

〈資料〉

全自動血液凝固分析装置コアプレスタ2000の導入 および24時間緊急検査対応の検討

及川 雄二、松本 信明、竹内 ゆき子、鈴木 真事

Basic examination of an automated coagulation analyzer, Coapresta 2000, and introduction to 24-hour emergency service

Yuji Oikawa, Nobuaki Matsumoto, Yukiko Seki and Makoto Suzuki

Summary Recently, in addition to accuracy and reliability, clinical laboratories have also been under pressure to produce results with speed around the clock. A novel automated coagulation analyzer, Coapresta 2000 (CP2000; Sekisui Medical Co., Ltd.), has enabled them to meet those requirements. In order to start a 24-hour emergency service of coagulation and fibrinolysis tests, we conducted a basic examination of the following tests: prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (APTT), fibrinogen, heparin, antithrombin III (AT III), fibrin degradation products (FDP), D-dimer and soluble fibrin monomer complex (SFMC) with the CP2000. In the CP2000, these test items were investigated for within-run and between-day reproducibility, and the linearity of test results. The coefficient of variation of within-run assays was less than 3.0% while that of between-day was less than 4.7% in each test item. The linear response ranges were 0 to 750 mg/dL in fibrinogen, 0 to 13 μ g/mL in FDP, 0.3 to 120 μ g/mL in D-dimer, and 17 to 100 μ g/mL in SFMC. A comparison study was conducted between the evaluation method (Coapresta 2000) and the present method (Coagrex-800, Sysmex Corporation). Except for APTT, significant correlations were observed in all test items (correlation coefficients were all higher than 0.993, $p < 0.001$). We concluded that Coapresta 2000 was able to provide 24-hour emergency service in coagulation and fibrinolysis tests.

Key words: Coapresta 2000, Coagulation and fibrinolysis tests, Soluble fibrin monomer complex (SFMC), 24-hour emergency service

I. はじめに

多くの血液凝固分析装置のなかで積水メディカル株式会社より発売されている全自動血液凝固分析装置コアプレスタ[®]2000 (Coaprest 2000 :

以下、CP2000) は、凝固時間法、合成基質法、そしてラテックス比濁法の3種の測定法を搭載して高性能・高速処理にあることが報告されている¹⁾。さらに、マルチ項目のリアルタイム (逐次) ランダムアクセス処理が可能である。タッ

東邦大学医療センター大橋病院 臨床検査部
〒153-8515 東京都目黒区大橋2-17-6

受領日 平成24年1月5日
受理日 平成24年2月27日

Department of Laboratory Medicine, Toho University
Ohashi Medical Center,
2-17-6 Ohashi, Meguro, Tokyo 153-8515, Japan

チパネルによる入力方式、操作ナビゲーション機能の搭載などユーザーフレンドリーな操作簡易性にあり、試薬、キャリブレーター、コントロールのバーコード管理機能が搭載されるなど入力時のヒューマンエラーを徹底して排除した自動分析装置である (Fig. 1)。

東邦大学医療センター大橋病院は循環器内科、心臓血管外科、脳神経外科、整形外科、外科、糖尿病・代謝内科、産科などの診療科を擁する地域中核の総合病院である。また、第二次救急医療機関として24時間体制の救急医療を実施している。臨床検査部も休日・平日および夜間における緊急検査業務に対応している。血液検査、凝固検査 (プロトロンビン時間と活性化部分トロンボプラスチン時間)、生化学的検査、免疫学的検査および微生物学的検査を実施しているが、本院の診療科の特色から潜在的血栓準備病態にある症例への対応が求められている。

本検査部が保有する分析装置はシスメックス株式会社のコアグレックス800 (Coagrex-800: 以下、CR800)^{2,3)}とコアグレックス700の2台であり、どちらの装置も凝固時間法を原理とする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) 検査の24時間測定 (バックアップ体制の確立) が可能であった。しかし、コアグレックス700は合成基質法やラテックス比濁法を原理とする抗凝固因子や線溶系

