

## 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

委員長：家子 正裕（北海道医療大学），副委員長：小宮山 豊（関西医科大学）  
 山崎 哲（聖マリアンナ医科大学病院），片桐 尚子（慶應義塾大学病院），  
 島津 千里（帝京大学医学部附属病院），内藤 澄悦（北海道医療大学病院），  
 三島 清司（島根大学医学部附属病院），由木 洋一（京都府立医科大学病院），  
 竹内 美保（日本ベクトン・ディッキンソン（株）），  
 小澤 達也（テルモ（株）ホスピタルカンパニー），  
 熊野 穰（シスメックス（株）），原田 大介（積水メディカル（株）），  
 野崎 順子（（株）LSI メディエンス），田中 秀明（ロシュ・ダイアグノステイクス（株））  
 オブザーバー：川合 陽子（医療法人財団山王病院），福武 勝幸（東京医科大学），  
 渡邊眞一郎（藤沢市民病院），本間 優（三越診療所）

【順不同】

#### 要 旨

別紙に示す凝固検査エキスパートによる遠心分離等の検証を踏まえて具体的に例示する。

#### 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。  
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。
- ◇翼状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

Ieko Masahiro

〒061-0293 北海道石狩郡当別町金沢1757

アドレス：iekom@hoku-iryo-u.ac.jp

キーワード：凝固時間検査，測定前手順，遠心分離条件，検体保存条件

受付日：2016年1月6日

受理日：2016年1月26日

表 1. 本コンセンサスに含まれる凝固時間検査の範囲

<p style="text-align: center;">A (本コンセンサスに 含む凝固時間検査)</p>	プロトロンビン時間 (PT と省略) 活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT と省略) フィブリノゲン (Fbg と省略) ループスアンチコアグラント (LA と省略) 希釈ラッセル蛇毒時間 (dRVVT と省略) 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 と省略) ヘパプラスチンテスト (HPT と省略)
<p style="text-align: center;">B (本コンセンサスに 含まない凝固時間検査)</p>	第 V 因子 (FV と省略) や第 VIII 因子 (FVIII と省略) 等の凝固因子活性定量 FVIII や第 IX 因子 (FIX と省略) などのインヒビター定量 遊離型プロテイン S (PS と省略) 活性

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。

#### 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 x g で最低 15 分間 (または 2,000 x g, 最低 10 分間)、18~25℃で行い、血漿中残存血小板数が 1 万/μL 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。

#### 保存と融解

- 室温 (18~25℃) 保存とし、4 時間以内に分析 (測定) する。4℃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℃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℃水浴中で急速融解し (通常は 1~2mL 試料を水浴で溶かすのに 3~5 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。

#### はじめに

凝固時間検査とは、術前検査や出血性疾患のスクリーニング検査、さらにヘパリンコントロール検査である活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) およびプロトロンビン時間 (PT) をはじめ、フィブリノゲン (Fbg)、ループスアンチコアグラント (LA)、凝固因子インヒビター定性 (クロスミキシング試験) やプロテイン S 活性など様々な検査で、クエン酸ナトリウム血漿を用いた様々な試薬・検体の組み合わせによる血液凝固をフィブリン (Fb) 析出時間で検出する検査を言う<sup>1)</sup>。これらの検査は、多くの施設で院内、院外検査として実施されていることは、平成 22 年度日臨技臨床検査精度管理調査に参加した施設が 2,000 施設を超えることから明らかで、日本全国で実施されている検査である<sup>2)</sup>。

凝固時間検査を標準化するうえで、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であり、また最初に取り組むべき問題であるため、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を実施した。その結果、凝固時間検査に用いる採血管の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の部分があることが明らかとなった。凝固時間検査の標準化にあたり、アンケート結果とともに、すでに標準化の方法を提示している米国臨床・検査標準協会 Clinical and

