

Dダイマー試薬「リアスオ - ト・Dダイマ - ネオ」の基礎的検討

藤田 晴美^{*1} , 西田 栄子^{*1} , 田中 房枝^{*1} , 宮鍋 真由美^{*1} , 田中 佳^{*1} ,
野島 孝之^{*2} , 福永 壽晴^{*2}

^{*1} 金沢医科大学中央臨床検査部：石川県河北郡内灘町大学1-1(〒920-0293)

^{*2} 金沢医科大学病態診断医学

SUMMARY

全自動血液凝固分析装置 Coagrex-800 (シスメックス社) を用い、Dダイマー試薬「リアスオ - ト・Dダイマーネオ」(シスメックス社) の基礎的検討を行った。その結果、精密さ・直線性・比較対照試薬との相関において良好な結果が得られた。共存物質の影響もほぼ良好であったが、強乳び検体では測定値が低値となり、希釈により影響を回避する必要がある。また比較対照に比べ直線性も良好であり (30 μ g/mL)、最小検出感度は0.1 μ g/mLであった。比較対照試薬との乖離検体の原因はIgMの非特異反応であり、本試薬では緩衝液に工夫がされており非特異反応は減少することが予測された。また高分子Dダイマーとの反応性も高く、本試薬は血栓・線溶状態の病態把握に有用であると考えられる。

Key Words Dダイマー, リアスオ - ト・Dダイマーネオ, 非特異反応

はじめに

フィブリンは活性化第 Ⅲ 因子により架橋結合し、架橋化フィブリンになる。Dダイマーは、この架橋化フィブリンにプラスミンが作用生成した分解産物であり、生体内における血栓の存在を鋭敏に示す。このためDダイマーは、DICや血栓症の診断、血栓溶解療法のモニタリングにおいて重要な指標となる。

今回、我々はシスメックス (株) により開発されたDダイマー試薬「リアスオ - ト・Dダイマーネオ」について基礎的検討を行ったので報告する。

測定原理

ラテックス凝集反応を利用したLIA (Latex Immuno Assay : ラテックス免疫比濁法) によりDダイマーを定量測定する方法である。すなわち検体と抗Dダイマーモノクローナル抗体 (マウス) 感作ラテックスを混合すると、検体中のDダイマーとの抗原抗体反応によりラテックス粒子の凝集が生じ、濁度が増加する。この濁度変化を波長730nmで測定する。また、同様に操作して得られた標準液の濁度変化と比較することにより、検体中のDダイマー濃度を求める。

対 象

1. 対象

試料は凝固検査として提供された3.2%クエン酸Na加血漿を用いた。

2. 機器と試薬

測定機器は全自動血液凝固分析装置 Coagrex-800 (シスメックス社, 以下 Coagrex-800) を使用し, 検討試薬はリアスオート・Dダイマーネオ (シスメックス社) を使用した。試薬キットは Dダイマー緩衝液, Dダイマーラテックス液 (抗Dダイマーモノクローナル抗体感作ラテックス), Dダイマー標準品ネオ (ヒト由来Dダイマー), Dダイマー希釈液ネオで構成されている。

比較対照試薬として, リアスオート・Dダイマー (シスメックス社) および, エルピアエースD-Dダイマー (CAシリーズ用) (三菱化学ヤトロン社) を使用した。

2) 日内変動

コントロール血漿2濃度, プール血漿2濃度を, 0, 3, 6, 8時間後に測定した。測定結果はCV 0.80 ~ 2.48%と良好な結果が得られた (表1)。

3) 日差再現性

試薬を開栓状態で5日間装置に設置し, オンボードにおいて, 2濃度のコントロール血漿, プール血漿を5日間測定した。CV 1.96 ~ 4.23%であり, 経時変化もなく良好な結果が得られた (表1)。

2. 希釈直線性

高値患者検体5検体を, それぞれ専用希釈液で5段階希釈し測定した。すべての検体において30 μ g/mL付近まで直線性が得られた (図1)。

3. 最小検出感度

0.7 μ g/mLの低値検体を専用希釈液で10段階希釈後, それぞれ10重測定し3SD法で0濃度と重ならない値を最小検出感度とした。その結果, 最小検出感度は0.1 μ g/mLと低濃度の結果であった (図2)。