検査の測定ができず、これら検査の24時間体制はCR800の故障時を考えると実施が不可能であった。そこで、我々は、PT、APTTに加え、凝固因子としてフィブリノゲンとヘパプラスチン (ビタミンK依存性凝固因子)、抗凝固因子としてアンチトロンビン III (AT III)、さらに、線溶検査としてフィブリン分解産物 (FDP)、Dダイマー、さらに、新しい凝血的分子マーカーとして可溶性フィブリンモノマー複合体 (soluble fibrin monomer complex: SFMC) の検査を夜間緊急項目に加え24時間体制で実施するべくCP2000を2台導入して完全バックアップ体制を確立した。導入時におけるCR800との比較検討の成績を報告する。

II. 方法

1. 試料

検査終了後の検体 (クエン酸Na加患者血漿) 72試料について、CP2000 (導入評価法) とCR800 (現行法) を用いて凝固線溶検査成績 (PT、APTT、フィブリノゲン、ヘパプラスチン、AT III、FDP、Dダイマー、SFMC) の比較検討を行った。本研究は大橋病院倫理委員会指針 (個人情報連結不可能、匿名化) に従い実施した (認証番号: 22-26)。

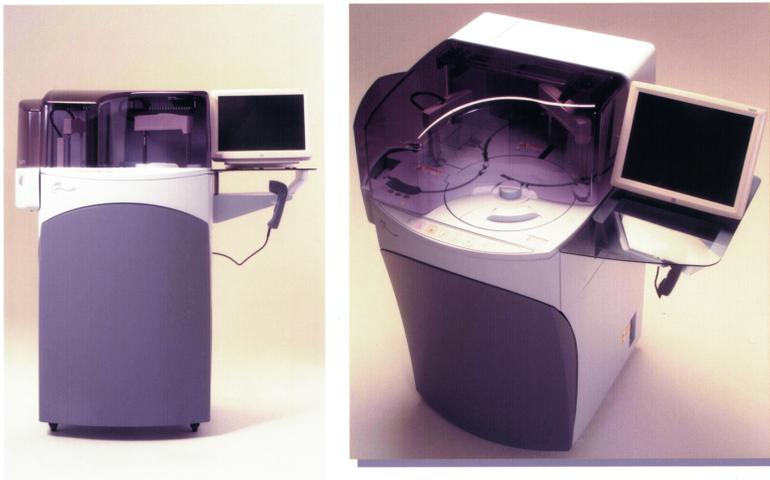


Fig. 1 Foto of Coapresta 2000

Table 1 Reproducibility of coagulation and fibrinolysis assays with Coapresta 2000

Assays (Reagents)	Control materials	Within-run (10 times)	Between-day (10 days)
PT (Coagpia PT-N)	Coagtrol IX	89.5±0.77% (0.9%) 1.05±0.01 INR (0.9%)	90.6±1.74% (1.9%) 1.06±0.01 INR (0.9%)
	Coagtrol IIX	41.3±0.59% (1.4%) 1.65±0.02 INR (1.2%)	47.0±1.85% (3.9%) 1.61±0.04 INR (2.5%)
APTT (Coagpia APTT-N)	Coagtrol IX	26.9±0.25 sec (0.9%)	31.6±0.29 sec (0.9%)
	Coagtrol IIX	70.9±0.57 sec (0.8%)	75.9±0.35 sec (0.5%)
Fibrinogen (Coagpia Fbg)	Coagtrol IX	289.0±6.48 mg/dL (2.2%)	275.0±7.90 mg/dL (2.9%)
	Coagtrol IIX	116.4±3.53 mg/dL (3.0%)	130.2±3.58 mg/dL (2.8%)
Hepaplastin (Complex factor H [Kokusai])	Coagtrol IX	109.5±0.84% (0.8%)	102.6±4.83% (4.7%)
	Coagtrol IIX	41.4±0.49% (1.2%)	42.6±1.20% (2.8%)
AT III (Testzym S ATIII)	Coagtrol IX	92.5±1.82% (2.0%)	96.2±2.86% (3.0%)
	Coagtrol IIX	29.4±0.66% (2.2%)	31.8±0.62% (2.0%)
D dimer (Nanopia D-dimer)	FDP Control LOW	2.28±0.03 μg/mL (1.3%)	2.72±0.10 μg/mL (3.7%)
	FDP Control HIGH	8.85±0.08 μg/mL (0.9%)	8.65±0.20 μg/mL (2.3%)
FDP (Nanopia P-FDP)	FDP Control LOW	9.76±0.19 μg/mL (1.9%)	10.18±0.14 μg/mL (1.4%)
	FDP Control HIGH	31.14±0.17 μg/mL (0.6%)	30.77±0.43 μg/mL (1.4%)
SFMC (Nanopia SF)	SF Control LOW	10.74±0.28 μg/mL (2.6%)	10.97±0.44 μg/mL (4.0%)
	SF Control HIGH	51.00±1.12 μg/mL (2.2%)	56.65±2.10 μg/mL (3.7%)

All values are mean±SD (CV).

