

マルチダイリユーション測定(MDA)を用いた第Ⅷ因子活性測定の見直し

新井 信夫, 小倉 優子, 笠井 年和, 石井 剛

シスメックス株式会社学術部: 神戸市西区高塚台4-4-4 (〒651-2271)

SUMMARY

全自動血液凝固測定装置CAシリーズ(CA-7000, CA-1500)に搭載されているマルチダイリユーション測定(MDA)とは、凝固因子活性測定において、患者血漿を自動的に段階希釈測定して活性値を求めるとともに、得られた回帰直線の外形、直線性、傾き、検量線との平行性をオペレーターが比較することによって、重度の因子欠乏症や検体中のインヒビターの存在を推測する機能である。最新のシステムプログラムでは、検量線との平行性の度合いを表す指標としてSR (Slope Ratio)が追加され、機能の強化が図られた。

我々は、第Ⅷ因子インヒビター血漿及び第Ⅷ因子欠乏血漿を用いて、第Ⅷ因子活性測定におけるSRの有用性を検討したので報告する。

Key Words マルチダイリユーション測定(MDA), 第Ⅷ因子測定, APTT, Slope Ratio (SR)

はじめに

第Ⅷ因子活性測定は、希釈患者血漿と第Ⅷ因子欠乏血漿を混合した試料をAPTTで測定する方法が広く用いられている(図1)。測定値の凝固時間は、活性値の表示されているWHO (World Health Organization) 標準血漿あるいは二次標準血漿を用いて作成された検量線から活性%に換算して報告される^{1,2)}。また、このとき患者血漿を検量線と同様に段階希釈測定することにより、得られた回帰直線の外形、直線性、傾き、検量線との平行性等を比較して、重度の因子欠乏症や検体中のインヒビター等の存在を推測することができる(図2)³⁾⁻⁶⁾。全自動血液凝固測定装置CAシリーズ(CA-7000, CA-1500) (以下CAシリーズ, シスメックス社)では、この希釈測定機能をマルチダイリユーション測定(MDA)と呼ぶ。

MDAは、血漿の希釈操作から測定結果の表示までを自動で行い、希釈倍率も測定試料に応じて、3つのパターン(MDA low, MDA, MDA high)を選択する

ことができる(表1)。測定値には、それぞれの希釈倍率での凝固時間と活性値(それぞれ原血漿に換算した値)が表示され、測定試料の回帰直線(Lin)及び検量線(SC)の相関係数はそれぞれ $Test_r$, SC_r で表示する(図3)。また、グラフ上には、検量線(SC), 測定試料の回帰直線(Lin), パラレルライン(Par)の3つの直線を表示する。パラレルラインは、測定試料の回帰直線(Lin)の1/1のポイント(あるいは最も希釈倍率が低いポイント)を通り、検量線を平行移動した直線で、測定試料の回帰直線(Lin)と検量線(SC)との比較を容易にしている。最新のシステムプログラムでは、この両直線の平行度合いを定量的に判断できるように、測定試料の回帰直線(Lin)の傾きを検量線(SC)の傾きで除したSlope Ratio(SR)が追加されている。このSRは、異常判定のために上下限値の範囲設定が可能で、設定範囲外の結果が得られた場合はSRの右横にフラグとして「*」が付加される。

