

全自動血液凝固測定装置 CS-5100 におけるレボヘム™ 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™ α 2-アンチプラスミンの基礎性能評価

徳 雅幸*¹，竹尾 映美*¹，前田 育宏*¹，上田 香織*²，大谷 春華*³，坂寄 輔*⁴，日高 洋*⁵

*1 大阪大学医学部附属病院 医療技術部：大阪府吹田市山田丘 2-15 (〒565-0871)

*2 シスメックス株式会社 大阪支店

*3 シスメックス株式会社 診断薬エンジニアリング本部

*4 シスメックス株式会社 臨床戦略本部

*5 大阪大学医学部附属病院 臨床検査部

合成基質法の血液検査用アンチトロンビンⅢキット レボヘム™ AT (シスメックス株式会社：以下、レボヘム AT、シスメックス)、血液検査用プロテイン C キット レボヘム™ プロテイン C (シスメックス：以下、レボヘム プロテイン C)、プラスミノゲンキット レボヘム™ プラスミノゲン (シスメックス：以下、レボヘム プラスミノゲン)、アルファ 2-アンチプラスミンキット レボヘム™ α 2-アンチプラスミン (シスメックス：以下、レボヘム α 2-アンチプラスミン) の基礎評価を行った。同時再現性の変動係数 (以下、CV) は正常域で 2 % 以下、異常域で 4 % 以下と良好であった。日差再現性の CV は正常域で 2 % 以下、異常域で 3 % 以下と良好であった。オンボード安定性は、対照試薬よりも安定性が長い結果となった。干渉物質への影響は、溶血ヘモグロビン、ビリルビン、乳びで測定値に影響しないことを確認した。希釈直線性は、レボヘム AT で 160 % まで、レボヘム プロテイン C で 180 % まで、レボヘム プラスミノゲンで 140 % まで、レボヘム α 2-アンチプラスミンで 160 % まで良好な直線性を確認した。対照試薬との相関性は、相関係数 0.99 以上と良好であった。

今回評価した試薬は良好な基礎性能を有していた。オンボード安定性が長く、既存製品の課題をユーザビリティの観点で解決している製品群であり、日常検査に有用であると考えられた。

キーワード 凝固線溶系マーカー、合成基質法、CS-5100

はじめに

凝固阻止因子であるアンチトロンビン (以下、AT) およびプロテイン C (以下、PC)、プラスミンの前駆体であるプラスミノゲン (以下、PLG) およびプラスミンと結合し凝固線溶を阻止する α 2-アンチプラスミン (以下、 α 2-AP) は、DIC や先天性血栓性素因の診断などに用いるマーカーである。今回、シスメックス株式会社 (以下、シスメックス) より発

売された、合成基質法による新規試薬である血液検査用アンチトロンビンⅢキット レボヘム™ AT (以下、レボヘム AT)、血液検査用プロテイン C キット レボヘム™ プロテイン C (以下、レボヘム プロテイン C)、プラスミノゲンキット レボヘム™ プラスミノゲン (以下、レボヘム プラスミノゲン)、アルファ 2-アンチプラスミンキット レボヘム™ α 2-アンチプラスミン (以下、レボヘム α 2-アンチ

プラスミン)を評価する機会を得たので、基礎性能および当院で運用している既存製品との比較検討について報告する。

実験材料および方法

1. 対象

検量線作成時の標準品として検討試薬ではコアグトロール N (シスメックス), 対照試薬では血液凝固標準ヒト血漿 (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コアグトロール IX・IIX (シスメックス) を用いた。検体には、2014年12月1日から2015年3月31日の期間で当院を受診し、当院ホームページ上の研究説明に同意した止血検査依頼のある患者の3.2%クエン酸ナトリウム加血漿の残余検体を用いた。なお、研究は大阪大学医学部附属病院 臨床研究倫理審査委員会 (承認番号 14105) およびシスメックス株式会社倫理委員会 (登録番号 2014-23) で承認された。

2. 測定装置

測定装置は全自動血液凝固測定装置 CS-5100¹⁾ (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1に示した。

4. 検討方法

1) 同時再現性

コアグトロール IX・IIX および正常域・異常域の血漿を用いて、20回連続測定を実施した。

2) 日差再現性

コアグトロール IX・IIX を用いて、5日間連続でそれぞれ5回測定を実施した。

3) オンボード安定性

30テスト分 (デッドボリューム含む) となるよう液量を調整した試薬を装置内に常時開栓設置し、コアグトロール IX・IIX を5日間連続でそれぞれ2回測定した。

4) 干渉物質の影響

正常域および異常域のプール血漿に干渉チェック・A プラス (シスメックス) を用いて遊離型ビリルビン (F), 抱合型ビリルビン (C), 溶血ヘモグロビンおよび乳びの影響を確認した。