Table 2 Calibration stability of coagulation and fibrinolysis assays with Coapresta 2000

Assays (Reagents)	Control materials	Time (hour) after calibration				
		0	6	12	18	24
PT (Coagpia PT-N)	Coagtrol IX (%)	91.5	89.1	91.5	94.0	90.2
	(INR)	1.05	1.07	1.05	1.03	1.06
	Coagtrol IIX (%)	47.3	46.7	48.0	59.1	50.1
	(INR)	1.60	1.62	1.58	1.54	1.54
APTT (Coagpia APTT-N)	Coagtrol IX (sec)	31.9	31.8	31.9	31.7	31.7
	Coagtrol IIX (sec)	73.4	76.4	76.1	76.0	76.7
Fibrinogen (Coagpia Fbg)	Coagtrol IX (mg/dL)	289	294	287	287	282
	Coagtrol IIX (mg/dL)	134	126	130	128	129
Hepaplastin (Complex factor H [Kokusai])	Coagtrol IX (%)	91.5	89.1	91.5	94.0	90.2
	Coagtrol IIX (%)	47.3	46.7	48.0	50.1	50.1
AT III (Testzym S ATIII)	Coagtrol IX (%)	94.9	95.1	95.5	94.9	93.5
	Coagtrol IIX (%)	22.7	31.5	31.4	29.9	31.7
D dimer (Nanopia D-dimer)	FDP Control LOW (μg/mL)	10.4	10.7	10.2	10.4	10.4
	FDP Control HIGH (μg/mL)	30.8	30.9	30.9	30.9	31.3
FDP (Nanopia P-FDP)	FDP Control LOW (μg/mL)	2.87	2.88	2.87	2.88	2.85
	FDP Control HIGH (μg/mL)	8.90	8.80	8.81	8.96	8.97
SFMC (Nanopia SF)	SF Control LOW (μg/mL)	11.6	11.5	11.6	11.8	11.8
	SF Control HIGH (μg/mL)	61.2	59.1	60.2	57.9	61.6

Calibration stability was assessed by measuring control materials at 6-hour intervals on Coapresta 2000 without recalibration.

2. 試薬

1) 評価法

導入評価法であるCP2000にはコアグピア、ナノピア、テストチームを使用した（積水メディカルCP2000専用試薬）。凝固時間法で測定するコアグピアPT-N（PT試薬）、コアグピアAPTT-N（APTT試薬）、コアグピアFbg（フィブリノゲン試薬）、合成基質法で測定するテストチームS AT-III（ATⅢ試薬）、そして、ラテックス比濁法で測定するナノピアP-FDP（FDP試薬）、ナノ

ピアDダイマー（Dダイマー試薬）、ナノピアSF（SFMC試薬）を用いた。ヘパプラスチンについてはシスメックス試薬（複合因子・H^{「コクサイ」}）をCP2000に用いた。

2) 現行法

現行法であるCR800のPT、APTT、フィブリノゲン、ヘパプラスチンの測定にはCP800専用シスメックス試薬を用いた。凝固時間法で測定するトロンボチェックPT（PT試薬）、トロンボチェックAPTT（APTT試薬）、トロンボチェッ

クFib(L) (フィブリノゲン試薬)、複合因子・H「ロクサイ」 (ヘパプラスチン試薬)。ATⅢ、FDP、Dダイマー、SFMCについては積水メディカル試薬をCR800に用いた。合成基質法で測定するテストチームS AT-Ⅲ (ATⅢ試薬)、ラテックス比濁法で測定するナノピアP-FDP (FDP試薬)、ナノピアDダイマー (Dダイマー試薬)、ナノピアSF (SFMC試薬) を用いた。

