綜 説

血液凝固における検査成績の信頼性と
検査法の特異性

藤巻 道男* 加藤 正俊*

Reliability and specificity of laboratory tests for the
quantitative determination of coagulation factor

Michio FUJIMAKI* and Masatoshi KATO*

Key words : quality control, standarization, clotting method,
immunological method, amidolytic method

Quantitative laboratory tests with high accuracy and precision are mandatory for the correct diagnosis of coagulation disorders. A blood specimen must be collected aseptically using a disposable plastic syringe, avoiding hemolysis and contamination from the tissue juice. For a special clotting test, the two-syringe technique is recommended.

The internationally accepted procedures (ICSH, ICTH, etc.) recommend an anticoagulant concentration of 3.2 % tri-sodium citrate·2H₂O (0.109 M). Commercially available reagents for blood coagulation tests are of the two types : activated partial thromboplastin time (APTT) reagent and prothrombin time (PT) reagent. They differ in the source organs from which they are extracted and the purification procedures by which they are prepared. Also, various automated instruments based on several mechanism such as electrical, optical, and mechanical, are commonly used. Although low CVs (coefficient of variation) are obtained when APTT or PT is determined by the use of an automated instrument, the quantitative parameter, such as clotting time and the shape of standard curve, critically depends on the type of reagent or instrument, as well as on the combination of them. Identical end point is not always realized when another reagent or instrument is used for the assay. In this respect standardization of the assay procedures for universal acceptance is storongly desired.

In an immunological method an optimal combination of antigen and antibody concentrations is a prerequisite for a reliable antigen-antibody reaction. In a reaction with a synthetic chromogenic substrate the most crucial factor is the precision in the reaction time. These assays are specific only when cross-reactions

* 東京医科大学臨床病理 (〒160 東京都新宿区西新宿6-7-1), Department of Clinical Pathology, Tokyo Medical College, Tokyo, Japan.

of these reagents with other factors present in the specimen is negligible. Because these assays are based on one of the following activities, clotting, immunological, and amidolytic, which may or may not correlated very well with each other, through understanding of the assay specificity is essential for the correct diagnosis.

はじめに

凝固・線溶系に関する検査成績は、患者の出血・血栓傾向における病態について客観的な情報を与え、その結果は検査室診断 laboratory diagnosis として重要なものとなる。

凝血検査の多くは、生物学的な活性として試薬を添加してからフィブリンの析出するまでの時間を測定している。しかし、フィブリンの析出は連続的な酵素反応によるものであり、また、血漿蛋白質である凝固因子の大部分が不安定なものであり、これらは多くの測定条件により活性値に変動をきたし易く、その誤差要因を含んでいる。したがって実施者は細心の注意をもって測定をしなければならない。

凝血検査で信頼性のある成績を得るためには被検体中に測定しようとする物質の真の値にどれだけ近い値が得られるかという正確度 accuracy が必要であり、それと同時に同一被検体を何回も繰り返し測定した際に常に同じ値が得られるような再現性、すなわち精密度 precision が高くなければならない。

本稿では凝血検査における採血と抗凝固剤および測定法として活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), プロトロンビン時間 (PT), 凝血因子定量法などの精度に関すること、さらに免疫学的測定法および合成ペプチド基質について従来法との比較や特異性などについて述べる。

I. 採血と抗凝固剤

静脈穿刺による採血は採血時に駆血帯によるうっ血時間を2分間以上に長くしないように行い、注射針は19~20Gを用い、注射器は接触因子の活性化と血小板の破壊を防ぐために、プラスチック製 disposable の注射器が用いられる。

また静脈穿刺は組織液の混入を避けるために1回で穿刺し、適度の速さで採血して速やかに抗凝固剤と良く転倒混和する。また予め抗凝固剤を注射筒内に入れておいて採血する場合にも同様の注意が必要である。静脈穿刺において未熟者が行った場合には、組織トロンボプラスチンの混入により全血凝固時間は短縮するが、APTT は一部の凝固因子の消費により延長することがある。また、このような場合にプロトロンビン時間 (PT) とトロンビン時間 (TT) には影響を与えることは少ない。したがって特殊な検査の場合には二本注射器法 two syringe method が推奨されている¹⁾²⁾。

