

マルチウェーブ検出方式を搭載した 高速処理 全自動血液凝固測定装置 CS-5100 の評価

A. S. Lawrie, J. M. Iseppi, I. J. Mackie and S. J. Machin

Haemostasis Research Unit, Department of Haematology, University College London, London. UK.
51 Chenies Mews, London. WC1E 6HX. UK.

要 旨

我々は、シスメックス社から発売された高速処理を可能とする全自動血液凝固測定装置 CS-5100 について、同シリーズの中速処理モデルである CS-2000i (シスメックス社) を対照機種として、性能の評価を行った。本装置は、CS-2000i が 10 チャンネルのマルチウェーブ検出部の搭載であったものを 20 に増やすことで、ほとんどのバッチ測定で処理時間を半減させることを可能としている。

今回、凝固法であるプロトロンビン時間 (PT)、活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT)、フィブリノゲン定量 (Fbg)、凝固 1 段法による第VIII因子活性 (FVIII)、合成基質法のアンチトロンビン (AT)、第XIII因子活性 (FXIII)、免疫比濁法の D ダイマー (DDi)、フォンビレブランド因子抗原量 (VWF:Ag) と血小板凝集法を原理としたフォンビレブランド因子 リストセチンコファクター活性 (VWF:RCo) について評価した。第VIII因子活性と VWF:RCo の測定は、複数の段階希釈したサンプルデータから直線性と検量線との平行性を確認することでインヒビターの存在あるいはサンプルの活性化状態を検出できるマルチダイリューション測定 (MDA) にて測定した。その他の項目については、測定値が検量線の範囲外となった場合は、自動再希釈測定を実施した。

CS-5100 の検量線の再現性および直線性は良好な結果を示した。正常域と異常域コントロール血漿を用いて、連続 10 回測定を 5 日間実施し、測定値の再現性を確認したところ、それぞれ CV が 0.73 ~ 6.3%, 0.04 ~ 9.9% であった。また、臨床検体を用いた CS-2000i との比較では、いずれの項目においてもデータは回帰直線に近接して分散し、 R^2 値が 0.96 ~ 0.99 と良好な相関性がみられ、臨床的に問題となるような乖離は認められなかった。

評価結果では、CS-5100 はルーチンの凝固項目と特殊項目ともに許容できる再現性であり、CS-2000i との相関性も良好であることが明らかになった。

キーワード 血液凝固測定装置, 高速処理, マルチウェーブ検出法

はじめに

検査室の集中化と緊急検査数の増加により、ターンアラウンドタイムの短縮と高速処理が可能な血液凝固測定装置の必要性が高まっている。シスメックス株式会社は、CA シリーズ^{3~6)} に継ぐ次世代の血液凝固測定装置として CS シリーズ^{1,2)} を上市した。

全自動血液凝固測定装置 CS-5100 (CS-5100) は、凝固法、合成基質法および免疫比濁法などの従来の測定項目に加え、アンモニア放出を利用した凝固XIII因子測定⁷⁾ と血小板凝集によってフォンビレブランド因子のリストセチンコファクター活性を測定する機能を備えている^{8,9)}。この新しいシリーズの装置は、測定前に測定サンプルの品質をチェックすることが

* 本稿は、Sysmex Journal. 2011; 21 (1): 1-9 より転載いたしました。

可能である。その1つが、採血管内の採血量が適切か否かを判定する採血量チェック機能である。ユーザがあらかじめ設定した判定閾値にもとづいて、採血量が不適正であったサンプルには測定結果にフラグを付与する。また、別のチェック機能として、測定前に3波長(405nm, 575nm および 660nm)の吸光度を測光することで、サンプルが溶血(H: Haemolysed)、黄疸(I: Icteric) および乳び(L: Lipaemic)といった生理的干渉物質を含んでいるかを判定する HIL チェック機能がある²⁾。

CS-5100 は、中速処理モデルの CS-2000*i* が 10 チャンネルのマルチウェーブ検出部の搭載であったものを 20 チャンネルに増やしており、ほとんどのバッチ測定での処理時間を半減させることを可能としている(図 1)。加えて、採血管からの血漿吸引には、キャッ

プピアシングとキャップピアシングなしのいずれかを選択することができる。キャップピアシングなしの吸引は、採血管からのサンプルを一次分注するのではなく、測定項目毎に直接採血管から血漿を吸引し、反応キュベットへ分注する微量モード用である。微量モードは、通常モード(キャップピアシング使用時)に比べ採血管からの吸引量が少量ですむため、検体量が少ないときに有用な機能である。

