

PT 測定試薬「デイド イノピン」と APTT 測定試薬「アクチン FSL」の概要

シスメックス株式会社 学術本部 新井 信夫
向出 佳恵

はじめに

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) の3項目は、血液凝固能のスクリーニング検査として最も普及している検査である。これらの項目は、血友病や播種性血管内凝固症候群 (DIC) などに代表される出血傾向における凝固因子の量的・質的異常を検索するスクリーニング検査として、また最近では血栓症の抗凝固療法のモニタリング検査としても用いられている¹⁾。

PT 試薬の主成分である組織因子は、リン脂質に結合した状態で活性を発揮するため、試薬の標準化が難しく、また、その由来や精製度によって凝固因子に対する感度が異なることが知られている²⁾。これらを解消するために、WHO では、試薬ごとに ISI (International Sensitivity Index; 国際感度指数) を決定し、国際的に通用する指標である INR (International Normalized Ratio) で報告することを推奨しており、INR を算出する際に発生する“指数”による誤差を少なくするために ISI の低い (1.0 に近い) 試薬の使用も推奨している³⁾。

一方、APTT 試薬においても、従来出血傾向のスクリーニング検査だけではなく、ヘパリンに代表される血栓症の抗凝固療法のモニタリングや LA に代表される血栓症素因のスクリーニング検査にも用いられており、出血傾向・血栓症性素因のスクリーニングおよび抗凝固療法のモニタリングに使用できる試薬が必要とされている⁴⁾。

今回、当社では遺伝子組み換え組織因子 (rTF)

を用いた高感度 PT 測定試薬の「デイド イノピン」と2種類のリン脂質を用いた APTT 測定試薬の「アクチン FSL」の販売を開始したので、以下に基礎データを交えながらこれらの試薬の特長と概要について紹介する。

試薬の概要

1. デイド イノピン

デイド イノピンは、ヒト由来 TF の 263 個の全アミノ酸配列⁵⁾を遺伝子組み換え技術により大腸菌で発現させた rTF を、リン脂質で再構成した後、カルシウム塩、緩衝剤および安定化剤等を加えて凍結乾燥⁶⁾した PT 試薬である (表 1)。

2. アクチン FSL

アクチン FSL は、活性化剤にエラグ酸、リン脂質にウサギ脳由来と大豆由来の2種類を使用した液状 APTT 試薬である (表 2)。

基本的性能

1. 同時および日差再現性

デイド イノピンおよびアクチン FSL の正常域血漿と異常域血漿による同時再現性 (n=10)、日差再現性 (5日間) の結果は、デイド イノピンでは秒数、%、INR、アクチン FSL では秒数において CV2.0% 以下の良好な結果が得られた (表 3)。

表1. デイド イノピン概要

包装サイズ	10×4mL, 10×10mL
組織因子 (由来)	ヒト遺伝子組み換え
リン脂質	合成リン脂質
ISI	1.0
正常参考範囲	9.7~12.3秒 (CA-1500)
ヘパリン非感受性	2U/mLまで影響を受けない
安定性 (closed vial)	2~8 10日間 15~25 5日間

表2. アクチン FSL概要

包装サイズ	10×2mL, 10×10mL
活性化剤	エラグ酸
リン脂質 (由来)	ウサギ脳, 大豆
正常参考範囲	25.2~30.4秒 (CA-1500)
安定性 (closed vial)	15 7日間

表3. 同時および日差再現性

サンプル	デイド イノピン						アクチン FSL	
	秒		%		INR		秒	
	同時 CV (%)	日差 CV (%)						
正常域血漿	0.6	0.4	1.3	0.8	0.6	0.4	0.4	0.3
異常域血漿	0.7	1.5	1.0	2.0	0.7	1.4	0.4	0.6

2. 因子検量線

デイド イノピンによる第 因子検量線をトロンボプラスチン・Cプラスと比較したところ、デイド イノピンの検量線はより急な傾きを示した(図1)。アクチン FSLによる第 因子および第 因子検量線をデータファイ・APTTと比較したところ、両試薬でほぼ同じ傾きの検量線であった(図2, 3)。

3. ヘパリン感受性

未分画ヘパリンを正常域血漿に添加してデイド イノピンとアクチン FSLのヘパリン感受性を確認した。デイド イノピンでは、未分画ヘパリン2 IU/mLまで凝固時間に変動は見られなかった(図4)。アクチン FSLは、濃度依存的に凝固時間の延長を示し、延長の度合いはデータファイ・APTTとほぼ同等であった(図5)。

