
第 21 回日本検査血液学会学術集会
テクニカルセミナー 3
標準化委員会報告—2020 年度の提言—

4. 凝固検査のためのサンプルの取り扱い—凝固検査検体 取り扱い標準化ワーキンググループの 2020 年の提言

小宮山 豊¹⁾⁴⁾ 家子 正裕²⁾⁴⁾ 松田 将門³⁾⁴⁾
凝固検査検体取り扱い標準化ワーキンググループ⁴⁾
橋口 照人⁴⁾⁵⁾

¹⁾北陸大学医療保健学部

²⁾北海道医療大学歯学部内科

(現：岩手県立中部病院診療部臨床検査科)

³⁾新潟大学医歯学総合病院検査部

⁴⁾日本検査血液学会血栓止血検査標準化委員会

⁵⁾鹿児島大学大学院医歯学総合研究科血管代謝病態解析学分野

鹿児島大学病院検査部

要 旨

凝固検査検体取り扱い標準化ワーキンググループでは、院内検査用の凝固検査検体取り扱いのコンセンサスの英文改訂版作成と外注検査用コンセンサスに必要な実験に取り組んだ。院内検査用コンセンサスでは「血漿中残存血小板数が $10 \times 10^9/L$ 未満」であれば高速遠心が許容できるかの検証実験を実施した。その結果 turnaround time 短縮のため、推奨 (1,500xg) 以上の高速遠心 (3,500 xg) を実施すると検体血漿中でトロンビン-アンチトロンビン複合体で検出される凝固活性が高まることを明らかにし、凝固検査検体取り扱いとして高速遠心を推奨できないことを追記した。この内容は英語版にも追記した。また外注検査用コンセンサスについては、家子らの報告をもとに長時間搬送 MIMIC 系での実験を行った。その結果、全血長時間搬送では、4℃ 静置での変化がより顕著で第 VIII 因子低下を伴う APTT 延長を認め、血友病と誤診されるレベルであった。凝固因子測定のひとつを受託施設に頼る本邦の現状を考えると注意が必要である。なお、自施設用コンセンサスの認知度調査も最近報告され、それらを解析すると自施設用コンセンサスの周知に

小宮山 豊

Yutaka Komiyama

E-mail : komiyamayut@gmail.com

キーワード：エキスパートコンセンサス、凝固時間検査、全血試料、血漿試料、ループスアンチコアグラント

は、院内検査室が保持する遠心分離機の複数化や技師会を通じて広いアナウンスの必要性などが改善方法として有用であることを確認した。

はじめに

本邦で普及している凝固検査の標準化を目的として、日本検査血液学会血栓止血検査標準化委員会凝固検査検体取り扱い標準化ワーキンググループ(WG)は、まず検査前誤差の是正に取り組み、本邦ではじめての凝固検査検体取り扱いに関するコンセンサス案(コンセンサス)を2016年に紙上発表した。その中で、凝固検査の検査前誤差を最低限とした検体を得る条件として、遠心分離は1,500xg以上で、最低15分間、採血管内血液量が多い3mL採血管や5mL採血管の場合は2,000xgで10分間、遠心分離の温度は室温を推奨した¹⁾。本遠心条件は、希釈ラッセル蛇毒試験(dilute Russel's viper venom test, dRVVT)において検体血漿中の残存血小板数が $10 \times 10^9/L$ を超えると、その凍結融解検体で偽陰性を招くことが報告され、これを回避するためにも重要である²⁾。しかし、本邦におけるコンセンサスの認知度や遵守率は未だに低いことが明らかになり^{3,4)}、さらに、「血漿採取のための遠心分離に要する時間を短縮したい」、「そのためコンセンサスで推奨の15分もの遠心時間は長すぎるため、何らかの方法で遠心時間を短くしたい」との臨床現場の要求が大きい状況は残っている。

今回、これらの問題を解説するとともに、現時点で我々が持つ知見をまとめ提示することで、いわゆる院内検査用コンセンサス遵守の重要性再確認とループスアンチコアグラント(LA)検査を受託検査に頼る病院が多い現状を踏まえ、外注用コンセンサス作成の重要性について考える。

