

凝固資料



# P T / I N R 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. P T 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 I C S H と I C T H のレポート ..... | (15) |
| 4-3 I S I、および I N R 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. P T 測定における正確度と精密度              |      |
| 6-1 P T 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 I S I 値設定方法、および管理方法 ..... | (24) |
| 8. I S I / I N R 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となります。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となります。

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いうことです。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必要があります。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考えられます。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となります。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のでしょうか。

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い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. P T の 表現方法

P T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 I N R表示

P T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。

I N R 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 (P T) が標準化の対象になっています。現在、P T 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 P T 結果を統一するために始まったとも言えます。

1960 年代の P T 測定は用手法で実施されていました。したがって、P T 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 **Mediterranean 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、A T-III・プラスミノーゲン……などが **N I B S C** (イギリス) によって決定されています。が、P T や A P T T 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 Mediterranean Congress on Thrombolism (トルコ:イスタンブール)

“基本的に標準血漿の概念は有用”

↓

N I B S C

### 標準試薬の設定

1969、70 ICTH、Dr.Poller (イギリス)

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、B C T (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 P T 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、I C S H (International Council for Standardization in Hematology)、及び、I C T H (International Committee on Thrombosis and Haemostasis) の設立につながりました。I C S H による P T 試験の標準法、I C T H 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、I C S H と I C T H 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、補正值は I S I (International Sensitivity Index) として使用されるようになっていきます。

### 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、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、CRM 147 として、

OBT/79 (ウシ脳、ISI=1.011) は、CRM 148 として、

RBT/79 (ウサギ脳、ISI=1.413) は、CRM 149 として登録・公開されています。

なお、これらの作業は ICHT と IC SH 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 BCT 67/40 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←CRM 149

1991 CRM 149 ISI=1.343

1995 CRM 149 ISI=1.257

注) IC SH : International Council for Standardization in Hematology  
(国際血液学標準化委員会)

IC TH : 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 郵送のいずれか／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ずれかである。

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、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(株)や近鉄 Exp.などがある。郵船航空(株)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もので、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IRP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（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名の検体を使用される。

（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。

| Sample    | IRP  | WRP  |
|-----------|------|------|
| Normal 1  | 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容混合する。血液はプラスチック（ポリプロピレンなど）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×5 min、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ある。

測定に際し、エンドポイントは I R P の場合、手と目で見て確かめる。W R P 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) Hippocraton Hospital, 1<sup>st</sup> Regional Transfusion Centre, Athens, Greece.
- (2) Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Servei d' Hematologia, Barcelona, Spain.
- (3) Centre Hospitalo - Universitaire de Paris, Laboratoire Central d' Hematologie de l' Hotel-Dieu, Paris, France.
- (4) Instituto Nacional de Saude, Department of Haematology, Lisbon, Portugal.
- (5) Ospedale Regionale di Parma, 5<sup>a</sup> Divisione Medicina Generale, Parma, Italy.
- (6) Ribe County 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) Katholieke Universiteit Leuven, Department of Medical Research, Leuven, Belgium.
- (10) Klinikum der Albert - Ludwigs-Universität, Zentrale Einrichtung Transfusionsmedizin, Freiburg i. 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 occasions.

Date: 2.6.1983

Water-bath temperature 37.1°C

Thromboplastin: 1. Rabbit brain thromboplastin Working Reference Preparation.

2. International Reference Preparation of Thromboplastin Rabbit, Plain, RBT/79.

Endpoint recording: tilt tube technique (water bath)

Time started: 10h15

Time finished: 11h00

Table 1: Suggested protocol for the recording of clotting times in the calibration of a Working Reference Preparation of rabbit Thromboplastin.

International reference  
preparation RBT/79

Working reference  
preparation

| Plasma    | Order of testing | Clotting time (seconds) | Order of testing | Clotting time (seconds) |
|-----------|------------------|-------------------------|------------------|-------------------------|
| Normal 1  | 1                | 15.9                    | 2                | 13.8                    |
| Patient 1 | 3                | 21.4                    | 4                | 19.6                    |
| Patient 2 | 5                | 35.6                    | 6                | 30.8                    |
| Patient 3 | 7                | 29.1                    | 8                | 28.6                    |
| Patient 4 | 9                | 21.8                    | 10               | 19.6                    |
| Patient 5 | 11               | 41.1                    | 12               | 33.6                    |
| Patient 6 | 13               | 37.9                    | 14               | 28.1                    |
| Normal 2  | 15               | 17.1                    | 16               | 15.2                    |

