

全自動血液凝固測定装置 CN-6000 の基礎的検討

畑山 祐輝, 市川 ひとみ, 石本 学, 吉岡 明, 山下 典子, 清水 小波, 野上 智,
福田 哲也

鳥取大学医学部附属病院 検査部：鳥取県米子市西町 36-1 (〒 683-8504)

凝固検査は血栓性疾患および出血性疾患の診断と治療において重要であり、迅速で正確な検査が求められる。今回我々は、新しい全自動血液凝固測定装置 CN-6000 (シスメックス株式会社) の導入を目的に基礎的検討を行ったので報告する。同時再現性と日差再現性はすべての項目で CV5% 以下であった。希釈直線性は、Fbg : 723.5mg/dL, P-FDP : 128.7 μ g/mL, DD : 114.1 μ g/mL, PIC : 18.5 μ g/mL まで直線性を認めた。最小検出感度は、P-FDP : 2.3 μ g/mL, DD : 0.4 μ g/mL, PIC : 0.06 μ g/mL であった。APTT と FXIII 以外の項目は溶血ヘモグロビンは 500mg/dL まで、非結合ビリルビンは 30mg/dL まで、結合ビリルビンは 30mg/dL まで、乳びは 3,000FTU まで測定値に影響は与えなかった。APTT の測定値はビリルビンの濃度依存的に影響を受けた。FXIII の測定値は非結合ビリルビンと結合ビリルビン、乳びは影響しなかったが、溶血ヘモグロビンの濃度依存的に影響を受けた。従来機種 (全自動血液凝固測定装置 CS-2100i) との相関はすべての項目で相関係数 0.99 であった。クロスミキシングテストの自動希釈測定とグラフの作成も利用可能であり、同時に算出される Index of Circulating Anticoagulant (ICA) は少数例での検討ではあるが、因子欠乏、インヒビターパターンを正しく判定していたことを確認した。CN-6000 の導入に伴い検討を行った結果、良好な基礎的性能を確認することができた。検体処理速度も従来機種より向上したため、報告時間の短縮が期待され、精度管理やメンテナンスも簡便に実施可能と思われた。

キーワード

全自動血液凝固測定装置 CN-6000, クロスミキシングテスト, Index of Circulating Anticoagulant

はじめに

凝固検査は血栓性疾患および出血性疾患の診断と治療において重要であり、迅速で正確な検査が求められる。また、凝固検査は測定試薬間や測定機器間で標準化が容易でない検査が多く¹⁾、サンプルの取り扱いや性状により測定値に誤差を与える要因が多い^{2,3)}。迅速で正確な検査結果の提供に血液凝固測定装置は不可欠であり、機器更新や測定試薬の変更の際には検査項目のバリデーションが必須である⁴⁾。今回我々は、新しい全自動血液凝固測定装置 CN-6000 (以下、CN-6000 : シスメックス株式会社 (以下、シスメックス)) の導入を目的に基礎的検討を行ったので報告する。

実験材料および方法

1. 使用機器

CN-6000 と対照機器として全自動血液凝固測定装置 CS-2100i (シスメックス ; 以下、CS-2100i) を使用した。

2. 対象検体

当院検査部に 2019 年 8 月から 10 月の期間に提出された入院および外来患者の 3.2% クエン酸ナトリウム加血漿を使用した。本研究は鳥取大学医学部倫理委員会の承認済みである。

3. 試薬

CN-6000 の基礎的検討に用いた試薬およびコントロールを以下に示す。(表1, 2)

4. 同時再現性および日差再現性

同時再現性は各項目コントロール2濃度を用いて10回連続測定を行い、得られた平均値とSDより変動係数(CV%)を求めた(表3)。日差再現性には朝夕1回ずつコントロール2濃度を20日間測定し、同様に変動係数を求めた(表4)。

5. 直線性試験

Fbg, PIC, DD, P-FDPそれぞれの高値検体を段階希釈し、11ポイントを2重測定した。得られた測定値が理論値と±5%以上乖離しない濃度までを

希釈直線性ありと判定した(図1)。

6. 干渉物質の影響

PT, APTT, Fbg, AT, α_2 -PI, PLG, PIC, DD, P-FDP, FVIII, FIX, FXIIIについて、ヘモグロビンと抱合ビリルビン、非抱合ビリルビン、乳びの影響について検討した。プール血漿を2濃度、干渉物質は6ポイントに段階希釈し、各濃度2重測定を実施した。干渉チェックAプラス(シスメックス)を使用した。ブランクの測定値の±10%以上になった濃度を、測定値に影響を与える濃度と判定した。

7. 最小検出感度

PIC, DD, P-FDP, U-FDPについて低濃度域を6ポイント作成し、10回ずつ測定を行った。吸光度

表1. 使用試薬一覧

	CN-6000	CS-2100i
PT	トロンボレル S	トロンボレル S
APTT	トロンボチェック APTT-SLA	トロンボチェック APTT-SLA
Fbg	トロンボチェック Fib (L)	トロンボチェック Fib (L)
AT	レボヘム AT	エルシステム・AT III
α_2 -PI	レボヘム α_2 -アンチプラスミン	エルシステム・APL
PLG	レボヘム プラスミノゲン	エルシステム・PLG
DD	リアスオート・D ダイマー ネオ	リアスオート・D ダイマー ネオ
P-FDP	リアスオート P-FDP	リアスオート P-FDP
PIC	リアスオート・PIC	リアスオート・PIC
FVIII	SIEMENS 製 第VIII因子欠乏血漿 20倍希釈	トロンボチェック Factor VIII 5倍希釈
FIX	SIEMENS 製 第IX因子欠乏血漿 20倍希釈	トロンボチェック Factor IX 5倍希釈
FXIII	ベリクローム FXIII	ベリクローム FXIII