3) キャリブレーターおよびコントロール

CP2000、CR800ともキャリブレーターにPT、APTT、フィブリノゲン、ヘパプラスチン、ATⅢにコアグトロールN (ヒト血漿凍結乾燥品、シスメックス)、FDPにFDPキャリブレーターN (ヒト血漿凍結乾燥品、積水メディカル)、DダイマーにDダイマーキャリブレーター (ヒト血漿凍結乾燥品、積水メディカル)、SFMCにSFキャリブレーター (ヒト血漿凍結乾燥品、積水メディカル) を用いた。コントロールはPT、APTT、フィブリノゲン、ヘパプラスチン、ATⅢにコアグトロールⅨとⅩX (ヒト血漿凍結乾燥品、シスメックス)、FDPとDダイマーにはFDPコントロールLOWとHIGH (ヒト血漿凍結乾燥品、積水メディカル)、SFMCにSFコントロールLOWとHIGH (ヒト血漿凍結乾燥品、積水メデ

イカル) を用いた。

Ⅲ. 結果

1. 測定精度

専用試薬とコントロール試料を用いてCP2000におけるPT、APTT、フィブリノゲン、ヘパプラスチン、ATⅢ、FDP、Dダイマー、SFMC測定の同時再現性 (10回) と日差再現性 (10日間) および日内再現性 (キャリブレーションの安定性：5回測定/日) を検討した。CP2000の測定精度は、すべての項目で同時再現性の変動係数 (CV) は3.0%以下、日差再現性のCVは4.7%以下にあった (Table 1)。検査開始時のキャリブレーション以降、再キャリブレーションせずにコントロール試料を6時間ごとに5回測定した成績は、検討したすべての項目で24時間まで安定であった (Table 2)。

2. 希釈直線性

フィブリノゲン (コアグピアFbg)、FDP (ナノピアP-FDP)、Dダイマー (ナノピアDダイマー)、SFMC (ナノピアSF) についてCP2000を用いて希釈直線性を検討した。フィブリノゲン

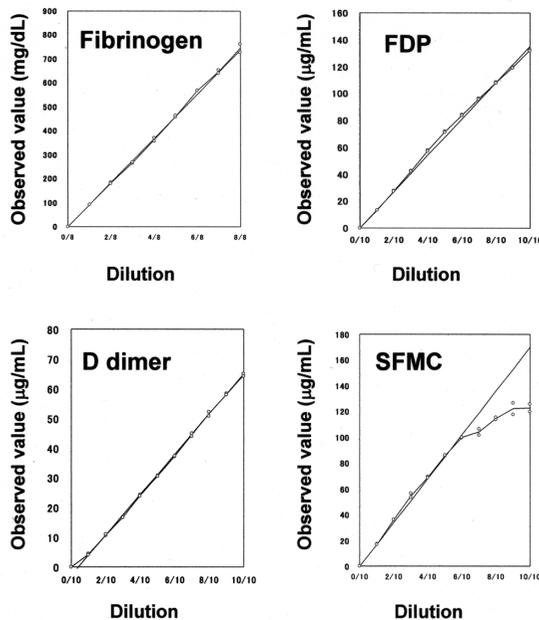


Fig. 2 Response curves and assays for fibrinogen, FDP, D dimer and SFMC with Coapresta 2000.

では高フィブリノゲン濃度にある患者血漿（クエン酸Na血漿）をTC緩衝液（シスメックス）で段階的に希釈してCP2000で測定した。実測値を理論値と比較した。FDP、Dダイマーについては、それぞれの濃度が高濃度にある患者血漿を生理的食塩水で希釈して用いた。SFMCについては、高濃度にある患者血漿を健常者血漿で希釈して用いた。フィブリノゲンは86 mg/dLから750 mg/dL、FDPは13 μg/mLから120 μg/mL、Dダイマーは4 μg/mLから60 μg/mL、SFMCは17 μg/mLから100 μg/mLの範囲で直線性を確認した（Fig. 2）。

3. 従来法との比較

患者血漿（クエン酸Na血漿）を用いてPT、APTT、フィブリノゲン、ヘパプラスチン、ATⅢ、FDP、Dダイマー、SFMCについて従来法（CR800）と導入法（CP2000）の成績を比較した。PT、フィブリノゲン、ヘパプラスチンにおいて従来法との有意な相関性（ $r=0.977$ 以上、 $p<0.001$ ）が認められた（Fig. 3）。APTTについては、他の項目に比べて相関性が低い結果であった（ $r=0.726$ 、 $p<0.001$ ）。APTT値が40秒を超