1. コンセンサスの認知度と凝固検査検体のいわゆる turnaround time

本学会のWGとしては1,500xg、15分以上、あるいは2,000xg、10分以上の遠心が、品質を保証した凝固検査検体を得るために必要であることを示したが、現状で2点の問題点がある。一つ目は、我々が示したコンセンサスの認知度の低さである。

2016年にコンセンサスを発表以来、コンセンサスの認知度について2つの報告がなされている。一つは広島県臨床検査技師会がコンセンサス発表1年後に発表した調査報告で、残念ながらコンセンサスの認知度は30%未満であった。原因として本学会会員のみならず、医師会検査センターなど調査対象が広いいため、本学会会員も少なくコンセンサス自体の周知が徹底されていなかった可能性が残る³⁾。従って、今後のコンセンサス発表では周知の方法を工夫する必要がある。もう一つは新潟県での調査で遵守率は35%であった。この報告で興味深いことはコンセンサスの認知度は高いが、保持遠心機台数が少ないため、遵守できない可能性が示唆されたことである⁴⁾。従って、今後、必要な台数の遠心機を確保することを明記するなど、コンセンサスの記載に工夫が必要である。

二つ目は臨床現場からの要望では、いまだに迅速で正確な検査結果を報告し、検体検査では何分以内に、例えば、30~40分以内に90%以上の検査結果を報告できるシステムを構築する必要があること、さらに止血系検査のみが遅く、turnaround timeを改善できない、遠心時間15分は長すぎるなどの要望が存在することもしばしば耳にする。さて、今回欧米での凝固検査項目のturnaround timeに関するコンセンサスを文献的に検索したところ、凝固検査の検査前誤差に関する世界的な研究者であるLippiのグループがD-dimerの救急領域における報告のturnaround timeについて報告し、救急領域で1時間以内と明記していた^{5,6)}。30分では困難であるが、1時間であると、凝固検査検体として品質保証できるデータを報告するため、遠心時間15分は十分確保できると筆者らは考える(図1)。

2. 高速遠心が凝固検査検体の品質に及ぼす影響および遠心不足がLAに及ぼす影響

Turnaround time短縮のために、高速遠心を試みる施設がある。松田らは高速遠心が血球に対して遠心力が過負荷になる可能性があるため、その



図1. 凝固検査は本当に遅すぎるのか. 求められる turnaround time と凝固検査検体の品質保証で考える

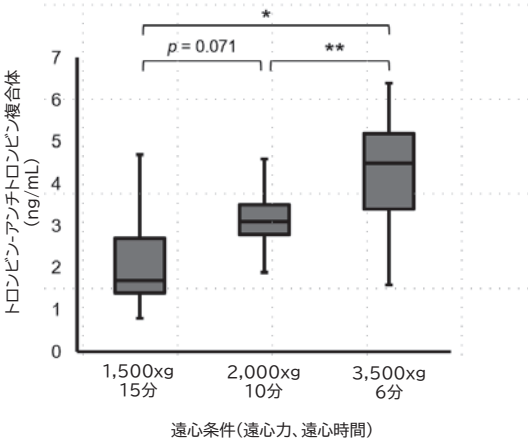


図2. Turnaround time 短縮のための高速遠心は、凝固検査検体中のトロンビン産生を有意に増加する
採血管は 20℃ の遠心温度で 3 種の遠心条件で遠心処理した。*p<0.001, **p<0.05
(松田将門 他：日検血会誌 21：136-144, 2020 から引用)

影響を院内検査用コンセンサスの条件と比較検討した⁷⁾。その結果、図2に示すように、コンセンサスで示している左端の 1,500xg で 15 分や左図中央の 2,000xg で 10 分に比して、左図右端の 3,500 xg で 6 分 (これら 3 条件ではすべて残存血小板数は $10 \times 10^9/L$ 以下) が有意にトロンビン産生を示すトロンビン-アンチトロンビン複合体が上昇することを認めた。なお、図示はしないが、トロンビン産生が遠心力を上げるにつれて上昇した上記