抗凝固剤については凝固因子が保存血漿中で比較的に安定性を保つことのできるクエン酸ナトリウムが一般的に用いられている。また、PT 測定において 3.2% trisodium citrate, 2H₂O (0.109M) が正常血漿および抗凝固薬内服の患者血漿を最も短縮しており³⁾、ICSH International Committee for Standardization in Hematology) および ICTH (International Committee on Thrombosis and Haemostasis) では、109mM trisodium citrate, 32g/l を国際標準法として推奨している⁴⁾。さらに国際標準法ではプラスチック製注射器で採血し、プラスチック製試験管に血液を入れて転倒混和後、直ちに冷却遠心器にて分離して non contact tube に入れる。採血後は2時間以内に測定し、それ以上の長時間になるとⅤ因子は室温にて低下し、Ⅶ因子は冷却により活性化される。また数時間以内に検査するときには、血漿を凍結してはいけないとしている⁴⁾。

II. 凝血的測定

凝血検査に用いられる各種の市販試剤および自動測定装置などがあり、凝血スクリーニング

Table 1 Comparison of activated partial thromboplastin time and prothrombin time with the Coag-A-Mate and manual methods

		APTT		PT	
		manual	automated	manual	automated
non commercial normal plasma	$\bar{X}$	40.2	39.1	10.7	9.9
	S D	0.56	0.19	0.08	0.04
	C V	1.40	0.56	0.78	0.43
non commercial abnormal plasma	$\bar{X}$	69.9	80.6	16.8	17.2
	S D	0.74	0.95	0.15	0.25
	C V	1.05	1.18	1.14	1.48
commercial verify normal	$\bar{X}$	35.8	35.2	12.0	11.2
	S D	0.34	0.51	0.15	0.08
	C V	0.94	1.44	1.23	0.75
commercial verify abnormal I	$\bar{X}$	67.5	58.0	18.6	18.7
	S D	0.59	1.19	0.18	0.14
	C V	0.87	2.66	0.99	0.76
commercial verify abnormal II	$\bar{X}$	86.5	80.9	26.6	35.4
	S D	0.63	2.34	0.47	0.33
	C V	0.73	2.89	1.75	0.95

テストとして活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), プロトロンビン時間 (PT) があり, また因子定量も行われている. これらを用いての測定における比較と評価について述べる.

1. 各種の市販試剤と自動測定装置

PTT および PT に使用される各種の市販試剤として, 組織抽出物はその臓器がウサギ脳, ウサギ肺, ヒト脳, ヒト胎盤などと異なっており, また APTT の活性化物質にはカオリン, セライト, エラジン酸などがある. また自動測定装置にも電気抵抗を応用した Fibrometer, Clot-timer, 分光光度計を応用した Coag-A-Mate, Auto Fi, Electra, Coagulation timer, Clot deitam, Coagulab, 機械的な方法として Clotek などがある.

著者らは市販標準血漿の Verify normal, Verify abnormal I, Verify abnormal II, 自家製クエン酸ナトリウム加血漿を用いて APTT, PT について用手法 (熟練者) と Coag-A-Mate による自動測定器法の同時再現性を各10回の測定にて比較した. なお, APTT 測定での試薬は目視法では Platelin plus activator, 自

動測定器法では Automated APTT, また, PT 測定には目視法では Simplastin, 自動測定器法では Simplastin automated を使用した. APTT, PT とともに全体的に精度としては目視法と自動測定器法との間には優劣をつけがたいが, APTT において自家製標準血漿で目視法では CV 1.40 に対して自動測定器法では CV 0.56 と, 後者の方がすぐれていた. しかし, 市販標準異常血漿では目視法で CV 0.87, 0.73 に対して自動測定器法で CV 2.66, 2.89 といずれも前者の方がすぐれていた (表 1). その他の測定装置においても CV 1.0~2.8% が得られている⁵⁾.

Morin ら (1975)⁶⁾ は APTT について市販標準血漿は Control plasma Dade, Abnormal plasma Dade, APTT 試剤は Activated cephaloplastin, 自動測定器は Electra 600, Fibrometer を用いて測定した. その成績は Control plasma では Electra 600 29.2 ± 0.9 (CV 3.1%), Fibrometer 30.3 ± 1.3 (CV 4.3%), 用手法 30.9 ± 1.7 (CV 5.5%) であり, Abnormal plasma では Electra 600 46.9 ± 2.3 (CV 4.9%), Fibrometer 45.4 ± 2.5 (CV 5.5%), 用手法 47.4 ± 2.8 (CV 5.9%) であり, 3 法によ

Table 2 Within-run PT precision for each instrument expressed in terms of coefficients of variation (CV)⁸⁾

Instrument	Single-run CV*			Average CV determined from differences between duplicates†			Patients
	Verify normal	Verify level I	Verify level II	Verify normal	Verify level I	Verify level II	
Coagulyzer Jr.	1.7	1.1	0.8	1.5	0.8	0.6	0.8
Coag-a-Mate	1.1	0.8	1.0	1.6	0.8	0.6	1.4
Clotek	1.9	1.1	0.8	1.6	1.5	0.8	1.5
Electra	2.6	2.6	0.8	1.4	1.3	1.6	2.1
Fibrometer	2.3	1.6	1.7	4.7	1.9	1.8	2.1

* Each Verify control was analyzed 20 times in a single run on each machine.