表2. 使用コントロール一覧

	レベル1	レベル2
PT	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
APTT	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
Fbg	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
AT	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
α_2 -PI	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
PLG	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
DD	線溶系コントロール L	線溶系コントロール H
P-FDP	線溶系コントロール L	線溶系コントロール H
PIC	PIC コントロール L	PIC コントロール H
FVIII	血液凝固試験用血漿 N	血液凝固試験用血漿 P
FIX	血液凝固試験用血漿 N	血液凝固試験用血漿 P

が0濃度の+2SDと重ならない-2SDを有する濃度を最小検出感度とした。

8. 相関性

CN-6000と従来機種CS-2100iを用いて患者検体を用いて相関性の評価を行った。相関性の評価は回帰式の傾きと相関係数をもとに評価を行った。当院検査部の規定により、相関係数が0.90以上、傾きが0.90～1.10以内を良好な相関性とした。

9. クロスミキシングテスト

クロスミキシングテストにおける検体の自動希釈測定、グラフの作成、Index of Circulating Anticoagulant (以下、ICA)の算出を行った。インヒビターを保

有しない血友病A患者とループスアンチコアグラント(LA)陽性患者検体を正常血漿(コアグトロールN:シスメックス)で即時型はCN-6000による自動希釈を行い、APTTを測定した。遅延型は用手法で患者血漿:正常血漿を10:0, 5:5, 0:10の3ポイントで作成し、37℃2時間加熱後にAPTTを測定した。ICAは12.4未満を凝固因子欠乏パターン、12.4以上をインヒビターパターンと判定した。

結果

1. 再現性

同時再現性はすべての項目でCVが5%以下(表3)、日差再現性もCV5%以下であった(表4)。

表3. 同時再現性

項目	PT				APTT		Fbg	
	コアグ QAP トロール IX		コアグ QAP トロール IIX		コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
単位	%	INR	%	INR	sec	sec	mg/dL	mg/dL
N	10	10	10	10	10	10	10	10
MEAN	89.68	1.06	40.46	1.71	27.06	60.52	287.46	142.52
SD	0.97	0.00	0.49	0.01	0.10	0.86	3.70	6.13
CV%	1.08	0.40	1.20	0.68	0.36	1.43	1.29	4.30

項目	AT		PLG		α ₂ -PI	
	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
単位	%	%	%	%	%	%
N	10	10	10	10	10	10
MEAN	98.50	36.60	102.14	43.52	106.70	45.09
SD	1.20	1.41	0.64	0.59	1.32	1.57
CV%	1.22	3.85	0.63	1.35	1.24	3.49

項目	P-FDP		DD		PIC	
	線溶系コントロール L	線溶系コントロール H	線溶系コントロール L	線溶系コントロール H	PIC コントロール L	PIC コントロール H
単位	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL	μg/mL
N	10	10	10	10	10	10
MEAN	6.46	30.06	2.47	13.29	2.57	9.97
SD	0.24	0.28	0.12	0.18	0.06	0.23
CV%	3.74	0.94	4.69	1.35	2.44	2.28

項目	FVIII		FIX		FXIII	
	血液凝固 試験用血漿 N	血液凝固 試験用血漿 P	血液凝固 試験用血漿 N	血液凝固 試験用血漿 P	血液凝固 試験用血漿 N	血液凝固 試験用血漿 P
単位	%	%	%	%	%	%
N	10	10	10	10	10	10
MEAN	97.88	28.67	92.90	35.28	98.50	36.60
SD	2.01	0.90	1.17	0.77	1.20	1.41
CV%	2.06	3.15	1.26	2.19	1.22	3.85

表4. 日差再現性

項目	PT				APTT		Fbg	
	コアグ QAP トロール IX		コアグ QAP トロール IIX		コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
単位	%	INR	%	INR	sec	sec	mg/dL	mg/dL
N	20	20	20	20	20	20	20	20
MEAN	91.15	1.06	40.31	1.72	27.47	62.30	282.41	141.34
SD	2.15	0.01	0.99	0.03	0.13	1.12	10.89	6.57
CV%	2.36	1.28	2.46	1.87	0.46	1.80	3.86	4.65

項目	AT		PLG		α_2 -PI	
	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX	コアグ QAP トロール IX	コアグ QAP トロール IIX
単位	%	%	%	%	%	%
N	20	20	20	20	20	20
MEAN	96.23	36.32	102.43	42.83	106.84	45.17
SD	1.42	1.16	1.54	0.58	2.37	1.28
CV%	1.48	3.20	1.50	1.34	2.22	2.84

項目	P-FDP		DD		PIC	
	線溶系コントロール L	線溶系コントロール H	線溶系コントロール L	線溶系コントロール H	PIC コントロール L	PIC コントロール H
単位	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$	$\mu\text{g/mL}$
N	20	20	20	20	20	20
MEAN	6.53	30.41	2.52	13.38	2.57	9.95
SD	0.25	0.70	0.09	0.25	0.08	0.29
CV%	3.81	2.31	3.66	1.90	3.25	2.96

