

カルシウム再加時間における容易なフィブリン検出法

山 口 航^{*1,2§} 宜 保 明 李^{*1} 眞 鍋 紀 子^{*1,2}

[要 旨] 各種血液凝固検査の基本はカルシウム再添加によるフィブリンの析出であり、カルシウム再加時間は簡便かつ安価にできる点も含めて、学生教育において実施する意義は大きい。しかしながらフィブリン析出の瞬間を見逃さないよう習熟する必要があること、試験管の振り方により凝固時間が異なるなど、初めて行う学生にとって技術的に難しい側面がある。そこで、色付きのラテックス粒子を加えた視覚的に分かり易いフィブリン検出法を考案した。

ラテックス添加により、細かい点状のフィブリン凝集塊と網状のフィブリン形成を観察することが可能となった。また用手法にてカルシウム再加時間を行ったところ、未添加に比べてラテックス添加の方が凝固時間は短くなった。よって、ラテックス粒子を添加したカルシウム再加時間は、初心者である学生にもフィブリン析出の観察が容易に行え、凝固の過程を理解する上で有用な検出法であると考えられた。

[キーワード] カルシウム再加時間、ラテックス粒子、フィブリン析出

緒 言

脱カルシウム作用のあるクエン酸ナトリウムを静脈血に加えて、凝固を阻止して得られた血漿に、再びカルシウムを加えると凝固カスケードが進行し、血漿は凝固する。このカルシウムイオン再添加の直後からフィブリン析出までの時間を、カルシウム再加時間（またはカルシウム再加凝固時間）という¹⁾。Quickのプロトロンビン時間測定法が開発されてから急激に発展を遂げた各種血液凝固検査のほとんどが、血漿にカルシウムイオンを加えて凝固するまでの時間を測るという操作を基本としているため、カルシウム再加時間は各凝固検査の用手法を身につける上で重要な検査法

である²⁾。

カルシウム再加時間は、内因系凝固因子の総合活性をみる検査方法であるが、血漿中の残存血小板数により影響を受けるため、基準範囲は90～180秒と範囲が広く、検出感度は全血凝固時間や活性化部分トロンボプラスチン時間(activated partial thromboplastin time: APTT)の中間くらいである³⁾。そのため、現在検査室においてほとんど用いられておらず、APTTにとって代わられている。さらに、細かい点状または網状のフィブリン析出の瞬間を見逃さないよう習熟する必要があること、試験管の振り方により凝固時間が異なることなど技術的な難しさという問題点もある³⁾⁴⁾。しかし初心者である学生が凝固時間の測定技術を

*1 香川県立保健医療大学保健医療学部臨床検査学科 § yamaguchi@chs.pref.kagawa.jp

*2 香川県立保健医療大学大学院

身に付ける上で、フィブリンの析出を観察することは重要であり、簡便かつ安価にできる点も含め、カルシウム再加時間は最も適した学内実習であるといえる⁵⁾。その上、検体に富血小板血漿 (platelet rich plasma: PRP) と乏血小板血漿 (platelet poor plasma: PPP) を用いることで、残存血小板数の違いにより PPP の方が延長するため、凝固過程において血小板のリン脂質が重要であることを理解できる⁶⁾ という利点がある。

そこで、上記の問題点を解決するために、ラテックス粒子を加えた視覚的に捉えやすいフィブリンの検出法について検討したので報告する。

I. 対象と方法

1. 血漿の調製

A 大学に在籍している学生および教員にアンケートを行い、疾患罹患および薬剤・サプリメントの服用がなく、研究に同意を得ることのできた 18 名を対象とし、真空採血を行った。本研究は、香川県立保健医療大学研究等倫理審査委員会の承認を受けて実施した (承認番号 277)。

対象者より得た血液 (3.2% クエン酸 Na : 血液 = 1 : 9) 採血管を転倒混和後、150 g で 10 分遠心した PRP と 2,000 g で 10 分遠心した PPP を作製した。作製した PRP と PPP はプール血漿として -30℃ で凍結保存し、使用直前に 37℃ で 3 分温めて融解したものを各測定に使用した。

2. 試薬

塩化カルシウム溶液は 25 mM 塩化カルシウム液 (シスメックス株式会社) を使用した (以後 : 未添加塩化カルシウム液)。ラテックス粒子は粒径 0.32 μm の Blue Polystyrene Latex (MAGSPHERE 株式会社) を用いた。ラテックス粒子を添加した塩化カルシウム液は、未添加塩化カルシウム液に前述のラテックス粒子が終濃度 1% となるように添加して使用した (以後 : ラテックス添加塩化カルシウム液)。