† For each instrument a total of 160 duplicate pairs was taken from 20 different runs.

Table 3 Within-run APTT precision for each instrument expressed in terms of coefficients of variation (CV)⁸⁾

Instrument	Single-run CV*			Average CV determined from differences between duplicates†			Patients
	Verify normal	Verify level I	Verify level II	Verify normal	Verify level I	Verify level II	
Coag-a-Mate	1.6	2.7	3.8	2.0	2.1	2.1	2.2
Coagulyzer Jr.	0.7	2.1	2.9	3.0	2.5	4.0	4.1
Electra 650	2.4	2.9	3.8	4.6	1.3	2.2	7.2
Clotek	1.7	3.8	5.0	2.0	4.5	5.0	12.5
Fibrometer (HCl wash)	2.2	2.2	4.0	7.0	4.0	4.7	8.5
Fibrometer (no HCl wash)	4.5	9.7	3.9	—	—	—	—

* Each Verify control was analyzed 20 times in a single run on each machine.

† For each instrument a total of 130 duplicate pairs was taken from 20 different runs.

る成績には大きな差がみられていない。

Derey ら (1974)⁷⁾ は 21~45歳の40名(男女20名づつ)について Coagulyzer と用手法にて Activated cephaloplastin (Dade) を用い APTT を測定した。その結果, Coagulyzer は 25.1 ± 4.2 (ISD), CV 2.5%, 用手法は 26.6 ± 5.7 , CV 3.75%であった。

Beckala ら (1978)⁸⁾ は, 自動測定装置として Coag-A-Mate, Coagulyzer Jr., Electra 600, Clotek, Fibrometer の5種類について, Verify normal, verify Level I, II の標準血漿を用い, APTT および PT を測定している。その成績は表2, 3に示したように良いCVを得ているが Verify plasma に対しては Coag-A-Mate が CV 2~4%と精度もよく, Coag-A-Mate と Electra 600 の日差再現性も CV 2~5%と良い精度を示している。Bio/Data CA-15 を参照

機器として比較試験を行ったところ, Coag-A-Mate, Electra 650, Clotek では $r \geq 0.95$, Coagulyzer Jr とは $r=0.95$ と高い相関を示している。Fibrometer は他の機器と比較して $r=0.87$ と低い相関であり, 各検体の測定後に電極を酸で洗浄することを定めており, 酸洗浄をしない時には CV は大きくなり認容されない。PT 測定においては各機器間には大きな差がなく, 3%以内の CV であれば凝血検査としては十分に認容されている。

Morin ら (1975)⁶⁾ は Electra 600, Fibrometer, 用手法にて正常血漿の APTT を比較したところ3者の成績には大きな差がみられなかったが, 肝疾患, 血管内凝固, Warfarin 内服者およびヘパリン治療者において, Electra 600 および Fibrometer を用いて APTT 測定を行ったところ Fibrometer は Electra 600 より凝

Table 4 Group A laboratories. Means over laboratories of the average prothrombin time(s) obtained by individual laboratories with fresh coumarin and normal plasmas. Each laboratory tested 19 coumarin plasmas and 5 normal plasmas.¹¹⁾

Thromboplastin	Number of labs	Means for fresh plasmas		
		Coumarin	Normal	Ratio
Simplastin A	11	58.1	26.0	2.25
Thrombotest	15	101.7	39.0	2.63
BCT	16	37.9	13.3	2.86
Thromborel	17	36.6	16.1	2.31
Simplastin	16	20.0	13.0	1.54
Ortho	17	20.6	12.7	1.63
Dade	19	22.5	13.1	1.73
Mérieux	15	18.0	11.7	1.55
Stago	16	25.9	14.4	1.80
Lyoplastin	16	19.0	10.9	1.75

Fig. 1 Comparison of standard curves of the factor VIII assays obtained with each activated partial thromboplastin time reagents.