項目	FVIII		FIX		FXIII	
	血液凝固 試験用血漿 N	血液凝固 試験用血漿 P	血液凝固 試験用血漿 N	血液凝固 試験用血漿 P	血液凝固 試験用血漿 N	血液凝固 試験用血漿 P
単位	%	%	%	%	%	%
N	10	10	9	9	8	8
MEAN	97.51	27.63	95.66	35.79	91.98	30.74
SD	2.02	0.85	4.75	1.46	1.22	0.86
CV%	2.07	3.09	4.97	4.09	1.32	2.79

2. 希釈直線性

各項目が高値の患者検体を用いて希釈直線性を確認した(図1)。Fbg は 723.5mg/dL, P-FDP は 128.7 $\mu\text{g/mL}$, DD は 114.1 $\mu\text{g/mL}$, PIC は 18.5 $\mu\text{g/mL}$ まで直線性を認めた。

3. 最小検出感度

ブランク検体の +2SD と各濃度の -2SD が重ならない濃度を最小検出感度としたところ、P-FDP は 2.3 $\mu\text{g/mL}$, DD は 0.4 $\mu\text{g/mL}$, PIC は 0.06 $\mu\text{g/mL}$ であった(図2)。

4. 干渉物質の影響

2 濃度のプール血漿に溶血ヘモグロビンと非抱合ビリルビン, 抱合ビリルビン, 乳び濃度を段階的に添加し, 測定値への影響について検討した(図3)。PT, Fbg, AT, PLG, α_2 -PI, P-FDP, DD, PIC, FVIII, FIX は溶血ヘモグロビンが 500mg/dL まで, 非抱合ビリルビンが 30mg/dL まで, 抱合ビリルビンが 30mg/dL まで, 乳びが 3,000FTU まで測定値に影響は与えなかった。APTT はビリルビンの濃度依存的に測定値が延長する傾向を認めた。FXIII 非抱合ビリルビンと抱合ビリルビン, 乳びは影響しなかったが, 溶血ヘモグロビンの濃度依存的に測定値が低下する傾向を認めた。

