

# ウサギ脳由来セファリンと大豆由来脂質の 混合リン脂質を用いた活性化部分 トロンボプラスチン時間測定試薬 アクチン FSL の基礎的検討

下村 大樹, 前川 芳明, 山本 慶和, 松尾 収二

天理よろづ相談所病院 臨床病理部：奈良県天理市三島町 200 番地 (〒 632-8552)

## SUMMARY

ウサギ脳由来セファリン (RBT) と大豆由来脂質 (SOY) の混合リン脂質を用いた、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) 測定試薬アクチン FSL (FSL) の基本的性能を検討した。また、リン脂質が RBT 単独で活性化剤が FSL と同一であるデータファイ・APTT (Data-Fi) を対照試薬として、各因子に対する感受性、相関性およびロット間差を比較し、2種類のリン脂質を用いた効果についても検討した。

再現性は同時・日差ともに良好で、試薬の安定性も良好であった。各因子に対する感受性の比較においては、Data-Fi に比べて未分画ヘパリン、第Ⅷ因子、第Ⅸ因子および第Ⅺ因子に対する感受性はほぼ同程度であったが、FSL はループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant : LA) に対する感受性が高く、第Ⅻ因子に対する感受性が低かった。両試薬の相関性は  $y = 0.812x + 9.20$ ,  $r_s = 0.946$  であり、高い相関性を認めた。また、両試薬のロット間差は FSL が有意に小さかった。以上より、FSL はリン脂質として RBT と SOY の2種類を組み合わせることで、リン脂質の組成や濃度の変動を少なく調整できる利点を有し、APTT の安定したデータの供給に貢献すると考えられた。

## Key Words

APTT, 内因系凝固因子, 混合リン脂質, ループスアンチコアグラント, ロット間差

## 緒言

活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) は、内因系凝固能を総合的に反映するスクリーニング検査として利用されている。また、ヘパリン投与による抗凝固療法のモニタリング、ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant : LA) のスクリーニング、内因系凝固因子定量、およびインヒビター力価の測定にも用いられている。

測定に用いられる APTT 試薬は、血小板代用物質としてのリン脂質と活性化剤から構成される。リン脂質は、様々な物質からの抽出物が用いられ、ウサギ脳、大豆、ヒト胎盤、ウシ脳および卵黄由来などがある。動植物由来のリン脂質を用いた試薬では、単一由来のリン脂質を使用した製品が多く<sup>1)</sup>、リン脂質組成にロット間差を生じる欠点があるとされている<sup>2-4)</sup>。その欠点を解消するため、近年では合成リン脂質を用いた試薬の開発も進められている<sup>5,6)</sup>。今回我々は、リン脂質にウサギ脳由来セファリン (RBT)

と大豆由来脂質 (SOY) の混合リン脂質を用いたアクチン FSL (以下, FSL; DADE BEHRING 社) の基本的性能の検討と, RBT と SOY を組み合わせたことによる効果の評価を行った。

## 材料および方法

### 1. 試薬・機器

APTT 試薬には FSL を使い, 対照試薬として, リン脂質が RBT 単独で活性化剤が FSL と同一であるデータファイ・APTT (以下, Data-Fi; DADE BEHRING 社) を用いた (表 1)。測定機器は全自動血液凝固分析装置 Coagrex-800 (以下, Coagrex-800; シスメックス社) を使い, APTT 凝固一段法にて測定した。

### 2. 再現性

同時再現性は, 管理試料サイトロール (DADE BEHRING 社) を使い, APTT 値が基準範囲内であるレベル 1, 中等度異常値のレベル 2, および高度異常値のレベル 3 を 10 回連続測定した。

日差再現性は, サイトロールレベル 1, レベル 2, およびレベル 3 を 5 日間測定した。

### 3. 試薬のオンボード安定性

同一バイアルの試薬を Coagrex-800 の試薬保冷庫に常時開栓状態で設置し, サイトロールレベル 1, レベル 2, およびレベル 3 を 14 日間測定した。今回の検討においては, サイトロールを溶解後分注したものを凍結保存し, 用時融解して使用した。