固時間が短縮しており、また APTT 試剤によって異なった凝固時間を示すことが報告されている。ヘパリン治療の管理において APTT が有用であることが数多く報告されているが、Shapiro ら (1977)⁹⁾ は試験管内の実験で、正常者のクエン酸ナトリウム加血漿に各種濃度のヘパリンを添加して APTT を測定したところ General Diagnostics の APTT 試薬ではヘパリン濃度 0~0.8IU/ml の範囲内で直線的に APTT の時間が延長しているが、他の APTT 試

薬では Lot によって差があり、直線性のみられないものがあることを観察している。また Soloway ら (1973)¹⁰⁾ はヘパリン治療者のモニターとしての APTT について、Kaolin, Celite および Ellagic acid を活性化剤とする APTT 試薬を用いて Fibrometer で測定したところ Celite による APTT 試薬が最もよく、Kaolin によるものはあまり適さなかったことを示唆している。

プロトロンビン時間測定の標準化として、

Table 5 Factor VIII assay systems, ranking by precision¹⁴⁾

System*	Laboratories†	Means (%)	SD (%)	CV (%)
Specimen H-30, 1978 (AHF<20%)				
General diagnostics APTT reagent/coagulyzer	3	9.4	3.3	34.7
General diagnostics APTT reagent/Coag-A-Mate dual channel	8	9.5	3.5	36.7
Dade actin/auto-Fi	3	10.1	5.5	54.4
Dade actin/tilt tube	10	9.4	5.6	59.5
Dade actin/coagulyzer	4	9.0	5.8	64.7
General diagnostics APTT reagent/fibrometer	8	9.9	6.4	65.2
Dade actin/fibrometer	20	10.4	7.4	70.8
Dade actin/MLA electra	3	13.2	10.5	79.7
Ortho thrombofax/fibrometer	5	18.4	19.7	107.1

* Systems used by 20 or more participants.
† Expressed as percentages of total laboratories reporting results.

ICTH および ICSH において経口抗凝固薬療法についての専門委員会があり、その報告がなされている¹¹⁾¹²⁾。そのA群検査室における成績をみると、各種の組織トロンボプラスチンによる PT 試薬を用いて Cumarin 内服者および正常者の新鮮クエン酸ナトリウム加血漿を測定しているが、Cumarin 内服者血漿と正常血漿における感度比は1.54～2.87と差がみられている(表4)¹¹⁾。この感度比とは使用している PT 試薬で測定した結果が正常であるか異常であるかを鑑別する能力の規準で、Thromboplastin sensitivity ratio の略 TSR がよく用いられる。国際標準品の TSR は NIBS&C 67/40 を2.0と規定して求められたものであり、自家製品あるいは市販品を用いる場合の TSR は1.6～3.0あれば十分使用に耐えるとされている。TSR の求め方は Biggs, Denson ら (1976) の方法があるが、検体数を多数必要とするので不便であるので、Loeliger ら (1975) の簡便法を用いるとよい。正常プール血漿と抗凝血漿を投与した患者血漿の中で、PT の高度に延長したものと中等度に延長したものをおのおのグループにしたプール血漿を用意する。次に国際標準品と自家製あるいは市販の PT 試薬で測定し、患者プール血漿2本の平均 PT (秒)を正常プール血漿の PT で割って延長比Rを算出する。国際標準品で求めたものを Rref, 自家製あるいは市販品によるものを Rx とすると次の(1)式から感

度比 TSR_x が計算できる。TSR_{ref} は国際標準品の感度比で標示してある数値を用いればよい。

$$TSR_x = \frac{(R_x - 1)(TSR_{ref} - 1)}{R_{ref} - 1} + 1 \dots\dots(1)式$$

また、トロンボプラスチンの感度の測定として calibration line の slope から比を求める方法もある¹¹⁾。また、先天性凝血因子欠乏血漿について各 PT 試薬を用いて測定し、その患者 PT/正常 PT にて表わすと、Ⅱ因子欠乏血漿は3.5～4.4, Ⅴ因子欠乏血漿は0.7～2.9, Ⅶ因子欠乏血漿は2.7～5.2, Ⅹ因子欠乏血漿は2.7～4.0であり、その PT 試薬の感度による差がみられている¹²⁾。

血漿凝固因子であるⅧ, Ⅸ, Ⅺ, Ⅻ因子の定量で APTT を応用した一段法 (Hardisty 法)が行われているが、全ての APTT 試薬によって検量線の Slope が異っている (Caral Sibley ら, 1973)¹³⁾。

著者らは用手法(熟練者)と Coag-A-Mate を用いて各 APTT 試薬によるⅧ因子活性の検量線を作製した。APTT 試薬には用手法として Platelin plus activator (Celite を含む), Actin (Ellagic acid を含む), Pathrontin (Kaolin を含む), Cephotest (Ellagic acid を含む)を, Coag-A-Mate には Platelin automated を用いて測定した。その結果は各 APTT 試薬によって感度が異なり、その検量線の Slope が

