**凝　固　の　知　識**

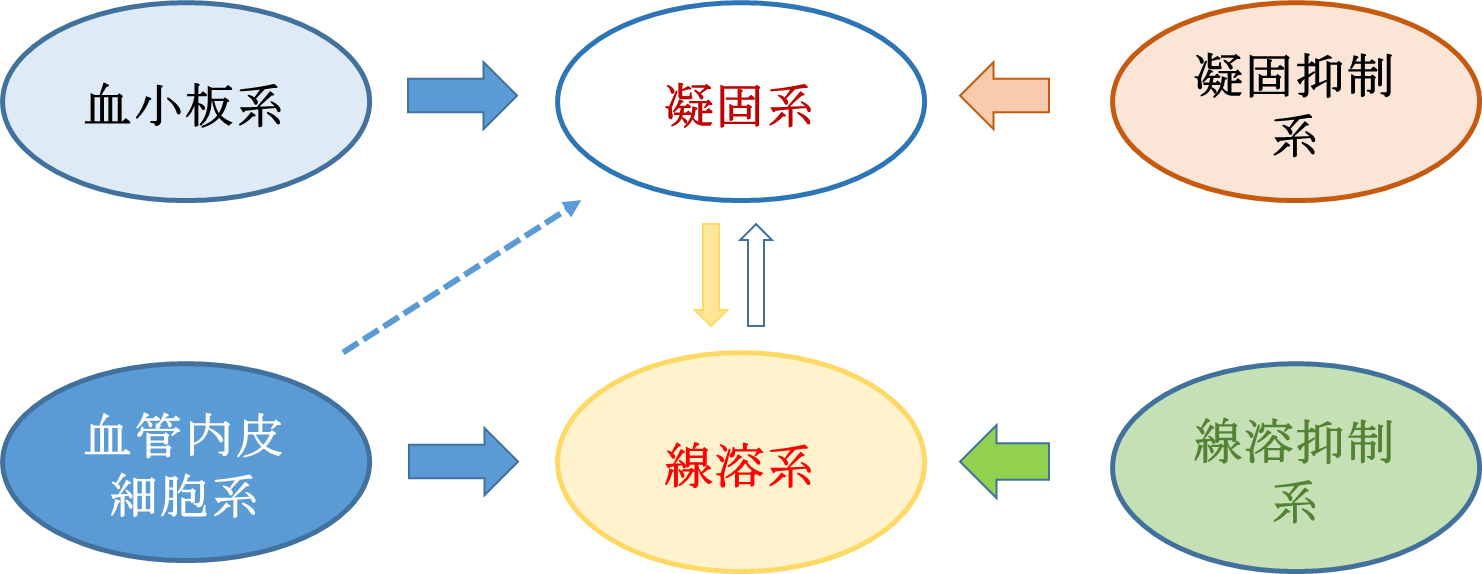
**１．　血栓形成の概要**

**Ａ．血栓形成の概要**

血液は循環器（心臓・血管系）によって継続的にくまなく生体内を循環しています。このため、血液が血管内で固まるということは、血液循環の障害となり、非常に危険な状態となります。しかし、ケガなどの出血があった場合には、直接生命に係わりますから、直ちに出血を防ぐ必要があります。このため、血液は、出血に際しては直ちに固まり（血液の凝固）、失血の防止と傷口の治癒をうながす作用を発揮するようになります。

このように、血液はそれ自体がもっている凝固するという性質と、全身的な生体制御によって流れ続けさせようとする作用、の２つのバランスの上で成り立っていると考えられます。人類が進化する過程において、人類の祖先は野山を駆け回り、その間にケガをしたり、あるいは虎やライオンなどの動物に攻撃されて出血したりしたでしょうが、その時速やかに出血を止める作用のあるヒトが選び抜かれ、その遺伝子が広く伝えられることにより、今日のヒトの血液の凝固能に至ったと考えられます。一方、そんな極端な例で説明するまでもなく、心臓や血管系は細胞と言う単位から構成された生命体です。ですから、この中では絶えず古い細胞は死に、新しい細胞に置き換わる必要があります。例えば、細胞が死ぬ毎に心臓や血管に穴があき出血を起こしていたら大変なことになりますから、ケガなどをしなくとも血管内で血液が凝固するという性質は重要な意味を持っていたと思われます。いずれにしても、強い凝固能を持つヒトが生き残り、それが今日に伝えられ、我々は強い凝固能を持つヒトとして生きていると言うことになります。

他方、血液を流れつづけさせる作用は抗凝固作用と呼ばれます。淀むことなく流れ続けないと、血液は上述の「凝固」する性質によって血管内で血栓を生じ、血流が停止してしまいます。酸素や栄養素を遮断された組織（あるいは器官）は死ぬ運命にあります。従って、血液は流れ続けなければならず、流れつづけさせるシステムが形成されなければならないという必然性があります。そのため、生体内では血液を流れ続けさせるための作用が全身的な生体制御で行なわれていると考えられます。血液を流れ続けさせる作用は、①凝固を起こさせない作用、と、②凝固反応を止める作用、③凝固したものを溶かすことによって再び流れさせるようにする作用、の３つが考えられます。①に該当するものとしては血管内皮細胞の機能として扱われているのですが、組織因子の血液内流入の阻止などが考えられます。②に該当するものではＡＴ－ⅢやヘパリンコファクターⅡ、活性化プロテインＣなど、③に該当するものではプラスミン（Plasmine）が挙げられます。



また血液を流れ続けさせる作用の内、③の「凝固したものを溶かすことによって再び流れさせるようにする作用」はケガをした後の血流の修復作用として重要です。血栓ができたままでは血流が停止しているか、あるいは緩慢な状態となっているわけですから、ケガの跡を一生引きずって生きていくことになり、至って不自由です。ですから、再生できる箇所は再生させて再利用することが重要で、そのためには一旦止血のために作られた血栓を溶かし、破損した細胞は新しい細胞に置き換えることが必要です。この血栓を溶かす反応系を線溶（線維素溶解現象）系と称しています。なお、血管内皮細胞系については近年になって注目されてきた研究テーマであり、未解明の部分が多くあります。

血液の液状維持と血液凝固、つまり血栓形成の

両者の関係は、大きな車輪（凝固させる性質）が、

小さな車輪止め（凝固を制御する作用）で固定され

ている状況を想像してください。大きな車輪は一旦

動きはじめると大きなパワーを発揮しますが、通常

の状態では小さな車輪止めによって動き出さない

よう固定されています。小さな車輪止めは車輪に

応じて色々な形・大きさがあって、また、一見、ヘン

テコなものでも、ちゃ～んとその役目を果たす…そんなものもあります。また、多少車輪が動いても踏み越えることはなく、最終的には定常状態に戻る、そのような関係です。小さなものが大きなパワーを制御する……これが日常、生体内で起こっている現象で、凝固に限らずいろいろな箇所に共通する様態です。

これらの「凝固する性質」と、「凝固を制御する作用」は、相反する作用ですが、我々の身体はこれらのバランスの上に生命が維持されています。この相反する作用は相互にその能力を発揮することで、①必要な位置で、②必要な量の制御を、③直ちに実行する能力が発揮されます。もしこのバランスが崩れると出血や血栓を生じ、各種の疾患を生じることになります。

しかしながら、微妙に制御されてきたバランスもやがて破綻する時＝「死」が来ます。例えば、高齢になるに従い血管系がもろく・狭くなったり、フィブリノーゲン量が増加する、PTの高活性が起こり、身体は「死」に向かった準備を始めます。この破綻＝死は、あらかじめプログラミングされたもので、生物である以上避けては通れません。日本における死亡原因の第一位はガンであり、二位および三位は心疾患・脳疾患ですが、これら疾患の最後は血管系でのバランスの破綻であり、出血ないしは血栓による「死」です。つまり、大半の病気は最終的に凝固系の破綻であり、重症であれば生命そのものを左右する危険性を孕んでいます。故に、臨床上の治療においては「出血を起こさせず、且つ、血栓も生じさせない状態を維持する」ことが非常に重要な課題となります。これは凝固系が生体系全体に関わる問題であるがために、どの診療科においても留意しておかねばならない重要な課題です。この意味で凝固系での臨床検査は重要な意味をもっています。

設問（１）： 線溶制御系の減少（α2－ＰＩなど）は血液を流れさせる作用に分類されるか？

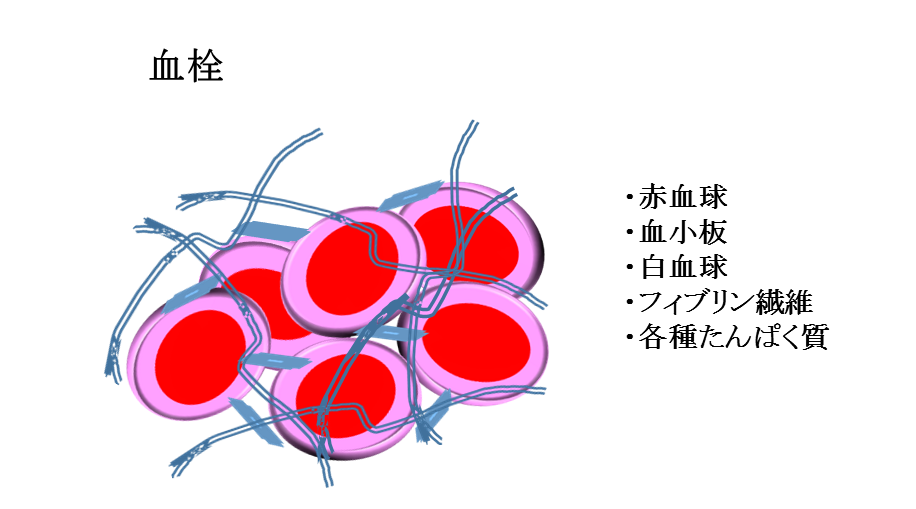
Yes or No

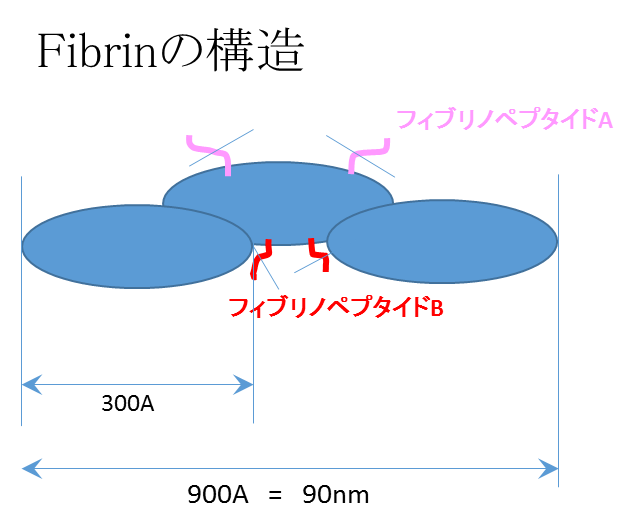
設問（２）： 凝固反応で最終的に産生される酵素はトロンビンである、 か？

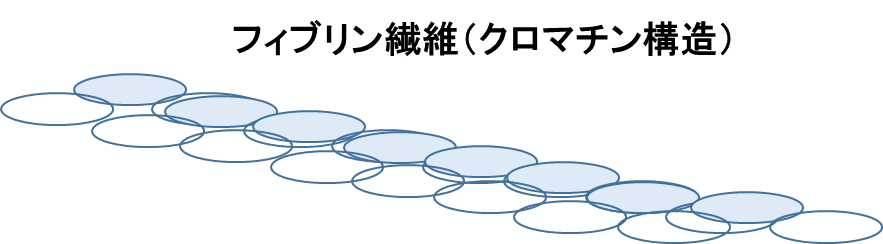
Yes or No

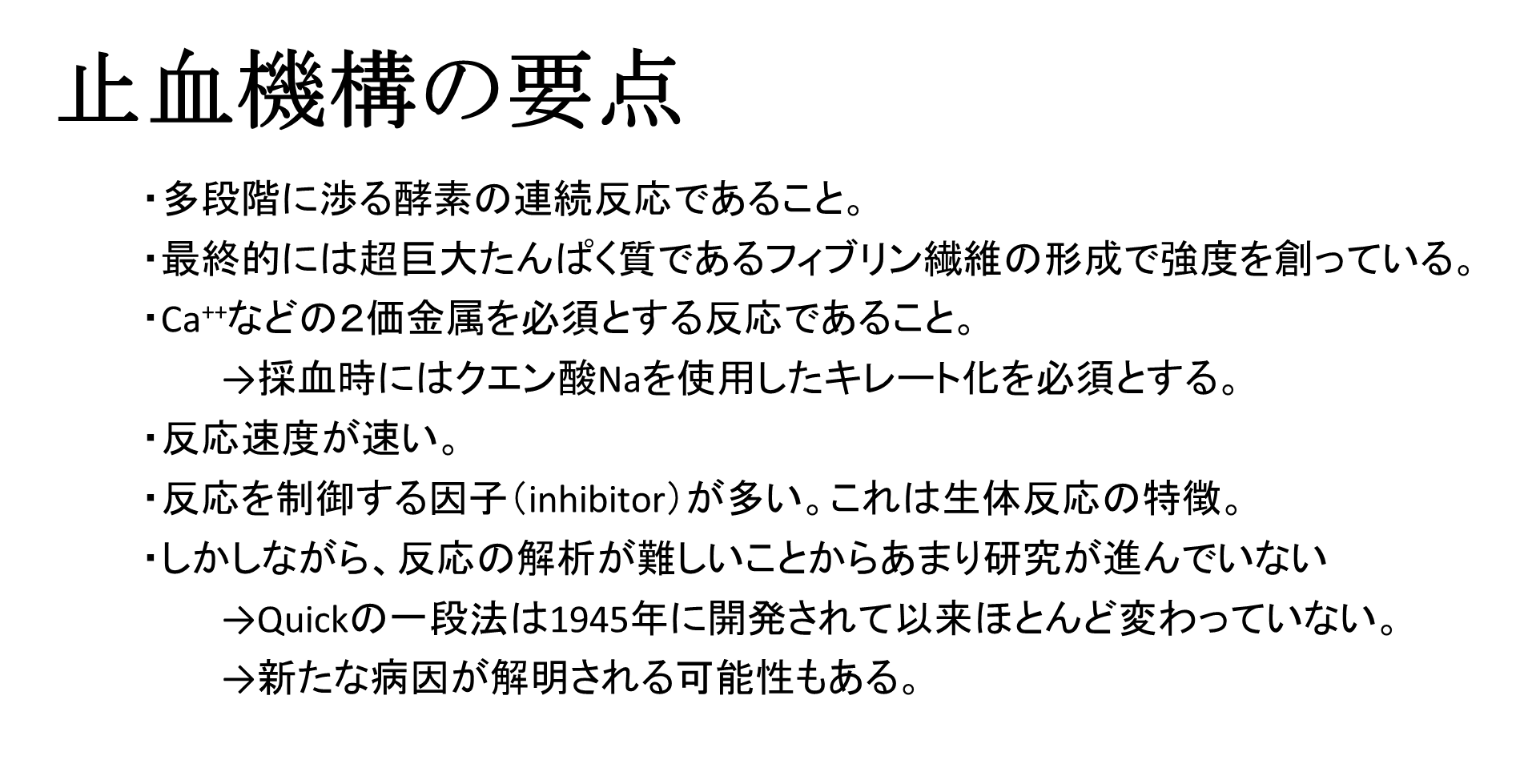
設問（３）： 血小板系は凝固系とは無関係である、 か？

Yes or No









**１．　血栓形成の概要**

**Ｂ．止血研究の流れ**

**Ｂ－１　はじめに**

血液凝固分野の研究は、まず、「血液が何故固まるのか」ということを研究することから始まりました。これは、血管内にある血液は固まらないのに対して血管外に流れ出た血液は自然に固まること、出血が多い場合には死に至る（失血死）重大な問題であること、………などが、「血液がなぜ固まるか」という課題を産み、研究の出発点となりました。この問題は血液が固まる反応経路の解明なしには理由付けができませんから、研究テーマとしても適していたと考えられます。ともかくこの「血液が何故固まるのか」という研究は1950年代に急速に進み、1960年初頭には現在の凝固反応のカスケードが確立されました。そのため、今日では凝固を勉強するとなると、まずこの偉大な成果であるカスケードを覚えると言うことが先決です。 （⇒別途後述してあります）

一方、「血液が固まらない」ことに対する研究は、近年になって（あるいは最近になって）活発になってきたテーマです。血液が固まることの詳細が解明されれば、その制御の仕組みも理解されるようになります。この方面の研究は現在進行中であり、いろいろの成果が得られていますが、その代表的なものは抗血栓薬剤の開発です。また、現在、生体内において各機序の活性化状態あるいは反応の進行レベルを知ることが重要視されています。この対象となる物質を総称して分子マーカーといい、別表の如く多くの種類があります。これらは特に血栓症（ＤＩＣを含む）の病態解析には必須の検査となります。（←詳しい事は上級編で説明したいと思います）

いずれにしても、両方から研究されてきた結果、血液凝固は基本的には次の４つの生体機序が深く関わっており、それぞれの機序は、その機能の発現状況によっては止血にも血栓形成にも作用します。

①　血管系

血液自体は常に「固まる」性質を有するため、正常な場合には「固まる」性質を抑制し、「常に流れる」作用が血管壁＝血管内皮細胞によってコントロールされている。現在判っている代表的なものはＴＭ（トロンボモジュリン）、あるいはＨcⅡ（ヘパリンコファクターⅡ）がある。血管狭窄は血栓形成の一因になる。

②　血小板系

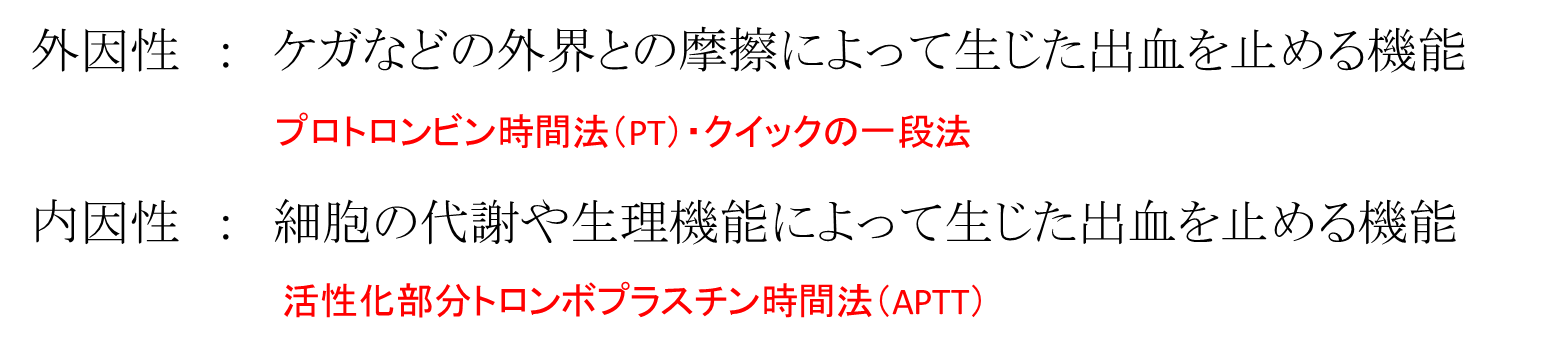
血小板は異物面に対して粘着し、変形、凝集という機能を発現させる。さらに凝集した血小板は内部物質を放出し、さらなる血小板凝集を引き起こす。これにより一次止血は完成する。ただ、この血栓（白色血栓または血小板血栓という）では物理的に強度が弱いため、重症な血管の破断の場合には凝固系の発動が不可欠となる。

③　凝固系

凝固系は内因系と外因系に大別され、内因系では凝固第ⅩⅡ因子の活性化が凝固の開始であり、外因系では組織因子の血液（血漿）混入が凝固開始の引き金となる。凝固の反応系は最終生成プロテアーゼとしてトロンビンを産生させ、トロンビンはその基質（Substrate）であるフィブリノーゲンをフィブリンに転化させ、これが血栓形成の主材料となる。

