

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

臨床病理 (2012.11) 60巻11号:1035~1039.

緊急凝固検査迅速化を目的とした検体遠心条件の検討

渡辺 愉美, 河原 好絵, 花田 大輔, 野澤 佳祐, 友田 豊, 紀
野 修一

表題

緊急凝固検査迅速化を目的とした検体遠心条件の検討

著者名

渡辺愉美 河原好絵 花田大輔 野澤佳祐 友田豊 紀野修一

所属

旭川医科大学病院 臨床検査・輸血部

所在地

旭川市緑が丘東2条1丁目

連絡著者

渡辺愉美

英文表題

Examination of the sample centrifugation time for emergency coagulation test

英文抄録

The rapidity of coagulation testing is important for use as appropriate substitution therapy in patients with, or at risk of critical bleeding requiring massive transfusion.

Whereas the ordinary method of coagulation testing is known to be slow, in a critically haemorrhaging patient, a rapid turnaround time of coagulation testing becomes indispensable. To find out if coagulation test results will be affected by a shortened centrifugation time, we measured PT (prothrombin time), APTT (activated partial thromboplastin time), FIB (fibrinogen) and PLT (platelet) in plasma, using different centrifugation times (10min, 5min, 3min), and analyzed the measurements.

We found that, whereas centrifugation time significantly affected the PLT count in plasma (10min; $5.17 \pm 3.71 \times 10^3 / \mu\text{l}$, 5min; $28.1 \pm 26.9 \times 10^3 / \mu\text{l}$, 3min; $63.7 \times 10^3 / \mu\text{l}$), PT (10min; 14.6 ± 5.76 sec, 5min; 14.7 ± 5.84 sec, 3min; 14.9 ± 6.40 sec), APTT (10min; 36.4 ± 15.9 sec, 5min; 36.8 ± 16.5 sec, 3min; 34.7 ± 11.4 sec) and FIB (10min; 361 ± 134 mg/dl, 5min; 356 ± 132 mg/dl, 3min; 356 ± 125 mg/dl) were not affected. These data suggest that shortening centrifugation time will have no significant effect on the value of PT, APTT and FIB, in an emergency situation.

キーワード

coagulation test (凝固検査)、shortening of centrifuge time (遠心時間の短縮)、critical bleeding (危機的出血)、massive transfusion (大量輸血)

はじめに

大量出血・大量輸血時には、凝固因子の消費、血漿成分の希釈により止血機構に破綻を生じることがあり、適切な補充療法を行うためにも迅速な凝固検査結果の提供が求められている¹⁾²⁾。特に PT (prothrombin time), APTT (activated partial thromboplastin time), FIB(fibrinogen) の 3 項目は大量出血時の輸血療法決定において重要な指標とされているため早急に結果を報告する必要があり、検体提出後 20 分以内の結果報告が望ましいとされている³⁾⁴⁾⁵⁾。

このような背景から、海外では凝固検査迅速化の取り組みが行われており、検体の運搬方法や検査室における検体処理法を見直すことにより検査所要時間 (turnaround time : TAT) を 20 分以内に短縮することに成功した例も報告されている⁵⁾。

一方、当院検査部において 2010 年 4 月に行った調査では、上記 3 項目の外来における TAT は平均 27 分 (n = 139) であった。危機的出血患者への対応を考える場合、さらなる検査の迅速化が必須であり、検体処理にかかる時間をいかに短縮するかが課題である。

凝固検査では測定結果、特に APTT の測定に影響を与えるとされる血漿中の残存血小板を除くため、3000 rpm (2000 G) で 20 分以上の遠心処理を行うことが推奨されている⁶⁾。当検査部では現在、血漿中の残存血小板数と TAT を考慮し 3000 rpm (2000 G), 10 分, 10°C で処理を行っており、検体を遠心機にかけてから停止まで約 13 分かかっていた。TAT の約半分が遠心処理で占められていることになる。PT, APTT, FIB 3 項目を当院の自動分析装置にて測定した場合、通常 7 分以内で測定終了するため、遠心時間をさらに短縮することで TAT を 20 分以内にすることは可能であると考えられる。

