

学生実習用に改良したガラス反応板を用いた カルシウム再加時間におけるフィブリン検出法

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

要 旨 カルシウム再加時間は各種血液凝固検査の基本となるため、簡便かつ安価な点も含めて学内実習に最適である。しかし初めて実施する学生には判定が難しい点があり、我々はラテックス粒子を加えることでフィブリン析出の検出が容易となることを報告した。但し、従来法は個々に行うため、試験管の振り方とフィブリン析出の判定確認が様々となり、結果にバラツキが生じやすい。そこで本実験では判定にガラス反応板を使用し、数人でフィブリンの凝集塊から網状形成までが観察可能となる方法の検討を行った。

試験管の中にガラスビーズを添加して接触因子を活性化すること、従来法の時間内での加温時間の調整、判定はガラス反応板で行うという方法で、学内実習で実施可能な、新しいカルシウム再加時間フィブリン検出法を確立した。

キーワード カルシウム再加時間、ガラス反応板、接触因子、凝固反応温度

緒 言

カルシウム再加時間は簡便かつ安価に行えるため、凝固時間の測定技術を身に付ける学内実習として最適である¹⁾。さらに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、凝固過程における血小板膜リン脂質の重要性について理解を深めることができる²⁾利点がある。凝固検査の用手法では、トロンビン生成とそれによるフィブリン産生によって起こる“ゾルからゲル”への変化を、血漿の流動性の低下(力学的変化)と白濁化(光学的変化)の二方向から捉えて凝固時間を決定している³⁾。学内実習で行うカルシウム

再加時間では、特にフィブリン析出の瞬間を捉える練習を実施するが、フィブリン析出点を観察することは、初心者である学生にとっては難しい⁴⁾。そこで我々は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、容易にフィブリンの析出が観察できる方法を考案した。この方法では、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が観察でき、従来のカルシウム再加時間に追加する器具もなく、ラテックス粒子の購入のみで行える点が優れていた。しかし実際に測定すると、慣れていない学生の凝固時間は習熟度の高い教員に比較して延長傾向を示し、バラツキも大きかった。原因としては、試験管の振り方と、析出の観察時に恒温槽から長時間出し過ぎによる反応温度低下の2点に問題があると考えられた。

*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

1 点目の試験管の振り方が問題となるのは、反応液とガラス管壁の接触による接触因子の活性化に大きな影響を与えるためである。よって試験管法では、手首を動かして試験管の傾きを変え、液が試験管の中ほどまで流れるようにし、十分に接触因子を活性化することが大切である⁴⁾。陰性荷電面により活性化したXII aはXI 因子を活性化するだけでなく、プレカリクレインをカリクレインに活性化する。カリクレインは高分子キニノゲンに働いてキニンを遊離させる一方、正のフィードバックによりXII 因子を活性化させる。高分子キニノゲンも同様にXII 因子を活性化するがXI 因子をXI aの反応を促進させる⁴⁾⁵⁾。さらに1960～1980年代に実施された、血漿に部分トロンボプラスチン(リン脂質)と塩化カルシウムを加えて行う部分トロンボプラスチン時間(partial thromboplastin time: PTT)が測定結果にバラツキが大きく、その原因が接触因子の活性化の程度の差であることがわかり、あらかじめ、活性化剤(エラジン酸、セライトまたはカオリン)で接触因子を完全に活性化することにより安定した測定値が得られる、活性化部分トロンボプラスチン時間(activated partial thromboplastin time: APTT)へと発展した経緯⁵⁾⁶⁾からも接触因子の活性化の大切さがうかがえる。よって凝固時間の短縮とバラツキを小さくするためには、接触因子を完全に活性化することが重要であると推察される。

2 点目の反応温度の低下は、酵素活性の低下を引き起こし、その結果凝固時間を遅延させる⁷⁾と考えられる。また、低温測定においてPT・APTTが延長する⁸⁾ことも、よく知られている。カルシウム再加時間においてもPRP検体を、37℃で反応させると99.0秒、室温で反応させると202.0秒との報告がある⁹⁾。故に、カルシウム再加時間には、接触因子の活性化と反応温度が重要であると考えられ、この2点に着目しながら本研究を行った。