今回、我々は CS-2000*i* を対照機種とし、CS-5100 の性能評価を行った。検討は 2 段階に分けて実施し、先に、精度管理物質の 2 濃度コントロール血漿を用いて、測定値の再現性を評価した。次に、正常および臨床のサンプルを対象として、CS-5100 と CS-2000*i* の測定値の相関性を評価した。



- Size of Main Unit : 1030mm×1150mm×1270mm (W×D×H)
- Weight : 284Kg
- Sampling Modes : Cap Piercing or Micro Mode
- Reaction Types : Clotting, Chromogenic, Immunoturbidometric, Agglutination
- Number of Reaction Detectors : 20 Multi-wavelength, 8 Stirred
- Capacity of Sampler Unit : 10×10 samples racks

図 1. Physical Description of CS-5100

材料および方法

全ての評価において、試薬はシーメンス社製を、装置はCS-5100（シスメックス社）と対照としてCS-2000i（シスメックス社）を使用した。デイドイノビンとアクチンFSは、それぞれプロトロンビン時間（PT）と活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）に使用し、フィブリノゲン（Fbg：データファイブリノゲン）はクラウス法にて測定した。アンチトロンビン（AT：イノバンスAT）と凝固第XIII因子（FXIII：ベリクロームFXIII）は合成基質法、Dダイマー（DDi：イノバンスDダイマー）は免疫比濁法にて測定した。凝固第VIII因子活性（FVIII：アクチンFS、第VIII因子欠乏血漿）は凝固1段法、VWF:RCo（BCフォンビレブランド試薬）はリストセチンによる血小板凝集法によって測定した。また、FVIIIおよびVWF:RCoは、マルチダイリユーシオン測定機能（MDA）を使用して3段階希釈のサンプルをそれぞれ測定した。MDAは、3段階の希釈サンプルによる直線性と標準血漿である血液凝固試験用標準ヒト血漿（SHP、シーメンス社）による検量線との平行性を比較するこ

とで、凝固因子と生理的インヒビターのレベルを評価する機能である。PTのINRは、AKキャリブラント（テクノクロン社）により設定したローカルISI（International Sensitivity Index）にて算出した。

再現性の評価は、シーメンス社の正常域および異常域の凍結乾燥血漿を用いて実施した。PTとAPTTにはサイトロール1、2および3、Fbg、FVIII、FXIII、VWF:RCoとATにはコントロール血漿N（CPN）とコントロール血漿P（CPP）、DDiにはイノバンスコントロール1（正常域）とコントロール2（異常域）を使用した。PT、APTT、Fbg、FXIII、AT、DDiは、それぞれのコントロールの10回測定を5日間行い、FVIIIとVWF:RCoは、10回測定5日間をMDA測定にて実施した。相関性の評価では、対象を正常者（n=30）と表1に示す様々な臨床群から採取した。そのうち、フォンビレブランド病（VWD）の患者サンプルは、多様なサブタイプ（Type 1, n=14；Type 2A, n=2；Type 2B, n=8；Type 2M, n=9；Type 2N, n=2；Type 3, n=3；Acquired, n=1 計 n=39）から採取した。

表1. Sample groups tested to compare results from CS-5100 and CS-2000i

Normal	n = 30			
Haemolysed	n = 10 (PlasmaHb 0.5–5.7g/L)			
Icteric	n = 20 (Total Bilirubin up to 350 µmol/L)			
Lipaemic	n = 40 (Cholesterol up to 8.6 mmol/L) (Triglycerides up to 9.4 mmol/L)			
D-Dimers Positive	n = 40 (>0.5 mg/L FEU)			
High Fibrinogen	n = 10 (>4.0 g/L)			
Low Fibrinogen	n = 10 (<1.5 g/L)			
Warfarin	n = 20 (INR >1.5)			
Heparin (UF)	n = 10 (0.17–0.80 iu/mL)			
Heparin (LMWH)	n = 10 (0.42–0.97 iu/mL)			
LA Positive	n = 20			
VWD	n = 39			
Biochemical Reference Ranges	Plasma Hb (g/L)	Total Bilirubin (µmol/L)	Cholesterol (mmol/L)	Trig Llycerides (mmol/L)
	< 0.5	< 17	3.60 –5.20	0.46 –1.88

生化学項目の総ビリルビン (Bil), コレステロール (Chol) およびトリグリセライド (Trig) はコバスマイラ (Horiba ABX-UK, Northampton, UK) と Horiba ABX 試薬を用いて定量測定した。血漿ヘモグロビン (Plasma Hb) は HemoCue, Plasma/Low Hb Photometer (HemoCue Ltd, Dronfield, Derbyshire, UK) にて測定した。

統計解析は, Analyse-It®ソフトウェアバージョン 2.03 (Analyse-It Software Ltd, www.analyse-it.com) を用いた。データは正規分布を確認した後, 集計結果の平均と標準偏差を示し, ピアソンの相関にて両側検定を用い, $p < 0.05$ を有意とみなした。