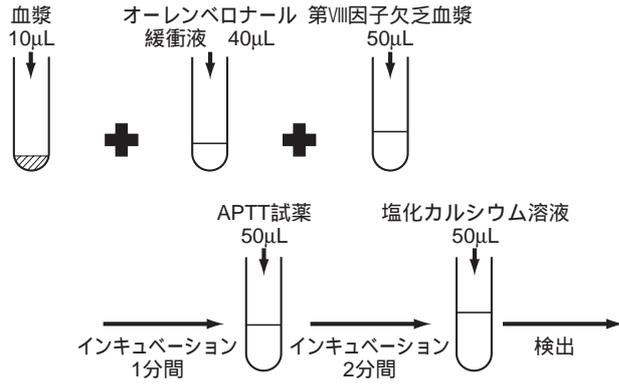


図1. 第Ⅷ因子活性測定のプロロー

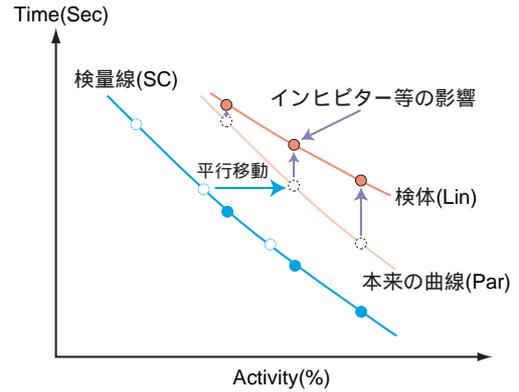


図2. Parallel Line Assayの概略

表1. MDAの希釈倍率(第Ⅷ因子活性測定時)

MDAのパターン	MDAの希釈倍率	試料の希釈倍率*	相当する活性値
MDA low	2/1	1:5	200%
	5/1	1:2	500%
	10/1	1:1	1000%
MDA	1/1	1:10	100%
	1/2	1:20	50%
	1/4	1:40	25%
MDA high	1/8	1:80	12.5%
	1/16	1:160	6.25%
	1/32	1:320	3.13%

*試料の希釈倍率は、測定手順に設定されている希釈倍率がMDAの1/1となり、この希釈倍率から他の試料希釈倍率が決定される。

材料及び方法

- 1) 装置: 全自動血液凝固測定装置 CA-1500
- 2) 試薬:
 - データファイ・APTT(デイドベーリング社)
 - 20mM塩化カルシウム溶液(デイドベーリング社)
 - 第Ⅷ因子欠乏血漿(デイドベーリング社)
 - 正常プール血漿自家製
- 3) 試料
 - 正常プール血漿(自家製)
 - 第Ⅷ因子インヒビター血漿, 3濃度(ジョージキング社)
 - 第Ⅷ因子インヒビター患者血漿
 - 第Ⅷ因子欠乏血漿(デイドベーリング社)

正常プール血漿, 第Ⅷ因子インヒビター血漿, 第Ⅷ因子欠乏血漿及び第Ⅷ因子欠乏血漿を正常プール血漿にて希釈した系列を用いて、第Ⅷ因子活性測定におけるMDAを行った。

