

体外診断用医薬品

ループス抗凝固因子キット

LAテスト「グラディポア」

[全般的な注意]

- 本品は、体外診断用でありそれ以外の目的に使用しないでください。
- 本品は、血漿中のループス抗凝固因子(LA)を検出する試薬であり、被験者の診断は他の関連する検査結果や臨床症状等と合わせて総合的に判断してください。
- 添付文書以外の使用方法については保証を致しません。
- 本品の試薬1及び試薬2には保存剤として0.1%(溶解時)のアジ化ナトリウムを含んでいます。目や口に入ったり、皮膚に付着した場合は、水で洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。
- 本試薬で陰性となった場合はAPTT法など、異なる原理に基づくLA検出法によってさらに確認してください。

[形状・構造等(キットの構成)]

構成品	包装	数量	備考
試薬1	2 mL	1本	凍結乾燥品
ラッセル蛇毒/ダイズリン脂質			
試薬2	2 mL	1本	凍結乾燥品
ラッセル蛇毒/ダイズリン脂質 (過剰のリン脂質を含む)			

[使用目的]

血漿中のループス抗凝固因子の検出。

[測定原理]

本品は、希釈ラッセル蛇毒時間法(dRVVT法)を原理として血漿検体の凝固時間を測定することにより、検体中のループス抗凝固因子(LA)を検出する試薬です。

希釈ラッセル蛇毒時間法は1986年にThiagarajanらによって報告された方法です。希薄なリン脂質の存在下で血液の凝固時間を測定した場合、LAが存在するとその凝固時間が延長されることにより、LAの存在を知ることができますが、ラッセル蛇毒はカルシウムの存在下において、血液凝固のカスケードにおける外因系の第Ⅷ因子および内因系における第Ⅷ因子以前の凝固因子をバイパスして直接第Ⅹ因子を活性化します。従ってdRVVT法は接触因子異常や第Ⅷ因子の欠乏若しくは阻害の影響を受けないため、APTT法に比してよりLAに特異的です。

試薬2にはLAを吸収するために過剰のリン脂質を加えており、試薬2を用いて凝固時間を測定した場合に、試薬1で延長した凝固時間との比を見ることにより、LAの存在を確認することができます。

[操作上の注意]

1. 検体について

- 検体はクエン酸血漿を用います。新鮮な患者の血液9容に0.12 mol/Lクエン酸3ナトリウム(好ましくは0.05 mol/LのHEPESを含むpH7.0のバッファー)1容をプラスチック試験管若しくはシリコン処理した試験管にとり、混合します。
- 検体は採血の後、できるだけ早く1500 g以上で15分間遠心します。キャップ付のバイアルに入れて4℃に保存し、4時間以内に使用してください。長期に保存する場合は-70℃以下に凍結して保存してください。
- 検体を凍結させる場合は、再度遠心するか0.2 μmのフィルターを通して血小板を除きます(10×10³個/μL以下になるまで)。血小板は凝固時間短縮の原因となります。
- 血漿中にフィブリン塊が認められた場合は抗凝固剤と血液の混合が遅かったものです。このような検体は測定に用いないでください。
- 光度計を用いて測定する場合に、黄疸の強い検体、乳び検体、溶血した検体では測定を誤る可能性がありますので、このような検体は用いないでください。
- ヘマトクリット値が異常を示す検体の場合も、クエン酸濃度に対する血漿の割合が適切でないため、誤った結果を得る場合があります。

2. 共存物質の影響

自社施設にて、検体における妨害物質の試験をしたところ、血漿中の残存血小板の量が*10×10³個/μL以上では、ろ過血漿に比べて凝固時間の短縮が認められました。また、ヘパリンについては1.0 IU/mLまでは凝固時間に明確な変化は認められませんでした。

[用法・用量(操作方法)]

1. 準備するもの

- 標準的な実験装置に加え以下のものがが必要です。
- 10×75 mmガラス試験管
 - 37±1℃一定の恒温浴槽

- (3)200 μ Lマイクロピペット
- (4)精製水
- (5)血小板を除いた陰性、陽性コントロール血漿
- (6)ストップウォッチ（用手法の場合）

2. 試薬の調製法

- (1)試薬1、試薬2とも2.0 mLの精製水で溶解します。バイアルを転倒して凍結乾燥した試薬が完全に溶解するまで良く混合します。
- (2)試薬は凍結乾燥状態では、2～8℃に保存したとき、表示の有効期限まで安定です。また、溶解後は-20℃に保存した場合1ヶ月、2～8℃に保存した場合48時間、20～25℃に保存した場合24時間、37℃に保存した場合8時間まで安定です。有効期限切れの試薬は使用しないでください。

