



血液凝固検査の標準化

— 凝固検査検体取扱いに関するコンセンサス —

日本検査血液学会標準化委員会

(関西医科大学 病態検査学講座、

シスメックス株式会社 凝固プロダクトエンジニアリング本部)

小宮山 豊



本日の話題

- ✓ **なぜ今、凝固検査検体取扱い？**
- ✓ **アンケート結果より**
- ✓ **コンセンサスで取り上げる内容**
- ✓ **すぐに測定しない時にどうするか？**
- ✓ **その他**

家子委員長：検査結果を急ぐため十分な遠心時間を得られないとの意見もあるが、確実な診断に結びつくことが重要である。



なぜ今、凝固検査検体取扱いか？

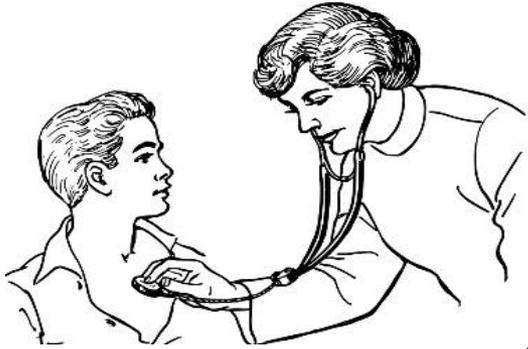
- **凝固時間検査：術前検査や出血性疾患のスクリーニング、ヘパリンやワルファリンなどのコントロールに多くの施設で利用**
- **凝固時間検査を標準化する上で、まずその検体の取り扱いを標準化することが極めて重要**
- **日本検査血液学会標準化委員会 凝固検査標準化ワーキンググループは、2013年末に日本検査血液学会評議員にアンケート調査したところ**



- **クエン酸ナトリウム濃度、遠心分離前後の保存条件、遠心分離条件などで統一性が不徹底**



なぜ今、凝固検査取扱い？凝固検査の流れ



診察 (医師)

1. 採血

- ・採血指示：医師
- ・採血準備：採血管、採血針
- ・採血行為：臨床検査技師、医師、看護師

2. 検体調整

- ・全血保存
- ・血漿作成：検査室 (臨床検査技師)
- ・血漿保存

3. 測定

- ・ (試薬調整、測定機器調整)
- ・凝固時間測定
- ・検査結果報告



医療行為など (医師)



アンケート結果より



アンケート結果(1)

ー採用採血管サイズー

採血管サイズ	施設数	割合
1.8 mL	81	68.1%
2.7 mL	23	19.3%
4.5 mL	9	7.6%
その他: 0.9 mL	6	5%
合計	119	100%

採血管サイズと遠心G

後述しますが、

同じ3000回転でも

16.0 cm = 1610 xg

14.5 cm = 1459 xg

12.5 cm = 1258 xg

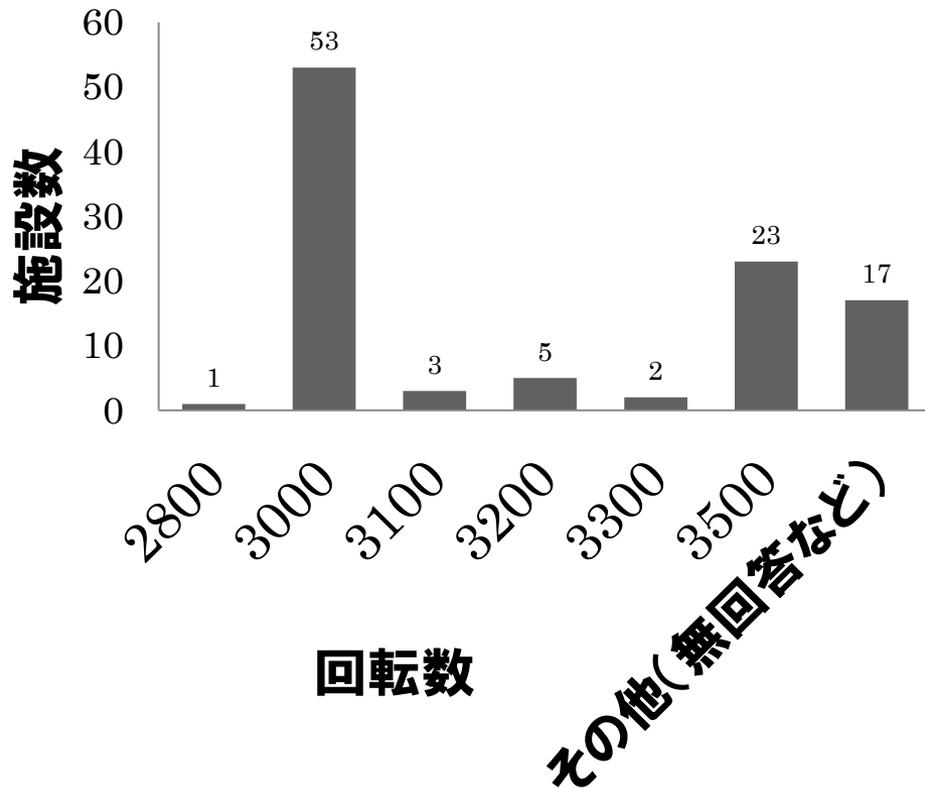
http://bio.tomys.co.jp/products/centrifuges/acceleration_simulator/



アンケート結果(2)

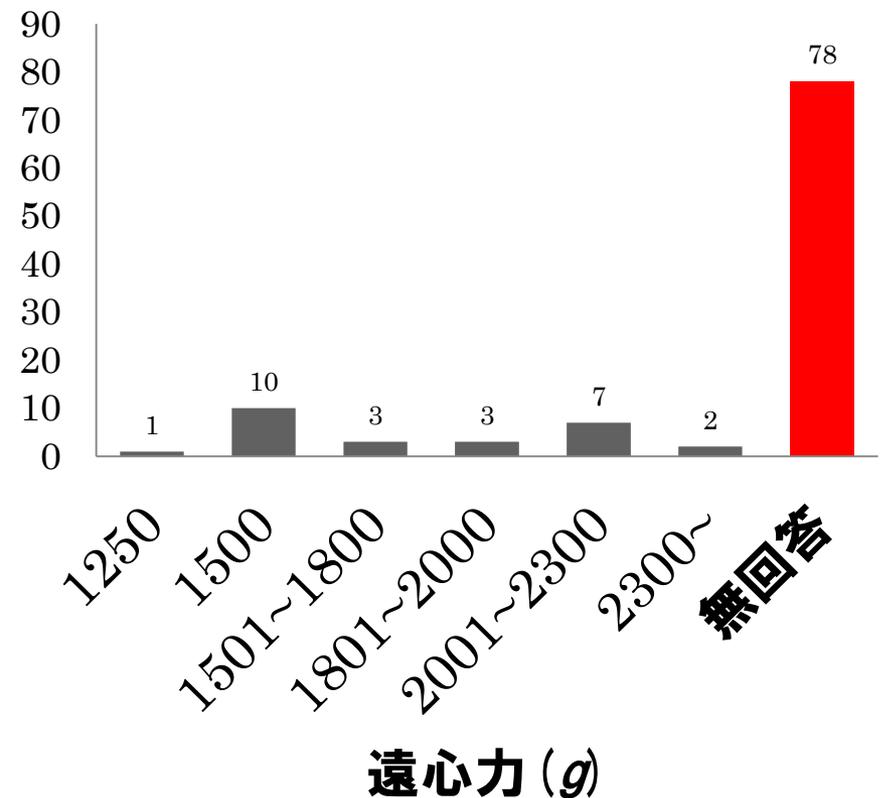
—遠心回転数と遠心力 g —

A



B

多数の無回答施設!