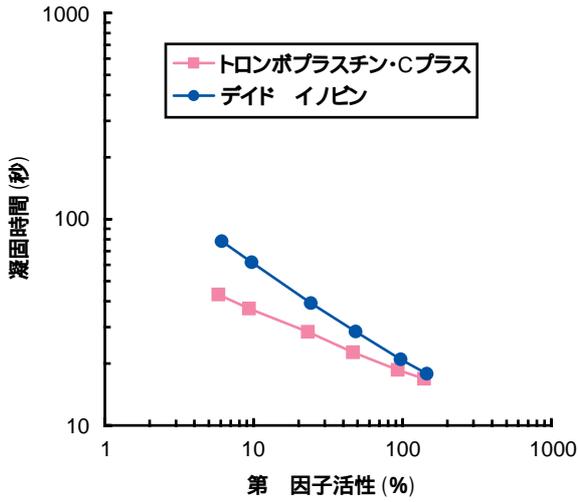


図1．第 因子検量線

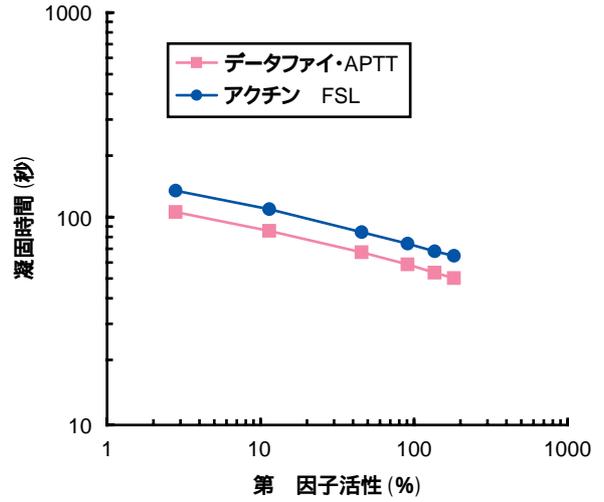


図2．第 因子検量線

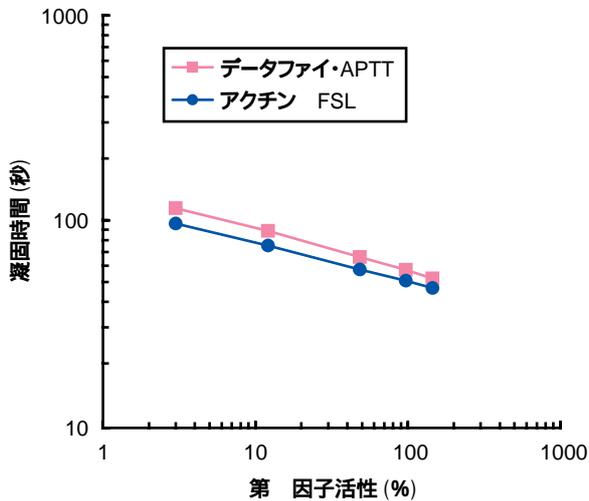


図3．第 因子検量線

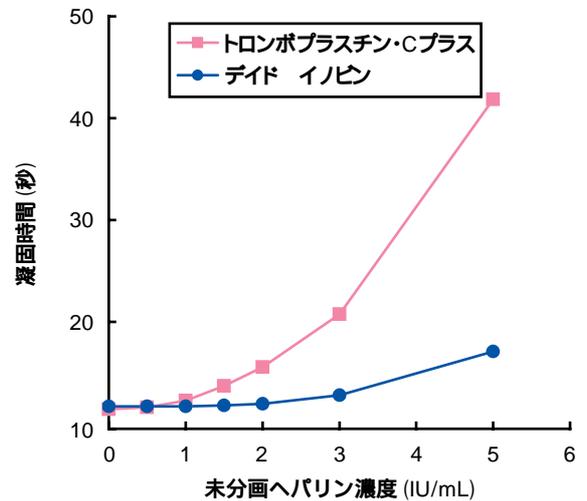


図4．PT 試薬ヘパリン感受性

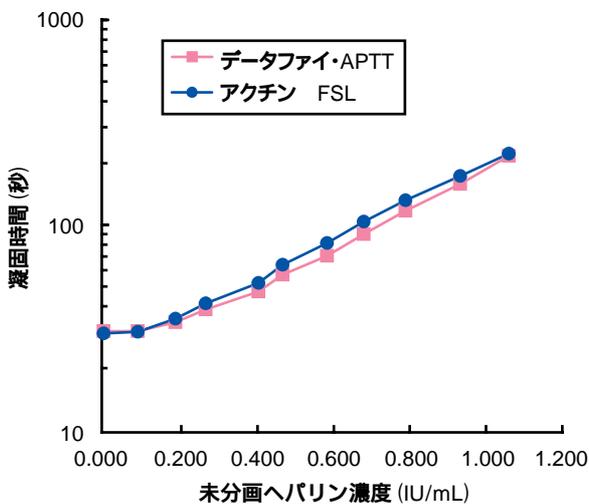


図5．APTT 試薬ヘパリン感受性

4. 相関性

1) 各種疾患の患者血漿 (104 検体) を用いてデイド イノピンとトロンボプラスチン・Cプラスとの相関性を確認した。秒数では、 $r=0.97$, $y=1.85x-10.6$ の結果となり、ワルファリン投与検体などの因子低下群においてデイド イノピンはより延長が見られた (図6)。INRでは、 $r=0.99$, $y=0.81x+0.15$ とトロンボプラスチン・Cプラスが全体的に高めの値となり、INRが2.0を超える試料では、より顕著にトロンボプラスチン・CプラスのINRが高くなった。これはトロンボプラスチン・CプラスのISIが1.7と高いために、INRを算出する際に発生する“指数”による誤差のためと思われる (図7)。