える試料で乖離（CP2000が高め）例が多く認められた。

ATⅢ、FDP、Dダイマー、SFMCにおいても従来法との有意な相関性（ $r=0.993$ 以上、 $p<0.001$ ）が認められた（Fig. 4）。

4. 症例

24時間緊急検査体制における臨床のニーズである前血栓状態の診断に有用とされるSFMCについて調査した。調査は2011年12月29日～2012年1月3日に実施した。この期間のSFMCの検査依頼

Table 3 Measurements of soluble fibrin monomer complex (SFMC) during year-end and new year periods (2011 - 2012)

Date	Patients	SFMC (μg/mL)
12/29	Orthopedics (inpatient)	1.3
12/30	Orthopedics (inpatient)	3.1
12/30	Orthopedics (inpatient)	8.7
01/01	Orthopedics (inpatient)	2.5
01/02	Orthopedics (inpatient)	13.1
01/02	Pediatrics (outpatient)	13.0
01/03	Pediatrics (outpatient)	10.2

Reference value for SFMC is less than 7.0 μg/mL in our hospital.

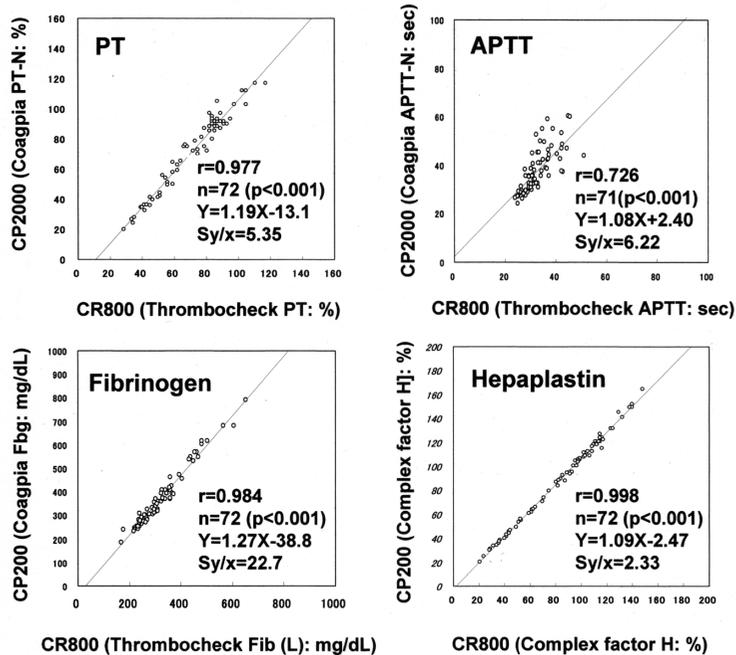


Fig. 3 Comparison of PT, APTT, fibrinogen, and heparlastin values found by the present method (Coagrex-800: CP800) and the evaluation method (Coapresta 2000: CP2000).