Table 6 Sensitivity and specificity of chromogenic substrate

	Trypsin	Thrombin	Factor Xa	Plasma kallikrein	Glandular kallikrein	Plasmin	Urokinase
S-2160	107	【100】	1	3	1	1	1
S-2238	56	【100】	2	1	1	ND	ND
S-2222	365	3	【100】	3	2	3	4
S-2251	75	5	3	18	50	【100】	ND
S-2302	37	16	21	【100】	53	21	ND
S-2444	1550	8	10	3	3	3	【100】
S-2266	85	4	1	5	【100】	2	1
CHROMOZYM TH	76	【100】	102	27	—	38	49
CHROMOZYM PL	20	16	6	2	—	【100】	61
CHROMOZYM PK	17	7	7	【100】	—	23	7
3093-V	—	【100】	1	ND	ND	1	ND
3094-V	—	8	【100】	ND	ND	ND	25
3095-V	20	16	6	2	—	【100】	61
3097-V	—	ND	2	ND	ND	ND	【100】
3096-V	—	ND	4	【100】	17	7	ND

注：数値は測定を目的とするプロテアーゼによる加水分解能力を100%として換算したものである。
NDは基質に対して感作しなかったもの。

多少とも異っている（図1）。

Kocoshis ら (1979)¹⁴⁾ はⅧ因子測定についてCAP survey の成績を報告している(表5)。その結果によると、異った試薬と測定装置との組合せによる測定の成績に大きな変動があり、また各検査室間においても変動がみられる。このような変動は特に軽症血友病および von Willebrand 病などで、Ⅷ因子が軽度欠乏している場合に問題があり、APTT によるⅧ因子の凝血学的活性定量法の標準化が望まれている。

自動測定装置によるフィブリン形成の終末点の設定は測定器によって異なるが、フィブリン形成の最大速度 maxmum velocity (MV) の時点を凝固終末点として捉らえているものが多い。しかし、自動測定装置によって凝固時間が多少とも異なるのは、この凝固終末点の捉え方をどこに設定するかによって差異が生じてくる。また凝固時間の延長するにしたがってフィブリン形成の過程は緩徐となってくるので、フィブリン形成の終末点を捉える範囲も広くなり、そのために凝固時間の再現性が悪くなる理由とも考えられる¹⁵⁾。したがって自動測定装置の標準化として凝固終末点の捉え方を規定し、その機器間での調整を行う必要もあろう

と思う。

III. 免疫学的測定

プロテアーゼ活性を示さない凝血因子や抗凝血因子の測定に活用されている技術に免疫学的手法による測定法があり、現在市販されている抗血清も10数種に及んでいる。

その長所とするところは、プロテアーゼ活性をもたない凝血因子の測定が可能であること、プロテアーゼ活性を示す因子であっても活性物質の添加なしに前駆体の型や異常分子の型でも共通抗原として測定できることがある。また免疫電気泳動を行うと、凝固過程における因子の活性化や不活性化の状態を泳動パターンとしてとらえることができるのである¹⁶⁾。

免疫学的測定法は抗原抗体によるものであり、その反応に参与する抗体には至適な濃度がある。定量免疫電気泳動法 (Laurell 法) にて抗体としての抗血清濃度が高い場合にはロケット形成の尖端が細くならず鈍く太くなり定量性に欠けてくるし、反対に抗原が過剰になるとロケット形成の尖端が不鮮明となり計測が不可能となる。測定に用いられる検体は一般的には血漿であるが、血清中にも抗原性の有する因子もみ

Fig. 2 Time course of antithrombin III assay (S-2238)

られる。一元免疫拡散法に、抗トロンビンⅢを測定すると正常の血清は血漿より約20%の低下があり、これは凝固過程において生成されたトロンビンにより消費されたものと思われる。しかし、定量免疫電気泳動の一次元泳動にて抗トロンビンⅢを測定すると血清は血漿より増加している。これは凝固過程において抗トロンビンⅢが小分子化され、易動度が進んだためロケット形成が高くなり見かけ上の増加をきたしたのである。また DIC において VIII R : AG が増加するのもプラスミンによって VIII 因子が分解され小分子化されるために、見かけ上の増加をきたす。なお凝固活性やアミダーゼ活性に対する免疫活性の相関性については後述する。

IV. 合成ペプチド基質による測定

天然基質のアミノ酸配列を参考にして合成されたペプチド基質は分子量が約 600 の小分子であり、しかし Binding site を認識しない欠点を有することから、表 6 に示すように他の活性凝固因子による交差反応が基質によって強弱はあるものの天然基質に比べて基質特異性に乏しい。しかし、この影響をできるだけ少なくするために pH, イオン強度, 希釈率あるいは阻害物質の併用など測定条件の工夫がなされている。

Fig. 3 Comparison of activity stored thrombin by the clotting assay method and synthetic substrate assay method²⁰⁾.