結果

再現性の評価は, 正常域および異常域の凍結乾燥血漿 (シーメンス社) の 10 回測定を 5 日間実施した。CS-5100 の各項目の変動係数 (CV) を計算したところ, 全ての項目において, ばらつきは許容できるレベルであった (表 2)。最も大きいばらつきを示したのは, MDA による FVIII (CPN 5.6%, CPP 7.1%) と VWF:RCo (CPN 6.3%, CPP 9.9%) であった。

表 2. CS-5100 inter-assay imprecision

	Control	Min	Max	Mean	SD	CV (%)
PT (s)	Citrol 1	11.4	11.7	11.5	0.08	0.73
	Citrol 2	30.9	31.9	31.4	0.24	0.76
	Citrol 3	53.4	55.5	54.5	0.44	0.81
APTT (s)	Citrol 1	27.4	27.9	27.6	0.10	0.38
	Citrol 2	50.2	51.6	50.8	0.30	0.58
	Citrol 3	71.1	72.9	72.2	0.51	0.70
Fbg (g/L)	CPN	2.22	2.60	2.38	0.09	3.96
	CPP	0.70	0.82	0.75	0.03	0.04
FVIII (%)	CPN	77.8	98.4	87.3	4.89	5.60
	CPP	26.4	35.4	30.9	2.18	7.08
VWF:RCo (%)	CPN	76.8	108.0	92.2	5.83	6.32
	CPP	21.3	34.0	26.3	2.61	9.92
FXIII (%)	CPN	77.2	91.4	85.3	2.83	3.32
	CPP	23.7	32.3	27.6	1.64	5.94
AT (%)	CPN	95.9	105.8	99.7	2.14	2.14
	CPP	33.6	36.8	35.2	0.87	2.46
DDi (mg/L FEU)	Control 1	0.29	0.36	0.32	0.02	5.47
	Control 2	2.54	2.92	2.71	0.09	3.48

PT: Prothrombin Time, APTT: Activated Partial Thromboplastin Time, Fbg: Clauss Fibrinogen, FVIII: Factor VIII, VWF:RCo: Von Willebrand Factor Ristocetin Co-factor activity, FXIII: Factor XIII, AT: Antithrombin; DDi: D-Dimer, CPN = Control Plasma N, CPP = Control Plasma P

CS-2000*i* との相関性の評価では、測定値は回帰直線上に近接して分散しており、全ての項目において良好な相関性（ピアソン相関）が認められた（**図 2, 3**）。特に、生理的干渉物質を含んだサンプル群（溶血、黄疸および乳び、計 $n=70$ 、**表 1**）における PT の相関性は、 $R^2=0.999$ ($p < 0.0001$) と非常に良好であった。同様に、ワルファリン投与患者のサンプルを対象とした INR においても、 $R^2=0.995$ ($p < 0.0001$) となり、正常者サンプルでも同様の傾向が見られた（**図 2B**）。全サンプルを対象とした際、アクチン FS による APTT の相関性は、 $R^2=0.983$ ($p < 0.0001$) と良好であった。VWF:Ag（**図 4A**）と VWF:RCo（**図 4B**）についても、良好な相関を示し、 R^2 値はそれぞれ 0.995 と 0.990 であった ($p < 0.0001$)。VWD のサブタイプの分類に用いられる VWF:Ag と VWF:RCo の比は、両装置間において同等の結果となった（**図 5**）。また、PT 以外の項目（APTT, Fbg, AT, FXIII および DDi）における生理的干渉物質を含むサンプルを対象とした相関性も良好な結果であった（**図 2, 3**）。ただ、FVIII の高活性域で一部の黄疸サンプルが回帰直線から外れ、CS-2000*i* において、より高値となる傾向がみられたが、 R^2 値は 0.967 ($p < 0.0001$) と良好であった（**図 3A**）。

分析の処理能力については、測定開始時（測定前の装置の初期化も含む）から計算し、50 検体の処理結果から算定した。PT と APTT の組み合わせにおける処理速度は、CS-5100 が 1 時間あたり 150 検体であるのに対して、CS-2000*i* は 1 時間あたり 51 検体であった。PT 単項目では、CS-5100 で 1 時間あたり 300 検体以上の分析が可能であり、CS-2000*i* のほぼ 2 倍の処理速度であった。VWF:Ag については、CS-5100 が 169 検体の処理に対し、CS-2000*i* は 72 検体の処理速度であった。VWF:RCo については、1 時間あたり CS-5100 が 26 検体、CS-2000*i* が 19 検体と、わずかに増加していた。