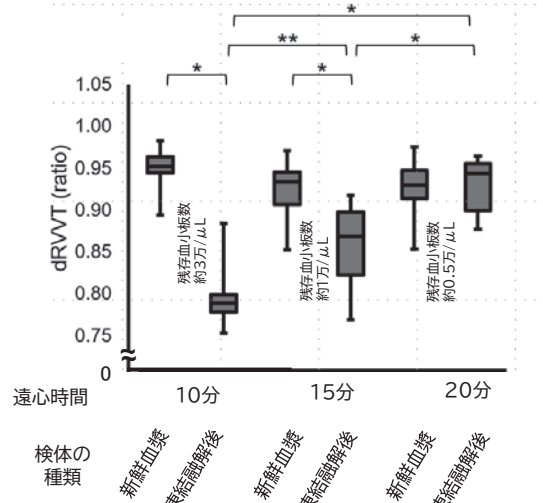


図3. ループスアンチコアグラント検査の測定前に凍結融解操作を伴う場合、残存血小板数が多いと偽陰性を招く
採血管は 5 mL を用い、1,500 xg の遠心力、20℃ の遠心温度で遠心処理した。dRVVT ratio はリン脂質濃度が高い confirm 試薬での凝固時間に対するリン脂質濃度が低い screen 試薬での凝固時間の比である。
*p<0.001, **p<0.01
(松田将門 他：日検血会誌 21：136-144, 2020 から引用)

の同一検体でフィブリンモノマー複合体、D-ダイマーおよび FDP を測定したところ、これらは変化しないことを認め、この高速遠心による遠心力負荷、すなわち凝固刺激はフィブリン形成以降に及ぶほど顕著でない程度の強さである可能性を得たことは興味深いと考える。一方、遠心不足が LA 検査結果に及ぼす影響を検証するため、希釈ラッセル蛇毒時間 (dRVVT) の ratio に及ぼす影響を 20℃、1,500xg のいくつかの遠心時間でさらに遠心直後と遠心後に凍結融解した血漿で比較した。なお、これらの条件は dRVVT が多くの施設で委託検査であることを考慮したために設計し、採血管は 5 mL 採血管を用いた。その結果、特に遠心時間 10 分で残存血小板数 $30 \times 10^9/L$ の凍結融解後の血漿試料では図3左から 2 番目に示すように、dRVVT の ratio が有意に減少し、偽陰性を招く可能性を強く示唆した。さらに血液が採血管内に占

める高さが大きく、採血管上部に遠心力が効きにくい5mL採血管の特徴でもあるが、15分では不足で20分以上の遠心分離が必要であることが示唆された。すでに吉田らが報告している結果とこの結果を合わせ考えると、凍結融解を伴う委託検査用の血漿検体は過度の高速遠心を避けつつ残存血小板数は $10 \times 10^9/L$ 以下を遵守し、さらに個々の検査結果を検証した条件で処理することの重要性が確認できた²⁷⁾。原因不明のAPTT延長などを契機に発見されるLA陽性症例の検査診断を正しく進めるために、この条件遵守は大切である。