Fig. 4 Relationship between prothrombin clotting activity and amidolytic activity in patient with oral anticoagulant therapy.

なお合成ペプチド基質と天然基質との感受性は、たとえばトロンビンについて K_m 値が、S-2160 は $11 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$, S-2238 は $0.7 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$ に対してフィブリノゲンは $1.9 \times 10^{-6} \text{ mol/l}$ であり、天然基質の方が優れている。しかし、トロンビンによる分解され易さ、すなわち特異性定数 (specificity constant) K_{cat}/K_m ($\text{M}^{-1} \text{ Sec}^{-1}$) はフィブリノゲンが 2×10^{-5} に対して S-2160 は 10×10^{-5} , S-2238 は 240×10^{-5} と低分子である合成ペプチド基質の方が天然基質より感受性の優れていることがある。また S-2238 を用いて抗トロンビンⅢ測定法についてみると、正常血漿の抗トロンビン活性とトロ

ンビン添加のみで抗トロンビンⅢを含まない Reagent blank のタイムコースを図2に示したが、正常血漿では75秒まで、Reagent blank では40秒まで直線的に吸光度が増加し、Lag phase あるいは Burst phase の影響は見かけ上であるが現われていない。それゆえに初速度法と one point 法による抗トロンビンⅢ測定での $\Delta E/\text{min}$ の変化率はほとんど差がみられず0~100%まで直線性のある検量線を示している。しかし、one point 法の場合には被検体中のビリルビンや濁りに影響されるので盲検をとって測定する必要がある。

本測定法では被検血漿を最終的には20~200倍に希釈して測定しているが、この主な理由は測定感度が高いということだけでなく、被検血漿中には種々のプロテアーゼインヒビターが常年在っているので、これらの測定への影響を避けるためには血漿をできるだけ十分に希釈することが望まれるためである。また、アルブミン濃度を低くしてキャリアプロテイン作用を防ぐためである。

本測定法で不活性型因子を測定する場合には種々の活性化剤、たとえばX因子には蛇毒 R-VV、プラスミノゲンにはストレプトキナーゼ、プレカリクレインにはカオリンやエラジン酸とリン脂質との混合液などを添加する。またプロテアーゼインヒビターの測定には過剰の活性型因子、たとえば抗トロンビンⅢではヒトトロンビン、抗Xa因子にはウシXa因子、アンチプラスミンではヒトプラスミンなどを添加する。このような活性化剤や活性型因子などを添加する場合には、おのおのの酵素の活性に十分注意しなければならない。もし添加活性型因子の力価が低すぎると、高濃度のプロテアーゼインヒビターのところでは検量線が曲がってくる。また活性化剤の種類が異なると、活性化の経路も異なることがあるので、不活性型因子量が見かけ上の低値を示すようになることもある。したがって、測定前に試薬盲検や正常血漿を測定し、添加する活性型因子や活性化剤の力価や性質について十分チェックする必要がある。そして、さらに本基質はヒトの凝血因子のアミノ酸配列をもとに作られたものであるか

ら、動物実験などで使用する際には検量線は同じ動物種のものから作製することが望まれる。そしてこれらのことは活性値の表現方法によって大きな影響を与える。

従来のフィブリン析出法では正常プール血漿の活性を100%として検量線を描いて被検血漿の活性値を求めている。しかし、本測定法では現在大きく分けて2種類の方法がとられている。1つはフィブリン析出法と同様に%で表現する方で、他の方法はP-ニトロアニリンの遊離速度からP-ニトロアニリンの分子吸数を用いて求める国際単位 $\mu\text{Kat}/\text{L}$, mU/mL で表す方法である。とくに後者では活性化剤の種類、活性型因子の動物差、反応系の変更、測定の際の分析機種によってかなり差がみられるので十分に注意する必要がある。

合成ペプチド基質による測定の同時再現性をみると血漿プレカリクレイン(Chromozym PK) 2.6%, X因子(S-2222) 1.2%, プラスミノゲン(S-2251) 3.6%, 抗トロンビンⅢ(S-2238) 3.9%, 抗Xa因子(S-2222) 3.0%, 抗プラスミン(S-2251) 3.2%であり、凝血学的測定法とはほぼ同じ変動係数が得られている。

