APTT測定試薬「アクチン　FSL」の基本性能

向出 佳恵[*1]，笠井 年和[*1]，中村 真佐徳[*2]，山内 由里子[*2]，
野口 啓子[*2]，瀧本 良実[*2]，川畑 宏志[*2]，重田 裕司[*2]

*1シスメックス株式会社 学術本部：神戸市西区室谷1-3-2（〒651-2241）
*2兵庫県立がんセンター 検査部

SUMMARY

内因系凝固スクリーニング検査に広く使用されている活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time：APTT）は，試薬中に含まれる活性化剤やリン脂質の違いにより，測定値や内因系の各凝固因子，ヘパリン，ループスアンチコアグラント（lupus anticoagulant：LA）に対する感度が異なることが知られている。今回，活性化剤にエラグ酸，リン脂質に大豆およびウサギ脳から抽出した2種類のリン脂質を使用したアクチン　FSLが新たに上市され，その基本性能を評価した。

本試薬の同時再現性，日差再現性はそれぞれCV 0.46％以下，CV 0.60％以下と良好で，データファイ・APTTとの相関は，相関係数r=0.943，一次回帰式y=0.907x +4.11であった。また，ヘパリンを添加した血漿でのヘパリン感受性は，データファイ・APTTと同等であり，LA陽性血漿を用いたLA感受性は同等以上であった。このことから，アクチン　FSLは，内因系凝固スクリーニングのみならずヘパリン療法のモニタリングやLAのスクリーニング検査など，APTT測定に求められる性能を有しており，ルーチン検査に有用なAPTT試薬と思われた。

Key Words　APTT，内因系凝固因子，ヘパリン，ループスアンチコアグラント

はじめに

活性化部分トロンボプラスチン時間（activated partial thromboplastin time：APTT）は，PTT試薬にエラグ酸，カオリン，セライトなどの活性化剤を添加することにより，接触因子を十分に活性化し，安定したデータが得られるように改良された測定方法である。現在，ほとんどの試薬が自動測定に対応し，内因系凝固のスクリーニング検査として広く用いられている[1)]。また，APTTはヘパリン療法のモニタリング[2～6)]やループスアンチコアグラント（lupus anticoagulant：LA）のスクリーニング検査[7)]としても使用される重要な検査項目である。

今回，大豆およびウサギ脳から抽出した2種類のリン脂質を使用したAPTT測定試薬アクチン　FSLが新たに上市され，その性能を評価したので報告する。

Web公開日：2007年5月25日

対象と方法

1．対象

兵庫県立がんセンターにおいて，平成17年11月から平成17年12月までの間にAPTTの測定依頼があった患者検体137例について検討した。

2．方法

1）材料

測定試料：0.11mol/Lクエン酸ナトリウム加患者血漿，正常域血漿（George King社），血液凝固試験用標準ヒト血漿（以下SHP），デイド サイトロール レベル1，デイド サイトロール レベル2（シスメックス社）

試　　薬：データファイ・APTT，アクチンFSL，0.020mol/L塩化カルシウム液，塩化カルシウム溶液(0.025mol/L)，第Ⅷ因子欠乏血漿，第Ⅸ因子欠乏血漿，干渉チェック・Aプラス（シスメックス社），ノボ・ヘパリン注1000（持田製薬社），フラグミン静注（キッセイ薬品社）

2）装置

全自動血液凝固測定装置CA-1500（シスメックス社）

3）実験方法

（1）再現性

a．同時再現性

正常域，異常域のコントロール血漿を10回連続測定した。

b．日差再現性

正常域，異常域のコントロール血漿を5日間連続測定した。

（2）相関性

患者検体137例を用いて，データファイ・APTTと比較した。

（3）正常参考範囲

患者検体137例を測定し，MCP-STAT（シスメックス社）のClinical Reference Range法（以下C.R.R法）において正常参考範囲を推定した。