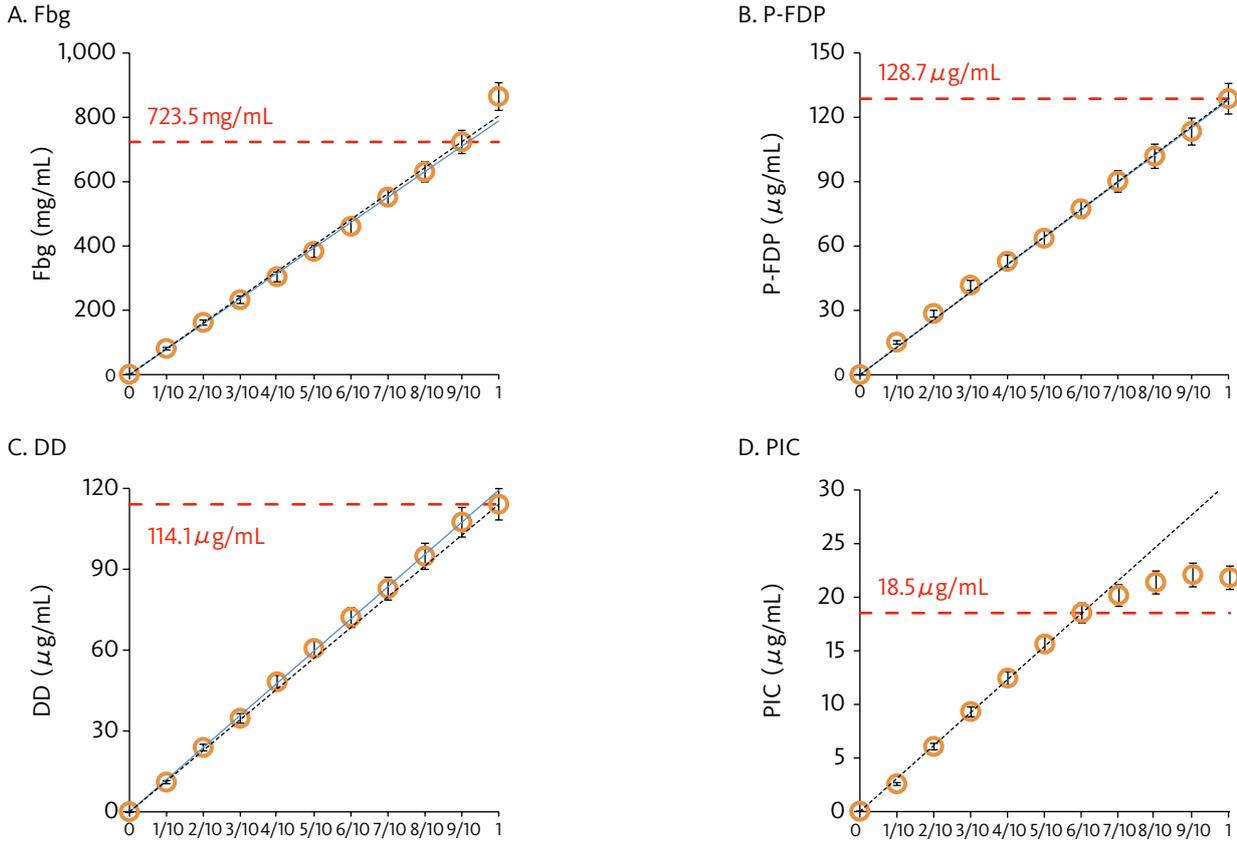


図1. 希釈直線性

各項目高濃度の患者検体を段階希釈し、直線性を検討した。エラーバーは測定値の±5%の範囲を示す。

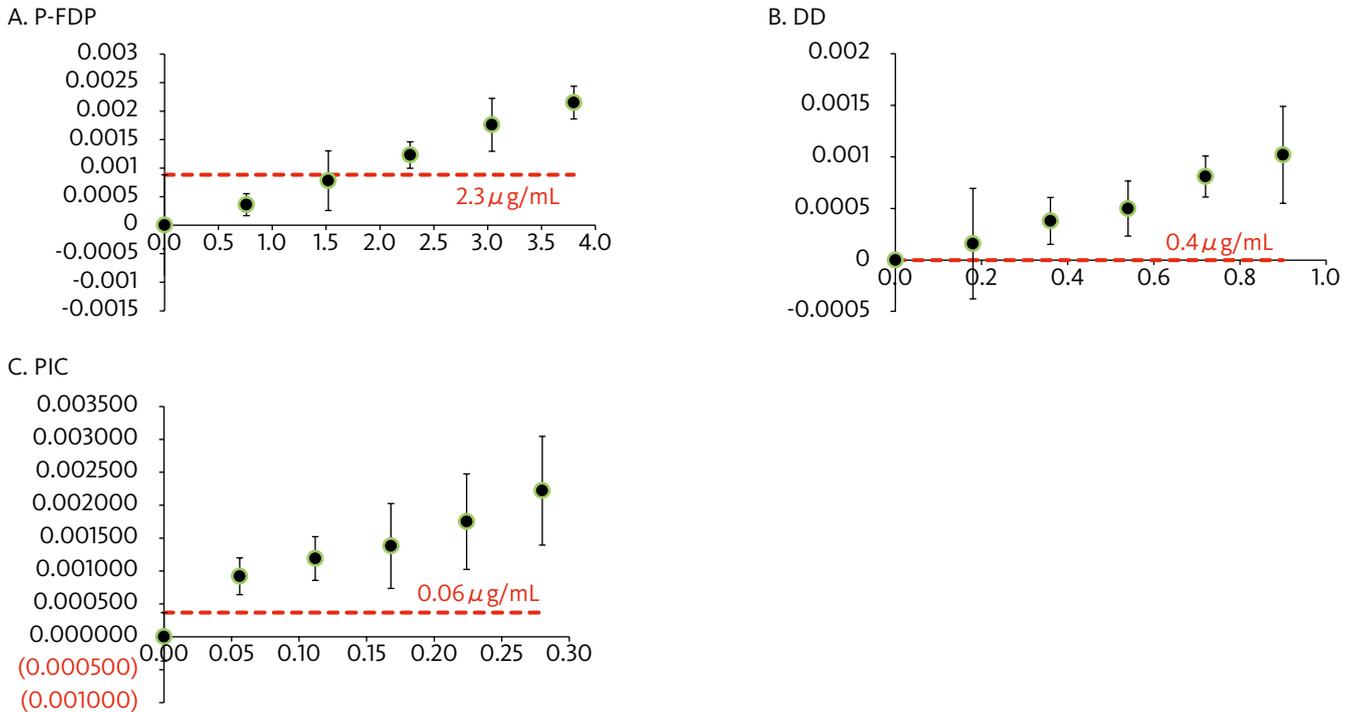


図2. 最小検出感度

低濃度域を6ポイント作成し、10回ずつ測定を行った。