

〈特集：凝固検査の標準化と現状〉

Dダイマーの現状と標準化に向けた課題

福武 勝幸

Current situation of D-dimer test and the strategy for standardization

Katsuyuki Fukutake

Summary The standardization of clinical tests is indispensable in that it promotes advanced medical treatment by incorporating its results in a common worldwide index. D-dimer is the inclusive name of molecules with structures that are abundant in their diversity rather than uniform since they are digestive products of fibrin stabilized by plasmin. Thus, there can be no authentically standard D-dimer substance. Previous standardization studies of D-dimer using artificial fibrin split products have ended unsuccessfully. Recently, attempts were made to improve clinical utility through harmonization by using pooled patient plasma as a standard substitute. The standardization project of D-dimer is being promoted by the standardization committee of the Japanese Society of Laboratory Hematology, and its aim is to reduce the difference among reagents to a practicable level in Japan. A way must be found where by the standardization of D-dimer can be achieved very carefully with sufficient international consensus.

Key words: D-dimer, Fibrinolysis, Standardization, Harmonization, Thrombosis

I. はじめに

臨床検査の標準化は、検査結果を世界の共通の指標として利用して、高度な医療を推進するために必須の作業である。そして、その実現は臨床検査を行う者の責務でもある。単一物質の測定における一般的な標準化は、純化精製された標準物質を原器として正確な測定を行うことにより達成することが出来る。一般的な手段として、まず、認証標準物質の整備を行い、安定

な単一精製物質の確保し、そのトレーサビリティを担保する。基準測定操作法の整備し、基準検査法を確立する。臨床検査室の認定を行い、基本的手順を遵守して常に一定の精度を保証できるシステムを作ることである。しかし、凝固検査において実現可能な標準化の手段は、対象が単一物質でない場合が多いため、前者とは全く異なる手法が必要となる。まず、認証標準物質の整備については、対象は単一物質とは限らず、複合作用物質やDダイマーのような類似

東京医科大学 臨床検査医学講座・血液凝固異常症
遺伝子研究寄附講座
〒160-0023 東京都新宿区西新宿6-7-1

Laboratory Medicine and Molecular Genetics of
Coagulation Disorders, Tokyo Medical University,
6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku, Tokyo 160-0023, Japan

の混合物も対象となるため、基本的に困難である。基準測定操作法の整備についても、検査技術の進歩が日々続いているため、測定原理と方法が様々であることから確立が困難である。臨床検査室の認定については、このような状況下で検査室ごとに測定法が異なっているために容易ではない。標準化を進めるには、まず、標準化のための別の方法を規定する必要がある、そのためには、その標準化の方法の合理性について、臨床的利便性も含めた様々な角度から検討した上で、多くの人々がコンセンサスを形成する必要がある。

血液凝固は一つの反応に関わる物質は複数であり、単一物質の測定のような訳にはいかないことが容易に想像できる。Dダイマーは構造的に多様性に富んだ不均一な分解物の総称であり、生体内での分子構成は病態によっても異なる。さらに、測定にはモノクローナル抗体を利用するため、測定法毎に認識するエピトープに差があり、認識部位の構造上の違いから複雑な問題が生じている。これまでに、人工的なフィブリン分解物を使った標準化の試みが行われたが、抗体の認識部位の構造上の違いから全ての診断薬に共通の応用が困難なことから不成功に終わっている。近年はプール血清（血漿）を代用標準物質に用いる方法が採用され、標準化（standardization）というよりも調和化（harmonization）という表現で合意を図りつつ臨床的な

有用性を高めようとしている。日本でも検査血液学会の標準化委員会を中心にFDP/Dダイマープロジェクトが3回に渡って進められており、試薬間差を実用的なレベルまで縮小することが示されている。今後、注意深いコンセンサスの形成を経た上で、国際的な標準化を実現する道を見出さなければならない。