### 4. 未分画ヘパリンに対する感受性

生理食塩水をブランクとして, ヘパリンナトリウム (味の素社) を健常人プール血漿に添加し, 終濃度 0.05 ~ 0.65 U/mL に調製した試料を用い, FSL と Data-Fi の凝固時間を比較した。なお, 健常人プール血漿は, プロトロンビン時間 (PT) および APTT が基準範囲内であった当院職員ボランティア 30 名 (男性 12 名, 女性 18 名) から採血したクエン酸 Na 加血漿を用いた。

### 5. 内因系凝固因子に対する感受性

健常人プール血漿の各凝固因子活性値を 100% とし, 第 VIII 因子欠乏血漿, 第 IX 因子欠乏血漿, 第 XI 因子欠乏血漿, および第 XII 因子欠乏血漿 (DADE BEHRING 社) をそれぞれ混合した希釈系列を作成し, FSL と Data-Fi の凝固時間を比較した。

### 6. LA に対する感受性

LA 陽性症例 26 検体について FSL と Data-Fi の凝固時間を測定し, それぞれの値を健常人 30 検体の平均値で除して凝固時間比 (Ratio) を求め, 比較した。

なお, LA の診断は, 国際血栓止血学会の Scientific and Standardization Committee (SSC) の指針<sup>7)</sup> に則って進められるが, 今回はスクリーニング検査 2 法, 混合試験 1 法, および確認試験 1 法を実施し, すべての検査において陽性になった検体を LA 陽性として用いた。スクリーニング検査では, PTT-LA (ロシュ・ダイアグノスティックス社) の凝固時間と Data-Fi を 0.1mM エラジン酸 (Sigma 社) 溶液で希釈した希釈 APTT の凝固時間を測定した。混合試験は,

表 1. 測定試薬の組成

	FSL	Data-Fi (対照試薬)
リン脂質	ウサギ脳由来 セファリン + 大豆由来脂質	ウサギ脳由来 セファリン
活性化剤	エラジン酸	エラジン酸
塩化カルシウム 溶液濃度	0.025 mol/L	0.020 mol/L

希釈 APTT による患者血漿，健常人プール血漿，および両者の混合血漿の凝固時間から Rosner index を求めた。確認試験は，希釈 Russel 蛇毒試験「グラディポア」(MBL 社)の凝固時間から LA-Screen/LA-Confirm を求めた。

LA スクリーニング検査と FSL および Data-Fi の凝固時間との関係を調べるため，説明変量として PTT-LA と希釈 APTT の凝固時間を用いて重回帰分析における決定係数を求めた。

### 7. 相関性

臨床検体を含めた 126 検体を用いた。内訳は，健常人検体として当院職員ボランティア 30 検体，ワーファリン服用およびビタミン K 欠乏症例 30 検体，肝機能低下症例 20 検体，ヘパリン投与症例 20 検体，LA 陽性症例 26 検体であった。なお，ワーファリン服用およびビタミン K 欠乏症例は International Normalized Ratio (INR) が 2.45 以上，肝機能低下症例はコリンエステラーゼが当検査室の基準範囲下限の 1/2 以下 (0.30  $\Delta$  pH 以下)，ヘパリン投与症例は硫酸プロタミン溶液の添加により凝固時間が補正された検体を用いた。相関係数は，スピアマンの順位相関係数 ( $r_s$ ) を算出した。また，回帰直線からのデータのバラツキを調べるため，回帰式の標準誤差 (不偏推定量:  $Sy.x$ ) を求めた。

### 8. ロット間差

各試薬 2 ロットを用い，臨床検体を含めた 122 検体を測定し比較した。なお，対象検体は相関性の検討に用いた検体と同一であるが，前述の相関性の検討において 100 秒以内の検体のみとした。