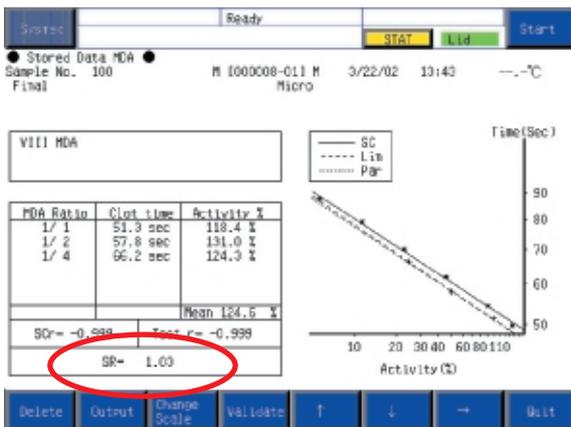


図3. マルチダイリュション測定の結果画面

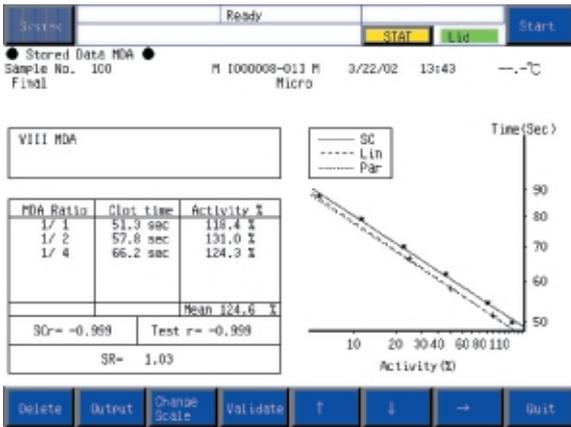


図4 . 正常プール血漿

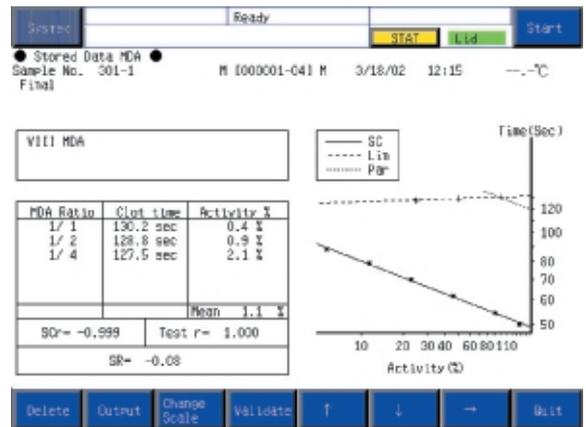


図5 . 市販インヒビター血漿A

表2 . 第VIII因子インヒビター血漿のMDA測定データ

試料	Sc (r)	Test (r)	SR
正常プール血漿	- 0.999	- 0.999	1.03
市販インヒビター血漿 A (301 B.U)	- 0.999	1.000	- 0.08
市販インヒビター血漿 B (272 B.U)	- 0.999	0.998	- 0.13
市販インヒビター血漿 C (56 B.U)	- 0.999	- 0.999	- 0.04
患者血漿 1 (75.0 B.U)	- 0.999	0.947	- 0.32
患者血漿 2 (18.0 B.U)	- 0.999	1.000	- 0.25
患者血漿 3 (6.5 B.U)	- 0.999	0.979	- 0.34
患者血漿 4 (0.7 B.U)	- 0.999	0.822	- 0.08
患者血漿 5 (0.3 B.U)	- 0.999	- 1.000	0.11

B.U = Bethesda units

2 . 第VIII因子活性低値血漿の測定値

第VIII因子活性低値血漿のMDA測定値を表3に、MDA画面の一部を図6, 7に示した。第VIII因子活性の低下に伴って、Linの傾きは小さくなり、検量線との平行性がなくなる結果となった。活性値が1%以下の第VIII因子欠乏血漿では、Linは横S字状のプロットでフラットな直線となった(図7)。SRは、第VIII因子の低下に伴って低値となり、活性値が5%以下では0.62以下、第VIII因子欠乏血漿では0となった。ただし、第VIII因子インヒビター血漿測定時に見られたマイナス表示は見られなかった。

結果

1 . 第VIII因子インヒビター血漿の測定値

第VIII因子インヒビター血漿のMDA測定値を表2に、MDA画面の一部を図4, 5に示した。市販の第VIII因子インヒビター血漿のLinは、インヒビターの含有量が多くなるほど検量線との平行性がなくなり、傾きも検量線とは逆となる結果となった。この傾向は患者検体においても同様であり、インヒビター含有量が多い検体ほど検量線との平行性はなかった。これら試料のSRは、ほとんどの試料がマイナス表示で、患者血漿5 (0.3 B.U)と正常血漿でのみプラス表示であった。

考察

第VIII因子活性測定MDAにおいて、第VIII因子インヒビター血漿、第VIII因子活性低値及び欠乏血漿は、正常血漿と異なったLinを呈した。軽度の第VIII因子欠乏では、検量線との平行性が保たれており、重度の第VIII因子欠乏ではフラット状を呈する特徴的な結果を示し、第VIII因子インヒビターを多く含む血漿では、検量線とは逆の傾きを呈した(図8)。これらは、インヒビター量の増加や活性値の低下に依存して変化した。

一方、SRはこれらの変化を数値によって明確に把握することができた。SRが1.0に近いほど検量線との平行性は保たれており、第VIII因子活性の低下に伴ってSRとTest rも低下した。また、第VIII因子インヒビ

