

血液凝固時間自動測定器クロテック-Ⅱの検討 —PT, APTT—

小 穴 こず枝*

I はじめに

近年、血液凝固検査における自動化の進歩は著しく、多種多様の自動測定器が開発され導入されている。従来より行われている用手法では、終末点の判定には自己の主観によるところが大きく、手技の熟練を必要とされていたが、自動測定器では精度の向上、更には能率性、省力化において、用手法より優れた成績が期待される。

これらの機器は、その検出原理により次の3種類に大別される¹⁾。

- 1) 析出フィブリン塊の異物への吸着を電気的あるいは光学的に検知する
- 2) 凝固反応による血漿の粘稠度変化を光学的に検知する
- 3) 凝固反応による吸光度変化を測定する

また、その操作性により全自動測定器と半自動測定器とに区別される。

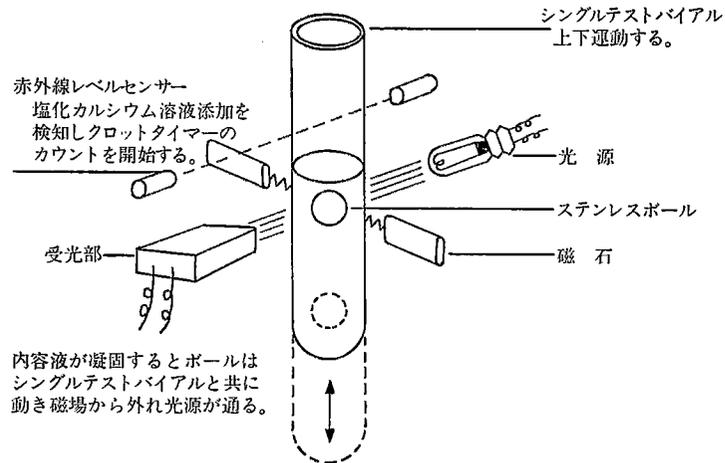
自動測定器による測定値および正常値は、用手法と差がみられることがあり、また使用する試薬と測定機種間に差がみられ、更に測定温度条件、室温条件などによる影響も受けることから、同一機種内でもこれらの条件の違いにより差が認められている²⁾。そのため、測定機種に適した試薬の選定、また標準血漿を用いる場合にはその選定も重要となる。

今回、2)の検出原理による半自動測定器であるクロテック-Ⅱ（日本トラベノール製）を用い、上記の点を考慮しながらプロトロンビン時間（以下PTと略す）と、活性化部分トロンボプラスチン時間（以下APTTと略す）について、用手法と比較しながら検討を試みた。

II 測定原理³⁾

ステンレスボールの入ったクロテック用シングルテストバイアルに試薬と被検血漿を加え、装置内の反応槽（ $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に調整されている）に入れると、可動ピストンによりシングルテストバイアルが120回/分の割合に上下運動して内容物が混合される。この時、ステンレスボールは第1図に示すように磁石によりシングルテストバイアルの上下運動とは無関係に一定に静止した状態に保たれており、光線はこのボールにより遮断されて光電管にはキャッチされない。

* 信州大学医療技術短期大学部衛生技術学科



第1図 測定原理

次に試薬をシングルテストバイアルに滴下すると、赤外線レベルセンサーがこの滴下を検知し、クロットタイマーが作動し始める。

シングルテストバイアル内の液が混和され、凝固し始めると、静止状態であったステンレスボールはシングルテストバイアルと共に磁場から外れ、遮断されていた光線が受光部に届き、クロットタイマーが停止し、時間が0.1秒までデジタル表示される。カウント終了と同時に、プリンターに試料ナンバーとクロットタイムがプリントアウトされる。

本装置は、フィブリン形成機序を基本としている反応系であれば測定が可能であり、PT、PTT、APTT、フィブリノゲン定量、ヘパラスチンテスト、各凝固因子定量などの測定ができる。