カルシウム再加時間は現在臨床でほとんど実施されないため、基準範囲を記載していない指導書が多い。記載のある本によると、90～180秒¹⁰⁾、あるいはPRPは60～90秒、PPPは90～120秒⁵⁾と

ある。しかし実際に本学で実習を行うと、PRPは90～120秒、PPPは210～240秒程度であり、学生では300秒近くまでかかることもある。1回の測定にこれだけの時間がかかると、集中力を失い、データの信用性が低下した結果となりやすい。そこで、十分な接触因子の活性化と37℃の反応温度を維持できる装置を考案し、PRPとPPP検体における理想の凝固時間を測定した。その結果を基に、フィブリンの凝集塊から網状形成までが見易く、数人で同時に観察ができるガラス反応板(以下、ガラス板)を用いた検討を行い、学内実習で実施可能な方法を確認したので報告する。

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おこない、疾患罹患および薬剤・サプリメントの服用がなく、研究に同意を得た18名を対象とし、真空採血をおこなった。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、150gで10分遠心したPRPと2000g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. 試薬および機器

塩化カルシウム溶液は25mM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0.32μm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)。ガラスビーズ(アズワン株式会社)は粒径3mmのものを使用した。

機器としては恒温槽(タイテック株式会社)と卓上3D振とう機(biosan株式会社)を使用した。

また本実験用の装置として、図1に示すような

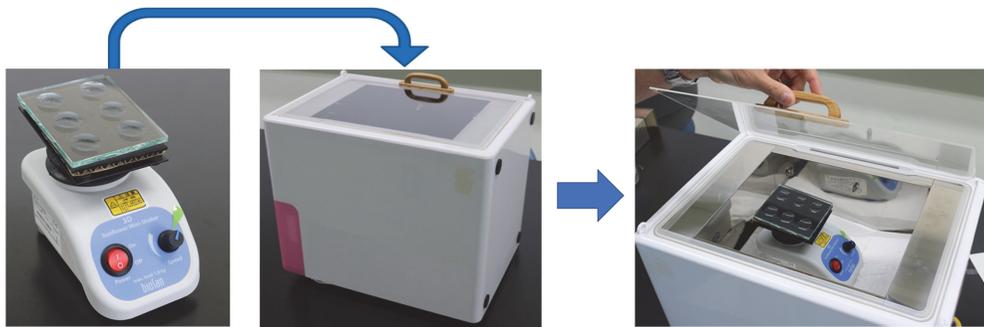


図1 実験2で使用した考案装置

37°Cのインキュベーター内にガラス板を置いた振とう機を入れ、取っ手の付いた透明板で蓋をした。37°Cの反応温度と接触因子の活性化を維持しながら、上から覗いてフィブリン析出が観察可能な装置である。

考案装置を使用した。これは常に37°Cの反応温度と接触因子が活性化する状態を維持するための装置で、37°Cの小型インキュベーター（サンブラテック株式会社）内に、ガラス板を置いた卓上3D振とう機を入れ、試薬の添加が簡便かつフィブリン析出が上から覗いて確認できるように、取っ手付きの透明板で蓋をした。

3. 試験管+ガラス板を使用した方法：実験1

従来のカルシウム再加時間は、内径8mmの小試験管に検体をとり、37°Cの恒温槽で1～2分加温後、塩化カルシウム液を加えて50秒加温静置し、試験管を傾けてフィブリン析出を10秒毎に観察する²⁾。しかし本実験では、フィブリンの析出をガラス板で観察することを目的としたため、途中まで従来のカルシウム再加時間測定法による試験管で反応させた後、反応液をガラス板に移して反応を継続した。具体的には、37°C恒温槽内の内径8mm小試験管に検体を100 μ Lとり、1分加温した。次に予め37°C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 μ L添加して、ストップウォッチをスタートさせた。さらに37°C恒温槽内で50秒静置後、振とう機の上に予め加温しておいたガラス板を置き、試験管内の反応液をピペットでガラス穴に広げて振とうさせ、網状のフィブリン析出までの時間を記録した。