## 結果

### 1. 再現性

同時再現性は，サイトロールレベル 1 の平均値  $\pm$  SD および CV が  $30.9 \pm 0.09\text{sec}$ ，0.31%，レベル 2 が  $49.0 \pm 0.19\text{sec}$ ，0.39%，レベル 3 が  $64.8 \pm 0.15\text{sec}$ ，0.23%であった (表 2)。

日差再現性は，レベル 1 が  $30.8 \pm 0.23\text{sec}$ ，0.74%，レベル 2 が  $48.9 \pm 0.47\text{sec}$ ，0.96%，レベル 3 が  $64.7 \pm 0.23\text{sec}$ ，0.35%であった。

### 2. 試薬のオンボード安定性

サイトロールレベル 1，レベル 2，およびレベル 3 ともに 14 日間までほぼ一定の値を示し (図 1)，CV は，それぞれ 0.44%，0.35%および 0.57%であった。

### 3. 未分画ヘパリンと内因系凝固因子に対する感受性

未分画ヘパリンに対して，FSL，Data-Fi ともに濃度依存的に延長を認め，感受性はほぼ同程度であった (図 2)。内因系凝固因子に対する感受性については，

表 2. 再現性試験

同時再現性 (n=10)	サイトロール		
	レベル1	レベル2	レベル3
Ave (sec)	30.9	49.0	64.8
Min (sec)	30.8	48.7	64.4
Max (sec)	31.0	49.4	64.9
SD	0.09	0.19	0.15
CV (%)	0.31	0.39	0.23
日差再現性 (n=5)	サイトロール		
	レベル1	レベル2	レベル3
Ave (sec)	30.8	48.9	64.7
Min (sec)	30.5	48.2	64.6
Max (sec)	31.1	49.5	65.1
SD	0.23	0.47	0.23
CV (%)	0.74	0.96	0.35