**Caliculation**

The International Sensitivity Index of the working preparation( I S I W R P ) 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 regression<sup>1</sup> may be preferred. With this technique,the slope,C I R P , W R P ,can be calculated from the following formulae:

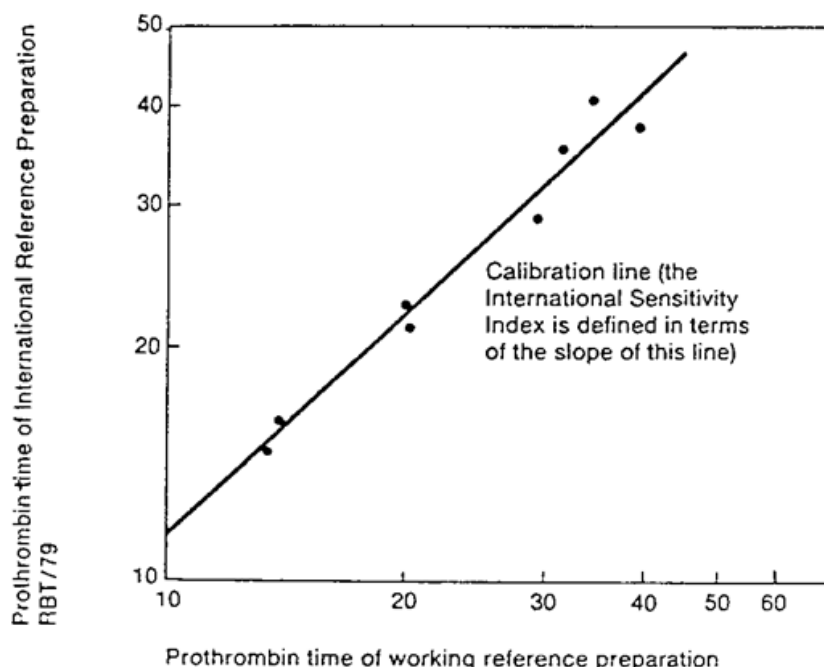


Fig.1.DoublelogarithmicplotofprothrombintimesobtainedononeoutoftendifferentoccasionsfordeterminationoftheInternationalSensitivityIndex.

## Example

Using the data from Table 1, the calculated value for C I R P , W R P is 0.968.

The International Sensitivity Index for RBT/79 is 1.4. Thus, the International Sensitivity Index for the working reference preparation is estimated as  $0.968 \times 1.4 = 1.355$ .

The standard error for C I R P , W R P is calculated as 0.072. Thus,  $S.E.(ISIWRP) = 0.072 \times 1.4 = 0.100$ . The coefficient of variation for the ISI of the working reference preparation is  $100 \times 0.100/1.355 = 7.4\%$ . The coefficient of variation is large because Table 1 contains data from only eight plasmas, i.e., one day's tests. In practice, tests would be conducted on several days and the coefficient of variation using the combined data would be smaller.

## 4-2 I C S H と I C T H のレポート

I C S H と I C T H は共同して、Thrombosis and Haemostasis (1985) に経口抗凝固療法のコントロールにおける P T 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 B C T / 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 P T 試薬にこれらと比較した I S I 値を付け、I N R 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 P T 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、I S I として表示すること。

②市販 P T 試薬には P T 結果と I N R 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: 12.0 sec. → Patient' s: 18.0 sec. ISI = 2.3 |          |         |       |
|-----------------------------------------------------|----------|---------|-------|
| P R                                                 | PT index | Percent | I N R |
| 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  |

### 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。

#### 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。

$(22.0 / 11.0) 1.5 = INR = (18.0 / 10.0) ISI_b$

$ISI_b = 1.5 \times \text{Log} (22.0 / 11.0) \div \text{Log} (18.0 / 10.0) = 1.768$

#### 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。(Log 10を使用、Log e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。 $\rightarrow Y = aX + b$

試薬AのISI値が1.5の場合、試薬BのISI値は、

$ISI_b = 1.5 \times a$

一次回帰式の傾きが1.2である場合には、

$ISI_b = 1.5 \times 1.2 = 1.80$

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。
- ③ 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、CO<sub>2</sub> による pH 変動を避けるため、密栓状態で室温に放置し、P T 測定では、4 時間以内に測定を終える。A P T T 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 1 mL 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がありますが、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. P T 測定における正確度と精密度