Ⅲ 試薬および方法

1 PT測定

1) 被検血漿

(1) 正常プール血漿

健常成人の血液9容に対し、3.13%クエン酸ナトリウム液1容の割合に加え、直ちに3000rpm10分冷却遠心、分離した血漿を6人分等量混合

(2) 市販標準血漿

① OMEGA凝固検査用コントロール血漿レベルI (ハイランド社)

② サイトロール・I (デイド社)

③ ベリハイノーマル・シトレイト (ワーナー・ランバード社)

④ コアグトロール・II (デイド社)

(3) 臨床検体血漿

信州大学医学部附属病院中央検査部血液検査室に凝固検査用として提出された検体血漿

2) 試薬

- (1) プロトンビンテスト (ハイランド社)
- (2) トロンボプラスチン・C (デイド社)
- (3) シンプラスチン (ワーナー・ランバード社)

3) 測定方法

自動化法はクロテックⅡ法, 手法は試験管傾斜法によった。なお両者ともに, 恒温槽は37°Cに調整して各使用試薬説明書に従い操作した。

(1) 各試薬別検量線の比較

① 新鮮正常プール血漿を用いた場合

正常プール血漿は生理的食塩水で100, 70, 50, 40, 30, 20%濃度に稀釈し, 試薬はプロトンビンテスト, トロンボプラスチン・Cおよびシンプラスチンの3種を用い, クロテックⅡと手法によりそれぞれ2重測定して, その平均値より検量線を作成し比較した。

② 各種標準血漿を用いた場合

試料としてOMEGA凝固検査用コントロール血漿レベルI, サイトロール・Iおよびベリハイノーマル・シトレイトの3種を用い, 生理的食塩水で100, 70, 50, 40, 30, 20%濃度に稀釈した。試薬はトロンボプラスチン・Cとシンプラスチンを用い, クロテックⅡと手法でそれぞれ2回ずつ測定し, 検量線を作成し, 相互に比較した。

(2) 同時多重測定によるクロテックⅡと手法の比較

試薬としてトロンボプラスチン・Cとシンプラスチンの2種, 試料には正常プール血漿(-20°C凍結保存), サイトロール・Iおよびコアグトロール・IIの3種を用いて, クロテックⅡと手法で19回ずつ測定し, SN比⁴⁾を用いて比較した。

(3) 臨床検体によるクロテックⅡと手法の比較

試薬としてトロンボプラスチン・Cとシンプラスチンを用い, 臨床検体血漿についてクロテックⅡと手法で2回ずつ測定した。

2 APTT測定

1) 被検血漿

(1) 正常プール血漿

PTと同様

(2) 市販標準血漿

- ① サイトロール・I (デイド社)
- ② コアグトロール・II (デイド社)

(3) 臨床検体血漿

PTと同様

2) 試薬

- (1) PTTテスト (ハイランド社)
0.03M塩化カルシウム液 (ハイランド社)
- (2) アクチン (デイド社)
0.02M塩化カルシウム液 (デイド社)
- (3) プラテリンプラス・アクティベーター (ワーナー・ランバード社)
0.025M塩化カルシウム液 (自家製)

3) 測定方法

自動化法はクロテック-Ⅱ法, 用手法は試験管傾斜法によった。なお両者ともに, 恒温槽は37°Cに調整して, PTTテストを使用したクロテック-Ⅱ法は測定器使用説明書に, それ以外の測定は各使用試薬説明書に従い操作した。

(1) 新鮮正常プール血漿を用いた場合の各試薬別検量線の比較

正常プール血漿は生理的食塩水で100, 70, 50, 40, 30%濃度に稀釈し, 試薬はPTTテスト, アクチンおよびプラテリンプラス・アクティベーターの3種を用い, クロテック-Ⅱと用手法で2重測定を行い, その平均値より検量線を作成し比較した。

