**凝固資料**

**ＰＴ／ＩＮＲと標準化**

**株式会社　レイデックス**

**目 次**

１．臨床検査における標準化の意義と目的 ………………………………………………………… (２)

２．ＰＴの表現方法 …………………………………………………………………………………… (４)

３．凝固分野における標準化の流れ

　３－１ 歴史的経緯 ………………………………………………………………………………… (５)

　３－２ 国際標準トロンボプラスチン試薬の設定………………………………………………… (７)

　３－３ 国際標準トロンボプラスチン試薬の入手方法…………………………………………… (８)

４．ＷＨＯの勧告

　４－１ ＷＨＯテクニカルレポートの要旨………………………………………………………… (11)

　４－２ ＩＣＳＨとＩＣＴＨのレポート…………………………………………………………… (15)

　４－３ ＩＳＩ、およびＩＮＲの使用方法………………………………………………………… (16)

５．測定方法の補足（その他の資料から）

　５－１ 検体採取方法………………………………………………………………………………… (17)

　５－２ 検体の処理、および保管…………………………………………………………………… (18)

　５－３ 標準血漿と、その調製方法………………………………………………………………… (18)

　５－４ 測定基準操作方法について………………………………………………………………… (19)

６．ＰＴ測定における正確度と精密度

　６－１ ＰＴ測定における誤差の理解……………………………………………………………… (20)

　６－２ 精度管理法…………………………………………………………………………………… (21)

７．当社でのＩＳＩ値設定方法、および管理方法 ………………………………………………… (24)

８．ＩＳＩ／ＩＮＲシステムの問題点 ……………………………………………………………… (26)

９．凝固反応の理解（製造者としての立場から） ………………………………………………… (28)

10．今後の動向 ………………………………………………………………………………………… (32)

11．ワーファリン

　11－１ はじめに……………………………………………………………………………………… (33)

　11－２ ビタミンＫの作用…………………………………………………………………………… (34)

　11－３ ワーファリンの作用………………………………………………………………………… (35)

　11－４ ワーファリンによる治療…………………………………………………………………… (36)

　11－５ モニタリング………………………………………………………………………………… (37)

12．文献 ………………………………………………………………………………………………… (38)

**ＰＴ／ＩＮＲと標準化**

**１．臨床検査における 標準化 の 意義 と 目的**

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３つの段階が考えられます。

　まず１番目は、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らないと言うことです。院内（あるいは同一検査室内）において、同一の検体を測定した場合には同一の結果が出ることが必要で、それは日が変わっても、また検査者が代わっても常に同一の結果が示されるべきです。そのためには、それぞれの施設は自らの環境に適した手技や手法、器具を統一し、測定誤差を最大限に小さくする工夫をしておくこと、さらには正確度や精密度を管理し、長期に渡って結果を比較できるシステムを持っておけば、まず安心ではないかと思われます。

　２番目は、各検査室間で結果が一致することが必要です。

 臨床検査では測定原理が異なる場合が多々ありますから、この場合、一致しなくとも検査結果に類似性のあることが必要です。現在は、ヒトの移動の激しい社会状況であり、患者の転院はごく普通に発生しています。このため、病院ごとに検査結果が異なっていると不信感が生まれ、適切な処置ができなくなります。したがって、各検査室間の密接な連携のもと、結果が一致するような努力をおこなうことが必要です。

　３番目は国際的レベルで結果を一致させることが必要です。

 科学的知見は海を越えて研究されており、海外で得られた科学的進歩は国内の医療にも反映されるべきです。そのためには、国際比較ができる条件を持っていることが必要です。国際的な情報交換を活発におこない、情報の収集と共に自分の意見を世界的な場に反映させて行く行動が必要ではないでしょうか。

 これらのことを実行して、はじめて安定な結果となる訳ですが、それがためには大変な努力と経費がかかると思われます。したがって、これは実現不可能な理想論ということになりますが、少なくともこのような状況の創出を前提にしなければ「安心」できる医療は実行できないことになります。ですから、理想論だと言わず、実現に向かってコツコツと努力して行かなくてはならないのではないでしょうか。

　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から、是非、有効に活用していただきたいと思います。ただ、一部にはサーベイの評価＝熟練度と考えて、評価のみに力点を置く場合があるので、注意しなければならないと思われます。

　一方、上述の事項は臨床検査全体に共通して適用されることです。サーベイでは臨床検査項目全部を実行することは不可能です。したがって、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。これにより、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ると言うことを理解して置かなければならないでしょう。

|  |
| --- |
| **臨床検査における 標準化 の 意義 と 目的** **前提条件（何が対象となるか？）** 一般的に広く測定されている項目（ポピュラー）であって、 臨床的有用性のある項目であること。 **意義と目的** ① 検査室内で検査結果が常に一定していること。 ② 検査室間の結果を一致させるか、または、類似性をもたせること。 ③ 国際的レベルで結果を一致させること。**結果** 検査担当者（施設）の熟練度が評価される。 |

**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。

　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．凝固分野における 標準化 の 流れ**

 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。この決議にもとず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。

|  |
| --- |
| **凝固検査 における 標準化 の 流れ**　　　**標準血漿の設定** 1971/10　Dr.Miale（ｱﾒﾘｶ）  第二回 Maditerranean Congress on Thrombolism（ﾄﾙｺ:ｲｽﾀﾝﾌﾞｰﾙ）　　　　　　　 　“基本的に標準血漿の概念は有用” 　　　　　　　　　　　　　↓ ＮＩＢＳＣ 　　 **標準試薬の設定** 1969、70 ICTH、Dr.Poller（ｲｷﾞﾘｽ) 1976 ＷＨＯ標準試薬の設定（Batch 67/40） 1983 ＷＨＯテクニカルレポートの発表  ↓ 国際標準品の配布 |

 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。

**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、BiggsandDenson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ＩＣＨＴ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。

|  |
| --- |
| **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＝1.048OBT/79ウシ脳、ISI＝1.011RBT/79ウサギ脳、ISI＝1.413←ＣＲＭ1491991 ＣＲＭ149RISI＝1.3431995 ＣＲＭ149SISI＝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、GoldenStandards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。

**３－３ 国際標準トロンボプラスチン試薬の入手方法**

国際標準トロンボプラスチン試薬は、ＥＣの一部門であるＢＣＲ（ベルギー、前記参照）から購入できます。1997年１月現在では、以下の３種類が入手できます。

ヒト脳由来→ＢＲＴ／４４１（？）

ウシ脳由来→ＯＢＴ／７９（ＣＲＭ１４８）

ウサギ脳由来→ＲＢＴ／９０（ＣＲＭ１４９Ｓ）

購入の方法としては、以下のスキームに従って進めるのが良いと思われます。

① Ｆａｘで在庫確認をおこなう。

消費されて在庫がなくなっている場合や、新規ロットに置き換えられている場合があるため、分譲してもらえる標準試薬があるのかどうかを、まず在庫の確認をおこなう。在庫のない場合には「ない」とだけ返事がきたり、新規ロットがあっても紹介してもらえない場合を想定して作文する。電話でも良いが、なるべく証拠が残るような方法が望ましい。