そこで我々は、大量出血時の緊急凝固検査迅速化を目的とし、検体遠心時間の短縮が検査結果に及ぼす影響を検討した。

I. 方 法

A. 対象

2011年6月1日から2011年11月31日の間、旭川医科大学病院臨床検査・輸血部に凝固検査のため提出された患者検体のうち、二次利用の同意が得られている検体からランダムに抽出した111件を対象とした(旭川医科大学倫理委員会承認番号：924)。

B. 使用機器および試薬

凝固系項目の測定には全自動血液凝固分析装置 Coapresta 2000 (積水メディカル) を使用し、測定試薬として PT 測定に thromborel S (シーメンス)、APTT 測定にトロンボチェック APTT-SLA (シスメックス)、 FIB 濃度測定にトロンボチェック Fib (L) (シスメックス) を用いた。

血漿中の血小板数測定には総合血液学検査装置 ADVIA2120i (シーメンス) を使用した。

採血管は 3.13%クエン酸ナトリウム真空採血管 (ベノジェクト II : テルモ) を使用した。

遠心機は himac CF7D2 (日立) を使用した。

C. 方法

遠心条件を 3000 rpm (2000 G), 10 分, 10°C、3000 rpm, 5 分, 10°C、3000 rpm, 3 分, 10°C の 3 条件に設定し、各々で得られた血漿の血小板数, PT, APTT, FIB 測定値を比較検討した。

なお、各条件ともに遠心機のブレーキ機能を使用し、減速は 6 段階中 2 に設定した。

提出された検体を 3000 rpm, 3 分, 10°C で遠心処理し、血漿 350ul を別容器へ採取したものを 3 分遠心血漿とした。また残検体を 2 分間追加遠心し、血漿 350ul を別容器へ採取することで 5 分間遠心血漿を、さらに 5

分追加遠心することで 10 分遠心血漿を得た。

D. 統計処理

2 群間の相関を求め $r > 0.975$ を有意な相関ありとした。

II. 結 果

A. 各遠心条件における血漿中残存血小板数

5 分遠心血漿と 10 分遠心血漿の平均血小板数を比較した (Table.1, Fig.1)。各 5 分遠心血漿について 10 分遠心血漿の血漿中残存血小板数に対する比を血小板残存率とした。5 分遠心血漿の血小板残存率は平均 5.8 倍であり、最も高い検体で 17.7 倍であった (5 分遠心血漿: $53.0 \times 10^3 / \mu\text{l}$, 10 分遠心血漿: $3.00 \times 10^3 / \mu\text{l}$)。5 分遠心血漿中最も残存血小板数の多い検体は、血小板数 $125 \times 10^3 / \mu\text{l}$ (10 分遠心血漿: $20.0 \times 10^3 / \mu\text{l}$)、残存率は 6.3 倍であった。

全 111 検体中 73 検体を用い、3 分遠心血漿と 10 分遠心血漿の平均血小板数を比較した (Table.1, Fig.1)。10 分遠心血漿と比較し 3 分遠心血漿には平均 15.8 倍の血小板が残存していた。最も残存率の高い検体は 32.9 倍 (3 分遠心血漿: $296 \times 10^3 / \mu\text{l}$, 10 分遠心血漿: $9.00 \times 10^3 / \mu\text{l}$) であり、これは 3 分遠心血漿中最も血小板数の多い検体と同検体であった。

B. 各遠心条件における PT, APTT, FIB の変化

5 分遠心血漿と 10 分遠心血漿における PT, APTT, FIB 測定値を比較し、相関を求めた。PT, APTT, FIB の相関係数は各々 0.999, 0.992, 0.998 であり、良好な相関であった (Fig.2A)。各項目の実測値平均は Table.2 に示すとおりであった。APTT については 200 秒以上の延長により測定不能となった検体 2 件を除いて解析し

図 1

表 1

た。

検体 111 件中 73 件を用い 3 分遠心血漿と 10 分遠心血漿の比較を行った。PT, APTT, FIB の相関係数は各々 0.999, 0.998, 0.998 であり、相関は良好であった(Fig.2B)。各項目の実測値平均は Table.2 に示すとおりであった。 APTT については 200 秒以上の延長により測定不能となった検体 2 件を除いて解析した。

図 2

表 2

C. 血小板残存率の高い検体における各因子(項目)の関係

5 分遠心血漿の血小板残存率 5 倍以上かつ残存血小板数 $50.0 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 以上の検体 19 件を抽出し、5 分遠心血漿と 10 分遠心血漿の PT, APTT, FIB 測定値を比較、相関を求めた。PT, APTT, FIB の相関係数は各々 0.999, 0.999, 0.998 であり、全ての項目で良好な相関が得られた(Fig.3)。