(2) 同時多重測定によるクロテック-Ⅱと用手法の比較

試薬としてアクチンとプラテリンプラス・アクティベーターの2種, 試料には正常プール血漿(-20°C凍結保存), サイトロール・Ⅰおよびコアグトロール・Ⅱの3種を用いてクロテック-Ⅱと用手法で19回ずつ(一部17回)測定し, SN比を用いて比較した。

(3) 臨床検体によるクロテック-Ⅱと用手法の比較

試薬としてアクチンとプラテリンプラス・アクティベーターを用い, 臨床検体血漿についてクロテック-Ⅱと用手法により2回ずつ測定した。

IV 成 績

1 PT

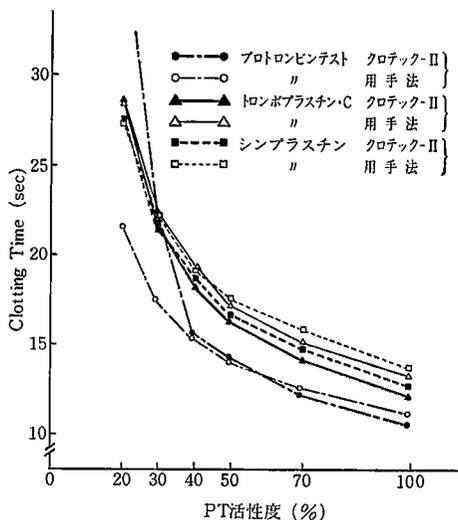
(1) 各試薬別検量線の比較

① 新鮮正常プール血漿を用いた場合

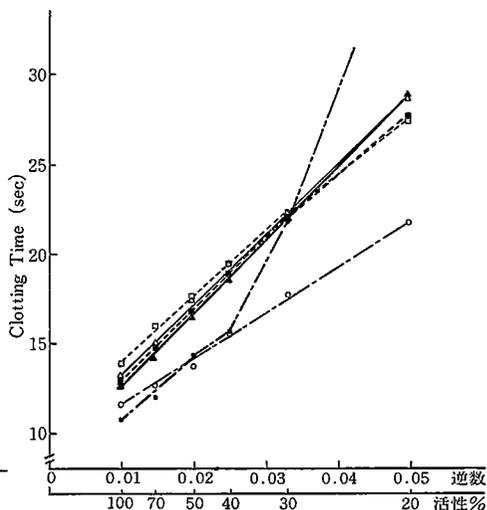
第2図は横軸に活性%, 縦軸に凝固時間をプロットして得た各種試薬によるPTの活性度曲線である。第3図は逆数グラフを用いて検量線を作成したもので, 横軸に活性%の逆数, 縦軸に凝固時間をプロットすると検量線は直線となる⁵⁾。

トロンボプラスチン・Cとシンプラスチンを用いた場合, 100%濃度ではクロテック-Ⅱは用手法に比べ約1秒短縮しており, 40%濃度まではほぼ同一傾向の検量線が得られた。30%濃度ではその差は小さくなり, 20%濃度ではクロテック-Ⅱの方が若干延長した。

プロトロンビテストを用いた場合, 稀釈濃度40%までクロテック-Ⅱと用手法はほぼ同一の検量線が得られたが, 30%以下ではクロテック-Ⅱによる測定が明らかに延長し, 第3図では検量線の角度が急に大きくなった。また, 20%濃度ではクロットタイマーが停止しない場合があった。