連絡先：Fax323-14-590406Tel.32-14-571211Directline719

IRMM Management of Reference Materials Unit

Frederique Siccardi（←人名、担当者が代わるので注意）

住所：Community Bureau of Reference(BCR)

Commission of the European Communities

Ruedela Loi, 200B-1049 Brussels

② 発注＆取引条件の確認

a) 発注に際し、数量・商品名・カタログNo.を明確に示し、Purchase Orderを作成して、送付する。送付の方法はFax or郵送のいづれか／両方を示す。

b) 価格の確認をおこなうと共に、通貨を決める。通貨はＥＣ共通通貨か、ドルか、ベルギーフランかのいづれかである。

また支払い方法を決める。前払いか、請求書（Invoice）による支払いか、銀行振込（Bank Transfer、Bank Check）か、など。銀行間では領収書（Receipt）は発行されないので銀行に発行してもらう。

c) 輸送方法の確認（or指定）する。指定しない場合はFedexの宅配便で冷却されずに送られてくる場合がある。輸送業者を明確にし、その業者を通じて輸入するように手配する方が安全である。輸入業者としては郵船航空㈱や近鉄Exp.などがある。郵船航空㈱はベルギーに支店があるため、直接集荷できる。なお、輸入業者は通関手続きも代行してくれるので便利である。

③支払いの実施。

Invoiceに対する支払いが望ましい。Receiptがないと不安だが、ある面では相手個人に渡っていないことを信用せざるを得ない場合もある。

④輸入手続きの実施

厚生省と所轄税関に「試験研究計画書」、「輸入申請書」、「商品説明書」、「念書」を提出し、承認をもらう。これらの書類は輸入業者が持っているので、それに書き込むと良い。その後の手続きは輸入業者と相談しながら実施する。

⑤入手と通関費用の支払い

上記の手続きにより輸入できる。手元に配達されるよう手配すると共にそれらに関わる経費を支払う。



**４． ＷＨＯの勧告**

**４－１テクニカルレポートの要旨**

ＷＨＯのテクニカルレポート（1983、Geneva）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）している。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、が記されている。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（HumanandRabbitBrain）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る。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。

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る。（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Normal１～２、Patients１～６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。

|  |
| --- |
| Sample IRP WRPNormal 1 Ⅰ ⅡPatient 1 Ⅲ ⅣPatient 2 Ⅴ ⅥPatient 3 Ⅶ ⅧPatient 4 Ⅸ ⅩPatient 5 ⅩⅠ ⅩⅡPatient 6 ⅩⅢ ⅩⅣNormal 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容混合する。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る。

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る。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する。

測定は２重測定ではなく、シングルでおこなう。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るが、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いまうこと、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ある。

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る。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％以下であるべきである。

較正（Calibration）の例として次ページのようなデータが示されている。

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) Hospitaldela Santa CreuI Sant Pau, Serveid’ Hematologia, Barcelona, Spain.

(3) Centre Hospitalo –Universitaore de Paris, Laboratoire Centrald’ HematologiedeI’ Hotel-Dieu,Paris,France.

(4) Instituto Nacionalde 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) Klinikumder Albert - Ludwigs-Universtat, Zentrale Einrichtung Tranfusionmedizin, Freiburgi Br.,Federal Republic of Germany.

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

|  |
| --- |
| **Appendix 1****Example of use of suggested method for reporting the data for the calibration of a Working Reference Preparation of thromboplastin against an International Reference Preparation.**In this example the test results are used which are obtained on only one of the ten occasions of which a calibration procedure exists.The real calculations are done with the pooled data obtained at all ten occations.Date:2.6.1983 Water-bath temperature 37.1℃Thromboplastin:1. Rabbit brain thromboplastin Working Reference Preparetion. 2. International Reference Preparation of Thromboplastin Rabbit,Plain,RBT/79.Endpoint recording: tilt tube technique(waterbath)Time startede: 10h15 Time finished: 11h00Table 1:Suggested protocol for the recording of clotting times in the calibration of a Working Reference Preparation of rabbit Thromboplastin. International reference Working referencepreparation RBT/79 preparationPlasma Order of Clotting time Order of Clotting time testing (seconds) testing (seconds)Normal 1 1 15.9 2 13.8Patient 1 3 21.4 4 19.6Patient 2 5 35.6 6 30.8Patient 3 7 29.1 8 28.6Patient 4 9 21.8 10 19.6Patient 5 11 41.1 12 33.6Patient 6 13 37.9 14 28.1Normal 2 15 17.1 16 15.2**Caliculation**The International Sensitivity Index of the working preparation(ＩＳＩＷＲＰ) is obtained by plotting the prothrombin times using the two thromboplastins on logarithmic axes as shown in Fig.1, fitting a straight line and estimating the slope. Any suitable statistical procedure for fitting the line and for estimating the slope and standard error of the slope may be used. However,the technique of orthogonal regression1 may be preferred. With this technique,the slope,ＣＩＲＰ，ＷＲＰ,can be calculated from the following formulae: |



Fig.1.DoublelogarithmicplotofprothrombintimesobtainedononeoutoftendifferentoccasionsfordeterminationoftheInternationalSensitivityIndex.

Example

UsingthedatafromTable1,thecalculatedvalueforＣＩＲＰ，ＷＲＰis0.968.

TheInternationalSensitivityIndexforRBT/79is1.4.Thus,theInternationalSensitivityIndexfortheworkingreferencepreparationisestimatedas0.968×1.4＝1.355.

ThestandarderrorforＣＩＲＰ，ＷＲＰiscalculatedas0.072.Thus,S.E.(ISIWRP)＝0.072×1.4＝0.100.ThecoefficientofvariationfortheISIoftheworkingreferencepreparationis100×0.100/1.355＝7.4％.ThecoefficientofvariationislargebecouseTable1containsdatafromonlyeightplasmas,i.e.,oneday’stests.Inpractice,testswouldbeconductedonseveraldaysandthecoefficientofvariationusingthecombineddatawouldbesmaller.

**４－２ ＩＣＳＨとＩＣＴＨのレポート**

ＩＣＳＨとＩＣＴＨは共同して、ThrombosisandHaemostasis（1985）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）」を掲載している。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る。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。

である。例として下記のグラフと表が示されている。

Thrombosis and HaemostasisにReportされた内容

|  |
| --- |
| Normal:12.0sec.→Patient’s:18.0sec.ISI＝2.3ＰＲ PT index Percent ＩＮＲ1.0 100 100 1.01.1 91 74 1.21.2 83 57 1.51.3 77 48 1.81.4 71 41 2.2→1.5 67 35 2.51.6 62 31 2.91.7 59 28 3.41.8 56 25 3.91.9 53 23 4.42.0 50 21 4.92.1 48 20 5.52.2 45 18.5 6.12.3 43 17.4 6.82.4 42 16.4 7.52.5 40 15.4 8.22.6 38 14.6 9.02.7 37 13.9 9.82.8 36 13.2 10.72.9 34 12.6 11.63.0 33 12.0 12.5 |

**４－３ＩＳＩ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、測定に供する。

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、測定する。

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、それを使用する。

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。

②ＰＴ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値が表示されている。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し（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

れる。

**５．測定方法の補足（その他の資料から）**

**５－１検体採取方法**

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、シリンジ採血では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。