#### 6－1 誤差の理解

① I N R 値としての誤差

P T 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. P T 測定結果の変動幅

|                                                                  | 秒 数    | 変 動 範 囲     |
|------------------------------------------------------------------|--------|-------------|
| 10.0 秒に対し±0.2 秒の範囲を設け、両対数グラフ上に平行移動線を引く。この時、各ポイントで交差する幅を変動量としている。 | 10.0 秒 | 9.8 ～ 10.2  |
|                                                                  | 15.0 秒 | 14.7 ～ 15.3 |
| この時、20.0 秒の場合の P T 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、P T 比としての最大変動誤差は

$$= (2.0816 - 1.9215) \div 2.0816 = 7.6\%$$

$$= (2.0816 - 1.9215) \div 1.9215 = 8.3\%$$

P T 試薬の I S I を 1.0、あるいは 2.0 とするとき、P R = 2.0 での I N R 値としての変動は

$$I S I = 1.0 \text{ の 時、 } I N R = 2.0816 \sim 1.9215 \text{ ( 差 } = 0.1601、\text{誤差 } = 8.0\%)$$

$$I S I = 2.0 \text{ の 時、 } I N R = 4.2327 \sim 3.7881 \text{ ( 差 } = 0.4446、\text{誤差 } = 11.1\%)$$

したがって、通常に測定した場合でも、I N R の誤差としては約 1 0 % 発生し得る。

## ② I S I 値を検定する時の誤差

上記表 1. の如く P T 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、I S I = 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

$\text{Log}(20.0/10.0) = A_{\min} * \text{Log}(20.4/9.8) \sim A_{\max} * \text{Log}(19.6/10.2)$

I R P を 1 回目とし、W R P を 2 回目とすると、

$$9454 \times 0.9454 = 0.8937 \sim 1.0612 \times 1.0612 = 1.1261$$

\* 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

$\text{Log}(30.0/10.0) = A_{\min} * \text{Log}(30.6/9.8) \sim A_{\max} * \text{Log}(29.4/10.2)$

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 I S I 値の変動幅は異なってくるが、P R = 2.0 の場合では 1 ステップで I S I 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 I S I 設定誤差の両者が発生した場合

一端、別途に設定された I S I 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、

$$0.816) 1.0612 \sim (1.9215) 0.9454 = 2.177 \sim 1.854$$

I N R = 2.0 に対する誤差は 108.8 ~ 92.7%

したがって、I N R 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、少なくとも測定シス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 I S I 値 設定方法、および 管理方法

まず、当社標準 P T 試薬、および当社標準 I N R 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 P T 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 I N R 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 I S I 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 I S I 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 P T 試薬（S T D）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 P T 試薬、および当社標準 I N R 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 P T 試薬、および当社標準 I N R 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の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）

European 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。

$$\text{異常検体の秒数 } ISIa \text{ } / \text{ 異常検体の秒数 } ISIb = INR = \text{ 正常検体の秒数 } / \text{ 正常検体の秒数}$$

\* 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、正常値のブ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る

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 I N R 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、I N R 表示において I N R 値が高いほど I N R 値が変動し易い性質がある点があります。また I N R 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 P T 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？

#### I S I / I N R 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。

P R 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 I S I 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 I N R を知らない (or 使用しない)。

##### 4. I N R システム

低値ほど I N R 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. Quick<sup>1)</sup>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.）<sup>2)</sup>、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。

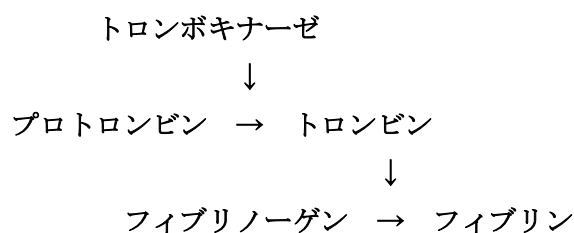


図1. Morawitzの古典的凝血学説

### 図2. Water Flowの凝固反応系

一方、Quickが当時で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<sup>3)</sup>。今日では、TFは蛋白質構造が決定され<sup>4)</sup>、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、P T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P T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P T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. P T試薬の調製方法

## 2-2 T F の構造

T P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。P T試薬の有効成分が組織片であると考えればこれで良い。が、T Fであると考えれば、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T Fは破碎されてT F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、T F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<sup>5)</sup>。このマイクロパーティクルは、T Fが活性を発揮する形に構成された第Ⅶ因子活性化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。