第2図 正常プール血漿を用いた場合の各試薬別PT検量線

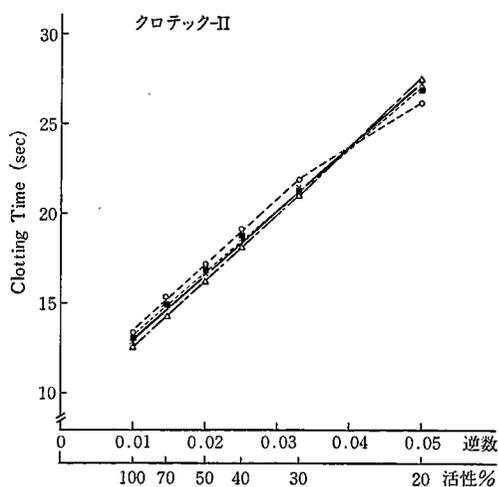
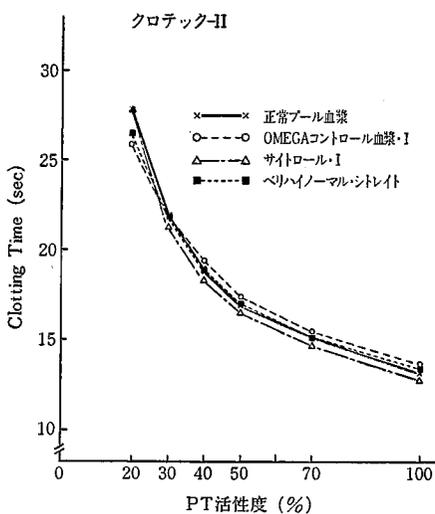


第3図 正常プール血漿を用いた場合の各試薬別PT検量線

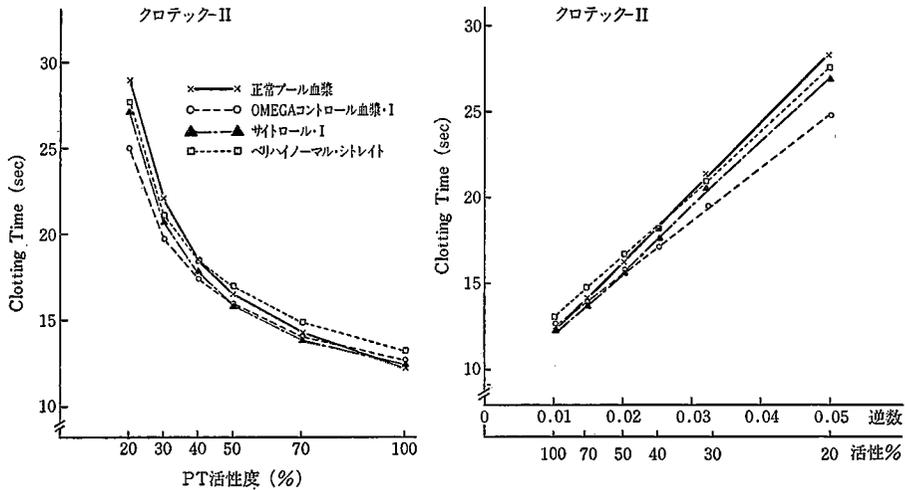
② 各種標準血漿を用いた場合

クロテック-IIと用手法を比較すると、いずれの試薬と標準血漿の組合せにおいても、クロテック-IIは用手法に比べ短縮傾向があり、低濃度になるとその差は小さくなるが、両測定法による検量線はほぼ同一傾向の検量線が得られた。

試薬としてトロンボプラスチン・Cを用いた場合とシンプラスチンを用いた場合を比較すると、同一標準血漿であれば、クロテック-II、用手法による測定とともに、トロンボプラスチン・Cはシンプラスチンに比べ短縮した測定値となった。



第4図 シンプラスチンによる各種血漿のPT検量線



第5図 トロンボプラスチンによる各種血漿のPT検量線

クロテック-IIによる3種類の標準血漿について比較すると、試薬としてシンプラスチンを用いた場合、第4図に示すように各濃度における3種類の標準血漿の測定値の差はほとんど1秒以内であった。逆数グラフで表わすと直線の検量線が得られた。これらの検量線と前述の正常プールの血漿による検量線を比較すると、ほぼ同じ検量線を示した。特にペリハイノーマル・シトレイトは20%値を除くと最も一致した。試薬としてトロンボプラスチン・Cを用いた場合は、第5図の如くシンプラスチンの場合より各標準血漿の測定値に差があり、低濃度ほどその差が大きくなった。正常プールの血漿による検量線と比較すると、サイトロール・Iがほぼ同じ傾向を示した。

