

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

北川ミヤ*1, 越智賢太*1, 藤井方仁*1, 山口和美*1, 飯田正彦*1, 林 寿郎*1
野口寛子*2, 笠井年和*2, 新井信夫*2, 船越國宏*2, 藤本敬二*2

*1 大阪厚生年金病院中央検査室：大阪市福島区福島4-2-78（〒553-0003）

*2 シスメックス株式会社学術本部

SUMMARY

最近、各社メーカーから多くのFDP・Dダイマー試薬が販売され、改良等も盛んに行われている。今回、シスメックス株式会社より新たに発売されたDダイマー測定試薬(リアスオート・Dダイマー ネオ)の性能評価を、実施した。リアスオート・Dダイマー ネオは、基本的性能(同時再現性、日差再現性、希釈直線性、最小検出感度等)は、良好であった。対照であるエルピアエースD-Dダイマーとも測定値の互換性があり、臨床症例において病態把握のための指標として使用できることが分かった。リアスオート・Dダイマーネオは、対照試薬に比較して、非特異反応に対しても改良がなされており、また、高分子のDダイマー分画との反応性が向上している。日常検査において臨床症状を良く反映できる試薬である。

Key Words Dダイマー、プラスミン分解、フィブリン、D分画、ラテックス凝集法

はじめに

フィブリンあるいはフィブリノゲンの分解産物であるFDPおよびDダイマーは、血栓の形成と線溶亢進状態を把握するための重要な指標として、DIC、血栓症および出血性疾患の病態把握のために用いられる。

近年、多数の試薬が販売され使用されているが、今回、シスメックス社が新しく開発したDダイマー試薬リアスオート・Dダイマー ネオを評価する機会を得たので報告する。

材料と方法

1. 対象

当院において平成16年5月から平成16年12月までの間にFDPおよびDダイマーの測定依頼があった検体について検討を行った。また、重症急性膵炎の症例においては、治療経過を追跡した。

2. 方法

検体

検体は、FDP専用採血管(トロンビン・アプロチニン入)で採血した血清および3.2%クエン酸ナトリウム加血漿を用いた。

装置

全自動血液凝固測定装置CA-1500(シスメックス社)およびLPIA-NV7(ヤトロン社)

試薬

エルピアエースD-Dダイマー、リアスオート・Dダイマー、リアスオート・Dダイマー ネオ(シスメックス社)

検討項目

1) 基本的性能評価

リアスオート・Dダイマー ネオについて管理試料を用いて同時再現性(n=10)、日差再現性

(5日間), 希釈直線性, 最小検出感度の検討を行った。

2) 各試薬とリアスオート・Dダイマー ネオの相関性

同一検体を用いて, 各試薬との相関性を検討した。

3) 1症例の臨床経過からの比較

臨床経過を追跡することができた重症急性膵炎症例において各試薬の測定値の変動を比較した。

4) E分画, D分画およびY分画に対する反応性

臨床検体に各分画を0~50 μ g/mLを添加し, その反応性を比較した。各分画には, 下記の製品を用いた。

D分画: Fibrin Fragment D (CALBIOCHEM)

E分画: Fibrin Fragment E (CALBIOCHEM)

Y分画: Fibrin Degradation Product Y (Biogenesis)

5) 安定化フィブリン分解産物の反応性

ヒト血漿10mLに対し, トロンビン10NIHU/mLを添加し, 37 $^{\circ}$ C 2時間インキュベートし, 安定化フィブリンを作製した。フィブリン塊を取り出し, 25mLのトリス緩衝液に浮遊させ, 次いで, プラスミン0.37 casein units/mLを添加して37 $^{\circ}$ Cで分解を行い, 0.5, 1, 2, 4, 6, 7, 8, 24, 28時間後に試料500 μ Lを取り出し, 2 TIU/mLのアプロチニンを添加して反応を停止させた。各プラスミン分解試料のDダイマー測定を行った。