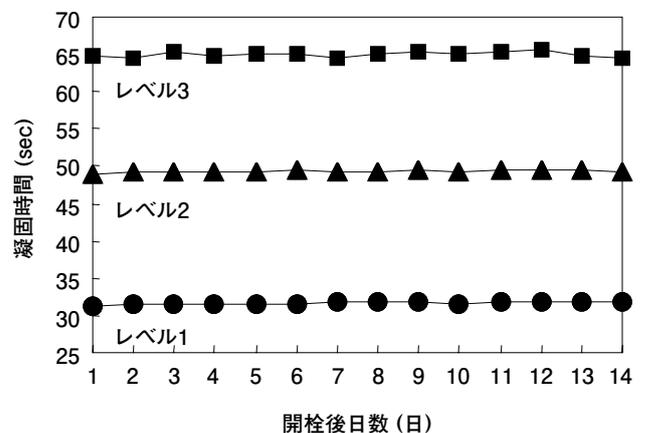


図 1. 試薬の安定性

第Ⅷ因子、第Ⅸ因子、および第Ⅺ因子ではほぼ同程度であり、第Ⅻ因子ではFSLが明らかに低かった(図3)。

#### 4. LA に対する感受性

Ratioの平均値は、それぞれFSL 1.61 (1.12 ~ 2.52), Data-Fi 1.52 (1.07 ~ 2.24)とFSLが高い傾向を示し

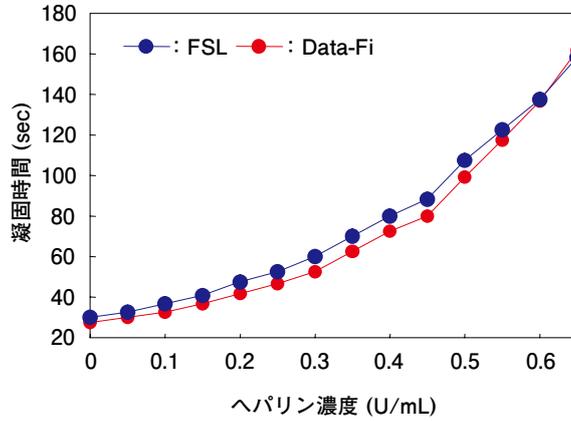


図2. 未分画ヘパリンに対する感受性

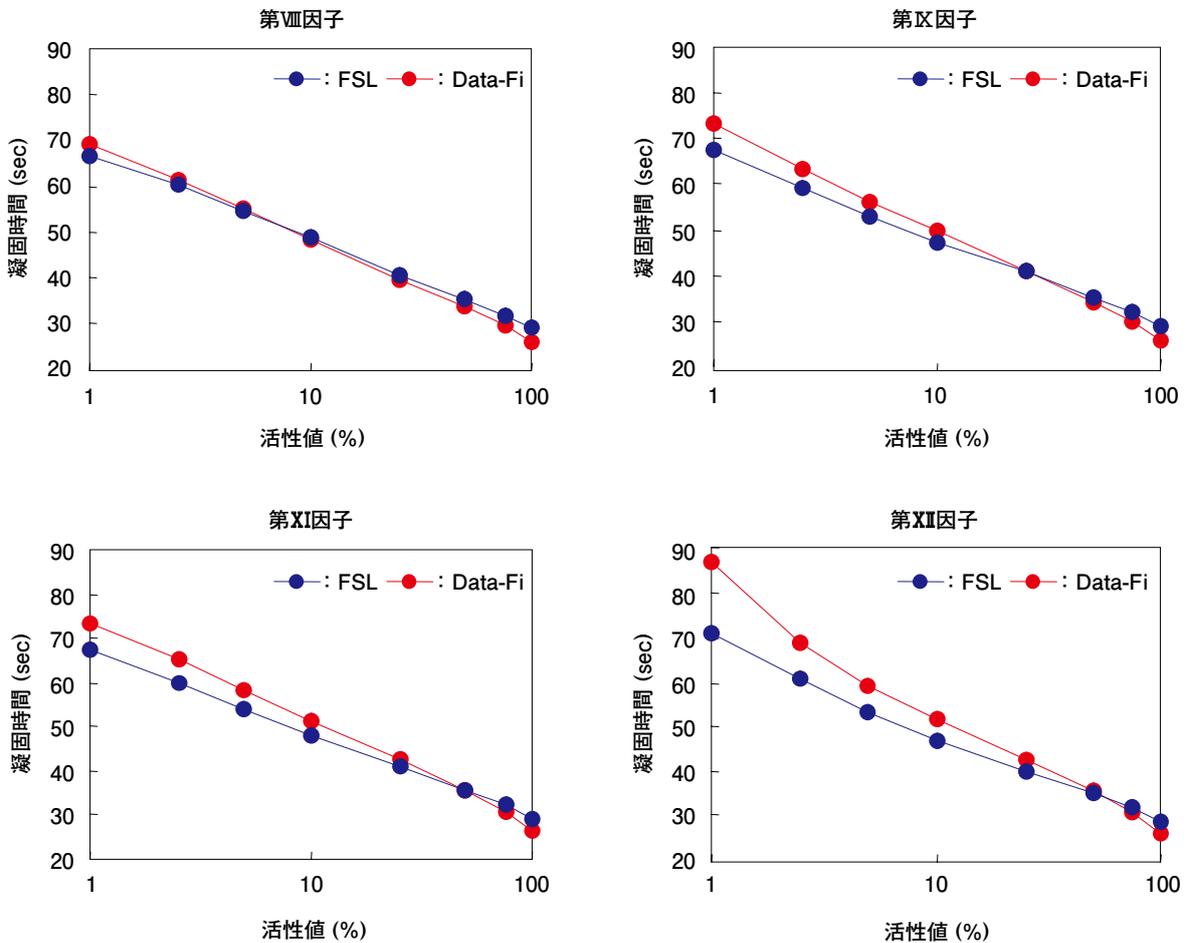


図3. 内因系凝固因子に対する感受性

た(図4)。また、LAスクリーニング検査2法とFSLおよびData-Fiの凝固時間との重回帰分析による決定係数(R<sup>2</sup>)は、FSLが0.743、Data-Fiが0.387であり、FSLの方が高い寄与率を示した。