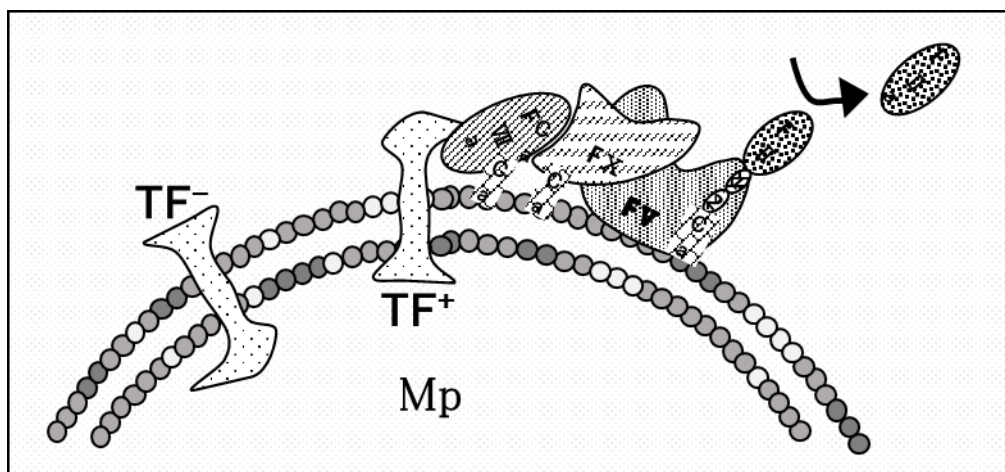


図4. マイクロパーティクルの構造模式図

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、T F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M<sub>p</sub> +を調製でき、P T試薬として利用できる。特に脳組織がP T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M<sub>p</sub> +は、細胞膜と同様に、リン脂質二重層の形に再構成される。M<sub>p</sub> +の大きさは分散させた溶液中の攪拌力によって異なるが、一般的には0.1~1.0 μmである。M<sub>p</sub> +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T FはC a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。M<sub>p</sub> +が構成されたとする概念では、長期保存のためにはM<sub>p</sub> +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M<sub>p</sub> +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M<sub>p</sub> +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M<sub>p</sub> +に還元されるように成分を調製することが必要である、といった見解となる。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T F蛋白質とリン脂質からP T試薬が製造される。この場合は正しく上記の概念(=M<sub>p</sub> +形成)が実行されている。

### 2-3 酵素反応の段階

P T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M<sub>p</sub> +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C a<sup>2+</sup>を介してリン脂質膜と結合すると共に、一端はM<sub>p</sub>のリン脂質膜の一部から表面に突出したT F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M<sub>p</sub>・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T F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C a<sup>2+</sup>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(=P EまたはP Sの集中した部分と思われる)にまずC aが結合し<sup>6)</sup>、その上に各凝固因子が分子N末端側のγ-カルボキシングルタミン残基を介して結合する。一方、F.ⅤはC a<sup>2+</sup>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(=P Cと考えられる)に結合する。

複数の凝固因子とM<sub>p</sub> +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、M<sub>p</sub>・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M<sub>p</sub> +とによって、活性を発揮する有効なM<sub>p</sub>・F複合体「工場」が常にすべて形成される訳ではない。M<sub>p</sub>・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、M<sub>p</sub> + (およびM<sub>p</sub> -)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せられた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<sup>-</sup>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<sup>-</sup>が必ず混入する。Mp<sup>-</sup>はMp<sup>+</sup>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<sup>-</sup>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Ca<sup>2+</sup>がキレートされており、Ca<sup>2+</sup>欠乏の状態にある。PT試薬中にCa<sup>2+</sup>が存在しないと凝固因子はMp<sup>+</sup>（またはMp<sup>-</sup>）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Ca<sup>2+</sup>は不可欠である。

Ca<sup>2+</sup>とMp<sup>+</sup>、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、Ca<sup>2+</sup>が不足した状態では、Ca<sup>2+</sup>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、Ca<sup>2+</sup>が過剰な状態では、Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>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、Ca<sup>2+</sup>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Ca<sup>2+</sup>が必要である（図6．）が、この必要量は抽出液に残存するCa<sup>2+</sup>の状態によって、さらにはMp<sup>+</sup>（またはMp<sup>-</sup>）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Ca<sup>2+</sup>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量は異なっており当然です。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。<sup>7)</sup>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<sup>8)、9)、10)</sup>。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1.0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) | P T 比 | I S I 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) | P T 比 | I S I 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    |
| 1 0 倍  | 15.7         | 55.0         | 3.50  | 1.00    |