5) 希釈直線性

高値の臨床検体と緩衝液を混合して活性比が等間隔となるよう10段階の希釈系列を作製し、各濃度2回測定した。

6) 相関性

臨床検体を用いて、対照試薬との相関を評価した。

表1. 使用試薬一覧

	検討試薬	対照試薬
AT	レボヘム AT	AT 試薬 (A社)
PC	レボヘム プロテイン C	PC 試薬 (A社)
PLG	レボヘム プラスミノゲン	PLG 試薬 (A社)
α 2-AP	レボヘム α 2-アンチプラスミン	α 2-AP 試薬 (A社)
緩衝液	イミダゾール緩衝液	オーレンベロナール緩衝液

結 果

1) 同時再現性

20回連続測定したAT, PC, PLGおよび α 2-APの変動係数(以下, CV)は正常域では1.0~1.3%, 異常域では0.8~3.1%であった(表2).

2) 日差再現性

5回連続測定を5日間実施したAT, PC, PLGおよび α 2-APのCVは, 正常域では0.3~1.4%, 異常域では0.7~2.9%であった(表3).

3) オンボード安定性

オンボード安定性の許容範囲を正常域・異常域とも変動率 $\pm 10\%$ としたとき, PC, PLGについては評価試薬, 対照試薬とも5日まで安定であった. ATについてはレボヘムは3日まで, 対照試薬は1日まで, α 2-APについてはレボヘムは2日まで, 対照試薬は1日まで安定であり, 評価試薬は対照試薬と比較してオンボード安定性が長かった(図1).

表2. 同時再現性

	N = 20	コアグトロール IX	コアグトロール IIX	サンプル1: 正常域血漿	サンプル2: 異常域血漿
AT	Mean (%)	100.9	30.3	103.3	40.9
	SD	1.0	0.9	1.1	1.3
	CV (%)	1.0	3.1	1.1	3.1
PC	Mean (%)	94.9	28.2	102.2	34.1
	SD	1.0	0.5	1.0	0.3
	CV (%)	1.1	1.7	1.0	1.0
PLG	Mean (%)	108.1	32.4	107.7	35.5
	SD	1.1	0.6	1.2	0.3
	CV (%)	1.0	2.0	1.1	0.8
α 2-AP	Mean (%)	99.3	38.0	102.7	43.9
	SD	1.3	0.8	1.0	0.8
	CV (%)	1.3	2.2	1.0	1.8

表3. 日差再現性

	N = 5	コアグトロール IX	コアグトロール IIX
AT	Mean (%)	100.6	30.3
	SD	1.4	0.9
	CV (%)	1.4	2.9
PC	Mean (%)	96.3	27.8
	SD	0.3	0.2
	CV (%)	0.3	0.7
PLG	Mean (%)	107.8	32.3
	SD	0.3	0.6
	CV (%)	0.3	1.8
α 2-AP	Mean (%)	100.7	38.5
	SD	0.4	0.7
	CV (%)	0.4	1.8