3. 物理的凝固時間測定法

添加するラテックス粒子の凝固時間への影響を確認するため、以下の測定を行った。

測定機器は KC4 デルタ (エル・エム・エス株式

会社) を使用した。検体 100 μL とスチールボールの入ったキュベットを準備し、予め 37℃ で加温しておいたラテックス添加塩化カルシウム液あるいは未添加塩化カルシウム液を専用マルチピペットで 100 μL 添加した。KC4 デルタでは添加と同時にタイマーが作動し、フィブリン析出による粘稠度の高まりに伴いスチールボールが可動するあるいは可動し始めるまでの時間 (凝固終末点) が凝固時間として表示される。

4. カルシウム再加時間測定法

内径 8 mm の小試験管に検体を 100 μL とり、37℃ 恒温槽で 1 分加温した。予め 37℃ で加温しておいたラテックス添加塩化カルシウム液あるいは未添加塩化カルシウム液を 100 μL 添加して、ストップウォッチをスタートさせた。37℃ 恒温槽内で 50 秒静置後、フィブリンの析出を 10 秒毎に観察し、目視で析出が確認できるまでの時間を凝固時間として測定した。

5. 統計学的解析

物理的凝固時間測定法については各血漿を用いて、ラテックス添加塩化カルシウム液あるいは未添加塩化カルシウム液でそれぞれ 4 回測定を行った。カルシウム再加時間測定法については各血漿を用いて、ラテックス添加塩化カルシウム液あるいは未添加塩化カルシウム液について、教員 3 名はそれぞれ 5 回、学生 6 名はそれぞれ 3 回測定を行った。測定値は各群の平均値と標準偏差で表し、有意差検定は Student's t-test により行った。p < 0.05 を統計学的有意とした。

II. 結 果

KC4 デルタを用いた凝固時間の測定において、PRP 検体では未添加塩化カルシウム液 132.5 ± 3.4 秒、ラテックス添加塩化カルシウム液 134.3 ± 5.4 秒であり、PPP 検体では未添加塩化カルシウム液 274.7 ± 23.3 秒、ラテックス添加塩化カルシウム液 283.3 ± 14.7 秒であった (図 1)。どちらの検体でも有意差はなく、ラテックス粒子添加による影響は認められなかった。

ラテックス粒子未添加および添加のカルシウム再加時間のフィブリン観察像を図 2 に示した。

青色のラテックス粒子を添加したカルシウム再加時間では、まず溶液全体が青くなり、フィブリン析出に伴い非常に細かい青色のフィブリン凝集塊が認められたのち(図 2A)、時間の経過とともに青色の網状のフィブリンが観察できた(図 2B)。

用手法によるカルシウム再加時間の測定結果は、習熟度による影響を受けるため、習熟度の高い教員と習熟度の低い学生で分けて解析した。

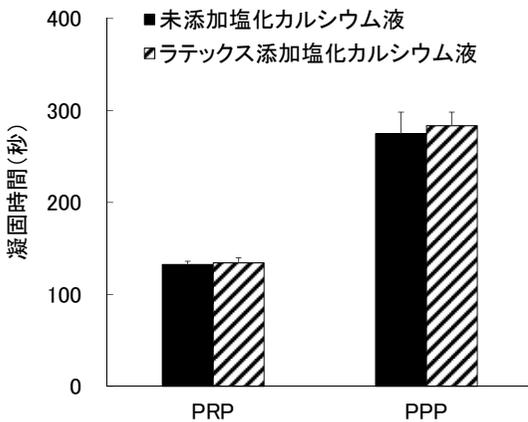


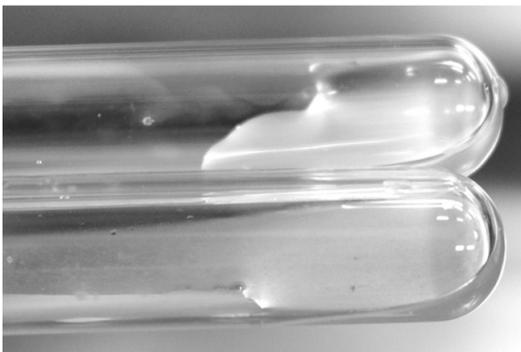
図1 KC4 デルタを使用した物理的凝固時間測定 PRP と PPP 検体を使用し、ラテックス添加塩化カルシウム液あるいは未添加塩化カルシウム液を加えて凝固終末点における凝固時間を測定した。