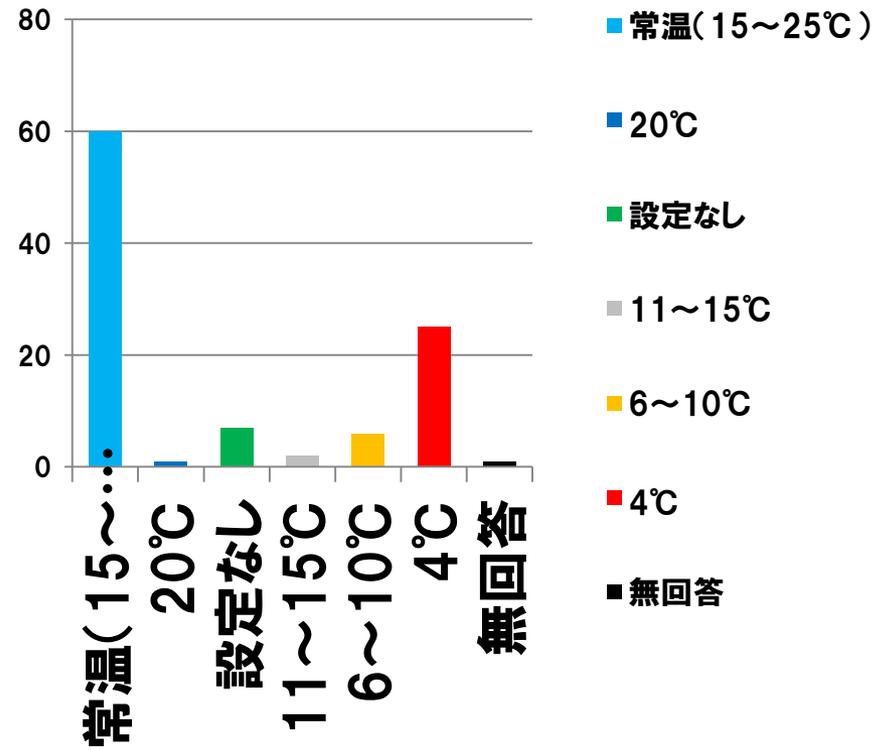
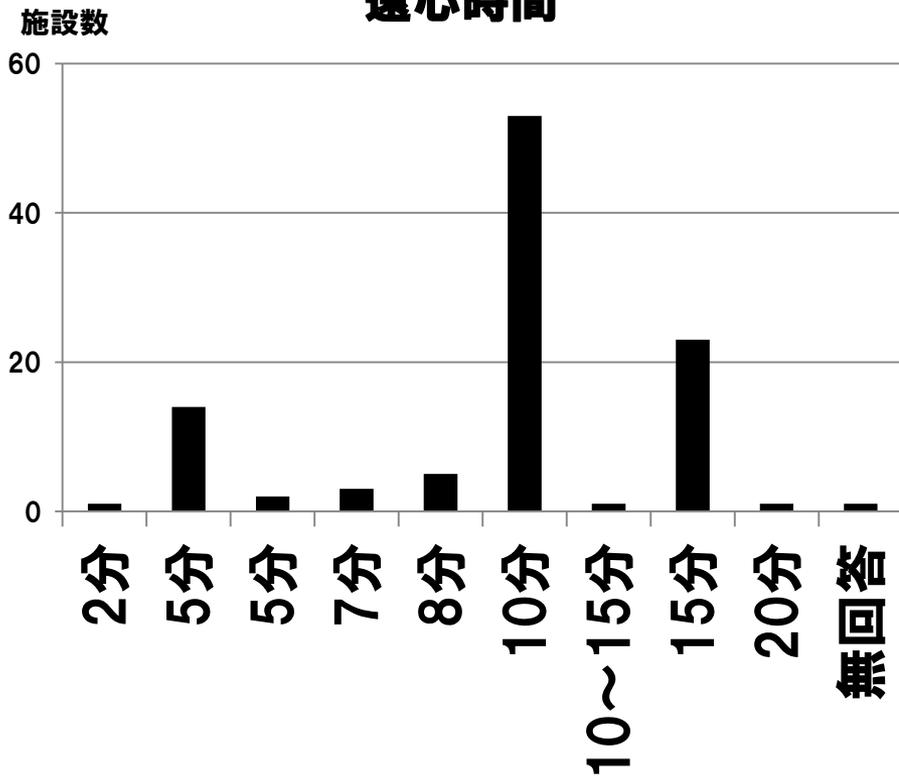


アンケート結果 (3)

—遠心時間と温度—

**4℃で遠心する施設
が20施設以上！**

遠心時間

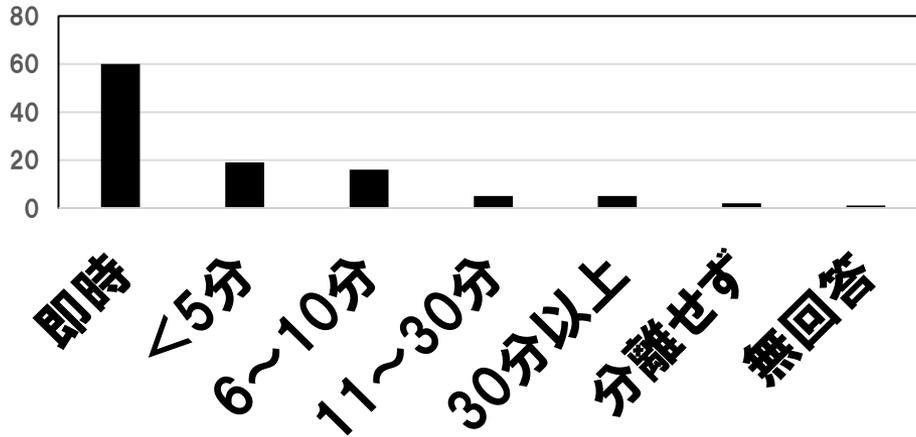




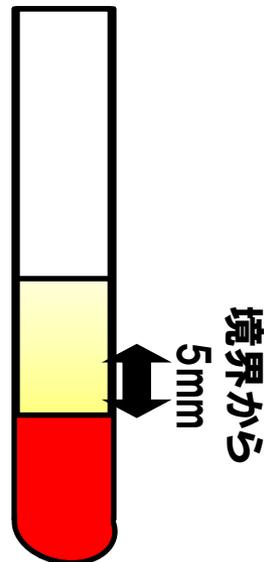
アンケート結果 (4)

— 血漿採取レベルと経過時間 —

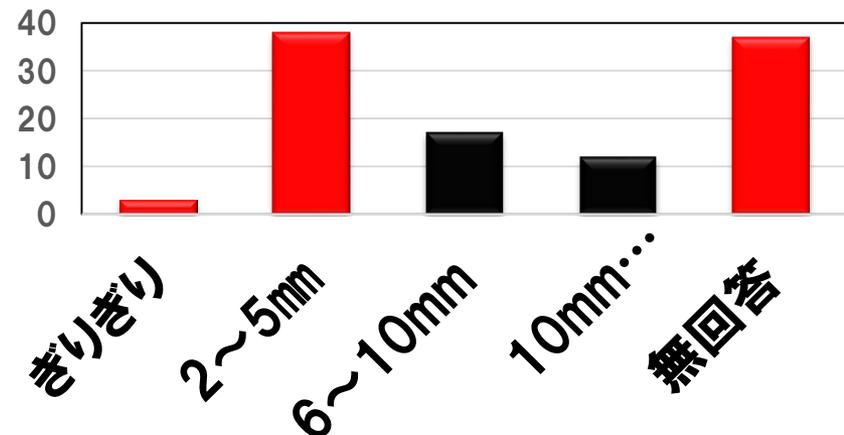
分離後測定までの時間



ぎりぎりまで、2-5mm
まで採取が若干数と無
回答も！



血漿採取レベル





アンケート結果のまとめ

- **解答施設は200床以上の自施設測定者がほとんどである**
- **採血管の種類が施設により異なる。**
- **3.8%のクエン酸Na使用施設はほとんど無いが、いまだ5%使用との報告も(2016年検査血液学会)。**
- **遠心条件が施設でばらばらである。特に4℃で遠心分離する施設が一定数存在する。**
- **血漿採取の高さ(レベル)が施設により異なる。**

これらは何に影響し、どのように解決すべきか。



検査血液学会として推奨案を提示する



コンセンサスで取り上げる内容



凝固検査検体取扱いに関するコンセンサス

日本検査血液学会標準化委員会 凝固検査標準化ワーキンググループが取り組み、2016年発表(日検血会誌 17:149-168、2016)