① 採血の実際。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。

＜採血方法＞

① 国際標準法＝２－シリンジ法

シリンジ採血を行う。シリンジ内に静脈血0.5～1.0mLを採取したら、注射針は静脈内そのままの状態でシリンジをはずす。そして直ちに、別の新しいシリンジを連結して、所定量の採血を行う。そして、予め所定量の抗凝固剤入りのプラスチック試験管に規定量の静脈血を分注し、よく転倒混和する。

欠点：手技が煩雑で効率が悪い。

② シリンジ採血法（１－シリンジ）

一回の静脈採血で所定量を採取し、抗凝固剤入りのプラスチック試験管に分注する。

欠点：・採血技術の未熟練により組織液が混入しやすい。

・採血した後に抗凝固剤と混和するので迅速な処理が必要。

③ バクテーナー（真空）採血法

初回の採血管には、CBC検査など少量の採血を行い、二回目に凝固検査用の採血管を装着することで、作業上は２－シリンジ法と同様の効果がある。

欠点：所定量の採血ができたか否か判断できないときがある。

利点：採血管に静脈血が入ったと同時に抗凝固処理がなされている。

留意点→採血は可能である限りバクテーナー（真空）採血法が望まれる。採血状態の良し、悪

しが測定成績に大きく影響する。検体容器中の血液量が適当かどうか確認する。

**５－２検体の処理および保管**

採血後の血漿中の因子は不安定であるから、それ以降の作業を速やかに実行するのが望ましいが、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い。しかし、本稿では、WHOのガイドラインに従って以下に解説する。

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coldactivation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の冷却活性化など）

**５－3標準血漿と、その調製方法について**

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のガイドラインに従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。また、標準物質のランク付けとして、一次・二次などで表現する場合もありますが、上記ガイドラインにしたがった新鮮プール血漿は一次標準血漿と考えてよいでしょう。次に、二次標準血漿としてランクされるものには、以下のような血漿であろうと考えます。

＜一次標準血漿＞

WHOのガイドラインに従って選別された正常男女計40名からの新鮮等量プールで、採血後4時間以内に全ての作業が完了し、測定に使用されたもの

＜二次標準血漿＞

(1) 一次標準血漿作製のガイドラインに従って作製された血漿ではあるが、個々の必要条件が異なるもの。

① 採血後4時間以降に全ての作業が完了し、測定に使用されたもの。または－70℃凍結保存を行ったものを使用した。

② プール件数が40名以下であること。

(2) 一次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使用する。

一般に、リファレンス血漿として市販されている凍結乾燥血漿を使用するユーザも多いですが、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。必ず確認検定を実施することが重要です。

**５－４測定基準操作方法について**

ICTH／ICSHのReference法について以下基本的な内容について解説します。

・測定の方法は、内径10mmガラス試験管を用いたマニュアル法で実施する。

・測定は37℃恒温水槽中で行い、凝固観察方法は試験管傾斜方法（用手法）、または、ワイヤー・ループ法とする。

・被検血漿の37℃予備加温については、添付説明書に従い、特に、指定時間を越えてはならない。

・試験管傾斜方法の場合、水槽からの試験管の出し入れは１秒間隔で観察する。また、ワイヤー・ループ法の場合、ワイヤー・ループの上下も同様に１秒間隔で行う。時間を越えてはならない。

・試験管傾斜方法の場合、水槽からの試験管の出し入れは１秒間隔で観察する。また、ワイヤー・ループ法の場合、ワイヤー・ループの上下も同様に１秒間隔で行う。

**６．ＰＴ測定における正確度と精密度**

**６－１　誤差の理解**

1. ＩＮＲ値としての誤差

　　　　ＰＴ測定の秒数としての変動幅が２％であり、且つ、その差は対数的に発生すると仮定すると、

各秒数での変動は右表のようになる。

 表１．ＰＴ測定結果の変動幅

 10.0秒に対し±0.2秒の範囲を設け、両対数グラフ上に 秒 数 変 動 範 囲

　　　　　　平行移動線を引く。この時、各ポイントで交差する幅を 　 　 10.0秒 9.8 ～ 10.2

　　　　　　変動量としている。　　　　　　　　　　　　　　　　　 　 15.0秒 14.7 ～ 15.3

　　 　この時、20.0秒の場合のＰＴ比としての変動範囲は、 　　 20.0秒 19.6 ～ 20.4

 （ 20.4秒／9.8秒） ～ （ 19.6秒／ 10.2秒） 30.0秒 29.4 ～ 30.6

 　　　　＝ 2.0816 　　　 ～ 　　　1.92156

 よって、ＰＴ比としての最大変動誤差は

 ＝ （2.0816 － 1.9215）÷ 2.0816 ＝ 7.6％

 ＝ （2.0816 － 1.9215）÷ 1.9215 ＝ 8.3％

 ＰＴ試薬のＩＳＩを 1.0、あるいは 2.0 とするとき、ＰＲ＝2.0でのＩＮＲ値としての変動は

　　　　ＩＳＩ＝1.0 の 時、　ＩＮＲ ＝ 2.0816 ～ 1.9215 （差 ＝ 0.1601、誤差 ＝ 8.0％）

　　　　ＩＳＩ＝2.0 の 時、　ＩＮＲ ＝ 4.2327 ～ 3.7881 （差 ＝ 0.4446、誤差 ＝ 11.1％）

　　　したがって、通常に測定した場合でも、ＩＮＲの誤差としては約１０％発生し得る。

　　② ＩＳＩ値を検定する時の誤差

　　　　上記表１．の如くＰＴ測定結果が変動した場合を想定し、正常／異常の２点からSlopeの幅を

算出すると、ＩＳＩ＝1.0に対する変動は以下のようになる。

 0秒 を 正常値として、20.0秒から求めたSlopeは 0.9454 ～ 1. 0612

 Log（20.0／10.0）＝Ａmin ＊ Log（20.4／9.8）　～　Ａmax ＊ Log(19.6／10.2)

 ＩＲＰを１回目とし、ＷＲＰを２回目とすると、

 9454×0.9454 ＝ 0.8937 ～ 1.0612×1.0612 ＝ 1.1261

 \* ISI＝2.0の場合は×2.0する。

 \* ２点法、あるいは相関法でも同じ。

 10.0秒 を 正常値として、30.0秒から求めたSlopeは 0.9648 ～ 1.0378

 Log（30.0／10.0）＝Ａmin ＊ Log（30.6／9.8）　～　Ａmax ＊ Log(29.4／10.2)