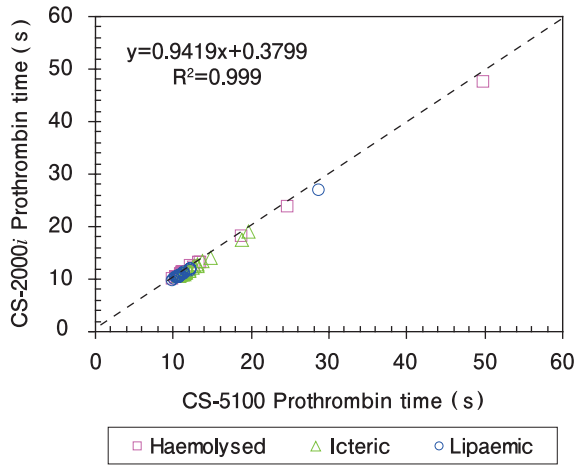
考 察

今回の検討は、中速処理モデルである CS-2000*i* を対照装置として CS-5100 の性能を評価した。測定項目は PT, APTT, Fbg, FVIII, FXIII, VWF:RCo, AT および DDi で、それぞれの測定値の再現性と相関性を評価した。正常域および異常域血漿の同時再現性（データは示していない）と日差再現性のばらつきは小さかった。ただし、FVIII と VWF:RCo においては、比較的高い CV 値が認められたが、その分散は MDA 測定としては、許容の範囲内であった⁸⁾。なお、検量線はコントロール血漿を測定する前に毎回作成した。

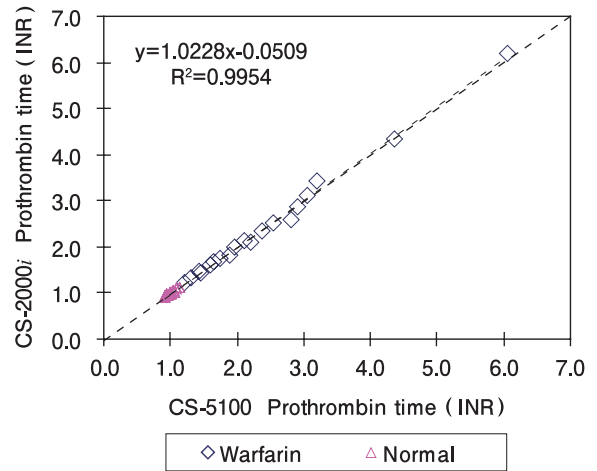
相関性の評価は、様々な疾患の患者サンプル（**表 1**）を用いて、CS-2000*i* と測定値の比較を行った。全ての項目において、両機種間で統計的に有意な相関が認められ、大部分の項目で測定値の分布に偏りは見られず、回帰直線に近接していた（**図 2 ~ 4**）。ワルファリン投与患者サンプルの INR は、AK キャリブラントによるローカル ISI から算出しており、1.5 ~ 6.0 の範囲においては R^2 値が 0.995 ($p < 0.0001$) と良好な相関が認められ、正常人のサンプルと同様、回帰直線上あるいは近傍に分布していた（**図 2B**）。VWF:Ag と VWF:RCo においても良好な相関性が認められ（**図 4**）、VWD のサブタイプの分類に用いられる VWF:Ag/VWF:RCo 比においても、2 型 VWD の患者 サンプルで 0.7 以下となり（**図 5**）、VWF の質的異常を示す結果となった。

今回、光学的検出原理への影響を検討するため、溶血、黄疸および乳びといった生理的干渉物質を含むサンプルを評価に用いた。これらのサンプルの大部分で、血漿ヘモグロビン、総ビリルビン、トリグリセライドおよびコレステロールの濃度は正常参考範囲を上回っていたが、いずれの項目においても測定値への影響はほとんどみられなかった。また、これらのサンプルにおいては、サンプルの品質をチェックする HIL チェック機能が正確に働き、1 つのサンプルに複数の干渉物質が同時に検出された。ただし、この機能はキャップピアシングを使用した標準モードにおいてのみ使用することができる。CS-5100 で付加された HIL フラグの種別は、大部分