含まれる範囲

- **プロトロンビン時間(PT)**
- **活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)**
- **フィブリノゲン(Fbg)**
- **ループスアンチコアグラント(LA)**
- **希釈ラッセル蛇毒時間(dRVVT)**
- **凝固因子インヒビター定性(クロスミキシング試験)**
- **トロンボテスト(TT)**
- **ヘパプラスチンテスト(HPT)**



日本検査血液学会による凝固検査コンセンサス作成 (凝固検査標準化ワーキンググループ)

クエン酸Na濃度:CLSIと英国GLを
スタンダード

クエン酸Na採血管での許容採血
量:CLSIと英国GLをスタンダード

採血で使用する器具:本邦の採血
GLをスタンダード

Cold activationと採血後の保存・
遠心条件:CLSI&文献

遠心回転数、時間:文献と実験

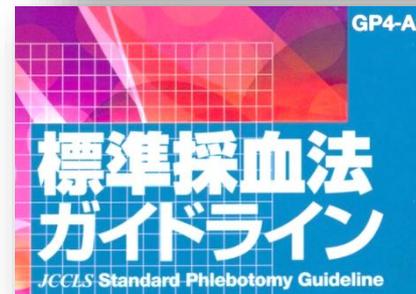
血漿回収レベル:文献的考察

H21-A5
Vol. 28 No. 5
Replaces H21-A4
Vol. 23 No. 35

Collection, Transport, and Processing of
Blood Specimens for Testing Plasma-Based
Coagulation Assays and Molecular
Hemostasis Assays; Approved Guideline—
Fifth Edition

Guidelines on the laboratory aspects of assays used in
haemostasis and thrombosis

I. MACKIE*, P. COOPER†, A. LAWRIE*, S. KITCHEN†, E. GRAY‡, M. LAFFAN§, ON BEHALF OF BRITISH
COMMITTEE FOR STANDARDS IN HAEMATOLOGY



PEARLS OF
LABORATORY MEDICINE

*Preanalytical Issues Specific to
Coagulation Testing*

*Giuseppe Lippi
Academic Hospital of Parma, Italy*



本コンセンサス案作成用検証実験

小宮山ら委員の実験結果を今回具体的に提示。

1. 遠心分離条件の検証

【方法】

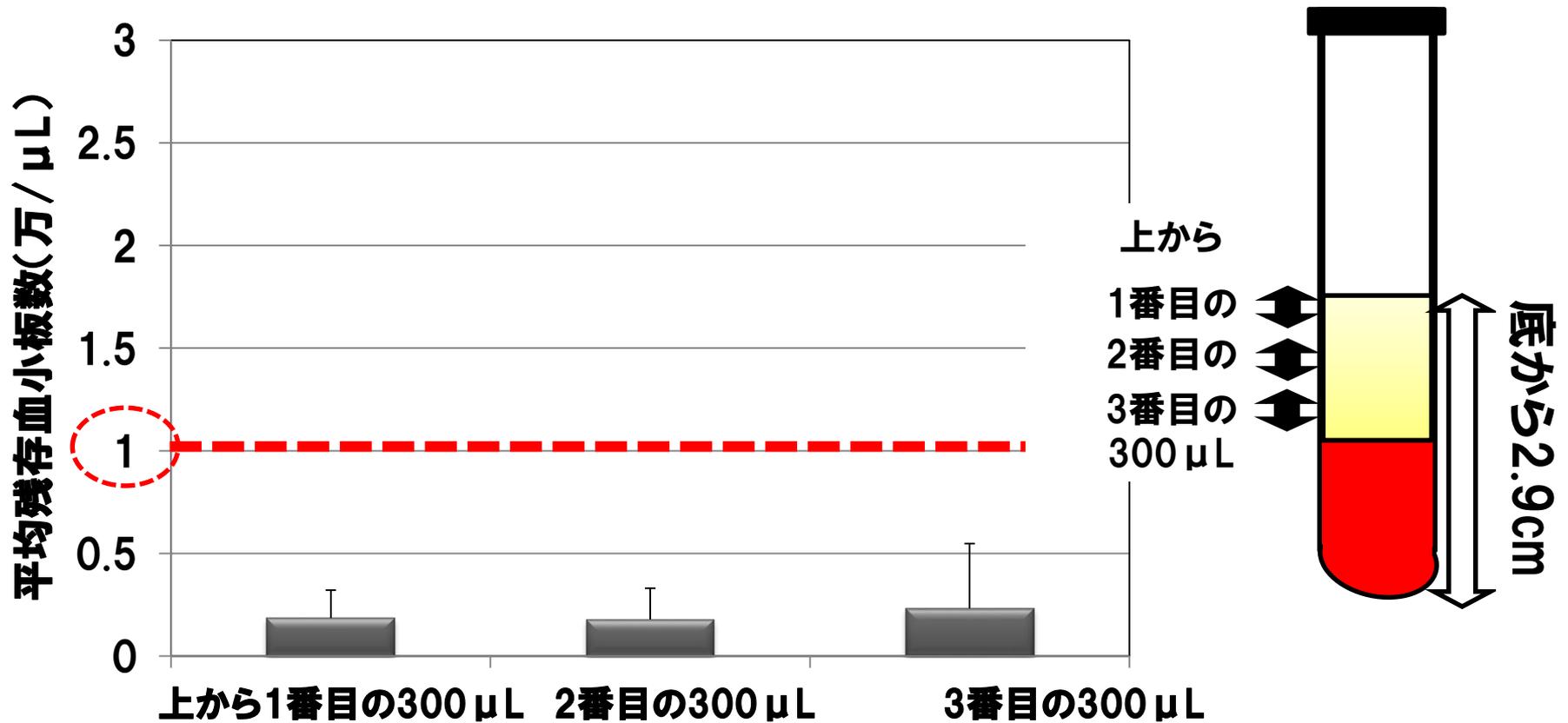
1. $1,500 \times g$ 、15分、室温、最小ブレーキ
2. 遠心後、上から $300 \mu\text{L}$ 毎にチューブに分注
3. 残存血小板数測定
4. APTT、PT-INR、Fbg、DD測定





2mL採血用クエン酸Na採血管

(2mL採血ラインまで底から2.9cm)を用い、平均遠心 g を $1,500 \times g$ 、15分、ブレーキ最小で遠心した場合の残存血小板数



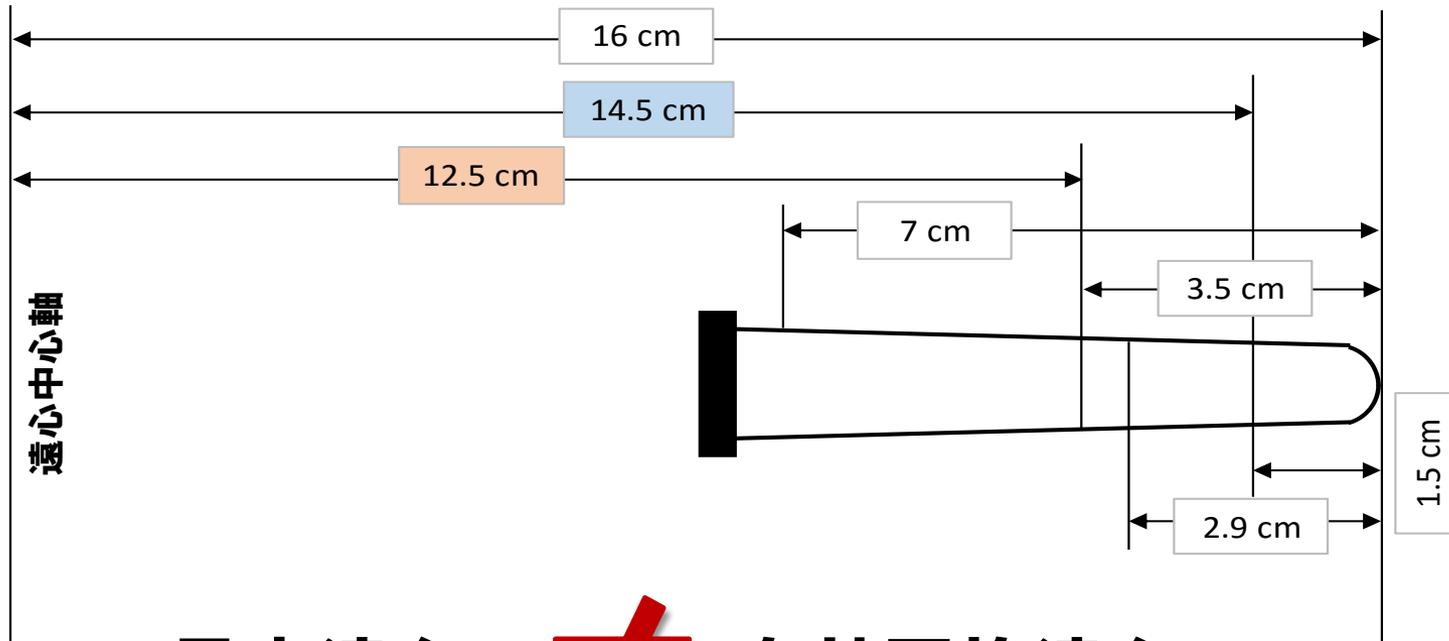
(血漿の一番上の層)