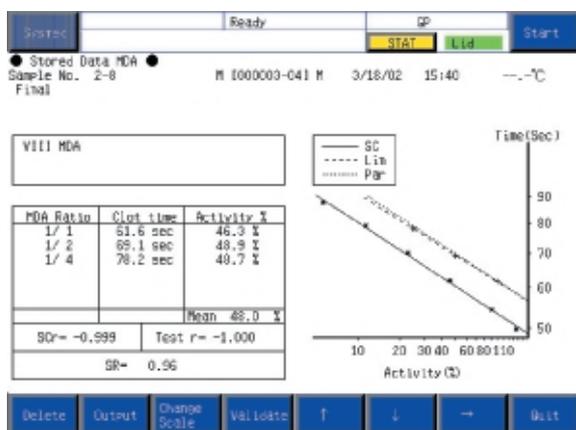


図 6 . 第VIII因子活性低値試料

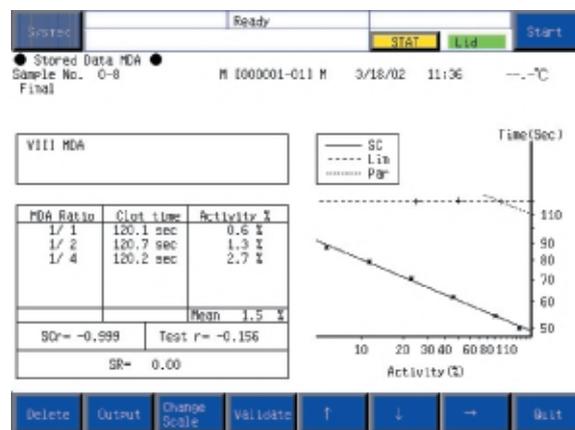


図 7 . 第VIII因子欠乏血漿

表 3 . 第VIII因子活性低値試料のMDA測定データ

試料	Sc (r)	Test (r)	SR
正常プール血漿	- 0.999	- 0.999	1.03
第VIII因子活性 46%*	- 0.999	- 1.000	0.96
第VIII因子活性 37%*	- 0.999	- 1.000	0.95
第VIII因子活性 24%*	- 0.999	- 1.000	0.87
第VIII因子活性 12%*	- 0.999	- 1.000	0.80
第VIII因子活性 6%*	- 0.999	- 0.998	0.68
第VIII因子活性 5%*	- 0.999	- 1.000	0.62
第VIII因子活性 4%*	- 0.999	- 0.998	0.63
第VIII因子活性 3%*	- 0.999	- 1.000	0.57
第VIII因子活性 2%*	- 0.999	- 1.000	0.47
第VIII因子活性 1%*	- 0.999	- 0.997	0.33
第VIII因子欠乏血漿 (1% 以下)	- 0.999	- 0.156	0.00

*正常プール血漿を第VIII因子欠乏血漿にて希釈した系列

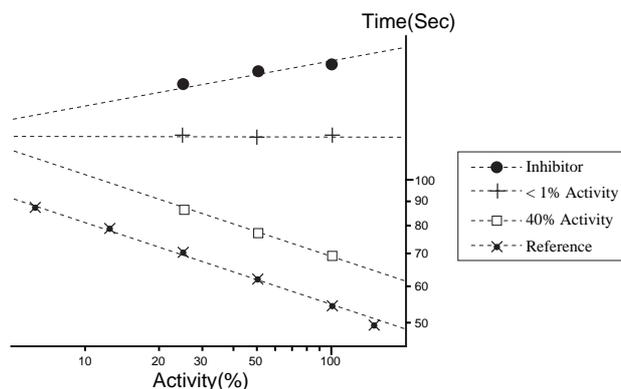


図 8 . MDAにおける各種試料のLin

ターを多く含む血漿では、SRはマイナス表示となった。このようにSRとTest rの2つのパラメータに注目することで、因子活性の低下とインヒビターの存在が推測可能である。また、SRの低下度合いにより、インヒビター量の推測もある程度可能であると思われる。しかしながら、両パラメータの異常判定域の

設定については、今後さらに様々な臨床検体を測定することにより、慎重に確立する必要がある。

NCCLS Guideline H-49A²⁾には、凝固因子活性測定の手順が詳細に記載されており、これを参考に、CAシリーズの第VIII因子活性測定におけるMDA時の注意事項を以下に記載する。

[注意事項]