教員の測定結果は、PRP 検体では未添加塩化カルシウム液 118.8 ± 14.2 秒、ラテックス添加塩化カルシウム液 97.4 ± 5.4 秒であり、PPP 検体では未添加塩化カルシウム液 237.3 ± 6.1 秒、ラテックス添加塩化カルシウム液 219.6 ± 15.6 秒であった(図 3A)。学生の測定結果は、PRP 検体では未添加塩化カルシウム液 153.1 ± 27.4 秒、ラテックス添加塩化カルシウム液 131.4 ± 11.6 秒であり、PPP 検体では未添加塩化カルシウム液 287.8 ± 24.3 秒、ラテックス添加塩化カルシウム液 255.3 ± 13.1 秒であった(図 3B)。教員と学生ともに、どちらの検体でもラテックス粒子添加によりカルシウム再加時間は短縮した。

III. 考 察

判別し難い白いフィブリン糸を可視化し易くするため、フィブリンに絡みついて色を付けると良いのではと考え、色付きのポリスチレンラテックス粒子を加えることを思い付いた。異物を添加することになるため、凝固終末点における凝固時間を測定し、接触因子への影響を検討した。ラテックス添加と未添加で凝固時間に差を認めなかったことから、ラテックス粒子は陰性に荷電しておらず、接触因子へ影響を及ぼさないことが確認できた。

A



B

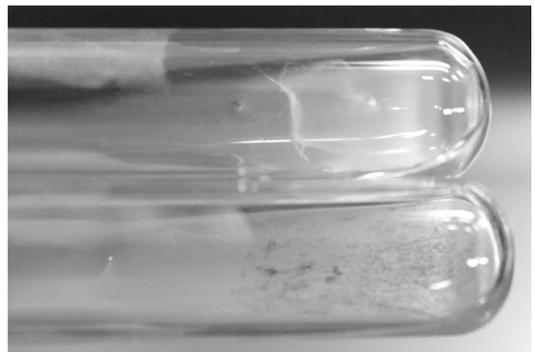


図2 フィブリン析出像の観察

PPP 検体に未添加塩化カルシウム液(上段)およびラテックス添加塩化カルシウム液(下段)を加えた。まず細かい点状のフィブリン塊(A)が出現し、時間経過とともに網目模様のフィブリン(B)が観察できた。

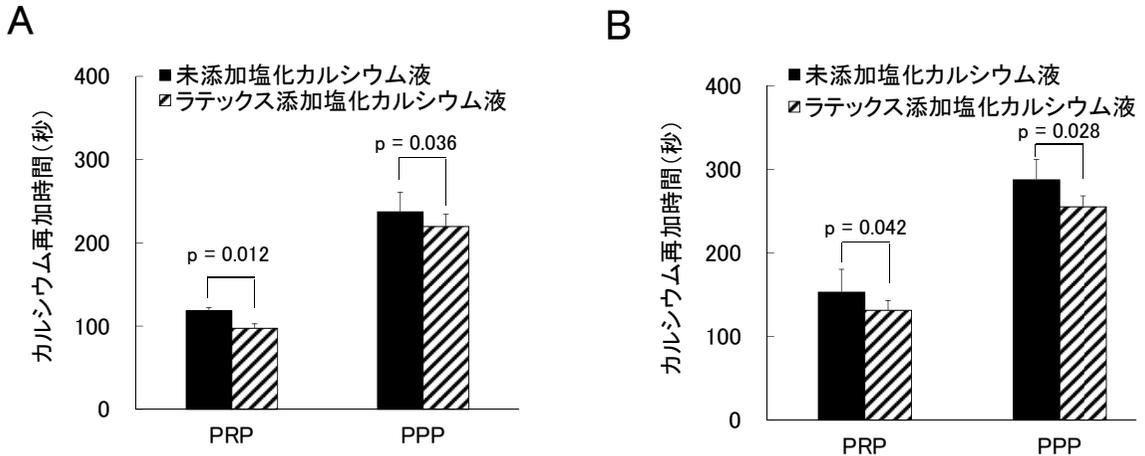


図3 用手法におけるカルシウム再加時間

PRPとPPP検体を使用し、ラテックス添加塩化カルシウム液あるいは未添加塩化カルシウム液を加えてカルシウム再加時間を測定した。(A)は教員、(B)は学生の測定結果を示している。

次にラテックスを添加した際のフィブリン析出像を観察した。細かいフィブリン凝集塊が出現したのち、網状に全体へ広がっていく様子が観察できた。小試験管を傾けた時に液面とガラスの接触面からフィブリンが析出してくるので、そこを見逃さないよう観察することが肝であると記載されている⁴⁾ため、我々教員もそのように学内実習で指導している。しかし初心者の学生にはその確認が難しく、気が付いたときにはすでにフィブリンの凝集塊ができてしまっていることも多い。また熟練した教員であっても、しばしば見逃すことがあった。しかしながら、色の付いたラテックス粒子を添加すると、この見逃しが無くなり、初心者であっても、凝集塊から網状形成の間に必ず気付くことができた。実際にラテックス粒子の添加により、未添加と比較して教員と学生どちらもカルシウム再加時間は短縮した。これはフィブリン形成の始まりを逃すことなく観察できるためであると考えられた。なお、いくつかの文献では、PRP検体で凝固時間は100～120秒で報告されているものが多かった^{5)7)～10)}。教員の測定結果は過去の報告と一致しているが、学生の測定結果はラテックス添加でさえ131秒と延長した。これは試験