(最も血球界面に近い層)

備考: オリジナルの血小板数は 26.6 ± 7.2 万/ μ L (14.7 ~ 36.9 万/ μ L, n=14)



遠心 g を算定するための回転半径測定の実際 (2mLおよび5mL管を例に)



最大遠心 g \neq 有効平均遠心 g

5ml管 平均遠心半径: 12.5cm(赤バック)、最大遠心半径: 16.0cm

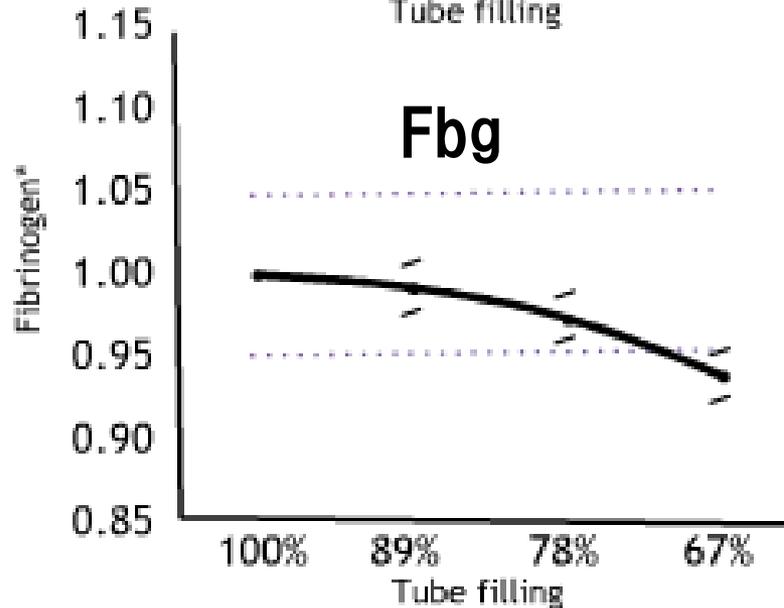
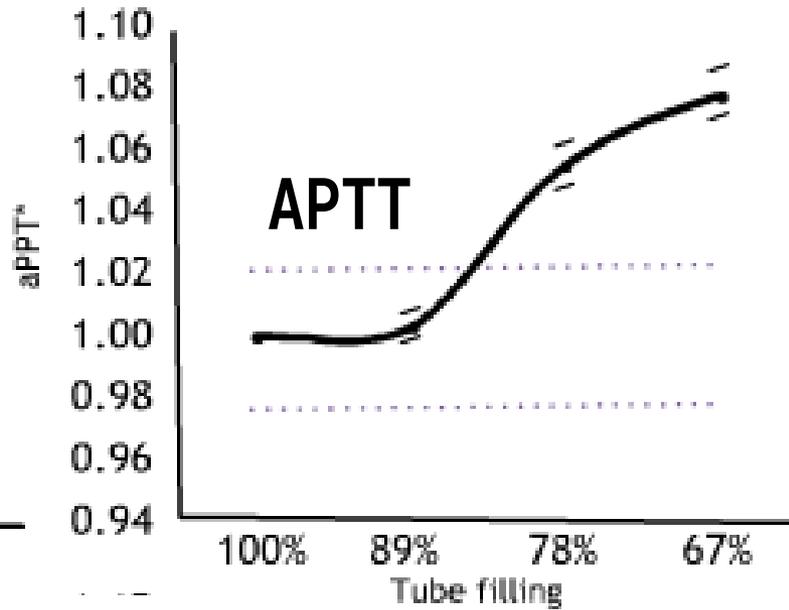
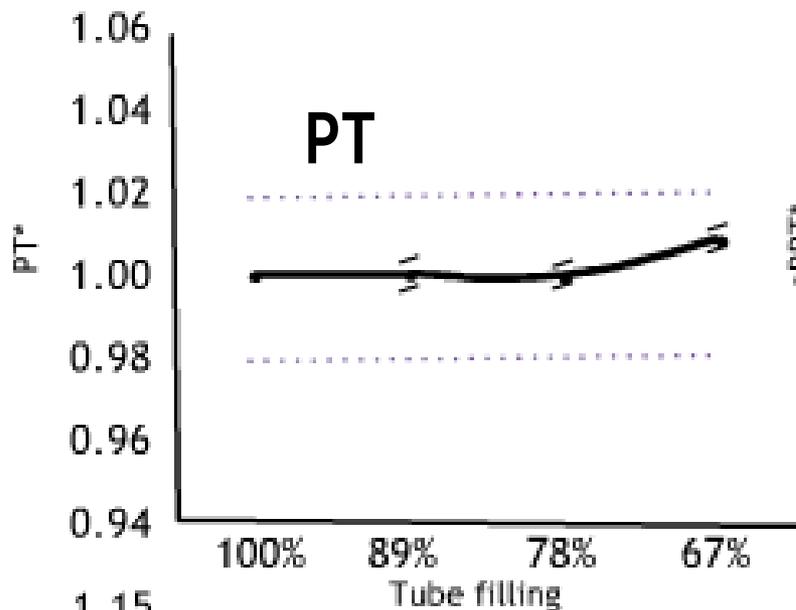
3000回転で平均遠心 g : 1258、最大遠心 g : 1610

2ml管 平均遠心半径: 14.5cm(青バック)、最大遠心半径: 16.0cm

3000回転で平均遠心 g : 1459、最大遠心 g : 1610



クエン酸加血で採血量不足は



APTTが最も影響される

Lippi G et al.: Quality standards for sample collection in coagulation testing. Semin Thromb Hemost: 38: 565-75, 2012



止血系検査のクエン酸Na

抗凝固剤：クエン酸Na濃度

□ 3.13～3.2%が望ましい

□ 3.8%は上記に比して結果が延長

(3.8%は直近の神奈川県調査でも5%がいまだ使用)