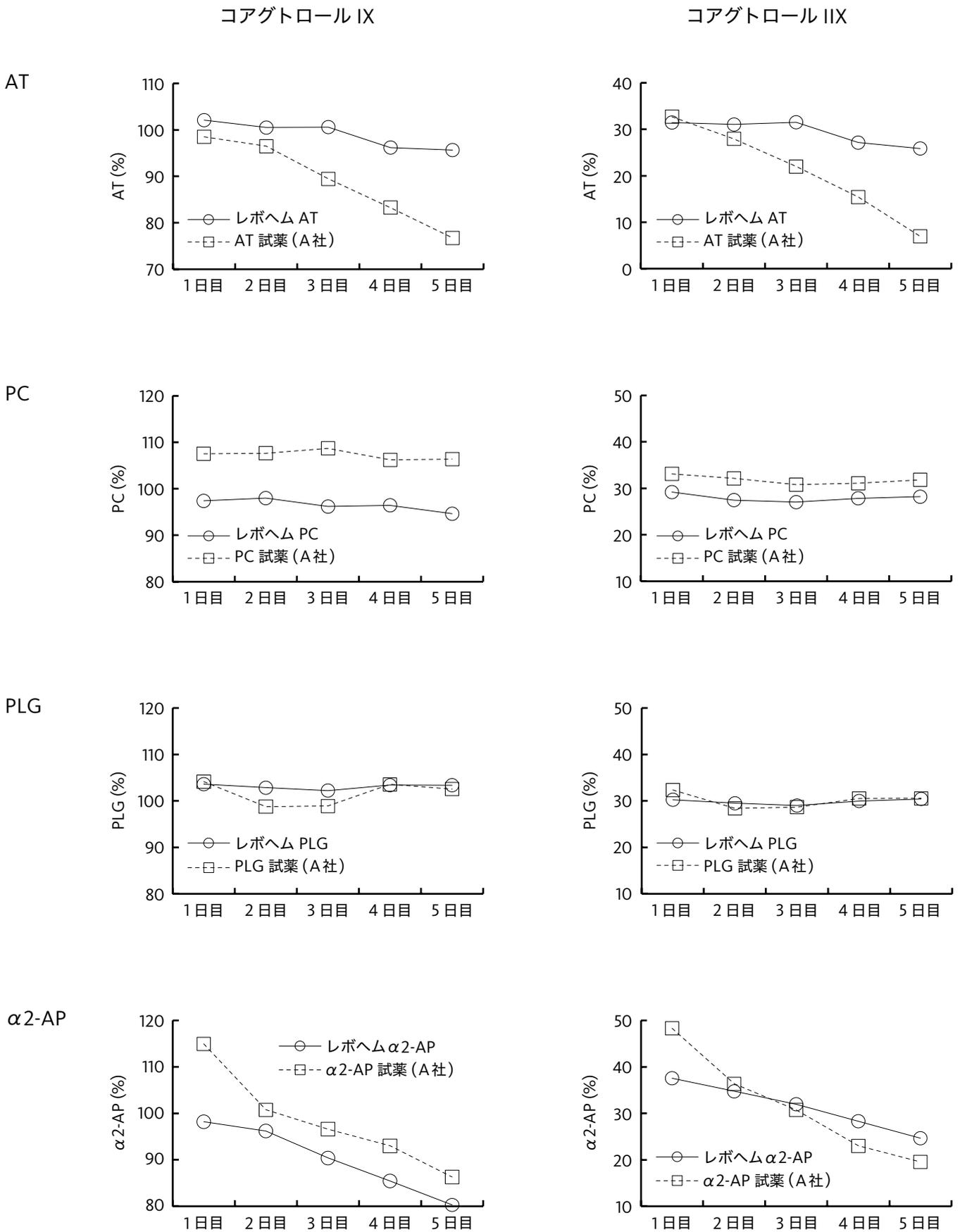


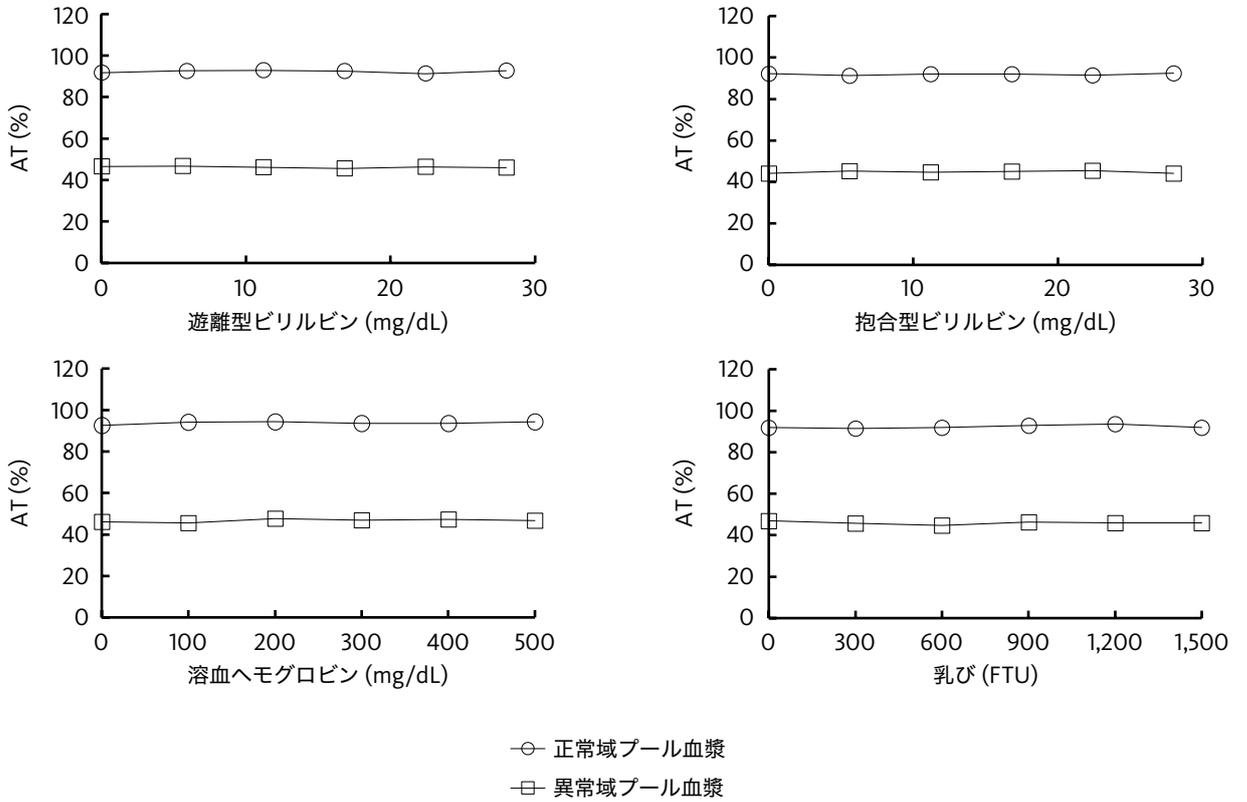
図1. オンボード安定性

4) 干渉物質の影響