ウェスタンブロットングには, ポリアクリルアミドゲル(レディーゲル5~10% 7well: Bio-rad)を用いた。一次抗体として抗ヒトフィブリノゲン・ウサギポリクローナル抗体(DAKO), 2次抗体としてパーオキシターゼ標識抗ウサギイムノグロブリン・ヤギポリクローナル抗体(DAKO)を使用し, POD発色試薬(HRP発色キット Bio-rad)を用いて発色させた。

SD 0.07, CV 3.3%, 管理用試料2において, 平均値12.3 μ g/mL, SD 0.19, CV 1.5%であった。

2) 日差再現性

2濃度の管理用試料を用いて, 5日間測定を行った。管理用試料1において, 平均値2.3 μ g/mL, SD 0.00, CV 0.0%, 管理用試料2において平均値12.7 μ g/mL, SD 0.17, CV 1.3%であった。

3) 希釈直線性

高濃度検体を専用希釈液で5段階希釈した試料をそれぞれ測定(n=10)し, 理論値と実測値をプロットして希釈直線性の評価を行った。図1に示すとおり約30 μ g/mLまで直線性が見られた。

4) 最小検出感度

管理試料を専用希釈液で希釈し, 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8および1.0 μ g/mLの試料を作製して, 最小検出感度の評価を行った。各試料を10回測定し, それぞれの平均値-2SDの値と0.0 μ g/mL試料の平均値+2SDの値が重ならない濃度を最小検出感度とした。図2に示すとおり, 最小検出感度は, 0.4 μ g/mLであった。