II. Dダイマーとは

Dダイマーはフィブリノゲン・フィブリン分解産物（fibrinogen/fibrin degradation products; FDP）のうち安定化フィブリンの分解物であり、線溶系の活性化により生成されたプラスミンにより安定化フィブリンが分解されて産生されたDダイマー構造を有する可溶性分解物の総称である。FDPは血液凝固検査において長く重要な役割を担っており、古くから播種性血管内凝固症候群（DIC）の診断に利用された凝固線溶検査の代表的な存在であるが、その中で安定化フィブリンの分解産物のうちDダイマー構造を有する分画を特にDダイマーと称し、2次線溶を反映するマーカーと認識している（図1）。したがって、病態の整理としてDダイマーの高値は2次線溶の亢進を反映するものと考えることが多いが、実際の生体内では1次線溶と2次線溶は常に共存しており、両者のバランスが病態によって変化する。このため、実際の臨床症例

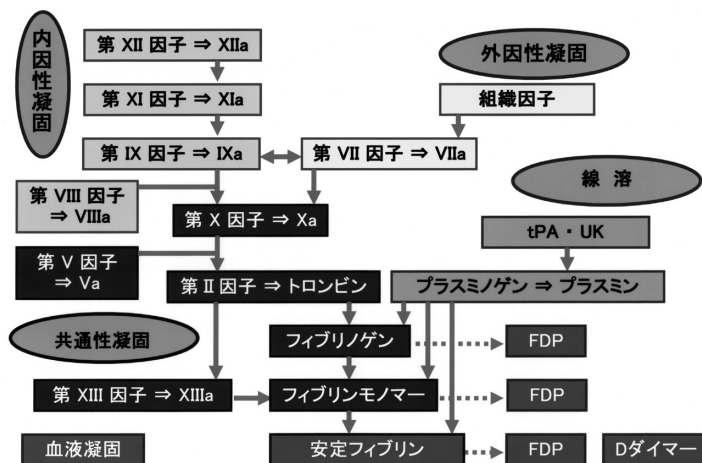


図1 血液凝固線溶のしくみ。
Dダイマーは安定化フィブリンの分解産物として生成され、2次線溶の指標となる。

では病態を厳密に区別して診断するのは難しいことも理解していなければならない。特異抗体を利用したDダイマーの測定キットが開発され、DICや深部静脈血栓症（DVT）などではDダイマーが高値示すことが報告された²⁾。一方、Dダイマーが低値の場合はDVTの存在を除外診断できる³⁾ことが示されて、臨床的に有用な検査項目として広く利用されている。

1. Dダイマー検査の利用時の注意点

Dダイマーは単一な分子ではなく、様々な分解過程の生成物の混合物であり分子量も構成要素も多様性に富んでいる（図2）。初期にFDPの測定が開発された当時は、ポリクロノナル抗フィブリノゲン抗体によって、凝固によりフィブリノゲンが除去されたあとの血清検体中の反応成分として、FDPを検出していた。その後、分子構造に特異的なモノクロノナル抗体の開発によりDダイマー分画を特異的に測定することが可能になり、2次線溶の存在が判定できるようになった。しかし、各メーカーが開発した抗体のエピトープや反応性には差があり、測定キット毎に反応部位が異なる抗体を利用する結果、Dダイマーと称した測定系でも特性が様々なものになっている。この結果、測定値はDダイマーという同じ名称の測定項目でありながら、測定キットにより測定成績が異なり、臨床的な不都合を生じることになり、標準化の必要性を指摘する声が高まっている。

2. 標準化の試み

DempfleらはDICやDVT患者の検体やプール血漿の希釈列などを含む86検体をセットにしてDダイマーの検査キットを製造する12社へ配布して調査をおこなった。その結果、それぞれの測定法はクロスリンクして安定化されたフィブリンに対する特異性や高分子分画あるいは低分子分画への反応性に違いがあった。安定化フィブリンのプラスミン分解による最終産物としてのDダイマーをキャリブレーターとして用いると、いくつかの測定法では極めて異常な値となった。特に高分子分画に反応性が高い試薬においてその傾向が強かったと報告している。また、キャリブレーターとして最も良く一致する成績を示したのは、プラズマの中に高レベルのD-ダイマーを含む患者のプール血漿であった⁴⁾とした。MeijerらはDダイマー検査についてのハーモナイゼーションモデルを構築し、患者のプール血漿から希釈検体を作成して検査施設へ配布して、測定方法別の回帰直線を求める方法を評価した⁵⁾。502施設へ試料を送付し、得られた測定結果から7種の主要なDダイマー測定法について353施設からの報告をもとに検討した。測定値を測定法別に解析し、回帰直線が求められ、また、全体の中央値を算出して変換式を求めた。この方法により方法間差は大幅に改善されることが示された。この方法を診断薬作成工程に各社が組み入れれば、利用者はみな調和化された