### 5. 相関性

FSL(y)とData-Fi(x)の相関性(n=126)は、 $y = 0.812x + 9.20$ ,  $r_s = 0.946$ ,  $Sy.x = 5.60\text{sec}$ であった(図5)。また、感受性試験においてLAに対する感受性に差を認めたことから、LA陽性症例を除いて(n=100)

再計算すると、 $y = 0.824x + 7.39$ ,  $r_s = 0.967$ ,  $Sy.x = 4.97\text{sec}$ と相関性が向上した。

### 6. ロット間差

各試薬2ロット(FSL:F1, F2, Data-Fi:D1, D2)を用い、122検体をそれぞれ測定した。ロット間の相関性は、FSL: $y = 0.964x + 1.10$ ,  $r_s = 0.996$ ,  $Sy.x = 1.40\text{sec}$ , Data-Fi: $y = 1.002x - 0.38$ ,  $r_s = 0.974$ ,  $Sy.x = 4.80\text{sec}$ であり、FSLのバラツキは少なかった(図6)。また、ロット間の残差を求めたところ、平均値はFSL:

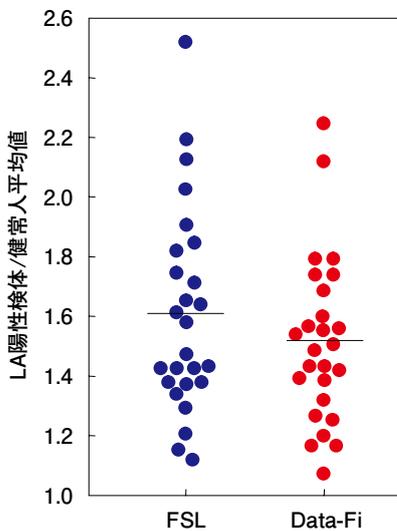


図4. LAに対する感受性

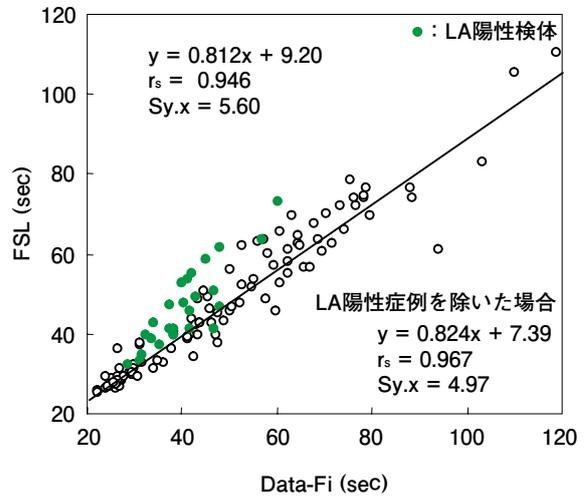


図5. 相関性

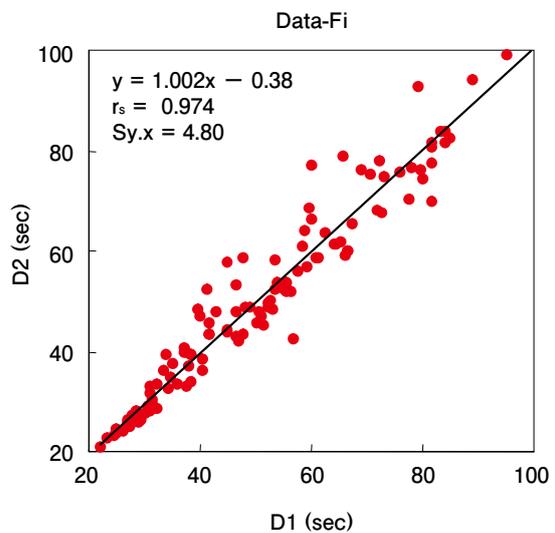
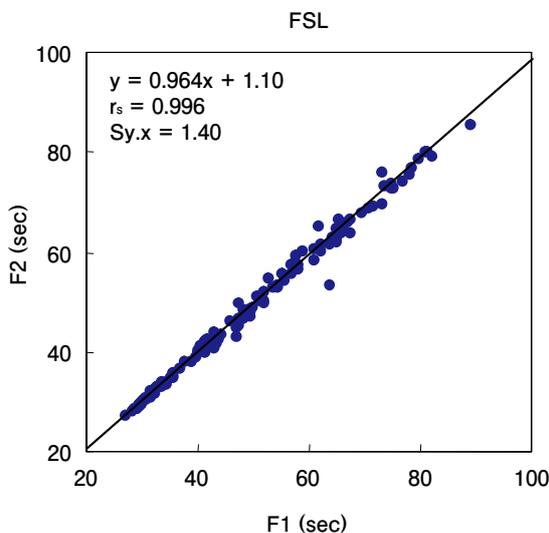


図6. ロット間差: 2ロットの相関性

1.1sec に対し Data-Fi : 3.5sec であり, FSL の方が有意に小さかった ( $P < 0.001$ ) (図7)。さらに, 症例別, 秒数別に詳しく見たところ, いずれの症例および秒数においても FSL は Data-Fi に比べて明らかにロット間での秒数の差が小さかった (表3)。