図 3

III. 考 察

凝固検査において、血漿中の残存血小板は検査結果、特に APTT に影響を与えるといわれており、血小板を除くためには十分な遠心処理が必要とされていた。しかし今回の検討では、遠心時間を短縮することにより血漿中の残存血小板数は大きく変化したが、PT, APTT, FIB の測定においては遠心時間の差による違いは見られなかった。特に APTT においても、 $50.0 \times 10^3 / \mu\text{l}$ 以上の血小板が残っている検体の 5 分遠心血漿と 10 分遠心血漿の相関は良好であり、遠心時間の短縮によって生じる残存血小板の増加が、測定値に大きく影響する可能性は低いと考えられる。血小板 $200,000 / \mu\text{l}$ までは PT, APTT の測定値に影響を及ぼさないとの報告もあり⁷⁸⁾、危機的出血時の凝固機能モニタリングや、術中の輸血療法決定を目的とした迅速検査に関しては、遠心時間を短縮して得られる凝固検査結果でも十分に対応可能である。

今回は大量出血患者への迅速な対応を目的としているため、項目を PT, APTT, FIB に絞って検討を行った。

APTT の測定系に影響を与えるのは血小板に含まれるリン脂質や血小板活性化によって放出されるマイクロパーティクルであり、ループスアンチコアグラントや抗リン脂質抗体の検査、また凍結検体を用いての検査に関しては特に血小板が残存することによる影響の報告が多い⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾。しかし、大量出血時の緊急を要する状況下において、上記検査項目や血漿を凍結することによる影響を考慮する必要性は低い。加えて、大量出血患者を対象とした場合、その血漿成分は出血による喪失、輸液による希釈により減少している事が予想され、血小板やその他の血漿物質による影響はさらに低くなると考えられる。

今回、患者の提出検体を用いての検討であったため検体を複数本入手することが難しく、遠心条件を変えた血漿を得るために追加遠心という方法をとった。通常業務時には 10 分間の連続遠心処理を行っているため、厳密に同じ条件とはいえず、途中で遠心を止めることによる血小板の舞い上がりが懸念されたが、今回の検討では血小板の影響はみられなかった。

今回の検討結果より、当院では大量出血時の緊急凝固検査に限り、検査項目を限定し遠心時間を 5 分に短縮しての検査を実施している。その結果、検体を受け取ってから 20 分以内に臨床側に結果を報告することが可能となった。遠心時間を短縮することは、迅速な凝固検査、結果報告に有用であると考えられる。

IV. 結 語

危機的出血時など緊急を要する状況下においては、なにより早急な検査結果の報告が求められている。凝固検査検体の遠心時間を短縮することで PT、APTT、FIB の測定値が大きく変動する可能性は低く、遠心時間短縮は検査迅速化に有用な手段であると考えられた。

文献

- 1) Kristen C. Sihler and Lena M. Napolitano. Massive Transfusion : New Insights. CHEST 2009;136: 1654-67.
- 2) Wendy N. Erber, et al. Massive blood transfusion in the elective surgical setting. Transfusion and Apheresis Science 2002; 27: 83-92.
- 3) 紀野修一,他. 術中大量出血に対して臨床検査部門ができること. 臨床病理 2011; 59: 670-75.
- 4) Schols SEM, Heemskerk JWM, van Pampus ECM. Correction of coagulation in dilutional coagulopathy: Use of kinetic and capacitive coagulation assays to improve hemostasis. Transfusion Med Rev 2010; 24: 44-52.
- 5) Wayne L Chandler, Chris Ferrell, Sara Trimble, and Suzanne Moody. Development of a rapid emergency Hemorrhage panel. TRANSFUSION 2010; 50: 2547-52.
- 6) 福武勝幸. 凝固検査の標準化の現状 : プロトロンビン時間(PT). 生物試料分析 2009; 32(5): 357-364.
- 7) Carroll WE, Wollizer AO, Harris L, et al. The significance of platelet counts in coagulation studies. J MED 2001; 32: 83-96.
- 8) Bames PW, Eby CS, Lukoszyk M. Residual platelet counts in plasma prepared for routine coagulation testing with the Beckman Coulter power processor. Lab Hematol 2002; 8: 205-209.
- 9) Brien WF, Schaus MR, Cooper KE, O'Keefe BT, Inwood M. Lupus anticoagulant testing: effect of the platelet count on the activated partial thromboplastin time. Br J Biomed Sci 1993; 50(2): 114-16.
- 10) Armando Tripodi.et.al. Standardization of activated protein C resistance testing: effect of residual

platelets in frozen plasmas assessed by commercial and home-made methods. *Brit J Hematol* 2003; 120:

825-828.