④　線溶系

プラスミンというプロテアーゼによって引き起こされる現象で、血液凝固反応で産生されたフィブリンを分解してＦＤＰを産生させる。このプラスミンは凝固第Ⅰ、（Ⅱ）、Ⅴ、Ⅷ、ⅩⅢ因子も分解することができる。血栓が形成された後、血管内皮細胞から増殖の信号（t-PA）が出されると、血栓内に混入したプラスミンが血栓を溶解し、修復がなされる。



Ｂ－１　はじめに　（つづき）

1935年当時、一般的に理解されていた凝固反応系は極めて単純なもので（図１．）、トロンボキナーゼと称する物質が酵素前駆体であるプロトロンビン（凝固第Ⅱ因子）を活性化酵素であるトロンビンに転化させる。さらにトロンビンはフィブリノーゲン（凝固第Ⅰ因子）をフィブリンに変えることによって、クロット（Clot）が形成されると考えられていました。ゆえに、プロトロンビン時間測定とは簡易的なプロトロンビン測定法として提唱されました。 Ａ．Ｊ．Ｑuickは提唱後、１段法によるＰＴ測定が凝固能を反映するか否かについて心配しましたけれども、幸いなことにＰＴ測定は、後の研究でWater　Flowの凝固反応系が確立されて行く時点で、外因系を反映することが確認され、ＰＴ測定は血液凝固系の主要な検査項目として世界的に広く普及するようになりました。その後の研究で解明されたWater　Flowの凝固反応系は、基本的に２つの経路から成っていることがわかりました。大体、発見された順番に凝固因子として番号が付けられて呼ばれています。ただ、番号が付けられた後、活性化第Ⅴ因子と同一因子であったことから、第Ⅵ因子は欠番となっています。

雑学2） ： フィブリン＝Fibrinの語源はFiber（ﾌｧｲﾊﾞｰ、つまり、繊維）に由来します。日本語では繊維素と称されます。

Fibrinogenは、その前駆体と言う意味です。

雑学3） ： Ｔｈｒｏｍｂｏ･･･と言う言葉が凝固分野ではしばしば使われますが、その意味は「止血」と言う意味です。

止血の代表は「トロンビン」であり、それに抗するものがアンチトロンビン＝Antithrombinですので、この２つの

用語を覚えると理解しやすくなります。ちなみに、線溶系ではプラスミン＝Plasminを覚えて置くと便利です。

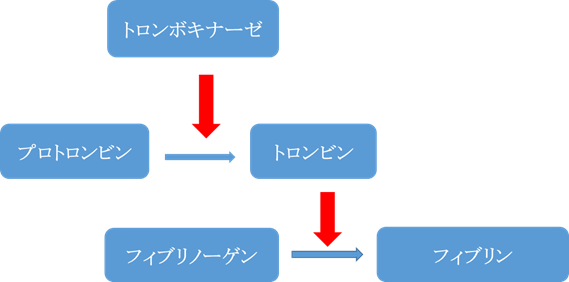


　　　　　　　　　　　　　　　　　図１．Ｍｏｒａｗｉｔｚの古典的凝血学説

Ｂ-２ 外因系

凝固反応系の１つは、外因系と言われる反応経路で、これは組織因子を出発点として凝固が起こる経路で、非常に強力な凝固力を持つ系です。

その反応系を簡単に述べますと、

1. 注射針を刺したとき、血管組織・細胞に一部が壊れ、細胞内部にあった組織片が表面露出し、血液と接触するようになります。この組織片のことを組織因子ＴＦ（第Ⅲ因子またはＦ.Ⅲ）と言います。
2. Ｆ.Ⅲは、血液中に混在している第Ⅶ因子（Ｆ．Ⅶ）を活性化します。

血液中のＦ.Ⅶは通常は何もしないただの蛋白質なのですが、Ｆ.Ⅲによって鞘から出され、むき出しのナイフとなります。これをＦ.Ⅶと区別する意味でＦ.Ⅶaと書きます。

③ Ｆ.Ⅶaは、血液中に混在している第Ⅹ因子（Ｆ．Ⅹ）を活性化します。

Ｆ.Ⅹはこれもまた、血液中では通常は何もしないただの蛋白質なのですが、Ｆ.Ⅶaによって鞘から出され、むき出しのナイフ（Ｆ.Ⅹa）となります。

④ Ｆ.Ⅹaはリン脂質上で血液中の第Ⅴ因子と合体して、稼動し始め、プロトロンビン（Ｆ.Ⅱ）をトロンビン（Ｆ.Ⅱａ）にします。

⑤ トロンビンは強力な酵素で、フィブリノーゲン（Ｆ.Ⅰ）をフィブリン（Fibrin）に変えて行きます。

⑥ フィブリンは凝固塊を形成し、止血します。

つまり、Ｆ.Ⅲ→Ｆ．Ⅶ→Ｆ.Ⅹ→Ｆ.Ⅴ→Ｆ.Ⅱ→Ｆ.Ⅰ となる訳で、（３→７→10→５→２→１） です。

メインは７→10→５→２です。また、ＰＴで測定される系ですから、

“ ＰＴは７５人力” と覚えると、簡単に覚えられます。



Ｂ-3内因系

凝固反応系のもう１つは、内因系と言われる反応経路で、これは第ⅩⅡ因子（接触因子）を出発点として凝固が起こる経路で、かなり弱い凝固系です。

① 血液中に存在する第ⅩⅡ因子は、負荷電性の物質面に接触することにより活性化されます。

（Ｆ．ⅩⅡａ）

② Ｆ．ⅩⅡａは、同じく血液中に存在する第ⅩⅠ因子を活性化します。（Ｆ．ⅩⅠａ）

③ Ｆ．ⅩⅠaは、血液中に混在している第Ⅸ因子を活性化します。（Ｆ．Ⅸａ）

④ Ｆ．Ⅸaはリン脂質上で血液中の第Ⅷ因子と合体して、稼動し始め、Ｆ．ⅩをＦ．Ⅹaに変えます。

⑤ Ｆ．Ⅹaはリン脂質上で血液中のＦ.Ⅴと合体して、稼動し始め、プロトロンビン（Ｆ.Ⅱ）を

トロンビン（Ｆ．Ⅱａ）にします。

⑥ トロンビンは強力な酵素で、フィブリノーゲン（Ｆ.Ⅰ）をフィブリン（Fibrin）に変えて行きます。

⑦ フィブリンは凝固塊を形成し、止血します。

つまり、接触因子→Ｆ．ⅩⅡ→Ｆ.ⅩⅠ→Ｆ.Ⅸ→Ｆ.Ⅷ→Ｆ.Ⅹ→Ｆ.Ⅴ→Ｆ.Ⅱ→Ｆ.Ⅰ となる訳で、

（12→11→9→８→10→５→２→１） です。 メインは12→11→9→８→10→５→２です。また、ＡＰＴＴで測定される系ですから、

“ ＡＰＴＴは喰う奴、１５人宣言” と覚えると、簡単に覚えられます。

\*宣言は繊維素源＝フィブリノーゲンのシャレ

“ ＰＴは７５人力” で覚えるか、“ ＡＰＴＴは喰う奴、１５人宣言” と覚えるかは、自由ですが、どちらか一方を覚えてしまうと、結果として両方が判るようになりますから、どちらか好きな方を（あるいは簡単に覚えられる方）を覚えてしまいましょう。

雑学4） ： 凝固分野では血友病という名の病気がありますが、Ｆ．Ⅷ欠乏は血友病Ａ、Ｆ．Ⅸ欠乏は血友病Ｂ、Ｆ．ⅩⅠ欠乏は血友病Ｃ、Ｆ．Ⅴ欠乏はパラ血友病、フォンウィルブランド因子欠乏は血管性血友病といいます。

雑学5） ： F.ⅩⅡ因子はHageman因子とも呼ばれます。アメリカの医者が血友病以外にＡＰＴＴ延長を示す患者がいることを発見して、患者の名前から付けられました。他の因子でも患者名や発見者名から付けた名で呼ぶこともあります。一時期、Ｆ．ⅩⅡ因子欠乏血漿はこれらの因子欠損患者の血漿を使用していた時期もあり、診断にはとても貴重なものでした。

閑話休題 ：尚、Hageman氏は鉄道員でしたが、日常生活では出血傾向を示すことはなく、むしろ血栓傾向だったようです。事故（ケガ）で亡くなったようです。蛇足ですが、Hageman氏がハゲていたかどうかは不明です。調べたい方はどうぞ！。

設問（６）：機器での測定においてＰＴ＆ ＡＰＴＴが測定される方法として散乱光法が最も多い、か？

Yes or No

設問（７）： ＰＴ＆ＡＰＴＴの反応にはカルシウムは不可欠である、 か？

Yes or No

Ｂ-4凝固抑制系

凝固系を抑制する物質の中で重要なもののひとつにトロンビンを不活化するアンチトロンビン＝AntiThrombinがあります。古くは、ＢｉｇｇｓによりⅠ型～Ⅳ型に分類されていました。その中で最も強力な物質がＡＴ－Ⅲと称される蛋白質で、これは、ヘパリンあるいはヘパリン様物質として総称される類似の構造物質と結合することにより、トロンビンと結合してその活性を抑制する他、Ｆ．ⅩaやＦ．Ⅶa、Ｆ．Ⅸaにも抑制作用を示します。

また、ＡＰＣ（活性化プロテインＣ）と呼ばれるものもあって、これは第Ⅷ因子や第Ⅴ因子を分解する作用を持ちます。ＡＰＣができる機序はやや複雑です。血管内皮細胞の表面にあるトロンボモジュリン（＝ＴＭ）にトロンビンが結合すると、このトロンビンは第Ⅰ因子、第ⅩⅢ因子とは反応せず、唯一血液中の蛋白質であるプロテインＣを活性化するようになり、その結果、できた物質がＡＰＣ＝活性化プロテインＣです。これはプロテインＳと共同して第Ⅴ因子、第Ⅷ因子の分解作用を発揮します。

ともかくも、アンチトロンビンとＡＰＣは補完し合う形で凝固系全部の酵素を抑制すると考えて良いでしょう。

設問（8）： 凝固検査の測定では、抗凝固剤として109ｍＭクエン酸ナトリウムが使用される、か？

Yes or No

設問（9）： Ｂｉｇｇｓの分類ではＡＴ－ⅠはＦｎ、Ｆｂｇである、 か？

Yes or No

設問（10）： ＦｐＡ orＦｐＢは分子マーカーと呼ばれる、 か？

Yes or No

Ｂ-5安定化フィブリン

トロンビンの作用により生成したフィブリンは、個々の場合、フィブリンモノマーと呼ばれ、この状態では止血する能力を持ちません。フィブリンモノマーが糸状のフィブリンポリマーになることによって初めて糸状＝繊維状になり、止血の効果が現れます。in vivo（体内）ではモノマーがポリマー化する反応は自然におこなわれますが、より安定化するためにはＦ.ⅩⅢと言う因子が関与します。これにより生じた

Ｂ-6線溶系・線溶抑制系

線溶系は一旦生成したフィブリンを溶解する系です。 機序としては、

1. フィブリン繊維が形成される時に、フィブリン繊維に吸着される形でトロンビンと共に巻き込まれます。

② 一旦フィブリン繊維に取り込まれたトロンビンが遊離し、血管内皮細胞を刺激します。

1. 血管内皮細胞はプラスミンアクチベーター（ｔ－ＰＡ）を放出します。
2. フィブリン繊維にあったプラスミノーゲン（ＰＬＧ）はｔ―ＰＡの作用により活性化され、プラスミン（＝ Plasmin）となります。 \*in vitroではｔ―ＰＡの代わりにストレプトキナーゼやウロキナーゼを使用します。

⑤ プラスミンはフィブリンを切断し、ＦＤＰを生成します。

⑥ さらに反応が進むと、ＦＤＰは細かく分解し、D-Dダイマーを生成します。

プラスミンを抑制する物質（Plasmin Inhibiter）としては多数ありますが、その内、α２－ＰＩと呼ばれるものが作用的に最も強い効果を発揮します。







**Ｃ．凝固検査の歴史**

凝固検査の歴史は古代ギリシャ時代に溯るとか、あるいはイスラエルでは割礼で出血した子供の第二子は割礼しなくとも良いと言う習慣があった、とか、いろいろと言われますが、出血した血が止まるかどうかについては生死に関わる問題として昔から注目されていたと思われます。我々が着目すべきは、近代的な凝固検査が始まった後の歴史で、それは1912年に始まるDukeの出血時間の測定や1913年Lee Whiteの全血凝固時間などの、生物学的な現象反応をそのまま利用した測定方法です。これらは現在でも教科書に記載されており、また実際に測定を行なっている施設もあります。しかし、精度の高い凝固検査としては、1935年にＡ．Ｊ．Ｑuickが１段法によるプロトロンビン時間測定方法を考案したことに始まると考えられます。

その後、1953年にLangdellによってＰＴＴ測定が開発され、1961年にProcterによってＡＰＴＴが開発されました。トロンボテスト（ＴＴＯ）は1959年にノルウェーのOwrenによって抗血栓薬剤（ワーファリン）治療のコントロール検査法として開発されましたが、ＰＩＶＫＡの影響を受けることや血友病ＢＭでは延長成績となることから、1969年にノルモテスト（日本名ヘパプラスチンテスト、HpT）として改良されました。

また、合成基質試薬は1972年にBrombechによって開発され、進歩的な試薬として世の注目を受けました。



設問（４）： ＡＰＴＴ試薬はＰＴＴ試薬の改良タイプである、か？

Yes or No

設問（５）： 合成基質とは、酵素が反応する基質に発色剤を結合させたものである、 か？

Yes or No

雑学１） ： Ｂｉｇｇｓは後にＩＮＲ研究において活躍した人物です。　Ｂｉｇｇｓ＆ＤｅｎｓｏｎはＩＮＲ計算方法を提案したとされ、また、第一回目の国際標準品を調製したとされています。なお、ＴＴＯ・ＨＰＴ試薬はＤｅｎｓｏｎの設立した会社からＯＥＭ供給されています。



**２．商品知識**

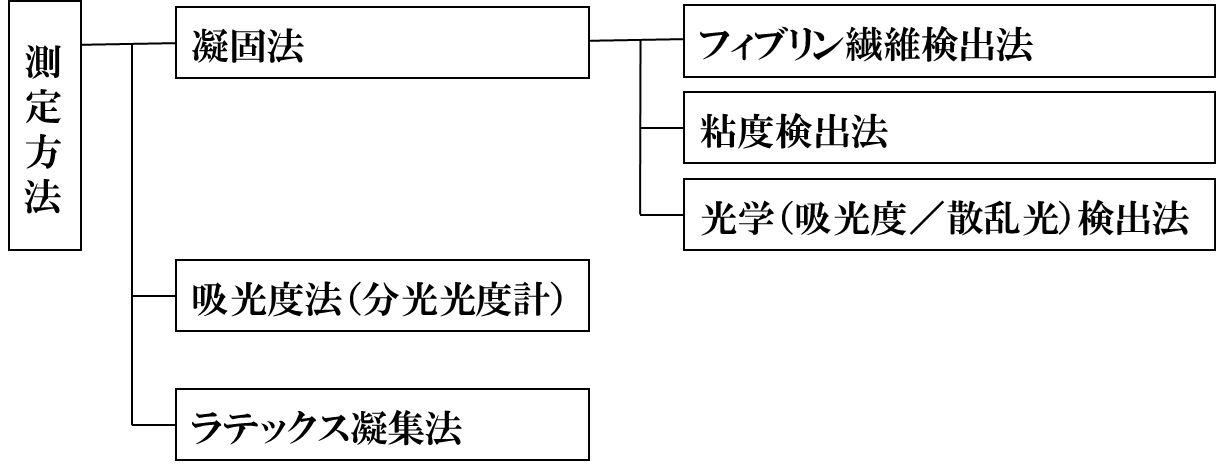
**２－Ａ．測定方法**

2-A-1総括

　　臨床検査測定は検体・試薬・機器の３要素から成る。検査での試薬と機器の関係は車の両輪に当たり、両者が正常に機能しなければ正しい結果は得られません。試薬と機器はそれぞれに進展して来ましたが、共に影響しあって、臨床状態をより正確に、且つ、より迅速に把握するように発達してきています。

　　血液凝固の検査は血液が固まる現象を検査するのが目的であるために、検査法は凝固する事を中心に組み立てられてきました。血液が凝固する現象は単に流動性がなくなる＝Clotを形成する＝だけではなく、白濁する＝吸光度の低下や散乱光の上昇＝でもあります。また撹拌条件下で凝固すると渦巻きの中心部にフィブリン繊維が形成されますので、これらを検出することによっても凝固能を検出できることになります。従って、凝固能の検査は原理的に①フィブリン繊維検出法、②粘張度検出法、③光学的検出法の３法で実施されてきました。これらの検出法で機器が構成され、各種の機器が開発＆販売されてきました。

　　しかし、一方で、より特異的に検出する、より早く・より精密に検出する、あるいはより微量な物質を検出する、と言った特徴で他社に先んじて営業するための「工夫」を凝らした結果、いろいろの試薬が発売されてきました。合成基質法の試薬や、ラテックス試薬がそれに相当します。試薬の開発に伴い、各種の検出方法が適用されようになりましたけれども、ＩＲＡ等の測定方法は淘汰され、最終的に測定方法は、吸光度度法、ラテックス凝集法などに収斂されました。



2-A-2凝固法

　　凝固法はフィブリンが塊となった状態＝つまり、クロット（Ｃlot）形成を検出する方法です。凝固反応は下図のようなＡ部分・Ｂ部分・Ｃ部分から成る凝固曲線を示しますが、下図のＡの部分はClotが形成されるまでの準備時間であり、例えばＰＴ測定ではⅦ因子の活性化に始まってトロンビンができ、フィブリンモノマーが形成されるまでの反応系に相当します。Ｂ部分はこれに続くClot形成部分であり、フィブリンポリマーが増加していく段階です。下図のＣ部分はフィブリンポリマー形成反応が収束する部分に当たります。

**散**

**乱**

**光**

**量**

**時間**

A

B

C

雑学6） ： Clotはトロンビンによりフィブリノーゲン（Fbg）がフィブリン（フィブリンモノマー＝ＦＭ）に転化するだけで起こるのではなく、一旦生成したＦＭ（フィブリンモノマー）が重合することによってフィブリンポリマーになり、このことに依って初めて検出されるようなフィブリン塊＝Clotとなります。当社ＣＡシリーズでのフィブリンポリマーの検出は、フィブリンモノマーが３個以上結合した大きさで検出できるようになるのではないかと考えられています。

　　　　　Clotを形成させて凝固能を測定する項目としては、いづれも凝固測定のメインとなる項目です。

　　　　　以下の測定項目が挙げられます。

　　　　　　　①ＰＴ、ＡＰＴＴ、Ｆbg………　ほとんどClot法で測定されている。

　　　　　　　②ＴＴＯ、ＨｐＴ……………・　Clot法のみ

　　　　　　　③ＡＴ－Ⅲ…………………　一部の他社試薬

　　　　　　　④プロテインＣ、Ｓ…………　一部の他社試薬

　⑤その他

　　検出に使用される機器の原理はClotを形成時に①流動性がなくなる点②白濁する点③フィブリン繊維が析出する点、これらのことを利用して検出する方法が採られ、①フィブリン繊維検出法、②粘張度検出法、③光学的検出法、のいづれかに分類されることになります。

①フィブリン繊維検出法では、スターラーで撹拌し、渦の中心部にフィブリン繊維を集め、これを検出する方法です。現在ではこの方法での検出機はほとんどありません。

②粘張度検出法は機械の種類の多い方法で、回転タイプ、横揺れタイプ、縦揺れタイプに分類されます。

③光学的検出法は自動化された機器に多い検出方法で、透過光方式と散乱光方式に分類されます。各社の機器毎に光情報の解析方法が異なります。当社ＣＡシリーズは散乱光方式です。