評価した4試薬すべてにおいて変動率±10%を許容としたとき、遊離型ビリルビンは28 mg/dL、抱合型ビリルビンは28 mg/dL、溶血ヘモグロビンは

500 mg/dL、乳びは1,500ホルマジン濁度の濃度までそれぞれ測定値に影響しないことを確認した(図2a, 図2b)。

AT



PC

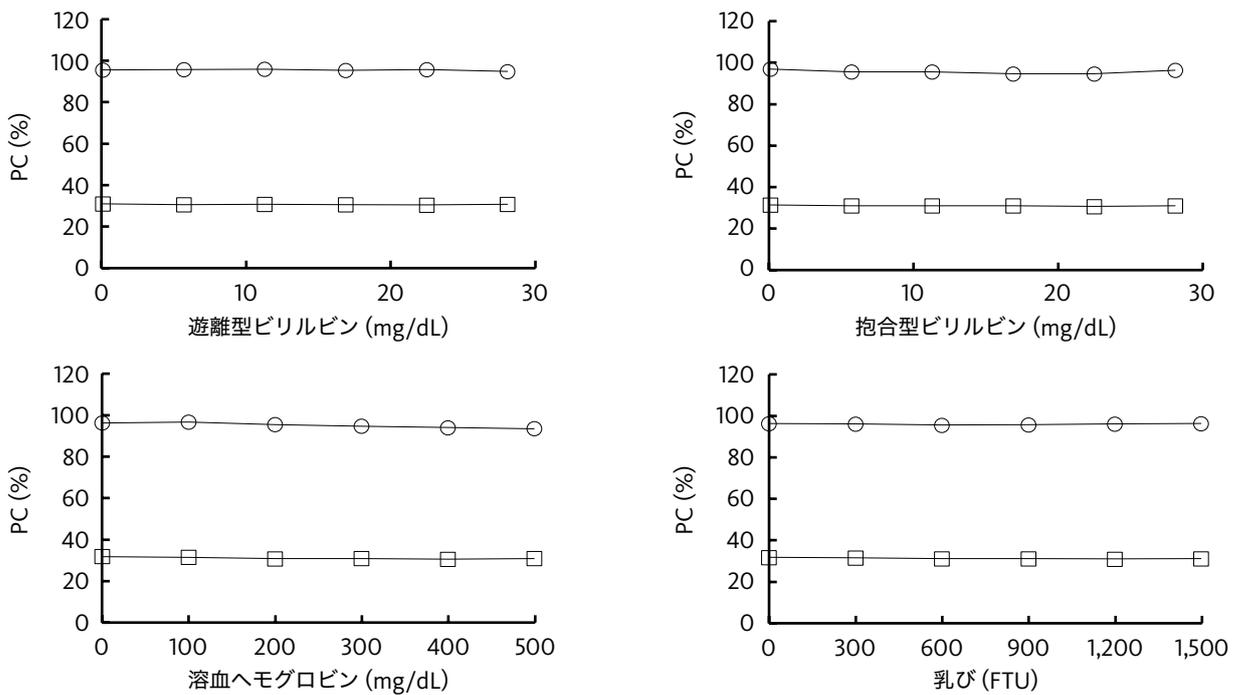
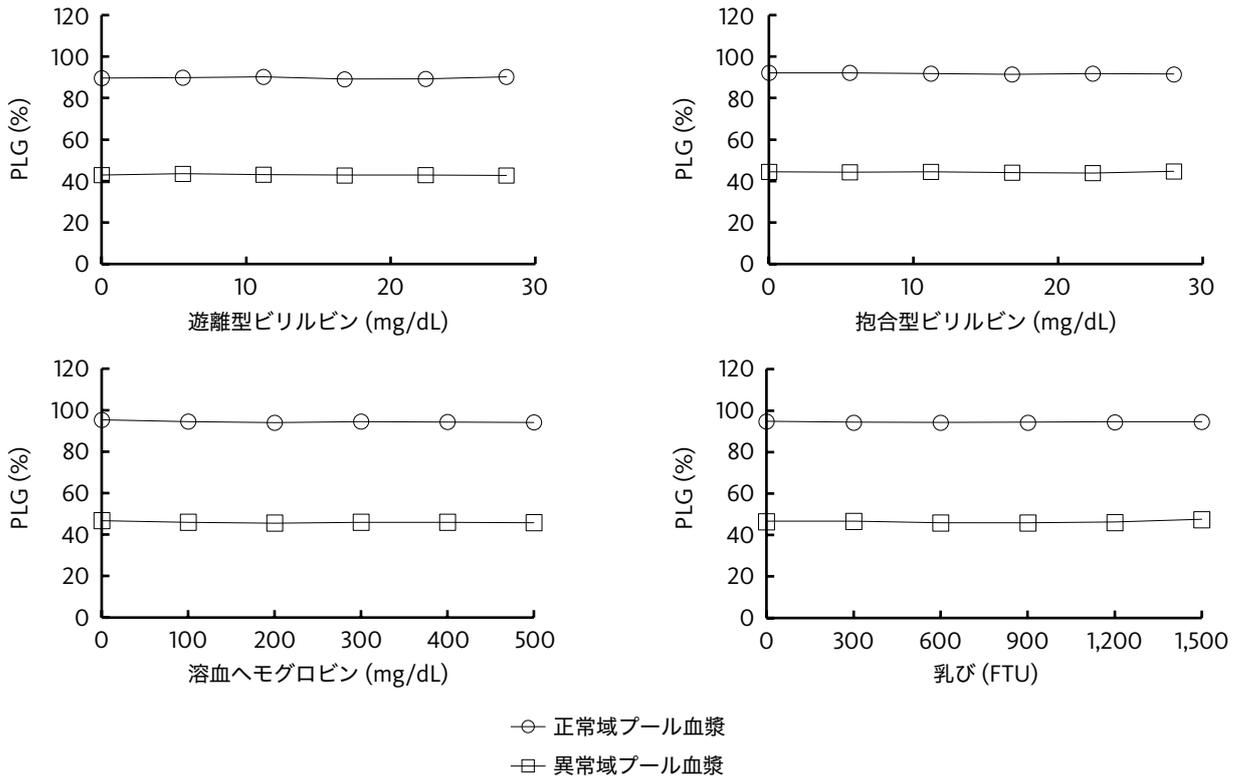