◆ クエン酸Naと血液の比率：許容範囲は±10%

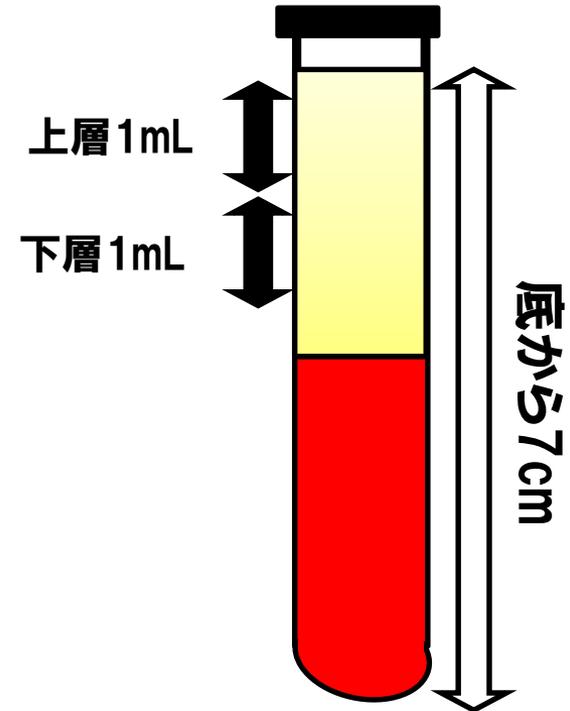
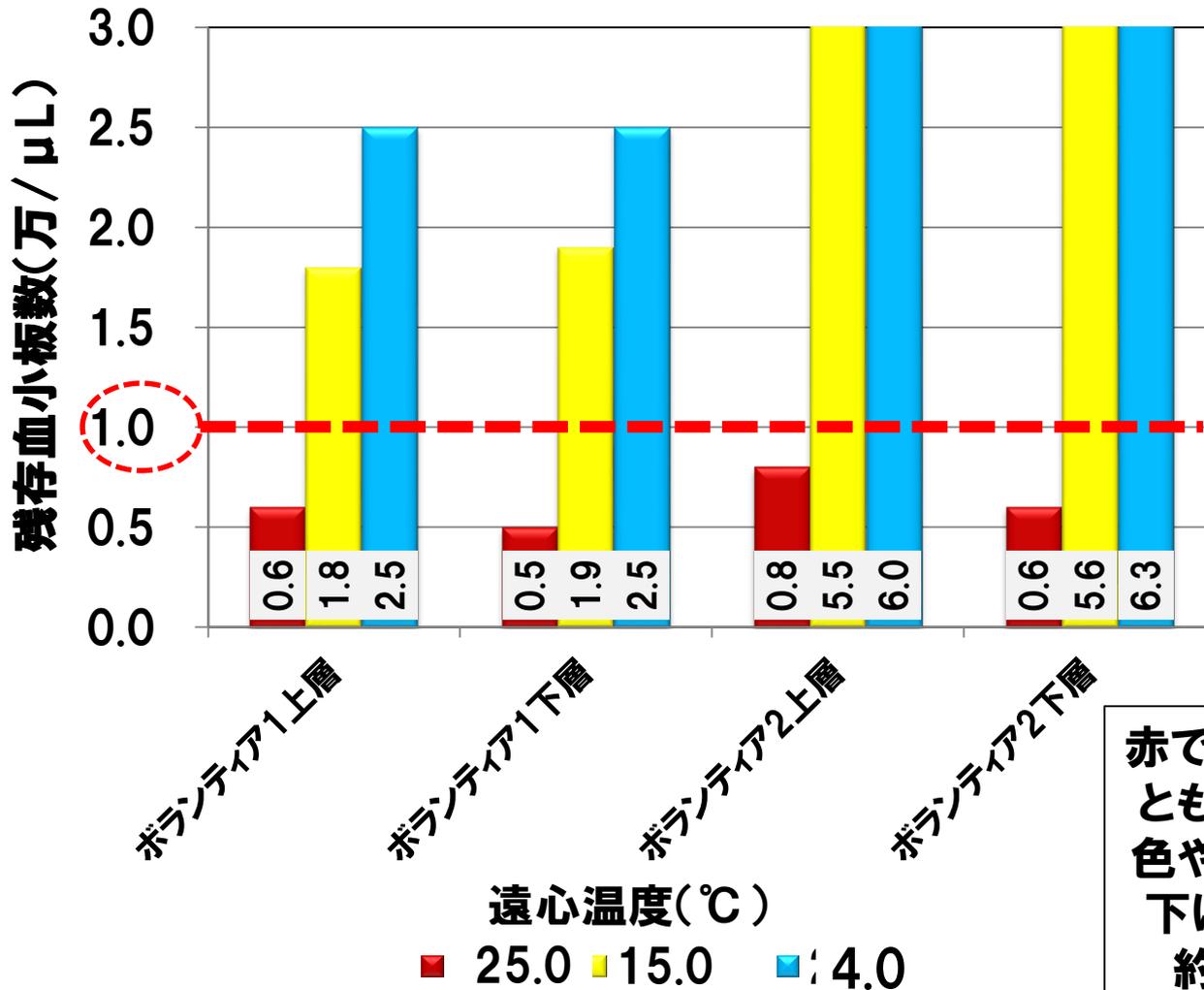
ヘパリン療法中の患者のAPTTを3.8%クエン酸Naと3.2%と比較すると7秒延長

を確認(Adcock DM et al: Am J Clin Pathol 107:105-10, 1997)

**自身が使うクエン酸Na濃度を
正確に知ろう。**



5mL採血管を、4、15、25°Cで遠心後の残存血小板数(上から1mL層)

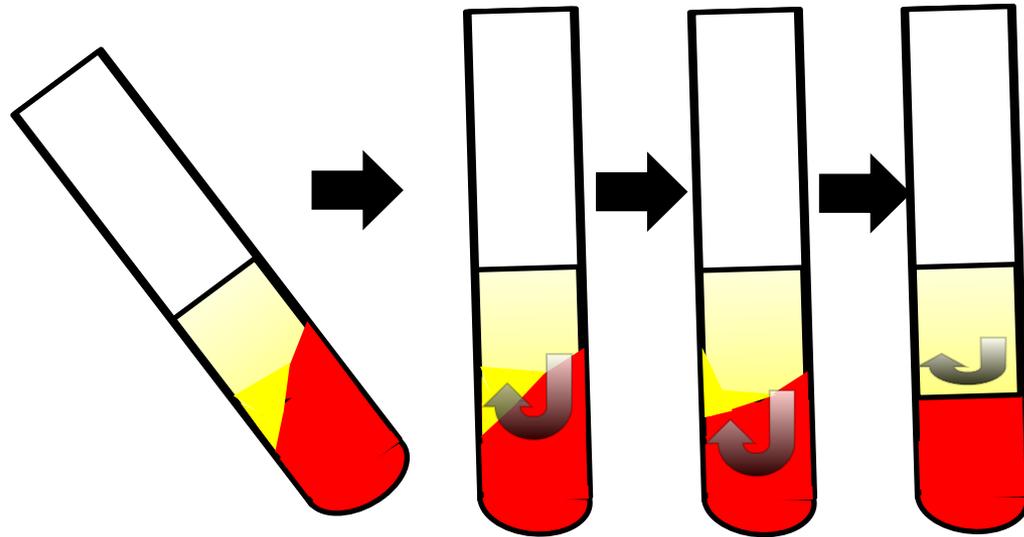
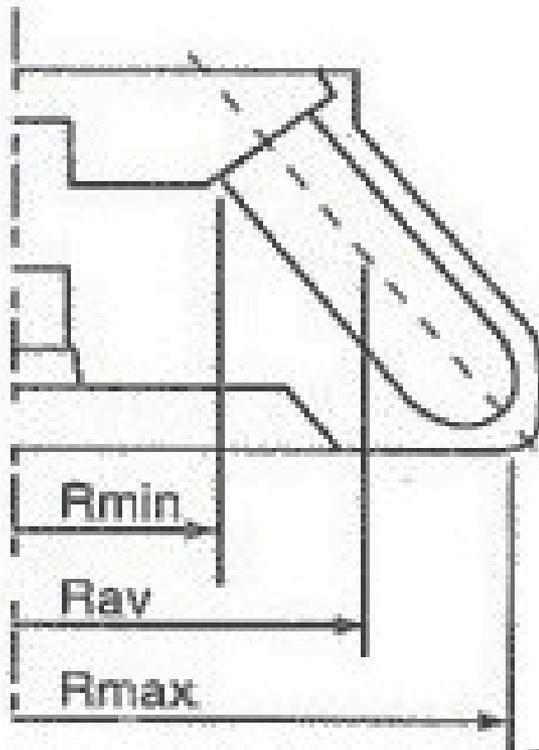


赤で示す25°C遠心で上層は、2例とも1万/ μ L未満であったが、黄色や青で示す15°C、4°Cと温度を下げるに従い、残存血小板数は約6万/ μ L以上に増加した。