雑学7） ： 凝固法の検出はマニュアル法が基本です。現在でも臨床病理学会の認定試験の一部（検査技師の試験）に試験管傾斜法で凝固時間を調べる方法が残っています。これに合格すると技師の給料が上がる病院もあります。が、現在、実際の臨床検査現場ではマニュアルで測定する事はほとんど無いのが実状です。

2-A-3吸光度法

　　分光光度計による吸光度測定です。

　　ある一定量の光が測定試料に照射され、透過してきた光の量を測定する方法です。試料の濁りや着色の程度により透過する光の量が変わりますから、透過した光の量を測定することによって、試料中の濁りや着色の程度を数値化できることを原理としています。一般的に試料中の濁りと、透過する光の量は対数関係にありますので、ＯＤ＝1.0は照射光量の１／10、ＯＤ＝2.0は１／100と言う関係になります。従って、透明な部分での光量変化はＯＤで表示される数値に現れにくく、逆に濁度の高い部分での光量の変化量は極めて少なくとも数値的には変動が大きく、例えばＯＤ＝3.0とＯＤ＝4.0での光量の差は0.001－0.0001＝0.0009となる性質があります。

　　また、光は360nm以下を紫外領域、360nm～800nmを可視領域、800nm以上赤外領域と呼び、色（波長）を区別しています。吸光度度測定では光の波長を選択して使用できることが特徴です。一般的には可視領域（360nm～800nm）での測定が汎用されています。

雑学8） ： 紫外領域（360nm）での測定にはプラスチックセルは使用せず、石英セルを使用します。理由はプラスチックに含まれる不純物やセル板の平行性のために、結果が安定しないことによります。

　　赤外領域は吸光度変化が少ない為にあまり使用されません。可視領域では人間の目で結果を確認できますし、吸光度変化も大きいので良く使用されます。

吸光度で凝固能を測定する項目としては、合成基質を用いる項目がメインです。以下の項目が挙げられます。

　　　　　　　①ＡＴ－Ⅲ、ＰＬＧ、ＡＰＬ（α2－ＰＩ）………　ほとんど合成基質法405nmで測定されている。

　　　　　　　②プロテインＣ（ＰＣ）………………………　合成基質法

　　　　　　　③ＦⅩⅢ……………………………………　ＮＡＤＨ（340nm）

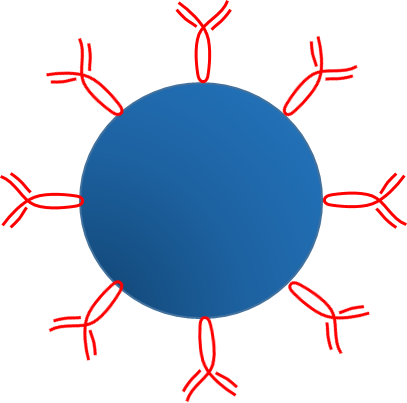
　　　　　　　④ＦⅧ・ＦⅨ…………………………………　合成基質法（国内では販売していない）

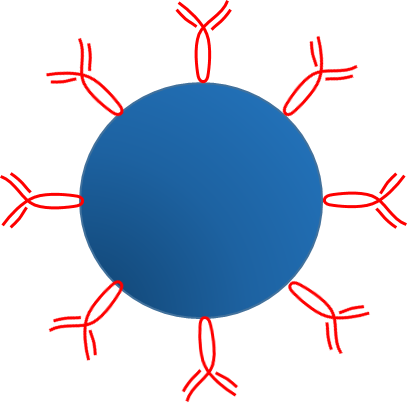
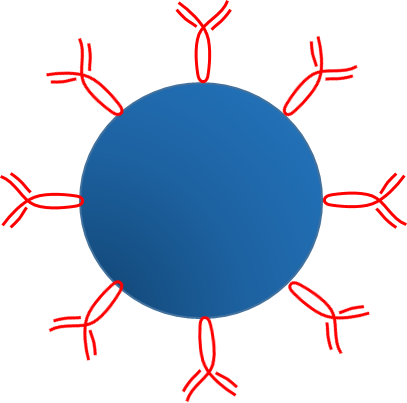
2-A-4ラテックス凝集法

　　ポリスチレン（ＰＳ）製のラテックス粒子表面に抗体を結合させた試薬を用いて、血漿（または血清）に含まれる抗原物質を反応させたとき、ラテックス粒子が凝集し、結果として透過光の変化が生じます。これを検出する方法がラテックス凝集法です。ラテックス粒子はすべての光を反射します（下図参照）ので、特定の波長領域にこだわる必要はありませんが、一般的には吸光度法と同じ分光光度計を使用して、500nm～900nmで測定します。ラテックス凝集法で凝固能を測定する項目としては、以下の項目が挙げられます。

1. ＦＤＰ、ＦＤＰ－Ｅ、D-Dダイマー………　ＬＰＩＡなど

② ＦⅩⅢ、その他…･･･････････････････・





雑学9） ： ラテックス凝集を580nm～800nmで測定する方法について、1997年11月まで三菱化学㈱が特許を取得していました。このため、他社は特許使用料を払うか、あるいはそれ以外の波長で測定するかの選択しかなく、一方、三菱化学㈱－ダイアヤトロン㈱はこの特許により、他社を牽制すると共に、な利益を確保しました。

**２－Ｂ．凝固測定機器**

2-B-1機器の種類・分類

　　検出に使用される機器は①フィブリン繊維検出法、②粘張度検出法、③光学的検出法、のいづれかに分類されます。

①フィブリン繊維検出法は、容器（試験管）の中に血液を入れ、そして凝固試薬を入れます。これを撹拌していくと、凝固するに伴い、渦巻きの中心部にフィブリン繊維が形成されます。これを検出する方式です。

フィブロメーターと言う機械では約0.4間隔で針が上下することによって、フィブリン繊維の形成の有無を判定する方式を採っていました。

　　フィブリン繊維　　　　　　　　　通電　　　　　上下

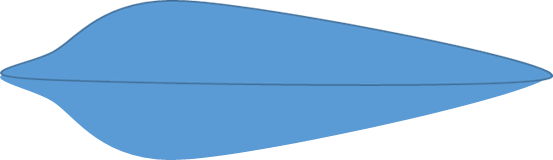
またフィブリンタイマーと言う機械では撹拌中心に光を当て、フィブリン繊維による光のゆらぎを捉えることで凝固点を検出していました。しかしながら、現在これらの方法は販売されておりません。希少価値があります。

②粘張度検出法は回転タイプ、横揺れタイプ、縦揺れタイプに分類されます。　　ｽﾀｰﾗｰ回転タイプで有名な機器はＫＣシリーズ（アメルング社：ドイツ、国内ではＭＣメディカル㈱が取り扱っている）があります。キュベットを少し傾けた状態で回転させ、磁石でスチィールボールを引っ張ります。凝固が起こるとスチィールボールはキュベットと共に回転するようになり、この磁石からハズレタ時間を凝固時間とします。ＫＣは半自動機器としては全世界的に広まりました。しかし、全自動KC-40はほとんど売れていません。

磁石・回転・他にＢＦＴ－Ⅱもこの回転タイプの形式に分類されます。

　横揺れタイプで有名な機器はＳＴＡです。スチールボールが左右に動きClotしたら磁石からハズレます。これで凝固時間を検出します。スチールボールを横ゆれさせるタイプはゆっくり動かして、揺れの振幅から凝固時間を算出しますので、上記と同様に磁石からハズレタところを見るか、より微少な凝固時間を見るためには振幅を計算して凝固時間を算出する機構を設けるなどの工夫が必要になります。これに対して、プラスチックの羽を細かく振動させてＣｌｏｔの形成により振動が止まるのを検出する機器（フィブリンタイマー）もあります。

　また、トロンボエラストグラフもこのタイプに分類されるかも知れません。



　　縦揺れタイプで有名な機器はクロテックで、試験管の中央にスチールボールを磁石で固定し、Clot形成によりスチールボールが試験管の上下運動と共に動き出すのを検出します。

　　　　　広義にはドライケミ試薬（和光純薬㈱が発売）であるＣＧ０１用の検出も磁性粒子の縦動きを検出しているのでこの方法に分類できるかも知れない。

③光学的検出法

　この検出に使用される機器は①透過光検出法、か、②散乱光検出法、のいづれかに分類されます。いづれの検出方式においても基礎となるデータは光量としての情報であり、同質です。一般的に0.1秒間隔で凝固過程での光量変動を検知し、その情報をコンピュータ処理して、凝固時間を算出します。また、光学的検出法は自動化された機器に多く採用されていますが、機器毎の特徴や差は、もちろん、その機器の処理能力や機能により違いがありますが、こと、凝固時間を算出する点ではそれぞれに異なった計算方式が採用されていますので、ここに特徴です。

　凝固時間の最も簡単な方法は、ある一定レベルの光量変化のあった点を凝固時間として算出する方法です。この方法では、項目毎に未反応レベルからある一定レベル（スレッシュホールドレベル）を設定しておきます。凝固反応によって光量変化が生じると、その光変化があった点（スレッシュホールドレベル）の凝固曲線から凝固時間として算出します。考え方としては粘張度検出法に近いですが、検体試料中のフィブリノーゲンの量によって凝固時間が異なってくる性質があります。また、一般的に低フィブリノゲン検体の測定不良が多い傾向があります。

　　機器としては、ＢＣＴ・ＢＣＳ等がこれに該当します。　（下図中のＡ）

　凝固曲線を微分、または二重微分すると、下図ＢまたはＣ図に示すような赤線が作成できます。一次微分の場合はＢ点が、二次微分の場合にはＣ点が凝固時間として算出されます。この算出方法では、凝固時間が短く表示される性質があること、また凝固曲線が正しく測定できた場合は良いですが、異常な検体の場合には再現性がない場合があります。この方式が採用されている機械としてはＡＣＬシリーズが挙げられます。（但しACLは透過光方式）

　凝固曲線の解析をさらに難しくした方法として、Coagrexタイプがあります。下図Ｄを参照。

　この方式では、凝固曲線の中央部分に直線領域があり、この中点をとることで凝固時間が算出できると言う考え方に立って凝固曲線を解析しています。当社ＣＡでの50％検出点に近い性質がありますが、検体によっては直線部分が見つかりにくいことがあり、このために測定エラーを発生する場合があります。

　ＣＡシリーズは０～100％検出法を採用していますが、これについては次章で詳しく述べます。（下図Ｅを参照）

雑学10） ： 凝固の測定方法や演算方法には上記に示した方法以外にも各種の方法があります。一度、どんなものがあるか調べてみてはいかがでしょうか？　　　　一方、まだまだ有用な測定方法や演算方法があると思われます。これに挑戦して特許をＧｅｔしてみてはいかがでしょうか？。

設問（11）：光学測定機器で多い波長は６６０ｎｍの散乱光、か？

Yes or No

**２－Ｃ．凝固試薬・血漿**

2-C-1試薬商品

　　　　　例えばＰＴ試薬では下表のような製品が販売されています。

　　　　ＰＴ試薬のメーカーと商品名

メーカー名 商品名 特徴

デイドベーリング トロンボプラスチンCプラス

トロンボプラスチンＩＳ

トロンボレルS

ｸﾛﾓｸｲｯｸ ウサギ脳由来、ISI:1.7

ウサギ脳由来、ISI:1.0

ひと胎盤由来、ISI:1.0

合成基質法

国際試薬 トロンボチェックPT

トロンボチェックPT　プラス ウサギ脳由来、ISI:2.0

ウサギ脳由来、ISI:1.6

オルガノンテクニカ シンプラスチン

シンプラスチン　エクセル

シンプラスチン　Ｌ

シンプラスチン　オート ウサギ脳＋肺、

ウサギ脳

ウサギ脳

ウサギ脳＋肺、機械用

IL社・コールター PT／Fibrinogen

ILテスト ウサギ脳、

ウサギ脳、

ロッシュ／ＢＭＹ STA試薬シリーズPT

ネオプラスチン

ネオプラスチンプラス ウサギ脳

ウサギ脳

ウサギ脳

オーソ ﾌﾞﾚｰﾝﾄﾛﾝﾎﾞﾌﾟﾗｽﾁﾝ

リコンビプラスチン ウサギ脳

遺伝子組み換え、1.0

和光純薬工業 ＰＴテスト　ワコー ドライケミ試薬

ビオメリュー社 ヘモラブ　トロンボマット

ヘモラブ　ISIマット　１ ウサギ脳由来

ひと胎盤由来

Nycomed社　三光純薬㈱ ノコプラスチン ウサギ脳由来

2-C-２血漿商品

　　現在のところ、国際的な認証標準血漿として使用されているものは、WHOのガイドラインにしたがって作製された正常者（非喫煙者正常成人、男女２０名ずつ計４０名）新鮮プール血漿です。

　　このプール血漿に含まれる凝固因子などの生物学的活性％を１００％として（輸血などの場合、この１mL中に含まれる因子活性＝１単位）、各測定での検量線作成に用いられます。

　　標準血漿による検量線を作成し、測定値付けられた各種血漿を、リファレンス血漿として市販されている凍結乾燥血漿に置き換えるユーザも多いのですが、測定値付けに使用された機器あるいは試薬が異なれば、表記の測定値と誤差が発生するのが常です。必ずお客様自身で確認検定を実施することが重要です。

　　　(1)標準血漿

　　　　血漿の採取方法

被検試料として、クエン酸 ３Na加血漿を使用します。この血漿中に含まれる諸因子は、極めて不安定であり、活性化や、あるいは不活性化が生じますから、以下に記載する内容を厳守して検体処理を実行してください。

　　　　＜採血に関する事項＞

　　　　①採血用注射器はプラスチック製品とする。（採血はバクテーナー採血が望まれるが、シリンジ５～１０mL用で注射針は２１ゲージ(G)を使用する。）

　　　　②検体容器は目盛り付きのプラスチック試験管（１０mL用）が望ましい。ガラス試験管を使用する場合、必ずシリコン加工を施すこと。

　　　　③採血のポイントは、過度のうっ血を避け、組織液の混入のないように、必要量の静脈血を採取する。正確に、抗凝固剤１容が静脈血９容に速やかに混合されるようにする。

　　　　＜使用する抗凝固剤と血液添加量＞

　　　　①国際標準法では、クエン酸３Naとして、１０９mｍol／L水溶液を使用する。

　　　　②抗凝固剤１容に静脈血９容の混合を厳守する。

　　　　＜採血後の処置＞

採血後の血漿中の因子は不安定ですから、それ以降の作業を速やかに実行するのが望ましいのですが、測定の効率化のために、従来より本邦では冷所に保管される場合が多く見られます。しかし、本稿では、WHOのガイドラインにしたがって以下に解説します。

　　　　①採血後の検体の保存

　　　　　抗凝固処理を施した検体試験管は、F-Ⅶの cold activationの影響を避けるために室温にて保存する。

　　　　②血漿分離作業

　　　　　採血後、できるだけ速やかに遠心分離を行うのが原則である。（ＷＨＯのガイドラインでは採血後１時間以内と規定している。）遠心条件は３０００rpm・１５分で、上清乏血小板血漿を得る。なお、血小板検査で血小板浮遊血漿を得る場合には、８００～１０００rpm・５分とする。

　　　　③遠心分離後の検体処理

　　　　　遠心操作後の分離血漿は、プラスチック製ピペットを用いて別の新しいプラスチック試験管に分離分注する。そして、CO2によるｐＨ変動を避けるため、密栓状態で室温に放置し、PT測定では、４時間以内に測定を終える。APTT測定では、分離血漿を氷水中に保存し、２時間以内に測定を終える。凍結保存が必要な場合は、－７０℃以下で急速凍結を施す。

　　　　④測定までの検体保存条件

採血後の検体血漿冷所保存は、できる限り短時間とするが、少なくとも採血から検体測定までの所要時　間は６時間以内で完了するように心掛ける。これ以上に時間が延長する場合、検体血漿はできるだけ速やかに－７０℃以下で急速凍結保存とする。なお、凍結血漿の融解は37℃恒温水槽内で急速融解させ、よく混和してから使用する。凝固検査は採血後6時間以内の即日実施が原則である。６時間以上の長期冷所保存あるいは－７０℃凍結については測定値への影響は無視できない。（凝固因子活性の劣化、F-Ⅶのcold activationなど）

　　　(2)市販血漿

正常者（非喫煙者正常成人、男女２０名ずつ計４０名）新鮮プール血漿を標準血漿は、その場での使用は問題ありませんが、長期的に使用するとなると、その維持作業はとても大変です。そこ　　で標準血漿を基準として、市販血漿に値付けを実施し、これを通常の使用に適用することが有　用です。

しかしながら、値付けに用いた試薬の特性、凍結乾燥血漿に添加された安定化剤等の影響により、あるいは測定機器の種類により、微妙に値が異なってきます。つまり、組み合わせにより、微妙に結果が異なります。そのため、標準血漿で値付けした条件を保持できることを前提として、市販血漿を用いることになります。

　　　　　市販されている血漿には以下のものがあります。

メーカー名 商品名

デイドベーリング

シスメックス コアグキャルＮ、デイドトロールＰ

サイトロールレベル　１、２、３

凝固標準ヒト血漿（ＳＨＰ）

コントロールプラズマN、Ｐ

国際試薬株 コアグトロールⅠＸ、ⅡＸ

コアグトロールN、コアグトロールＰ

オルガノンテクニカ ベリハイⅠ

ベリハイリファレンス

IL社・コールター社 キャリブレーションプラズマ

ロシュ／BMY STA Precidot Ⅰ

STA Unicalibrator

STA　Barcode　Cali.