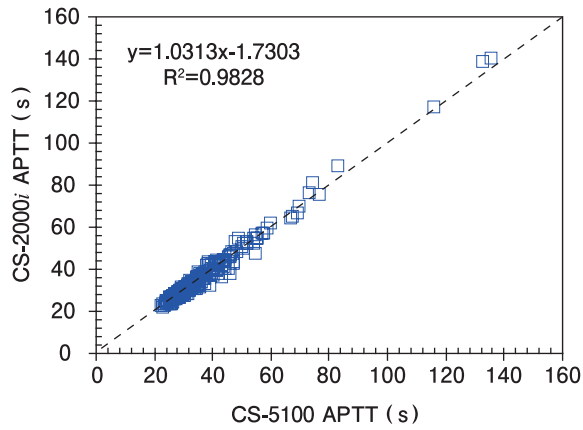
(A) PT HIL Samples Only



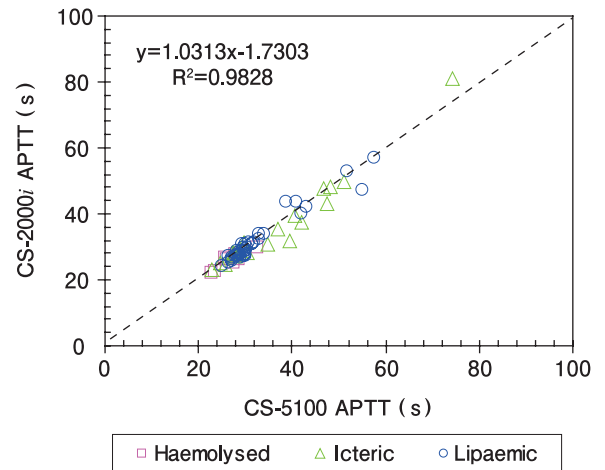
(B) PT Warfarin and Normal Samples Only



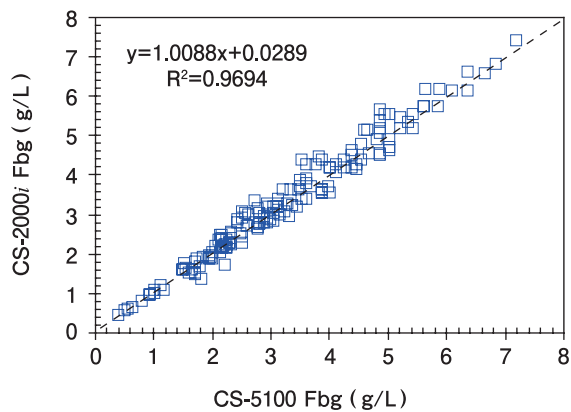
(C) APTT All samples



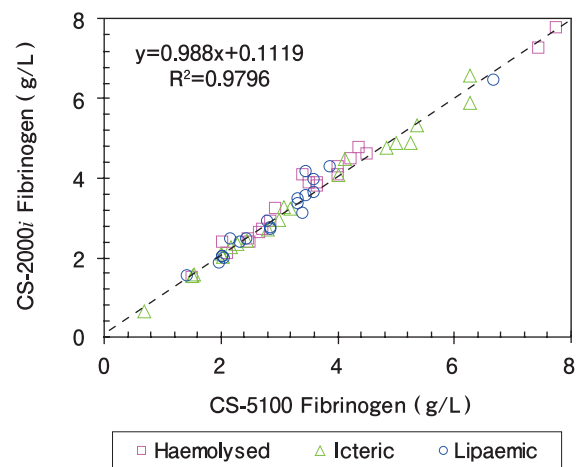
(D) APTT HIL Samples Only



(E) Fbg All samples



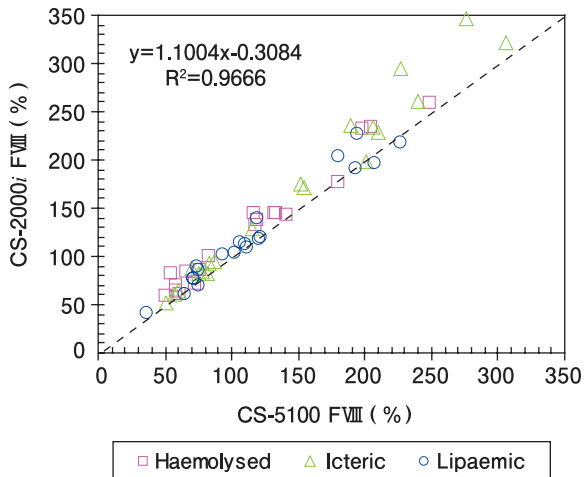
(F) Fbg HIL Samples Only



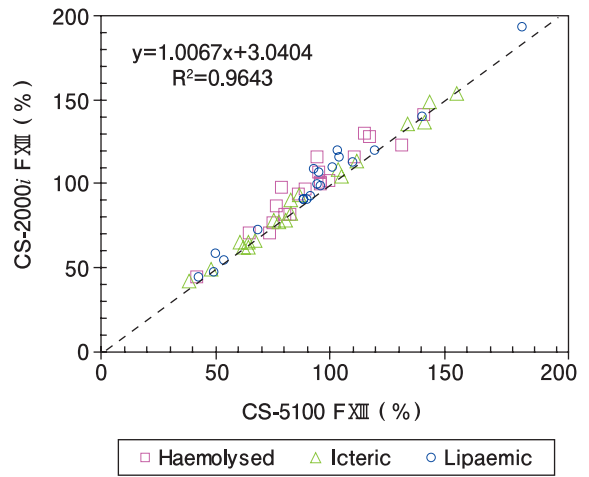
Broken line = Line of Identity

Fig 2. Comparison of CS-5100 and CS-2000i Prothrombin time, APTT and Clauss Fibrinogen results