合成ペプチド基質による測定法が従来から行われている方法とどれほどの相関性があるかはいまだ詳細な報告はないが、Blombäckら(1974)¹⁷⁾はS-2160を用いて抗トロンビンⅢの凝固活性と免疫活性とを比較し、凝固活性との間には $r=0.88$, $y=1.30x-4.6$, 一元免疫拡散法との間には $r=0.97$, $y=0.97x-3.3$ と高い相関性のあることを観察している。またAbladgaardら(1977)¹⁸⁾および著者ら(1978)¹⁹⁾はS-2238を用い抗トロンビンⅢの免疫活性との相関は、 $r=0.93$, $y=0.74x-22.43$ および $r=0.96$, $y=0.75x+26.1$ とほぼ同様な相関が得られている。しかし、著者ら(1974)¹⁹⁾は凝血活性で抗トロンビン作用のあるFgDPはChromozym THによるトロンビン活性に阻止作用を示さないことを観察している。またGaffneyら(1978)²⁰⁾は市販トロンビンを凍結保存して10週間にわたりS-2160, Chromozym THによるアミダーゼ活性と凝固活性とを比較し、アミダーゼ活性は10週間でも著明な変化が

みられないが、凝固活性では6週間で約50%低下することを報告している(図3)。これは凝固活性のある α トロンビンが保存によって β および γ トロンビンに漸次的に自己分解したためである。また同様な例として Warfarin 内服患者について Echis carinatus venom (蛇毒) で活性化して Chromozym TH で測定するアミダーゼ活性と凝固活性によるプロトロンビン濃度を比較すると $r = 0.82$, $y = 0.84x - 29$ と相関はあるもののアミダーゼ活性の方が凝固活性より高値を示した(図4)。これは Warfarin 投与によりビタミンKが拮抗されると、プロトロンビン分子は肝での生成過程でグルタミン酸の型で止まり、 γ -カルボキシグルタミン酸が生成されず、いわゆるビタミンK拮抗物質による PIVKA (protein induced by vitamin K antagonist) に止まってしまうためである。

線溶系において合成ペプチド基質 S-2251 に測定されるアンチプラスミンは青木ら(1976)²¹⁾によって発見された α_2 プラスミンインヒビター (α_2 PI) を反映するものである。著者ら²²⁾は肝疾患30名の血漿を用いて α_2 PI, α_2 M, α_1 AT, AT III および CiINA の一元免疫拡散法 (SRID 法) と S-2251 によるアミダーゼ活性との相関を観察したところ、 α_2 M, α_1 AT, AT III および CiINA との間にはおのおの $r = -0.15$, $r = 0.13$, $r = 0.46$ および $r = 0.28$ と全く相関性を示さないが、 α_2 PI のみに $r = 0.91$ と高い相関を示し、 α_2 PI 6mg/dl を100%として換算すると $y = 1.18x - 18.6$ の回帰方程式が得られた。また精製純化した各種プロテアーゼインヒビターの S-2251 によるアンチプラスミン作用を経時的に観察したが、 α_2 PI は瞬時にアンチプラスミン作用が最大に達することを認めた。また DIC および Defibrase 投与患者の血漿について α_2 PI の一元免疫拡散法と S-2251 のアミダーゼ活性を測定したところ DIC 症例では両法で低値を示し、本来の $y = 1.18x - 18.6$ の回帰直線上に分布されたが、Defibrase 投与例では部分的に一元免疫拡散法の方が高く回帰直線上よりはずれるものが観察された。この回帰直線をはずれた血漿中には α_2 PI と α_2 PI・プラスミン複合体の両者が含まれ、その結果として免疫

活性の方が高値を示したことが確認された。

おわりに

凝血検査において信頼性のある成績を得るためには血液凝固を十分に理解した測定手技の熟練者によらなければならない。また検査室間の成績の調整のために、測定法の標準化が望まれる。それには各試剤の精製法や各自動測定装置のフィブリン形成の終末点の設定などの統一が必要であろう。また免疫学的測定では抗原抗体反応での抗原、抗体の至適濃度を定めて測定することが必要であるとともに蛋白の分子構造上には凝血的活性部位に比べて免疫学的活性部、すなわち抗原基ははるかに多く存在しているため異常をきたしている因子をも反応して定量の際に正常値を示すことがあり、分子異常であるかを留意する必要がある。また合成ペプチド基質による測定では基質自体が天然基質の特徴をとらえたアミノ酸3~4個からなる小分子のものであるため、他のプロテアーゼとの間に cross reaction のあることを無視できない。したがって、この方法はとくにプロテアーゼインヒビターの測定に最も適したものであり、不活性型因子あるいは活性型因子の測定では被検体とする体液によっては cross reaction に注意して用いることが必要である。

以上、凝血因子を測定する方法として凝固活性、免疫活性およびアミダーゼ活性で求める3法について精度管理上の問題点について概説してきたが、それぞれの特異性を理解してその活性値を評価すべきであると思われる。