STA Neo PLUS

IMMUNO AG PTｷｬﾘﾌﾞﾚｰｼｮﾝﾌﾟﾗｽﾞﾏ

エーザイ 標準血漿正常域、異常域

オーソ社 凝固コントロールⅠ

ビオメリュー社 ユニプラズマトロールＮ

カリプラズマ

　　雑学11） ： クエン酸３ナトリウム（Tri-Soduim　Citrate、Ｃ６Ｈ５０７３Ｎａ）には、無水のものと、水を含むものがあります。

　　　　　　　　　構造式　CH2-COO-Na　　　無水塩の分子量：MW=　258.07、２水塩のMW=　294.10です。

　　　　　　　　　　　　　　　CH0H-COO-Na　　109mMを血液に１：９に混合する時の含量は、MW×0.109×0.1です。

　　　　　　　　　　　　　　　CH2-COO-Na　　　これを計算すると、294.1×0.109×0.1＝3.205ｇ／Ｌとなります。

採血管にあらかじめ入れておく場合は×0.1は不用ですから、32.05g／Ｌです。これを重量％に置き換えると、３．２％となります。

設問（12）：採血時に組織因子（ＴＦ）が混入すると凝固時間は延長する、か？

Yes or No

設問（13）：採血時、抗凝固剤１容に静脈血９容の混合比は厳守しなくとも良い、か？

Yes or No

設問（14）：現在の所、正常ひと新鮮ﾌﾟｰﾙ血漿は国際的に標準血漿と認証されている、か？

Yes or No

**３．測定手技**

**3-Ａ．正確な結果を得るために**

　　正確な結果を得るための測定手技について、５つの項目に分けて、特にその考え方を説明します。具体的な実施方法については、３－Ｂ測定手技で説明します。

3-A-１検体の調製

　　検体（試料）自体が変動すると、機器や試薬が如何に正確に調製されても正しい結果は得られません。検体の調製は結果に与える影響が大きく、正確な調製が求められます。検体を正確に調製するための例として、以下の点が挙げられます。

　　まず、正確な採血することです。つまり、針を刺した時に無用に組織を傷つけ、あるいは採血している時に針口面が血管に密着するなどのことが発生すると、血管内皮細胞からＴＦ（組織因子）が放出され、凝固活性を亢進し、短めの凝固時間を示すことになります。よって、なるべく血管を傷つけないように採血することが正確な結果を出す為の第一条件となります。また、採血に使う器具でガラス製品を使用する場合は必ずシリコン処理したものを使用する必要があります。ガラスに血漿が接触すると、ガラス表面のマイナス荷電のために凝固亢進を招きます。経時的変化に留意しておかなくてはなりません。

　　次に、抗凝固剤（クエン酸ナトリウム）と血液とが正しく混合されたものであることが必要です。真空採血管を使用する場合、通常は１：９に混合されますが、真空度が不良であったり、十分に採血される前に中断したような場合にはこの１：９のバランスが崩れ、クエン酸ナトリウムが相対的に多く含まれる血漿ができることになります。クエン酸ナトリウムは凝固試薬に含まれるカルシウムと拮抗する物質ですから、試薬中のカルシウム濃度が一定の場合には凝固時間は延長傾向を示すことになります。

　　また、血漿の遠心分離を十分に行ない、血小板の混入がないようにすることも必要です。血小板の混入はＰＴやＡＰＴＴの測定では特に問題はありませんが、他の測定項目分では、血小板が混入すると、ＰＦ３（血小板第３因子＝リン脂質）の混入のために正しい結果とならない場合があります。

　　採血後は速やかに測定することが重要ですが、測定できない場合には良好な条件下で保存しておくことが必要です。液体のまま保存する場合には冷蔵庫などの出し入れにより温度変化を与えないように心掛けると共に、炭酸ガスが放出しないよう密栓して置くことが必要です。検体の劣化は凝固時間の延長、検体ｐＨの上昇（ｐＨ８．６くらいまで）は凝固活性の短縮・その後劣化による延長を引き起こします。また、凍結する場合には、採血後速やかに凍結し、できれば－７０℃以下で保存します。保存中は冷凍庫の開閉により温度が変化する場合があるので、速やかに作業を済ませるようにします。

**3-A-２試薬の準備**

　　試薬は適正な条件下で保存されたものを使用すべきです。通常は直射日光を避け、冷暗所保存します。保存条件外の凍結・融解処理をしたもの、あるいは有効期限外のもは使用してはいけません。

　　使用に際しては、計画性を持って、必要なものを必要なだけ準備します。溶解の前には室温に戻し、正確な溶解・正確な定量に心掛けるようにします。また、試薬間の接触・コンタミに留意し、細菌汚染のないように処置することが必要です。

**3-A-3測定準備**

　　測定に際しては、検体数量を確認に、また測定に必要な試薬量が準備されているかを確認します。検体はそれ自体がＣｌｏｔしていないか、遠心分離が十分であるか、溶血などの現象がないかを確認し、もしそれらがあった場合にはどの測定項目に影響があるか、をあらかじめ予想して置きましょう。その上で機器の測定設定（項目の確認・設置場所の確認）を行ないます。また、測定結果をどのような計算をさせるのか、レポート（検査結果の報告）内容と整合性が取れているかを調べます。また、緊急性のある検体であるか、通常の測定作業として処理して良いものであるかの確認も必要です。

　一方、これらは作業のし易い場所で、自ら配置を考えて実施するようにしましょう。配置の如何で作業の正確性・能率は大きく異なります。また、作業場所の清潔性にも配慮しましょう。

**3-A-４正確度の確認**

　　機器設置時に自施設のデータの正確性の程度を把握して置きます。正常域では凝固時間は何秒程度の上下変動があり、異常域ではどのような傾向を示すのか、またそれらが精度管理等のデータにどのように表われ、許容できる範囲を設定して置きます。検査当日の精度管理等の結果が許容できるものであれば、この時点で始めて測定に着手できると考えます。

　　上記の条件に照らし合わせて、当日の検査結果に検体のデータに誤りはないか？、ミスなどが発生していないか？　…をチェックします。さらに検体や試薬の経時変化を起こしていないか、また、検体の特性（採血の状態・共存物質の有無、あるいは治療・投薬の有無・過去のデータ）によって影響を受けた結果となっていないか？、などを確認し、検査結果が妥当なものであるかどうかを判断します。必要であれば、二次検査・精密検査を実行します。

**3-A-５結果の報告**

　　検査の依頼に対して、必要な検査が正確に行なわれているかを確認します。記載ミスがあってはならないことは当たり前です。可能であれば、検査成績に対し、極力コメントを付けるようにします。

　　一方、検査を振り返り、検査が計画的に実施できたか、最小限のコストでできたか、また迅速且つ適正であったか、…などを検証してみることも必要です。改良点があれば、着手できるところから改良し、計画的に変更しなければならない箇所は検査室全体で話し合って改良するようにしましょう。

　　　　　また、検査終了後は後片付けをきちんと行ないます。検査室を「きれい」にする、また、「きれい」に保つことは感染等から自身の安全性を確保する点でも、検査の正確性を向上させる点でも重要です。検査室を「きれい」な状態にすることも忘れてはならない重要な点です。

設問（15）：凍結乾燥試薬は冷蔵のまま、冷水で溶かす方が良い、か？

Yes or No

設問（16）：可能な限り、測定データを検査前に予測しておくことは重要である、か？

Yes or No

設問（17）：検査結果にはコメントを付けてはならない、か？

Yes or No

**３．測定手技**

**3-Ｂ．測定手技**

　　凝固検査は、①検体、②機器（または手技）、③試薬、の、「たった３つの要素」で実行されますが、得られる結果は個人差が大きく且つ不安定です。しかし、これらの要素の変動を最小に抑えることにより、凝固試験成績を安定化することができますし、問題が発生した場合にはたった３つの要素しかないのですから、一つ一つの側面からアプローチしていけば解決はたやすくなります。

　　　準備

　　　　　①試験に使用する器具は清浄なものを使用する。

　　　　　②ガラス器具の使用は避ける。使用する場合でも短時間に終了するようにする。またシリコン

　　　　　　処理していない器具は使用しない。

　　　　　③定量器具（ピペット）はエッペンドルフピペットを薦める。

　　　　　　ホールピペットはトロンビン汚染の可能性が高く、且つ、操作性が良くない。

　　　　　④トロンビンに接触した器具を他の測定と混同してはならない。トロンビンと接触した可能性の

　　　　　　ある器具は廃棄する。

**3-B-１採血**

　　　　　①まず、採血時に組織トロンボプラスチンの混入がないよう慎重に採取されなければなりませ

　　　　　　ん。組織因子が混入すると外因系が活性化し、凝固時間が短くなります。

　　　　　②この時、抗凝固剤は一定の濃度のもの（3.2％or3.8％クエン酸ナトリウム）を使用し、正確

　　　　　　正確に１：９容となるよう採取します。変動の目安としては±８％。

　　　　　③採血管はシリコンコートしたガラス製試験管または樹脂製試験管を使用することが必要で

　　　　　　す。ガラスのままでは接触因子系が活性化し、凝固活性が亢進します。市販の採血管を

　　　　　　使用していてもシリコン処理が充分でないことがあり、採血したまま放置して置くと凝固す

　　　　　　る場合がありますので注意が必要です。

　　　　　④採血後においては、速やかに遠心分離し、直ちに測定に供します。遠心分離は3000rpm×

　　　　　　10～１５分間、または、3500ｒｐｍ×10分間。ＰＰＰが得られれば特に問題ありません。

　　　　　　遠心分離後はなるべくフタをとらずに置きましょう。炭酸ガスが蒸発してｐＨ上昇の原因と

　　　　　　なります。

　　　　　⑤検体（血漿）は採血後は経時的に変化するものとして扱い、直ちに測定します。測定まで

　　　　　　の目安は２時間以内です。直ちに測定ができない場合はフタをしたまま冷蔵保存します。

　　　　　⑥測定に際しては血小板の混入がないよ配慮すること、また、検体同士のコンタミに留意し、

　　　　　　測定に供する採取量は正確に定量することが必要です。

**3-B-２検体の凍結・融解**

　　　　凍結検体の保存＆溶解

　　　　　①検体血漿を凍結する際は、採血後の時間の経過していないものを凍結に使用する。

　　　　　　　時間が経過したものは劣化が進み、凍結処理により一段と劣化するため、凍結前・後のデ

　　　　　　　ータが乖離する場合がある。

　　　　　②検体の凍結は－７０℃以下でおこなう。－２０℃では劣化する。また冷凍庫の開閉により、

　　　　　　　劣化する場合があるので、注意を要する。

　　　　　④凍結時に発泡スチロールなどで覆われたものは冷却能力が悪い。これにより検体の劣化を

　　　　　　　招くので、熱が分散しやすい包装で凍結する。

　　　　　⑤凍結回数は新鮮なものでも３回が限界である。４ヶ月以上の保管は避ける。

　　　　　⑥凍結に際しては、日時・検体番号・検体の特徴・保管者・液量などを明記する。

　　　　　⑦凍結中に扉を開けっ放しにするなどして検体に温度変化を起こさせないように配慮する。

　　　　　⑧融解に際しては３７℃水槽で速やかに溶かす。

　　　　　⑨氷は80～90％溶けたら、水槽より取り出し、転倒撹拌して残りの氷を溶かすようにする。

　　　　　　　加温のし過ぎは検体の劣化を招く。

　　　　　⑩融解した検体は１時間以内に測定が終了するよう試験計画を立てる。

　　　　コントロール血漿（凍結乾燥）の溶解

　　　　　①試薬を溶解する作業の前に実施する。

　　　　　　　試薬溶解よりも後になった場合には、場所を変え、清浄な箇所でおこなう。

　　　　　②溶解液はその度新しいものを準備する。

　　　　　③ゴム栓をゆっくりとはずし、ゆるやかに溶解液を入れる。

　　　　　　　入れたらゆっくりと回転させ、約３分間静置する。

　　　　　　　その後、撹拌して完全に溶解させる。この時、残存物がないか、必ずチェックする。

　　　　　④室温に静置し、使用を待つ。加温加冷はしない。

**3-B-３試薬の溶解方法**

　　　　凍結乾燥試薬の溶解

　　　　　試薬は、指示の通り適正に準備し、且つ、使用方法・保存方法を守って使用されなければなり

　　　　　ません。そのため、まず、以下の点を確認してください。

　　　　　①まず、納入された試薬は保存温度を厳守して納品されたものであること。

　　　　　②納入後は適正な温度で保存されていること。

　　　　　　　冷蔵庫や冷凍庫の扉の開閉により、温度の変化がないように注意する必要があります。

　　　　　　　特に温度の低い冷凍庫では室温との差が100℃以上ある場合があり、また開けっ放しに

　　　　　　　しておくと結露の原因となりますから、開閉は速やかにするよう習慣化しましょう。日頃、整

　　　　　　　理・整頓しておくことも重要です。

　　　　　次に試薬溶解に際して、以下の点に留意して取り扱ってください。

　　　　　①試薬溶解に際しては、まず、室温に戻します。凝固で使用される試薬は生物製剤ですか

　　　　　　　ら、温度差のある溶解液を直ちに注ぐのではなく、充分な時間をかけて室温に戻します。

　　　　　②溶解に際しては、凝固活性能の低い試薬から順番に溶解するように順番を決めます。

　　　　　　　例えば、トロンボﾃｽﾄやヘパプラスチンテスト試薬を先に溶解し、トロンビン試薬は最後に

　　　　　　　し、しかも、他の試薬にコンタミしないよう離れた場所で溶解します。特にトロンビン試薬は

　　　　　　　凝固能に与える影響が大きいので、試薬溶解に用いた器具や容器は別々にし、混同しな

　　　　　　　いようにする必要があります。デイスポーサブル器具の使用をお奨めします。

　　　　　③溶解液を準備する。溶解液は室温、または37℃のもの用意する。

　　　　　④試薬のフタを空け、溶解液を注ぐ。試薬びんのフタは乾燥物が飛び散らないように注意深く

　　　　　　　空ける。乾燥物が飛散し易い場合はびんのフタを空けず、重量を測定し、ゴム栓を付けた

　　　　　　　ままで、少量の溶解液を入れた注射器の針を差し、溶解させる。その後、重量を測定しなが

　　　　　　　ら規定量の溶解液で溶解する。

　　　　　　　フタを空けて溶解させる場合は粉末が飛び散らないようゆっくりと丁寧にフタを開け、ゆるやかにピペットで溶解液を入れる。溶解液は激しく注がず、壁面を伝わる程度に注ぎます。こ

　　　　　　　のとき、泡のたたないように留意する。また、ピペットの先端と試薬びんとが接触すると、他の

　　　　　　　試薬あるいは血漿へのコンタミネーションの原因となりますから、絶対に接触させないように

　　　　　　　注意が必要です。管壁にピペットの先端が接触した場合は、器具は廃棄する。また、試薬

　　　　　　　コンタミの原因となるので、試薬溶解に使用した水は混同して使用してはならない。（特に、

　　　　　　　血漿溶解に使用してはならない。）

　　　　　⑤液を入れたら、直ちに、ゆっくりと２～３回回転させて、溶解の状況を確かめます。この時、

　　　　　　　激しく振らないようにします。蛋白製剤ですから絶対に泡を立てないようします。この後、

　　　　　　　使用説明書に記載された時間（約１０分間～30分間）静置する。

　　　　　⑥溶解したら、使用前に再度撹拌します。前回よりやや激しく撹拌して、充分に混合します。

　　　　　⑦トロンビン試薬は他の試薬に影響を与え易いので、溶解は最後におこなう。

　　　　　⑧測定に際しては、正確に分注することが必要です。

　　　　　⑨用手法において（加温が必要な場合）は、検体（血漿）と試薬が混合される直前までに適正

　　　　　　　な温度となっていなければ異なる結果となります。また、加温も過ぎると悪影響を与えます

　　　　　　　から、加温を始めてから適正な温度になったら直ぐに使用するようにしましょう。

　　　　試薬の保存

　　　　　①取り扱い説明書に従って、保存する。

　　　　　②生物製剤で加熱（または凍結）したものは原則的には使用不可である。

　　　　　③試薬同士のコンタミがないよう留意する。特に、ゴム栓を間違えないよう注意する。

　　　　　④トロンビン試薬は他の試薬に影響を与え易いので、取り扱いは最後にする。

　　　　　　　また、トロンビン試薬を触った手で他の試薬や血漿を触らないこと。

　　　　　　　どうしても触らなければならない場合は、一度、手を洗ってから作業をおこなうこと。

　　　　　⑤可能な限り冷所（４℃）保存する。

**3-B-４その他**

　　測定機

　　測定機器は今日多様の測定原理に基づく機器が出回っており、表示される結果もまちまちでです。しかし、反応中の温度を正確に37℃に保持して凝固反応をおこなわせることは最低限の性能と言えます。検出法としては、基本的には用手法を起点として、それぞれの機器の正確度を判定して置く必要があります。ただし、機器により撹拌力が異なるので、凝固測定においては重大な結果の誤差要因となります。このことは用手法においても同様です。

　　その他

　　　　　①作業の片付け、整理整頓、実験室の清浄化に関しては充分おこなう。

　　　　　　　そうでないと次回実験でデータ不良の原因となる。

　　　　　②試薬間／検体間の汚染を避けるため、可能な限り、デスポの使用を心がける。

　　③器具は専用化する。

設問（18）：トロンビン試薬が混入してもデータに影響はないので、最初に溶かしても良い、か？

Yes or No

設問（19）：凝固試薬では細菌汚染を気にすることは必要ない、か？

Yes or No

**3-Ｃ異常の発見**

**3-C-１異常の発見**

　　データ異常が見つかった場合、まず、凝固時間、次に凝固曲線を調べます。凝固時間は短縮か、あるいは延長であるかの情報が判ります。凝固曲線の情報からは、特にΔＨが正常に得られているか、曲線そのものに異常がないかを調べてください。それらの結果から、異常の原因が、①検体であるのか、②試薬であるのか、③機器であるのか、を推定します。通常は原因は一つであり、複合的に異常が発生することはありませんので、如何なる手法を使っても一つに原因を絞り込むことが重要です。

　　　　　(1)検体の場合

　　　　　　　短縮傾向の結果となる場合には、以下の２点が主要な原因となります。

①トロンビン等の試薬が検体にコンタミしたためによるもの

②採血ミス、あるいは採血管不良（抗凝固剤の不良や、シリコン処理の不良）

延長傾向の結果となる場合には、多様な原因が考えられますので、例えば次の点を確認し、対応を図ります。

　　　　　　　　①薬剤の投与により、データ異常を引き起こしていないか？

　　　　　　　　②採血ミス、あるいは採血管不良を起こしていないか？（クエン酸Naが多い）

　　　　　　　　③経時変化、保存条件の不良（COガスが抜け、ｐＨが高くなっている）

　　　　　　　　④Clotを発生していないか？

　　　　　　　　⑤検体のコンタミ、検体の取り違えや血清検体を使用していないか？

　　　　　　　　⑥特異的な検体であるか、

　　　　　　　　⑦他の検体、あるいは他の項目測定結果との比較

　　　　　(2)試薬の場合

　　　　　　　短縮傾向の結果となる場合には、以下の２点が主要な原因となります。

　　　　　　　　　①トロンビン等の試薬がコンタミしたためによるもの

　　　　　　　　　②試薬溶解方法の間違い、取り違え、試薬設置場所の間違い

　　　　　　　延長傾向の結果となる場合には、多様な原因が考えられますので、例えば次の点を確認

　　　　　　　し、対応を図ります。

　　　　　　　　①溶解手技のミス？、溶解液の取り違え？、溶解液量の間違い？

　　　　　　　　②溶解後の経時変化？、保存条件の不良？

　　　　　　　　③洗浄液・緩衝液は良好か？

　　　　　　　　④試薬設置場所の間違い？

　　　　　　　　⑤試薬のコンタミ？

　　　　　　　　⑥他の検体、あるいは他の項目測定結果との比較

　　　　　(3)機器の場合

　　　　　　　　①機器内部の汚れ・故障の状況を調べる。汚れている場合にはその時点できれいに清掃

　　　　　　　　　　する。（←次に動作させた時に異常が発見し易くなる）

　　　　　　　　②データ異常が突発的であるか、継続的であるかを調べる。

　　　　　　　　③次に、凝固曲線においてΔＨが適正であるか調べる。

　　　　　　　　④温度・流体系を調べる。

　　　　　　　　　　（試薬や緩衝液・洗浄液の設置間違いや、残量不足であることが以外と多い）。

　　　　　　　　　　　キャリーオーバーしていないか？

**3-C-２対応方法**

　　　　　原因は、検体、または、試薬、または機器のいずれかであって２つが原因となることは、まづありませ

　　　　ん。―つの原因に絞り込み、対応するようにします。

　　　　　ただ、「凝固反応そのものがおかしい？」と考えられる場合、フィブリンクロットの形成においては下

　　　　記の要因が影響を与えますので、留意しておいてください。

　　　　　　(1) ＰＨ

(2) 電気伝導度

(3) 浸透圧

(4) Ｃａ

(5) 撹拌

(6) 安定化剤

(7) その他の測定条件

設問（20）：異常が発生したら、凝固曲線を見るべきである、か？

Yes or No

**４．凝固分野の標準化**

**４－Ａ．標準化の意義と目的**

**４－Ａ－１はじめに**

　臨床検査は患者の病態を科学的・客観的に把握する手法として、今日広く普及していますが、臨床検査で取り扱う対象は生体由来の極めて複雑な構成物であり、時間と共に変化し、あるいは手技や手法（器具や機器）により多様な結果を表現されます。それが故に何が「真値」かと言うことが絶えず問われることになります。しかしながら、検査結果が安定していなければ、患者が疾病を起こしているのか、あるいは治療の効果があったのか判定できず、臨床診断に混乱を与えてしまい、重大な結果を招来する恐れがあります。したがって、臨床検査は常に一定の安定した結果が要求されることになります。

　結果が安定であるためには、まず、１つの検査室において継続して安定した結果でなければなりませんし、また、各検査室間で結果が一致することが必要です。

　これらの作業をサポートする手段として、全国的、あるいは全世界的にサーベイが実施されています。現在、我々は各種のサーベイに参加し、自分の検査結果が、あるいは自検査室が全体レベルのどの位置にあるのかを知ることができます。それによって、改善の機会が与えられていることになります。

　しかしながら、サーベイにおいては臨床検査で実施される項目を全部実行することは不可能です。よって、サーベイでは一般的に広く測定されている項目（ポピュラーな項目）であって、しかも臨床的意義の高いものを選択して実施することになります。サーベイでは、一般的、且つ、有効な項目から統一し、やがては臨床検査全体の統一を目指しています。