吸光度が0濃度の+2SDと重ならない-2SDを有する濃度を最小検出感度とした。

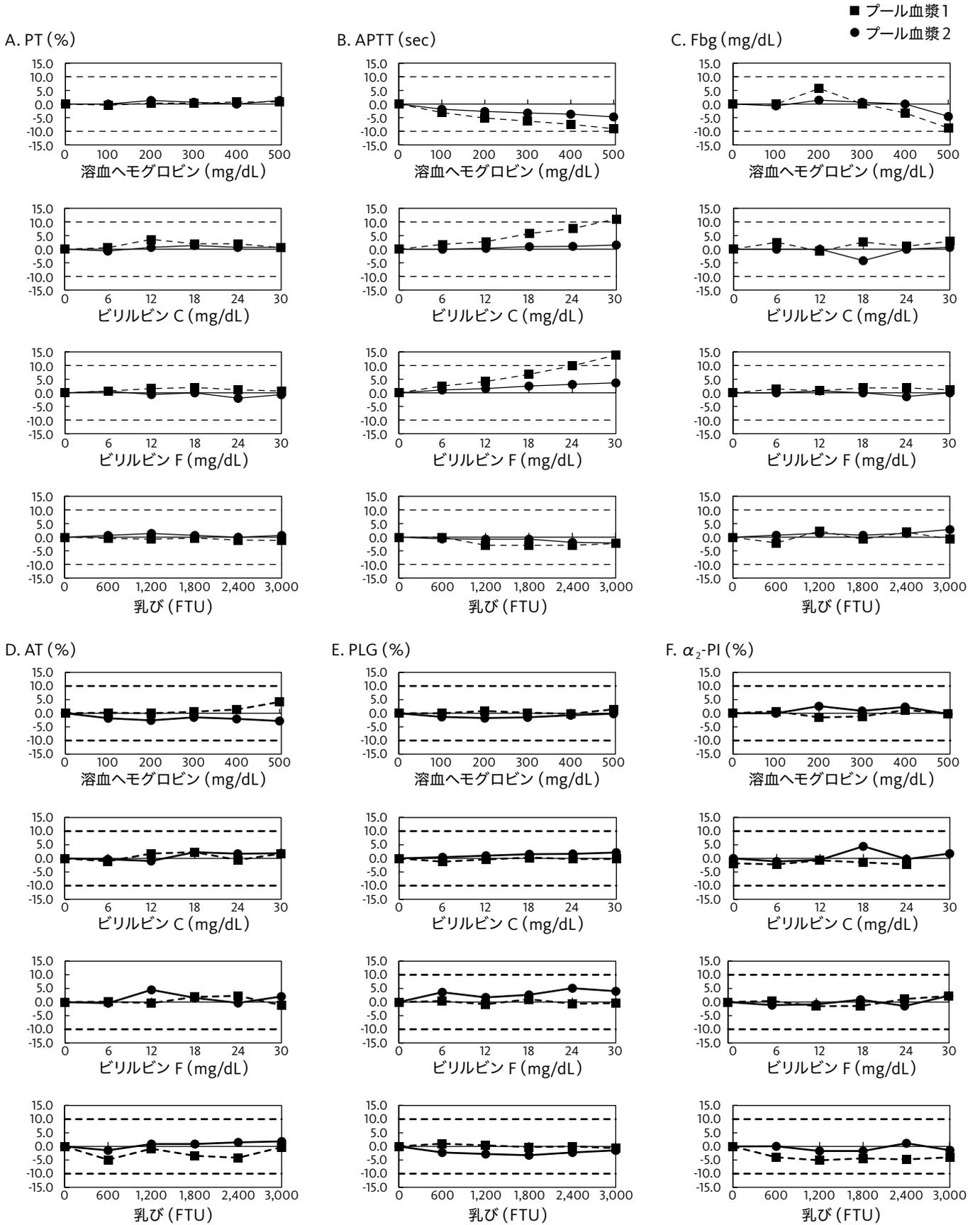


図3. 干渉物質の影響 (A ~ F)

プール血漿を2濃度、干渉物質は6ポイントに段階希釈し、各濃度2重測定を実施した。干渉チェックAプラスを使用した。blank測定値の±10%を超えた濃度を影響ありと判断した。