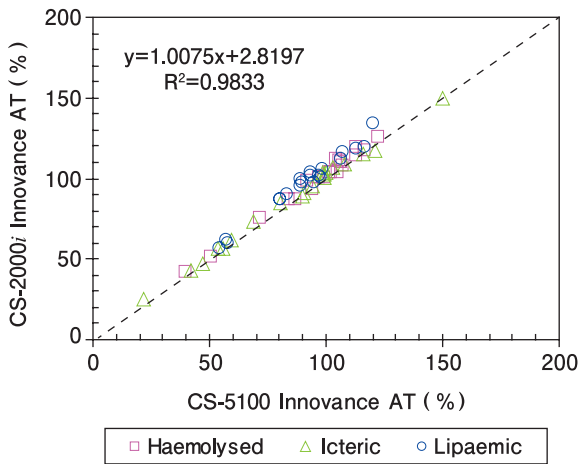
(A) FVIII HIL Samples Only



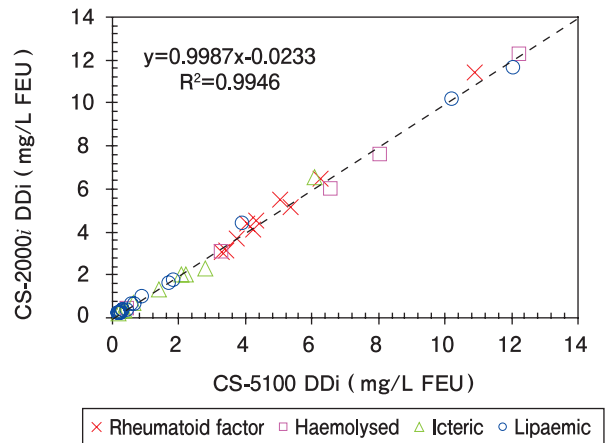
(B) FXIII HIL Samples Only



(C) AT HIL Samples Only



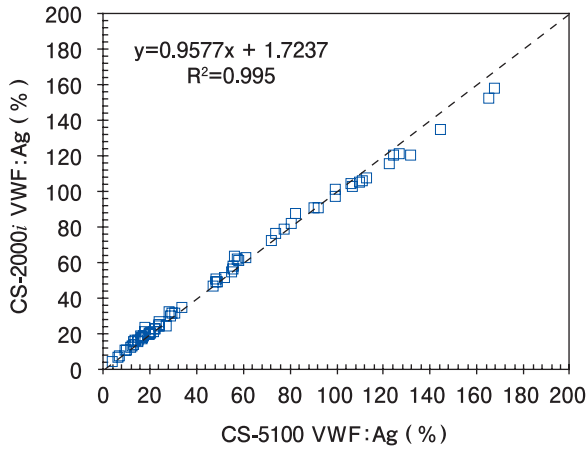
(D) DDi HIL Samples Only



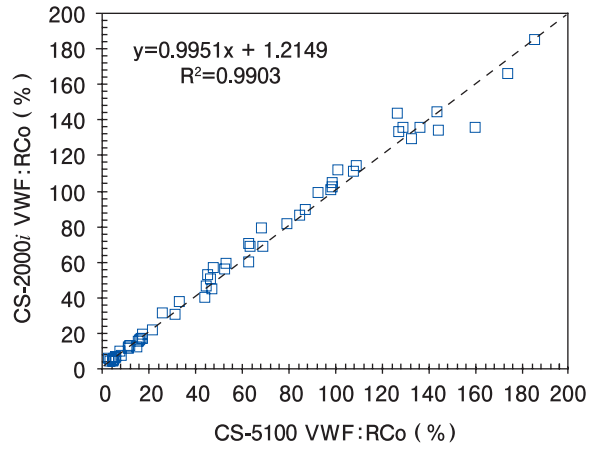
Broken line = Line of Identity

图 3. Comparison of CS-5100 and CS-2000i Factor VIII, Factor XIII, Antithrombin, and D-dimer results