Laboratory Standards Institute (米国 CLSI) と、英国の血栓止血検査ガイドラインを参照した<sup>3)4)</sup>。さらに、認定血液検査技師のテキストであるスタンダード検査血液学、および多くの臨床検査技師が参照する臨床検査法提要、日本臨床検査標準協議会 JCCLS の標準採血法ガイドライン (GP4-A2) を参考にして、凝固時間検査用検体の取り扱いに関する指針案の作成にとりかかった<sup>5)~7)</sup>。本コンセンサスのカバーする範囲は PT, APTT などの基本的な凝固時間検査で表1に示す A の範囲であり、B の範囲については今後の更なる議論が必要である。LA は不適切な検体処理が偽陰性を招く原因となる可能性が高く A に含めた。

本稿は第1素案である。また、臨床研究が不可能であるため、本コンセンサスのエビデンスを深めるために特別な検証システムは用いていない。また推奨度も記さない。

なお、体外循環におけるヘパリン投与量管理に用いる POCT の活性化凝固時間 (ACT) は今回の範囲に含まない。また、合成発色基質を用いた高感度凝固第 VIII 因子定量法などや採血時の抗凝固剤組成が特殊な血小板第 4 因子測定などは、原理的にフィブリン析出で測定していないため本コンセンサスの範囲外である。

また、本コンセンサスの記載内容については、CLSI など欧米のガイドラインを参考にしたり、文献的考察のみにより記載した内容があるため、本邦の臨床現場における検証が必要と考える。2年後には第2版を発行したいと考えている。本コンセンサスの発行により、凝固時間検査の検体取扱いの標準化の動きが活性化することを期待する。

## 1. 採血管

### A) サイズ

本邦で一般的に販売されている採血管の形状 (外形) は 13mm×75mm (直径×長さ) であり、採血量は 0.9mL, 1.8mL, 2.7mL, および 4.5mL の4種の採血管がある。なお、素材はポリプロピレンのように凝固活性化を惹起しないプラスチックあるいはシリコン処理ガラスを用いることが望ましい<sup>3)</sup>。また各製品におけるパッケージ開封後の使用可能期間は、材質によりクエン酸ナトリウム溶

液の蒸発や陰圧低下の状態が異なるため添付文書に従って取り扱う。

### B) 抗凝固剤

凝固時間検査用採血管の抗凝固剤はクエン酸ナトリウムであり、濃度は 0.105~0.109M (3.13~3.2%) を使用することを推奨する<sup>3)4)</sup>。なお、3.8% クエン酸ナトリウム採血管を用いた際は、健常参考値や測定値が 3.2% 採血管の使用時と異なり、最大 10% 程度延長傾向があることが知られているため、3.8% 採血管の使用は推奨しない<sup>8)~10)</sup>。

### C) 許容採血量

本邦の標準採血法ガイドライン (GP4-A2) では推奨量の ±10% 以内と明記され、米国 CLSI のガイドラインでも同様に許容範囲であるため、±10% 以内を推奨する<sup>3)4)7)</sup>。なお、±0% にラインがある採血管と -10% にラインがある採血管が本邦では共存するため、自施設の採血管についてラインの意味を確認する必要がある。また、自施設の許容限界を決定する前に、正常血のみならず凝固時間の異常延長を示すヘパリン血などを用いて実際に測定し、各施設でその結果を確認することを推奨する。

### D) 血液/抗凝固剤の比率

クエン酸ナトリウム溶液と血液の比率は、1:9 とする。JCCLS GP4-A2 および CLSI H21-A5 に従い、公称採血量 ±10% までを許容採血量とする<sup>3)4)7)</sup>。よって公称採血量が 90% 未満の検体については再採血を依頼することを推奨する。患者のヘマトクリット (Ht) が 55% 以上である際は、抗凝固剤の容量を調整する<sup>11)</sup>。以下の計算式を用いてクエン酸ナトリウム溶液量を調整することも可能であるが、計算を簡略化するため、CLSI H21-A5 に記載されている