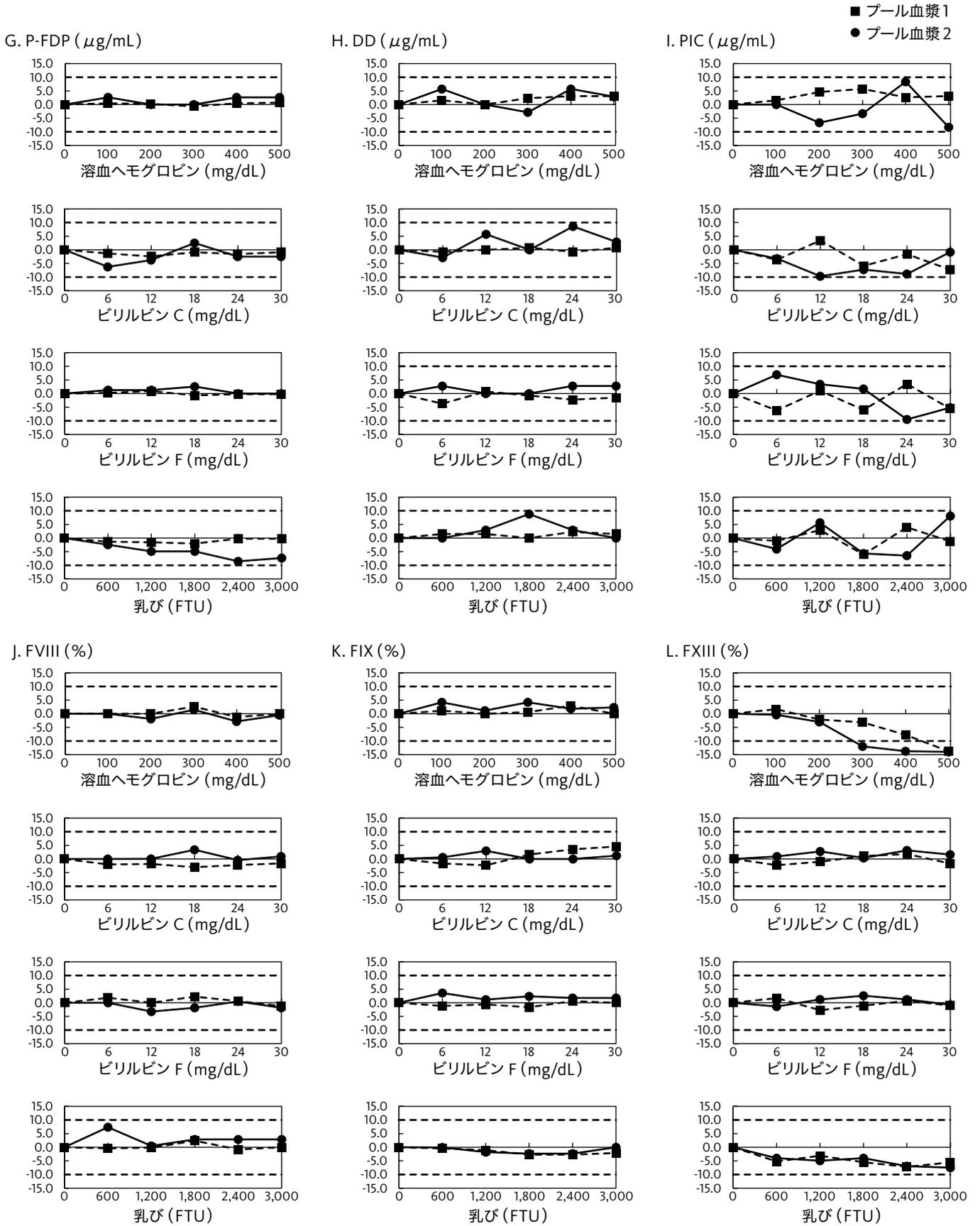


図3. 干渉物質の影響 (G~L)

プール血漿を2濃度、干渉物質は6ポイントに段階希釈し、各濃度2重測定を実施した。干渉チェックAプラスを使用した。blank測定値の±10%を超えた濃度を影響ありと判断した。

5. 相関性

CS-2100i による測定値との相関性について検討を行った (図4)。回帰式および相関係数 (r) は PT : $y=1.01x-0.04$, $r=0.99$, APTT : $y=0.98x+0.07$, $r=0.99$, Fbg : $y=1.07x+3.26$, $r=0.99$, DD : $y=1.03x-0.01$, $r=0.99$, P-FDP : $y=1.06x-0.20$,

$r=0.99$, PIC : $y=0.98x+0.02$, $r=0.99$, FXIII : $y=0.96x+0.30$, $r=0.99$, AT : $y=1.05x+0.11$, $r=0.99$, PLG : $y=1.04x+0.36$, $r=0.99$, α_2 -PI : $y=1.07x+0.87$, $r=0.99$, FVIII : $y=0.91x-0.23$, $r=0.99$, FIX : $y=1.10x+0.41$, $r=0.99$ であった。