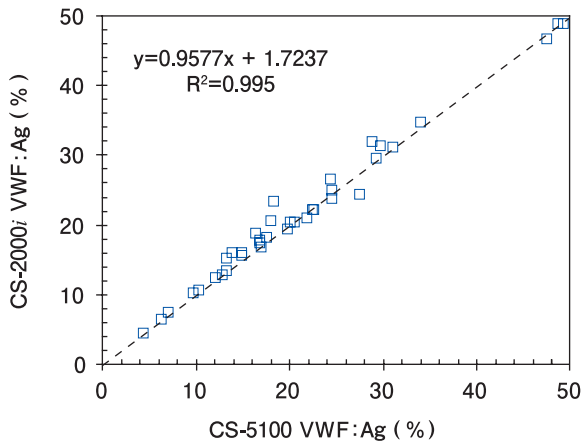
(A) VWF:Ag All samples



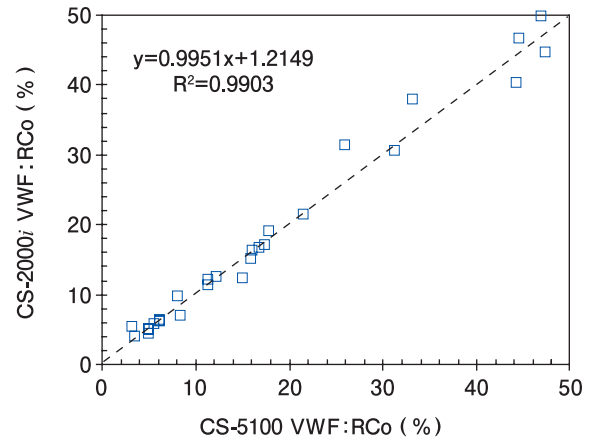
(B) VWF:RCo All samples



(C) VWF:Ag Data truncated at 50%

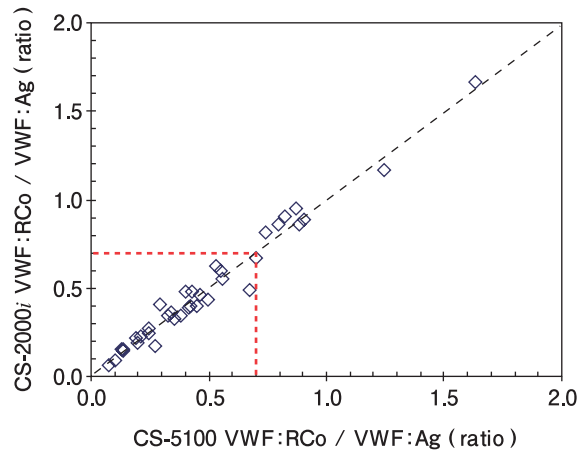


(D) VWF:RCo Data truncated at 50%



Broken line = Line of Identity

Figure 4. Comparison of CS-5100 and CS-2000i VWF antigen and Ristocetin Co-factor results



Black Broken line = Line of Identity
Red Dotted line = cut-off for normality

Figure 5. Comparison of CS-5100 and CS-2000i VWF:RCo / VWF:Ag Ratios from VWD patients' samples

のサンプルで CS-2000*i* が付加したものと同等であった。溶血、黄疸および乳びのレベルが高いサンプルにおいても、主要な項目の測定値への目立った影響はほとんど見られなかった。FVIIIで、一部の黄疸サンプルが CS-5100 より CS-2000*i* で高めの活性値を示したことについては、凝固曲線をレビューするなどし精査を実施したが、高濃度のビリルビンや他の光学的干渉物質が乖離の原因であるということは明らかにできなかった。

最後に、一般的に検査室で実施されているような多数のサンプル測定による処理能力を評価したところ、大部分の項目で CS-5100 の処理速度は CS-2000*i* の2倍以上であることが明らかになった。

また、CS-2000*i* では測定中に VWF:RCo で使用するスターラーバー (SB) キュベットを装置内に追加できなかったが、CS-5000 ではソフトウェアのアップグレードにより、装置状態の条件を整えば、測定中でも SB キュベットの追加が可能となっている。これによって1時間あたり約26サンプル (MDA 測定による) と処理能力が向上しており、CS-5100 では CS-2000*i* より SB キュベットの架設可能数が4個少ない20個ではあるが、処理速度に影響を与えないものと考えられた。ただし、装置の処理能力については、今後ますます様々な項目の組み合わせにて、多数のサンプルを測定することで評価を実施する必要があると考えられる。

今回の CS-5100 の評価では、有用な性能評価の結果が得られた。ルーチンの凝固項目と、凝固法、合成基質法、免疫比濁法および血小板凝集法を用いた特殊項目において、満足できる範囲内のばらつきであることが明らかになった。また、対照装置と良好な相関性を示し、総ビリルビン、コレステロール、トリグリセライドおよびヘモグロビンの高濃度のサンプルにおいても測定値への影響はみられなかった。