Appendix A: ノモグラム計算図表を使用するのも一法である<sup>11)</sup>。

$$C = (1.85 \times 10^{-3}) (100 - \text{HCT}) (\text{V blood})$$

C: 採血管内に残っているクエン酸溶液量,

HCT: 患者ヘマトクリット値 (%),

V blood: 採血量 (例 5mL の採血管を使用した場合には 4.5mL),

$1.85 \times 10^{-3}$ : 定数 (クエン酸量, 血液量およびクエン酸濃度より算出)

## 2. 採血

基本的には JCLLS 標準採血法ガイドラインに従う。なお、ヘパリンが混在する静脈ラインからの採血は不可である。ヘパリン混入の可能性解析方法については文末の補足資料を参照していただきたい。

### A) 駆血帯の使用

標準採血法ガイドライン (GP4-A2) では、「逆流の危険性を減らす手技を励行すれば、最後の採血管を抜去した後に駆血帯をはずす手順が標準法として採用できる」と記載されており、過度に強いあるいは長時間駆血でない限り採血中の駆血帯使用を控える必要はない<sup>7)12)</sup>

### B) 採血針

本邦や CLSI のガイドラインなどに従うが、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ことを推奨する。また、19G は成人の良好な血管で使用可能である<sup>3)4)13)14)</sup>。しかし、25G および、それより細い採血針の使用は溶血など採血不良を招く可能性があり推奨できない。ただし、新生児、小児などやむを得ない場合は結果の評価に注意する。

### C) 採血器具

採血針+真空採血管、採血針+シリンジ、翼状針+シリンジ、翼状針+真空採血管のいずれも、針刺し事故に注意しつつ使用した場合、いずれの組み合わせも使用可能である。ただし、シリンジ採血を行った場合には、採血後速やかに採血管に分注する。時間を要した場合は凝固時間検査には使用しない。

### D) 採血時の凝固時間検査用採血管の順序

真空採血では凝固時間検査用採血管は1番目あるいは2番目であることが望ましい。翼状針を使用する際、1番目の採血管でチューブ内にデッドボリュームが発生するため、凝固時間検査用採血管の使用は避け、必要に応じてダミー採血管などを使用する。シリンジ採血では1番目に凝固時間検査用採血管に分注する。なお、凝固時間検査用採血管を1番目に採血した際に問題が生じないものはPTとAPTTであるが、その残余検体でトロ

ンビン-アンチロンビン複合体 (TAT) を測定すると偽高値を招く危険性があることに留意する。標準採血法ガイドライン (GP4-A2) でも真空採血の場合、通常は1番目に凝固時間検査用採血管に採取し、穿刺に時間がかかった場合や、特殊な項目を含む場合は、1番目に血清用採血管に採取するとしている<sup>7)</sup>。

### E) 採血管の転倒混和

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。なお、内径の細い採血管では、転倒による空気層逆転を目視にて確認後転倒混和を実施する。また、感染防止のため、採血管の栓の上面に血液が付着している可能性があることに留意する。

### F) 凝固検体の確認

採血困難な患者を中心に検査室到着時にすでに凝固が確認できる検体があり、遠心前に凝固を視認した場合は、再採血による検査続行か検査中止の確認を臨床側と相談する。

## 3. 採血後の検体保存 (遠心分離前)

採血後の検体は室温に保存し、出来る限り速やかに血液試料の遠心分離を行う。Cold activation や長時間冷却によるクリオプレシピテート生成など、結果的に原因不明の変化を招かないよう、採血後の保存温度は室温とし1時間以内が理想的である。室温とは CLSI のガイドラインに従い約 18~25℃ とする<sup>3)4)</sup>。なお、文献的には cold activation の影響で、凝固第 VII 因子、第 VIII 因子活性や von Willebrand 因子活性が有意差を持って低下することも報告されており、APTT 系の検査でも検体処理は室温で速やかに行うことが理想的である<sup>15)16)</sup>。