（4）内因系凝固因子，ヘパリンおよびLAに対する感受性

a．内因系凝固因子感受性

第Ⅷ因子欠乏血漿，第Ⅸ因子欠乏血漿と正常域血漿を100:0，95:5，90:10，80:20，70:30，50:50，25:75，0:100の割合に混合した因子活性の異なる試料を測定し，各凝固因子に対する凝固時間の延長度合いをデータファイ・APTTと比較した。

b．ヘパリン感受性

正常域血漿と低分子量ヘパリンであるフラグミン静注および未分画ヘパリンであるノボ・ヘパリン注1000を混合し，それぞれ最終濃度0.0～1.0 IU/mLとなるように調整した試料を測定し，各ヘパリン濃度に対する凝固時間の延長度合いをデータファイ・APTTと比較した。

c．LA感受性

LA陽性患者血漿7例とキャリブレーター血漿であるSHPを測定し，LA/SHP比を求め，LAに対する凝固時間の延長度合いをデータファイ・APTTと比較した。

（5）共存物質の影響

干渉チェック・Aプラスを用いて遊離型ビリルビン，抱合型ビリルビン，溶血ヘモグロビン，乳びの影響について検討した。

（6）試薬安定性

試薬を装置内試薬ホルダーに設置し，正常域，異常域のコントロール血漿であるデイド サイトロール レベル1，デイド サイトロール レベル2を9日間測定することで，オンボードでの試薬安定性を確認した。試薬は，測定時のみ開栓し，それ以外では閉栓保存とした。また，試料はその都度溶解したものを測定した。

結　果

1．再現性

a．同時再現性

各コントロール血漿の10回連続測定の結果は，

・デイド サイトロール レベル1：平均値 28.61秒，SD 0.12，CV 0.42％

・デイド サイトロール レベル2：平均値 46.45秒，

SD 0.21，CV 0.46％であった。

b．日差再現性

各コントロール血漿の5日間測定の結果は，

・デイド サイトロール レベル1：平均値 28.80秒，SD 0.11，CV 0.37％

・デイド サイトロール レベル2：平均値 47.29秒，SD 0.28，CV 0.60％であった。

2．相関

患者検体137例を用いて，データファイ・APTTとアクチン　FSLの測定データを比較したところ，相関係数r=0.943，一次回帰式y=0.907x+4.11であった（**図1**）。