3. 委託検査において多数経験する全血搬送の危険性

2019年の家子らの報告に本邦の受託検査施設の多くが、全血搬送を経験し、すべての検体が全血搬送である施設が25%に達することが明らかとなった。直近のCLSIのガイドライン(H21-A5)(2008年)ではプロトロンビン時間(PT)用検体は24時間まで検体保存可能としているが⁸⁾、2018年ベルギーのLinkensらは外注検査においても追加検査がある可能性を考慮すると24時間まで室温保存を認める事への疑問があることを報告した⁹⁾。さらにこの議論は血漿での話題であり、本邦のような全血での議論ではないこと、さらに実際に車載搬送した実験系の報告は少ないが、唯一トルコから2017年にPTが2時間で変化することを示した報告がある¹⁰⁾。これらのことから健常者全血を用い、強振動(200rpm)弱振動(50rpm)、静置の3条件に20℃と冷蔵の2温度条件を加え、0, 4, 8, 12, 24時間の経過に伴う活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)第VIII因子(FVIII)活性、dRVVTなど全血保存による影響を検証し、2019年国際検査血液学会で発表した¹¹⁾。その結果、特にAPTTとFVIIIにおいて特記すべき結果を得た。論文執筆中のため図示することは控えるが、APTTは時間の経過とともに延長し、特に冷蔵静置、あるいは弱振動で延長することを認めた。この変化は室温強振動や冷蔵強振動より顕著であったことは驚きである。原因として考えられるのは、いわゆるクリオプレシピテートの関与が推定された。いずれにせよ、FVIIIは4時間後から明確な低

下を認め、12時間以降では冷蔵、静置および弱振動で大きな影響を認めることが明らかとなったが、個人の変化では臨床的に問題となるレベルであることも明らかとなった。すなわち、冷蔵静置の条件では、第VIII因子活性70%の健常者が、冷蔵静置の間に経時的に減少し、12時間後で40%以下となり、24時間後では20%台となり、臨床医がデータのみから判断することを考えると、この軽症血友病レベルにまで達する偽減少は大きな問題であることが明らかとなった。これらの結果から、全血による凝固検査試料の運搬は重大な検査過誤が招かれることが強く示唆され、今後の外注検査の凝固検査検体取り扱いに関するコンセンサスでは全血搬送負荷を明記する必要がある可能性が強く示唆された。

4. まとめ

我々は、本コンセンサスの内容が極めて重要であること、そして国際的認知度を高める必要があることから、英語版のコンセンサスを最近発表した¹²⁾。すでに述べ、また英語版コンセンサスにも記載のとおりであるが、残存血小板数 $10 \times 10^9/L$ 以下のみが一般に認知されているが、 $10 \times 10^9/L$ 以下にすることのみでは不十分であり、過度の高速遠心は凝固活性化を意味し、推奨できない。またdRVVTは外注検査に頼る施設も多く、凍結融解を伴う場合、遠心不足では偽陰性になる可能性を示唆し、これらのことを周知する必要がある。また全血搬送は避けなければならないことが明確となった。今後さらに検討を深め、外注検査における凝固検査検体取り扱いのガイドライン完成に向けてさらに検討を進める予定である。

本論文内容に関連する著者の利益相反開示：

小宮山豊：社員、役員、顧問職への就任(シスメックス株式会社)

文 献

- 1) 家子正裕, 小宮山豊, 他: 資料 凝固検査検体取り扱いに関するコンセンサス. 別紙検証資料 凝固時間検査用検体作成のための遠心条件による残存血小板数の影響と凍結融解の凝固スクリーニング検査に対する影響

- に関する実験報告書. 日本検査血液学会雑誌 17: 149—168, 2016.
- 2) Yoshida M, Ieko M, et al: Is plasma separated from blood by double centrifugation useful for determination of lupus anticoagulant? *Thromb Haemost* 9(Suppl.): 879, 2011.
 - 3) 河野浩善, 中川浩美, 他: 広島県における凝固検査の検体取り扱いに関するアンケート調査報告. *広島臨床検査* 6: 26—30, 2017.
 - 4) 松田将門, 山田 隆: 凝固検査検体取り扱いの現状の解析. 新潟県におけるアンケート調査. *日本検査血液学会雑誌* 21: 170—181, 2020.
 - 5) Lippi G, Cervellini G, et al: D-dimer testing for suspected venous thromboembolism in the emergency department. Consensus document of AcEMC, CIS-MEL, SIBioC, and SIMeL. *Clin Chem Lab Med* 52: 621—628, 2014.
 - 6) Favresse J, Lippi G, et al: D-dimer: Preanalytical, analytical, postanalytical variables, and clinical applications. *Crit Rev Clin Lab Sci* 55: 548—577, 2018.
 - 7) 松田将門, 小宮山豊, 他: 血液凝固線溶検査における検体の遠心条件および保存条件の影響. *日本検査血液学会雑誌* 21: 136—144, 2020.
 - 8) Adcock DM, Hoefner DM, et al: Collection, transport, and processing of blood specimens for testing plasma-based coagulation assays and molecular hemostasis assays: approved guideline. 5th ed. ed Wayne PA, pH 21-A5, p13—15, Clinical Laboratory Standards Institute, CLSI document, 2008.
 - 9) Linkens EA, Devreese KMJ: Pre-analytical stability of coagulation parameters in plasma stored at room temperature. *Int J Lab Hem* 40: 292—303, 2018.
 - 10) Ergin M, Erdogan S, et al: The effect of transport by car on coagulation tests. *Clin Chem Lab Med* 55: 1943—1947, 2017.
 - 11) Matsuda M, Komiyama Y, et al: The impact of sample storage conditions and mechanical agitation as well as their interaction on coagulation tests. *Int J Lab Hem* 41(suppl. 2): 112, 2019.
 - 12) Ieko M, Komiyama Y, et al: Expert consensus regarding standardization of sample preparation for clotting time assays. *Int J Hematol* 112: 614—620, 2020.