3. 操作法

LAテスト「グラディポア」は自動機器あるいは用手法のどちらによっても測定することができます。

(1)用手法の場合

- 1) 調製した試薬1を試験管中で予め37℃ \pm 1℃に温めておきます。
- 2) 調製した検体200 μ Lをガラス試験管に添加し、37℃ \pm 1℃で1分間温めます。
- 3) 予め温めておいた試薬1の200 μ Lを血漿に加え、凝固するまでの時間を測定します(T1)。
- 4) 調製した試薬2を用いて同様に操作し、凝固時間(T2)を測定します。
- 5) T1とT2の比(T1/T2)を計算し、結果として報告します。

(2)自動機器を用いる場合

試薬1、試薬2とも、等量の被験血漿と試薬を混合し、ほとんどの場合トロンビン時間のプロトコルを用いて行うことができます。しかし、観察時間あるいは獲得時間は120秒まで延長してください。

各自動機器を用いた場合も用手法と同様に試薬1での凝固時間(T1)と試薬2での凝固時間(T2)の比を計算しますが、各機器のプロトコルについては「問い合わせ先」にお問い合わせください。

[測定結果の判定法]

1. 測定は、ばらつきによる誤差を最小にするため、試薬1と試薬2は同時に測定してください。
2. 最終的な結果は試薬1と試薬2の凝固時間の比として表されます。

- 試薬1の凝固時間(T1)/試薬2の凝固時間(T2) \geq 1.3…陽性
- 1.3 > 試薬1の凝固時間(T1)/試薬2の凝固時間(T2) \geq 1.1…ボーダーライン
- 試薬1の凝固時間(T1)/試薬2の凝固時間(T2) < 1.1…陰性

注意)

1.1～1.3(ボーダーライン)にある場合は、混合試験等の他の試験結果を考慮して注意深く推移を観察してください。

判定例

検体	試薬1の凝固時間	試薬2との凝固時間の比	判定
1	正常	1.1未満	陰性
2	正常	1.3以上	陰性
3	延長	1.3以上	陽性
4	延長	1.1未満	陰性

■参考基準範囲

健康な男女52名について試薬1、試薬2を用いて測定した結果は以下の通りでした。

	MIN(秒)	MAX(秒)	平均(秒)	標準偏差(SD)	平均+2SD
試薬1(a)	25.3	40.8	31.3	3.2	37.4
試薬2(b)	30.0	39.6	34.7	2.2	39.2
a/b	0.74	1.19	0.90	0.10	1.10

使用機器：Amelung KC- 4 A micro

「判定上の注意」

1. 上記の値はあくまでも参考であり、各施設は独自に基準となる値を設定することをお勧めします※。
※測定値は手技によるばらつきのほか、用いる機器によっても異なります。凝固時間を測定する機器には、凝固に伴う透過光の変化を検出するものや、凝固に伴う粘稠度の増加を検出するものなどがあります。3施設において同一の陽性検体を測定したときの凝固時間のばらつきは下表の通りでした。

	施設A	施設B	施設C
試薬1	73.2秒	62.4秒	60.0秒
試薬2	38.0秒	39.5秒	34.9秒

2. 本試薬で陽性となった場合は、正常血漿との混合試験や他の検査所見を総合的に考慮して診断を行ってください。
3. LAテスト「グラディポア」と混合試験を併用することによって、さらに各種の病態を診断することが可能となります。

試薬1		試薬2		判定
患者血漿	混合血漿	患者血漿	混合血漿	
正常	正常	正常	正常	LA陰性
延長	延長	正常	正常	LA陽性
延長	正常	延長	正常	凝固因子欠乏
延長	延長	延長	正常	LA+凝固因子欠乏
延長	延長	延長	延長	他の抗凝固因子

- 通常のLAの場合、混合血漿での試薬1の凝固時間は患者血漿のみの場合と若干異なります。また、試薬2では正常を示します。
- 第II、第V、第X因子が欠乏している患者の場合は、ワルファリン治療の場合と同様に、試薬1および試薬2での凝固時間は延長を示します。

4. 凝固因子の欠乏を伴うLA血漿では試薬1での凝固時間は延長を示し、混合試験によっても多少の補正が見られるのみです。このような検体では、患者血漿のみを用いたときに、LAではなく凝固因子の欠乏により試薬2で異常な結果を示します。

5. もし正常血漿の添加によっても試薬1、試薬2とも凝固時間が補正されない場合、第II、第V、第X因子のいずれかに対する阻害因子の存在が疑われ、PT試験で異常が見られるはずですが。このような場合には正常血漿で1:1に希釈した血漿(混合血漿)を用い、LA抵抗性のプロトロンビン時間と共に個別の凝固因子に対する測定を行ってください。