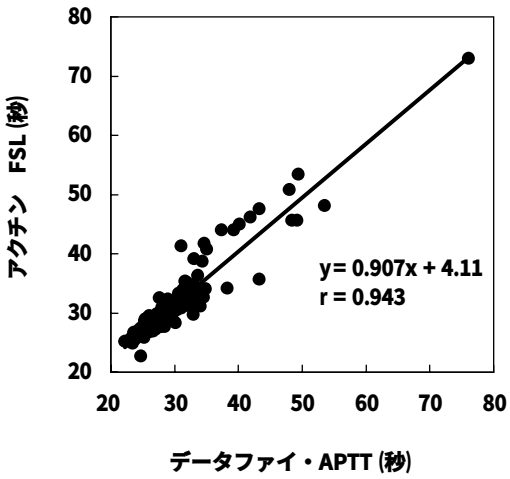

図1．データファイ・APTTとの相関

3．正常参考範囲

患者検体137例をアクチン　FSLで測定し，C.R.R法で推定した正常参考範囲は，24.3～36.0秒であった（**図2**）。

4．内因系凝固因子，ヘパリンおよびLAに対する感受性

a．内因系凝固因子感受性

両試薬ともに因子活性の低下に伴って凝固時間が延長した（**図3**）。凝固時間の延長の度合いは，Ⅷ因子，Ⅸ因子ともにデータファイ・APTTと同等であった。

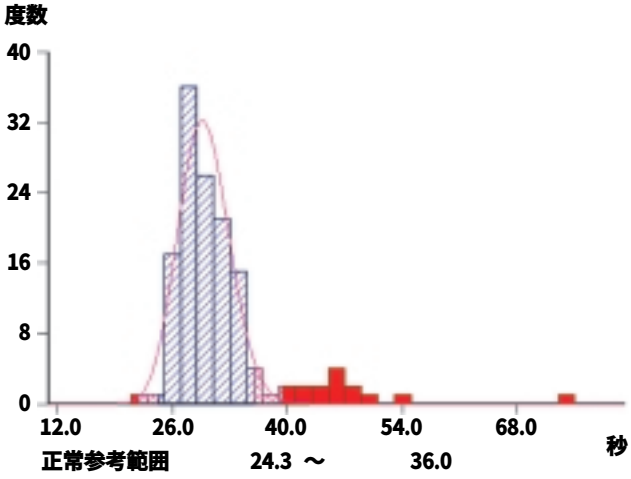

図2．C.R.R法にて推定した正常参考範囲

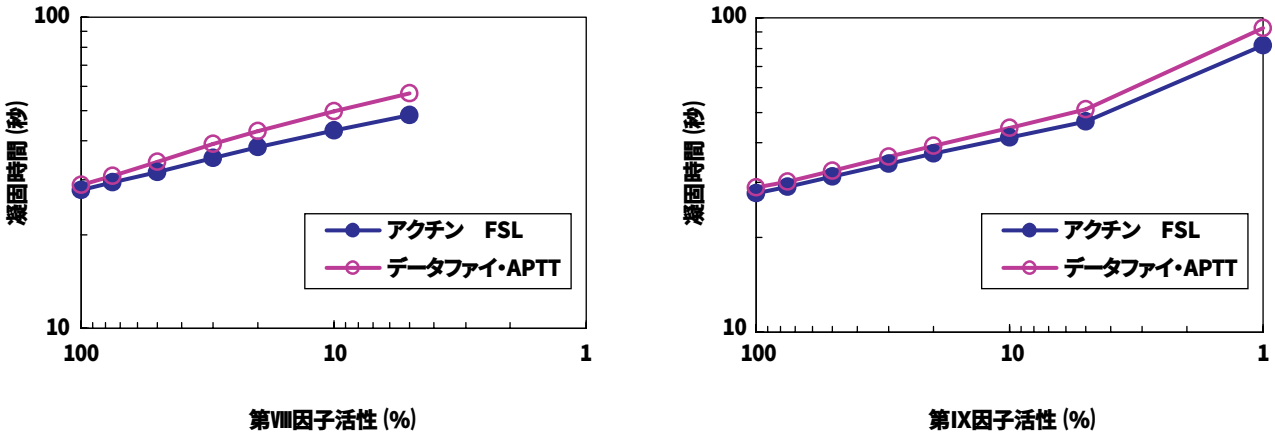

図3．内因系凝固因子感受性

b. ヘパリン感受性

両試薬において，ヘパリン濃度の増加にともなって凝固時間が延長した（**図4**）。低分子量ヘパリンでは，両試薬ともに**0.1** IU/mLより凝固時間の延長が見られ，未分画ヘパリンでは，**0.2** IU/mLより凝固時間の延長が見られた。また，各ヘパリンが**0.3** IU/mLの試料より，両試薬の凝固時間はC.R.R法にて推定した正常参考範囲外となった。

c. LA感受性

LA陽性患者血漿**7**例の測定値とSHPの測定値の比を算出したところ，アクチン　FSLで平均**2.0**，データファイ・APTTでは平均**1.9**であった。また，アクチン　FSLはデータファイ・APTTと比べ，**7**例中**4**例が高いLA/SHP比を示し，**2**例がほぼ同程度，**1**例が低い結果となった（**図5**）。