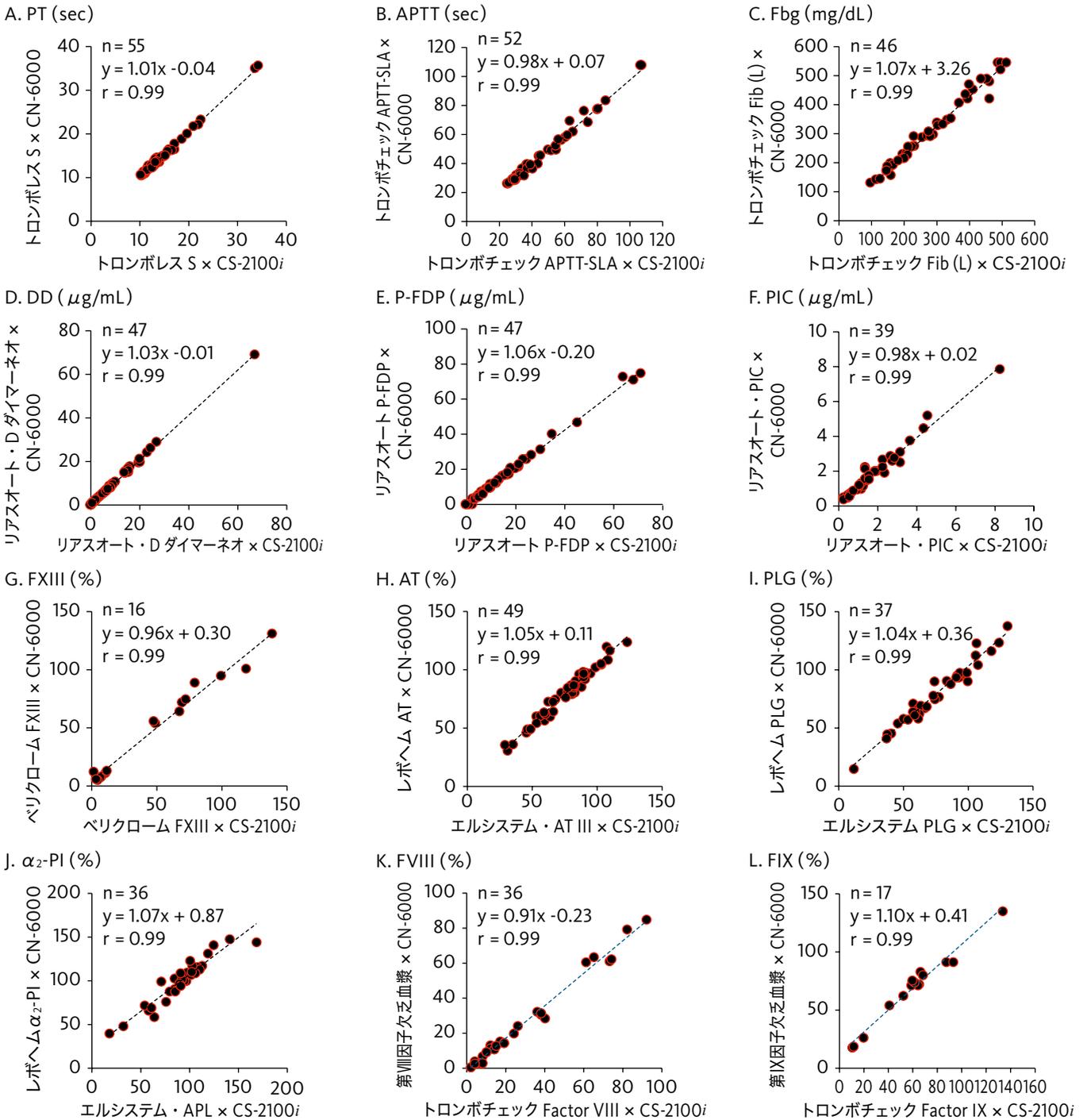


図4. 相関性

X軸 : CS-2100i, Y軸 : CN-6000. A ~ G は測定試薬の変更がない項目で, H ~ L が測定試薬を変更した項目。

6. クロスキシングテスト

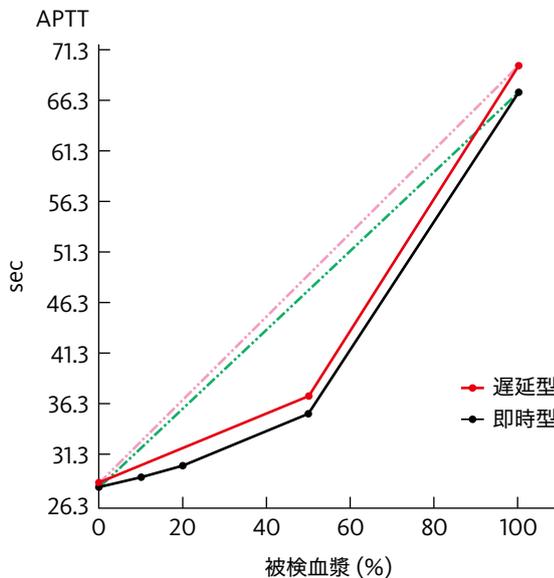
インヒビターを保有しない血友病 A 患者検体と LA 陽性患者検体を用いて即時型と遅延型の測定およびグラフの作成を行った。血友病 A 患者では即時型と遅延型の両方で下に凸の波形を示し、算出された ICA は即時型が 10.7 sec, 遅延型が 12.3 sec と凝固因子欠乏パターンと判定された (図 5-A)。LA 陽性患者では即時型と遅延型の両方で上に凸の波形を示し、算出された ICA は即時型が 38.7 sec, 遅延型が 39.5 sec とインヒビターパターンと判定された (図 5-B)。

考 察

各種凝固検査項目の同時再現性と日差再現性は良好であり、CN-6000 による測定精度は良好であると思われた。希釈直線性と最小検出感度の結果をもとに、報告可能範囲の変更と自動希釈再検の基準について見直しを行った。特に DD は CS-2100*i* では 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で自動希釈再検を実施していたが、

今回の検討結果より、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で希釈再検されるように変更した。干渉物質の影響は多くの項目で測定値に影響を与えなかったが、FXIII は溶血ヘモグロビンの影響を受け、再採血などの対応をする必要があると考えられた。CS-2100*i* との相関性も、全項目で相関係数が 0.99 と良好であった。AT と PLG, α_2 -PI, FVIII, FIX は測定試薬も変更となったが、従来試薬との相関は良好であった。全自動血液凝固測定装置 CS-5100 (シスメックス) を用いたエルシステム AT, PLG, α_2 -PI とレボヘム AT, PLG, α_2 -PI の比較はすでに報告されているが⁵⁾、CS-2100*i* で測定されたエルシステムシリーズの測定値と、CN-6000 で測定されたレボヘムシリーズの測定値との傾き、相関がともに良好であったことから、測定機器と試薬が変更になっても基準値の変更の必要はないと考えられた。以上のことから、CN-6000 は、CS-2100*i* の代替として日常検査に導入可能と考えられた。

A. 血友病 A (インヒビター陰性)



B. LA 陽性

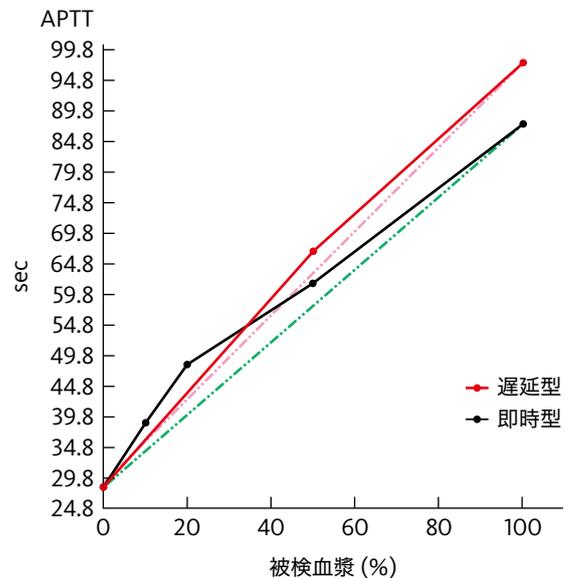


図 5. クロスキシングテストの自動希釈測定とグラフ作成, ICA 値の算出

A はインヒビターを保有しない血友病 A 患者。FVIII : 7%, ICA : 10.7. B は LA 陽性患者。FVIII : 36%, ICA : 38.7. LA (Lupus Anticoagulant)