## 4. 遠心分離

各施設で使用している採血管、遠心分離条件により残存血小板数は異なるため、各施設で、残存血小板数が1万/ $\mu$ L未滿にコントロールされていることを確認する<sup>3)13)</sup>。特に、検体を検査前に冷凍保存する場合およびLA検査で使用する場合には、血漿中の残存血小板数が検査結果に大きな影響を及ぼすため、残存血小板数が1万/ $\mu$ L以下未

満になるよう遠心分離処理を行う<sup>17)</sup>。なお、2009年に国際血栓止血学会より出されたLAのガイドライン (Update of the guidelines for lupus anti-coagulant detection) では、2回遠心分離処理 (室温にて2,000 x g, 15分遠心後、凝固活性を起こさないプラスチック管に血漿を分注し、再度2,500 x g以上、10分遠心) を推奨している<sup>18)</sup>。

血漿中の血小板残存数は、各施設で使用している採血管、遠心分離条件により異なるため、各施設の下で検討をすることが重要である。凝固検査エキスパート (凝固検査標準化ワーキンググループ) の5施設、14例で確認実施した別紙検証資料を参考に実施することを推奨する。

#### A) 遠心分離条件

平均遠心重力は、1,500 x g以上で最低15分間以上、または2,000 x gで10分間の遠心分離処理を推奨する。

#### B) ブレーキの設定

残存血小板数を1万/ $\mu$ L以上に上昇させるほど急激でないことを確認すること。さらにPTやFbgに統計的有意差があるとの報告も散見されるため、ブレーキ使用はできるだけ最低限に行うことを推奨する<sup>19)</sup>。

#### C) 遠心分離時の温度設定

室温 (18~25°C) にコントロールすることを推奨する<sup>3)4)</sup>。なお、繰り返し遠心することによる遠心分離機内の温度上昇は凝固因子の失活を招く恐れがあるため、温度設定が無い機種で遠心する際は注意が必要である。

#### D) 遠心分離機の種類

使用する遠心分離機の種類はスイングロータが望ましい。遠心角度が固定のアングルロータを用いる場合は、遠心後の沈殿物の巻き上がり、横流れ (血小板およびそのマイクロパーティクルの巻き上がりなど) の可能性があるため、各施設で遠心後の処理方法と処理時間を確認し、残存血小板数1万/ $\mu$ L未満の血漿を分離できるよう工夫が必要である<sup>19)</sup>。

### 5. 凝固時間検査実施までの時間および保存条件

#### A) 検体の確認

遠心分離後、検体に凝血 (clot)、溶血、乳びが無いことを確認し、これらを認めた場合には検査不可とすることを考慮する。in vivo、すなわち患者の病態に応じて患者体内で惹起した溶血はやむをえないが、in vitro、すなわち採血操作を含むそれ以降に生じた溶血 (同時採血の血清は溶血していない等のことが明確な場合) の場合は注意する。

#### B) 検体の分注

遠心分離後の血漿を別容器に分注する際には血漿中に血小板などの血球の混入を避けるため、パフィーコートから最低5mmは離れた上清を使用する必要がある<sup>20)</sup>。なお2回遠心などで残存血小板が少ないことを確認している場合はこの限りではない。2012年の英国の抗リン脂質抗体症候群 (APS) の管理に関するガイドラインでも明記されているように、LAであっても血漿のフィルター濾過は推奨しない<sup>21)</sup>。

#### C) 検体の保存と時間

検体保存は、3の採血後の検体保存の項に記載のように室温で1時間以内の保存が理想的であり、冷却保存によるcold activationや長時間保存による第VIII因子活性の低下などの影響を避けるため、採血後、室温で4時間以内に測定することが望ましい<sup>3)4)15)16)</sup>。