(2) 同時多重測定によるクロテック-IIと用手法の比較

第1表に示すように、両試薬ともにクロテック-IIは用手法に比べSN比が大きく優れた結果が得られた。

第1表 PTの同時多重測定における比較

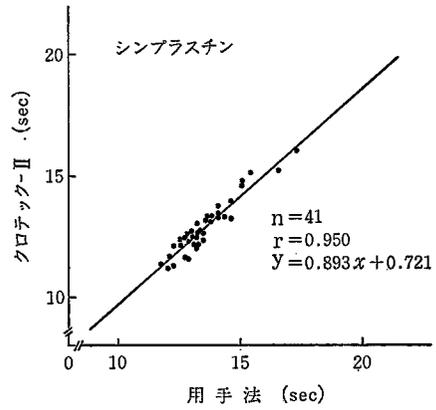
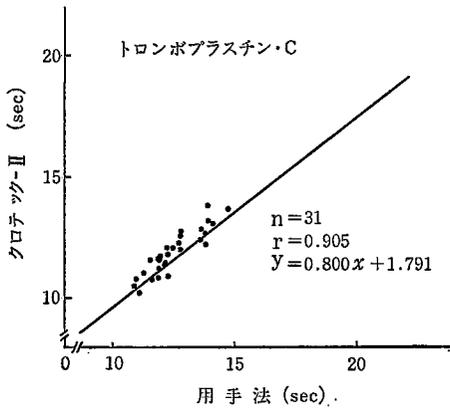
	クロテック-II			用 手 法		
	n	平均±S. D.(秒)	SN比	n	平均±S. D.(秒)	SN比
トロンボプラスチン・C						
正常プールの血漿	19	13.49±0.12		19	13.70±0.25	
サイトロール・I	19	12.56±0.20	850.237	19	13.00±0.25	389.333
コアグトロール・II	19	25.35±0.35		19	25.46±0.49	
シンプラスチン						
正常プールの血漿	19	13.54±0.24		19	14.38±0.27	
サイトロール・I	19	12.56±0.24	311.512	19	13.21±0.27	266.121
コアグトロール・II	19	22.40±0.41		19	23.73±0.48	

(3) 臨床検体によるクロテック-IIと用手法の比較

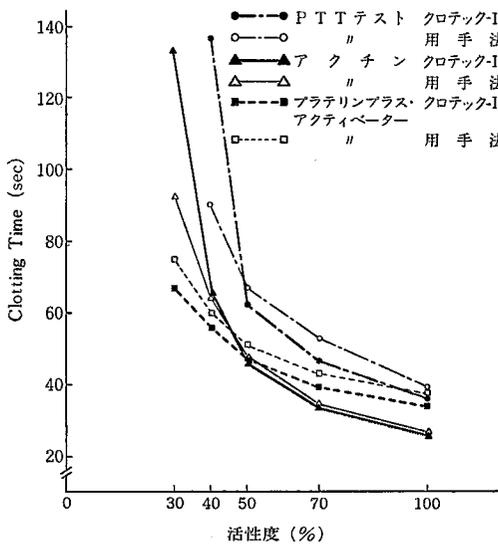
各測定法による凝固時間の平均値は第6図に示すように良好な相関が認められた。SN比による比較を第2表に示した。両試薬ともクロテック-IIは用手法に比べSN比が大きく優れた結果が得られた。