CN-6000 で実施可能な技術にクロスミキシングテストの自動希釈測定とグラフ作成, ICA 値の算出が挙げられる。即時型は正常血漿と採血管をラックに載せて測定可能であり, 測定結果をもとに自動でグラフを作成, 出力ができる。遅延型は用手法で行う必要があるものの, 即時型の結果に割り当てて解析でき, 遅延型のグラフも重ね合わせて描出が可能である。ICA 値も同時に算出でき, 本検討で使用したインヒビターを保有しない血友病 A 患者と LA 陽性患者においても正しく判定することができた。本検討では ICA のカットオフ値を規法に従い 12.4 としたが, 用いる試薬の特性により変動することも考えられるため, 標準化することが必要と思われた⁶⁾。

メンテナンス面では光源がハロゲンランプから LED ランプに変更になったことで, ランプ交換の頻度も減り, 定期的に検査室で実施するメンテナンス項目が減ったと実感している。報告時間は処理能力が CS-2100*i* の約 2.5 倍であることに加えて, 凝固時間法で得られる凝固波形を 8 秒ごとに解析し, エンドポイントを検出した段階で結果報告される機能が搭載されており, 診療科への報告時間短縮が期待される。また, サンプルプローブの形状を改良したことでより少ない検体量で検査が実施可能となった。検量線作成については, 標準品を試薬テーブルに架設する必要がなくなり, サンプルラックでの運用が可能となった。またゼロ点補正やポイント置き換えによる検量線の補正も簡便であり, 精度管理における利便性も向上していると感じられた。

結 語

CN-6000 の導入に伴い CS-2100*i* との比較検討を行った結果, 良好な基礎性能を確認することができた。検体処理速度の向上により報告時間の短縮が期待され, 精度管理やメンテナンスも簡便に実施可能と思われた。

全自動血液凝固測定装置 CN-6000 : 医療機器製造販売
届出番号 28B1X10014000001

全自動血液凝固測定装置 CS-2100*i* : 医療機器製造販売
届出番号 28B2X10007000093

参考文献

- 1) 福武勝幸. 凝固検査の標準化の必要性和現状. 日本血栓止血学会誌. 2016 ; **27** (6) : 617-622
- 2) 小宮山豊. 凝固検査用サンプル取扱いの標準化. 日本血栓止血学会誌. 2016 ; **27** (6) : 623-630
- 3) 内場光浩. 実臨床における凝固線溶検査のピットフォール. 日本血栓止血学会誌. 2018 ; **29** (1) : 28-34
- 4) 日本臨床化学会クオリティマネジメント専門委員会. 定量測定法に関するバリデーション指針. 臨床化学. 2011 ; **40** (1) : 149-157
- 5) 大谷春華 他. 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 α 2-アンチプラスミンの基礎的評価. Sysmex Journal Web. 2018 ; **19** (2) : 1-11
- 6) Kumano O, Ieko M, Naito S, Yoshida M, Takahashi N, Suzuki T, et al. Lupus anticoagulant diagnosis in activated partial thromboplastin time mixing test : optimization of the index of circulating anticoagulant cut-off value. Clin Lab. 2014 ; **60** (12) : 2115-2118

Basic Evaluation of the Automated Blood Coagulation Analyzer CN-6000

Yuki HATAYAMA, Hitomi ICHIKAWA, Manabu ISHIMOTO, Akira YOSHIOKA,
Noriko YAMASHITA, Konami SHIMIZU, Satoshi NOGAMI and Tetsuya FUKUDA

Division of Clinical Laboratory, Tottori University Hospital, Yonago 683-8504, Japan

Blood coagulation test is necessary for diagnosis and treatment of thrombotic and bleeding disorders, and rapid and accurate measurements are required. We evaluated the new automated blood coagulation analyzer CN-6000 launched by Sysmex for introduction.

The coefficients of variation of intra- and inter-assay variability were less than 5.0% of all measurement items. Dilution linearity was observed up to 723.5 mg/dL in Fbg, 128.7 µg/mL in P-FDP, 114.1 µg/mL in DD and 18.5 µg/mL in PIC measurement, respectively. The lower detection limit was 2.3 µg/mL in P-FDP, 0.4 µg/mL in DD, 0.06 µg/mL in PIC measurement, respectively. There was no influence of interfering substance was observed in all items except APTT and FXIII up to 500 mg/dL of hemoglobin, 30 mg/dL of conjugated and unconjugated bilirubin and 3,000 FTU of turbidity. APTT measurements were affected in a bilirubin concentration-dependent manner. FXIII measurements were affected in a hemoglobin concentration-dependent manner. The correlation with the conventional model (CS-2100i) was good and the correlation coefficient was 0.99 for all items.

Automatic dilution measurement of cross-mixing test and creation of graph are also available, and index of circulating anticoagulant (ICA) calculated at the same time. It was confirmed that coagulation factor deficiency and inhibitor pattern were correctly judged.

As a result of evaluation with the introduction of CN-6000, we were able to confirm good basic performance. It is expected that the turn-around time will be shortened by improving the sample processing speed, and quality control and maintenance can be performed easily.

Key Words Automated Blood Coagulation Analyzer CN-6000, Cross-mixing Test, Index of Circulating Anticoagulant