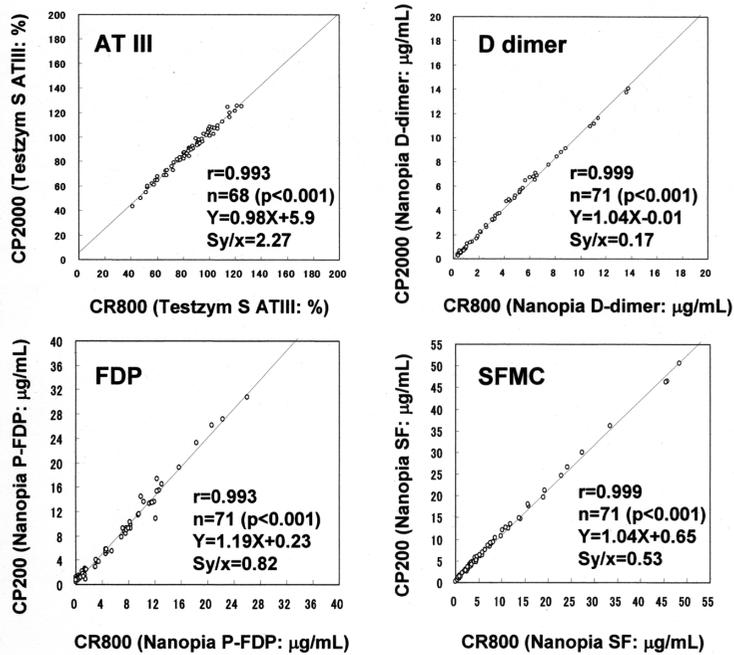


Fig. 4 Comparison of AT III, D dimer, FDP, and SFMC values found by the present method (Coagrex-800: CP800) and the evaluation method (Coapresta 2000: CP2000). Patients as in Fig. 3.

数は7件であり、カットオフ値 $7.0\mu\text{g/mL}$ を超える症例も多く認められた (Table 3)。依頼の多い診療科は整形外科であった。

IV. 考察

凝固線溶検査 (PT、APTT、フィブリノゲン、ヘパプラスチン、AT III、FDP、Dダイマー、SFMC) のすべてを24時間完全バックアップ体制で実施する目的でCP2000を導入した。導入時における従来法 (CR800) との成績の比較および幾つかの基礎的検討を行った。

CP2000の同時再現性は、すべての項目において同時再現性のCVは3.0%以下、日差再現性のCVは4.7%以下と良好な測定精度にあった。朝8時より6時間ごとに5回測定した日内再現性は、すべての項目で朝一回の校正キャリブレーションで24時間校正不要であった。しかし、日常的な経験ではAT IIIについては24時間後に不安定な場合もあり。当直開始前に再キャリブレーションしておけば安心であろう。

希釈直線性の検討では、フィブリノゲン、FDP、Dダイマー、SFMCは、それぞれ試薬添付文書記載の測定範囲 (上限) までの直線性を確認した。ルーチン検体の測定に十分対応できる上限値と考える。最低検出感度については検討ができなかったが、フィブリノゲン、FDP、SFMCについては、ブランク試料の想定値が希釈直線の外挿値と一致することから、フィブリノゲンで 0 mg/dL 、FDPで $0\mu\text{g/mL}$ 、SFMCで $0\mu\text{g/mL}$ までの測定が可能と考えられる。西村ら⁴⁾はCP2000を用いてフィブリノゲンで 30.8 mg/dL の最低検出濃度を報告している。この濃度は新生児の低フィブリノゲン血症にも十分に対応できることを示唆している。今回の検討で、Dダイマーについては $4\mu\text{g/mL}$ の検出感度を得たが、CR800との比較成績 ($1.0\mu\text{g/mL}$ 以下の試料での両機種との乖離幅は $0.0\sim 1.0\mu\text{g/mL}$) から考えると最低検出感度は $0.3\mu\text{g/mL}$ 付近であろう。

従来法 (CR800) との成績の比較ではAPTTを除いた全ての項目で相関係数が $r=0.977$ 以上と良好な相関性を確認することができた。PTについ

ては秒表記の比較で、 $r=0.979$ 、回帰式 $Y=1.19X-13.1$ 、 $Sy/x=5.35$ とY切片の大きさ、平均値における5.35の差を認めている。相関図は示さないがPTをINR表記で比較すると、CR800とCP2000で $r=0.987$ 、回帰式 $Y=0.96X+0.001$ 、 $Sy/x=0.006$ と機種間差のない成績が示された。

フィブリノゲンについても相関係数は $r=0.984$ ($p<0.001$) と良好な相関性があるが、回帰式 $Y=1.27X-38.8$ 、 $Sy/x=22.7$ とY切片の大きさ、平均値における38.8の差がある。CP2000の測定上限値を超えた高濃度試料で大きな乖離が認められた。CR800で653 mg/dLにあった試料のCP2000での測定値は791 mg/dLを示した (Fig. 3)。これはフィブリノゲン測定に用いたキャリブレーター (コアグトロールN) のトレーサビリティ体系^{5,6)}がシスメックスと積水メディカルで異なり、表示値がトロンボチェックFib (L) で256 mg/dL、コアグピアFbgで290 mg/dLと相違する。そのため、それぞれの表示値で作成した検量線での測定結果は、高濃度領域における系統誤差を生じるものと考えられる。

