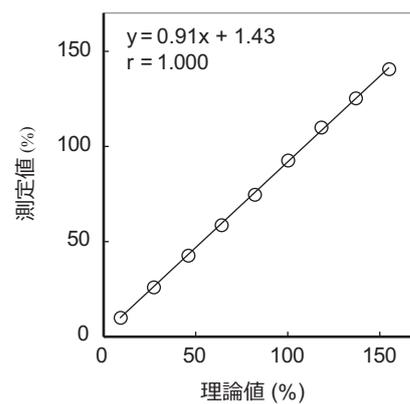
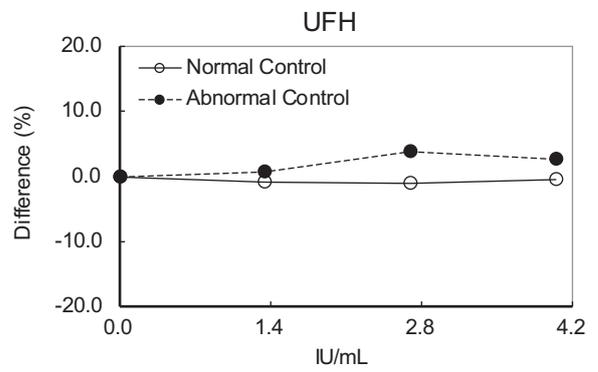
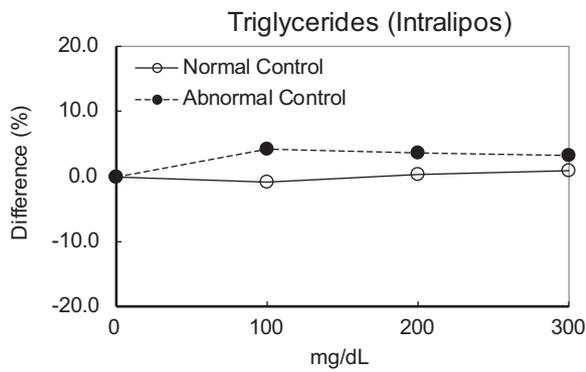
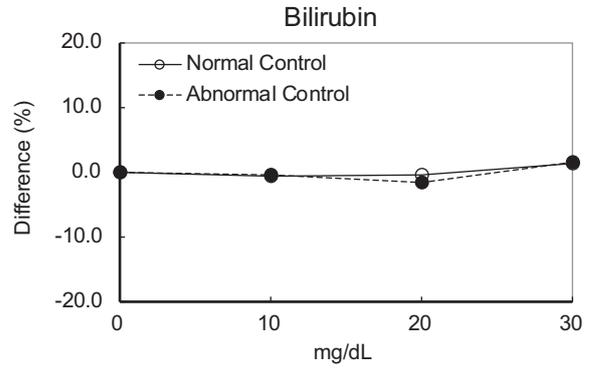
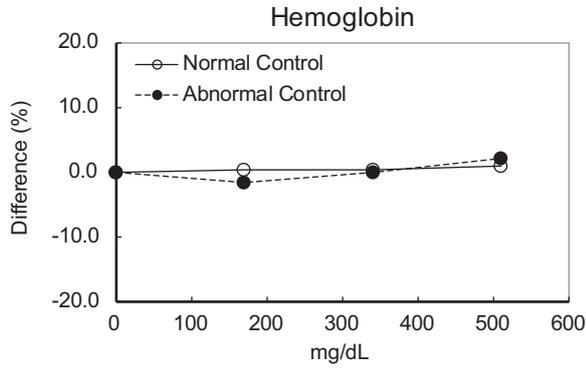