第2表 臨床検体におけるPTのSN比

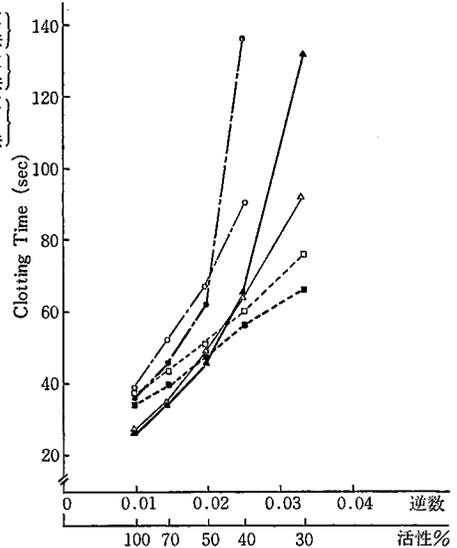
試薬	クロテック-II	用手法
トロンボプラスチン・C	15.436	11.142
シンプラスチン	25.222	13.114



第6図 PTの相関性



第7図 正常プール血漿を用いた場合の各試薬別 APTT 検量線



第8図 正常プール血漿を用いた場合の各試薬別 APTT 検量線

2 APTT

(1) 新鮮正常プール血漿を用いた場合の各試薬別検量線の比較

第7図に活性度曲線を示した。第8図は逆数グラフを用いた検量線である。各試薬により測定値に差があり、また検量線の傾きに違いがみられた。第8図をみると、用手法による測定ではいずれの試薬においても検量線はほぼ直線となったが、クロテック-Ⅱでは、PTTテストは50%濃度まで、アクチンは40%まで、プラテリンプラス・アクティベーターは30%まで直線を示し、これらの濃度まではクロテック-Ⅱと用手法は同一傾向の検量線を示した。この時、クロテック-Ⅱは用手法に比べ短縮していたが、更に低濃度となると逆にクロテック-Ⅱの方が著しく延長し、PTTテストでは30%濃度はクロットタイムが停止しなかった。

(2) 同時多重測定によるクロテック-Ⅱと用手法の比較

第3表に示すように、両試薬ともクロテック-Ⅱは用手法に比べSN比が大きく優れた結果が得られた。

(3) 臨床検体によるクロテック-Ⅱと用手法の比較

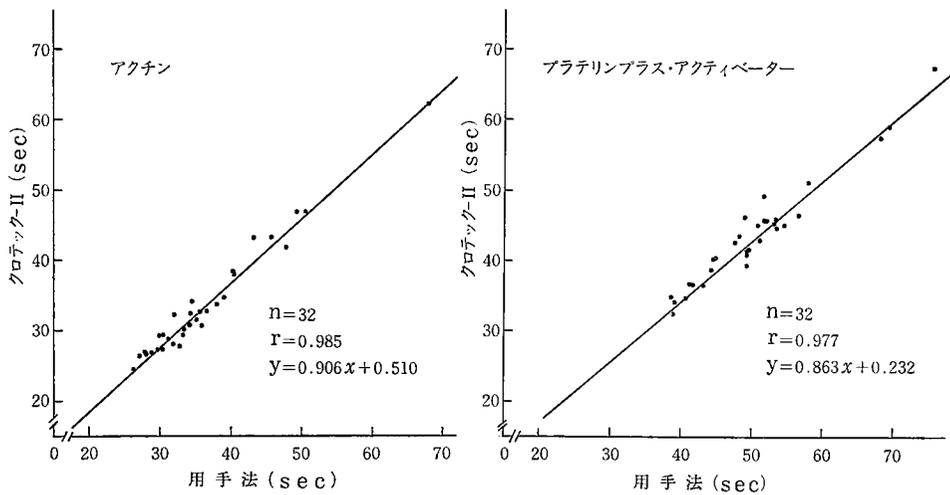
各測定法による凝固時間の平均値は第9図の如く、良好な相関性が得られた。第4表に各測定によるSN比を示した。両試薬ともにクロテック-Ⅱは用手法に比べSN比が大きく優れた結果が得られた。