結果

1. 基本的性能評価

1) 同時再現性

2濃度の管理用試料を用いて測定(n=10)を行った。管理用試料1において, 平均値2.1 μ g/mL,

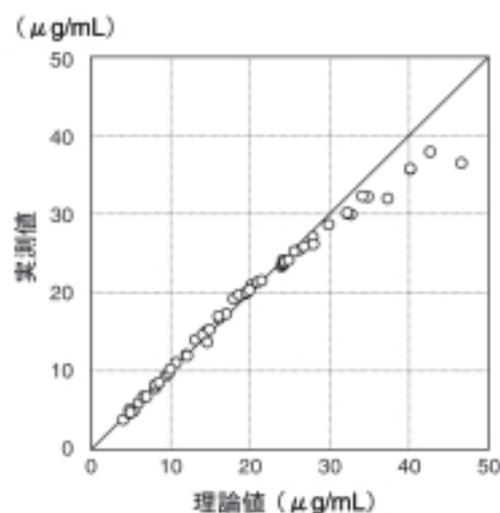


図1.リアスオート・Dダイマーネオの希釈直線性

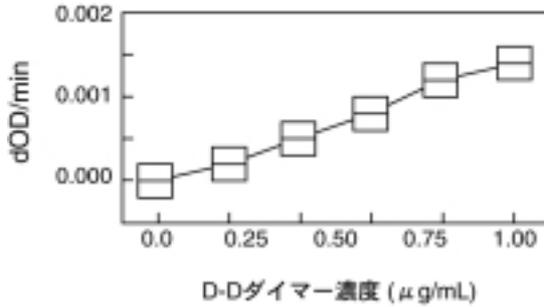


図2. リアスオート・Dダイマーネオの最小検出感度

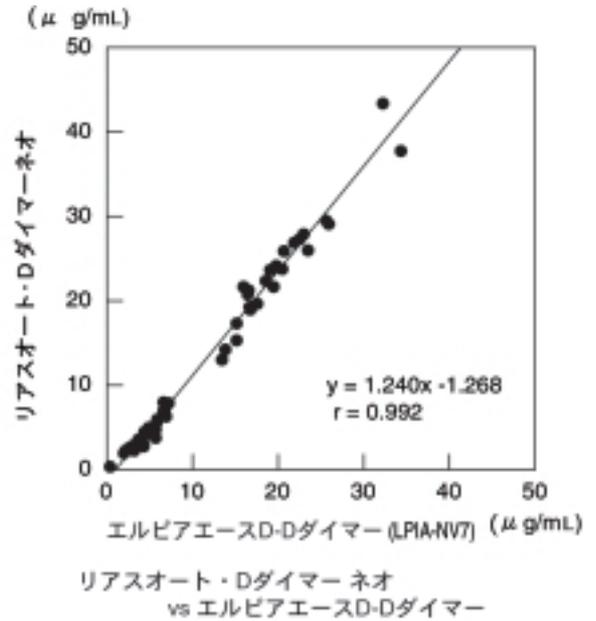


図3. リアスオート・DダイマーネオとエルピアエースD-Dダイマー相関

2. 各試薬とリアスオート・Dダイマーネオとの相関性

当院患者検体を用いて、エルピアエースD-Dダイマーとリアスオート・Dダイマーネオとの相関性の評価を行った。図3に示すとおり、相関係数 $r=0.992$ 、一次回帰式 $y=1.240x-1.268$ と良好な相関が得られた。

同様に、リアスオート・Dダイマーとリアスオート・Dダイマーネオとの相関性の評価を行った。図4に示すとおり、相関係数 $r=0.852$ 、一次回帰式 $y=1.290x+1.818$ の結果が得られた。検体No.24において大きく乖離がみられたためエルピアエースD-Dダイマーとの相関に比べて、やや悪い結果となった。検体No.24における乖離の原因を特定するため、確認吸収試験を実施した結果、リアスオート・DダイマーのIgMによる非特異反応であることが分かった。吸収後のデータを使用した相関においては、相関係数 $r=0.964$ 、一次回帰式 $y=1.583x-0.001$ となり良好な結果となった。

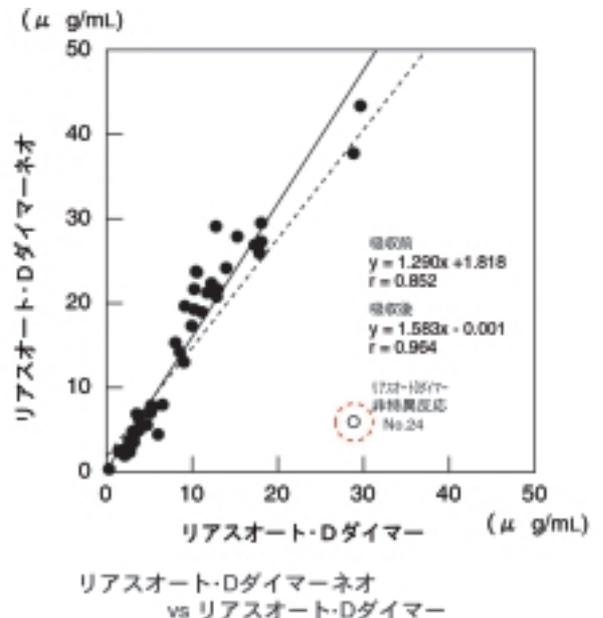


図4. リアスオート・Dダイマーネオとリアスオート・Dダイマー相関

3 . 臨床経過からの比較

症例)

28歳，女性。平成16年10月26日，救急搬送。来院時，アルコール臭，不穏著明。血液検査，血液ガス，腹部CTより，重症急性膵炎，DIC，ARFと診断された。CHDF，臍動注療法としてフサン，メロペン，オメプラール投与，高血糖にインスリン持続静注療法を施行した。平成16年12月8日，血液検査で安定，腹部CTでも臍腫脹改善傾向が認められ，近医外来において厳重経過観察を条件として退院した。