血小板(マイクロパーティクル)と遠心分離

アングルロータ遠心後に放置・立てて放置、測定機内で動く
と、血小板が舞い上がりバックグラウンド上昇の可能性



アングルロータ内

サンプルラックに立て・測定器内で縦横に動く

**測定時まで残存血小板が
1万 / μL 以下を維持**

小宮山豊 他. 生物試料分析 2007;30:195-202



採血後の操作の小括(遠心や検査前保存)

自身で残存血小板確認が大切！

- **Cold activationと採血後保存、遠心温度設定:**
CLSIの指摘以来多くの施設で4℃/氷中から室温に変更 (20~25℃では4℃より残存血小板が少ない傾向)
- **遠心回転数か遠心Gか: 3,000rpmか3,500rpmか**
より遠心Gが普遍的で、目標は 2,000g あるいは 1,500g(これはCLSIが1,500g、英国のGLが2,000gと書いているため)⇒大切なことは残存血小板数を1万以下にできたか確認すること
- **遠心後の血漿回収はどこまでOKか: 5mm離す**

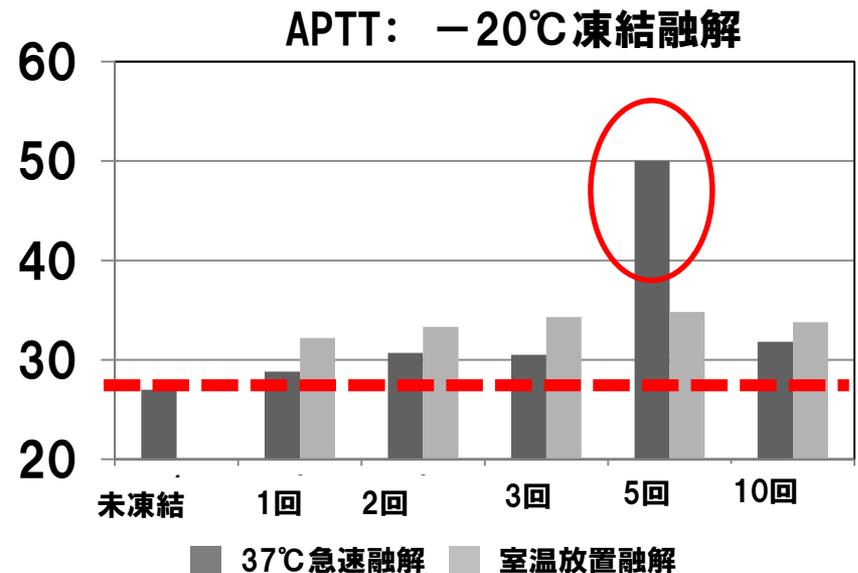
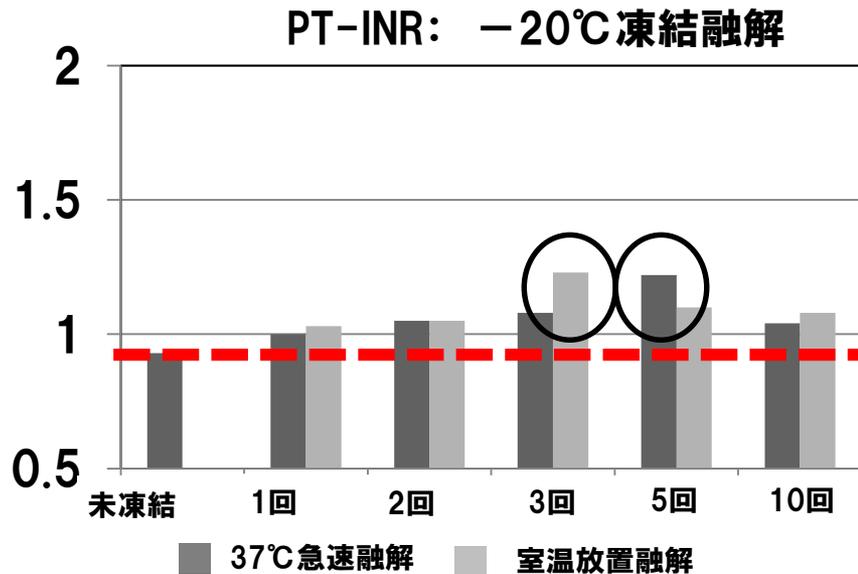


すぐに測定しないときにどうするか？



凍結温度と融解回数の止血

スクリーニングへの影響 (-20℃)

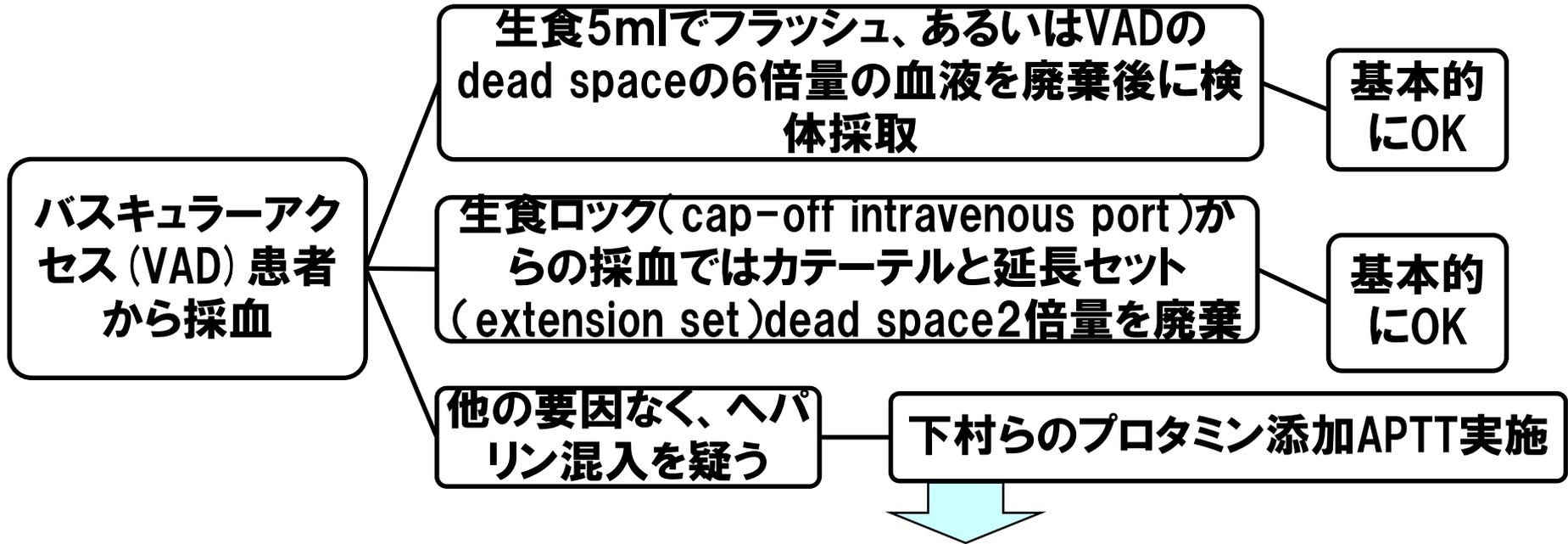


-20℃で凍結融解を繰り返すと、赤線(---)で示す未凍結に比して、凍結融解群では、黒丸(○) PT-INRで若干(0.1~0.2)であるが、赤丸(○)で示すようにAPTTでは著しい(15秒以上)の延長を3~5回の繰り返して認めた。なお、37℃急速融解と室温放置融解、どちらの条件でも-20℃では異常が発生した。