第3表 APTTの同時多重測定における比較

	クロテック-Ⅱ		用 手 法			
	n	平均±S. D.(秒)	SN比	n	平均±S. D.(秒)	SN比
アクチン						
正常プール血漿	19	28.08±0.37		19	29.64±0.43	
サイトロール・Ⅰ	19	28.46±0.37	200.456	19	29.71±0.41	194.526
コアグトロール・Ⅱ	19	39.52±0.60		19	42.78±0.73	
プラテリンプラス・アクティベーター						
正常プール血漿	19	35.88±0.63		19	38.42±0.79	
サイトロール・Ⅰ	17	34.18±0.35	356.627	19	37.19±0.41	101.616
コアグトロール・Ⅱ	17	44.07±0.37		19	48.18±0.58	

第4表 臨床検体におけるAPTTのSN比

試 薬	クロテック-Ⅱ	用 手 法
アクチン	269.862	196.158
プラテリンプラス・アクティベーター	239.469	129.994



第9図 APTTの相関性

V 考 察

現在、血液凝固検査において多種多様の自動測定器が販売されている。最近では、試薬、検体の分注から測定、成績のプリントまで完全自動化された多数検体を処理する大型機器が登場してきた。検体数の多い施設では、省力化を目的としてこれら大型機器を利用することが可能であるが、このような機器は高価でもあり、どここの施設でも導入できるというものではない。また、検体数の少ない施設では、大型機器よりは小型の機器のほうが利用しやすく、能率的でもある。従来より小型機器の一種としてクロテックは多く利用されてきたが、今回、精度の向上、能率化、省力化を考慮したクロテックⅡが発売された。このクロテックⅡについてPT、APTT測定を行い、従来より行われている用手法と比較検討を試みた。

血液凝固検査における測定値は、使用する試薬、測定方法により差を生じ、また用手法と自動測定器による差、自動測定器の機種間差が認められている²⁾。今回の検討においても、クロテックⅡと用手法とでは測定値に差がみられた。本機は反応液が絶えず一定速度で攪拌されているため、用手法に比べ若干短縮する⁶⁾が、PT、APTTともに使用試薬により一定の短縮傾向がみられた。しかし、正常プール血漿と標準血漿を生理的食塩水を用いて希釈、測定して作成したPT、APTT検量線では、低濃度になるとクロテックⅡと用手法との差が小さくなったり、クロテックⅡの方が延長した値が得られた。フィブリン析出の瞬間を終末点として肉眼的に捉える用手法に比べ、本機の場合、その検出原理によりフィブリノゲンが低濃度となる場合などでは測定終末点に大きく影響が現われると考えられる。特に今回の検討では、希釈に生理的食塩水を用いたため、その影響は大きかったと思われる。希釈液としては、生理的食塩水ではなくフィブリノゲン液あるいはバリウム吸着血漿が推奨されている⁷⁾が、今後、検討を予定している。プロトロンビンテ

ストを用いたPT測定やPTTテストを用いたAPTT測定時にフィブリン析出があるにもかかわらず、血漿全体がゲル化しないためにタイマーが停止しない場合があった。他の試薬を用いた同濃度の血漿では測定可能であったことより、試薬の性状により血漿のゲル化に差を生じるということも考えられるが、そのためにも、測定器に適合した試薬の選定が必要である。この2種の試薬に関しては、検量線上の低濃度域において用手法と大きな違いがみられたが、今回は精度については比較してないので、今後、検討を予定している。今回の検討に使用したその他の試薬については充分使用可能と考えられる。精度に関しては、3種類の血漿による多重測定と臨床検体による測定において、クロテックⅡは用手法に比べSN比が大きく、優れた結果が得られた。また、臨床検体による用手法との相関は良好であった。更に、プラテリンプラス・アクティベーターのような混濁のあるAPTT試薬は、散乱光度法による自動測定器では使用不能であるが、本機においてはそれが測定可能となる。PT検量線の検討において、正常プール血漿の代りとなる市販標準血漿は、使用試薬と同一社種の標準血漿を用いるのが望ましいと思われた。