## 考 察

APTT 試薬はリン脂質と活性化剤の合剤で, その組成と濃度は多種多様である<sup>1)</sup>。リン脂質は動植物由来が多く, その組成や濃度の不均質に起因するロット間差が問題とされている<sup>2-4)</sup>。FSL は, RBT と SOY を用いてリン脂質の組成や濃度の安定性向上を目的に改良されている。今回, その基本的性能の検討と, リン脂質が RBT 単独である Data-Fi を対照試薬としてリン脂質の混合効果の評価を行った。

同時および日差再現性は極めて良好であり, 14 日間の高い試薬安定性も認められた。

感受性試験では, Data-Fi に比べて FSL の感受性は未分画ヘパリン, 第Ⅷ因子, 第Ⅸ因子および第Ⅺ因子に対してはほぼ同程度であったが, LA に対しては高く, 第Ⅻ因子に対しては低かった。これらの感受性は, APTT 試薬中のリン脂質であるホスファチジルセリン (PS), ホスファチジルエタノールアミン (PE), およびホスファチジルコリン (PC) の組成,

濃度の違いにより異なることが知られている。さらに, LA に対する感受性は PS 濃度に依存的であり, PS 濃度が低くなるにしたがい感受性は高くなることが報告されている<sup>8,9)</sup>。また, リン脂質の由来からみると, 大豆由来試薬はウサギ脳由来試薬に比べて PS 濃度が低く<sup>9, 10)</sup>, FSL が LA に対する感受性が高いのは, FSL の PS 濃度が Data-Fi に比べ低値であるためと推測される。

相関性においては, FSL と Data-Fi の相関係数は良好であったが, 傾きが小さく y 切片が大きかったことから, 両試薬間でのデータの解釈には注意を要すると考えられる。

凝固検査において, APTT 試薬にロット間差が生じることは大きな問題である。我々は, 対照試薬に用いた Data-Fi について, ロット間差が大きいことをすでに報告している<sup>11)</sup>。今回の検討においても, Data-Fi のロット間差は FSL に比べて有意に大きかった。一方, FSL は基準範囲域の差が平均 0.3sec とほとんど変動を認めず, 高度異常域においてもその差は平均 2.0sec であった。今回は 2 ロットのみの比較であるため, さらに多数のロットを用いた検証が必要ではあるが, FSL は安定したデータを供給し, データ管理の向上に貢献すると考えられる。