Abstract

Handling of samples for clotting time assays—2020 recommendation by the working group for standardization of sample preparation for clotting time assaysYutaka Komiyama¹⁾⁴⁾, Masahiro Ieko²⁾⁴⁾, Masato Matsuda³⁾⁴⁾,The Working Group for Standardization of Sample Preparation for Clotting Time Assays⁴⁾,
Teruto Hashiguchi⁴⁾⁵⁾¹⁾Hokuriku University, Faculty of Health and Medical Sciences, 1-1 Taiyogaoka, Kanazawa City,
Ishikawa 920-1180, Japan²⁾Health Science University of Hokkaido, School of Dentistry, Department of Internal Medicine
(Present affiliation: Iwate Prefectural Chubu Hospital, Clinical Laboratory Medical Laboratory Division, 1757
Kanazawa, Ishikari-Tobetsu, Hokkaido 061-0293, Japan)³⁾Niigata University Medical and Dental Hospital, 1-754 Asahimachi-dori, Chuo-ku, Niigata City,
Niigata 951-8520, Japan⁴⁾Japanese Society of Laboratory Hematology, Shinanomachi-Rengakukan-5F, 35 Shinanomachi, Shinjuku-ku,
Tokyo 160-0016, Japan⁵⁾Kagoshima University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Laboratory and Vascular Medicine,
Kagoshima University Hospital, Department of Clinical Laboratory, 8-35-1 Sakuragaoka,
Kagoshima City, 890-8544, Japan

The working group for standardization of sample preparation for clotting time assays prepared a revised version of the English version of the consensus on the handling of coagulation test specimens for in-hospital tests and the experiments necessary for the consensus for outsourced tests. In the consensus for in-hospital clotting time tests, a verification experiment was conducted to evaluate whether high-speed centrifugation is acceptable if the residual platelet count in plasma is less than $10 \times 10^9/L$. As a result, to shorten the turnaround time, the coagulation activity detected by the thrombin-antithrombin complex in the sample plasma increased after performing high-speed centrifugation (3,500xg) faster than the recommended (1,500xg). Therefore, high-speed centrifugation is not recommended, and this was added to the English version. Regarding the consensus for outsourced clotting time tests, we conducted an experiment using a long-term transport MIMIC system based on the reports of Ieko et al. In the long-term transport of whole blood, the change after refrigeration with still storage was more marked than that after storage at room temperature with rotation, and APTT prolongation accompanied by a decrease in factor VIII was observed, which was a misdiagnosis level for hemophilia. This is significant because Japan relies on outsourced laboratory testing to measure coagulation factor activity at most hospitals. A recognition survey of the consensus for in-hospital clotting time tests was also recently reported and a wide announcement for consensus is required.

Key words: Expert consensus, Clotting time assay, Whole blood sample, Plasma sample, Lupus anticoagulant