臨床経過を追うことが出来た重症急性膵炎症例において各試薬の測定値の比較を行った。測定値の変動を図5，ウェスタンブロッティングを図6にそれぞれ示す。

DIC発症例において臨床経過と共に各試薬のDダイマーの測定値が変動し，ウェスタンブロッティングにおいても，病態の変化と一致した。

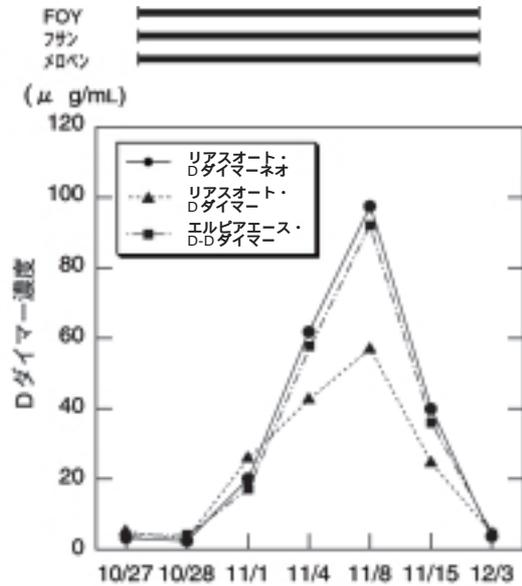


図5.重症急性膵炎症例における各試薬のDダイマー測定値

4 . D分画，E分画およびY分画に対する反応性

当院患者の低濃度および高濃度プール検体に各分画0～50 μg/mLを添加し，その反応性を比較した。

1) D分画

D分画を添加した場合，高濃度検体プール試料において，リアスオート・Dダイマーの測定値は，分画添加量の増加とともに低くなる傾向が見られたが，エルピアエースD-Dダイマーでは若干の上昇傾向が見られた。リアスオート・Dダイマーネオでは，変動は見られなかった。正常プール試料において，各試薬の測定値は，添加量増加とともに若干の上昇傾向が見られた(図7)。

ウエスタンブロッティングを図8，9に示す。高濃度検体プール試料(図8)および正常プール試料(図9)ともDダイマーのバンドが添加量と共に濃くなり，D分画試料中にDダイマーが含まれていたと考えられる。

2) E分画

E分画を添加した場合，高濃度検体プール試料および正常プール試料において，各試薬の測定値は，図10に示すとおり影響は見られなかった。それぞれのウエスタンブロッティングを図11，図12に示す。