方法および結果

1. 精密さ

1) 同時再現性

コントロール血漿2濃度, プール血漿2濃度を試料として, 20回連続測定を行った。測定結果はCV 1.37 ~ 4.58%と良好な結果が得られた (表1)。

4. プロゾーン現象

高濃度検体を段階希釈後, 3重測定しプロゾーンについて検討した。その結果, 理論濃度29.3 μ g/mLまで直線性を示し, 73.3 μ g/mLよりプロゾーン現象が認められた (図3)。

表1. 精密さ

		n=20			
同時再現性		Control low	Control high	Pool low	Pool high
	Mean(μ g/mL)	1.87	11.94	0.77	12.33
	SD	0.03	0.18	0.04	0.17
	CV(%)	1.82	1.49	4.58	1.37
		n=4			
日内変動		Control low	Control high	Pool low	Pool high
	Mean(μ g/mL)	1.88	12.10	0.76	12.40
	SD	0.02	0.08	0.02	0.10
	CV(%)	1.31	0.67	2.48	0.80
		n=5			
日差再現性		Control low	Control high	Pool low	Pool high
	Mean(μ g/mL)	1.91	12.60	0.80	12.21
	SD	0.04	0.34	0.03	0.38
	CV(%)	1.96	2.70	4.23	3.10

5. 干渉物質の影響

2濃度のプ-ル血漿に、干渉チェックAプラス(シスメックス社)、干渉チェックRFプラス(シスメックス社)、イントラファット注20%(武田薬品工業社)を添加し測定した。RF 500IU/mL、ビリルビンF 18.4mg/dL、ビリルビンC 19.7mg/dL、ヘモグロビン 490mg/dLまで影響を認めなかった。乳びは、干渉チェックで1,470ホルマジン濁度まで影響はなかったが、イントラファットでは濃度が高くなるにしたがってDダイマー値が低くなり、1%混濁液で19.6%の減少が見られた(図4)。

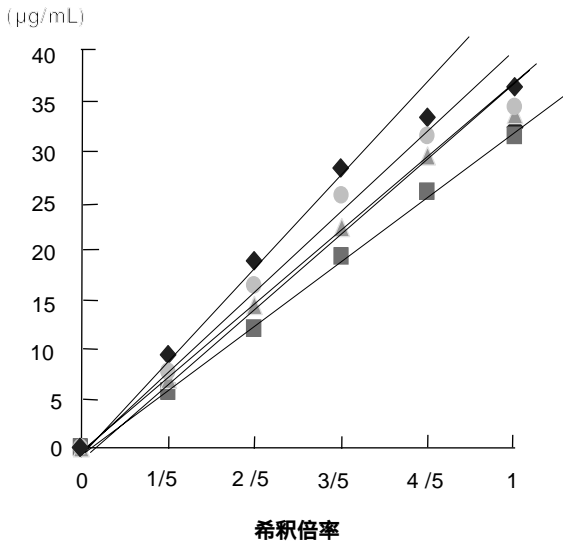


図1. 希釈直線性

6. 相関

対照試薬エルピアエースD-Dダイマー(CAシリーズ用)との相関(n = 122)は $r = 0.988$, $y = 0.935x + 0.266$, $S_{yx} = 1.540$ と良好であったが、4検体の乖離が認められた(この4検体は回帰式には含めていない)。リアスオート・Dダイマーとの相関(n = 122)は $r = 0.956$, $y = 1.225x - 0.168$ であり、本試薬は約20%高値となった。また $S_{yx} = 2.827$ とバラツキが大きかった(図5)。