凝固分野では、最もポプラーな測定項目であるＰＴをターゲットとして、現在、ＰＴを標準化することにより、データの統一を図り、やがては凝固検査全体の統一化を図ろうとしています。凝固分野での標準化活動はスタートラインに着き、“やっと一歩踏み出した”と言うところでしょう。



**３－Ａ－２ ＰＴの表現方法**

　ＰＴの表現方法の表現方法としては、以下のようなものが挙げられます。

　　　　　　① 秒数

　　　　　　② 正常／異常

　　　　　　③ 異常／正常

　　　　　　④ 活性％の表示

　　　　　　⑤ ＩＮＲ表示

　ＰＴ結果を報告する方法として、最初に利用された表現方法は ① 秒数で、これは現在でも使用している施設があります。測定結果は概念的（感覚的）に異常の程度を推定することができます。また、継続して観察すれば病態の経過を知ることができます。しかし、測定結果は試薬ロットによって変動し、精密に比較するには問題があります。

　②および、③ は秒数として概念的に把握するのではなく、より客観的な値として診るために工夫されました。この方法では、正常／正常 ＝ 1.0 に対して、比としての値が高く表示されるか（または低く表示されるか）によって、正常と比較した異常の程度を知ることができます。この場合、試薬ロット間差の影響を受けにくくなり、秒数に比べればより客観的な値となります。けれども、同一の検査室の場合には比較できますが、他施設との比較、あるいは種類の異なる試薬を使用する場合では、比較できなくなります。

　活性％を使用する方法は、今日、本邦では最も広く使用されています。使う試薬それぞれに検量線を作成するので、秒数や比が異なっても、正常は100％と算出され、異常はその程度に応じて低値に表示されます。この結果、活性％表示は多様な試薬間の比較ができ、標準化の手段として優れた方法であると思われます。ただ、検量線が湾曲すると言う欠点もあります。

　ＩＮＲ表示は、世界的標準化の検討において考案された方法です。ワーファリン治療、あるいはそのモニタリングにおいて、活性％表示では湾曲する部分を直線的に表示する方法として採用されています。

**３－Ａ－３ 凝固分野における標準化の流れ**

**3-A-3-1 歴史的 経緯**

　さて、血液凝固分野における標準化の試みでは、プロトロンビン時間（ＰＴ）が標準化の対象になっています。現在、ＰＴ測定は、1935年にＡ．Ｊ．Ｑuickが１段法によるプロトロンビン時間測定方法を提唱したものを一般的に使用していますが、標準化の議論が開始された1960年代に、これが世界的に普及していた最もポピュラーな項目であったために標準化の項目となったと考えられます。逆に、標準化の試みはＰＴ結果を統一するために始まったとも言えます。

　1960年代のＰＴ測定は用手法で実施されていました。したがって、ＰＴの測定結果は試薬あるいは検体（血漿）の組み合わせで多様に変化しました。そこで、**試薬を統一することで結果を一致させようとする方向と**、**検体血漿を統一することで結果を一致させようとする方向**の２つの試みが検討されました。

　検体血漿を統一することによって標準化をおこなうという試みでは、アメリカを中心として広く議論され、1971年イスタンブール（トルコ）でおこなわれた Maditerranean Congress on Thrombolism　では「基本的に標準血漿の概念は有用である」との認識が確認されました。この決議に基づいて標準血漿の作製作業が開始されました。検討の過程では、「生血液や凍結血液では利用面で制約が多く凍結乾燥血漿を使用せざるを得ない」こと、しかしながら、「凍結乾燥血漿では試薬との相性により結果が異なってくることがある」こと、「試薬の影響を受けない血漿の開発が困難なこと」･･････などの理由から標準血漿を特定し得ない状況になりました。その当時、アメリカではＯｒｔｈｏ社 と ＤＡＤＥ社 の ２大メーカーがお互いに標準血漿を提供することを申し出ましたが、むしろこれが設定作業の混乱に拍車をかけてしまったと考えられます。このため、現在でも国際的に合意された標準血漿は存在しません。標準血漿として選定されているのは、フィブリノーゲン量や各凝固因子の活性量、ＡＴ－Ⅲ・プラスミノーゲン･･････などがＮＩＢＳＣ（イギリス）によって決定されています。が、ＰＴやＡＰＴＴに関する標準血漿はありません。

試薬を統一することによって標準化をおこなうという試みでは、Dr.Poller（イギリス）によって精力的に進められました。イギリスでは、「同じ製剤を使用して同じ検査結果を出す」試みが実際におこなわれ、 Dr.Pollerは輝かしい成果を残すことができました。今でもイギリスでは Manchester社のトロンボプラスチン試薬が97％のシェアーを誇っているという報告もあります。しかしながら、この試みは同一試薬の消費量が多すぎて、すぐに使い果たされてしまい、継続性の面で挫折を余儀なくされました。

　そこで、次に、標準試薬の消費量を減らす工夫として、「一般試薬は標準試薬と比較した値を付けることによって、標準試薬と同等の結果が得られるようにする」ことがを考えられました。これは、一般試薬を使用する場合には、正常凝固時間に対して異常凝固時間の比（Ratio）をとり、ＢＣＴ（British Comparative　Thromboplastin）に対する傾きを修正する方法でした。

　　　　　　　　　 　　　異常凝固時間

　　　　　　　　　 　　　　　　　　　　　×　Ｉｎｄｅｘ

　　　　　　　　　　 　　正常凝固時間

　これにより、Biggs and Densonは、自ら作製したヒト脳注出のトロンボプラスチン製剤が、多くのＰＴ試薬とグラフ上で補正できることを示しました。この概念の初期には、補正の方法は単純にRatioにIndexをかける方法だったために、正常～軽度異常の領域においては湾曲する現象が見られました。これは、臨床的に説明不能な矛盾でした。が、そのことが、逆に議論を活性化させ、ＩＣＳＨ（International Council for Standardization in Hematology）、及び、ＩＣＴＨ（International Committee on Thrombosis and　Haemostasis）の設立につながりました。ＩＣＳＨによるＰＴ試験の標準法、ＩＣＴＨによる各種の検討の結果、 Biggs and Denson の作製したロット67/40はＷＨＯの国際標準トロンボプラスチンとして採用されました（1976年）。ＷＨＯは、テクニカルレポート（1983：ジュネーブ）を発表しています。次いで、ＩＣＳＨとＩＣＴＨの共同作業のもと、ＷＨＯはウシとウサギの脳由来の標準品が設定しています（1985年）。なお、この間、修正する方法は両対数グラフ上で補正する方法に代わり、補正値はＩＳＩ（International Sensitivity Index）として使用されるようになっています。

　　雑学12） ： Dr.Poller（イギリス）は、現在、国際標準血漿の設定のために活動しています。つい最近、日本でもこの

　　　　　　　　国際標準血漿（凍結乾燥品）の評価依頼があり、桜川教授（富山医科歯科大）や、鈴木節子先生（凝固研

　　　　　　　　究会）らがこれの血漿の評価をおこなっています。

設問（21）： ＩＮＲの計算方式はLog10を基本としている、か？

Yes or No

**3-A-3-2 国際標準トロンボプラスチン試薬 の 設定**

　ＷＨＯが最初の国際標準トロンボプラスチンとして採用した試薬は、Biggs and Densonが作製したロット67/40です（1976）。この試薬は、これ以前の反省からすぐに門外不出の試薬としました。したがって、一般的に使用できる試薬を大量に準備する作業がはじまり、ＢＣＴ／099が1978年に、1983年にはＢＣＴ／253がヒト脳由来のトロンボプラスチン試薬としてが設定されました。次いで1983年には、二次標準品として、ヒト、ウシ、ウサギ脳由来のトロンボプラスチン製剤が設定されました。これらは、一次標準品と直接比較検討されたISI値が付けられており、 ＥＣの一部門であるＢＣＲが認定標準材料としてその配布をおこなうことにより、世界的に比較検討できるシステムが完成しました。ＥＣ／ＢＣＲにおいて

BCT /009（ヒト脳、ISI ＝ 1.048）は、ＣＲＭ１４７として、

OBT / 79（ウシ脳、ISI ＝ 1.011）は、ＣＲＭ１４８として、

RBT / 79（ウサギ脳、ISI ＝ 1.413）は、ＣＲＭ１４９として登録・公開されています。

　　　なお、これらの作業はＩＣＴＨとＩＣＳＨとの共同研究の成果であり、その報告は、Thrombosis and Haemostasis に掲載することで公開性を持たせています。これらの作業により、今日、我々はＢＣＲから標準品を購入し、自施設での値が正しいか否かを判定することができるようになりました。

　　雑学13） ： Biggs and Densonの内、Densonは現在当社が販売している複合因子ＴＴＯ・ＨｐＴ試薬のＯＥＭ供給元の社長です。

　　国際標準品 の 経緯

1976 ＢＣＴ67/40の設定（初代IRP、ISI ＝ 1.00）

1983 ＢＣＴ /253 （ヒト脳、ISI ＝ 1.085）

1985 二次標品の設定

BCT /009 ヒト脳、ISI ＝ 1.048

OBT / 79 ウシ脳、ISI ＝ 1.011

RBT / 79 ウサギ脳、ISI ＝ 1.413 ← ＣＲＭ149

1991 ＣＲＭ 149R ISI ＝ 1.343

1995 ＣＲＭ 149S ISI ＝ 1.257

　　　　注） ＩＣＳＨ ： International Council for Standardization in Hematology

（国際血液学標準化委員会）

ＩＣＴＨ ： International Committee on Thrombosis and　Haemostasis

（国際血栓止血学委員会）

ＢＣＴ ： British Comparative Thromboplastin（英国対照ＰＴ試薬）

英国血液学標準化委員会（British Committee for Standards in Haematology）

ＢＣＲ ： Reference Bureau of the European Union（欧州連合基準局）

ＩＲＰ　 ： International Reference Preparation（国際標準品）

ＣＲＭ ： Certified Reference Material

　この後、ＢＣＲでは在庫の不足に伴い、さらなる標準試薬の設定と供給をせざるを得ない状況となっています。新しい標準試薬の設定には欧州の１０ヶ所の検討施設で一次標準品および二次標準品を使っておこなわれ、ＣＲＭ１４９Ｒが1988年に、ＣＲＭ１４９Ｓが1993年に設定されています（本邦において一般的に入手できるようになったのはそれぞれ約３年後）。この結果、新たな標準品を設定するたびに、Golden Standardsは確実に減少し、今や二次標準品でさえ試験に供することができない状態となっています。

　　雑学14） ： ICTHのチェアマンは　Van den Besselaar A.M.H.P.（オランダ）です。ＩＣＴＨからアナウンスされるも

のはだいたいThrombosis and Haemostasis（英文）に掲載されます。

**３－Ａ－４ ＷＨＯの勧告**

**3-A-4-1 テクニカルレポート の 要旨**

　以下の文献より

①WHO Expert Committee on Biological Stanndardization 33 report [WHO technical Report Series 687]　1983

②ICSH/ICTH Recommendations for Reporting Prothrombin Time In Oral Anticogulant Control T hrombos. Haemostas. 155-156 1985

③Commission of the European Communities；　BCR INFORMATION reference materials: The Certification of the second reference material for rabbit Thromboplastin CRM 149R 1988

④Commission of the European Communities BCR INFORMATION reference materials:

The Certification of the third reference material for rabbit 　Thromboplastin CRM 149S 1994

⑤Commission of the European Communities BCR INFORMATION reference materials: The Certification of three reference materials for Thromboplastins BCR No.147，148 and 149 1984

　ＷＨＯのテクニカルレポート（1983、Geneva、上記①）はトロンボプラスチンにおいてＷＨＯのＩＲＰを使用する場合の方法を勧告（Recommended）しています。その中で、まず、 ＷＨＯのＩＲＰに付けられたＩＳＩ値は主要な１０の研究施設で検定がなされていること、そして、経口抗凝固薬治療のコントロールにおいて、検査室で較正（Calibration）する際にはＷＨＯが推奨するＩＰＲを使用すべきであること、が記されています。そして、ＷＨＯのＩＲＰには２種類のトロンボプラスチンがあり、トロンボプラスチン注出のみのもの（Human and Rabbit Brain）と結合型（Combined ＝ Bovine注出物に Ｆ.Ⅰ＋Ｆ.Ⅴ＋Caを添加したもの）があり、較正の対象となるトロンボプラスチン試薬（ＷＲＰ）は較正の最適精度を求めるためにお互いに類似したトロンボプラスチンを使って実施すべきであるとしています。最初に最適なＩＲＰを使用してＷＲＰの較正をおこない、次に、ロット毎にＩＳＩ値を設定する作業を実施せよ――としています。

　次に、較正の方法が記載されている部分について述べます。

　較正（Calibration）においては、健常人２名とワーファリン投与患者６名の検体が使用されます。（この数はクマリン誘発凝固欠損の個人差が大きいと言う点を考慮して算出されている。）健常人は男女各１名であり、ワーファリン投与患者は少なくとも６週間に渡って経口抗凝固療法がおこなわれた安定した６名の検体を使用すること、それぞれの検体はNormal １～２、Patients １～６と言う番号が付けられ、次の順序で、較正作業は10日間おこなわれるべきであるとしています。

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　Sample　　　 　　　ＩＲＰ　　 　　　　　ＷＲＰ

　　　　　　　　　　　　　　　　　　Normal１ Ⅰ　　　　　　 　　Ⅱ

　　　　　　　　　　　　　　　　　　Patient 1　 　　　　Ⅲ　　　　　　　　　Ⅳ

　　　　　　　　　 Patient 2　 　 　　　Ⅴ　 　 　　　　　　Ⅵ

　　　　　　　　　 Patient 3　 　　 　Ⅶ　　　　　　　　　Ⅷ

　　　　　　　　　 Patient 4　　 　Ⅸ　　　　　　　　　Ⅹ

　　　　　　　　　 Patient 5　　　　　 ⅩⅠ　　　 　　　　ⅩⅡ

　　　　　　　　　 Patient 6　　　　　 ⅩⅢ　　　 　　　　ⅩⅣ

　　　　　　　　　 Normal 2　　 　 ⅩⅤ　　　　 　　　ⅩⅥ

　採血の方法は、血液９容に対し、0.109mol／Ｌのクエン酸３ナトリウム溶液を１容混合します。血液はプラスチック（ポリポロピレンなど）またはシリコンコートしたシリンジで採取し、同様の凝固活性化を生じせしめない器具に移します。血液は直ちに遠心分離（2500rpm×５min、室温）し、上清を試験管に移し、栓をし、測定まで室温に静置する。採血後、４時間以内に測定を終了させます。

　ＩＲＰは、使用方法に従って準備し、溶解後は２時間以内に測定を終了させます。数日間実施する場合にはＩＲＰとＷＲＰの順序を交互にして測定します。

　測定は２重測定ではなく、シングルでおこないます。理由はシングル測定で異常が発生した場合には異常なデータをグラフから読みとって排除できますが、２重測定した場合には残差誤差がわずかであり異常の発見が遅れてしまうこと、また、測定に時間がかかり、検体の経時変化の影響を受ける可能性が増すため、早く連続しておこなえるようにするためです。

　測定に際し、エンドポイントはＩＲＰの場合、手と目で見て確かめます。ＷＲＰの場合は用手法 or半自動、または全自動の機械で測定して構わない。精密度３％以下、正確度（Variation）　５％以下であるべきです。

　　　　国際標準トロンボプラスチンの国際比較の施設

(1) Hippocration Hospital, 1st Regional Transfusion Centre, Athens, Greece.

(2)Hospital de la Santa Creu I Sant Pau, Servei d’Hematologia, Barcelona, Spain.

(3)Centre Hospitalo-Universitaore de Paris, Laboratoire Central d’Hematologie de I’Hotel-Dieu, Paris, France.

(4)Instituto Nacional de Saude, Department of Haematology, Lisbon, Portugal.

(5)Ospedale Regionale di Parma, 5a Divisione Medicina Generale, Parma, Italy.

(6)Ribe Coubty Hospital, Department of Clinical Chemistry, Section Coagulation and Fibrinolysis, Esbjerg, Denmark.

(7)Thame Thrombosis and Haemostasis Research Foundation, Thame, Oxon, United Kingdom.

(8)Withington Hospital, Thrombosis Reference Centre, Manchester, United, Kingdom.

(9)Katholike Universiteit Leuven, Department of Medical Research, Leuven, Belgium.

(10)Klinikum der Albert-Ludwigs-Universtat, Zentrale Einrichtung Tranfusionmedizin, Freiburg iBr., Federal Republic of Germany.

(11)Academisch Ziekenhuis Leiden, Department of Haematology, Haemostasis and Thrombosis Research Center, Leiden, The Netherlands.

設問（22）： 較正の対象となるトロンボプラスチン試薬（ＷＲＰ）は較正の最適精度を求め

　　　　　　　　るためにお互いに類似したトロンボプラスチンを使って実施すべきである、か？

Yes or No

設問（23）： ＷＲＰは、正常が２×10回測定されるとすると、ワーファリン検体は６×10回

　　　　　　　　測定されることによりＩＳＩ値が設定される、か？

Yes or No

**3-A-4-2 ＩＣＳＨ と ＩＣＴＨ の レポート**

　ＩＣＳＨとＩＣＴＨは共同して、Thrombosis and Haemostasis（1985）、前述文献②に、経口抗凝固療法のコントロールにおけるＰＴのレポート方法について「勧告（Recommendation）」を掲載しています。この中ではＷＨＯが標準トロンボプラスチンとするＢＣＴ／253を基準として、あるいはこの基準試薬に基づいて設定された他のＷＨＯ標準トロンボプラスチンを用いて、経口抗凝固療法に適用される市販ＰＴ試薬にはこれらと比較したＩＳＩ値を付け、ＩＮＲで報告することを勧告しています。すなわち、

① 経口抗凝固療法において使用される市販ＰＴ試薬は、ＷＨＯが標準トロンボプラスチンとして採用した試薬と比較した傾き（Slope）をバッチ毎に示し、ＩＳＩとして表示すること。

②市販ＰＴ試薬にはＰＴ結果とＩＮＲ値との関係を示した表あるいはグラフを添付すること。 例として下記のグラフと表が示されています。

Thrombosis and Haemostasisに Reportされた内容

Normal: 12.0sec.、 →　Patient’s: 18.0sec. ISI＝ 2.3

ＰＲ PTindex Percent ＩＮＲ

1.0 100 100 1.0

1.1 91 74 1.2

1.2 83 57 1.5

1.3 77 48 1.8

1.4 71 41 2.2

→ 1.5 67 35 2.5

1.6 62 31 2.9

1.7 59 28 3.4

1.8 56 25 3.9

1.9 53 23 4.4

2.0 50 21 4.9

2.1 48 20 5.5

2.2 45 18.5 6.1

2.3 43 17.4 6.8

2.4 42 16.4 7.5

2.5 40 15.4 8.2

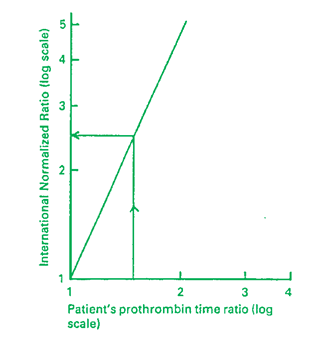
2.6 38 14.6 9.0

2.7 37 13.9 9.8

2.8 36 13.2 10.7

2.9 34 12.6 11.6

3.0 33 12.0 12.5



**3-A-4-3 ISI およびINR の 使用方法**

　まず、正常ヒト検体を準備する。正常ヒト検体はＩＮＲ算出においてＰＲの底となり、結果を大きく左右するので、非喫煙で健常な男女を選択し、可能な限り多数を集める。採血においては組織片の混入がないように慎重に採取し、採血後は速やかに遠心分離して、測定に供します。

　ワーファリン検体については、なるべく安定期の患者検体を上記と同方法で集め、測定します。ＰＴ試薬については、メーカーの発行するＩＳＩ値が付いているので、それを使用します。