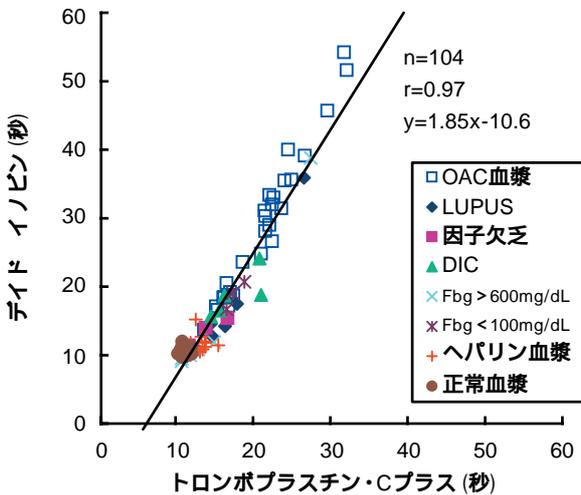


図6. デイド イノピンの相関 (秒)

2) 患者血漿 (200 検体) を用いて、アクチン FSL とデータファイ・APTTとの相関性を確認した。 $r=0.93$, $y=0.87x+5.1$ の結果となり、異常域においてはデータファイ・APTTの方が若干延長した凝固時間を示した (図8)。

5. 正常参考範囲

健常者 60 名の血漿を測定し、MCP-STAT (シスメックス社) のパラメトリック法において正常参考範囲を算出した。デイド イノピンは、秒数：9.7 ~ 12.3 秒, 活性値：86.9 ~ 120.4 % , INR：0.92 ~ 1.17 , アクチン FSLは、25.2 ~ 30.4 秒であった (表4)。

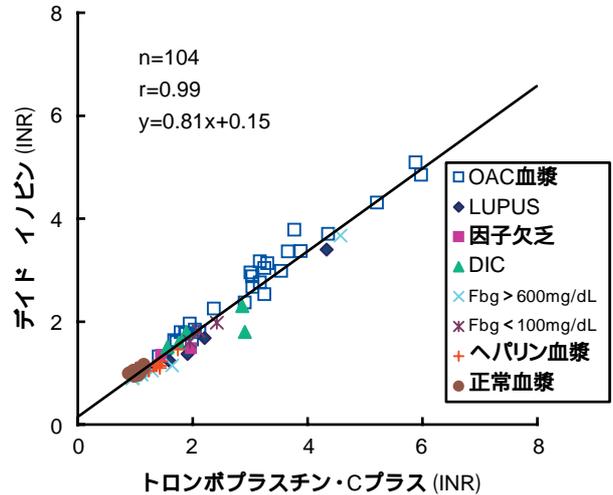


図7. デイド イノピンの相関 (INR)

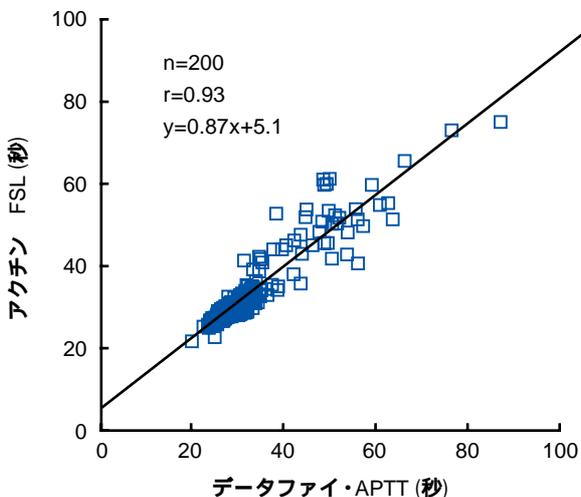


図8. アクチン FSLの相関

表4. 正常参考範囲

	デイド イノピン	アクチン FSL
秒数	9.7 ~ 12.3 (中央値10.3)	25.2 ~ 30.4 (中央値27.9)
%	86.9 ~ 120.4 (中央値105.1)	-
INR	0.92 ~ 1.17 (中央値0.98)	-