図3. 直線性

レボヘム AT



レボヘム プロテインC

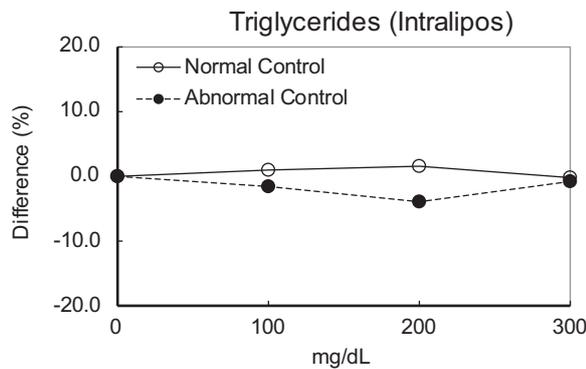
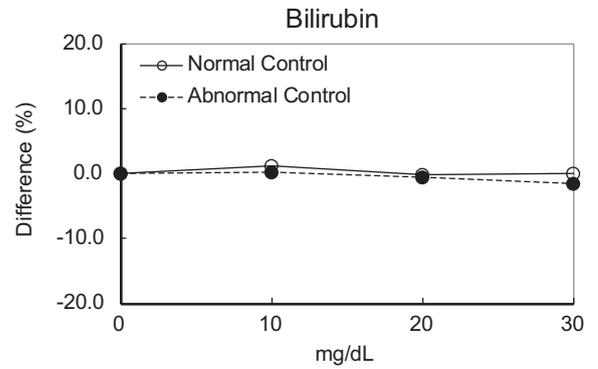
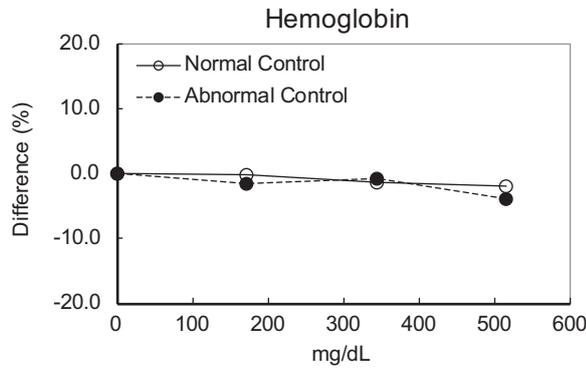
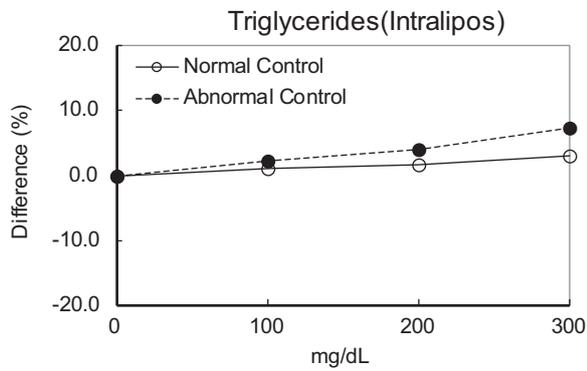
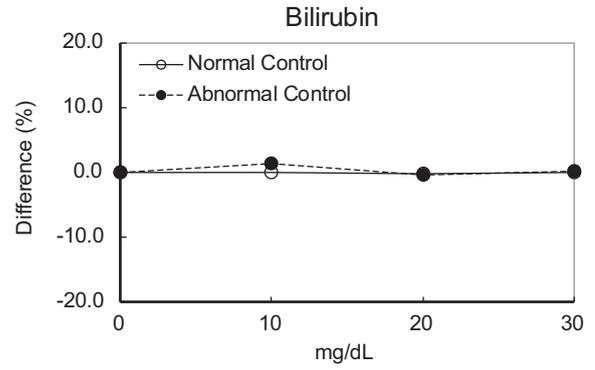
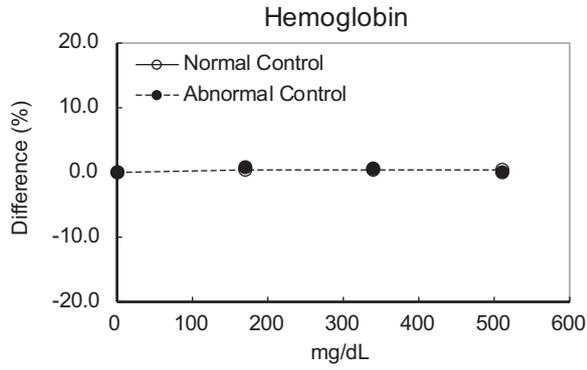