### 6. 凝固時間検査実施までに凍結保存を必要とする際の条件

#### A) 凍結保存容器

凍結保存が必要な血漿はOリングが付いたネジまき式ポリプロピレン管に保存することを推奨する。また、凍結用血漿量に応じた凍結容器の使用を推奨する。例えば1mLの血漿に対して10mL容量の容器を使用する場合、血漿量に対して空きスペースが大きくなり、凍結保存中に血漿中の水分が失われる恐れがある。

#### B) 凍結保存温度

各種凍結条件で凍結融解を繰り返した際の凝固スクリーニング検査 (凝固時間検査) 成績につい

ては、別紙検証資料、CLSI Approved guideline 5th ed H21-A5が引用した論文およびLippiらによる研究報告から、 $-40^{\circ}\text{C}$ 以下望ましくは $-75^{\circ}\text{C}$ 以下で保存し、凍結融解を繰り返さないことを推奨する<sup>22)23)</sup>。なお、CLSI Approved Guidelineの記載では $-20^{\circ}\text{C}$ でも2週間までの保存が可能としているが<sup>23)24)</sup>、別紙報告1に示すように、いわゆる家庭用冷凍冷蔵庫の冷凍室等に保存する場合は、冷凍室扉の開け閉めや冷凍室内の場所、自動霜取り機能の作動により、冷凍の進みが不十分となることがある。実験的にも冷凍室内でも液状を保つことがあり、この場合は凝固活性化から凝固スクリーニング検査(凝固時間検査)異常を招くため、 $-20^{\circ}\text{C}$ の記載があっても家庭用冷蔵庫の冷凍室は使用不可である。やむを得ず凍結融解を繰り返す際は、1~2回以内とする。なお影響を受ける検査は、文献的、実験的にはPT、APTT、Fbg、アンチトロンビン、凝固第VIIIおよびIX因子活性である<sup>24)</sup>。

### C) 融解方法

凍結融解時は室温放置による融解を避け、測定前に $37^{\circ}\text{C}$ 水浴中で3~5分間急速融解し、クリオプレシピテートを再懸濁するため、緩やかに攪拌する。

補足資料：ヘパリン混入が疑われる場合の対処例

病態とAPTT値の不一致あるいは原因不明のAPTT延長の解明は大きな問題である。まず、疑うべきは凝固時間検査用検体へのヘパリンの混入で、意図せぬヘパリン混入が疑われる場合は、基本的には再採血を依頼し、ヘパリン非存在下のAPTTを測定する必要がある。CLSI Approved guideline 5th ed H21-A5ではvascular access device (VAD)からの採血では、エアリークが無いことを確認し、可能な限りヘパリンフラッシュを避け、ヘパリンの混入あるいは希釈を避けることが明記されている。具体的にはまず生食5mLでフラッシュ、続いて5mLあるいはVADのdead spaceの6倍容量の血液を廃棄したのち検体を採取する。生食ロック(cap-off intravenous port)からの採血ではカテーテルと延長セット(extension set) dead spaceの2倍量を廃棄することが明記さ

表2. APTT延長と推奨プロタミン添加量

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

れている。なお、ヘパリンによる延長効果の感度はAPTT試薬により異なる<sup>25)</sup>。

ヘパリン混入を確認するにはAPTT検体に硫酸プロタミンを加えた中和法が有用である<sup>26)</sup>。試薬は下記原法の粉末とともに薬局が持つ液状薬も利用可能である。本法は、ヘパリンにより延長したAPTTを硫酸プロタミンの添加で短縮させることができるかを判定する方法であるが、硫酸プロタミン自体によるAPTT延長効果を除外するために、APTT延長度合いによる硫酸プロタミン量の調整が重要である。APTT秒数毎に添加する硫酸プロタミン量を表2に示したので、参考にいただきたい。

硫酸プロタミン添加APTTで秒数短縮を認めた場合、結果をもって臨床現場に再採血を依頼する。なお、本法は下村大樹らにより発表されたもので、原報を読み、運用方法を確認することが重要である<sup>26)</sup>。