 ２回の誤差があった場合は　 0.9308 ～ 1.0770

 \* ISI＝2.0の場合は×2.0する。 \* ２点法、あるいは相関法でも同じ。

　　　したがって、正常値に対する異常値の範囲をどこまでとるかによってＩＳＩ値の変動幅は異なっ

てくるが、ＰＲ＝２.0の場合では１ステップでＩＳＩ値は約11％変動する。

　　　また、延長検体を使用する方がブレは少なくなる。

 個別測定誤差とＩＳＩ設定誤差の両者が発生した場合

　　　　一端、別途に設定されたＩＳＩ値を使用して通常の測定を実施した場合には上記に①、②の両

方が加算される。正常値10.0秒に対し、異常値が20.0秒である場合の誤差を算出すると、

 0816）1.0612 ～ （1.9215）0.9454 ＝　2.177 ～　1.854

 ＩＮＲ ＝ 2.0 に対する誤差は 108.8 ～ 92.7％

　　　したがって、ＩＮＲ値として見る場合、少なくとも±８％はブレていると考えた方が良い。

**６－２　精度管理**

　凝固線溶検査の多くが生物学的機能量として測定されています。生物学的機能の測定は、測定試料・測定方法または測定機器、および測定試薬のそれぞれに起因する重大な測定誤差があり、少なくとも測定シムテムの検証を行うにあたっては、下記の事項を厳守して実施する必要があると考えられます。

 ① 評価基準測定方法を明確化し、これを対照法とする。疑義が生じた場合には対照法で測定できるようにして置く。また、対照法と機器との差を評価して置く。凝固・線溶検査の国際的な基準方法は、マニュアル法である。従って、自検査室でのマニュアル法による測定操作技術の検定も分析できるようにしておかなければならないと考えられる。

 同一試料であっても、測定方法・測定試薬によって測定結果が異なるので、できるだけ共通の試料・試薬を用いるべき（準備するべき）である。

 試薬・試料とも、その調製および処理、それらの使用方法に関しては、国際的に認知されたガイドラインに従って操作・実施のこと。（後述の項を参照のこと。）

 活性％表示で測定結果を比較検討する場合、検量線作製に使用する標準血漿には、必ずWHOガイドラインに準じて作製された共通の正常者由来新鮮プール血漿を使用する。市販品の測定値付記コントロール血漿やリファレンス血漿も存在するが、これらの製品の中には、試薬の種類が異なれば、同一機器の測定であっても、測定結果が異なることがよく経験されるので、注意を要する。

 測定試料の多くは血漿であるが、採血・抗凝固剤処理・試料の保存など、諸条件により測定値が変動する。従って、試料の保存時間など無理のない実施スケジュールを立てること。

 ［測定機器の管理について］

 測定機器管理の実際

 測定試薬および測定試料は検定期間を通してできる限り不変的な測定条件を設定することが望まれる。一般的には以下の如く実施される。

 測定試薬について： 測定項目ごとの試薬を実施日ごとに調製するわけであるが、試薬は全て同一ロット品を用い、その溶解方法・測定までの保存・保存有効時間設定など試薬取り扱い説明書に従って一貫性のある作業をする。

 測定試料について：　同一ロット品の市販管理用コントロール血漿・リファレンス血漿、時として－70℃凍結保存プール血漿などを用いることもある。測定試薬と同様に、各血漿とも溶解調製・保存など標準化された作業とする。

 c) 測定機器について

 任意の試料を用いて、機器のテストランを行い、ハード的な操作・機構等の異常がないことを確

認する。

 機器管理のための測定検討内容

 検査値記載の標準血漿（正常および異常）を５回重測定を行い、当日測定値、測定日の差を統計

的に検定する。

 b) 検量線作製による検定

 各検査項目の検量線を作成し、活性％＝100％，50％，25％，の実測値を経時的あるいは経日

的に比較検討する。

［測定試薬の管理について］

 測定試薬性能の劣化など性状の変化に対する測定値の変動をチェックするために実施されます。

 ここで重要な点は、測定機器と測定試料は必ず同一条件下で、かつ経時的な成績比較を行うということです。本来、測定機器検定のためには、標準試薬を用いて機器の測定精度をチェックすることが望まれるのですが、通常では、検討機器と検討試薬の組み合わせによる精度管理手法を実行し、許容範囲を越えた測定値の変動を認めた際に、機器側を試薬側のそれぞれの性能をチェックするのが効率的であろうと思われます。

［試料および試薬の調製方法について］

 試料中に含まれる凝固・線溶因子の多くは、前述の如く不安定であり、測定に用いる各試薬は、凝固因子・凝固補助物質・プロテアーゼなどを含む、いわゆる生物活性試薬であるため、本質的には試薬間差・ロット間差の問題や、調製方法および使用上の注意など、多くの厳守事項があります。特に注意しなければならない事項についてのみ以下に記載します。

 測定試薬の調製方法

 通常の検討では、市販試薬が使用されます。必ず試薬取り扱い説明書を熟読し、試薬溶解量・ 攪拌方法・溶解後の放置条件・保存条件など指示内容に従って作業する。

 市販コントロール・リファレンス血漿など

 試薬と同様に慎重に溶解・調製する必要があります。正常域の血漿の場合、不均一な溶解状態で測定された場合であったとしても凝固反応系の特徴として著明な測定誤差の発生は少ないのですが、異常域の血漿の場合には、顕著な誤差が認められます。凍結乾燥血漿の溶解は所定量の蒸留水を添加後、緩やかに混和してから少なくとも室温にて30分～60分は放置する必要があります。そして、その後緩やかに攪拌してから使用まで冷所に保存します。

当社での 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。

|  |
| --- |
| 当社ＩＳＩの設定方法国際標準PT試薬（ＣＲＭ）Europian　Communityに在庫状況・価格・輸送方法・支払い方法・発注量について問い合わせを行ない、入手の条件が決定すればPurchase　Orderの作成と輸入手続き書類を作成します。ＷＨＯプロトコール測定試料（大バッチ）（正常血漿／ワーファリン血漿）(1) まず、社内の健常人（約200～300名）からクエン酸採血し、当社標準PT試薬の候補と国際標準トロンボプラスチン試薬で測定を行ないます。正常平均値と同等な結果の出る凍結乾燥血漿を当社標準血漿として選定します。(2) 次にワーファリン検体（約100検体）を測定し、国際標準品と秒数の対数相関をとり、一次回帰式から当社標準PT試薬のISI値を設定します。(3) 用手法・各種機器での相関性（秒数の対数値相関）をとり、用手法ごとのISI値の変動を調べます。(4) 以上の結果から最も適正な試薬を選択し、これを当社標準PT試薬（STD）とします。この試薬は製品系列ごとに設定され、約１年間運用されます｡当社検定PT試薬(1) 当社標準PT試薬、および当社標準血漿での測定結果を対照として、各製品ロットを測定します。(2) 次式に従ってISI値を算出します。異常検体の秒数　ISIa　／異常検体の秒数 ISIb　＝INR＝　正常検体の秒数／正常検体の秒数＊ISIa：当社標準PT試薬のISI値＊ISIb：製品ロットのISI値ＷＨＯプロトコール 国際標準品、およびワーファリン検体を使用して、用手法で測定し、製品のISI値を算出します。各種機種間ISIの補正検定 |

**８．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。

　しかしながら、問題点があるからと言って、全ての点で否定すべきではないと思われます。

　「標準化」は検査の実行上、必要なことです。したがって、自らの工夫や改良によって、「標準化」を目指すことが検査に関わる人間にとって大切なことではないでしょうか？

|  |
| --- |
| ＩＳＩ／ＩＮＲシステムの問題点 １．測定方法に関する規定 ＷＨＯ勧告では測定方法を規定していない。 機器により、試薬感度が異なる。 ２．検体 正常値を得るための基準が無い。 ＰＲ値がブレる。 正確度・互換性がない。 異常値の規定がなく、異常値のレンジによってＩＳＩが変わる。 ３．使用の問題 治療域が明確になっていない。 医師がＩＮＲを知らない（or使用しない）。 ４．ＩＮＲシステム 低値ほどＩＮＲ値が変動し易い。 多様な試薬特性に対し、一律の計算方法では適応できない。 |