①　ＩＮＲ値を算出する場合

　　　　　　患者検体の測定秒数を正常検体の測定秒数で割り、ＰＲ値を算出する。

　　　　　　ＰＲ値にＰＴ試薬のＩＳＩ値を指数乗し、ＩＮＲ値を算出する。

　　　　　　患者検体が22.0秒で正常検体が11.0秒、ＩＳＩ値が1.5であった場合には

　　　　　　ＩＮＲ＝（22.0／11.0）1.5　＝　2.828　となる。

②　ＰＴ試薬のＩＳＩ値を算出する場合

　　　　　　患者検体および正常検体を試薬Ａで測定する。

　　　　　　同じ検体を試薬Ｂで測定する。

　　　　　　試薬Ａで測定した時のデータを22.0秒、11.0秒とし、試薬ＡのＩＳＩ値を1.5とする。

　　　　　　また、試薬Ｂで測定した時のデータを18.0秒、10.0秒とすると、

　　　　　　試薬ＢのＩＳＩ値は、以下の計算により算出される。

　　　　　　　（22.0／11.0）1.5　＝　ＩＮＲ　＝　（18.0／10.0）ISIb

　　　　　　　ＩＳＩb　＝　1.5 × Ｌog（22.0/11.0） ÷ Ｌog（18.0／10.0）　＝　1.768

③ 相関の傾きからＰＴ試薬のＩＳＩ値を算出する場合

　　　　　　なるべく多数の検体を試薬Ａ、および、試薬Ｂで測定する。

　　　　　　個々の測定秒数を対数に変換する。（Ｌｏｇ10を使用、Ｌｏｇｅではない）

　　　　　　対数化されたデータを、Ｙ軸に試薬Ａ、Ｘ軸に試薬Ｂの相関をとり、一次回帰式を求め

　　　　　　る。　→　Ｙ ＝ ａＸ ＋ ｂ

試薬ＡのＩＳＩ値が1.5の場合、試薬ＢのＩＳＩ値は、

　　　　　　　ＩＳＩb ＝ 1.5 × ａ

　　　　　　一次回帰式の傾きが1.2である場合には、

　　　　　　　ＩＳＩb ＝ 1.5 × 1.2 ＝ 1.80

＊比較する際の測定機器は同一のものを使用する。機器が異なる場合には機器としてのＩＳＩ値を別途算出して置くことが望ましい。

＊また、現在入手できるＰＴ試薬はメーカーが国際標準トロンボプラスチンと比較したＩＳＩ値が表示されています。メーカーが示すＩＳＩ値に疑問がある場合は、他メーカーの試薬と比較（できれば複数の）、然る後に国際標準品を取り寄せて検討する方がより簡単であると思われます。

**４-A-4-4 ISI／INRシステムの問題点**

　ＷＨＯ、あるいはＩＣＳＨ・ＩＣＴＨが勧告したＩＳＩ／ＩＮＲシステムは難産の末に提唱されたＰＴの表現方法ですが、まだこのシステムには未完成の部分が残っており、これが故に実行上の問題となっています。以下に問題点とその経過を示します。

　第一には、ＩＳＩ／ＩＮＲ法の実施に際し、測定方法に関する規定がない、あるいは不明確である点が挙げられます。ＷＨＯの勧告では国際標準品は用手法で測定し、その他の試薬は用手法または機器で測定するよう説明していますが、それ以外の方法面での記載はありません。単に用手法と言っても同一とは考えずらい面があります。欧州での測定結果では同じ試薬を使っても15～16秒のデータとなるものが、本邦での測定結果では11～12秒となると言う報告もあります。これに対し、国内では、取り敢えずは用手法で測定したものが基本であることを提議していますが、どの施設においても一定の結果となる訳ではありません。

　第二には、機械毎に結果（感度）が異なる点を如何に補正すれば良いのか、と言う点です。上記第一の問題点において“基本は用手法”と言うことに決定しましたが、機械毎の感度差が測定結果に与える影響は意外と大きいこと（＝ある機器をISI＝1.0とすると、ISI＝1.4と言う機器があること）が判り、機械毎の感度差は無視できないものとなりました。そこで、試薬メーカーが表示するISI値表には少なくとも同社が表示し得る機器毎のISI値を表示するように提案されました。この結果、各ＰＴ試薬にはメーカーで測定された値をもとに機器毎のISI値が表示されるようになりました。が、ISI値の測定方法は決まった手技・手法が設定されていない現状では、どうしてもメーカー毎に異なる傾向にあります。これを如何に統一的なものにするかと言う問題が残ります。

　第三には、検体に関する規定です。凝固検査では、一応、「正常ヒトプール血漿」を基準にしていますが、「正常ヒトプール血漿」は集めた集団の特性により、凝固活性（秒数）も異なってくる傾向があります。正常血漿の個々の平均値とプール血漿の測定値とでは、プール血漿の値が短縮傾向にあることも指摘されております。このため、各検査室で作製した「正常ヒトプール血漿」の出来方如何によって、ＰＲ値がブレたり、正確度に疑問が生じたりすることになります。また、異常検体においても同様な状況であり、且つ、「安定期のワーファリン患者」の活性範囲については規定が示されていません。これを解決する手段として、近年、“ＩＮＲ表示血漿”を使用することが提案されています。しかしながら、人種や食生活習慣の違う者（集団）では、当然、正常域は異なってきますし、いわんや異常域においては感度的にも特性が異なってきます。その結果、正常値のズレや異常域での値の違いはＩＮＲ表示値に影響を与え、国際的に統一されたＩＮＲ値で比較検討できなくなります。

　第四には、使用上の問題です。欧州ではワーファリンのモニタリングをＰＴだけで実施してきた経緯がありますが、本邦ではトロンボテストとＰＴを併用するか、ないしは使い分けてきた歴史があります。

このため、ＰＴの検査によってワーファリンモニターをする習慣が少なく、ＩＮＲ検査依頼が少ない（あるいは無い）と言った傾向のあることも事実です。また、治療面では軽度に凝固能を抑制する傾向（⇒ＩＮＲ値では2.0前後で治療する傾向）があり、ワーファリン治療に対する取り組み方の違いがあります。臨床医師サイドでの治療域を明確にし、且つ、検査リクエストを出してもらう必要があります。

　第五には、凝固測定における測定手技の標準化が進んでいないと言う点です。上記一～四の如く、問題点が解決されたとしても、基礎になるデータがバラバラであっては標準化の意味はありません。しかしながら、凝固測定は施設毎に測定手技がまちまちであり、同一の試薬・機械・標準物質を使用していても施設間差は極めて大きいのが現状です。正常or治療域においては正確なＩＮＲ値を示し得る手法を規定することが必要であると考えられます。

その他、ＩＮＲ表示においてＩＮＲ値が高いほどＩＮＲ値が変動し易い性質がある点があります。またＩＮＲ値はISI値が大きい程、変動し易い変動し易い性質もあります。これらの点を踏まえ、多様な試薬に対応する方法の規定も必要です。さらに、特にトロンボテストとＰＴとの関係を明確にす

ること、一律の計算方法では適用できないと言う問題点に対し、今後、検討されるべき課題が多くあると思われます。



**４．凝固分野の標準化**

**４－Ｂ　ＩＳＩ値設定方法、および管理方法**

　まず、当社標準ＰＴ試薬、および当社標準ＩＮＲ血漿の選択をおこないます。その方法としては、ＷＨＯプロトコールに従い、正常ヒト血漿の測定、および、ワーファリン血漿の測定が大バッチで実施されます。この際、使用される試薬はＷＨＯ標準試薬と次期候補の社内標準ＰＴ試薬です。次期候補の社内標準試薬は事前の小バッチの検討で絞り込まれたものが使用されます。また、正常ヒト血漿は、社内健康診断時に健常人（約200～300名）からクエン酸採血し、採血後２時間以内に個々の測定を実施します。同時に正常ヒト血漿はプールされ、一部は凍結保存されて以降の各種の試験に使用されます。この作業により、正常ヒト血漿の平均値と同等な秒数結果を示す凍結乾燥血漿（当社標準ＩＮＲ血漿）が選択されます。

　次に、この作業と平行する形で約100検体のワーファリン検体が測定されます。測定結果は対数相関がとられ、ＷＨＯ標準品との一次回帰式の傾きから、次期候補の社内標準試薬のＩＳＩ値が設定されます。

　さらに、用手法・各種機器での測定結果から、対数相関をとり、測定に供した全試薬のＩＳＩ値の変動が計算されます。

　以上の結果から、最も適正と考えられる試薬を選定し、これを当社標準ＰＴ試薬（ＳＴＤ）とします。この試薬は製品系列毎に設定され、約１年間、運用されます。

　次に設定された当社標準ＰＴ試薬、および当社標準ＩＮＲ血漿は精度管理部門、品質管理部門、およびその他の部門に配布されます。精度管理はそれぞれブラインドされた２ヶ所以上の社内施設で、少なくとも１回／週以上の頻度で実施されます。また、半年に１回以上の割合で、20名以上のプール血漿を作製して正常値の検定をおこないます。品質管理は当社標準ＰＴ試薬、および当社標準ＩＮＲ血漿を使用して、各製品の検査をおこないます。この結果、各製品に対しては統一された検査結果が表示され、且つ経時的変化を比較できるデータが得られることになります。

　これらの日常的な使用においてデータ的異常が発生した場合には、直ちに原因究明と対策が実施されます。

　一方、市場品質を監視する目的で、ＷＨＯのプロトコールに従ってＩＳＩの検定が実施されます。他社試薬を始め、各種機器および機種間ＩＳＩの検定がおこなわれます。この結果は当社標準ＰＴ試薬・標準血漿の選定方法の検討にフィードバックされると共に、機種間補正に使用されます。この作業を実施する部門は上記の部門とは別であり、市場問題の発生に対して不定期に実施されます。

設問（24）： ISI値は機器毎に異なる、か？

Yes or No

設問（25）： 正常値（sec.）は、世界中どんな人種でも・どんな施設でも、一定である、か？

Yes or No

**４－Ｃ．凝固反応の理解**

　　　　――技術解説：プロトロンビン試薬の反応機序――

**４-C-1 はじめに**

　　プロトロンビン時間測定（以下ＰＴ測定）は、1935年にＡ．Ｊ．Ｑuick1)が１段法によるプロトロンビン時間測定方法を考案したことに始まる。当時、一般的に理解されていた凝固反応系は極めて単純なもので（図１．）２)、トロンボキナーゼと称する物質が酵素前駆体であるプロトロンビン（凝固第Ⅱ因子）を活性化酵素であるトロンビンに転化させる。さらにトロンビンはフィブリノーゲン（凝固第Ⅰ因子）をフィブリンに変えることによって、クロット（Clot）が形成されると考えられていた。ゆえに、プロトロンビン時間測定とは簡易的なプロトロンビン測定法として提唱された。 Ａ．Ｊ．Ｑuickは提唱後、１段法によるＰＴ測定が凝固能を反映するか否かについて心配したが、幸いなことにＰＴ測定は、今日の画期的に変化した Water　Flowの凝固反応系（図２．）で外因系を反映することが確認された。このため、ＰＴ測定は血液凝固系の主要な検査項目として世界的に広く普及するようになった。

　　　　　　　　　　　　　　　　トロンボキナーゼ

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　↓

　　　　　　　　　　　　　プロトロンビン　→　トロンビン

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　↓

　　　　　　　　　　　　　　　　　フィブリノーゲン　→　フィブリン

　　　　　　　　　　　　　図１．Ｍｏｒａｗｉｔｚの古典的凝血学説

　　　　図２．Water　Flowの凝固反応系

　　一方、 Ｑuickが当時に使用した試薬は各種の組織をホモジナイズし、その抽出物の懸濁液であった。当初は酵素と考えられていたためトロンボキナーゼと呼称されたが、後にこれが酵素ではなく、国際的な名称も組織トロンボプラスチン（＝第Ⅲ因子）と付けられた。しかし、さらにその後、各種の研究により反応の本質が明らかにされ、組織因子（ティッシュファクター＝ＴＦ）と命名された３)。今日では、ＴＦは蛋白質構造が決定され４)、遺伝子工学的に製造されるようになっている。

　　これらの発展に伴い、ＰＴ試薬の構造、反応の機序が解明されてきている。このため、従来考えられてきた概念とは趣を異にしている。ＰＴの反応系、ひいては凝固反応系全体の見方を変えなくては理解できない状況が発生しつつある。本技術解説ではＰＴ試薬の成分・構造、および反応機序についてこれまでの情報をまとめてみたい。

**４-C-2 ＰＴの反応機序**

**４-C-2-1 ＰＴ試薬の製造方法**

　　一般的に、動物由来（ヒト以外）ＰＴ試薬の製造方法は図３．に示す工程で製造されるが、基本的にはＡ．Ｊ．Ｑuickが開発した方法と大差はない。かつては国内の実験室においてもこの工程にしたがって、ウサギなどの動物脳を調達し、ＰＴ試薬を調製することがなされていたが、現在は臨床検査の場で自家調製することは希で、メーカーで作製された商品を使用するのが一般的である。

　　ただ、近年においてはメーカーの作業も分業化され、図３．の①～③の作業（＝つまり、ウサギなどの動物調達・脳などの摘出・アセトンパウダーの作製する工程）は専門メーカーによっておこなわれ、ＰＴ試薬のメーカーは購入したアセトンパウダーを原料としてＰＴ試薬を製造するのが一般的である。

① 各種動物（ウサギなど）の各種組織（脳など）を摘出する。

② アセトン中でホモジナイズし、脱脂・脱水する。

③ 乾燥させ、粉末とする（アセトンパウダーを作製する）。

④ 生理食塩水などの溶液に懸濁する。

⑤ 遠心分離し、上清画分（懸濁液）を得る。

⑥ その懸濁液をＰＴ試薬とする。

　あるいは凍結乾燥して保存する。使用時には水を加えて溶解する。

　　　　　　　　　　　図３．ＰＴ試薬の調製方法

**４-C-2-2 ＴＦの構造**

　　ＴＰの抽出工程（図３．の④～⑤の作業）は、従来は組織片を得る作業と考えられていたため、遠心分離の工程ではウサギ脳粉砕物の大きな破片を取り除き、試薬として有効な画分を得るために「ゆるやかな遠心」が必要と考えられてきた。ＰＴ試薬の有効成分が組織片であると考えるとこれで良い。が、ＴＦであると考えると、この工程は以下のように複雑である。

　　つまり、これらの工程において、脳などの組織・細胞内にあったＴＦは破砕されてＴＦの一部に細胞表面のリン脂質断片を付けた蛋白片となる。そして乾燥後、再度生理食塩水などに分散されると、ＴＦおよびリン脂質断片は液中に分散される。リン脂質断片の一部は凝集し、ミセル（＝マイクロパーティクル：Ｍｐ）を形成する５)。このマイクロパーティクルは、ＴＦが活性を発揮しうる形に構成された第Ⅶ因子活性型マイクロパーティクル（以下Ｍｐ＋）と、第Ⅶ因子活性化作用を持たないマイクロパーティクル（以下Ｍｐ－）が形成される。

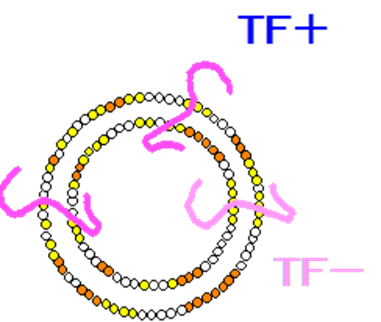


　　　　　　　　　　　　図４．マイクロパーティクルの構造模式図

　　このような工程を経ると、必然的にかなりの確率でＭｐ＋が形成される。そればかりか、ＴＦと分散性の良いリン脂質があれば、どのような動物種からも、あるいはどのような組織からでもＭｐ＋を調製でき、ＰＴ試薬として利用できる。特に脳組織がＰＴ試薬に適するのは、ホミジナイズによる分散性が良く、且つ、リン脂質に富んでいることに依る。

　　ほとんどのＭｐ＋は、細胞膜と同様に、リン脂質二重層の形に再構成される。Ｍｐ＋の大きさは分散させた溶液中の撹拌力によって異なるが、一般的には0.1～1.0μｍである。Ｍｐ＋内部は空洞であるが、再構成時の液体で充満される（図４．）。

　　この状態でＴＦはＣａを添加してそのまま使用されるか、あるいは一旦凍結乾燥して使用される（図３．－⑤）。凍結乾燥は長期保存を目的としておこなわれる。凍結乾燥では、反応環境を整え、凍結乾燥のショックを和らげる目的で、緩衝剤や安定化剤を混合した溶液を試薬構成液として使用される。Ｍｐ＋が構成されたとする概念では、長期保存のためにはＭｐ＋内部の水分を除去する必要があること、一旦再構成されたＭｐ＋内部の水分を抜くには強度の真空乾燥が必要であること、また試薬構成液は塩析物がＭｐ＋の膜構造を破壊することのないように、また同時に溶解時点で活性を有するＭｐ＋に復元されるように成分を調製することが必要である、と言った見解となる。このため、各種の製造技術が必要である。

　　なお、最近では、遺伝子工学によって調製されたＴＦ蛋白質とリン脂質からＰＴ試薬が製造される。この場合は正しく上記の概念（＝Ｍｐ＋形成）が実行されている。

**４-C-2-3 酵素反応の段階**

　　ＰＴの反応は多段にわたる酵素反応と、フィブリンの形成反応の２つから成る。最初に起こるのは酵素反応で、これは反応はＭｐ＋の分子表面上で進む。（図５．）

　　血液から供給された凝固第Ⅶ因子（Ｆ.Ⅶ）はＣａ２＋を介してリン脂質膜と結合すると共に、一端はＭｐのリン脂質膜の一部から表面に突出したＴＦと結合する。これにより活性化凝固第Ⅶ因子（Ｆ.Ⅶa）が生成されると考えられている。次にＦ.Ⅶaは凝固第Ⅹ因子（Ｆ. Ⅹ）に作用し、Ｆ.Ⅹaを生成する。さらに、リン脂質膜上においてＦ.Ⅹa・Ｆ.Ⅴa複合体（以下Ｍｐ・Ｆ複合体）が形成され、Ｆ.Ⅱを分解し、トロンビンを生成するようになる。この過程において、 Ｆ.ⅦaはＴＦと結合した場所で、あるいは再度浮遊した状態でＦ.ⅩをＦ.Ⅹaに変える。 Ｆ.Ⅶ、Ｆ.ⅩおよびＦ.Ⅱは Ｃａ２＋を介してリン脂質膜と結合するが、どこにでも結合するのではなく、リン脂質膜上の負荷電性の高い部分（＝ＰＥまたはＰＳの集中した部分と思われる）にまずＣａが結合し６)、その上に各凝固因子が分子Ｎ末端側のγ-カルボキシグルタミン残基を介して結合する。一方、Ｆ.Ⅴは Ｃａ２＋を介して結合するのではなく、リン脂質膜に埋もれる形で結合（あるいは膜が変形して結合）するため、荷電性のないリン脂質部分（＝ＰＣと考えられる）に結合する。

　　複数の凝固因子とＭｐ＋が複合体を形成すれば、酵素と基質の分子量の差が大きくなり、分子会合の確率が高まるので、一連の反応性はさらに向上することになる。また、Ｍｐ・Ｆ複合体は巨大分子となるために構造破壊の危険性が極端に低下し、高稼働率でしかも安定的な状態でトロンビンを生成する「工場」となる。



　　　　　　　　　　　図５．外因系の反応模式図

　　凝固因子とＭｐ＋とによって、活性を発揮する有効なＭｐ・Ｆ複合体「工場」が常にすべて形成される訳ではない。 Ｍｐ・Ｆ複合体の形成は、血液から供給された各種の凝固因子（ＦⅦ・ＦⅩ・ＦⅤ）の量と、Ｍｐ＋（およびＭｐ－）の量によって影響され、マトリックスに組み合わされた不完全な幾種類ものＭｐ・Ｆ複合体が形成され、その中で有効に組み合わされたＭｐ・Ｆ複合体のみが活性を発揮する関係である。有効なＭｐ・Ｆ複合体が形成される確率は正しくポアソン分布に従う。