FSL のロット間差が小さい要因は, RBT と SOY の 2 種類のリン脂質を組み合わせることで, 調整時に

表3. ロット間差: 症例別, 秒数別の差の平均値

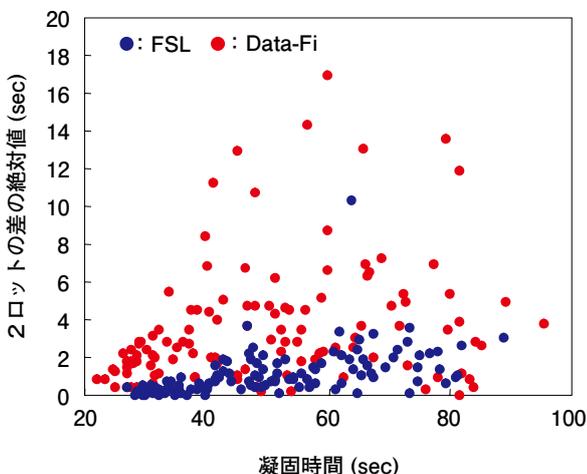


図7. ロット間差: 2 ロットの残差 (差の絶対値)

症例別	例数	FSL (sec)	Data-Fi (sec)
健常人	30	0.2	1.8
ワーファリン服用 およびVK欠乏症例	28	1.3	4.6
肝機能低下症例	20	1.0	2.7
ヘパリン投与症例	18	1.7	3.6
LA陽性症例	26	1.4	5.1
秒数別		FSL (sec)	Data-Fi (sec)
20~40sec未満		0.3 (42)	2.1 (47)
40~60sec未満		1.1 (46)	4.6 (42)
60sec以上		2.0 (34)	4.3 (33)

VK: ビタミンK

リン脂質の組成や濃度の変動を少なくすることができると推測される。Okudaら<sup>9)</sup>は、RBTとSOYをそれぞれ単一に用いたAPTT試薬中のリン脂質はロットにより異なるが、SOYがRBTの約4倍であり、組成はRBTのPE:PC:PSが約52:31:17、SOYが約28:69:3であると報告している。このように、リン脂質の構成が全く異なったRBTとSOYを用いることで、リン脂質の調整が可能になったものと示唆された。

また、FSLが1986年に先行発売されたアメリカではその使用率が高く、アメリカを中心とした世界的な精度管理調査であるCollege of American Pathologists SURVEYS 2007によると、FSLの占める割合は全体の約39%と最も高く、Data-Fiは約1.8%で減少傾向となっている<sup>12)</sup>。

ロット間差の改善には、リン脂質を組み合わせる他に合成リン脂質の開発が進んでいる。高純度合成リン脂質を用いた試薬は、理論上ロット間差が最も小さくなると考えられるが、それぞれの試薬によりリン脂質の組成や濃度が異なることも懸念され、それらの統一が望まれる。また、内因系凝固能を総合的に反映する、APTTに適したリン脂質の組成や濃度の検討も行われている<sup>9)</sup>。以上のようなリン脂質に対する取り組みは、ロット間差を改善するばかりでなく、困難とされているAPTTの標準化につながると期待される。

なお、国内におけるAPTT試薬の使用状況は、日本医師会の平成18年度(第40回)臨床検査精度管理調査結果報告書<sup>13)</sup>によると、Data-Fiが全体の約40%と最も多くの施設で使用されているが、今後は国内においてもFSLのようなロット間差の小さい試薬への切り替えが進むと考えられる。