図2a. 干渉物質の影響

PLG



$\alpha 2$ -AP

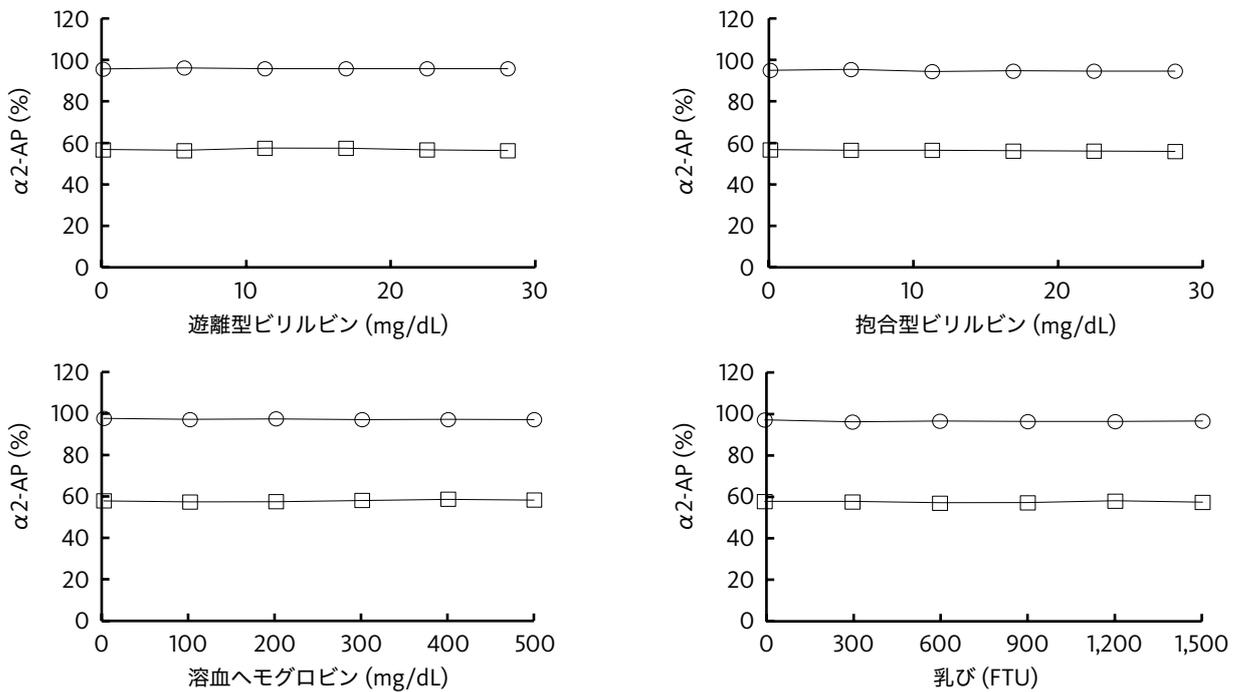


図2b. 干渉物質の影響

5) 希釈直線性

ATは160%まで、PCは180%まで、PLGは140%まで、 $\alpha 2$ -APは160%まで直線性を確認した(図3).

6) 相関性

一次回帰式および相関係数 (r) は n = 90 にお

いて AT (%) : $y = 1.03x + 4.06$, $r = 0.999$, $n = 82$ において PC (%) : $y = 1.03x + 2.26$, $r = 0.999$, $n = 92$ において PLG (%) : $y = 0.95x - 5.05$, $r = 0.994$, $n = 75$ において $\alpha 2$ -AP (%) : $y = 1.00x - 2.16$, $r = 0.991$ と良好な相関を示した(図4).