4. 考案装置+ガラス板を使用した方法：実験2

考案装置内のガラス板に検体100 μ Lを直接広

げて振とうしながら1分加温し、予め37°C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 μ L添加して、ストップウォッチをスタートさせ、振とうさせながら網状のフィブリン析出までの時間を記録した。

5. 試験管+ガラスビーズ+ガラス板を使用した方法：実験3

実験2の測定結果を参考にして、学内実習で実施しやすい方法を検討した。ガラスビーズを添加した試験管を37°Cの恒温槽に入れ、検体（PRP、PPP）を加えて加温した。ガラスビーズを添加した理由は、検体中の接触因子の完全な活性化を得るためである。試験管の接触だけでは検体中のすべての接触因子の活性化は不十分であると思われる。また加温時間は、従来のカルシウム再加時間測定法²⁾の範囲内でPRPとPPPについて各々設定した。

具体的には、PRPでは恒温槽内のガラスビーズ5粒入りの小試験管に検体を100 μ Lとり、2分加温した。次に予め37°C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 μ L添加して、ストップウォッチをスタートさせた。さらに37°C恒温槽内で50秒静置後、室温に置かれた卓上3D振とう機に予め37°C加温しておいたガラス板をのせて、試験管内の反応液をピペットにて広げて振とうさせ、網状のフィブリン析出までの時間を記録した。

PPP では、同様にガラスビーズ5粒入りの小試験管に検体を100 μL とり、1分加温した。次に予め37°C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。さらに37°C恒温槽内で2分静置後、PRPと同様の操作を行い、網状のフィブリン析出までの時間を記録した。

6. 統計学的解析

実験1、2、3は実験者3名が各血漿を用いて、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。

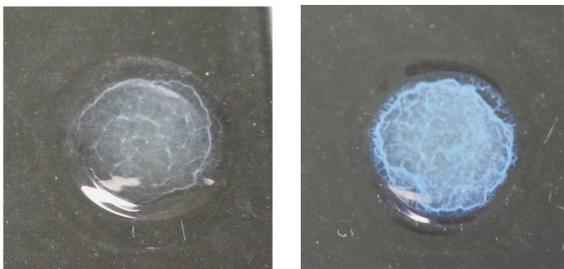
II. 結果

ガラス板におけるフィブリン析出像を示す(図2A)。ラテックス粒子未添加および添加ともに網状のフィブリンが観察できた。

実験1の結果は、PRP 検体では未添加 140.3 ± 5.8 秒、ラテックス添加 146.0 ± 4.6 秒であり、PPP 検体では未添加 331.1 ± 25.5 秒、ラテックス添加 306.8 ± 28.0 秒であった(図2B)。PRPとPPP 検体ともに、有意差は認めなかった。

実験2の結果は、PRP 検体では未添加 109.4 ± 8.9 秒、ラテックス添加 101.9 ± 7.9 秒であり、PPP 検体では未添加 210.0 ± 12.7 秒、ラテックス添加 204.0 ± 13.7 秒であった(図3)。PRPとPPP 検体ともに、ラテックス未添加と添加で有

A



B

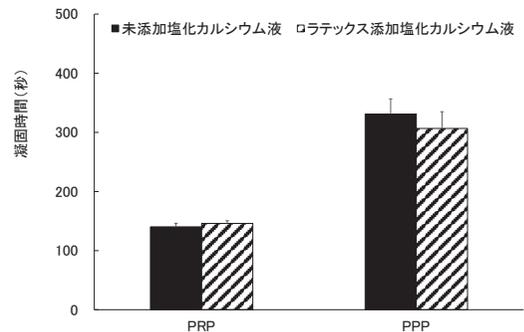


図2 実験1の結果

(A)ラテックス粒子未添加および添加時のガラス板におけるフィブリン析出像。左図:未添加塩化カルシウム液、右図:ラテックス添加塩化カルシウム液(B)試験管+ガラス板を使用した際のPRPとPPP 検体の凝固時間。