注意) 混合試験は一定時間インキュベートした後に行ってください。しかし、LAとインキュベート時間の関係については未だ知られていません。

6. 正常血漿を用いて測定した結果が試薬1と試薬2で2秒以上異なる場合、既知正常血漿で得られた値で各凝固時間を割ることにより、凝固時間の補正をすることが出来ます。

$$\text{補正值} = \frac{\frac{\text{試薬1での患者血漿(又は混合血漿)の凝固時間}}{\text{試薬1での正常血漿の凝固時間}}}{\frac{\text{試薬2での患者血漿(又は混合血漿)での凝固時間}}{\text{試薬2での正常血漿の凝固時間}}}$$

[臨床的意義]

ループス抗凝固因子(LA)は陰性荷電をもつリン脂質又は β_2 GP-1、プロトロンビンのような凝固因子とリン脂質との複合体に対する自己抗体です。

LAは各種の病的状態、特に自己免疫疾患において産生されます¹⁾。LAは従来よりAPTTやカオリン凝固時間(KCT)、希釈ラッセル蛇毒時間(dRVVT)法のようなリン脂質依存性の凝固試験により検出されてきました²⁾。

血液中のLAは通常、リン脂質依存性の凝固試験によって凝固時間が延長し、健常者血漿との混合試験によっても補正されないことによってその存在が示されます。リン脂質を加えることによって、延長した凝固時間が補正されれば、よりLA特異的であると言えます³⁾。リン脂質による補正を原理とした試薬は今までにいくつか開発されてきました⁴⁾が、LAテスト「グラディポア」のような使いやすい試薬はありませんでした。

LAはリン脂質依存性の凝固試験において凝固時間を延長しますが、臨床的には血栓症と関連しています⁵⁾。LAは検査室におけるAPTT試験において、原因不明のまま凝固時間の延長を示す場合の最も一般的な原因であり、出血の原因となる第VIII因子に対する抗体とは注意深く区別する必要があります。

現在LAは他の原因不明の血栓症を呈する患者や、習慣

性流産を呈する女性においてしばしば存在する重要なリスクファクターであると考えられています。dRVVT法はThiagarajanらによって1986年に報告されて以来⁶⁾最も良く使われる方法となっており、オーストラリアのグラディポア社(現ライフセラピューティクス社)は、このdRVVT法を簡便化、標準化しました⁷⁾。Petriら⁸⁾によれば、SLEの患者における血栓症はELISA法で測定される抗カルジオリピン抗体よりも、dRVVT法によって検出されるLAと、より密接に関連しています。このことはGalliとBeverisによってさらに研究され、彼らはdRVVT法に最も影響を与えるLAのサブタイプは β_2 GP-1依存性のLAであり、KCTにおいて凝固時間の延長に影響を与えるプロトロンビン要求性のLAではないことを示しています⁹⁾。

LAテスト「グラディポア」は希釈ラッセル蛇毒時間(dRVVT)法によるループス抗凝固因子検出用試薬です。

[性能]

1. 性能

(1)感度試験

自社施設において本キットを用い、LA陰性管理検体を試料として操作した場合の凝固時間は、試薬1、試薬2とも25秒以上40秒以内であった。更に陽性管理検体につき同様に測定するとき、試薬1の凝固時間と試薬2の凝固時間の比は1.5以上であった。

(2)正確性試験

自社施設において本キットを用い、陽性管理検体(凝固時間の比が1.5以上)及び陰性管理検体(凝固時間の比が1.2以下)を試薬1及び試薬2を用いて測定したところ、凝固時間の比はいずれも期待値の±15%以内であった。

(3)同時再現性試験

自社施設において本キットを用い、陰性管理検体及び陽性管理検体各1例を各5回同時に測定したとき、凝固時間のばらつきは試薬1、試薬2ともCV値10%以内であった。

2. 臨床性能試験成績

陽性を示す検体の割合はLA既知検体※の90%(26/29)、ヘパリン血漿の12%(1/8)、ワルファリン血漿では0%(0/7)、凝固因子欠乏では0%(0/5)、正常血漿では2%(1/60)でした。

※LAはAPTTとKCTでの混合試験により同定しました。

[使用上又は取扱い上の注意]

1. 取扱い上の注意

(1)検体はHIV、HBV、HCV等の感染の可能性があるものとして取り扱ってください。検査にあたっては、感染の危険を避けるため、使い捨ての手袋を着用し、また、口によるピペティングを行わないでください。