**９．　凝固反応の観点から、（製造者としての立場から）**

**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。

 **２． ＰＴの反応機序**

 **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**

 **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。

 **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。

　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）

 **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。

 **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。

 **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)

 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。

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

**10．今後の動向**

　各種のサーベイ等でＩＮＲの調査が実施されていますが、必ずしも良好とはなっていないのが現状です。そのため、よりＩＮＲ値を以って標準化をおこなうために、いろいろの提案がなされています。

　まず第一は、各施設において自施設での補正ＩＳＩを持つことです。これはＩＮＲ－Ⅱとも称されます。つまり、国際標準品と比較した場合の値と、自施設の結果の差をあらかじめ算出しておくことで結果を一致させようと言うものです。これには自施設で国際標準品を取り寄せ、直接試験をすることが必要です。手法的には、ワーファリン検体を使用して傾きを補正するものや、緩衝液やフィブリノーゲン添加溶液、さらには吸着血漿などを使用して血漿の希釈検量線から補正しようとするもの、あるいは、サーベイ結果を使用して計算しているものなど……が挙げられると思います。

　第二には、メーカーで検討された機器毎の結果を使用する方法です。最近では試薬メーカーが各種の測定機に対してそれぞれのＩＳＩ値を持つようになりました。試薬メーカーでは全ての機械に対してのＩＳＩ値を持っていると言う訳ではありませんし、また、機械と試薬のメーカーが違う場合は複雑なので注意が必要ですが、相談すれば有用な情報が得　　　られます。ただ、メーカーが検討した際の正常値が基準となっていますから、自施設との差が発生する可能性はさけられません。

　第三には、ワーファリンコントロールする際の治療域を明確化し、ＰＴ結果とリンクさせようとするものです。前述の如く、本邦における治療方法は欧米とは異なっています。そこで治療方法を見直し、どのようにコントロールするのかを根本から再設定しようとするもので、医師を中心に検討がおこなわれています。早急な結論が望まれます。

　第四には、ＩＮＲ標準血漿を作ろうとするもの。

　第五には、ＩＮＲでの標準化に対してはＰＴ試薬に依らず、トロンボテストで標準化をしようとする試みもあります。

　いづれにしても、本邦においては現在鋭意検討がなされている状態で、まだ結論は得られていません。しかし、いづれは納得のいく結論が得られるのではないでしょうか。

**11．ワーファリン**

 11－１ 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た。取り次ぎもままならないまま、たまたま

　　　面談したのがここの生化学者 K. P. Linkであった。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

　　　なかったろうか。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る。

　　　　さて、生化学者であった K. P. Linkはコツコツと調査を始めた。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た（1943）。

　　　　ちなみに、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）

　　　の合成語である。　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

 とも称される。

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した。それまで人体に対しても

　　　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る。

　　　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った。

　　　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．Ｗright医師がワーフ

　　　ァリンを使用した逸話は有名である。

  **11－２ 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がある。

　　Ｋ１は植物由来で緑黄野菜・豆類に多く含まれる。Ｋ２は腸内細菌藪で合成される。特に、納豆に

　　は多量に含まれる。１日に必要なビタミンＫは1.5μｇ／Ｋｇとされる。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るが、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、蓄積される。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であるとされる。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。

　　　　　　　　　　　　　　　　ビタミンＫ１

　　　　ビタミンＫは、完全なor正常な形の凝固蛋白質を作るのに不可欠である。ビタミンＫ依存性蛋

　　　白質と呼ばれる一群の蛋白質には、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などが挙げられるが、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る。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らない。

　　　　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る。これは、ＰＩＶＫＡ

　　　と称される。（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）に変わる。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。

　　　　ビタミンＫ欠乏状態では様々のＰＩＶＫＡ蛋白質は作られ、凝固活性を阻害する。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

　　　いる。

　　　　ちなみに、ＰＩＶＫＡ－Ⅱと示される場合のＰＩＶＫＡ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る。

　　　　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ある。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る。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・予防ができる。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るが、加齢と共に解消される。

　　　　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する。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くる。１／1700で発生するが、予防処置で１／10以下に

　　　激減する。経口摂取量の上昇と腸内細菌藪の発達で解消される。

　　　　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と称されている。摂食により投与される。

 **11－３ 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）となる。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）に変える。この時、ＶＫＨ2は酸化されてＶＫ－２,３－エ

　　ポキシドとなるが、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に戻る。

　　　　　　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つ。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る。

 **11－４ 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る。抗凝固療法はその

　　　１つであり、ワーファリンやヘパリンが使用される。ワーファリン投与法は長期に簡便に治療で

　　　きる特徴がある。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ある。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るが、本邦ではトロンボテスト（ＴＴＯ）と併用されることが多い。ＷＨ

　　　Ｏの推奨するモニタリング領域はＩＮＲでは2.0～4.5とされているが、国内の状況では、治療域

　　　は1.5～2.5とされる。

　　　　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る。

　　　　　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る。夕食後などに服

　　　用時間を一定にしておき、10～30ｍｇを最初に投与し、その後２～４日目からその半量（２～９

　　　ｍｇ／日）を服薬するようにする。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時間でピークに達する。肝細胞に取り込まれ、ミクロソームで分解される。血

　　　中での半減期は３７時間程度とされる。

　　　　次の疾患ではワーファリン療法は禁避となる。

　　　　　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

  **11－５ 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る。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あるが、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

　　　るり、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る。また、欧米ではＰ

　　　Ｔで投与量を決定しているが、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る。

　　　　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％の範囲を取る。トロンボテスト（ＴＴＯ）では６０～２０％と

　　　考えられる。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ある。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る。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る。