## 文 献

- 1) Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Lima-Oliveira G, Guidi GC, Favaloro EJ: Quality standards for sample collection in coagulation testing. *Semin Thromb Hemost* 38: 565—575, 2012.
- 2) 安藤秀実, 坂場幸治, 岸 孝彦, 久保田浩, 坂東史郎, 本間 優, 三島清司: 凝固部門(平成22年度日臨技臨床検査精度管理調査報告書), p34—35, 2010.
- 3) Approved guideline 5th ed H21-A5: Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline—Fifth Edition <http://shopping.netsuite.com/s.nl/c.1253739/it.A/id.318/f>
- 4) Mackie I, Cooper P, Lawrie A, Kitchen S, Gray E,

- Laffan M; British Committee for Standards in Haematology: Guidelines on the laboratory aspects of assays used in haemostasis and thrombosis. *Int J Lab Hematol* 35: 1—13, 2013.
- 5) 東 克己: 検体管理. スタンダード検査血液学 第2版 日本検査血液学会編, p94—95, 2013.
  - 6) 新井盛夫: 血液凝固検査の試材・器具と基礎的方法. 臨床検査法提要 改訂33版 金井正光監, 奥村伸生, 戸塚 実, 矢富 裕編, p319—321, 2010.
  - 7) 日本臨床検査標準協議会: JCCLSの標準採血法ガイドライン (GP4-A2) 渡邊 卓編, p19—27, 2011.
  - 8) Adcock DM, Kressin DC, Marlur R: Effect of 3.2% vs 3.8% sodium citrate concentration on routine coagulation testing. *Am J Clin Pathol* 107: 105—110, 1997.
  - 9) 小林 清, 吉田美雪, 神田 俊, 比佐華菜子, 松本梢: クエン酸ナトリウム溶液濃度の違いによる検査値への影響について. 都臨技会誌 38: 154, 2010.
  - 10) 安藤秀実: 血液凝固検査用採血管統一の提案—クエン酸三ナトリウム濃度3.2%採血管の使用推奨について—. *Medical Technology* 40: 350—351, 2012.
  - 11) Approved guideline 5th ed H21-A5: Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline—Fifth Edition <http://shopping.netsuite.com/s.nl/c.1253739/it.A/id.318/f>, Appendix A page 22.
  - 12) 厚生労働省医薬食品局安全対策課長: 薬食安発第0104001号 (平成17年1月4日).
  - 13) 小宮山豊, 吉賀正亨: データに影響する採血手技. 臨床検査 59: 20—25, 2015.
  - 14) Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Poli G, Guidi GC: Influence of the needle bore size on platelet count and routine coagulation testing. *Blood Coagul Fibrinolysis* 17: 557—561, 2006.
  - 15) 吉田美香, 家子正裕, 内藤澄悦, 鈴木健史, 高橋信彦, 柴田孝典: 全血の保存条件および保存時間がPT測定に及ぼす影響についての検討. 検査血液会誌 14: 267—273, 2013.
  - 16) Favalaro E, Soltani S, McDonald J: Potential laboratory misdiagnosis of hemophilia and von Willebrand disorder owing to cold activation of blood samples for testing. *Am J Clin Pathol* 122: 686—692, 2004.
  - 17) Brien WF, Schaus MR, Cooper KE, O'Keefe BT, Inwood M: Lupus anticoagulant test: effect of the platelet count on the activated partial thromboplastin time. *Br J Biomed Sci* 50: 114—116, 1993.
  - 18) Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand J.H, Ortel T.L, Galli M, De Groot P.G: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemostas* 7: 1737—1740, 2009.
  - 19) Daves M, Giacomuzzi K, Tagnin E, Jani E, Adcock Funk DM, Favalaro EJ, Lippi G: Influence of centrifuge brake on residual platelet count and routine coagulation tests in citrated plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 25: 292—295, 2014.
  - 20) Yoshida M, Ieko M, Naito S, Morikawa C, Kumano O, Murakami M, Takahashi N, Atsumi T: Is plasma separated from blood by double centrifugation useful for determination of ipus anticoagulant? *Thromb Haemost* 9 (Supple.): 879, 2011.
  - 21) Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M; British Committee for Standards in Haematology: Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. *Brit J Haematol* 157: 47—58, 2012.
  - 22) Woodhams B, Girardot O, Blanco MJ, Colesse G, Gourmelin Y.: Stability of coagulation proteins in frozen plasma. *Blood Coagul Fibrinolysis* 12: 229—236, 2001.
  - 23) Lippi G, Rossi R, Ippolito L, Zobbi V, Azzi D, Pipitone S, Favalaro EJ, Funk DM: Influence of residual platelet count on routine coagulation, factor VIII, and factor IX testing in postfreeze-thaw samples. *Semin Thromb Hemost* 39: 834—839, 2013.
  - 24) Approved guideline 5th ed H21-A5: Collection, Transport, and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays; Approved Guideline—Fifth Edition <http://shopping.netsuite.com/s.nl/c.1253739/it.A/id.318/f>, Appendix B page 23.
  - 25) 山崎 哲, 鈴木典子, 山崎法子, 高山成伸, 瀧 正志: 2. APTTの注意点と標準化. 日検血会誌 14: 85—95, 2013.
  - 26) 下村大樹, 林田雅彦, 山本慶和, 松尾収二: 未分画ヘパリン混入検体におけるプロタミン補充活性化部分トロンボプラスチン時間の方法と有用性. 日検血会誌 10: 175—181, 2009.