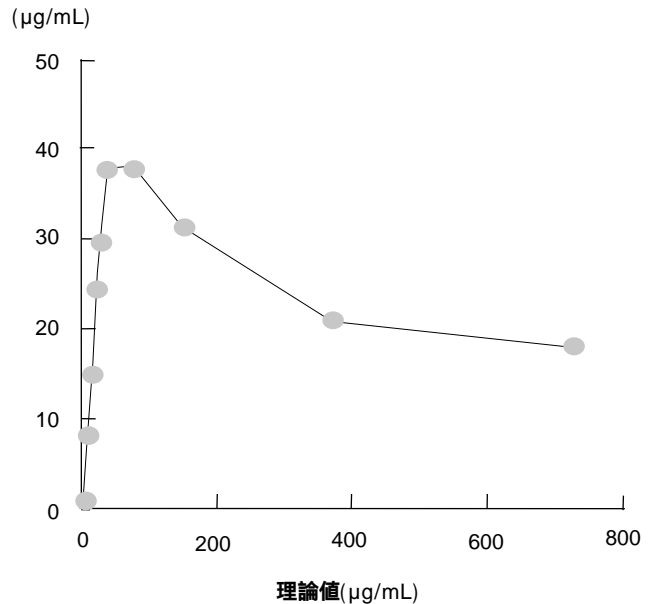


図3. プロゾ-ン現象

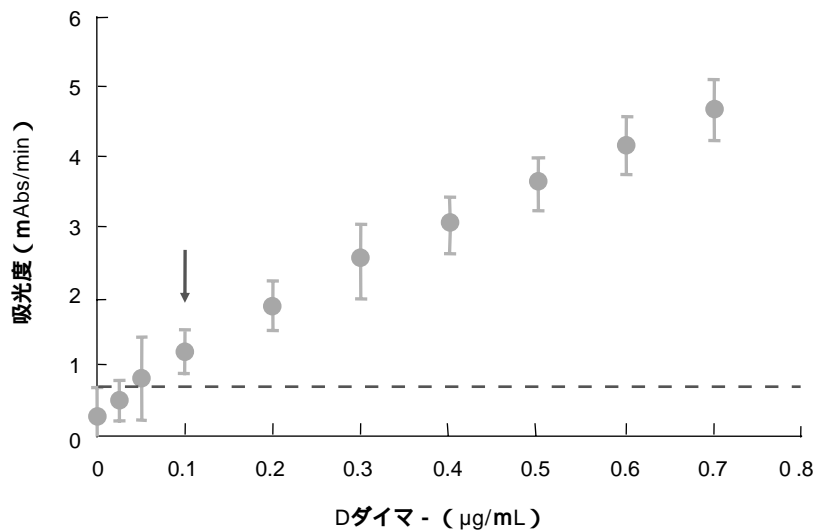


図2. 最小検出感度

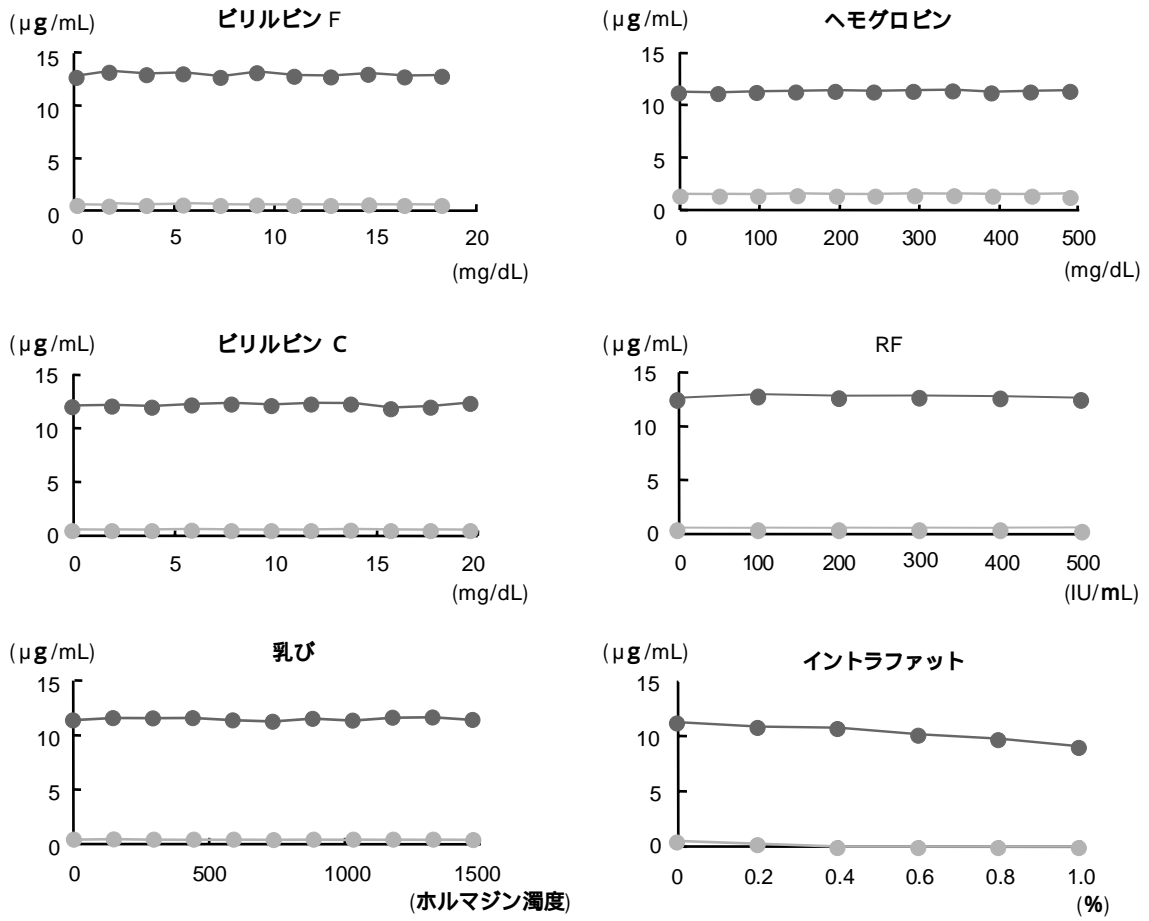


図4. 干渉物質の影響

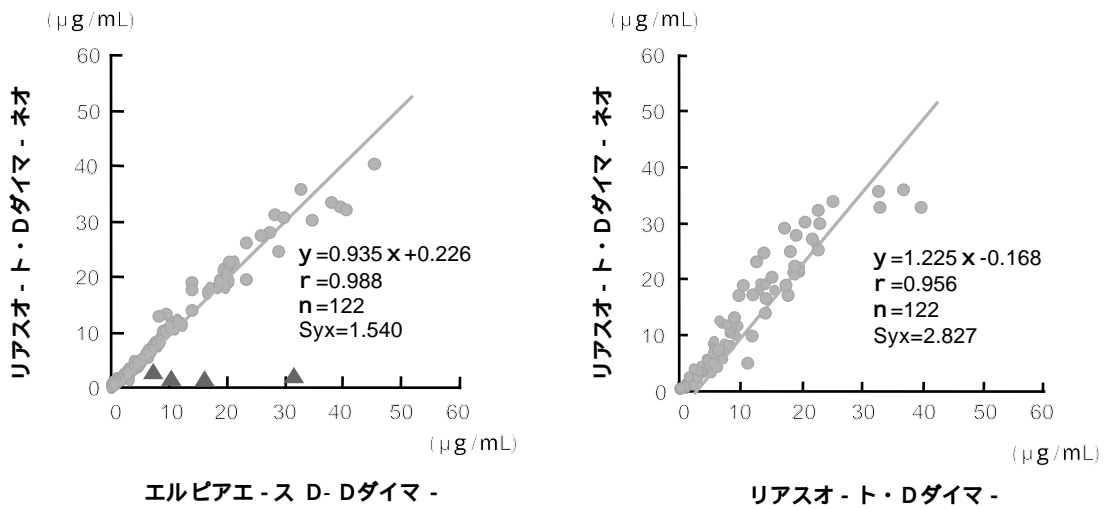


図5. 相 関

7. 非特異反応

エルピアエースD-Dダイマー試薬と本試薬が乖離した4検体について解析を行った。エルピアエースD-Dダイマーについて専用の希釈液を用い希釈測定を行った結果、4検体すべてにおいて希釈率が高くなるにしたがって低値になり、直線性は確認できなかった(図6)。またウエスタンブロッティング試験ではDダイマーの明確なバンドは認められず、患者血中に非特異反応を惹起する成分の存在が考えられたため、Rabbit Anti-Human IgM (6.0mg/mL) (DAKO社)抗体を用い、検体と1:1に混合し吸収試験を実施した。吸収試験の結果、82.5~100%の吸収が認められ、乖離の原因は検体中のIgMであり、本試薬は影響を受けなかったことを確認した(表2)。