　　　　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

　　　ては毎日測定する。その後は１回／週、または１回／月の検査でも良い。

資料　：　 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 |  |
| 消化管系心血管系呼吸器系CNS感染症内分泌系悪性腫瘍､免▼疫抑制運動器系栄養､血液系耳鼻科､食道皮膚科ｱﾙｺｰﾙ中毒 | ｼﾒﾁｼﾞﾝ制酸剤、Mg塩流動パラフィンｽﾙﾌｨﾝﾋﾟﾗｿﾞﾝｱﾐﾀﾞﾛﾝｸﾛﾌｨﾌﾞﾚｰﾄ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)ｴﾀｸﾘﾝ酸抱水ｸﾛﾗｰﾙと同族体ｸﾛｰﾙﾌﾟﾛﾏｼﾞﾝ(Largactil)ｼﾞｸﾛﾗｰﾙﾌｪﾅｿﾞﾝ(Welldorm)ﾃﾞｷｽﾄﾛﾌﾟﾛﾎﾟｷｼﾌｪﾝｼﾞﾌﾙﾆｻﾙ(Dolobid)ﾒﾌｪﾅﾑ酸(Ponstan)ＭＡＯ阻害剤三環型抗うつ剤ﾄﾘｸﾛﾌｫｽ塩ｺﾄﾘﾓｷｻｿﾞｰﾙ(Bactrim ,Septrim▼)ﾒﾄﾛﾆﾀﾞｿﾞｰﾙ(Flagyl)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 ﾃﾄﾗｻｲｸﾘﾝ蛋白同化ﾎﾙﾓﾝ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,Progesi▼c)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(Dista▼gesic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)ｱﾙｺｰﾙｼﾞｽﾙﾌｨﾗﾑ(Antabuse) | ＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋ | ｺﾚｽﾁﾐﾝ(Questran)ｺﾚｽﾁﾎﾟｰﾙ(Colestid)ｺﾚｽﾁﾗﾐﾝｺﾚｽﾁﾎﾟｰﾙｽﾋﾟﾛﾉﾗｸﾄﾝ抗ﾋｽﾀﾐﾝ剤ﾊﾞﾙﾋﾞﾂｰﾙ剤ｸﾞﾙｾﾁﾏｲﾄﾞｶﾙﾊﾞﾏｾﾞﾋﾟﾝ(Tegretol)ｼﾞｸﾛﾗｰﾙﾌｪﾅｿﾞﾝﾊﾛﾍﾟﾘﾄﾞｰﾙﾌﾟﾘﾐﾄﾞﾝ(Hysoline)ﾌｪﾆﾄｲﾝ(Epanutin)ｸﾞﾘｾｵﾌﾙﾋﾞﾝﾘﾌｧﾝﾋﾟｼﾝ経口避妊薬ﾋﾞﾀﾐﾝＫ１抗ﾋｽﾀﾐﾝ剤ﾌｪﾅｿﾞﾝ抗ﾋｽﾀﾐﾝ剤 | 抑制作用の強▼さ＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋＋ |

**12．文献**

1) Miale J.B. Prothrombin Time Standardization Report of the Expert Panel on Oral Anticoagulamt Control: A Minority Opinion Thrombos. Haemostas. 42 1132­1135 1979

2) Prothrombin Time Standardization : Report of the Expert Panel on Oral Anticoagulant Control Thrombos. Haemostas. 42 1073­1114 1979

3) Besselaar A. ADPTION AND VALIDATION OF THE INTERNATIONAL NAORMALIZED RATIO FOR MONITORING ORAL ANTICOAGULAMT THERAPY [THE SITUATION IN 1989] Res. Clin. Lab. 20 75­81 1990

4) Loeliger E.A. Thromboplastin Calibration ­ Experience of the Dutch Reference Laboratory for Anticoagulant Control Thrombos. Haemostas. 40 272­287 1978

5) Recommended methodology for using WHO Internatonal Reference Preparation for Thromboplastin World Health Organization 1211 Geneva 27 Swizerland

6) Morrison M., Caldwell A. Discrepant INR values: a comparison between Manchester and Thrombotest reagents using capillary and venous samples Clin. Lab. Haemat. 11 393­398 1989

7) Koepke J.A., Rodgers J.L. Pre­instrumental Variables in Coagulation Testing A. J. C. P. 64 591­596 1975

8) Besselaar A., Evatt B.L. Proficiency Testing and Standardization of Prothrombin Time : Effects of thromboplastin. Instrumentation, and Plasma A. J. C. P. 82(6) 688­699 1984

9) Poller L.,Hirsh J. [Award Articles and Special Reports] Special Report: A Simple System for the Derivation of International Normalized Ratios for the Reporting of Prothrombin Time Results With North American Thromboplastin Reagents A. J. C. P. 92(1) 124­126 1989

10) Basselaar A. 　 The Significane of the International Normalized Ratio (INR) for Oral Anticoagulnt Therapy JIFCC 3(4) 146­153 1991

11) Giddings J., C.Hall P. Protocol for the evaluation of automated blood coagulation instruments (coagulometers) for determination of the international normalized ratio Med. Lab. Sci 46 39­44 1989

12) Taberner D.A., Poller L. QUALITY CONTROL OF THE PROTHROMBIN TIME AND INTERNATIONAL NORMALIZED RATIOS. NATIONAL AND INTERNATIONAL SCHEMES Res. Clin. Lab. 20 59­69 1990

13) Mckernan A., Thomson J.M. The reliability of internatilnal ratios during short­term oral treatment Clin. lab. Haemat. 10 63­71 1988

14) Poggio M. THE EFFECT OF INSTRUMENTS FOR PROTHROMBIN TIME TESTING ON THE INTERNATIONAL NORMALIZED RATIO Res. Clin. Lab. 20 71­74 1990

15) Peters R.H.M., Besselaar A. A Multi­Centre Study to Evaluate Method Dependency of the International Sensitivity Index of Bovine Thromboplastin Thrombos. Haemostas. 61(2) 166­169 1989

16) Denson K.W.E. International and national standardization of control of anticoagulant therapy in patients receiving coumarin and indanedione drugs using calibrated thromboplastin preparations J. Clin. Path. 24 460­463 1971

17) LoeligerE.A.,VisserL.P. A Simplified Thromboplastin Calibration Procedure for Standardization of Anticoagulant Control Thrombos. Diath. Haemorh. 33 172­190 1975

18) Miale J.B., Lafond D.J. 1963 PROTHROMBIN TIME TEST SURVEY, COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS, STANDARS COMMITTEE, SUBCOMMITTEE ON COAGULATION A. J. C. P. 47(1) 40­59 1967

19) Loeliger E.A.,Besselaar,A. Critical Appraisal, Clinical Usefulness, and Implementation of the Thromboplastin concept of Prothrombin­Time Standardization 34­48

20) Jonker J.J.C., Azar A.J. LABORATORY AND THERAPEUTIC CONTROL IN THE THROMBOSIS CENTRE ROTTERDAM USING CHROMOGENIC PROTHROMBIN TIME TESTS Res. Clin. Lab. 20 45­57 1990

21) Kazama M.,Suzuki S. Evaluation of International Normalized Ratios by a Controlled Field Survey with 4 Different Thromboplastin Reagent Thrombos. Haemostas. 64(4) 　535­541 1990

22) Houdijk W.P.M. INR－Monitoring Oral Anticoagulant Therapy With Commercial Thromboplastin: Use Of The International Normalized Ratio Organon Teknika

23) Loeliger E.A.,Visser L.P. Biological Properties of the Thromboplastins and Plasmas Includedin the ICTH/ICSH Collaborative Study on Prothrombin Time Standardization Thrombos. Haemostas. 42 1115­1127 1979

24) Prothrombin Time Reporting and the International Normalized Ratio System －Improvements Are Needed A. J. C. P. 99(6) 653­655 1993

25) Koepke J.A. International Committee Comunications －Partial Thromboplastin Time Test－Proposed Performance Guidelines ICSH Panel on the PTT Thrombos. Haemostas. 55(1) 143­144 1986

26) Ingram G.I.C.,Hills M. International Committee Comunications －Referenece Method for the One­Stage Prothrombin Time Test on Human Blood International Committee for Standardization in Hematology Thrombos. Haemostas. 36 237­239 1976

27) Gogstad G.O. トロンボテストと国際標準比（INR） エーザイ

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

29) Besselaar.A. Standardization and Quality Control in Blood Coagulation Assays Qual. Assurance in Haemat. 119­150