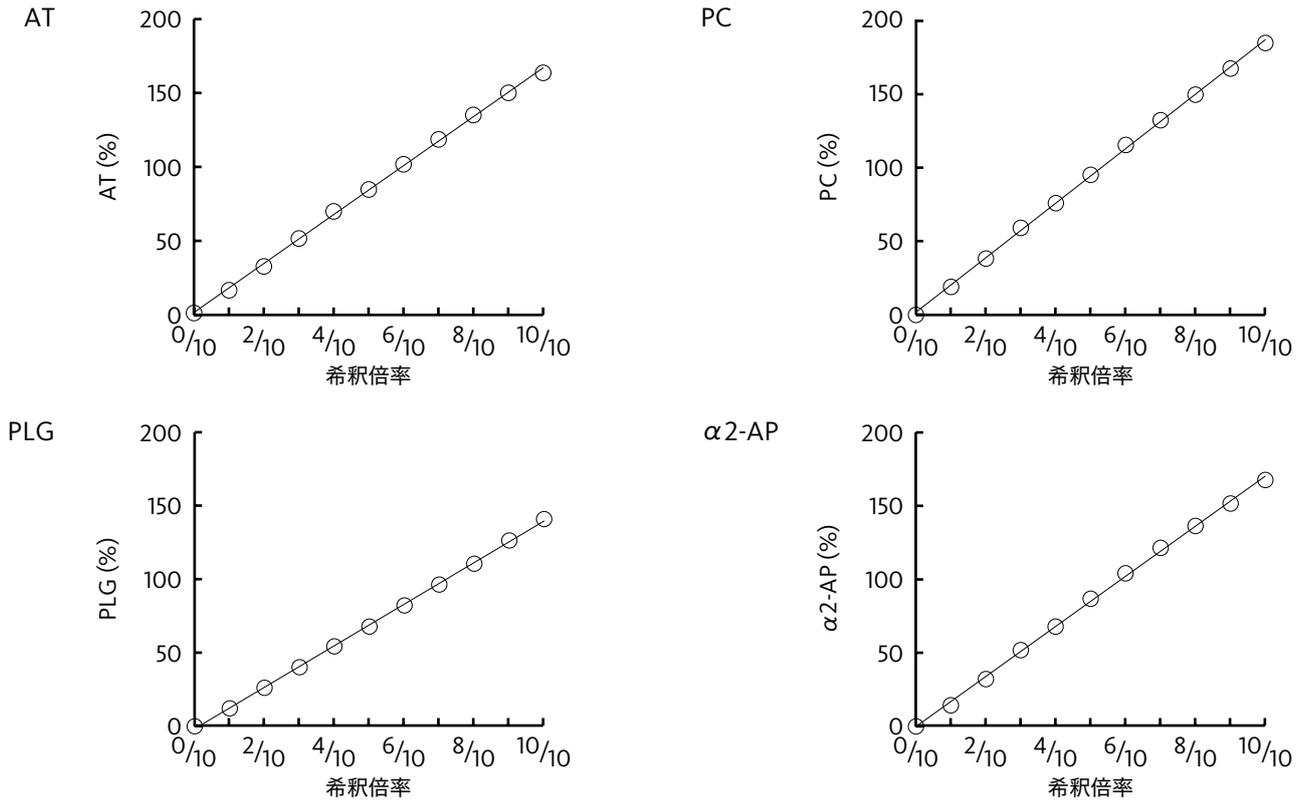


図3. 希釈直線性

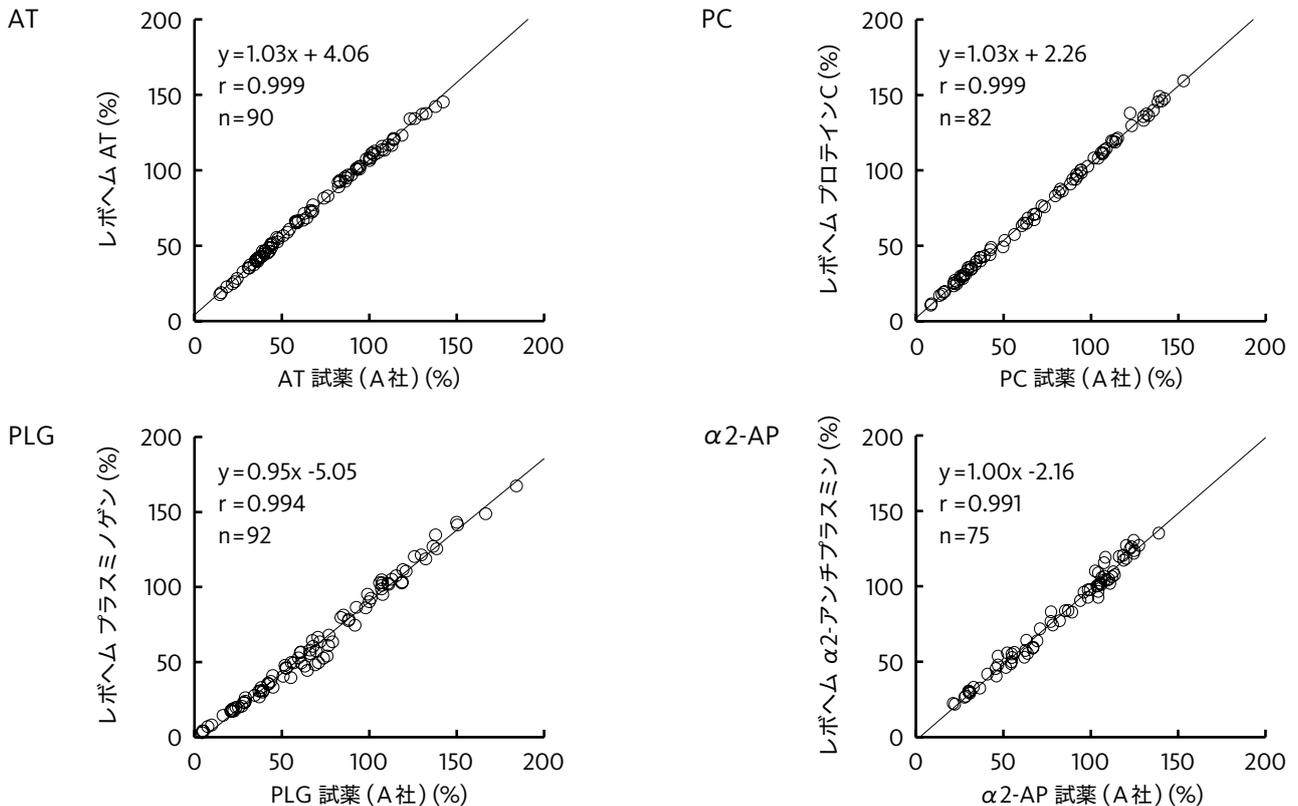


図4. 相関性

考 察

今回我々は、新たに開発された、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評価（同時再現性・日差再現性・干渉物質の影響）、既存製品とのオンボード安定性ならびに相関性についての比較検討を実施した。

同時再現性・日差再現性・干渉物質の影響および既存製品との相関性については良好な結果であったことから、日常検査において十分な基礎性能を有していることが考えられた。AT や α 2-AP の右下がりの検量線の項目では、日常検査においてオンボード安定性が劣化しやすいが、今回検討したレボヘム AT およびレボヘム α 2-アンチプラスミンは既存製品よりも AT で 2 日間（1 日から 3 日）、 α 2-AP で 1 日間（1 日から 2 日）オンボード安定性の期間が延長していた。オンボード安定性は評価する時期や評価条件によって異なり注意が必要であるが、今回の結果から考えると試薬交換などによるコスト低減に繋がることを期待される。