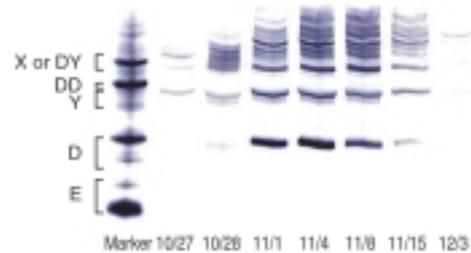


図6.臨床症例における臨床経過とWB

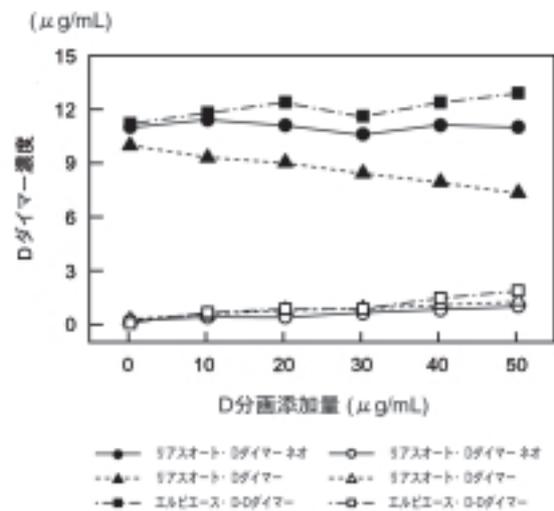


図7.D分画添加量とDダイマー濃度

高濃度検体プール試料

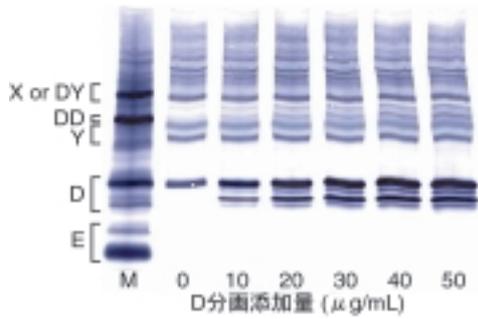


図8.Dダイマー高濃度試料へのD分画添加WB

高濃度検体プール試料

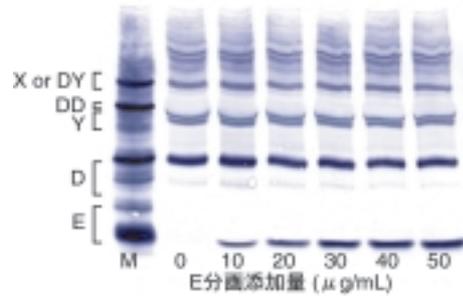


図11.Dダイマー高濃度試料へのE分画添加WB

正常プール試料

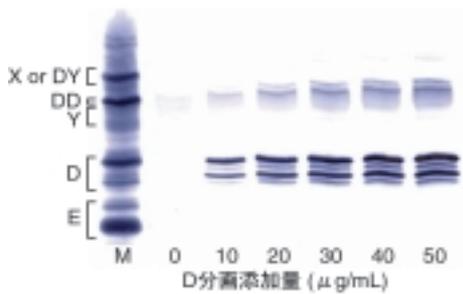


図9.Dダイマー低濃度試料へのD分画添加WB

正常プール試料

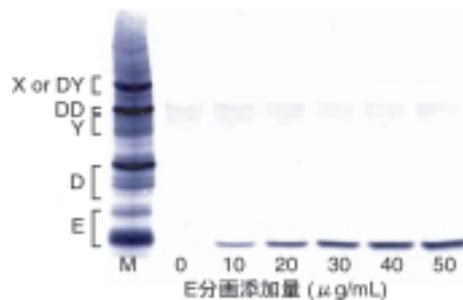


図12.Dダイマー低濃度試料へのE分画添加WB

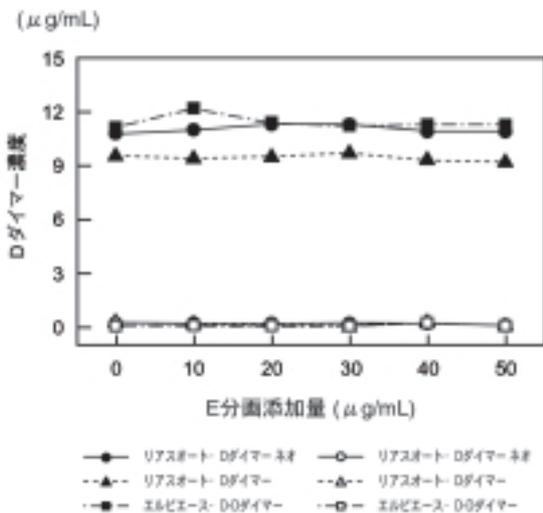


図10.E分画添加量とDダイマー濃度

3) Y分画

Y分画を添加した場合、高濃度検体プール試料において、リラスオート・Dダイマーの測定値は図13に示すとおり、分画添加量の増加とともに低下する傾向が見られたが、エルピエースD-Dダイマーおよびリラスオート・Dダイマーネオでは、影響は見られなかった。正常プール試料においては、各試薬とも影響は見られなかった。

各試料のウェスタンブロッティングを図14、15に示す。高濃度検体プール試料(図14)および正常プール試料(図15)とも、添加量の増加と共にD分画の位置にバンドが発現して濃くなり、Y分画試料中にD分画が含まれていたことが考えられる。