以上より、CS-5100 は1台でピアッシングありとなしのサンプル吸引を可能とし、高速で大量のサンプル処理を要望する検査室に適した装置であると思われる。

参考文献

- 1) Molenaar PJ and Leyte A. Pre-acquisition system assessment of the Sysmex[®] Coagulation System CS-2100*i* and comparison with end-user verification ; a model for the regional introduction of new analysers and methods. *Clin Chem Lab Med.* 2011 ; 49 (9) : 1479-89
- 2) Mukaide K. The Multi-Wavelength Detection Feature of The New Automated Blood Coagulation Analyzer - Sysmex[®] CS-2000*i*/CS-2100*i*. *Sysmex J Int.* 2011 ; 21 (1) : 1-9
- 3) Dorn-Beineke A et al. Evaluation of the automated coagulation analyzer Sysmex CA-7000. *Thromb Res.* 2005 ; 116 (2) : 171-179
- 4) Fischer, F et al. Evaluation of the automated coagulation analyzer Sysmex CA-7000. *Thromb Res.* 2006 ; 117 (6) : 721-729
- 5) Gosselin RC et al. Summary evaluation of the Sysmex CA-6000 coagulation analyzer. *Clin Chem.* 1997 ; 43 (9) : 1783-1785
- 6) Quehenberger P et al. Evaluation of the automated coagulation analyzer SYSMEX CA 6000. *Thromb Res* 1999 ; 96 (1) : 65-71
- 7) Lawrie AS et al. Factor XIII - an under diagnosed deficiency - are we using the right assays? *J thromb haemost.* 2010 ; 8 (11) : 2478-2482
- 8) Lawrie AS et al. Evaluation of an automated platelet-based assay of ristocetin cofactor activity. *Haemophilia.* 2011 ; 17 (2) : 252-256
- 9) Bowyer AE et al. A rapid, automated VWF ristocetin cofactor activity assay improves reliability in the diagnosis of Von Willebrand disease. *Thromb Res.* 2011 ; 127 (4) : 341-344
- 10) Laffan M et al. The diagnosis of von Willebrand disease : a guideline from the UK Haemophilia Centre Doctors' Organization. *Haemophilia.* 2004 ; 10 (3) : 199-217
- 11) Montgomery RR and Kroner PA. von Willebrand disease : a common pediatric disorder. *Pediatric Annals.* 2001 ; 30 (9) : 534-540
- 12) Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annual Review of Biochemistry.* 1998 ; 67 : 395-424

Evaluation of a High Throughput Multi-wavelength Blood Coagulation Analyser - Sysmex CS-5100

A. S. Lawrie, J. M. Iseppi, I. J. Mackie, S. J. Machin

Haemostasis Research Unit, Department of Haematology, University College London, London. UK.

SUMMARY

We assessed the performance of a prototype high throughput coagulation system (CS-5100) from Sysmex Corporation Japan, in parallel with their intermediate throughput CS-2000*i*. The new analyser has the advantage of 20 multi-wavelength reaction detector positions as opposed to 10 on the CS-2000*i*, thereby approximately halving the processing time of most batched assays. In our evaluation we assessed performance in clotting (prothrombin time [PT], activated partial thromboplastin time [APTT], Clauss fibrinogen [Fbg], one-stage factor VIII [FVIII]) chromogenic (antithrombin [AT], factor XIII [FXIII]), immuno-turbidometric (D-dimer [DDi], von Willebrand factor antigen [VWF:Ag]) and platelet agglutination based ristocetin co-factor (VWF:RCo) test systems. For the FVIII and VWF:RCo assays, all samples were tested using the multi-dilution analysis (MDA) utility, to assess linearity and parallelism of the dose response curve to detect possible false results due to inhibitors or sample activation. For all other assays a single point determination was made with automatic redilution if the relative potency was outside the range of the standard curve. The CS-5100 methods showed good linearity and reproducible standard curves, and gave low inter-assay imprecision using commercial normal (CV = 0.73 - 6.3%) and pathological (CV = 0.04 - 9.9%) control plasmas (preparations tested 10 times on each of 5 days). Good correlations were observed between CS-2000*i* and CS-5100 using clinical samples in each of the test systems (PT, APTT, Fbg, FVIII, FXIII, VWF:Ag, VWF:RCo, AT and D-Dimer. $R^2 = 0.96 - 0.99$), with no clinically significant misclassification, and data points scattered closely around the line of identity. Our results demonstrated that using the CS-5100 analyser, routine coagulation testing and specialised assays can be performed with satisfactory imprecision and show good correlation with the CS-2000*i*.

Key Words

Coagulation Analyser, High Throughput, Multi-wavelength Blood Coagulation Analyser