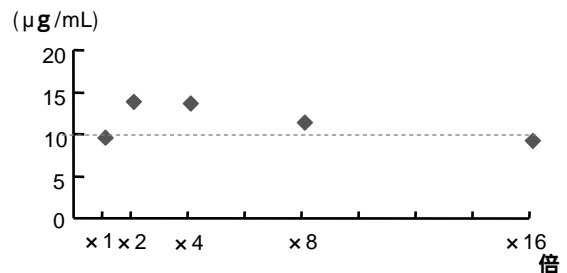
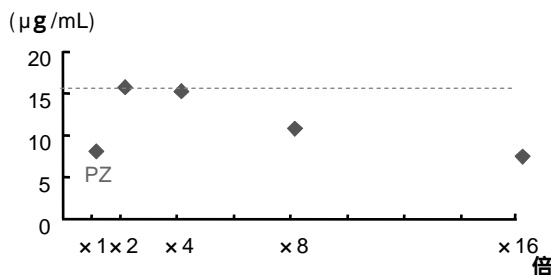
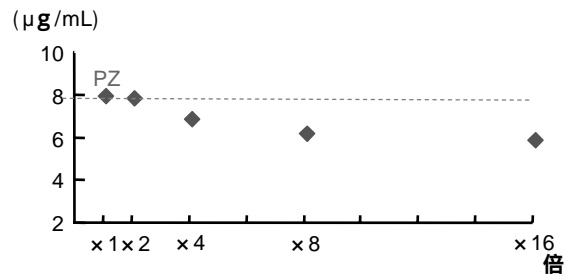
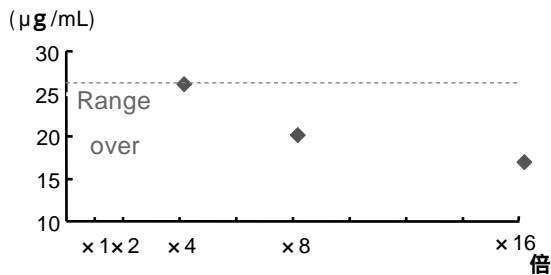
表2. IgM吸収試験

Blank ($\mu\text{g/mL}$)	26.8	7.9	17.5	9.0
IgM吸収処理後 ($\mu\text{g/mL}$)	0.0	1.38	0.41	0.2
吸収率 %	100	82.5	97.7	97.8

考察およびまとめ

リアスオート・Dダイマーネオは、同時再現性・日内変動ともに良好であった。Coagrex-800の試薬トレーは常に6~7に保たれているが、開栓、オンボード状態での使用に耐えうるかどうかを、日差再現性で確認した。その結果、CV 1.96~4.23%と試薬の乾燥によるデータの影響もなく、夜間・休日の対応も可能であると思われた。

リアスオート・Dダイマーとの相関では、試薬間の反応性の違いと思われるバラツキが見られた。しかし、高分子Dダイマーを鋭敏に反映するエルピアエースD-Dダイマーとの相関は良好であることから、本試薬は高分子Dダイマーの反応性が高いことが示唆された¹⁾。FDPには様々な分子量の分画が存在するが、患者血漿中のFDPの大半は、高分子のFDPやDダイマーとして存在することが明らかになっている²⁾。したがって、高分子Dダイマーに対する反応性が高い本試薬は、DICなど、血栓症の早期診断、病態把握に有用であると思われる。



データは希釈率換算してあります
PZ: プロゾーン表示あり

図6. 希釈試験

線溶亢進検体の希釈直線性試験の結果では、 $30\mu\text{g}/\text{mL}$ まで直線性が確認できた。比較対照試薬のエルピアエースD-Dダイマーの上限は $10\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、日常検査における希釈再検率は17%程度であるが、本試薬では、5%程度に減少するものと思われる。