**Abstract****Expert consensus on standardization of sample preparation for clotting time assays**

Member of The Working Group for Standardization of Sample Preparation for Clotting Time Assays  
Masahiro Ieko<sup>1)</sup>, Yutaka Komiyama<sup>2)</sup>, Satoshi Yamazaki<sup>3)</sup>, Hisako Katagiri<sup>4)</sup>, Chisato Shimazu<sup>5)</sup>,  
Sumiyoshi Naito<sup>6)</sup>, Seiji Mishima<sup>7)</sup>, Yoichi Yuki<sup>8)</sup>, Miho Takeuchi<sup>9)</sup>, Tatsuya Ozawa<sup>10)</sup>, Osamu Kumano<sup>11)</sup>,  
Daisuke Harada<sup>12)</sup>, Junko Nozaki<sup>13)</sup>, Hideaki Tanaka<sup>14)</sup>, Yohko Kawai<sup>15)</sup>, Katsuyuki Fukutake<sup>16)</sup>,  
Shin-ichiro Watanabe<sup>17)</sup>, Masaru Homma<sup>18)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Internal Medicine, School of Dentistry, Health Sciences University of Hokkaido,  
1757-Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan

<sup>2)</sup>Department of Clinical Sciences and Laboratory Medicine, Kansai Medical University,  
2-5-1 Shin-machi, Hirakata City, Osaka 573-1010, Japan

<sup>3)</sup>Department of Clinical Laboratory, St. Marianna University School of Medicine Hospital,  
2-16-1 Sugao, Miyamae-ku, Kawasaki, Kanagawa 216-8511, Japan

<sup>4)</sup>Central Clinical Laboratory, Keio University Hospital, 35 Shinanomachi Shinjuku-ku, Tokyo 160-8582, Japan

<sup>5)</sup>Department of Central Laboratory, Teikyo University Hospital,  
2-11-1 Kaga, Itabashi-ku, Tokyo 173-8606, Japan

<sup>6)</sup>Department of Clinical Laboratory, Health Sciences University of Hokkaido Hospital,  
2-5 Ainto-sato, Kita-ku, Sapporo, 002-8072, Japan

<sup>7)</sup>Central of Clinical Laboratory, Shimane University Hospital, 89-1 Enya, Izumo, Shimane 693-8501, Japan