文 献

- 1) McPhedran, P., Clyne, L.P., Ortoli, N.A., et al.: Prolongation of the activated partial thromboplastin time associated with poor venipuncture technic. Am. J. Clin. Pathol., 62; 16~20, 1970.
- 2) 藤巻道男: 凝固検査のための採血と試剤の調整法。実践止血凝固学(藤巻道男, 他・編), 医歯薬出版, 東京, 1980, p. 84~97.
- 3) Ingram, G. I. C. and Hills, M.: The prothrombin time test.: Effect of varying citrate concentration. Thrombos. Haemostes

- (Stuttg.), **36**; 230~236, 1976.
- 4) Ingram, G. I. C. and Hills, M.: Reference method for the one-stage prothrombin time on human blood. *Thrombos Haemostas* (Stuttg.), **36**; 237~238, 1976.
 - 5) 藤巻道男, 鈴木弘文: 自動血液検査器械 C: 自動凝固・線溶測定装置. 血液学的検査・正常値(柴田進, 他・編), 丸善, 1979, p.838~848.
 - 6) Morin, R.J. and Willoughby, D.: Comparison of several activated partial thromboplastin time methods. *Am. J. Clin. Pathol.*, **64**; 241~247, 1975.
 - 7) Darey, E. R. and Oates, R. P.: Evaluation of an automated method for the determination of activated partial thromboplastin time. *Am. J. Clin. Pathol.*, **61**; 834~838, 1974.
 - 8) Beckala, H. R., Dennis, B. A. Didisheim, P., et al.: A comparison of five manually operated coagulation instruments. *Am. J. Clin. Pathol.*, **70**; 71~75, 1978.
 - 9) Shapiro, G. A., Saundra, W., Willson, J. E., et al.: Variation among commercial activated partial thromboplastin time reagents in response to heparin. *Am. J. Clin. Pathol.*, **67**; 477~480, 1977.
 - 10) Soloway, H. B., Cornett, B. M. and Grayson, J.W.: Comparison of various activated partial thromboplastin time reagents in the laboratory control of heparin therapy. *Am. J. Clin. Pathol.*, **59**; 587~590, 1973.
 - 11) Prothrombin time standardization: Report of the ICTH/ICSH expert panel on oral anticoagulant control. *Thrombo. Haemostasis*, **42**; 1073~1114, 1979.
 - 12) Loeliger, E. A. and van Halem-Visser, L. P.: Biological properties of the thromboplastins and plasma included in the ICTH/ICSH collaborative study on prothrombin time standardization. *Thromb. Haemost.*, **42**; 1115~1140, 1979.
 - 13) Carol Sibley, B.S., Singer, J.W. and Wood, R.J.: Comparison of activated partial thromboplastin reagents. *Am. J. Clin. Pathol.*, **59**; 581~586, 1973.
 - 14) Kocoshis, T.A. and Triplett, D.A.: CAP survey results for VIII assays (1977~1978). *Am. J. Clin. Pathol.*, **72**; 346~361, 1979.
 - 15) 藤巻道男, 長坂 晋, 須沢徹之, 他: 血液凝固検査の自動化とその評価, 凝固過程記録式による測定装置. 日本臨床検査自動化研究会会誌, **3**; 17~21, 1978.
 - 16) 藤巻道男, 池松正次郎, 加藤正俊, 他: 血液凝固における凝固因子抗原性的変化. 臨床病理, **26**; 298~304, 1978.
 - 17) Blombäck, M.: Syntetic substrates and syntetic inhibitors. *Haemostasis.*, **7**; 61~188, 1978.
 - 18) Abildgaard, U., Lie, M. and Degard, D. H.: Antithrombin (heparin cofactor) assay with new chromogenic substrate (S-2238 and chromozym TH). *Thromb. Res.*, **11**; 549~555, 1977.
 - 19) 藤巻道男, 加藤正俊: 血液凝固, 線溶系の測定における発色性合成ペプチド基質について. 医用酵素, **7**; 554~564, 1980.
 - 20) Gaffney, P.J., Lard, K., Brasher, M., et al.: Problems in the assay of thrombin using synthetic peptide as substrates. *Thromb. Res.*, **10**; 549~556, 1977.
 - 21) Moroi, M. and Aoki, N.: Isolation and characterization of α_2 -plasmin inhibitor from human plasma. A novel proteinase inhibitor which inhibits activator-induced clot lysis. *J. Biol. Chem.*, **251**; 5956~5965, 1976.
 - 22) 加藤正俊, 藤巻道男, 福武勝博: P-ニトロアニリン法によるアンチプラスミンおよびヘパリンの測定. *Biomedical J.*, **3**; 789~796, 1979.
-