## 結 語

FSLは、再現性、安定性において良好な成績を示し、さらにウサギ脳由来セファリンと大豆由来脂質を組み合わせることによりロット間差が小さく、APTTの安定したデータの供給に貢献すると考えられた。

## 参考文献

- 1) 香川和彦. 血液凝固補正試験. 検査と技術. 2006; 34(8): 735-742.
- 2) 桜井典子, 前場恵一子. APTTの測定. 検査と技術. 2001; 29(5): 421-427.
- 3) 香川和彦, 福武勝幸. プロトロンビン時間(PT)と活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)測定の現状と標準化に向けての課題. 臨床病理. 1999; 47(5): 431-437.
- 4) 安室洋子, 滝 政志. 抗リン脂質抗体とその検査. 臨床病理レビュー特集115号「臨床検査Yearbook 2001 - 血液検査の最新の動向 -」. 2001; 91-102.
- 5) 奥田昌宏, 他. 合成リン脂質を用いた新しいAPTT試薬の開発. 日本検査血液学雑誌. 2002; 3(1): 124-130.
- 6) 鈴木典子, 他. 合成リン脂質を用いたAPTT試薬の評価. 日本検査血液学雑誌. 2003; 4(1): 136-141.
- 7) Brandt TJ, et al. Criteria for the Diagnosis of Lupus Anticoagulants: An Update. Thromb Haemost. 1995; 74(4): 1185-90
- 8) Kelsey PR, et al. The diagnosis of lupus anticoagulants by the thromboplastin time-The central role of phosphatidyl serine. Thromb Haemostas. 1984; 52: 172-175.
- 9) Okuda M, Yamamoto Y. Usefulness of synthetic phospholipids in measurement of activated partial thromboplastin time: a new preparation procedure to reduce batch difference. Clin. Lab. Haem. 2004; 26: 215-223.
- 10) 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. 日本血栓止血学会雑誌. 2005; 16(2): 222-227.
- 11) 下村大樹, 他. 合成リン脂質を用いたトロンボチェックAPTT-SLA試薬の基礎的検討 - データファイ・APTT試薬との比較 -. 医学検査. 2006; 55(8): 940-944.
- 12) College of American Pathologists SURVEYS2007: 23-29.
- 13) 平成18年度(第40回)臨床検査精度管理調査結果報告書: 日本医師会 136-141.

# Evaluation of Dade® Actin® FSL Activated PTT Reagent Containing a Phospholipid Combination of Rabbit Brain and Soy Bean Origin

Daiki SHIMOMURA, Yoshiaki MAEGAWA,  
Yoshikazu YAMAMOTO and Syuji MATSUO

Department of Clinical Pathology, Tenri Hospital, 200 Mishima-cho, Tenri-shi 632-8552

---

## SUMMARY

Dade® Actin® FSL Activated PTT Reagent (ACTIN FSL) is an activated Partial Thromboplastin Time (aPTT) reagent containing a phospholipid combination rabbit brain and soy bean origin. We evaluated a basic performance of this reagent by comparing with the Dade® Actin® Activated Cephaloplastin Reagent (ACTIN) containing a phospholipid of rabbit brain origin.

In our study, this reagent showed the excellent results in within-run reproducibility, between-run reproducibility and on-board stability. Sensitivity of intrinsic factors, unfractionated heparin and Lupus anticoagulant (LA) were equal to that of ACTIN except the Factor XII and the LA. The LA sensitivity was higher than ACTIN though the Factor XII sensitivity was lower than ACTIN. The coefficient of correlation and regression line between ACTIN FSL and ACTIN were  $r_s=0.946$  and  $y=0.812x + 9.20$  respectively. And lot-to-lot variation of this reagent was significantly smaller than ACTIN.

From these results, ACTIN FSL will be possible to contribute to uniform diagnosis by having combined the two kinds of phospholipid.

**Key Words** aPTT, Intrinsic Factors, Phospholipid Combination, Lupus Anticoagulant, Lot-to-lot Variation

---