30) Habibzadeh F.,Yadollahie M. A Simple Method for the Derivation of the International Normalized Ratio for the Reporting of Prothrombin Time Results A. J. Hemat. 50 283­287 1995

31) Van der Velde E.A, Poller L The APTT Monitoring Heparin－The ISTH/ICSH Collaborative Study Thrombosis and Haemostasis Vol.73 No.1 73­81 1995

32) Loeliger E.A., Poller L., Van den Besselaar A.M.H.P., et al Questions and Answers on Prothrombin Time Standardization in Oral Anticoagulant Control Thrombosis and Haemostasis Vol.54 No.2 515­517 1985

33) 天木一太 INR 検査と技術 Vol.15 No.12 1329­1330 1987

34) 内田景博、片山善章 経口凝固療法とモニター検査の標準化 臨床機器・試薬 Vol.11 No.6 929­937 1988

35) 上塚芳郎、他 経口抗凝血療法におけるトロンボテスト（％）とプロトロンビン時間(INR)の臨床的意義と信頼性について 血液と脈管 Vol.20 453 1989

36) Barrow DA, Maynard JR 経口抗凝固薬モニタリングのためのプロトロンビン時間標準化：国際標準比 Dade凝固技術報告　＃19

37) 風間睦美 経口抗凝血薬療法におけるISI/INRシステムの精度管理の研究 臨床血液 Vol.31 No.6 769­775 1990

38) 風間睦美 経口抗凝固療法－その標準化の緊急性－ 血栓止血誌 Vol.5 No.2 114­120 1994

39) 国際血液学標準化委員会 経口抗凝固療法ガイドライン 血液と脈管 Vol.16 431­440 1985

40) 風間睦美 経口抗凝固療法におけるISI/INRシステムの臨床的意義 臨床血液 Vol.30 No.9 1483 1989

41) Loeliger E., van den Bessslaar A., Lewis S. Reliability and Clinical impact of the normalization of the Prothrombin times in Oral Anticoagulant control Thrombos. Haemostasis 148­154 1985

42) Berther A.M., et al A Multicenter Study on Amidolytic Factor Ⅹ Evaluation in Oral Anticoagulant Therapy Thrombosis and Haemostasis Vol.53 No.3 433­436 1985

43 Solomon H.M.,et al. Heparin­Induced Increase in the International Normalized Ratio A.J.C.P. Vol.103 No.6 735­739 1995

44) Poggio M., Van den Besselaar A.M.H.P., et al The Effect of Sume Instruments for Prothrombin Time testing on the International Sensitivity Index (ISI) of two Rabbit Tissue Thromboplastin Reagents Thrombosis and Haemostasis Vol.62 No.3 868­874 1989

45) Hirsh J.,Dalen J.E.,Poller L., et al. Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range Chest Vol.102 312S­326S 1992

46) Dalen J.E., Hirsh J. Introduction Chest Vol.108 No.4 225S­226S 1995

47) Hirsh J.,Dalen J.E.,Poller L., et al. Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range Chest Vol.108 No.4 258S­275S 1995

48) Shafer D. Oral Anticoagulants: Mechanism of Action, Clinical Effectiveness, and Optimal Therapeutic Range SUMMARY DADE 1995

49) Eckman M.H., et al Effect of Laboratory variation in the Prothrombin－Time Ratio on the results of Oral Anticoagurant Therapy New England J. Med Vol.329 No.10 696­702 1993

50) Hirsh J. Monograph by Dade Education: Anticoagurant Therapy Baxter 1988

51) Barrowcliffe T. 4. Standardization of Coagulation Tests and Assays 51­86

52) Poller L. A national standard for anticoagulant therapy－The Manchester Comparative Reagent The Lancet 1: 491­493 1967

53) Miale J., Kent J. Standardization of the Therapeutic Range for Oral Anticoagulants Based on Standard Reference Plasmas A.J.C.P Vol.57 No.Jan 80­88 1972

54) Poller L. The British System for Anticoagulant Control Thrombos. Diathes. haemorrh. Vol.33 157­162 1975

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

56) Naghibi F., Han Y., et al Effect of Reagent and Instrument on Prothrombin Times, Activated Partial Thromboplastin Times and Patient/Control Ratios Thrombosis and Haemostasis Vol.59 No.3 455­463 1988

57) Van den Besselaar A.M.H.P., Bertina R.M. Multi­Center Calibration of the Second Reference Material for Thromboplastin, Rabbit, Plain, Coded CRM 149R Thrombosis Haemostasis Vol.65 No.3 263­267 1991

58) Van den Besselaar A.M.H.P., Bertina R.M. Multi­Center Study of Thromboplastin Calibration precision ­ Influence of Reagent Species, Composition, and International Sensitivity Index (ISI) Thrombosis and Haemostasis Vol.69 No.1 35­40 1993

59) Krulder J.W.M., et al Diurnal Rhythm in Anticoagulant Effect of Heparin during a low dose constant rate Infusion Thrombosis and Haemostasis Vol.68 No.1 30­32 1992

60) 小田晃司、他 CA­4000による各種組織トロンボプラスチンINR（International Normalied Ratio）の検討 Sysmex Journal Vol.13 No.1 153­158 1990

61) Chantarangkul V., et al The Effect of Instrumentation on Thromboplastin Calibration Thrombosis and Haemostasis Vol.67 No.5 588­589 1992

62) 風間睦美 血液凝固検査法の標準化 －プロトロンビン時間及び活性化トロンボプラスチン時間の標準化－（国際血栓止血学会SSC小委員会の報告を中心に） 医学検査 Vol.42 No.12 1956­1959 1993

63) 福塚勝弘、他 PTのＩＮＲ表示における問題点 医学検査 Vol.45 No.3 534 1996

64 ICTH Standardization of Factors Ⅱ, Ⅶ, Ⅸ and Ⅹ in Plasma and Concentrates Report of the ICTH Subcommittee on Factors Ⅷ and Ⅸ [Brussels, July 1987] Thrombosis and Haemostasis Vol.59 No.2 334 1988

65) Hirsh J., Poller L. The International Normalized Ratio－A Guide to Understanding and Correcting Its Problems Arch Intern Med Vol.154 282­288 1994

66) 香川和彦、福武勝幸、他 プロトロンビン時間(PT)測定とInternational Normalised Ratio(INR)の問題点の検討 東医大誌 Vol.54 No.4 423 1996

67) 福江英尚 プロトロンビン時間とINR 第42回日本臨床病理学会　第30回臨床血液学専門部会議 抄録 pp8 1995

68) 鈴木節子 抗凝固療法におけるINR表示の現状と展望 －INR表示血漿による 経口抗凝固療法のモニタリングの標準化－ 臨床病理 Vol.44 総会号 35 1996

69) 大竹順子、他 プロトロンビン時間、トロンボテストにおける結果の表示方法について 臨床検査 Vol.35 No.2 203­207 1991

70) Schmitz L.L., et al. Failure to Generate Comparable International Normalizxed Ratio Values Using Five Different Thromboplastin Reagents in Parallel Studies of Patients receiving Warfarin Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis Vol.1 No.2 142­150 1995