患者血漿の測定値は、検量線の範囲内に収まる必要があるが、この条件が満たされない場合は、検量線の測定ポイントを追加して再測定を行うか、検体の希釈倍率を変更して再測定を行う³⁾。CAシリーズの第VIII因子測定時の検量線ポイントのデフォルトは、3/2 (150%)、1/1 (100%)、1/2 (50%)、1/4 (25%)、1/8 (12.5%)、1/16 (6.3%) の6ポイントであり、3/2 (150%) 以上あるいは1/16 (6.3%) 以下を示した検体については、検量線のポイントを増やすか、あるいはMDA low、MDA highやマニュアル希釈等で検体の希釈倍数を変更して、再測定を行ったうえで成績を評価する必要がある。これは、因子欠乏症の重度(Severe)、中等度 (Moderately severe) に該当する検体(表4)では、特に重要となる。ただしMDA lowを使用した場合、用いる血漿量が多いために反応液中の残存凝固因子の濃度が高くなり、MDAラインが直線にならず、むしろ1/5や1/10では凝固時間が延長することを経験している。このことからMDA lowでは2/1 すなわち1:5のみのデータを参考にするのが良いと思われた。

検量線と検体の回帰式において、MDA測定ポイントの1つ以上が直線性の範囲内にあるが、平行性が認められないときはインヒビターの存在が疑われる。このときの検査成績は信頼性が低いので、データに参考データ等のコメントをつけて報告すべきである。

測定データが検量線のポイント外で、回帰直線がフラット状あるいは横S字状のプロットを呈し

た時は、重度の因子欠乏症が疑われる。このような場合は、標準血漿を1～2%程度に希釈したものを追加して再測定を行い、患者血漿の凝固時間がこれ以上の延長を示した時は、この活性値以下として報告する。

検量線及び患者回帰直線の直線性は、3ポイントでは、 $r \geq 0.97$ 、4ポイント以上では、 $r \geq 0.99$ が妥当である。

MDAによる因子活性測定時は、上記の点を考慮して、試料の希釈倍率の選択、測定及び結果の評価を行うことが重要である。

まとめ

マルチダイリキュション測定は、各凝固因子活性を測定するとともに重度の因子欠乏症やインヒビターの存在を視覚的に推測する機能である。新たに追加されたパラメータのSRは、視覚的に区別しにくい患者回帰直線と検量線の平行の度合いを客観的に判別することが可能であり、今後さらに臨床検体の測定例を増やすことによって、因子活性測定の有用なパラメータとして活用できることが期待される。

参考文献

- 1) Bruce L Evatt, et al. : Fundamental Diagnostic Hematology, The Bleeding and Clotting Disorders (second edition). World Health Organization, 1992.
- 2) NCCLS. Determination of factor coagulant activities; approved guideline H48-A. Wayne, PA: 1997.
- 3) NCCLS: Procedure for the determination of fibrinogen in plasma; approved guideline H30-A2 second edition. Wayne, PA: 2001.
- 4) Donna M Corriveau, et al. : Hemostasis and Thrombosis in the Clinical Laboratory, J B Lippincott Company, USA, 1988.
- 5) K N Williams, et al. : A Computer Program for the Analysis of Parallel-Line Bioassay of Clotting Factors. British Journal of Haematology, 31: 13, 1975.
- 6) T B L Kirkwood, et al. : Biometric principles in clotting and clot lysis assays. Clin lab Haemat 2: 155-167, 1980.

表4 . 測定結果の判定 (第VIII因子活性)

Severe = less than 1% activity
Moderately severe = 1% - 5% activity
Mild severe = 5% - 25% activity

Evaluation of Factor VIII Assay using Multi Dilution Assay (MDA) on CA Analyzers

Nobuo ARAI, Yuko OGURA, Toshikazu KASAI, and Tsuyoshi ISHII

Scientific Division, Sysmex Corporation
4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe 651-2271.

SUMMARY

The Multi Dilution Assay (MDA) is a function to analysis the Factor VIII Activity, and to check the presence of inhibitor or severe factor deficiency. MDA Line is the straight line which connects the plotted measured values by auto doubling dilution of a patient sample. Comparing the shape, linearity, slope and parallel with the calibration curve, the inhibitor or factor deficiency can be suspected.

In current system software, the Slope Ratio (SR) has been added as a new function. This index is to show the degree of parallelism of the MDA Line with the calibration curve. We investigated the usefulness of SR using Factor VIII Inhibitor Plasma and Factor VIII Deficient Plasma and reported on the results as follows.

Key Words Multi Dilution Assay (MDA), Factor VIII Assay, APTT, Slope Ratio (SR)