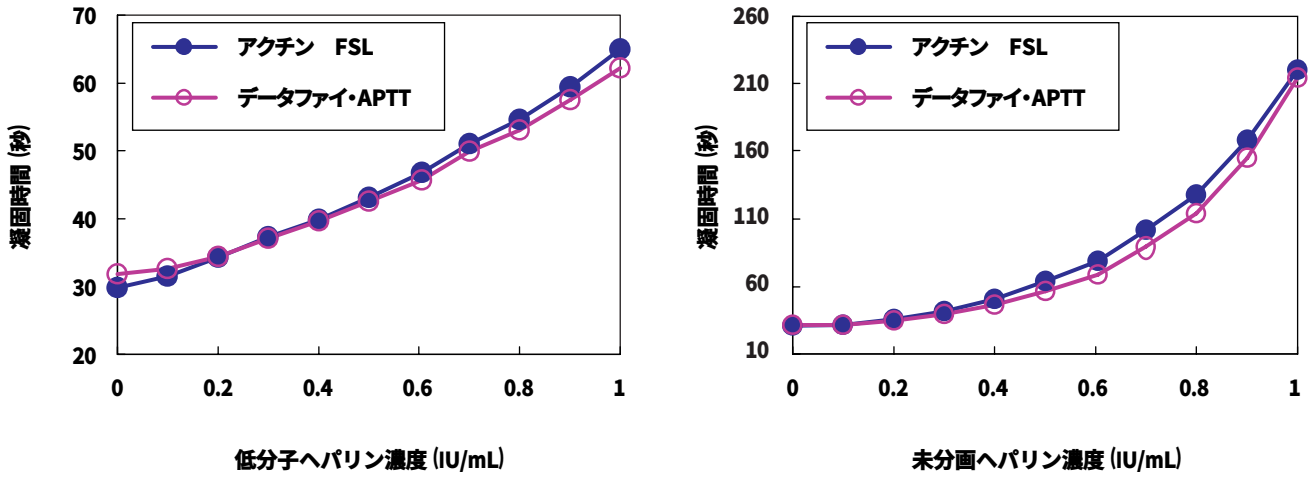

図4．ヘパリン感受性

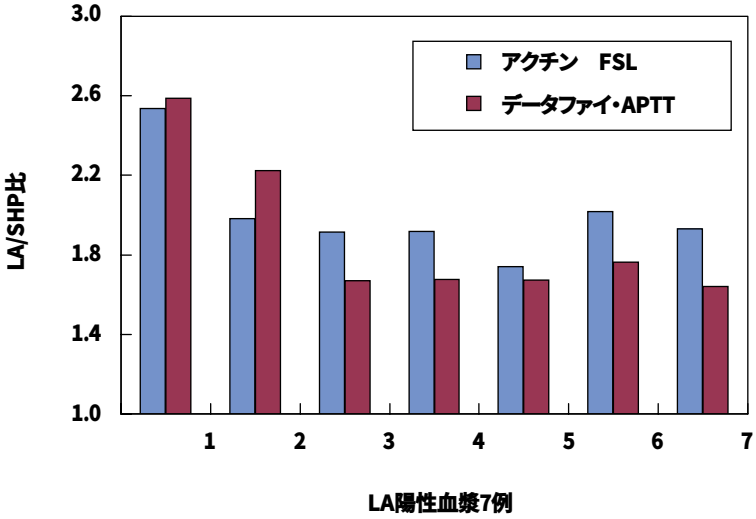

図5．LA感受性

5．共存物質の影響

各共存物資の影響は，遊離型ビリルビンで19.7mg/dLまで，抱合型ビリルビンで21.8mg/dLまで，溶血ヘモグロビンで487mg/dLまで，乳びで1890FTU（ホルマジン濁度）まで測定値への影響は認められなかった（**図6**）。