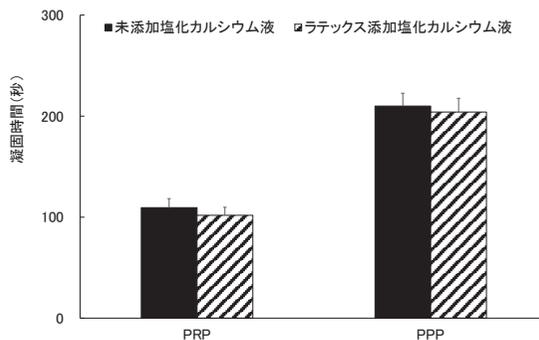


図3 実験2の結果

考案装置(図1)を使用した際のPRPとPPP 検体の凝固時間。

有意差は認めなかった。

次に実験1と実験2の検討では、PRP検体において、ラテックス未添加と添加ともに、有意差を認めた(図4A)。PPP検体でも同様に、有意差を認めた(図4B)。

実験3の結果は、PRP検体では未添加 98.3 ± 3.0 秒、ラテックス添加 98.7 ± 9.5 秒であり、PPP検体では未添加 205.0 ± 5.8 秒、ラテックス添加 195.4 ± 6.8 秒であった(図5)。PRPとPPP検体ともに、ラテックス未添加と添加で有意差は認めなかった。

実験2と実験3についての検討では、PRP検体においては、ラテックス未添加と添加ともに、有意差はなかった(図6A)。PPP検体でも同様に、有意差はなかった(図6B)。

III. 考 察

実験1～3を通して、ラテックス添加において細かい凝集塊が認められ、未添加と比較して明らかに見易かったものの、網状のフィブリンが析出してくるまでの凝固時間には有意差を認めなかった(図2)。実験1では、凝固時間はPRP検体が約2分半、PPP検体が5分強であり、学内実習中に学生がガラス板を観察し続けるには長すぎると感じた。この結果は我々の想定通りであり、凝固時間が長くなった原因は、ガラス板が時間経過とともに冷えたため反応温度が低下したことと、ガラスによる接触因子の活性化が不十分であったと考えられた。