図 8. Mp 濃度の影響

一方、凝固反応の場合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結合力が強く、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合である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障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攪拌が必要であり、攪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. Baneroff : A study of the coagulation defect in hemophilia and jaundice. Am.J.Med.Sci., 190, 501~511, 1935
- 2) Morawitz, P : Beitrage zur Kenntnis der Blutgerinnung . Beitr. 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 I N R 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 I N R 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 I S I を持つことです。これは I N R - 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 I S I 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 I S I 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、P T 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、I N R 標準血漿を作ろうとするもの。

第五には、I N R での標準化に対しては P T 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のでしょうか。

## 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。

#### ジクロマル

#### ワーファリン

ジクロマル、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は腸内細菌叢で合成される。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  $1.5\mu\text{g/Kg}$  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  $5\sim 10\mu\text{g}$ 、K2で  $50\sim 100\mu\text{g}$  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を介してリン脂質膜（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、腸内細菌叢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叢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）によって分けられ、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 $\gamma$ -カルボキシグルタミン酸残基（Gla 残基）に変える。この時、VKH<sub>2</sub>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

$\gamma$ カルボキシグルタミン酸残基

$\gamma$  グルタミルカルボキシラーゼ

ワーファリン

DTT

DTTH<sub>2</sub>

NAD

ビタミンKレダクターゼ

ビタミンKエポキシドレダクターゼ

DTTH<sub>2</sub>

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。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忌となる。

- |                                |               |
|--------------------------------|---------------|
| 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                     |               |

I N R法による経口抗凝固療法のコントロール値

| I N R     | 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<br>深部静脈血栓症の治療<br>肺栓塞、T I A      |
| 3.0 ～ 4.5 | 反復性の深部静脈血栓症、肺栓塞<br>心筋梗塞を含む動脈疾患<br>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P T、またはT T O（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％程度で実施されたと考えられ、病態によって40～15％の範囲を取る。トロンボテスト（T T O）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す、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 I C S H (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 | シメチジン                           | ++       | コレスチミン<br>(Questran) | 抑制作用<br>の強▼さ |
|      | 制酸剤、Mg 塩                        | +        | コレスチポール              | +            |
| 心血管系 | 流動パラフィン                         | +        | (Colestid)           | +            |
|      | スルフィンピラゾン                       | +++      |                      |              |
|      | アミダロン                           | ++       | コレスチラミン              | +            |
|      | クロフィブレート                        | ++       | コレスチポール              | +            |
|      | デキストロサイロキシン                     | ++       | スピロノラクトン             | +            |
|      | キニジン                            | ++       |                      |              |
| 呼吸器系 | ジアゾキサイト (Eudemine)              | +        |                      |              |
| CNS  | ジピリタモール(Persantin)              | +        |                      |              |
|      | エタクリン酸                          | +        |                      |              |
|      | 抱水クロラルと同族体                      | +        | 抗ヒスタミン剤              | +            |
|      | クロールプロマジン(Largactil)            | +        | バルビツール剤              | +++          |
|      | シクロロアルフェナゾン<br>(Welldorm)       | +        | ゲルセチマイド              | +++          |
|      | デキストロプロポキシフェン                   | +        | カルバマゼピン              | +            |
|      | ジフルニサル(Dolobid)                 | +        | (Tegretol)           | +            |
|      | メフェナム酸(Ponstan)                 | +        | ジクロロアルフェナ<br>ゾン      | +            |
| 感染症  | MAO阻害剤                          | +        | ハロペリドール              | +            |
|      | 三環型抗うつ剤                         | +        | フリミドン<br>(Hysoline)  | +            |
|      | トリクロフォス塩                        | ++       | フェニトイン<br>(Epanutin) | +            |
|      | コトリモキサゾール<br>(Bactrim ,Septim▼) |          |                      |              |
|      | メトロニダゾール(Flagyl)                |          |                      |              |
|      | アミノグリコシド系                       |          |                      |              |
|      | アミカシン                           |          | グリセオフルビン             |              |
|      | ゲンタマイシン                         |          | リファンピシン              |              |
|      | ネオマイシン                          |          |                      |              |
|      | ストレプトマイシン                       | +        |                      |              |
|      | トブラマイシン                         |          |                      |              |
|      | セファロスポリン系                       |          |                      |              |
|      | セファロジン                          |          |                      |              |
|      | セファゾリン                          | +        |                      |              |
|      | セファマンドール                        | +        |                      |              |
|      | ラタモксеフ(Moxalactan)             | +        |                      |              |