6．試薬安定性（オンボード）

初日の測定値を対照として，各測定日のデータを比較したところ，9日目まで対照測定値との間に1.0秒以上の変動は認められなかった（**図7**）。

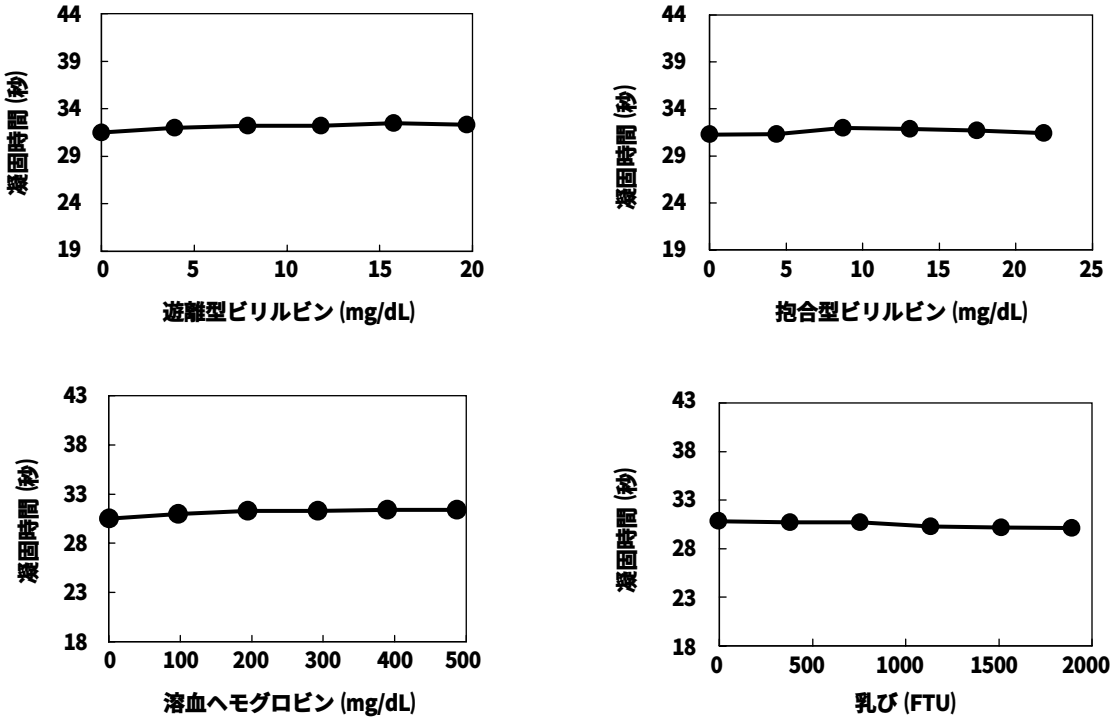

図6．共存物質の影響

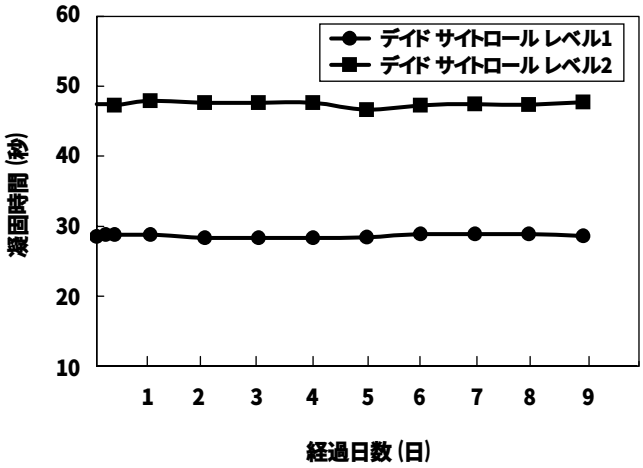

図7．試薬安定性

考　察

今回評価したアクチン　FSLは，同時再現性および日差再現性においてCV（%），SDともに良好であり，データファイ･APTTとの相関性も，異常域でのばらつきは認められるものの許容できる範囲と思われた。また，C.R.R法を用いて推定した正常参考範囲は，**24.3**～**36.0**秒となり，データファイ・APTTの**22.5**～**36.2**秒に近い範囲となった。このことから，データファイ・APTTからアクチン　FSLへのスムーズな切り替えが可能と思われる。内因系凝固因子の第Ⅷ因子および第Ⅸ因子に対する感受性においては，凝固因子の活性低下に伴い凝固時間の延長が認められ，その感度はデータファイ・APTTと同等であり，内因性凝固スクリーニングおよび血友病AあるいはBで低下する第Ⅷ因子，第Ⅸ因子の因子定量に使用可能と思われた。