ヘパリン混入を疑う際の対処例

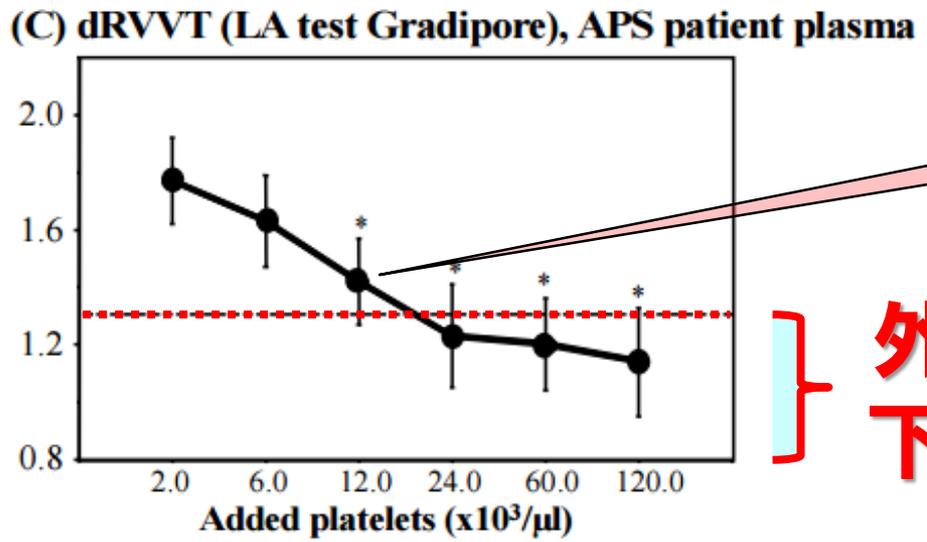
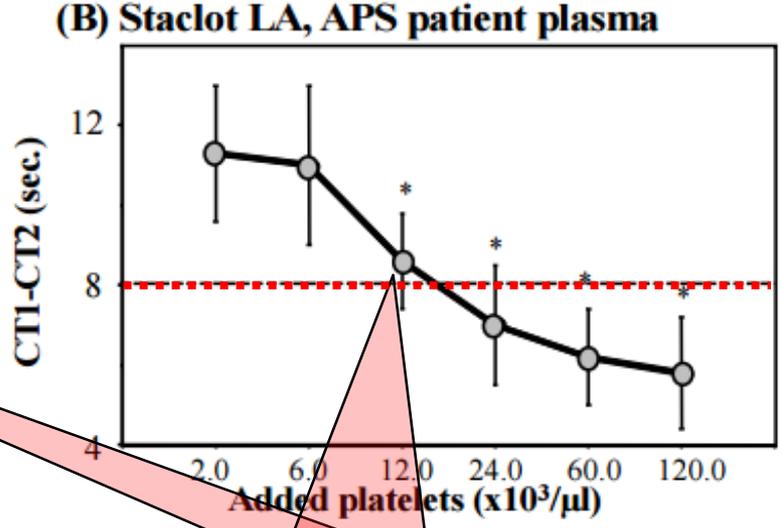
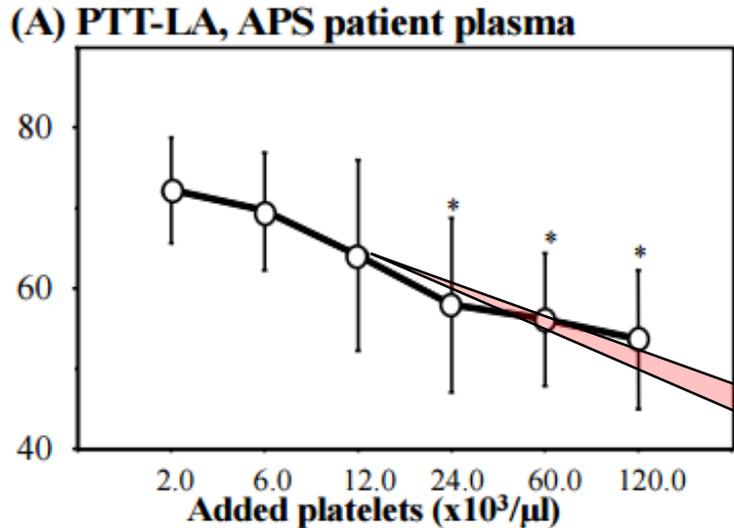
(下村大樹ら:日検血会誌 10:175-181、2009)



APTT(秒)	硫酸プロタミン(mg/mL)
41-50	0.05~0.1
51-100	0.1~0.2
100-200	0.2~0.3
200-300	0.3~0.4
300以上	0.5~0.6



残存血小板数がLA検査に及ぼす影響をAPS血漿で検証



Plt: 1.2万/μL

外注のdRVVTで1.2以下は陰性 ⇒ 偽陰性



検証実験のまとめ

1. 遠心分離条件

- 2mLの採血管において1,500 x g 、15分、室温の条件で、残存血小板数1万/ μL 以下の血漿を得ることができた。
- BD36823の2mL採血管、3mLおよび5mLにおいて、遠心時間の延長、遠心力を2,000 x g に上昇、遠心温度を25°Cに保持、血球部分から最も離れた血漿の上層のみを使用などで、残存血小板数1万/ μL 以下の血漿を得ることができた。

2. 凍結融解条件

- 凝固時間検査用検体の凍結は -40°C 以下を用いることが推奨される。
- 凍結融解回数は温度に関わらず2回以内とする必要がある。



その他



血液凝固経路概略と 基本検査のPT, APTTに関する疾患

内因系(APTT)

外因系(PT)

XII XI IX VIII X VII TF

APTTが延長する疾患

- 血友病A・B・vWD
- APS(無・血栓傾向)
- 重症肝障害
- Vit K欠乏症
- DIC
- 後天性血友病
(ヘパリン投与)
- ループスアンチコアグラント

PTが延長する疾患

- 重症肝障害
- Vit K欠乏症
(ワルファリン投与も)
- DIC

V

II

I

XIII

PTもAPTTも延長しない疾患

- 血管系:アレルギー性紫斑病など
- 血小板系:再生不良性貧血、ITP、HIT、TTPなど
- 凝固系:第XIII因子欠乏・異常症



APTTクロスミキシング試験の実際

— 37°C 2時間インキュベート中の水分蒸発は —

APTT測定に必要な0.3ml(見やすいようBPB中性溶液)を蓋付き0.5ml、1.5mlプラスチック遠心管、1.5mlネジ蓋付き凍結容器、2.5mlサンプルカップ(測定機器用)に入れ、パラフィルムあるいは蓋で密閉と蓋無し37°C、2時間後に容器に付着する液を確認

37°C、2時間後

インキュベート前





クロスミキシング判定しにくい40代男性(1)

**第1病日:生ガキによる感染性胃腸炎に対
症療法と抗生剤で治療(他院)。**



**第3病日:頭部に隆起する皮疹と掻痒感が
出現。⇒ ??????**

**第4病日:右手首に水疱、顔面から腋窩、
両側大腿部、陰部、腰背部に赤色調の
Spotが出現。**



**第7病日:K大学病院皮膚科を受診し両側
前腕の腫脹と紫斑を認め緊急入院。**



クロスミキシング判定しにくい40代男性(2)

第8病日：腫脹が増悪したため当院救命科にコンサルト。

- 両側前腕のコンパートメント症候群を認め、感染症による症状とは考え難く、凝固障害で多部位に出血と考えた。
- **APTT:71.4秒**の他は血小板の低下やPTの延長などの特記すべき異常所見なし。
- 血液検査、臨床経過より後天性血友病を疑ったためVIII因子・IX因子の活性及びinhibitorの検索(外注にオーダー)、ミキシングテストを行い、その結果と症状に応じてノボセブンを使用する方針とした。

APTTの延長

(家子正裕:循環抗凝血素 pp173-175、スタンダード検査血液学第3版、医歯薬出版 2014 を改変)

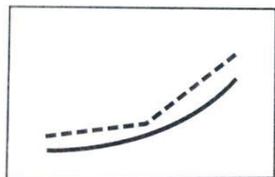
APTTの延長

混合試験(即時)を実施

【0:10、1:9、2:8、5:5、10:0】(実線)

37℃2時間インキュベート後を混合試験実施

【0:10、(1:9、2:8)、5:5、10:0】(点線)