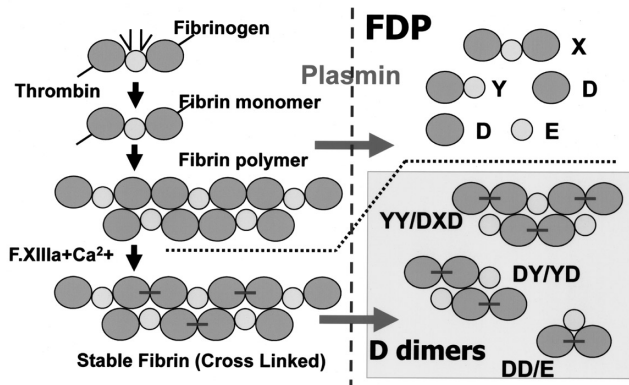


図2 フィブリン分解産物の生成過程のモデル。黄色の四角で囲われた部分がDダイマー分画であり、生体内にはさらに大分子量の分画も存在している。

データを利用できることになり、便利になる。ただし、この方法ではDダイマー真の値をどうすかは決められず、コンセンサス値としてどのような根拠で値付けするかは別の問題として残っている。また、評価されていない測定キットも残っており、今後は他の測定キットにも応用可能な更なる検討が必要である。

3. 標準化を困難にする原因

ダイマーは、近年、深部静脈血栓症の除外診断指標として注目されるようになり、低値域での信頼性と測定法間差の問題が多く議論されている。実際に標準物質が統一されていないことに加え、抗原の多様性が激しくモノクローナル抗体の特性が異なるために、個々の検査法により測定値が大きく乖離しているのが現状である。また、Dダイマーと認識する物質とその測定法の特性による注意点として、①Dダイマーは単一の物質ではなく、多様性のある分解産物の混合物であり真の標準物質が存在し得ない、②このため抗原性の違い、分子量の違うものが混在する、③測定に使用される抗体の特性が様々である、④各分解産物の構成に疾患（個体）差がある、⑤抗体によってはエラスターゼ分解物の交差反応があるなどの問題がある。著者の検討では（図3）に示すように、2004年の時点で日本国内で市販されていた測定法で検討した結果、同一プール検体の測定値は測定法によりかなりばらついていた。

4. 標準化とハーモナイゼーション

市販の測定キットは独自の標準物質を使用し

ている測定法が多く、またキット毎に使用している抗体と検体中の抗原との反応性が異なっている。しかし、対象物質が単一ではない以上、個々の測定法が異なる標準物質を使うことは避けられず、標準化自体が極めて馴染み難いことが容易に想像できる。実際に過去に人工的な分解物を用いた試みがなされたが、標準物質が全ての測定キットへの普遍性が得られないことから失敗に終わっている。それらの教訓から、標準物質を多様性の高い実際の患者検体のプールに求める方法が試みられ、ハーモナイゼーション（調和化）として位置づけることにより、臨床的な不都合を解消する活動が進みつつある。すなわち、Dダイマーのように真の基準物質を得ることができない場合には、厳密な標準化ではなく、基準物質の代替品としてプール検体などを用いて、全ての検査室で標準的な検体は概ね一致する値を示すことを目標とするものである。

5. 標準物質の選定

個々の患者では線溶系の活性化の状況と分解産物の代謝の関係が異なるため、流血中の分解産物の分子構成が異なることが知られている。例えば、高度に線溶系が活性化された場合はフィブリノゲン分解が強く起こり、Dモノマーが大量に検出される。このような検体の特徴がDダイマー測定値の測定法間差につながることは避けられない。しかし、現在はそれ以前の標準物質の統一がなされていない状態であり、特徴のない検体やプール検体の測定値においても測定法間差が著明である。これまでの研究から、