また，ヘパリンに対する感受性においてはデータファイ･APTTと同等であることが確認された。ヘパリン療法のモニタリングには，検査結果が速やかに得られ，経済的にも安価なAPTTが用いられることが多く，通常，対照値の**1.5**～**2.0**倍に凝固時間が延長するように投与量が調整される。しかし，用いる測定試薬によって測定値が異なるため，治療域のヘパリン濃度（おおむね **0.3**～**0.7** IU/mL）とAPTTの測定値を把握しておくことが重要である[8]。今回の検討結果から得られたアクチン　FSLの上記治療域の凝固時間は，未分画ヘパリンで**41**秒～**103**秒（対照値**30**秒），低分子量ヘパリンで**37**秒～**51**秒（対照値**30**秒）に相当し，ヘパリン療法のモニタリングに十分使用可能であると思われた。

LA感受性においては，アクチン　FSLは，データファイ・APTTと比較すると，同等以上の感受性を示した。近年，APTT試薬によるLAのスクリーニング検査の有用性が注目されており，抗リン脂質抗体症候群と密接な関わりをもつ全身性エリテマトーデスや習慣性流産などにおいてLAは高率に検出される[9]。LAは，*in vitro* のリン脂質依存性凝固反応（APTT，希釈ラッセル蛇毒時間dRVVT，カオリン凝固時間KCT）を阻害する免疫グロブリンと定義され，その検出感度は試薬に含まれるリン脂質の種類に依存する[10]。その中でもL-a-ホスファチジルセリン（PS）の含有量がLAの感度を左右し，PSの含有量が少ないとLAの感受性が高くなり[11]，多くなると正常血漿の測定値が短縮することが報告されている[12]。また，大豆由来のリン脂質のPS濃度は，ウサギ由来と比べて低く[13]，大豆由来のリン脂質はLAに対して有利となると考えられる。アクチン　FSLは，大豆およびウサギ脳から抽出した**2**種類のリン脂質を使用しており，データファイ・APTTと同等の正常参考範囲を保った上で，LAに対する感度を向上させていることが，今回の結果から確認できた。しかしながら，単一の方法でLA の存在を決定することは困難であり，いくつかの方法を組み合わせて実施することが，国際血栓止血学会の抗リン脂質抗体標準化委員会のLA検査ガイドラインに示されている[14]。したがって，LAの検出にはAPTT測定や混合試験以外の各種検査方法も実施することが重要である。

共存物質の影響の検討では，今回検討したビリルビン，溶血ヘモグロビン，乳びの添加量においては測定値への影響は認められなかった。また，開封後のオンボードでの試薬安定性は，検討期間の**9**日間までの安定性が確認され，ルーチン検査での使用に十分耐え得るものであった。

以上の結果より，APTT測定試薬アクチン　FSLは，内因系凝固スクリーニングのみならず，ヘパリン療法のモニタリングやLAのスクリーニング検査など，APTT測定に求められる性能を有しており，ルーチン検査に有用なAPTT試薬であると思われた。

参考文献

1）松野一彦, 森本美恵. 全血凝固時間, 活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT), 活性化全血凝固時間（ACT). 特集 血栓症ガイドブック. **2004** ; 12 (**4**) : **51**-**55**.

2）Basu D, et al. A prospective study of the value of monitoring heparin treatment with the activated partial thromboplastin time. N Engl J Med. **1972** ; 287 : **324**-**327**.

3）Deykin D. Regulation of heparin therapy. N Engl J Med. **1972** ; 287 : **355**-**356**.