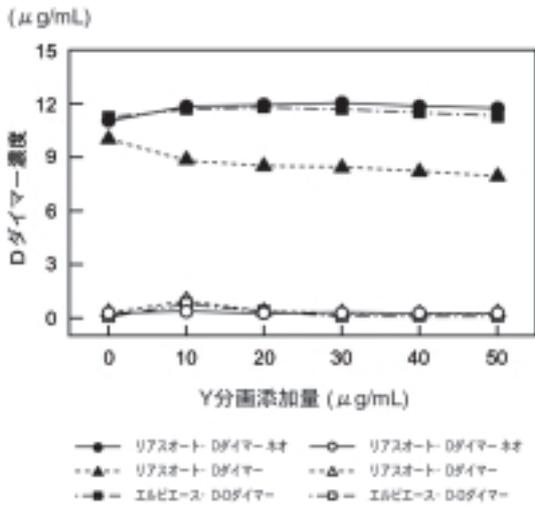


図13. Y分画添加量とDダイマー濃度

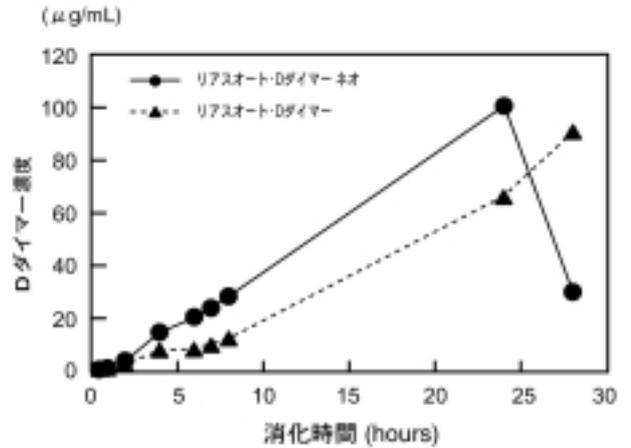


図16.安定化フィブリンの分解時間とDダイマー値

高濃度検体プール試料

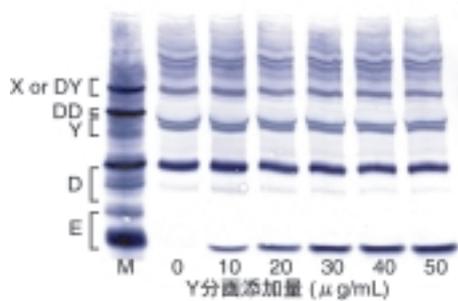


図14.Dダイマー高濃度試料へのY分画添加WB

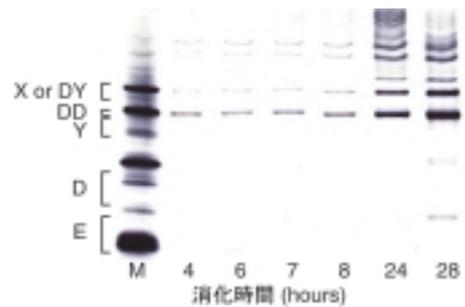


図17.安定化フィブリンの分解時間とWB

正常プール試料

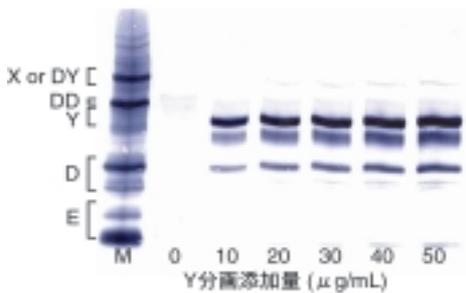


図15.Dダイマー低濃度試料へのY分画添加WB

5. 安定化フィブリン分解産物の反応性

安定化フィブリンをプラスミンで0.5, 1, 2, 4, 6, 7, 8, 24, 28時間分解した試料のDダイマー値を、各試薬を用いて測定した。分解初期の高分子Dダイマーの多い試料において、リアスオート・Dダイマー・ネオでは、高値を示し、リアスオート・Dダイマーでは低値となった。これに対して分解の進行した低分子Dダイマーの多い試料においては、リアスオート・Dダイマー・ネオにおいてDダイマー値が低値、リアスオート・Dダイマーでは高値を示した。各試薬の測定値を図16に示す。ウエスタンブロッティング(図17)は、時間の経過と共にDDのバンドが濃くなり、分解が進行していることを示している。