|                  |                          |     |                                        |                    |
|------------------|--------------------------|-----|----------------------------------------|--------------------|
| 内分泌系             | クロラムフェニコール               | +   | 経口避妊薬                                  | +                  |
|                  | サイクロセリン                  | +   |                                        |                    |
|                  | エリスロマイシン                 | +   |                                        |                    |
|                  | イソニアジド                   | +   |                                        |                    |
|                  | ケトコナゾール                  | +   |                                        |                    |
|                  | ミコナゾール                   | +   |                                        |                    |
|                  | ナリジキシン酸                  | +   |                                        |                    |
|                  | ペニシリン G 大量静注             | +   |                                        |                    |
|                  | アンピシリン経口                 | +   |                                        |                    |
|                  | キノネ塩類                    | +   |                                        |                    |
|                  | ストレプトトレート                | ++  |                                        |                    |
|                  | スルフォナマイド                 | ++  |                                        |                    |
|                  | テトラサイクリン                 | ++  |                                        |                    |
|                  | 蛋白同化ホルモン                 | ++  |                                        |                    |
| 悪性腫瘍、免疫抑制        | タモキシフェン                  | +   | 経口避妊薬                                  | +                  |
|                  | ゲルカゴン                    | +   |                                        |                    |
| 運動器系             | サイロキシン                   | +   |                                        |                    |
|                  | クロールプロホップミド              | +   |                                        |                    |
|                  | 副腎皮質ステロイド                | +   |                                        |                    |
|                  | プロピルサイオエラシル              | +   |                                        |                    |
|                  | トルブタマイド                  | +   |                                        |                    |
|                  | サイクロフォスファマイド             | +++ |                                        |                    |
|                  | (Endoxan)                | +++ |                                        |                    |
|                  | メルカプトプリン                 | +++ |                                        |                    |
|                  | メソトレキセート                 | +++ |                                        |                    |
|                  | アサプロホップソン(Rheumox)       | +++ |                                        |                    |
|                  | フェフロハロゾン                 | ++  |                                        |                    |
|                  | (Methrazone)             | ++  |                                        |                    |
|                  | オキシフェンブタゾン(Tanderil)     | +   |                                        |                    |
|                  | フェハルブタゾン(Butazolidin)    | +   |                                        |                    |
| 栄養、血液系<br>耳鼻科、食道 | スルフィンピラゾン(Anturan)       | +   | 経口避妊薬                                  | +                  |
|                  | アスピリン、サリチル酸剤             | +   |                                        |                    |
|                  | アロプリノール(Zyloric)         | +   |                                        |                    |
|                  | ジグルニサル                   | +   |                                        |                    |
|                  | フェンクロフェナック(Flenac)       | +   |                                        |                    |
|                  | フェノプロフェン                 | +   |                                        |                    |
|                  | (Fenepnone, Progesi ▼ c) | +   |                                        |                    |
|                  | フルフェナム酸                  | +   |                                        |                    |
|                  | フルバイプロフェン(Froben)        | +   |                                        |                    |
|                  | インドメタシン                  | +   |                                        |                    |
|                  | ケトプロフェン                  | ++  |                                        |                    |
|                  | (Orudis, Alrheumat)      |     |                                        |                    |
|                  | メフェナム酸                   |     |                                        |                    |
|                  | ナプロキセン                   |     |                                        |                    |
| 皮膚科<br>アルコール中毒   | (Naprosyn, Synflex)      |     | ビタミンK 1<br>抗ヒスタミン剤<br>フェナゾン<br>抗ヒスタミン剤 | +++<br>+<br>+<br>+ |
|                  | ハラセタモール大量一日用量            |     |                                        |                    |
|                  | (Dista ▼ gesic 中のデキスト    |     |                                        |                    |
|                  | ロプロホキシフェン)               |     |                                        |                    |
|                  | ビロキシカム(Feldene)          |     |                                        |                    |
|                  | スリンダック(Clinoril)         |     |                                        |                    |
|                  | アルコール                    |     |                                        |                    |

|  |                   |  |  |  |
|--|-------------------|--|--|--|
|  | ジスルフィラム(Antabuse) |  |  |  |
|--|-------------------|--|--|--|