今回の検討で最も乖離の大きかったAPTTでは、相関係数 $r=0.726$ 、回帰式 $Y=1.08X+2.40$ 、 $Sy/x=6.22$ とY切片の大きさ、平均値における5.35の差を認めている。相関図は示さないがCR800とCP2000に同じ試薬 (トロンボチェックFib (L)) を用いて、今回の試料を再測定すると、相関係数 $r=0.987$ 、回帰式 $Y=1.05X-0.01$ 、 $Sy/x=1.30$ と両機種の値は近似する。このことより乖離の原因は機種間差に起因するものでなく、用いた試薬間差にあることが考えられる。APTT試薬にはリン脂質の抽出源や製造方法、活性化剤の種類などが多様であり、ヘパリンや内因系凝固因子などに対する感受性が異なることが原因と考えられる。今回の試料 (患者) についてヘパリン、ワーファリン治療や肝疾患の有無について調査していないが、APTT試薬の未分解ヘパリンへの感受性については小島ら⁷⁾の詳細な報告がある。小島らの成績ではトロンボチェックAPTT (CR800) のヘパリン感受性 (凝固時間 (秒) を延長させる) はコアグピアAPTT-S (CP2000) は小さいと報告されている。今回の検討で

CP2000に用いたコアグピアAPTT-Nは、APTT-Sの改良品のため感受性については不明である。トロンボチェックAPTTに比べコアグピアAPTT-Nが延長したAPTT値 (秒) にあることから、更なる研究が必要とされる。

SFMCは、D-dimerの活動性肺塞栓症 (PE) / 深部静脈血栓症 (DVT) の除外診断に加えて、D-dimerよりさらに鋭敏で増加のピークが短いため、過凝固状態 (前血栓状態) の診断に有用だとされている^{8,9,10)}。今後、D-dimerの検査と共に測定されていくことが望まれる。本施設でのSFMCの検査は、ひと月に138~250件であり、依頼料の多くは整形外科が占め、その多くはDダイマーと共に検査されている。

文献

- 1) 須長宏行: 全自動血液凝固分析想定コアプレスタ2000の特長とその有用性(測定原理からミキシングテストまで). 生物試料分析, 32: 386-392, 2009.
- 2) 関川由紀子, 高師紀子, 高橋美加, 桑田昇治, 木野内喬: 全自動血液凝固分析装置Coagrex-800の基礎的検討(1). 臨床検査機器・試薬, 23: 371-377, 2000.
- 3) 関川由紀子, 高師紀子, 高橋美加, 桑田昇治, 木野内喬: 全自動血液凝固分析装置Coagrex-800の基礎的検討(2). 臨床検査機器・試薬, 23: 379-385, 2000.
- 4) 西村敏治, 大西信行, 菊池美幸, 後藤文彦, 長野美恵子, 堀内 啓: 全自動血液凝固分析装置「コアプレスタ®2000」の基礎的検討. 医学と薬学, 58: 339-346, 2007.
- 5) 松野一彦: 凝固検査標準化の現状: 凝固検査標準化の現状. 生物試料分析, 32: 349-356, 2009.
- 6) 高宮 脩: 血液検査の標準化と現状: フィブリノゲン. 生物試料分析, 32: 371-379, 2009.
- 7) 小島 彩, 佐野将也, 後藤秀之, 石井 清, 西村敏治: 4機種の全自動血液凝固測定装置における測定処理時間およびAPTT試薬 (6種類) の感受性についての検討. 医学と薬学, 61: 87-91, 2009.
- 8) 和田英夫, 山田絵梨: 血栓症の診断・治療マーカーとしてのフィブリン関連マーカー-D-dimerとSFの意義一. 医学と薬学, 60: 679-685, 2008.
- 9) 細田雅子, 永野貞明, 大石 毅, 福武勝幸: 新たな可溶性フィブリン測定試薬 (ナノピアSF) の評価. 日本検査血液学会雑誌, 10: 202-210, 2009.
- 10) 松本剛史, 和田英夫: DVT/PEの診断・治療マーカー (フィブリン関連マーカーを中心に). 日血栓止血誌, 19: 22-25, 2008.