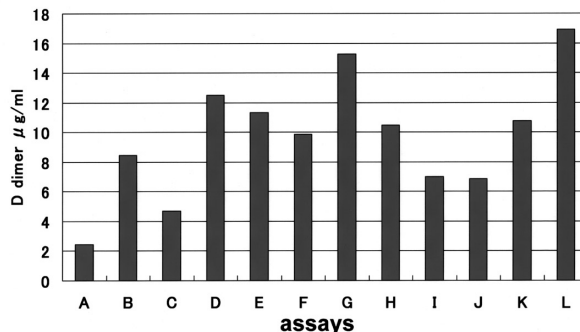


図3 測定法A-Lによる管理検体（プール血清）の測定値。著者らの検討では測定法により大きなばらつきが発生している。

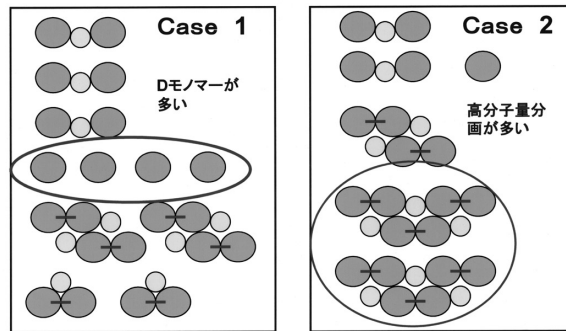


図4 生体内における分解産物の分子構成の違い。Case1ではプラスミン分解が高度でありDモノマー分画が増加している。Case2では高分子量の分画が増加している。

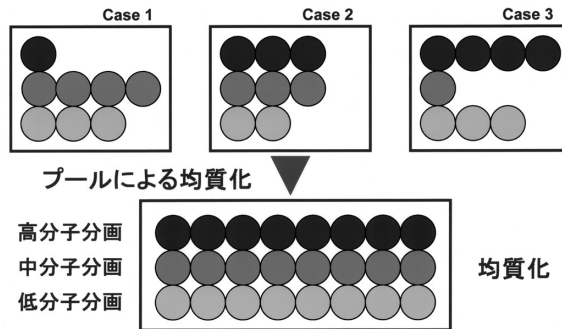


図5 血漿をプールする意味。個々の症例のDダイマー分画の分子構成は様々であるが十分な症例数の混合により均質化することができる。

人工的な標準物質は作成方法に依存する個性が強く現れるため、多くの測定法に共通して使うことは困難であるとの評価が出ている。そこで、最近では患者検体をプールすることにより、個々の検体の偏りを打ち消して、ヒトの生体内で産生される一般的な分子構成のFDP/Dダイマー標品を作成することが試みられた。図4に示すように、血中のFDPは個体により分子種の構成が異なり多様性が大きいことが知られている。

このようなFDPの標準物質として相応しいものは平均的な分子種の構成をもつFDPの混合物と考えられ、図5に示すように多くの個体から得た血漿を混合することにより、標準物質に適した分子構成が得られる。この方法を用いて、ヨーロッパのグループと我々日本のグループが市販の測定法について検討し、両グループともに臨床的に満足できると考えられる結果を得た。

6. ハーモナイゼーションの現状

Dダイマーはすでに長期間にわたり利用されてきた検査だが、標準化が行なわれないうままに診断約の開発が進められたため、エビデンスは個々の診断薬ごとに集積されていて、検査項目全体としてのエビデンスとは言えない状況にある。個々の検査法の持つ固有の問題についての情報提供も十分でなく、検査結果を正しく理解し利用するためには、世界規模でのハーモナイゼーションの実現と情報の整理が必要である。