図4. 干渉物質の影響

レボヘム プラスミノゲン



レボヘム α2-アンチプラスミン

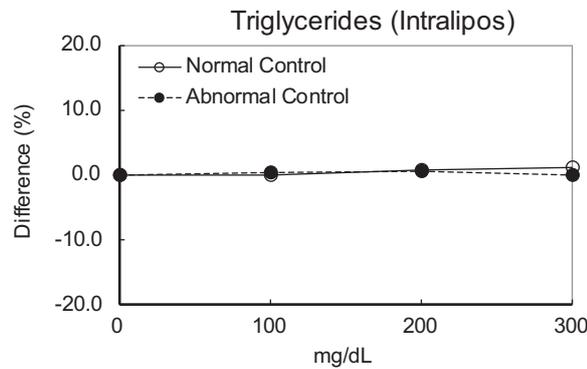
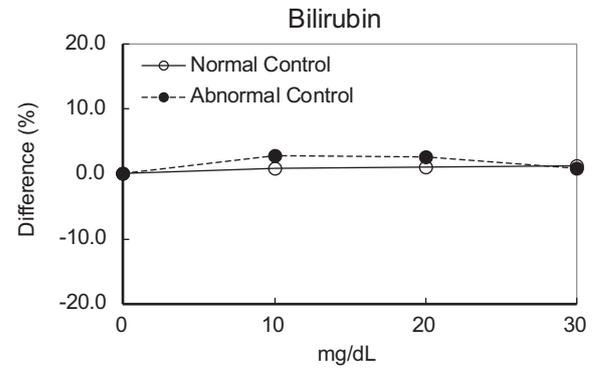
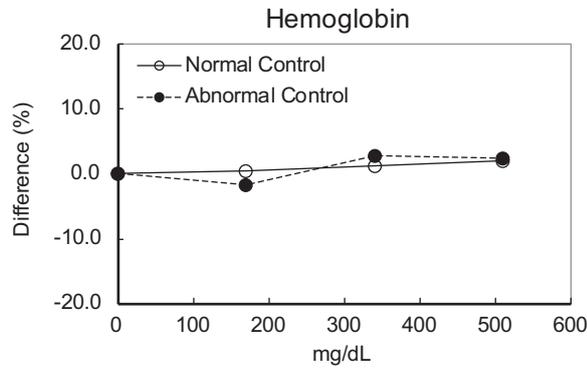


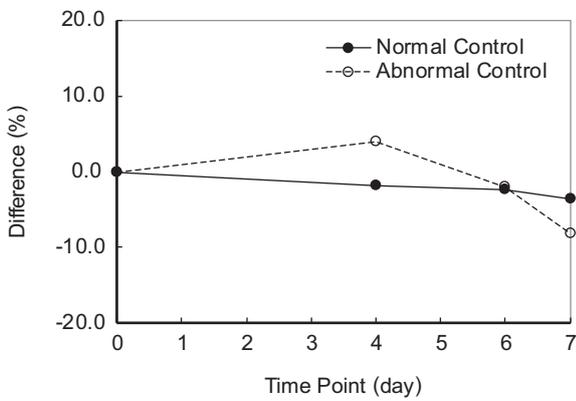
図4. 干渉物質の影響

5) オンボード安定性

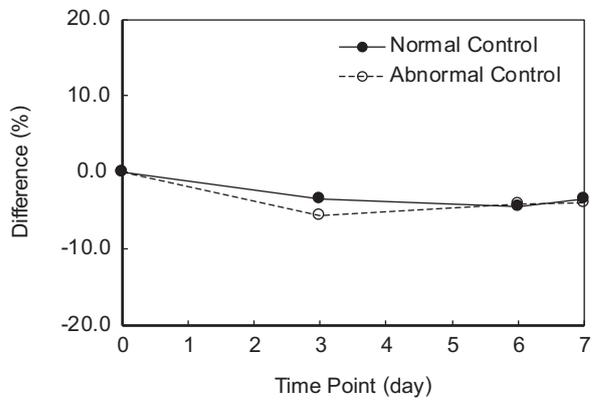
0 日目の測定値と比較した活性値の変動率はすべての項目において7日間の変動率が正常域コン