干渉物質の影響において、強乳び検体では低値となる影響が見られた。イントラファット0%と1%の反応カーブを比較すると(図7)、1%添加では測定直後より80秒まで吸光度の減少があり、その後増加するが、吸光度変化は小さく測光ポイントを変更しても低値となる(通常測光ポイントは40秒と160秒を使用)。これは、試薬中の界面活性剤による濁度の減少が原因と考えられ、強乳び検体測定の際は反応カーブの確認を行い、吸光度の減少がある場合は希釈測定により影響を回避することが必要である。また、干渉物質の中でもIgMによる非特異反応は日常検査で多く経験するが、今回乖離した4検体の原因もすべてIgMによるものであった。これらの血漿中にはIgM型の異好性抗体(hAb)が存在し、これが抗Dダイマー抗体に反応し、見かけ上高値となったと思われる³⁾。今回、本試薬において非特異反応は見られず、IgMなどによる非特異反応を回避する工夫がされているものと思われる。しかし、ヒト血清中には他に様々な非特異抗体が存在するため、異常値に遭遇した場合は希釈試験などで見分ける必要がある。

Dダイマーの測定はDVT(Deep Vein Thrombosis: 深部静脈血栓症)の診断手順においてDVTを除外するのに極めて有効であることが報告されている⁴⁾。図8は、人工股関節の手術後1~3日、1週、2週、3週と経過を追ってDダイマーを測定し、本試薬の手術後における凝固・線溶の指標としての有用性を他法と比較したものである。図中のプロットは人工股関節手術9症例(抗凝固療法非施行)の平均値である。DVT予防として、術後当日から3日目までフットポンプ、4日目まで弾性包帯を行い、5~7日で車椅子、8~14日で歩行器・杖歩行となる。術後3日以降よりDダイマー値は上昇し2週間目をピークに減少していった。これは周手術期における生体反応、凝固・線溶の推移と一致しており⁵⁾、経過中において、3試薬は同様の動態を示した。このことから、本試薬は対照試薬と同様に臨床症状を反映しており、DVT指標として対応可能な試薬と考えられる。

現在、Dダイマーはいくつかのメーカーより測定キットが販売され、試薬の反応特異性の差異と標準物質の相違により、標準化は遅れている²⁾。日本救急医学会・日本血栓止血学会合同委員会により作成された救急領域のDIC診断基準⁶⁾でも、『FDPの代替としてDダイマーを使用して良い』が、『各施設の測定キットにより換算表を使用する』となっており、FDPのように、測定値を直接診断基準に用いることはできていない。しかし、今回のようにメーカーが

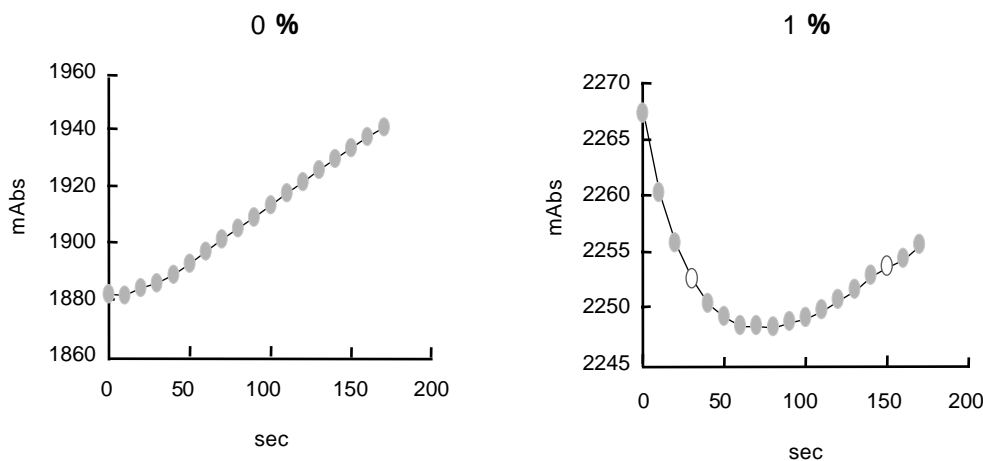


図7. イントラファット添加時反応カーブ

違う2社のDダイマー試薬が同等の反応性を持つことは、メーカー間差の是正につながる可能性があり、今後の標準化に期待したい。

結 語

リアスオート・Dダイマーネオは、ほぼ満足のいく基礎的検討結果が得られた。本試薬は高分子Dダイマーの反応性が高く、非特異反応の低減、高い希釈直線性などDダイマー測定試薬として優れた性能を持った試薬である。また、DVTの指標として十分対応可能な試薬である。