(2)試薬が目や口に入った場合は、水で十分に洗い流すなどの応急措置を行い、必要があれば医師の手当てを受けてください。

2. 使用上の注意

- (1) 試薬1と試薬2は、外箱に記載されたロット内の組み合わせで使用し、異なるロットの試薬を組み合わせで使用しないでください。
- (2) バイアル瓶を開封したときに真空でなかったり、試薬が乾燥していなかった場合には、その試薬は使わないでください。
- (3) 各試験ごとにコントロールとして血小板を除いた既知の陰性および陽性血漿を用いてください。
- (4) 各施設は独自に妥当なコントロールの値および正常範囲を設定してください。正しい判定結果を得るために、患者血漿は正常血漿と同じ方法で処理し、試薬1と試薬2は同時に行ってください。

3. 廃棄上の注意

- (1) 検体は感染の可能性があるものとして取り扱ってください。検査に使用した器具は、次のいずれかの方法で処理した後、廃棄してください。
 - 1) 最終濃度2%のグルタルアルデヒド溶液に1時間以上浸漬する。
 - 2) 0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液（有効塩素約1000ppm）に1時間以上浸漬する。
 - 3) 121℃で20分以上高圧蒸気滅菌する。また、試薬及び器具等を廃棄する場合は、廃棄物の処理及び清掃に関する法律、水質汚濁防止法等の規定に従って処理してください。
- (2) 血液等が飛散した場合には、手袋着用の上、ペーパータオル等でふき取り、0.1%次亜塩素酸ナトリウム溶液にて清拭してください。又、使用した手袋、ふき取りに使用したペーパータオル等は、廃棄上の注意(1)に従って処理し、廃棄してください。
- (3) 試薬1、試薬2には溶解時0.1%のアジ化ナトリウムが含まれています。アジ化ナトリウムは、配管中で爆発性のアジ化銅やアジ化鉛を形成することが知られています。これらの物質の形成を防ぐため、アジ化ナトリウムを含んだ廃液は十分な量の水で洗い流してください。

[貯蔵方法・有効期間]

貯 法：2～8℃

有効期間：24箇月

（使用期限は外箱に表示されています。）

[包装単位]

製品コード	構成品名	包 装	備 考
4150	試薬1	2 mL×1本	凍結乾燥品
	試薬2	2 mL×1本	凍結乾燥品

[主要文献]

1. FEINSTEIN DI. Lupus anticoagulant, thrombosis and fetal loss. N. Eng. J. Med. 1985, 313, 1248-1350
2. TRIPLETT DA, BRAND JT. Laboratory identification of the lupus anticoagulant. Br. J. Haematol. 1991, 73, 139-142
3. EXNER T., TRIPLETT DA, TABERNER D., MACHIN SJ. Guidelines for testing and revised criteria for lupus anticoagulants. Thromb. Haemostas. 1991, 65, 320-322
4. RAUCH J., TANNENBAUM M., JANOFF AS. Distinguishing plasma lupus anticoagulants from antifactor antibodies using hexagonal phase II phospholipids. Thromb. Haemostas. 1989, 62, 892-896.
5. LOVE PE., SANTORO SA. Antiphospholipid antibodies; Anticardiolipin and the lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus (SLE) and in non-SLE disorders. Ann. Intern. Med. 1990, 112, 682-698.
6. THIAGARAJAN P., PENG V., SHAPIRO SS. The use of the dilute Russell's viper venom time for the diagnosis of lupus anticoagulants. Blood, 1986, 68, 869-874.
7. EXNER T., PAPADOPOULOS G., KOUTTS J. Use of a simplified dilute Russell's viper venom time (dRVVT) confirms heterogeneity among "lupus anticoagulants". Bl. Coag. Fibrinol. 1990, 1, 259-266.
8. PETRI M., RHEINSCHMIDT M., ET AL. The frequency of lupus anticoagulant in systemic lupus erythematosus. Ann. Int. Med. 1987, 106, 524-531.
9. GALLI M., FINAZZI G., BEVERS EM., BARBUI T. Kaolin clotting time and dilute Russell's viper venom time antiphospholipid antibodies. Blood. 1995, 86, 617-623.

**[問い合わせ先]

株式会社医学生物学研究所 学術部

〒105-0012 東京都港区芝大門二丁目1番8号

住友不動産芝大門二丁目ビル

TEL：03-6854-3613 E-mail：kensa@mbl.co.jp

**[製造販売元]

株式会社医学生物学研究所

〒105-0012 東京都港区芝大門二丁目1番8号

住友不動産芝大門二丁目ビル

TEL：03-6684-6860 FAX：03-6854-3615