考案装置を用いた実験2の結果は、実験1と比

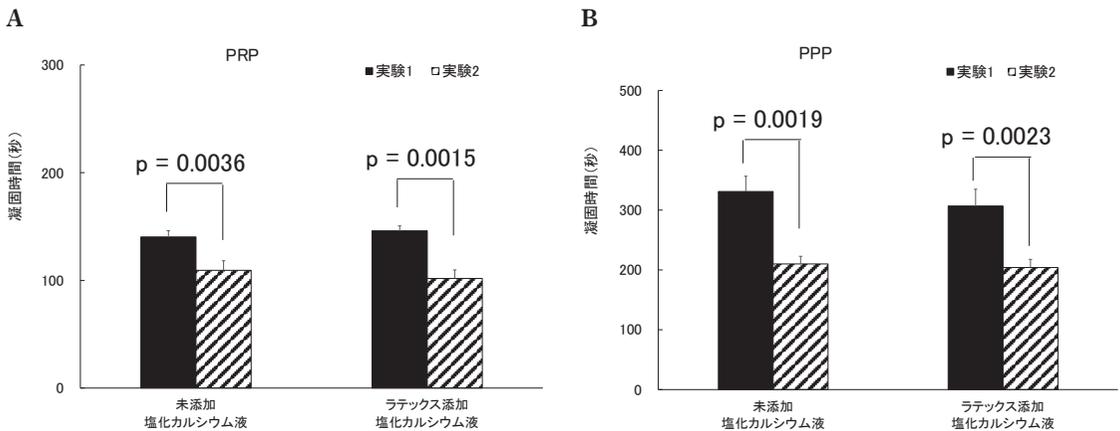


図4 実験1と実験2の凝固時間の比較

(A)PRPと(B)PPP検体について、実験1と実験2の凝固時間を比較した。

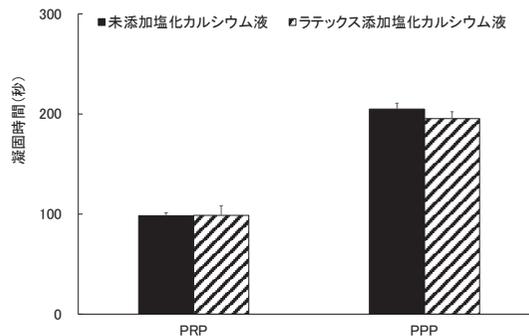


図5 実験3の結果

試験管+ガラスビーズ+ガラス板を使用した際のPRPとPPP検体の凝固時間。

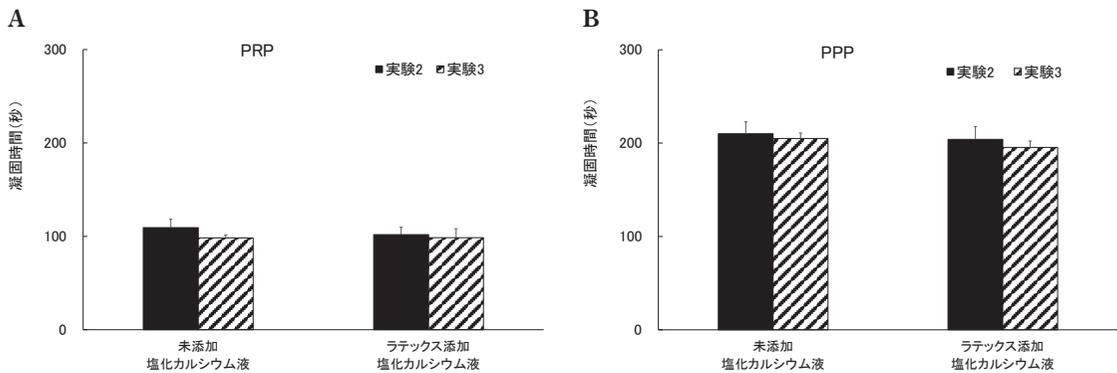


図6 実験2と実験3の凝固時間の比較

(A)PRP と(B)PPP 検体について、実験2と実験3の凝固時間を比較した。

較して、PRP 検体では約30秒、PPP 検体では約100秒も凝固時間が短縮した(図4)。このことから、37℃の反応温度と接触因子の活性化を維持することが重要であることを再確認した。

実験3の結果は実験2と同等の凝固時間となり(図6)、ガラスビーズ添加による接触因子の活性化促進、および37℃での反応時間を変更することで可能となった。実験2の凝固時間は現状での理想であるが、この装置を実習のために何セットも購入することは高額な費用が必要となり、限られた実習費から捻出することは困難であると思われる。よってできる限り実験2に近い凝固時間となる実験3の方法を、新しいカルシウム再加時間として提案したい。

従来のカルシウム再加時間の方法に追加して準備する機器は、ガラス反応板と振とう器、追加する試薬はガラスビーズとラテックス粒子である。少し作業が煩雑になる点は否めないが、数人でフィブリンの凝集塊から網状形成までをわかりやすく観察できる利点があり、学内実習に適していると考えられる。是非とも多くの養成校で実施して頂けることを期待したい。

IV. 結 論

試験管の中にガラスビーズを添加して接触因子を活性化すること、従来法の時間内での加温時間の調整、判定はガラス反応板で行うという方法で、

学内実習で実施可能な、新しいカルシウム再加時間フィブリン検出法を確立した。

文 献

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 日野志郎, 奈良信雄, 小山高敏. 検査法-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) 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.
- 6) 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.
- 7) Watts DD, Trask A, Soeken K, Perdue P, Dols S, Kaufmann C. Hypothermic coagulopathy in trauma: Effect of varying levels of hypothermia on enzyme speed, platelet function, and fibrinolytic activity. J Trauma 1998; 44: 846-54.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.