参考文献

- 1) 北川ミヤ, 他: 日常検査への新規Dダイマー試薬の導入を目的とした臨床評価. *Systemex J Web* 6 (3), 2005.
- 2) 片桐尚子, 他: 分子マーカーの標準化, DIC診断・治療に対する戦略的プロジェクト. *臨床病理レビュー特集号* 130: 87 ~ 94, 2004.
- 3) 大竹皓子, 加野象二郎: 免疫量的測定法における干渉, 検査と技術. 25 (3), 1997.
- 4) 柳本 繁: 股関節手術後のFDP D-dimer値の検討, 整形外科. 51 (9): 1137 ~ 1142, 2000.
- 5) 武田成彰: 外科手術とDIC, *DIC ology*. 第1版: 265 ~ 273, 1997.
- 6) 丸藤 哲: 救急領域のDIC診断基準, *臨床病理レビュー特集号*. 130: 15 ~ 21, 2004.

	術後1~3日	術後1週間	術後2週間	術後3週間
エルピアエースD-Dダイマー	4.45 ± 3.13	7.17 ± 4.01	10.22 ± 6.15	6.86 ± 4.63
リアスオート・Dダイマーネオ	4.81 ± 4.01	7.96 ± 4.97	11.37 ± 6.69	7.09 ± 4.71
リアスオート・Dダイマー	3.93 ± 2.47	6.67 ± 2.76	9.75 ± 6.04	6.85 ± 3.90

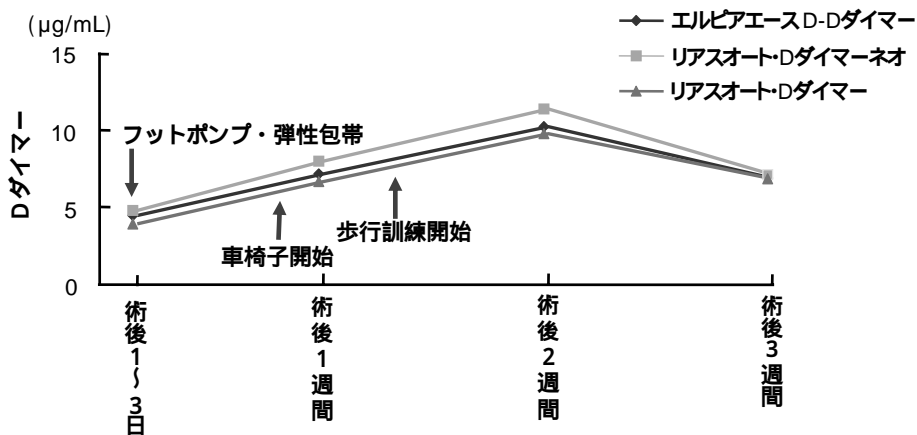


図8. 人工股関節手術後のDダイマー値

The Fundamental Study of D-dimer reagent “RIAS AUTO D-dimer NEO”

Harumi FUJITA^{*1}, Eiko NISHIDA^{*1}, Fusae TANAKA^{*1}, Mayumi MIYANABE^{*1}, Yoshi TANAKA^{*1},
Takayuki NOJIMA^{*2}, and Toshiharu FUKUNAGA^{*2}

^{*1}Central Clinical Laboratory, Kanazawa Medical University Hospital
1-1, Daigaku Uchinada-Machi, Kahoku-gun, Ishikawa 920-0293.

^{*2}Department of Pathology and Laboratory Medicine, Kanazawa Medical University

SUMMARY

Basic performance of D-dimer reagent, “RIAS AUTO D-dimer NEO,” was evaluated by using Coagrex-800. As a result, reproducibility and correlation with comparison methods are excellent. The influence of the interferential material was almost good, however it becomes a low value in strong chylemia. Therefore a dilution of the sample is necessary to evade the influence. The linearity was better than comparison reagent (up to 30 μ g/mL) and the minimum detection sensitivity was 0.1 μ g/mL. Non-specific reaction of IgM, which is observed in comparison methods, was enough controlled by anti-IgM antibody included in the buffer solution in this reagent. The sensitivity of high molecular weight D-dimer fraction is also high. It is considered that “RIAS AUTO D-dimer NEO” is useful to grasp the clinical condition in the thrombosis and the fibrinolysis.

Key Words D-dimer, RIAS AUTO D-dimer NEO, Non-Specific Reaction