　　これらの要素の中で最も重要なものはＭｐ－の存在である。ＰＴ試薬は製造工程においてアセトンパウダーを再浮遊させた懸濁液を使用するため、Ｍｐ－が必ず混入する。Ｍｐ－はＭｐ＋と同様に凝固因子を吸着し、不活性型のＭｐ・Ｆ複合体を形成する。このため、有効なＭｐ・Ｆ複合体が形成される確率はＭｐ－の多少により大きく左右される。（図７．参照）

**４-C-2-4 酵素反応とＣａ**

　　血液から供給される凝固因子はクエン酸ナトリウムによって Ｃａ２＋がキレートされており、 Ｃａ２＋欠乏の状態にある。ＰＴ試薬中に Ｃａ２＋が存在しないと凝固因子はＭｐ＋（またはＭｐ－）に結合できず、各凝固因子の活性化が非常に困難になる。このため、 Ｍｐ・Ｆ複合体を形成するには Ｃａ２＋は不可欠である。

　　 Ｃａ２＋とＭｐ＋、さらに各凝固因子が最適条件下で混合された状態では、有効なＭｐ・Ｆ複合体が多量に形成されるため、反応量が増し、したがって、凝固時間は短くなる。一方、 Ｃａ２＋が不足した状態では、 Ｃａ２＋量に応じたＭｐ・Ｆ複合体が形成されるため、凝固反応量（速度）は低下し、凝固時間は延長する傾向を示す。

　　逆に、 Ｃａ２＋が過剰な状態では、 Ｃａ２＋はリン脂質表面に結合するだけでなく、溶液中に浮遊する各凝固因子にも結合する。この状態では、本来複合体を形成すべきものがお互いに反発するためにＭｐ・Ｆ複合体を形成しにくくなる。そのために、凝固反応量（速度）は低下する。ただ、溶液中に浮遊する Ｃａ２＋が結合した凝固因子であってもゆるやかには反応するので、 Ｃａ２＋不足の状態に比べゆるやかな延長傾向を示す。

　　このようにＰＴ測定の反応溶液中には最適な Ｃａ２＋が必要である（図６．）が、この必要量は抽出液に残存する Ｃａ２＋の状態によって、さらにはＭｐ＋（またはＭｐ－）の量により異なる。つまり、製造の条件や、試薬の濃淡・試薬量の変動によっても、さらには試料中の抗凝固剤の添加濃度によっても変わってくる。したがって、試薬メーカー、および製造ロットが異なれば Ｃａ２＋の添加量もそれに合わせた量が必要となる。

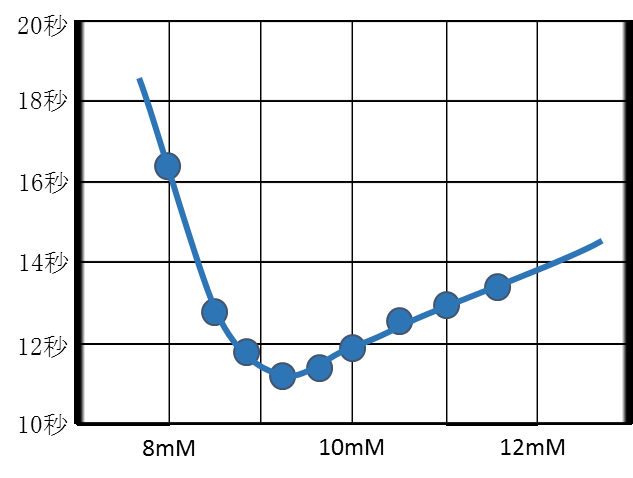


　　　　　　　　　　図６．Ｃａ濃度と凝固時間の関係

　反応溶液中には適切な量のＣa量が存在する必要があります。しかし、見方を変えれば、このことはＣaの量を増加／減少させれば、反応量が異なることを示しています。つまり、多量にＣaが存在する場合には正常に凝固反応を実行できるマイクロパーティクルの相対数は減少することになりますから、反応性は弱まり、結果として感度の高い試薬に表現されることになります。採血時のクエン酸濃度が異なれば同一の試薬であっても、感度（ＩＳＩ値）は違ってくることになります。

　　また、上述のごとく、マイクロパーティクルのりん脂質構造によってＣaの最適量は変わるのですから、試薬（メーカー）が異なればＣaの添加量もそれに合わせた量が必要となり、一定のあるいは固定的なＣa量と言うものはありません。試薬（メーカー）毎にＣa量は異なって当然です。製造技術的にはＣaがりん脂質に結合する力より弱く、凝固因子に結合する力より強い緩衝物質があれば、液中にＣaをストックしておくことが可能ですから、反応系には常に適正な量のＣaを供給できるシステムになります。その意味では緩衝剤はＰＨだけでなく、Ｃa供給の面で重要な作用となります。

**４-C-2-5 クロット形成反応の段階**

　　Ｍｐ・Ｆ複合体により生成したトロンビンは液中へ遊離され、フィブリノーゲンに作用してフィブリンモノマーを生成する反応を開始する。

　　最初の段階では生成したトロンビンのほとんどはアンチトロンビン物質による阻害を受けて、失活する。産生初期のトロンビンの７０～８０％はＡＴ－Ⅲによって活性を失い、またフィブリノーゲンやプロテインＣなどの作用基質によっても失活される。また、２０～３０％のトロンビンは生成されたフィブリンに吸着されることでも不活化される。その他、トロンビンは様々なアンチトロンビン物質によっても失活すると考えられる。７)ＰＴ測定においてはこれらアンチトロンビン物質による消化が済んだ後、フィブリンモノマーが加速的に産生される。

　　産生されたフィブリンモノマーは特定濃度（閾値）に達した時点より分子重合を開始し、フィブリン塊を形成する。フィブリンモノマーの重合は非酵素的である。フィブリンモノマーの重合は、反応環境、つまり、ＰＨ・電気伝導度・浸透圧・挟雑物質の存在量によってフィブリンポリマーの形成反応速度は量的にも質的にも影響を受ける８）、９）、１０)。一般的に中性で、塩濃度が低い状態での重合度が速い。フィブリンポリマーの形成が発現されると、これに伴なって、透過光・散乱光の変化や粘度の変化、あるいはフィブリン繊維が認められるようになる。

　　このようにＰＴの測定において、フィブリン形成までの各種の反応がn（ナノ）秒単位で進行しているにもかかわらず、我々が検知できるようになるまでに約７～８秒を要するのは、効果的に酵素作用を発揮できるトロンビンの量が必要であることと、それに続く重合開始に必要な濃度のフィブリンモノマーの量の確保に時間を費やすためである。

**４-C-2-6 ＰＴ試薬の感度**

　　ＰＴ試薬の感度は正常検体を測定した場合の凝固時間（正常値）と、凝固因子量の少ない異常検体を測定した場合の凝固時間（異常値）によって決定される。正常値が示す凝固時間については特に規定はないが、異常域での延長度が大きい場合には「感度の高い試薬」として位置付けられる。感度は総合的な試薬特性を表現しており、諸種の要因により影響される。

　　たとえば、Ｍｐ＋量、凝固因子量、Ｃａ量などが最適な場合には凝固時間は正常値・異常値共に短く、従って試薬感度としては鈍くなる。しかし、これらの量に過不足が生じた場合には試薬感度は急激に変化し、高い感度を示すことになる。我々の実験（図７．）では通常のＰＴ試薬にＭｐ－を１％（or５％）添加すると、ＩＳＩ値1.70は1.467（or1.263）に下がり、また、ＰＴ試薬中のＴＦ（Ｍｐ＋、およびＭｐ－）濃度を１倍～１０倍に変更した場合（図８．）にはＩＳＩ値は1.00まで下がり、著しい感度の向上が認められている。この意味では感度が高いと言うことは成分の適正なバランスのとれた試薬とは言い難く、 ＩＳＩ値が1.Oに近いと言うことは凝固因子・プロテアーゼ反応において阻害要因の大きい試薬であることを窺わせる。

　　Ｍｐ－の添加量 正常域の凝固時間（秒） 異常域の凝固時間（秒） ＰＴ比 ＩＳＩ値

１ ０ 　　　9.8 　　　　　　　　　　　　　　20.7 　　　　　　　　　　　　　2.11 1.70

２ １％ 　　10.6 　　　　　　　　　　　　　　25.2　　　　　　　　　　　　　　2.38 1.467

３ ５％ 　　14.7 　　　　　　　　　　　　　　40.2 　　　　　　　　　　　　　2.73 1.263

　　　　　　　　　　　図７．Ｍｐ－の添加の影響

　 Ｍｐ濃度 正常域の凝固時間（秒） 異常域の凝固時間（秒） ＰＴ比 ＩＳＩ値

１倍 　　　　9.9 　　　　　　　　　　　　　　　　20.7 　　　　　　2.09 1.70

２．５倍 　　　　10.5 　　　　　　　　　　26.4 　　　　　　2.51 1.36

５倍 　　　　12.2 　　　　　　　　　　37.4 　　　　　　3.06 1.12

１０倍 　　　　15.7 　　　　　　　　　　55.0 　　　　　　3.50 1.00

　　　　　　　　　　　図８．Ｍｐ濃度の影響

　　一方、凝固反応の場であるマイクロパーティクル（Ｍｐ）のリン脂質部分はＰＥ・ＰＳ・ＰＣ・ＰＡなどで構成される。これらの各成分は個々に荷電性が異なるため、荷電性の高い成分が多く混じるＭｐではＣａ結合力が高く、したがってＦ．ⅦやＦ．Ⅹに対するの高い結合が期待できる。つまり、リン脂質成分の差によって、ＰＴ試薬特性・感度に差が生じることになる。現在市販されているＰＴ試薬におけるリン脂質成分の差とは、原料の差や製法の差である。使用されている動物種としてはウサギ・ウシ・ウマ・サル・ヒトなどであり、組織としては脳・肺・胎盤などが挙げられるが、これらに由来するリン脂質成分に差があり、したがって上述の如く、感度にも差異が生じることになる。

　　ごく最近に至ってはＴＦ蛋白質を遺伝子工学的に大腸菌に合成させ、リン脂質部分は人工的に調合された構成成分とし、この両者を再構成させることでよい均一性の高いＰＴ試薬が製造されるようになった。これは、リコンビナント試薬として販売されている。１１）、１２)

**４-C-3 おわりに**

　　以上、ＰＴ測定における凝固反応の概念について述べた。凝固反応は反応の場であるＭｐ＋と凝固因子との椅子取りゲームに例えることができる。Ｃａを介して椅子にたどりついた凝固因子はＭｐ・Ｆ複合体を形成し、凝固反応が促進される。その間にはＣａが重要な役目を果たすことを説明した。しかし、ＰＴ測定は以下の特徴的な条件で実施されていることも留意して置く必要がある。

　①　ＰＴ測定では高濃度の蛋白質溶液中で行われる点である。一般的に実施される生化学検査や免疫分野の測定では反応液中の被検試料濃度はかなり低い。が、ＰＴ測定ではこれが１：２であり、せいぜい３倍にしか希釈されない。そのため、Ｍｐ＋と凝固因子蛋白質との会合確率の点で立体阻害を生じる反応環境となっている。このため、会合条件を安定的に保つには強度な撹拌が必要であり、撹拌が弱い場合にはデータへの影響に注意しなければならない。

②　ＰＴ測定では多段に渡るプロテアーゼ反応の結果として凝固能が測定されている。一般的に凝固因子は極めて不安定であるため、被検体の取扱い方法によって重大な測定誤差を発生する。しかも被検試料中には他種類の抑制物質が共存するため、異常データの成績判断には注意を要する。

　③　フィブリンクロットの形成は自然重合でおこなわれるため、反応環境が大きく影響する点である。反応溶液中の ＰＨ・ 電気伝導度・ 浸透圧・ およびその他の測定条件が影響する。しかも反応が進むにつれてｇｅｌはｓｏｌに変化し、重合反応の環境も変化する。凝固終末点の検出方法は種々の原理・方法が考案されている１３)が、仮に同一被検試料であったとしても機器の検出原理や解析方法によってまた様々な結果が示される。

　　以上のようにＰＴ測定は成分も反応様式も、また測定方法も複雑であり、その理解は難しい。しかし、一方では標準化の検討も盛んにおこなわれている。１４）、１５)ＩＮＲ表示は国際的な規模で評価されており、もっとも期待できる方法であると考えられる。標準化が進展すれば凝固検査分野でのさらなる発展が期待できる。

以上

**４-C-4 文献**

1)　Quick,A.J.,　B.M.Stanly　and　F.W.Baneroft：Ａ　study　of　the　coagulation　defect　in　hemophilia　and　jundice．　Am.J.Med.Sci.,190,501～511,1935

2)　Morawitz,Ｐ：Beitrage　zur　Kennits　der　Blutgerinnung．　Beit.　Chem.　Physiol.,5,133,1904

3)　福武勝博、浮田実：日本血液学全書１１,出血性素因・基礎　P217、新版日本血液学全書刊行委員会編、丸善、1979

4)　濱本高義、中垣智弘、岩永貞昭：外因系血液凝固機構の進歩、血液・腫瘍科、Vol.３４、No.６、502-511、1997

5)　Papahadjopoulos,D.,C.Hougie　and　D.J.Hanahan：Influence　of　surface　change　of　Phospholipids　on　their　clot　promoting　activity.　Proc.Soc.Exp.Biol.Med.,3,413,1962

6)　香川靖雄：生体膜と疾患の分子生物学　P480,南山堂、1993

7)　鈴木宏治：止血・血栓・線溶（松田道生、鈴木宏治編集）、P187-196,中外医学社、1994

8)　松田道生：フィブリノゲンの誘導体、とくに可溶性フィブリン（soluble　fibrin）とＤダイマー（Ｄ　dimer）について、血栓止血,Vol.8,No.1,24-32,1997

9)　丹羽和紀：フィブリン繊維の形成機序に関する研究, 血栓止血,Vol.8,No.1,33-43,1997

10)　山角健介、田辺元、愛甲孝：合成ペプチドを応用した重合機転の解析、血栓止血Vol.8,No.2,75-83,1997

11)　R.Bader、et.al.：Multicentric　Evaluation　of　a　New　ＰＴ　Reagent　Based　on　Recombinant　Human　Tissue　Factor　and　Synthetic　Phospholipids、Thrombosis　and　Haemostasis、Vol.71、No.3.,292-299,1994

12)　高宮脩、百瀬正信、横瀬和哉：遺伝子組み替え型組織因子と臓器抽出物の組織因子を用いた第Ⅶ因子活性の比較、医学と薬学Vol.33、No.1,229-237,1995

13)　中野一司、東和也、西村辰志、北島勲、丸山征郎：凝固・線溶検査の自動化、日本臨床検査自動化学会誌、Vol.22、No.1.、3-8、1997

14)ＷＨＯ　Expert　Committee　on　Biological　Standardization、　33　report（ＷＨＯ　technical　Report　Series　No.　687、1983

15)　鈴木節子ら：ＰＴ・ＴＴ標準化に関する研究、臨床病理Vol.45,No.4,321-327，1997

**３－Ｄ．ワーファリン**

3-D-1 はじめに

　1933年２月、米国北部の牧場主であったEd Carlsonは発酵したスイートクローバーを給餌されたウシが原因不明の出血のために次々と死んで行くのに困り果て、牧草とウシを馬車に積み、調査を依頼しようとしてウィスコンシン大学を訪れました。担当主任が不在であり、取り次ぎもままならない状況でしたが、強引に・たまたま面談したのがここの生化学者 K. P. Linkでした。たぶん、 Ed Carlsonは丁寧に、かつ、強引にK. P. Linkに原因の調査をする依頼し、その結果、シブシブとK. P. Linkは引き受けたのではなかったのではないでしょうか。当時の米国は不況の真っ直中で、優秀な研究者といえども物価の安い地方に転出しているような状況であったこと、さらに、当時のウィスコンシン大学には農場試験場があったことなどが、ワーファリンの発見につながったと考えられます。

　さて、生化学者であった K. P. Linkはコツコツと調査を始めました。やがて、クローバーの中から毒性成分の注出に成功し、これがジクロマールであることを見出しました。彼はその後誘導体として、ワーファリンの合成にも成功しました（1943）。

　雑学15） ： ワーファリン（Warfarin）と言う語は、発見されたウィスコンシン大学農場試験場に敬意を表してWisconsin

　　　　　　　　Agricultural Research Foundationの頭文字と、クマリン(Coumarin）の合成語です。

　　　　　　　　また、化学的構造分類から、ジクロマール、およびその誘導体はクマリン系とも称されます。

　　　　　　　　ジクロマール　　　　　　　　　　　　　　　　　　　ワーファリン

　ジクロマール、およびその誘導体は、最初は毒物として扱われ、殺鼠剤として使用されました。しかし、ある時、自殺のために大量に使用した人が蘇生する現象が発生しました。それまでは人体に対しても毒物として扱われたために臨床に応用されることはなかったのですが、これにより1954年に至ってAmerican Heart Associationによって心筋梗塞患者を対象に臨床治験が進められることになりました。

American Heart Associationによって抗凝固薬としての臨床応用がなされた結果、ワーファリンは治療薬として知られるようになりました。特に、有名になったのは、アメリカ大統領アイゼンハワーの急性心筋梗塞の治療において、I.S.W.right医師がワーファリンを使用し、これに成功したためです。

3－D－２ ビタミンＫの作用

　ビタミンＫ（ ＫはKoaglationのＫ ）は、脂溶性ビタミンであり、天然にはＫ１とＫ２があります。Ｋ１は植物由来で緑黄野菜・豆類に多く含まれます。Ｋ２は腸内細菌藪で合成されます。特に、納豆には多量に含まれます。１日に必要なビタミンＫは1.5μｇ／Ｋｇとされます。体内動態としてのビタミンＫの吸収経路には種々の報告がありますが、主として胆汁・膵液の存在下で小腸上部消化管で吸収され、リンパ系で運ばれて肝臓に達し、蓄積されます。肝臓では体内の約６０％のビタミンＫがプールされ、その量はＫ１で５～10μｇ、Ｋ２で50～100μｇであるとされます。したがって、吸収されたビタミンＫは、常に代謝されていると考えて良いでしょう。

　　　　　　　　　　　　　　　　ビタミンＫ１

　ビタミンＫ依存性蛋白質と呼ばれる一群の蛋白質があります。これには、凝固第Ⅱ因子、Ⅶ因子、Ⅸ因子、Ⅹ因子、プロテインＣ、プロテインＳなどが挙げられますが、これらの蛋白質はＣaを介してりん脂質膜（ＰＦ３？）に結合した状態で反応をおこなう必要があます。そのため、蛋白構造の一部に結合部位＝γ-カルボキシグルタミン酸残基（Gla基）を持っておかなければなりません。このγ-カルボキシグルタミン酸残基を持つ完全な（or正常）な形の凝固蛋白質を作るのに、ビタミンＫは不可欠です。

詳細には3-D-3にて述べますが、ここではワーファリンの作用概略の述べると以下のようになります。つまり、ビタミンＫ依存性蛋白質は生成過程で、一旦前駆体蛋白質が形成されます。これは、ＰＩＶＫＡと称されます（Protein Induced by VitaminＫ　Absence or Antagonistsの略）。ＰＩＶＫＡ蛋白質は、Ｎ末端近傍に３～１３個のグルタミン酸残基（Glu基）を持ち、これらがビタミンＫの存在下において酵素作用によってγ-カルボキシグルタミン酸残基（Gla基）に変わります。このことによって、ビタミンＫ依存性凝固蛋白質はＣaを介した結合能を得、正常な凝固活性を有するようになる訳です。

しかし、ビタミンＫ欠乏状態では様々のＰＩＶＫＡ蛋白質が作られ、凝固活性を阻害します。一般的にビタミンＫ依存性蛋白質が持つ９～１３個のγ-カルボキシグルタミン酸残基（Gla基）の内、１個欠けると凝固活性は50％に低下し３個以上欠けると75％以上の凝固活性が失われると言われています。