考 察

新規Dダイマー試薬 リアスオート・Dダイマーネオは、基本的性能，同時再現性，日差再現性，希釈直線性(図1)，最小検出感度等(図2)において，良好な結果を示した。エルピアエースD-Dダイマーとの相関において相関係数，一次回帰式とも良好であり，測定値の互換性があると考え(図3)。また，リアスオート・Dダイマーとの相関において乖離例がみられたが，確認吸収試験の実施により，リアスオート・Dダイマーにおける非特異反応であることが分かり，偽高値を示す非特異反応に対しても改良がなされている(図4)。重症急性膵炎症例でのDIC発症例において治療経過と共に測定値が上昇し，また，快方に向かうにつれて測定値が低下し，病態把握のための指標として使用できることが確認できた(図5,6)。FDPの各分画の添加試験においてリアスオート・Dダイマーでは，D分画の添加により測定値が低下するのに対してリアスオート・Dダイマーネオでは測定値の変動はなく影響を受けなかった。このことから，D分画との反応性も改善されていることが分かった(図7)。フィブリンの分解産物との反応性においては，プラスミン分解試料の高分子分画が多く含まれる試料でリアスオート・Dダイマーネオで高値を示し，低分子分画が多く含まれる試料ではリアスオート・Dダイマーが高値を示した。このことは，リアスオート・Dダイマーネオにおいてフィブリンの分解の初期，高分子のDダイマー分画が多い段階での試料との反応性が高く，リアスオート・D

ダイマーでは，フィブリン分解の進んだ段階での試料でも反応性が高いことを示している(図16,17)。in vitroではフィブリンはDD/Eまで分解されるが，in vivoでは血流および2-PIの作用により，DD/Eまで分解されないという報告もあり，高分子Dダイマーに対する反応性が高いほど生体内における線溶状態が反映できると考えられ，リアスオート・Dダイマーネオは，ルーチン検査として有用な試薬と考える。

参考文献

- 1) 末廣 謙，小川哲司: D-dimer測定の臨床的意義について，臨床病理.39: 694 ~ 700, 1991.
- 2) 腰原公人，福武勝幸: 線溶による分解残物(FDP, FgDP, Dダイマー)の測定，検査と技術.24 (10): 797 ~ 803, 1996.
- 3) 松田道生: フィブリノゲンの誘導体，とくに可溶性フィブリンとDダイマーについて その2. Dダイマーについて，血栓止血誌. 8(3):204 ~ 211, 1997.
- 4) 岡嶋研二: Dダイマー，Medical Technology.26(10): 1111 ~ 1113, 1998.
- 5) C.W. Francis Plasmic Degradation of Crosslinked fibrin I. Structural Analysis of the Particulate Clot and Identification of New Macromolecular-Soluble Complexes，Blood.56(3): 456 ~ 464, 1980.

Clinical Evaluation of a New D-Dimer Reagent for Routine Laboratory Use

Miya KITAGAWA^{*1}, Kenta OCHI^{*1}, Masahito FUJII^{*1}, Kazumi YAMAGUCHI^{*1}, Masahiko IIDA^{*1},
Jurou HAYASHI^{*1}, Hiroko NOGUCHI^{*2}, Toshikazu KASAI^{*2}, Nobuo ARAI^{*2}, Kunihiro FUNAKOSHI^{*2},
and Keiji FUJIMOTO^{*2}

^{*1}Osaka Kousei Nenkin Hospital : 4-2-78 Fukushima, Fukushima-ku, Osaka 553-0003.

^{*2}Scientific Affairs, Sysmex Corporation

SUMMARY

D-Dimer and FDP (Fibrinogen/Fibrin Degradation Products) reagents have been available in the market from various manufacturers for some time and these products are undergoing continuous improvement. Sysmex Corporation has recently launched LIAS AUTO D-Dimer NEO, a new D-Dimer reagent based on the immunoturbidimetric assay procedure. Here, we have evaluated the performance of this kit. It shows better basic performance (within-run reproducibility, day-to-day reproducibility, linearity and minimum detection limit). This reagent correlates well with the reference reagent of LPIA Ace D-Dimer (Iatron). Furthermore, there are two advantages of this reagent when compared with the reference reagent. One is that it has little influence from the non-specific reactions that are caused by antibodies such as human anti-mouse antibody and rheumatoid factor. The other is that it has high sensitivity against the high molecular weight D-dimer fraction. It is useful for the diagnosis of DVT (Deep Venous Thrombosis), PE (Pulmonary Embolism) and DIC (Disseminated Intravascular Coagulation).

This reagent can be used as a routine laboratory test and is useful for understanding the clinical condition of the patient.

Key Words D-dimer , Plasmin-digests , Fibrin , Fragment D , Latex Agglutination