管の傾け方が悪く接触因子の活性化が不十分であった⁴⁾、あるいはフィブリン析出の瞬間を見逃さないよう夢中で観察するため、恒温槽から出している時間が長くなり、反応温度が37℃を著しく下回ったことが考えられた¹⁰⁾¹¹⁾。

現在臨床現場で一般的な凝固検査はプロトロンビン時間 (prothrombin time: PT) とAPTTであり、この2つの実習は学内実習だけではなく臨床実習でも必須の項目である。外因系と内因系の凝固カスケードを理解する上で重要ではあるものの、凝固という現象を学生に理解させるには不十分であるように思われる。例えば、自動分析装置における散乱光や透過光を原理とした凝固反応曲線を説明するためには、凝固開始点から凝固終了点までのプロセスの理解が欠かせない¹²⁾¹³⁾。そのプロセスはフィブリンの析出に始まり、網状フィブリンの形成までであり、それを視覚的にとらえることができるカルシウム再加時間は、凝固を理解する上で最適な実習項目であると考えられる。今回報告した、ラテックス粒子を添加したカルシウム再加時間は、方法も簡易であり、観察が容易となるため、是非とも多くの養成校で取り入れて頂けることを期待したい。

IV. 結 論

塩化カルシウム液に色付きのラテックス粒子を添加することで、カルシウム再加時間におけるフィブリン析出の観察が、初心者である学生にも容易に行えた。フィブリンの細かい凝集塊から、網状のフィブリン形成まで観察できることから、学生が凝固の過程を理解する上で有用な検出法であると考えられた。

文 献

- 1) 古澤新平, 磯部淳一. 第5章出血傾向・血栓傾向検査法. B 凝固系の検査. 血液検査学第4版. 東京: 医学書院 2010: 180-93.
- 2) 三村邦裕. 第8章血小板, 凝固・線溶検査. II 凝固検査. 血液検査学. 東京: 医歯薬出版株式会社 2016: 166-80.
- 3) 新井盛大. 第5章血栓・止血検査. IV 血液凝固系の検査. 監修 金井正光, 編集 奥村伸生, 戸塚 実, 矢富裕, 臨床検査法提要 (改訂第33版). 東京: 金原出版 2010: 348-81.
- 4) 日野志郎, 奈良信雄, 小山高敏. 検査法一D 血液凝固と線溶系の検査. II 血液凝固関係の検査. 臨床血液学. 東京: 医歯薬出版株式会社 1996: 236-57.
- 5) 上村英夫. 「血漿カルシウム再加時間」の実習について - 保存血漿の意外なデータの考察 -. Medical Technology 1978; 6: 420-1.
- 6) 三村邦裕. V 血小板・凝固・線溶検査. 監修 日本臨床検査学教育協議会. 血液検査学実習書. 東京: 医歯薬出版株式会社 2009: 79-140.
- 7) 高橋とし子. 短期心理ストレス負荷時の血小板形態の電子顕微鏡的観察. 臨床病理 1982; 30: 1113-7.
- 8) 和田英夫, 出口 晃, 森 美貴, 大久保伊都子, 津田雅之, 長野 正, その他. 特発性血小板減少性紫斑病における凝固異常. 臨床血液 1987; 28: 338-44.
- 9) 太田和夫, 佐中 孜, 平沢由平, 中川雅夫, 中川成之輔, 秋澤忠男, その他. 血液透析時体外循環における低分子ヘパリン KM-311 (一般名: レビパリンナトリウム) の抗凝血薬としての臨床的検討 - 多施設共同第II相臨床試験 -. 臨床医薬 1997; 13: 1941-59.
- 10) Gulliani GL, Hyun BH, Litten MB. Blood recalcification time. A simple and reliable test to monitor heparin therapy. Am J Clin Pathol 1976; 65: 390-6.
- 11) 福田篤久, 石田浩美, 久保田芽里, 小島義忠, 溝端康光, 松岡哲也, その他. 患者の低体温凝固反応に及ぼす影響と凝固検査値. 臨床病理 2000; 48: 1102-8.
- 12) 阪田光彦, 高宮 脩. 凝固検査の測定原理とその特徴. Sysmex Journal 1998; 21: 17-23.
- 13) 松本智子. 凝固波形解析の活用と見方. Medical Technology 2018; 46: 66-71.