トロール血漿では10%以下，異常域コントロール血漿では20%以下であり安定であることが確認できた(図5)。

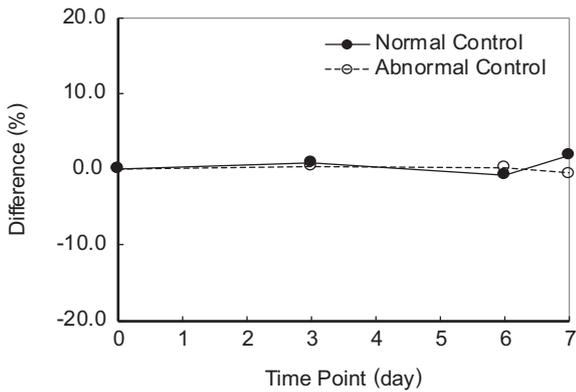
レボヘム AT



レボヘム プロテインC



レボヘム プラスミノゲン



レボヘム α2-アンチプラスミン

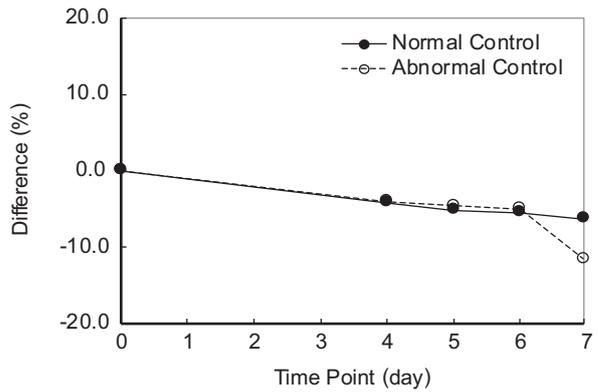


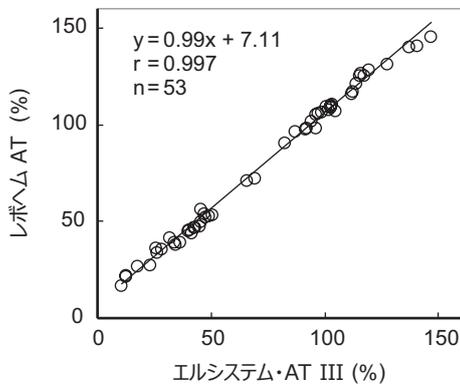
図5. オンボード安定性

6) 相関性

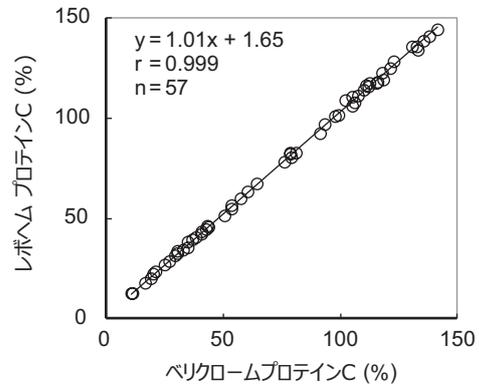
一次回帰式および相関係数 (r) は AT (%) : n=53, r=0.997, $y=0.99x+7.11$, PC (%) : n=57, r=0.999,

$y=1.01x+1.65$, PLG (%) : n=55, r=0.998, $y=1.03x+0.42$, α 2-AP (%) : n=61, r=0.985, $y=0.99x-0.65$ と良好な相関を示した (図6).