71) 冨田真理、他 ISI表示されたﾄﾛﾝﾎﾞﾌﾟﾗｽﾁﾝ試薬の検討(ﾄﾛﾝﾎﾞﾌﾟﾗｽﾁﾝFS) 衛生検査 Vol.38 No.4 410­414 1989

72) Peters R.H.M. ,Van den Besselaar A.M.H.P., et al Determination of the Mean Normal Prothrombin Time for Assessmentof International Normalized Ratios－Usefulness of Lyophilized Plasma Thrombosis and Haemostasis Vol.66 No.4 442­445 1991

73) Miale J., Lafond D. Prothrombin Time Standardization－Proposal of the Standards Committee, College of American Pathologists, Subcommittee on Coagulation Reagents A.J.C.P Vol.52 No.2 154­160 1969

74) 山中学、他 トロンボプラスチン試薬標準化への基礎的研究 臨床病理 Vol.30 No.10 1103­1107 1982

75) Loeliger E., van Halem­Visser L. Results of Calibration by the Dutch National Reference Laboratory of the Thromboplastins included in the ICTH/ICSH Collaborative Sutudy of Prothrombin Time Standardization Thrombos. Haemostasis Vol.42 1128­1131 1979

76) Ray M.J. , Smith I.R. The Dependence of the International Sensitivity Index on the Coagulometer Used to Perform the Prothrombin Time Thrombosis and Haemostasis Vol.63 No.3 424­429 1990

77) Ts'ao C., et al Implications of Use of Low International Sensitivity Index Thromboplastins in Prothrombin Time testing Arch Pathol Lab Med. Vol.118 Dec. 1183­1187 1994

78) 天谷初夫、他 プロトロンビン時間測定における標準血漿の再評価 医学検査 Vol.44 No.5 895­900 1995

79) 高宮修、武田行夫、他 凝固因子活性測定における標準参照血漿の問題点 －第２報 WHO標準品から算出された市販標準血漿のassigned valueに互換性はあるか？ 医学検査 Vol.44 No.10 1516­1521 1995

80) 寺岡敦子、他 凝固因子定量における検体の保存性および標準品の問題点 衛生検査 ol.39 No.2 159­163 1990

81) 半戸茂友、他 血液凝固検査における誤差要因について －第３報　プロトロンビン時間の検量線作成で用いる標準物質について 医学検査 Vol.44 No.12 1787­1790 1995

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

83) Commission of the European Communities BCR INFORMATION reference materials: The Certification of the third reference material for rabbit Thromboplastin CRM 149S 1994

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

85) Bangham D.R., Biggs R., Brozovic M., Denson K.W.E. Calibration of five different thromboplastins, using fresh and freeze dried plasma Thromb. Diathes. Haemorrh. Vol.29 No.2 228­239 1973

86) Commission of the European Communities Certificated reference materials: Certificate of measurement －BCR no.147(BCT/099) 1981

87) Commission of the European Communities Certificated reference materials: Certificate of measurement －CRM 149S Rabbit Thromboplastin 　1994

88) Commission of the European Communities Certificated reference materials: Certificate of measurement－CRM no.149R Thromboplastin rabbit 1988

89) Van den Besselaar A.M.H.P., et al Status of Present and Candidate International Reference Preparations (IRP) of Thromboplastin for the Prothrombin Time－A Report of the Subcommittee for Control of Anticoagulation Thrombosis and Haemostasis Vol.69 No.1 85 1993

90) Poller L., et al. The Calibrationof the Second Primary International Reference Preparation for Thromboplastin(Thromboplastin,human,plain,coded BCT/253) Thrombos. Haemostasis Vol.52 No.3 336­342 1984

91) 高宮修、武田行夫、他 凝固因子活性測定における標準参照血漿の問題点－第１報　健常人プール血漿の再評価 医学検査 Vol.44 No.8 1264­1267 1995

92) Van den Besselaar A.M.H.P., et al Deterioration of Reference Material for Human Thromboplastin Thrombosis and Haemostasis Vol.67 No.6 726 1992

93) Miale J., Kent J. Performance Characteristics of reference Thromboplastins A.J.C.P Vol.60 No.Oct 453­457 1973

94) Ingram G. The Stabillity of the WHO Reference Thromboplastin NIBS & C 67/40 Thrombos. Haemostasis. Vol.42 No. 1135­1140 1979

95) 半田哲郎 リン脂質と中性脂質の相互作用と構造形成について 膜 Vol.18 No.2 89­95 1993

96) 阿部正彦、他 リン脂質の水和に及ぼす2価金属イオンの影響－DPPG,DPPC/Ca2+,Mg2+,Ba2+系油化学 Vol.43 No.5 403­408 1994

97) 古澤邦夫 微粒子分散系に関する界面化学的研究 油化学 Vol.43 No.2 101­108 1994

98) Vis R., Van den Besselaar A.M.H.P., et al Artifical Prolongation of the Prothrombin Time of Lyophilized Plasma Induced by Transportation with Solid Carbon Dioxide Thrombosis and Haemostasis Vol.67 No.6 725 1992

99) Duncan E.M., et al Effect of Concentration of Trisodium Citrate Anticoagurant on Calculation of the International Normalized Ratio and the International Sensitivity Index of Thromboplastin Thrombosis and Haemostasis Vol.72 No.1 84­88 1994

100) 日野志郎 抗凝固剤クエン酸ナトリウム溶液の濃度 臨床血液 Vol.23 No.4 583­585 1982

101) 成田厚子、他 血液凝固検査における誤差要因について－第１報　検体の採取法による影響 医学検査 Vol.44 No.5 890­894 1995

102) 小林香織、他 血液凝固検査における誤差要因について－第２報　検体の保存方法による影響 医学検査 Vol.44 No.7 1137­1141 1995

103) 中川雅夫 抗血栓薬の薬理作用と使い方－Warfarin療法の理論と実際 内科　Vol.78　No.3　474­477 1996

104) 井上和明、関山和彦、与芝真 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　ビタミンKと肝疾患　Biomedical Perspectives　Vol.5　No.1　47­52　1996

105) 岩田敏 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　ビタミンKと抗生物質 Biomedical Perspectives Vol.5　No.1　37­45 1996

106) 白幡聡 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　ビタミンKの構造と作用機序 Biomedical Perspectives　Vol.5　No.1　10­17 1996

107) 佐野善寿 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　ビタミンKの体内動態 Biomedical Perspectives Vol.5　No.1　19­28 1996

108) 徳永文稔 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　ビタミンK依存因子の生合成 Biomedical Perspectives　Vol.5　No.1　29­36 1996

109) 白幡聡 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　ビタミンK拮抗物質とPIVKA Biomedical Perspectives Vol.5 No.1 81­87 1996

110) 長尾大 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　新生児および乳児のビタミンK欠乏症　Biomedical Perspectives　Vol.5　No.1　61­65 1996

111) 飯塚敦夫 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　特発性乳児ビタミンK欠乏症 Biomedical Perspectives　Vol.5　No.1　67­72　1996

112) 寺尾俊彦 特集 ﾋﾞﾀﾐﾝK－基礎と臨床－　　妊娠とビタミンK Biomedical Perspectives Vol.5 No.1　53­59 1996