検査血液学会と臨床検査医学会の標準化委員会が呼びかけて実施したFDP Project-1に基づいたハーモナイゼーションの効果は図6に示す通りである。これは、Dダイマーの低値から高値にわたる患者プール検体を12種の検査法で測定し、個々の検査法から求めた回帰直線を全体の中央値を通る回帰直線に変換する式を図7の方法で作成し、各測定値を変換した。

図6に示すように、この変換方法により測定法間差は改善されることから、不均一な物

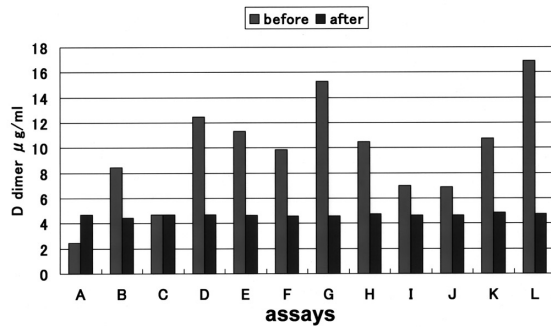


図6 ハーモナイゼーション前後の測定値の測定法間差。

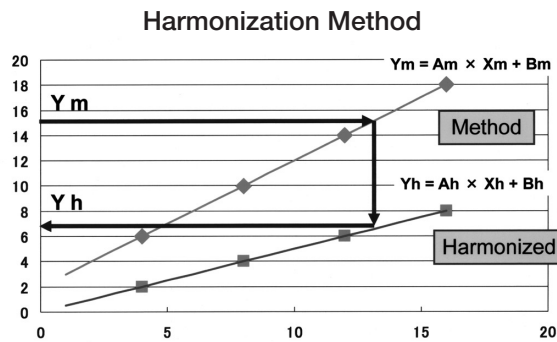


図7 回帰直線の変換方法。 $Y_h = a_h \times (Y_m - b_m) / a_m \times b_h$ 。

質の標準化の手法として利用できると考えている^{6),7)}。ただし、この方法ではすべての検体の測定値がどの検査法でも一致するわけではなく、あくまでも標準的な検体についてほぼ一致するようになる。特殊な検体では検査法により乖離することは避けられない。しかし、多くの検体に一致した検査結果を与えるために、Dダイマー検査にとって標準化の推進が極めて重要であり、早急に進めなければならない。一方、Dダイマー検査を利用した診断基準やガイドラインが様々な医療の場で用いられ始めており、現時点では検査の実用化の基本となる標準化は未だに十分に進んでいないことを理解したうえで臨床に供していくことが大切である。

文献

- 1) Dempfle CE: D-dimer: standardization versus harmonization. *Thromb Haemost.*, 95: 399-400, 2006.
- 2) Elms MJ, Bunce IH, Bundesen PG, et al.: Measurement of crosslinked fibrin degradation products—an immunoassay using monoclonal antibodies. *Thromb*

Haemost., 50: 591-4, 1983.

- 3) Rowbotham BJ, Carroll P, Whitaker AN, et al.: Measurement of crosslinked fibrin derivatives—use in the diagnosis of venous thrombosis. *Thromb Haemost.*, 57: 59-61, 1987.
- 4) Carl-Erik Dempfle, Sybille Zips, Hanimsah Erg 1, Dieter L. Heene and the FACT study group: The Fibrin Assay Comparison Trial (FACT) Evaluation of 23 Quantitative D-dimer Assays as Basis for the Development of D-dimer Calibrators. *Thromb Haemost.*, 85: 671-8, 2001.
- 5) Piet Meijer, Frits Haverkate, Cornelis Kluyt, Philippe de Moerloose, Bert Verbruggen, Michael Spannag: A model for the harmonisation of test results of different quantitative D-dimer methods. *Thromb Haemost.*, Mar; 95(3): 567-72, 2006.
- 6) 福武勝幸: 凝血学的検査を深く理解するために FDP/Dダイマー検査の注意点. *日本検査血液学会誌*, 9(1); 86-90, 2008.
- 7) 福武勝幸: 標準化 凝固検査の標準化. *臨床検査 Yearbook 2009 血液検査編*, 臨床病理レビュー, 142: p162-166, 東京, (2009)