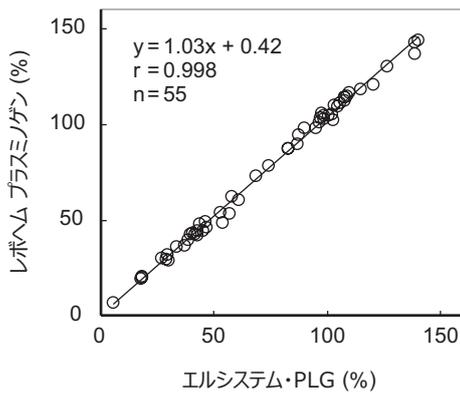
AT



PC



PLG



α 2-AP

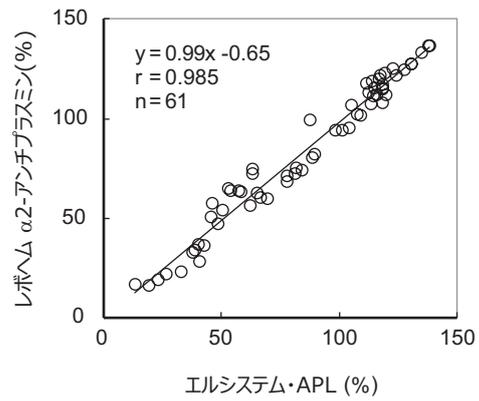


図6. 相関性

考 察

今回、新たに開発したレボヘム AT, レボヘム プロテイン C, レボヘム プラスミノゲン, レボヘム α 2- アンチプラスミンの基礎性能を評価した。検量線, 同時再現性, 直線性, 干渉物質の影響, 既存試薬との相関性において良好な成績であった。このことから, 日常の臨床検査で使用できる十分な基礎性能を有していると考えられた。特に, 検量線の評価では, 本試薬群は既存製品に比べて検量線の傾きが大きく 1.6 ~ 3.7 倍程度感度が高い傾向を示した。これは試薬中の酵素・基質濃度の最適化や感度増幅の技術⁴⁾によるものであり, 分析能力の向上や安定性の向上が期待される。

新規試薬群のオンボード安定性は, 本評価から 7 日間安定であることが確認できた。データは示していないが, レボヘム AT のオンボード安定性は同条件で評価した既存試薬のエルシステム AT に比べて向上している。これは R1 試薬が組成の工夫により蒸発に対して強くなっていること, R2 試薬に含まれる合成基質がペプチド修飾によって安定化していることが要因であると思われる。一方で, R1 試薬の蒸発を抑えるための工夫は逆に吸水性作用を有するため, 湿度の高い外気環境下では吸水の影響により AT 活性が上昇傾向となる場合がある。オンボード安定性は試薬残量や外部の環境によって変化するため, 精度管理などによって測定値の信頼性を確認しておくことが重要である。

また, レボヘム AT においては, 既存試薬で要望が高かった小容量のキット化を実現した。同時に, 開発した試薬において, サンプルカップ用のバーコードラベルを同梱したことによって, 試薬をサンプルカップに移し替えた場合でも容易にロット管理が可能となった。これまで試薬をサンプルカップで使用するには, マニュアルでロット番号や有効期限の入力が必要であったが, この操作が自動化されユーザビリティの向上に寄与する。また, 有効期間についても既存試薬の 12 ヶ月から 24 ヶ月に延長しており, 同一ロット試薬の長期使用が可能となった。