## 12. 文献

- 1) Miale J.B. Prothrombin Time Standardization Report of the Expert Panel on Oral Anticoagulant Control: A Minority Opinion Thrombos. Haemostas. 42 1132-1135 1979
- 2) Prothrombin Time Standardization : Report of the Expert Panel on Oral Anticoagulant Control Thrombos. Haemostas. 42 1073-1114 1979
- 3) Besselaar A. ADPTION AND VALIDATION OF THE INTERNATIONAL NAORMALIZED RATIO FOR MONITORING ORAL ANTICOAGULANT THERAPY [THE SITUATION IN 1989] Res. Clin. Lab. 20 75-81 1990
- 4) Loeliger E.A. Thromboplastin Calibration - Experience of the Dutch Reference Laboratory for Anticoagulant Control Thrombos. Haemostas. 40 272-287 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. 11 393-398 1989
- 7) Koepke J.A., Rodgers J.L. Pre-instrumental Variables in Coagulation Testing A. J. C. P. 64 591-596 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) 688-699 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) 124-126 1989
- 10) Basselaar A. The Significane of the International Normalized Ratio (INR) for Oral Anticoagulant Therapy JIFCC 3(4) 146-153 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 39-44 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 59-69 1990
- 13) Mckernan A., Thomson J.M. The reliability of internatilnal ratios during short-term oral treatment Clin. lab. Haemat. 10 63-71 1988
- 14) Poggio M. THE EFFECT OF INSTRUMENTS FOR PROTHROMBIN TIME TESTING ON THE INTERNATIONAL NORMALIZED RATIO Res. Clin. Lab. 20 71-74 1990

- 15) Peters R.H.M., Besselaar A. A Multi-Centre Study to Evaluate Method Dependency of the International Sensitivity Index of Bovine Thromboplastin Thrombos. Haemostas. 61(2) 166-169 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. 24 460-463 1971
- 17) Loeliger E.A., Visser L.P. A Simplified Thromboplastin Calibration Procedure for Standardization of Anticoagulant Control Thrombos. Diath. Haemorrh. 33 172-190 1975
- 18) Miale J.B., Lafond D.J. 1963 PROTHROMBIN TIME TEST SURVEY, COLLEGE OF AMERICAN PATHOLOGISTS, STANDARDS COMMITTEE, SUBCOMMITTEE ON COAGULATION A. J. C. P. 47(1) 40-59 1967
- 19) Loeliger E.A., Besselaar A. Critical Appraisal, Clinical Usefulness, and Implementation of the Thromboplastin concept of Prothrombin-Time Standardization 34-48
- 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 45-57 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) 535-541 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 Included in the ICTH/ICSH Collaborative Study on Prothrombin Time Standardization Thrombos. Haemostas. 42 1115-1127 1979
- 24) Prothrombin Time Reporting and the International Normalized Ratio System – Improvements Are Needed A. J. C. P. 99(6) 653-655 1993
- 25) Koepke J.A. International Committee Communications – Partial Thromboplastin Time Test – Proposed Performance Guidelines ICSH Panel on the PTT Thrombos. Haemostas. 55(1) 143-144 1986
- 26) Ingram G.I.C., Hills M. International Committee Communications – Reference Method for the One-Stage Prothrombin Time Test on Human Blood International Committee for Standardization in Hematology Thrombos. Haemostas. 36 237-239 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 Anticoagulant Control Thrombos. Haemostas. 155-156 1985
- 29) Besselaar A. Standardization and Quality Control in Blood Coagulation Assays Qual. Assurance in Haemat. 119-150
- 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. 50 283-287 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 73-81 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.2 515-517 1985
- 33) 天木一太      INR      検査と技術 Vol.15 No.12 1329-1330 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.6 929-937 1988
- 35) 上塚芳郎、他      経口抗凝血療法におけるトロロンテスト (%) 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.6 769-775 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.2 114-120 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.16 431-440 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 Besselaar A., Lewis S.      Reliability and Clinical impact of the normalization of the Prothrombin times in Oral Anticoagulant control      Thrombos. Haemostasis 148-154 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.3 433-436 1985
- 43) Solomon H.M., et al.      Heparin-Induced Increase in the International Normalized Ratio      A.J.C.P. Vol.103 No.6 735-739 1995
- 44) Poggio M., Van den Besselaar A.M.H.P., et al      The Effect of Some Instruments for Prothrombin Time testing on the International Sensitivity Index (ISI) of two Rabbit Tissue Thromboplastin Reagents      Thrombosis and Haemostasis Vol.62 No.3 868-874 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 312S-326S 1992
- 46) Dalen J.E., Hirsh J.      Introduction      Chest Vol.108 No.4 225S-226S 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 258S-275S 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 Anticoagulant Therapy      New England J. Med Vol.329 No.10 696-702 1993
- 50) Hirsh J.      Monograph by Dade Education: Anticoagulant Therapy      Baxter 1988