　　雑学16） ： 一般に“ＰＩＶＫＡ－Ⅱ”と示される蛋白質はプロトロンビン（第Ⅱ因子）の前駆蛋白質であり、 その

　　　　　　　　測定キットであるＰＩＶＫＡ－Ⅱモノクロナル抗体は３個以上のGla残基欠損蛋白質に反応すると言われ

　　　　　　　　ています。

　本邦で注目されたのは、ビタミンＫ不足によって新生児が出血死したことが大きい。

　新生児出血性疾患（通称メレナ、Hemorrhagic Disease of the Newborn）は生後０～６日頃に見られる後天性凝固障害症です。新生児は肝が未熟であること、また、腸内細菌藪が発達していないために、吐血・下血などの消化管出血を主徴とする症状が起こります。新生児メレナでは凝固因子の低下は極端でなく、正常成人の２０～３０％に低下している場合が多い。ビタミンＫ２シロップを薄めて投与することで治療・予防ができます。予防をしなかった母乳栄養児の５％にメレナが発生すると言われますが、加齢と共に解消されます。

　乳児ビタミンＫ欠乏症は生後１～２ヶ月の母乳栄養児に頭蓋内出血で発症します。特発性乳児ビタミンＫ欠乏症では頭蓋内出血のある場合、ビタミンＫ依存性凝固因子は正常成人の３～４％に激減していることが多い。ビタミンＫを１～２ｍｇ静脈注射すると１５分後には出血も止まり、３時間後には異常検査値も正常化してきます。１／1700で発生しますが、予防処置で１／10以下に激減します。経口摂取量の上昇と腸内細菌藪の発達で解消されます。なお、治療に供されるビタミンＫは、メナキノン（menaquinone）のあとのイソプレノイド基の数（Ｎ）よって分けられ、ＭＫ４～ＭＫ７と称されています。摂食により投与されます。

3－D－３ ワーファリンの作用

体内に取り込まれたビタミンＫ（キノン型ＶＫ）は、一旦、ビタミンＫレダクターゼによって還元されてヒドロキノン型ＶＫ（ＶＫＨ2）とな

ります。ＶＫＨ2はγ-グルタミルカルボキシラーゼのcofactorとして働き、前駆体蛋白質のＮ末端近傍に存在するグルタミン酸残基（Glu残基）をγ-カルボキシグルタミン酸残基（Ｇla残基）に変えます。この時、ＶＫＨ2は酸化されてＶＫ－２,３－エポキシドとなりますが、ミクロソーム上のビタミンＫエポキシドレダクターゼにより還元されて再びキノン型ＶＫに戻ります。

　　　　　　グルタミン酸残基　　　　　　　　　　　　　　　　γｶﾙﾎﾞｷｼｸﾞﾙﾀﾐﾝ酸残基

　　　　　　　　　　　　　　　γグルタミルカルボキシラーゼ

　　　　　　　　　　　　　　　　　　　ワーファリン

　　　ＤＴＴ　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　ＤＴＴＨ2

　　　ＮＡＤ

ビタミンＫレダクターゼ　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　ビタミンＫエポキシﾄﾞレダクターゼ

　　　　　ＤＴＴＨ2

　　　　　またはＮＡＤＨ　　　　　　　　　　　　　　　　ＤＴＴ

　ワーファリンはビタミンＫレダクターゼ、およびビタミンＫエポキシドレダクターゼの活性を阻害し、ＶＫサイクルを止める作用を持ちます。この結果、ＶＫ欠乏状態を作り出し、凝固活性を有する蛋白質は生成されないことになります。

3－D－４ ワーファリンによる治療

　抗血栓療法としては、抗血小板療法、抗凝固療法、線溶療法が挙げられます。抗凝固療法はその１つで、ワーファリンやヘパリンが使用されます。ワーファリン投与法は長期に簡便に治療できる特徴があります。出血傾向を助長する薬効作用があるため、投与時には出血傾向を防止するためのモニタリングが必要です。モニタリングの方法としてはＷＨＯはＰＴによるＩＮＲ値を指標とするよう推奨していますが、本邦ではトロンボテスト（ＴＴＯ）と併用されることが多い状況です。ＷＨＯの推奨するモニタリング領域はＩＮＲでは2.0～4.5とされていますが、国内の状況では、治療域は1.5～2.5とされます。

適応となる循環器疾患には以下のようなものが挙げられます。

　　①　心筋梗塞症（急性期の冠動脈再閉塞の予防、心室内血栓の予防、再梗塞の予防）

　　②　弁膜症や心房細動による塞栓症の予防、

　　③　冠動脈バイパス手術後、

　　④　人工弁置換術後、

　　⑤　肺塞栓症

　　⑥　深部静脈血栓症の予防と治療

　処方では１ｍｇ錠と５ｍｇ錠の２種類のワーファリンカリウムが使用されます。夕食後などに服用時間を一定にしておきます。10～30ｍｇを最初に投与し、その後２～４日目からその半量（２～９ｍｇ／日）を服薬するようにします。投与されたワーファリンは上部消化管から急速に吸収され、血中濃度は２～４時間でピークに達します。肝細胞に取り込まれ、ミクロソームで分解されます。血中での半減期は３７時間程度とされます。

　次の疾患ではワーファリン療法は禁避となります。

　　①　薬剤投与が計画的に行えない精神異常者、非協力的患者　←　酵素阻害による増強

　　②　アルコール中毒症、アスピリン常用者　　　　　　←　酵素阻害による増強

　　③　高血圧症：BPs＞180mmHg、BPd＞110mmHg　←　降圧剤が増強させる

　　④　腎疾患：腎不全　　　　　　　　　　　　　　　　←　排泄障害

　　⑤　肝疾患：非代償性肝硬変　　　　　　　　　　　　←　肝障害による増強

　　⑥　出血性素因：血小板減少症、凝固因子欠乏症　　　←　出血の危険性があるため

　　⑦　消化性疾患：消化性潰瘍、食道静脈瘤　　　　　　←　出血の危険性があるため

　　⑧　妊婦　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　←　胎児への催奇形性

　　⑨　手術を受ける患者

　　　　ＩＮＲ法による経口抗凝固療法のコントロール値

　　　　　　　　ＩＮＲ　　　　　病 態

　　　　　　　 2.0 ～ 2.5　　 　深部静脈血栓症の予防（高リスク外科侵襲を含む）

　　　　　　　 2.0 ～ 3.0　　 　腰部・大腿骨骨折手術

　　　　　　　　　　　　　　 深部静脈血栓症の治療

　　　　　　　　　　　　　　 　　 肺栓塞、ＴＩＡ

3.0 ～ 4.5　　 　反復性の深部静脈血栓症、肺栓塞

　　　　　　　　　　　　 　　　　心筋梗塞を含む動脈疾患

　　　　　　　　　　　　　　 　　移植動脈、人工弁

3－D－５ モニタリング

　血小板機能や凝固機能を代表とする止血機構は生理的に予備能をもつシステムであり、ある程度の範囲内で制御すれば、大出血を起こすことなく血栓の発現を防止できます。ワーファリン投与における抗凝血療法においては、病態に応じて凝固活性を制御することが重要ですが、欧米では血液自体が血栓傾向にあるためにワーファリン投与も強度に実施される（上表参照）傾向にあり、本邦では血液自体が出血傾向にあるために弱く投与される傾向があります。また、欧米ではＰＴで投与量を決定していますが、本邦ではＰＴ、またはＴＴＯ（トロンボテスト）、またはその両方でモニターしています。

　本邦でのワーファリン投与による制御範囲は正常値の２倍＝約２５％程度で実施されると考えられ、病態によって４０～１５％の範囲を取ります。トロンボテスト（TTO）では６０～２０％と考えられ、ＩＮＲ値では２．０前後と考えられます。５％以下の場合には出血の危険性が高いので注意が必要です。治療範囲内においても致命的な頭蓋内出血・消化管出血・泌尿器系出血が発生する場合があり、また、軟部組織（舌下・食道・後腹膜など）への出血に対しても注意しておく必要があります。また、ワーファリンは種々の薬剤と相互作用を引き起こすので、薬剤の併用に対しては慎重に選択する必要があります。

　投与前、およびワーファリンの初回大量投与、および安定期（１～２週間）までの確認においては毎日測定します。その後は１回／週、または１回／月の検査でも良いでしょう。

　　雑学17） ： エーザイ㈱はワーファリン製剤とビタミンＫ製剤との両方を販売していました。ワーファリンの治療効果

　　　　　　　　を判定する目的で、また新生児突然死症候群and／or予防のためのビタミンＫ２シロップの効果を判定す

　　　　　　　　るために、医師にトロンボテスト（TTO）を積極的に推奨しました。これがほとんど独占状態で売れた

　　　　　　　　ために診断薬事業部ができたそうです。この事業も現在は、資本参加した三光純薬に移しています。

　　雑学18） ：エーザイ㈱が販売しているTTO・HpTは Nycomed社（ﾉﾙｳｪｰ）からのＯＥＭ商品です。　Nycomed社は

　　　　　　　　Dr.Owrenが作ったTTO・HpTを供給するためにできた会社です。現在、エーザイ㈱は、TTO／HpTの販売

　　　　　　　　権を　Pan-Pacificの範囲で持っています。

設問（26）： ビタミンＫは脂溶性である、か？

Yes or No

設問（27）： 母乳にはビタミンＫが不足がちであるため、日本では新生児突然死症候群の予防のため、ビタミンＫ２シロップを服用させる病院が多い、か？

Yes or No

設問（28）： ＰＩＶＫＡとは凝固蛋白質合成段階でビタミンＫが不足したものである、か？

Yes or No

設問（29）： ワーファリンは当初は殺鼠剤として使われた、か？

Yes or No

設問（30）： アル中とワーファリン療法は無関係である、か？

Yes or No

3－D－６ 経口抗凝固剤と相互作用を示す薬剤

British Committee for Standardization in Haemostasis and Thrombosis Task Force(1984.May)に基づくＩＣＳＨ（International Council for Standardization in Haematology : 国際血液学標準化委員会）の報告からの抜粋。

薬剤名 増強作用の強さ 薬剤名 抑制作用の強さ

消化管系 ｼﾒﾁｼﾞﾝ ＋＋ ｺﾚｽﾁﾐﾝ(Questran) ＋

制酸剤、Mg塩 ＋ ｺﾚｽﾁﾎﾟｰﾙ(Colestid) ＋

流動パラフィン ＋

心血管系 ｽﾙﾌｨﾝﾋﾟﾗｿﾞﾝ ＋＋＋ ｺﾚｽﾁﾗﾐﾝ ＋

ｱﾐﾀﾞﾛﾝ ＋＋ ｺﾚｽﾁﾎﾟｰﾙ ＋

ｸﾛﾌｨﾌﾞﾚｰﾄ ＋＋ ｽﾋﾟﾛﾉﾗｸﾄﾝ ＋

ﾃﾞｷｽﾄﾛｻｲﾛｷｼﾝ ＋＋

ｷﾆｼﾞﾝ ＋＋

ｼﾞｱｿﾞｷｻｲﾄﾞ(Eudemine) ＋

ｼﾞﾋﾟﾘﾀﾞﾓｰﾙ(Persantin) ＋

ｴﾀｸﾘﾝ酸 ＋

呼吸器系 抗ﾋｽﾀﾐﾝ剤 ＋

CNS 抱水ｸﾛﾗｰﾙと同族体 ＋ ﾊﾞﾙﾋﾞﾂｰﾙ剤 ＋＋＋

ｸﾛｰﾙﾌﾟﾛﾏｼﾞﾝ(Largactil) ＋ ｸﾞﾙｾﾁﾏｲﾄﾞ ＋＋＋

ｼﾞｸﾛﾗｰﾙﾌｪﾅｿﾞﾝ(Welldorm) ＋ ｶﾙﾊﾞﾏｾﾞﾋﾟﾝ(Tegretol) ＋

ﾃﾞｷｽﾄﾛﾌﾟﾛﾎﾟｷｼﾌｪﾝ ＋ ｼﾞｸﾛﾗｰﾙﾌｪﾅｿﾞﾝ ＋

ｼﾞﾌﾙﾆｻﾙ(Dolobid) ＋ ﾊﾛﾍﾟﾘﾄﾞｰﾙ

ﾒﾌｪﾅﾑ酸(Ponstan) ＋ ﾌﾟﾘﾐﾄﾞﾝ(Hysoline) ＋

ＭＡＯ阻害剤 ＋ ﾌｪﾆﾄｲﾝ(Epanutin) ＋

三環型抗うつ剤 ＋

ﾄﾘｸﾛﾌｫｽ塩 ＋

感染症 ｺﾄﾘﾓｷｻｿﾞｰﾙ(Bactrim ,Septrim) ＋＋ ｸﾞﾘｾｵﾌﾙﾋﾞﾝ ＋

ﾒﾄﾛﾆﾀﾞｿﾞｰﾙ(Flagyl) ﾘﾌｧﾝﾋﾟｼﾝ ＋

ｱﾐﾉｸﾞﾘｺｼﾄﾞ系

ｱﾐｶｼﾝ

ｹﾞﾝﾀﾏｲｼﾝ

ﾈｵﾏｲｼﾝ

ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾏｲｼﾝ

ﾄﾌﾞﾗﾏｲｼﾝ

ｾﾌｧﾛｽﾎﾟﾘﾝ系 ＋

ｾﾌｧﾛﾘｼﾞﾝ

ｾﾌｧｿﾞﾘﾝ

ｾﾌｧﾏﾝﾄﾞｰﾙ

ﾗﾀﾓｸｾﾌ(Moxalactan)

ｸﾛﾗﾑﾌｪﾆｺｰﾙ ＋

ｻｲｸﾛｾﾘﾝ ＋

ｴﾘｽﾛﾏｲｼﾝ ＋

ｲｿﾆｱｼﾞﾄﾞ ＋

ｹﾄｺﾅｿﾞｰﾙ ＋

ﾐｺﾅｿﾞｰﾙ ＋

ﾅﾘｼﾞｷｼﾝ酸 ＋

ﾍﾟﾆｼﾘﾝG大量静注 ＋

ｱﾝﾋﾟｼﾘﾝ経口 ＋

ｷﾆｰﾈ塩類 ＋

ｽﾄﾚﾌﾟﾄﾄﾚｰﾄﾞ ＋

ｽﾙﾌｫﾅﾏｲﾄﾞ ＋

ﾃﾄﾗｻｲｸﾘﾝ ＋

内分泌系 蛋白同化ﾎﾙﾓﾝ ＋＋ 経口避妊薬 ＋

ﾀﾞﾅｿﾞｰﾙ ＋＋

ｸﾞﾙｶｺﾞﾝ ＋＋

ｻｲﾛｷｼﾝ ＋＋

ｸﾛｰﾙﾌﾟﾛﾊﾟﾐﾄﾞ ＋

副腎皮質ｽﾃﾛｲﾄﾞ ＋

ﾌﾟﾛﾋﾟﾙｻｲｵﾕﾗｼﾙ ＋

ﾄﾙﾌﾞﾀﾏｲﾄﾞ ＋

悪性腫瘍､免疫抑制 ｻｲｸﾛﾌｫｽﾌｧﾏｲﾄﾞ(Endoxan) ＋

ﾒﾙｶﾌﾟﾄﾌﾟﾘﾝ ＋

ﾒｿﾄﾚｷｾｰﾄ ＋

運動器系 ｱｻﾞﾌﾟﾛﾊﾟｿﾞﾝ(Rheumox) ＋＋＋

ﾌｪﾌﾟﾛﾊﾟｿﾞﾝ(Methrazone) ＋＋＋

ｵｷｼﾌｪﾝﾍﾞﾀｿﾞﾝ(Tanderil) ＋＋＋

ﾌｪﾊﾙﾌﾞﾀｿﾞﾝ(Butazolidin) ＋＋＋

ｽﾙﾌｨﾝﾋﾟﾗｿﾞﾝ(Anturan) ＋＋＋

ｱｽﾋﾟﾘﾝ､ｻﾘﾁﾙ酸剤 ＋＋

ｱﾛﾌﾟﾘﾉｰﾙ(Zyloric) ＋＋

ｼﾞｸﾙﾆｻｰﾙ ＋

ﾌｪﾝｸﾛﾌｪﾅｯｸ(Flenac) ＋

ﾌｪﾉﾌﾟﾛﾌｪﾝ(Feneprone,Progesic) ＋

ﾌﾙﾌｪﾅﾑ酸 ＋

ﾌﾙﾊﾞｲﾌﾟﾛﾌｪﾝ(Froben) ＋

ｲﾝﾄﾞﾒﾀｼﾝ ＋

ｹﾄﾌﾟﾛﾌｪﾝ(Orudis,Alrheumat) ＋

ﾒﾌｪﾅﾑ酸 ＋

ﾅﾌﾟﾛｷｾﾝ(Naprosyn,Synflex) ＋

ﾊﾟﾗｾﾀﾓｰﾙ大量一日用量(Distagesic中のﾃﾞｷｽﾄﾛﾌﾟﾛﾎﾟｷｼﾌｪﾝ) ＋

ﾋﾟﾛｷｼｶﾑ(Feldene) ＋

ｽﾘﾝﾀﾞｯｸ(Clinoril) ＋

栄養､血液系 ｱﾙｺｰﾙ ＋＋ ﾋﾞﾀﾐﾝＫ１ ＋＋＋

耳鼻科､食道 抗ﾋｽﾀﾐﾝ剤 ＋

ﾌｪﾅｿﾞﾝ ＋

皮膚科 抗ﾋｽﾀﾐﾝ剤 ＋

ｱﾙｺｰﾙ中毒 ｼﾞｽﾙﾌｨﾗﾑ(Antabuse)

＊ 本内容は、風間睦美・安部英：経口抗凝固療法ガイドライン；Blood ＆ Vessel，Vol.16，431～440（1985）にも内容が紹介されている。

ﾌｪﾊﾙﾌﾞﾀｿﾞﾝ(Butazolidin) ＋＋＋

ｽﾙﾌｨﾝﾋﾟﾗｿﾞﾝ(Anturan) ＋＋＋

ｱｽﾋﾟﾘﾝ､ｻﾘﾁﾙ酸剤 ＋＋

ｱﾛﾌﾟﾘﾉｰﾙ(Zyloric) ＋＋

ｼﾞｸﾙﾆｻｰﾙ ＋

ﾌｪﾝｸﾛﾌｪﾅｯｸ(Flenac) ＋

ﾌｪﾉﾌﾟﾛﾌｪﾝ(Feneprone,Progesic) ＋

ﾌﾙﾌｪﾅﾑ酸 ＋

ﾌﾙﾊﾞｲﾌﾟﾛﾌｪﾝ(Froben) ＋

ｲﾝﾄﾞﾒﾀｼﾝ ＋

ｹﾄﾌﾟﾛﾌｪﾝ(Orudis,Alrheumat) ＋

ﾒﾌｪﾅﾑ酸 ＋

ﾅﾌﾟﾛｷｾﾝ(Naprosyn,Synflex) ＋

ﾊﾟﾗｾﾀﾓｰﾙ大量一日用量(Distagesic中のﾃﾞｷｽﾄﾛﾌﾟﾛﾎﾟｷｼﾌｪﾝ) ＋

ﾋﾟﾛｷｼｶﾑ(Feldene) ＋

ｽﾘﾝﾀﾞｯｸ(Clinoril) ＋

栄養､血液系 ｱﾙｺｰﾙ ＋＋ ﾋﾞﾀﾐﾝＫ１ ＋＋＋

耳鼻科､食道 抗ﾋｽﾀﾐﾝ剤 ＋

ﾌｪﾅｿﾞﾝ ＋

皮膚科 抗ﾋｽﾀﾐﾝ剤 ＋

ｱﾙｺｰﾙ中毒 ｼﾞｽﾙﾌｨﾗﾑ(Antabuse)

＊ 本内容は、風間睦美・安部英：経口抗凝固療法ガイドライン；Blood ＆ Vessel，Vol.16，431～440（1985）にも内容が紹介されている。