表5 . PT 試薬のISI 値のロット間差

	デイド イノピン	トロンボプラスチン・Cプラス
n	100	36
Mean	1.02	1.55
SD	0.03	0.08
CV%	2.9	5.3

おわりに

デイド イノピンは、遺伝子組み換え組織因子と合成リン脂質を使用していることから、従来の動物由来の組織因子による試薬に比べて、残存凝固因子がほとんど含まれていない。

したがって、試薬自体は澄んでおり、10日間の静置でも沈降物を生じない。また、2～8℃で密栓保存した場合は、10日間の安定性を保っており、動物由来のPT試薬より保存安定性に優れている。また、リコンビナントのPT試薬であることから、ロット間差が低減されているのが大きな特長である。表5にISI値のロット間差を示した。100ロットの試薬でのISI値は、平均1.02、CV 2.9%と非常に安定している。

デイド イノピンの第Ⅰ因子の検量線は、トロンボプラスチン・Cプラスより傾きが急であり、第Ⅰ因子の因子感受性が高いことが伺え、活性値(%)への変換においても誤差が生じにくいと思われる。また、デイド イノピンは未分画ヘパリン約2 IU/mLまで測定値に影響を受けないことから、ヘパリン/ワルファリンの併用療法の時に、治療レベルのヘパリンの干渉を受けずにPTの測定が可能である。

デイド イノピンは、国際3次標準試薬のrTF/95によりISIが決定されており、感度はこの国際標準試薬とほぼ同等である。PT試薬のISIについては、WHOガイドライン³⁾では1.5未満、望ましくは1.2

未満、CLIS (旧NCCLS) ガイドライン⁷⁾では1.5以下が推奨されており、今後さらに1.0に近い試薬が推奨されるものと思われる。

アクチン FSLは、第Ⅰ因子、第Ⅱ因子の検量線およびヘパリン感受性はデータファイ・APTTとは同等であった。また、データファイ・APTTと良好な相関性が認められた。アクチン FSLは、リン脂質にウサギ脳由来と大豆由来の2種類を用いているが、APTT試薬に含まれるリン脂質の種類と量は、試薬性能に大きな影響を及ぼすことが知られている⁸⁾。アクチン FSLでは、大豆由来のリン脂質でLAへの感受性を高めるとともに、ウサギ脳由来のリン脂質で凝固時間を従来試薬のデータファイ・APTTと同等にしており、LA陽性患者血漿7例を用いた検討では5例がデータファイ・APTTより延長した結果を示したことをすでに報告している⁹⁾。

以上より、デイド イノピンは、

1. ISIが1.0と国際標準品に近く高感度である
2. 第Ⅰ因子に対する感度が高い
3. ヘパリンの影響を受けにくい
4. ロット間差が小さく、保存安定性が良い

などが特長としてあげられる。一方、アクチン FSLは、データファイ・APTTと同等の性能を有し、2種類のリン脂質を用いることでLAの感受性を高めた試薬である。

参考文献

- 1) 池田康夫, 他. 血栓症ナビゲーター. 東京: メディカルレビュー社; 2006. 180-181.
- 2) 後藤信哉, 半田俊之介. 循環器領域における血栓症と抗血栓療法. 東京: メジカルセンス; 2002. 22-28.
- 3) WHO Expert Committee On Biological Standardization 48th Report. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 1999. 64-85.
- 4) 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.
- 5) Takayenoki Y, et al. cDNA and amino acid sequences of bovine tissue factor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1991; 181 (3): 1145.
- 6) Hawkins P, et al. Prothrombin time reagents prepared from recombinant human tissue factor produced in *E. coli*. *Thromb Hemost.* 1991; 65 (6): 1215.
- 7) Adcock DM. Procedures for Validation of INR and Local Calibration of PT/INR Systems; Approved Guideline H54-A, 1st ed. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2005. 64.
- 8) 安室洋子, 他. 抗リン脂質抗体とその検査. *臨床病理 特.* 2001; 115: 91-102.
- 9) 向出佳恵, 他. APTT測定試薬「アクチン FSL」の基本性能. *Sysmex J Web.* 2007; 8 (2), https://members.sysmex.co.jp/scientific/sjw/2007/vol08_2/fulltext02.html