- 51) Barrowcliffe T. 4. Standardization of Coagulation Tests and Assays 51-86
- 52) Poller L. A national standard for anticoagulant therapy – The Manchester Comparative Reagent The Lancet 1: 491-493 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 80-88 1972
- 54) Poller L. The British System for Anticoagulant Control Thrombos. Diathes. haemorrh. Vol.33 157-162 1975
- 55) WHO Expert Committee on Biological Standardization 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.3 455-463 1988
- 57) Van den Besselaar A.M.H.P., Bertina R.M. Multi-Center Calibration of the Second Reference Material for Thromboplastin, Rabbit, Plain, Coded CRM 149R Thrombosis Haemostasis Vol.65 No.3 263-267 1991
- 58) Van den Besselaar A.M.H.P., Bertina R.M. Multi-Center Study of Thromboplastin Calibration precision - Influence of Reagent Species, Composition, and International Sensitivity Index (ISI) Thrombosis and Haemostasis Vol.69 No.1 35-40 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 30-32 1992
- 60) 小田晃司、他 CA-4000 による各種組織トロンボプラスチン INR (International Normalized Ratio) の検討 Sysmex Journal Vol.13 No.1 153-158 1990
- 61) Chantarangkul V., et al The Effect of Instrumentation on Thromboplastin Calibration Thrombosis and Haemostasis Vol.67 No.5 588-589 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 1956-1959 1993
- 63) 福塚勝弘、他 PT の I N R 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.154 282-288 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.2 203-207 1991
- 70) Schmitz L.L., et al. Failure to Generate Comparable International Normalized Ratio Values Using Five Different Thromboplastin Reagents in Parallel Studies of Patients receiving Warfarin Clin. Appl. Thrombosis/Hemostasis Vol.1 No.2 142-150 1995
- 71) 富田真理、他 ISI 表示されたトロンボプラスチン試薬の検討(トロンボプラスチン FS) 衛生検査 Vol.38 No.4 410-414 1989
- 72) Peters R.H.M., Van den Besselaar A.M.H.P., et al Determination of the Mean Normal Prothrombin Time for Assessment of International Normalized Ratios – Usefulness of Lyophilized Plasma Thrombosis and Haemostasis Vol.66 No.4 442-445 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.2 154-160 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 1103-1107 1982
- 75) Loeliger E., van Halem-Visser L. Results of Calibration by the Dutch National Reference Laboratory of the Thromboplastins included in the ICTH/ICSH Collaborative Study of Prothrombin Time Standardization Thrombos. Haemostasis Vol.42 1128-1131 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.3 424-429 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. 1183-1187 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.5 895-900 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 1516-1521 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 Vol.39 No.2 159-163 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 1787-1790 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.2 228-239 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 Calibration of the Second Primary International Reference Preparation for Thromboplastin(Thromboplastin, human, plain, coded BCT/253) Thrombos. Haemostasis Vol.52 No.3 336-342 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 1264-1267 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 453-457 1973
- 94) Ingram G. The Stability of the WHO Reference Thromboplastin NIBS & C 67/40 Thrombos. Haemostasis. Vol.42 No. 1135-1140 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 89 - 95 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/Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>系  
油化学 Vol.43 No.5 403-408 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.2 101-108 1994
- 98) Vis R., Van den Besselaar A.M.H.P., et al Artificial 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 Anticoagulant on Calculation of the International Normalized Ratio and the International Sensitivity Index of Thromboplastin Thrombosis and Haemostasis Vol.72 No.1 84-88 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.4 583-585 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.5 890-894 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 1137-1141 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.3 474-477 1996

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

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

106) 白幡聡 特集 ビタミン 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 10-17 1996

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

108) 徳永文稔 特集 ビタミン 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 29-36 1996

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

110) 長尾大 特集 ビタミン 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 61-65 1996

111) 飯塚敦夫 特集 ビタミン 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 67-72 1996

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