評価試薬は適応する血液凝固測定装置へ適切なアプリケーションが施されており、既存製品では R1/R2 吸引量が異なり試薬設置に注意を要するが、評価試薬では R1/R2 吸引量が等量であるため、廃棄が少なくユーザビリティが向上している。その他に、製造後の有効期限が対照試薬とした既存製品（13 ヶ月）よりも長い（評価試薬は 24 ヶ月）など、液状試薬が主流のこれらの項目においてさらにユーザビリティを向上させようとして設計された製品であることが考えられた²⁾。

AT は日本血栓止血学会が公表した DIC 診断基準 2017 年度版で新たに追加された³⁾。 α 2-AP については、DIC 診断基準には掲載されていないものの、その有用性についても報告されている⁴⁾。また、プロテイン S とともに、AT および PC の先天的欠乏による特発性血栓症（遺伝性血栓性素因によるものに限る。）（指定難病 327）が、2017 年度より難病指定されたことから⁵⁾、これらの項目に対する標準化に向けた検査ニーズは今後増えていくことが考えられる。

今回評価した合成基質法による新規試薬であるレボヘム 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 α 2-アンチプラスミンは十分な基礎性能を有し、これまで課題であったオンボード安定性を改善、ユーザビリティも向上しており、日常検査に有用であると考えられた。

全自動血液凝固測定装置 CS-5100：医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000021

血液検査用アンチトロンビン III キット レボヘム™ AT：製造販売届出番号 28E1X80030000065

血液検査用プロテイン C キット レボヘム™ プロテイン C：製造販売届出番号 28E1X80030000066

プラスミノゲンキット レボヘム™ プラスミノゲン：製造販売認証番号 230ABEZ00089000

アルファ 2-アンチプラスミンキット レボヘム™ α 2-アンチプラスミン：製造販売認証番号 230ABEZ00090000

イミダゾール緩衝液：製造販売届出番号 28E1X80030000062

参考文献

- 1) 徳 雅幸, 竹尾映美, 松本智紗, 他. 全自動血液凝固測定装置 CS-5100 の基礎的検討. *Sysmex Journal Web*. 2013; **14** (3): 1–10.
- 2) 大谷春華, 坂寄 輔, 北野圭介, 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.
- 3) Aota T, Wada H, Fujimoto N, 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.
- 4) 内場光浩. DIC 凝固系制御と線溶系制御の破綻状態. *日本検査血液学会雑誌* 2018; **19**: 1–8.
- 5) 難病情報センター <https://www.nanbyou.or.jp/entry/5419> (アクセス日: 2021 年 4 月 14 日)

Basic Performance Evaluation of Revohem™ AT, Revohem™ Protein C, Revohem™ Plasminogen, and Revohem™ α 2-AP by the Automated Coagulation Analyzer CS-5100

Masayuki TOKU*¹, Emi TAKEO*¹, Ikuhiro MAEDA*¹, Kaori UEDA*², Haruka OTANI*³,
Tasuku SAKAYORI*⁴ and Yoh HIDAKA*⁵

*1 Department of Medical Technology, Osaka University Hospital, 2-15, Yamadaoka, Suita-shi, Osaka, 565-0871, Japan

*2 Osaka Branch, Sysmex Corporation

*3 Reagent Engineering, Sysmex Corporation

*4 Medical Affairs, Sysmex Corporation

*5 Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Hospital

In this study, we evaluated the basic performance of Revohem™ AT, Revohem™ Protein C, Revohem™ Plasminogen, and Revohem™ α 2-AP through chromogenic assay. The coefficient of variation (CV) in the within-run imprecision showed good results with 2% or less at the normal level and 4% or less at an abnormal level. The coefficient of variation (CV) in the between-day imprecision showed good results with 2% or less at the normal level and 3% or less at an abnormal level. The on-board stability was longer than the reference reagents. No interference by materials such as hemoglobin, bilirubin, or triglyceride was observed. The linearity test showed a good linearity of up to 160% with Revohem AT, 180% with Revohem Protein C, 140% with Revohem Plasminogen, and 160% with Revohem α 2-AP. Correlation with reference reagents using clinical samples was good, with correlation coefficients of 0.99 or higher.

As a result of this evaluation of Revohem reagents, we were able to confirm good basic performance. We understand that Revohem reagents will contribute to the efficiency of our laboratory examinations.

Key Words

Coagulation and Fibrinolytic Markers, Chromogenic Substrate Method, CS-5100