<sup>8)</sup>Faculty of Clinical Laboratory, Kyoto Prefectural University of Medicine,  
Kawaramachi-Hirokoji, Kamigyo-ku, Kyoto 602-8566, Japan

<sup>9)</sup>Preanalytical Systems, Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.,  
Akasaka Garden City, 4-15-1 Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan

<sup>10)</sup>General Hospital Products Division, General Hospital Company, Terumo Corporation,  
Tokyo Opera City Tower 49F, 3-20-2 Nishi-Shinjuku, Shinjuku-ku, Tokyo 163-1450, Japan

<sup>11)</sup>Hemostasis Product Engineering, Sysmex Corporation, 4-4-4 Takatsukadai, Nishi-ku, Kobe, 651-2271, Japan

<sup>12)</sup>Marketing Department, Diagnostics Division, Sekisui Medical CO. LTD,  
13-5 Nihombashi, 3-Chome, Chuo-ku, Tokyo 103-0027, Japan

<sup>13)</sup>Research & Development Department, IVD Business Division, LSI Medience Corporation,  
1460-6 Mitodai, Mito, Takomachi, Katori-gun, Chiba 289-2247, Japan

<sup>14)</sup>Life Cycle Management, Roche Diagnostics K.K., 6-1 Shiba 2-chome, Minato-ku, Tokyo 105-0014, Japan

<sup>15)</sup>International University of Health & Welfare, Sanno affiliate Hospital,  
8-10-16, Akasaka, Minato-ku, Tokyo 107-0052, Japan

<sup>16)</sup>Department of Laboratory Medicine, Tokyo Medical University,  
6-7-1 Nishishinjuku, Shinjuku, Tokyo 160-0023, Japan

<sup>17)</sup>Department of Clinical Laboratory, Fujisawa City Hospital,  
2-6-1 Fujisawa, Fujisawa City, Kanagawa 251-8550, Japan

<sup>18)</sup>Mitsukoshi Health And Welfare Foundation, 1-24-1-Nishishinjuku, Shinjuku, Tokyo 160-0023, Japan

The preparation method utilized for a patient blood sample that is subjected to testing, such as centrifugation, can significantly affect the clotting time assay results. The Working Group (WG) for Standardization of Sample Preparation for Clotting Time Assays was organized by The Japanese Society of Laboratory Hematology (JSLH) with the purpose of proposing a standardized method to appropriately prepare blood samples prior to assay. After referring to the previously presented guidelines as well as original experimental results, this WG of the JSLH reached consensus on the following recommended method for the pre-analytical procedure when subjecting samples to a coagulation assay.

#### 1. Blood collection tubes

- The anticoagulant should be a sodium citrate solution ranging from 0.105~0.109 M (3.13~3.2%).
- The ratio of sodium citrate solution to blood should be 1 : 9. The maximum allowable volume of blood to be drawn is the nominal capacity  $\pm$  10%.

#### 2. Blood collection

- The Standard Phlebotomy Guidelines (GP4-A2) of The Japanese Committee for Clinical Laboratory Standards (JCCLS) should be complied with.

#### 3. Handling (transport)

- Blood samples should be centrifuged at room temperature within 1 hour of collection to separate the plasma, then freeze if necessary and transport on dry ice. The safety manual or transport safety manual of the hospital should be complied with.

• Centrifugation should be performed at 1,500 x g for at least 15 minutes (or 2,000 x g for at least 10 minutes) at a temperature of 18~25°C, and the remaining platelet count in plasma must then be confirmed to be less than 10,000/ $\mu$ L.

#### 4. Storage and thawing

- Samples should be stored at room temperature (18~25°C) and analyzed (measured) within 4 hours of collection. Long-term storage at 4°C should be avoided.

• For cryopreservation of samples, divide the plasma samples into screw-top polypropylene tubes with O-ring caps. For long-term storage, storage at -75°C or below is recommended.

**Key words:** Clotting time assay, Pre-analytical procedure, Centrifugal separation condition, Sample storage condition