凝固阻止因子であるアンチトロンビン, プロテ

イン C, プロテイン S の先天性欠損症は活性が正常の約 50% 程度に低下しただけでも血栓傾向が生じるため, 活性値の測定は非常に重要である。日本人におけるアンチトロンビンの欠損症は約 0.15%, プロテイン C の欠損症は約 0.13% と推測されている⁵⁾。また, これらの欠損症が日本人における静脈血栓塞栓症 (VTE) の主な血栓性素因であることが知られている⁵⁾。アンチトロンビン, プロテイン C の異常症については, 2017 年度より特発性血栓症 (遺伝性血栓性素因によるものに限る) (指定難病 327) として難病指定されていること⁶⁾, アンチトロンビンは日本血栓止血学会が公表した DIC 診断基準 2017 年度版⁷⁾ で新たに追加されたことから, 今後標準化に向けた動きが活発化されることが予想される。

今回開発した合成基質法を測定原理とした新規試薬群は, 既に多くの施設で使用されている全自動血液凝固測定装置へのマッチングや市場ニーズを汲み取った試薬となっており, 今後の臨床検査の発展に寄与することが期待される。

参考文献

- 1) 朝倉英策 編著. 臨床に直結する血栓止血学. 第 1 版. 東京: 中外医学者; 2013. 381
- 2) 徳 雅幸 他. 全自動血液凝固測定装置 CS5100 の基礎的検討. *Sysmex J.* 2013; 14 (3): 1-10
- 3) 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; 17 (2): 1-10
- 4) Jean AMIRAL. 液体媒体中でプラスミノゲンをアッセイする方法, 関連する組成物およびキット. JP2014526243. 2014-10-06
- 5) 森下英理子. アンチトロンビン, プロテイン C およびプロテイン S 検査の信頼性. *日本検査血液学会雑誌.* 2014; 15 (1): 117-125
- 6) <http://www.nanbyou.or.jp/entry/5419> (参照 2018-07-24)
- 7) Aota T, et al. The valuable diagnosis of DIC and pre-DIC and prediction of a poor outcome by the evaluation of diagnostic criteria for DIC in patients with hematopoietic injury established by the Japanese Society of Thrombosis and Hemostasis. *Thrombosis Research.* 2016; 147: 80-84

Basic Evaluation of Recently Developed Chromogenic Reagents Revohem AT, Revohem Protein C, Revohem Plasminogen and Revohem α 2-Antiplasmin

Haruka OTANI^{*1}, Tasuku SAKAYORI^{*1}, Keisuke KITANO^{*1}, Masato MICHISHITA^{*1},
Masumi MURAKAMI^{*1}, Mai EGASHIRA^{*1}, Shinichi KATO^{*2}, Nobuo ARAI^{*1} and Hidenari TAKAOKA^{*2}

*1 Engineering 1, Sysmex corporation, 4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe, 651-2271, Japan

*2 Engineering 2, Sysmex Corporation

SUMMARY

We have recently developed Revohem AT, Revohem Protein C, Revohem Plasminogen, and Revohem α 2-antiplasmin with chromogenic assay. These are liquid reagents that ready for use, and by optimizing the measurement application and unifying the enzyme reagent and substrate reagent usage quantity, we reduce the reagent wastage existing reagents. In addition, the barcode for the sample cup can be included in a lot control for reagent use in the sample cup. At this time, the basic evaluation of these four reagents has been carried out and reported.

The results of the calibration curve preparation showed that the slope of the calibration curve was larger than that of conventional reagents and was about 1.6 to 3.7 times more sensitive. The coefficient of variation (CV) in the within-run imprecision showed good results with 2% or less in the normal level and 6% or less in the abnormal level. The linearity test showed good linearity up to 150%. No results of interference materials such as hemoglobin, bilirubin, or triglyceride were observed. The on-board stability was stable for 7 days in each case. Correlation with existing reagents using clinical samples was good, with correlation coefficients of 0.99 or higher in complete parameters. Based on the results of this evaluation, the recently developed reagents are confirmed to have higher sensitivity than existing reagents and have good basic performance. In addition, usability, such as the improvement of stability by the improvement of the reagent composition and packing of the barcode for the sample cup was also improved, which seems to be useful for routine tests.

Key Words Antithrombin, Protein C, Plasminogen, α 2-Antiplasmin, Chromogenic Assay, Usability