4）Spector I, Corn M. Control of heparin therapy with activated partial thromboplastin times. JAMA. **1967** ; 201 : **157**-**159**.

5）Zucker S, Cathey MH. Control of heparin therapy. Sensivity of the activated partial thromboplastin time for monitoring the antithrombotic effects of heparin. J Lab & Clin Med. **1969** ; 73 : **320-325**.

6）Van der Velde EA, Poller L. The APTT monitoring of heparin-the ISTH/ICSH collaborative study. Thromb Haemost. **1995** ; 73 : **73-81**.

7）Brinkhous KM, Dombrose FA. Partial thromboplastin time. Boca Raton : CRC Press ; **1980**. **221-246**, (CRC handbook series in clinical laboratory science, vol.**3**. Section Ⅰ : hematology. Schmidt RM, ed.)

8）櫻川信男, 他 : 抗凝固薬の適正な使い方. 東京 : 医歯薬出版 ; **2000**. **211-232**.

9）渡辺清明. 血栓症の臨床診断と血液凝固検査. 臨床病理. **1998** ; 46 : **238-244**.

10）安室洋子, 瀧　忠志. 抗リン脂質抗体とその検査. 臨床病理 特. **2001** ; 115 : **91-102**.

11）Kelsey PR, Stevenson KJ, Poller L. The diagnosis of lupus anticoagulants by the activated partial thromboplastin time-The central role of phosphatidyl serine. Thromb Haemost. **1984** ; 52 : **172-175**.

12）奥田昌宏, 菊川紀弘, 上村八尋. 合成リン脂質を用いた新しいAPTT試薬の開発. 日本検査血液学会雑誌. **2002** ; 3 (**1**) : **124-131**.

13）奥田昌宏.活性化部分トロンボプラスチン時間測定(APTT) における合成リン脂質の有用性. 日本血栓止血学会誌. **2005** ; 16 (**2**) : **222-227**.

14）渥美達也. ループスアンチコアグラント (LA) テスト. 特集 血栓症ガイドブック. **2004** ; 12 (**4**) : **89-92**.

Basic Performance of "Dade® Actin® FSL Activated PTT Reagent"

Kae MUKAIDE[*1], Toshikazu KASAI[*1], Masanori NAKAMURA[*2], Yuriko YAMAUCHI[*2], Keiko NOGUCHI[*1], Yoshimi TAKIMOTO[*2], Hiroshi KAWABATA[*2] and Hiroshi SHIGETA[*2]

[*1]Sientific Affairs, Sysmex Corporation, 1-3-2, Murotani, Nishi-ku, Kobe 651-2241
[*2]Hyogo Cancer Center

SUMMARY

The activated Partial Thromboplastin Time (APTT) is widely used for screening for functional factor (VIII, IX, XI and XII) defects but it is known that the specification of reagent components, such as activator and phospholipid, has an influence on the sensitivity for intrinsic factors, heparin and lupus anticoagulant (LA). In the Japan market, we have begun the sale of Dade® Actin® FSL Activated PTT Reagent (Actin FSL) that contains a combined phospholipid (rabbit brain and soy bean origin) and report the basic performance after evaluation of this reagent.

Within-run reproducibility and between-run reproducibility were excellent and CVs were less than 0.60% when control plasmas were used. The coefficient of correlation and regression formula between Actin FSL and Dade® Actin® Activated Cephaloplastin Reagent (Actin) were r=0.943 and y=0.907x +4.11, respectively. Sensitivity of unfractionated heparin and low molecular weight heparin using spiked heparinized samples was equal to Actin. Sensitivity of Factors VIII and IX using mixed factor deficient plasma was also equal to Actin. LA sensitivity when using LA positive samples was equal to or better than Actin. From these results, Actin FSL fulfills all the requirements of routine testing such as detection of factor deficiencies of the intrinsic system, heparin monitoring and LA screening.

Key Words APTT, Intrinsic Factor, Heparin, Lupus Anticoagulant