即時反応、遅延反応

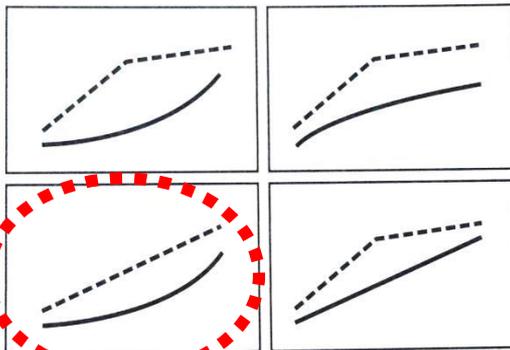
共に下に凸

凝固因子の欠乏か

ヘパリン混入

凝固因子定量か

硫酸プロタミン短縮試験



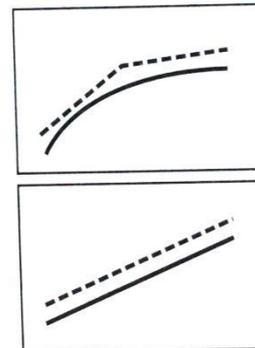
即時反応、遅延反応共に上に凸

凝固因子インヒビター

凝固因子インヒビター定量

(ベセスダ単位算出)

関西医科大学 小宮山豊



即時反応、遅延反応共に

直線か上に凸

LA陽性

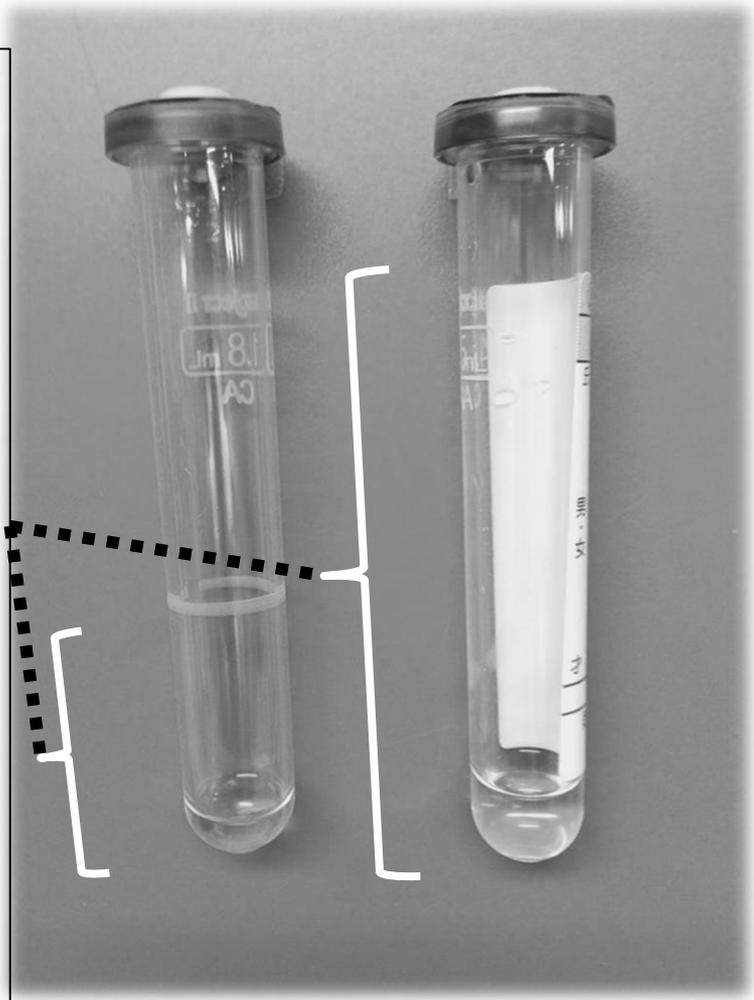
抗リン脂質抗体測定

抗CL、抗β2GPI、抗FII抗体



後天性血友病やLAと検査手技

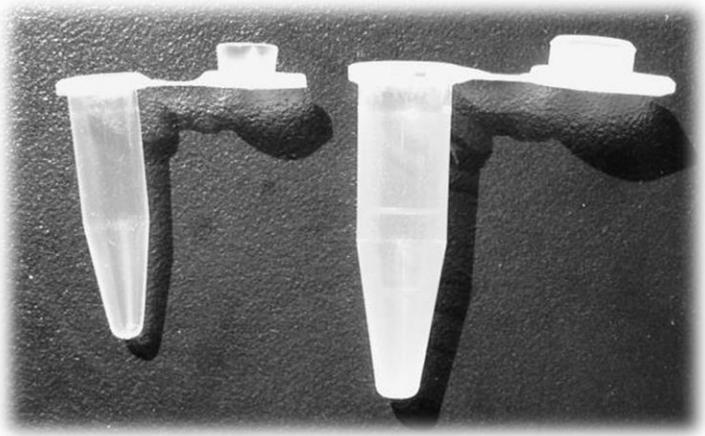
血液を入れたこの部分で、
下半分にある血球上の5 mm
を、検体として使用しない



2 ml採血管 5 ml採血管



凍結保存容器



0.5 ml 1.5 ml

微量遠心管 微量遠心管



凝固検査検体取扱いに関するコンセンサス抜粋(1)

1. 採血管

- ・ 容器の素材は、プラスチック製もしくはシリコン処理済みガラス製を使用する。
- ・ 抗凝固剤には、0.105～0.109M(3.13～3.2%)クエン酸ナトリウム溶液を使用する。
- ・ クエン酸ナトリウム溶液と血液の比率は1:9とし、許容採血量は公称採血量±10%までとする。
- ・ 患者のヘマトクリット値(Ht)が55%以上の場合はクエン酸ナトリウム溶液量を調整する。

2. 採血(JCCLSの標準採血法ガイドラインGP4-A2に従う)

- ・ 真空採血、注射器採血のいずれの組み合わせも使用可とする。
 - 採血針を用いた真空採血:1番目に凝固検査用採血管もしくは血清用採血管で採血する。
 - 翼付針を用いた真空採血:1番目にダミーの採血管もしくは他の検査用採血管で採血後、凝固時間検査用採血管で採血する。
 - 注射器採血:1番目に凝固検査用採血管に血液を分注する。
- ・ 最低限の血流うっ滞(駆血帯処置)で清潔に穿刺する。
- ・ 個別の状況に応じて対応することも可能とするため、21～23Gの注射針あるいは翼状針を使用する。
- ・ ヘパリンが混在する静脈ラインは使用不可である。
- ・ 正確な血液量が採血管に流入したことを確認し、血液と抗凝固剤は速やかに5回程度泡立たぬよう転倒混和する。



凝固検査検体取扱いに関するコンセンサス抜粋(2)

3. 操作(搬送)

- 1時間以内に血液試料を室温で遠心、血漿分離、必要に応じて凍結、ドライアイスで搬送。なお、病院や搬送の安全マニュアルに沿う。
- 遠心は $1,500 \times g$ で最低15分間(または $2,000 \times g$, 最低10分間)、 $18 \sim 25^{\circ}\text{C}$ で行い、血漿中残存血小板数が $1 \text{万} / \mu\text{L}$ 未満であることを確認する。
- 遠心後に凝固、黄疸、*in vitro* の強度溶血、高脂血・混濁試料は検査不可を考慮する。

4. 保存と融解

- ・室温($18 \sim 25^{\circ}\text{C}$)保存とし、4時間以内に分析(測定)する。 4°C での長時間保存は避ける。
- ・凍結保存が必要な検体はO-リングが付いたネジまき式ポリプロピレン管に血漿を分取し、長期間の場合は、 -75°C 以下での保存を推奨する。
- ・家庭用冷凍冷蔵庫は止血系検体の凍結保存に使用不可である。
- ・分析・測定前に 37°C 水浴中で急速融解し(通常は $1 \sim 2 \text{mL}$ 試料を水浴で溶かすのに $3 \sim 5$ 分)、クリオプレシピテートを再懸濁するため、緩やかに攪拌し速やかに測定する。



まとめ



- ❑ 冷却遠心すると、残存血小板は増加する！
- ❑ 血液凝固検査用検体の取り扱いを標準化し、止血検査を議論できる医師や仲間を増やそう！
- ❑ **医師の的確な判断と患者さんの利益に繋がる。**

検査結果を急ぐため十分な遠心時間を得られないとの意見もあるが、確実な診断に結びつくことが重要である

残存血小板数1万 / μL 以下を確認しよう
(BY 家子委員長)。