血液凝固時間測定には、種々の外的要因の影響を受けやすい。たとえば恒温槽の温度や検査室の温度などがそうである。クロテックⅡの場合、構造上、外気温度に影響されやすい。恒温槽は $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ にコントロールされているが、反応槽内の光源の発熱量が高いため、室温が 30°C 以上になると、その熱が放熱されずに、恒温槽を加熱してしまうことになる。今回の検討中（プラテリンプラス・アクティベーターを用いたAPTT測定時）、室温が 30°C 以上の時に、クロテックⅡの恒温槽温度が 40°C 以上となってしまう、再現性、相関性が不良となった。一般に、温度が上昇すると血液凝固は促進されるが、この時のクロテックⅡの測定値は用手法に比べ、明らかに延長していた。その原因として、本機の検出原理である凝固反応による血漿の粘稠度変化と温度との関係が考えられる。従って、検査室の温度調整のできない場合は、時々、恒温槽温度をチェックするなどの注意を要する。その後、光源ランプを発熱のないものに交換し、また、本体を被っているカバーを通気のための窓を明けたものと交換したところ、上記のようなトラブルは発生しなくなった。

クロテックⅡは、被検体、試薬の注入は手動であるため、ピペット操作には注意を要するが、本機の操作は簡便に行うことができる。また、ピペッターがコードレスであるので、他のピペットも使用でき、種々の測定に応用可能である。更に、小型で軽量であるため、移動も可能で、場所をとらずに使用でき、日常検査のほか緊急検査にも即応できると考えられる。

Ⅶ ま と め

血液凝固時間自動測定器クロテックⅡによるPT、APTT測定について、各種試薬メーカーの試薬による相異も含めて用手法と比較検討を行った。

血液凝固時間は測定温度に影響されやすいため、クロテックⅡに限らず一般に恒温槽

の温度調整(37°C)は重要である。また、検査室の気温についても注意を要する。

クロテック-Ⅱによる測定値は、用手法に比べ若干短縮し、その程度は、PT, APTTともに使用試薬に依存していた。しかし、検量線作成時に、稀釈液として生理的食塩水を用いた場合は、低濃度域では自動化法がむしろ遅延する傾向がみられた。クロテック-Ⅱは用手法に比べ、SN比が大きく優れた結果が得られた。クロテック-Ⅱに関する使用試薬についての知見は以下の如くであった。

1 PT測定

トロンボプラスチン・Cとシンプラスチンによる測定は精度、相関性ともに良好であった。市販標準血漿を用いる場合は、使用試薬と同一社種の血漿が望ましい。

2 APTT測定

アクチン、プラテリンプラス・アクティベーターによる測定は精度、相関性ともに良好であった。

以上、クロテック-Ⅱは操作が簡便で、日常検査に使用し得る優れた機器と考えられた。

(稿を終えるにあたり、検体をご提供いただいた信州大学医学部附属病院中央検査部血液検査室の皆様へ深く感謝します。)

参 考 文 献

- 1) 山中 学：近年における血液凝固検査。Medical Technology, 5: 431, 1977.
- 2) 血液検査研究班：昭和56年度血液検査研究班事業報告。衛生検査, 31: 1298, 1982.
- 3) 日本トラベノール：クロテック-Ⅱ使用の手引。
- 4) 日本規格協会SN比マニュアル分科会編：SN比マニュアル, 日本規格協会, 1975.
- 5) 馬場百合子, 他：トロンボレルの使用経験。臨床検査機器・試薬, I: 215, 1978.
- 6) 大賀美佐子, 他：クロテック-Ⅱの日常検査使用性に関する基礎的検討。臨床検査機器・試薬, IV: 629, 1983.
- 7) 新版日本血液学全書刊行委員会：新版日本血液学全書13血液学的検査・正常値, 374, 丸善, 東京, 1979.

(1983年9月30日 受付)