Table 1 Relation between centrifuge time and residual platelet count in specimens.

PLT ; platelet

Ratio ; ratio of residual platelet count at individual centrifuge time to that at 10min centrifugation.

Result are given as the mean \pm SD.

Figure 1 Residual platelet count in samples.

Figure 2 Effect of centrifuge time on PT, APTT and FIB.

A : Correlation between 5min and 10min samples.

B : Correlation between 3min and 10min samples.

Table 2 PT, APTT and FIB in individual centrifuge time.

Result are given as the mean \pm SD.

Figure 3 Effect of centrifuge time on PT, APTT and FIB in samples which showed high rate of residual platelet.

Table.1

centrifuge time	PLT count ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	Rate
10 min	5.17 ± 3.71	1.000
5 min	28.8 ± 26.9	5.8 ± 4.0
3 min	63.7 ± 52.1	15.8 ± 10.7

Figure.1

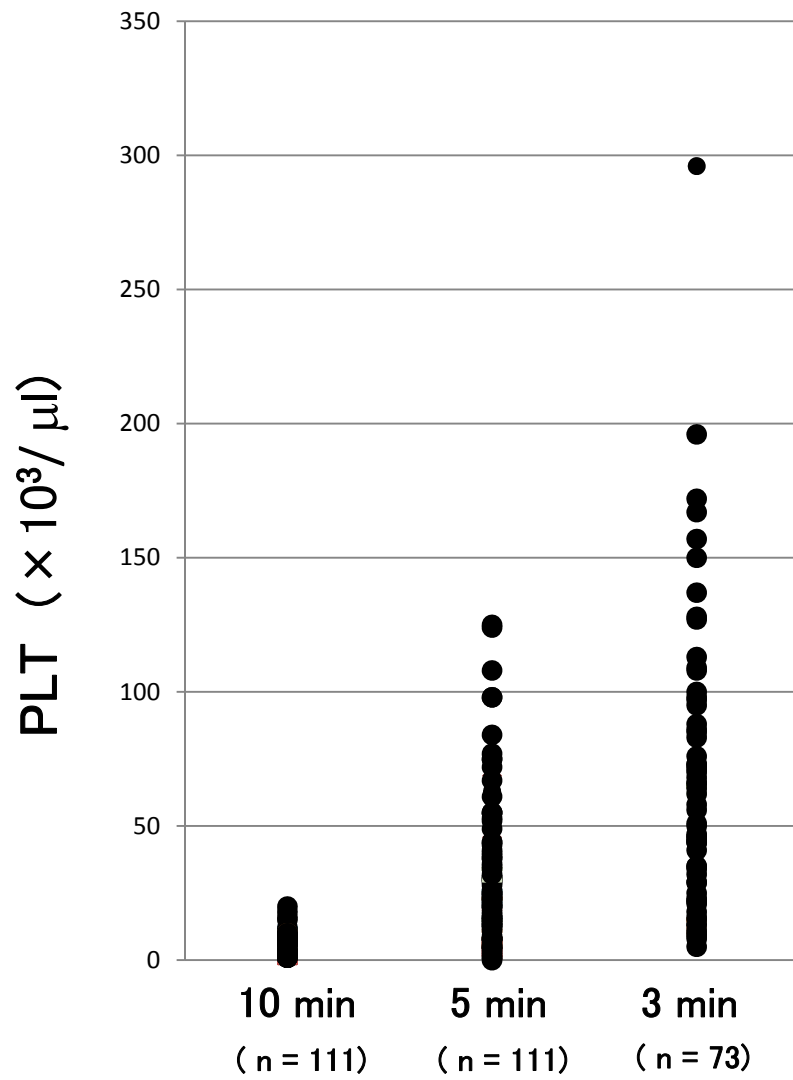


Figure.2

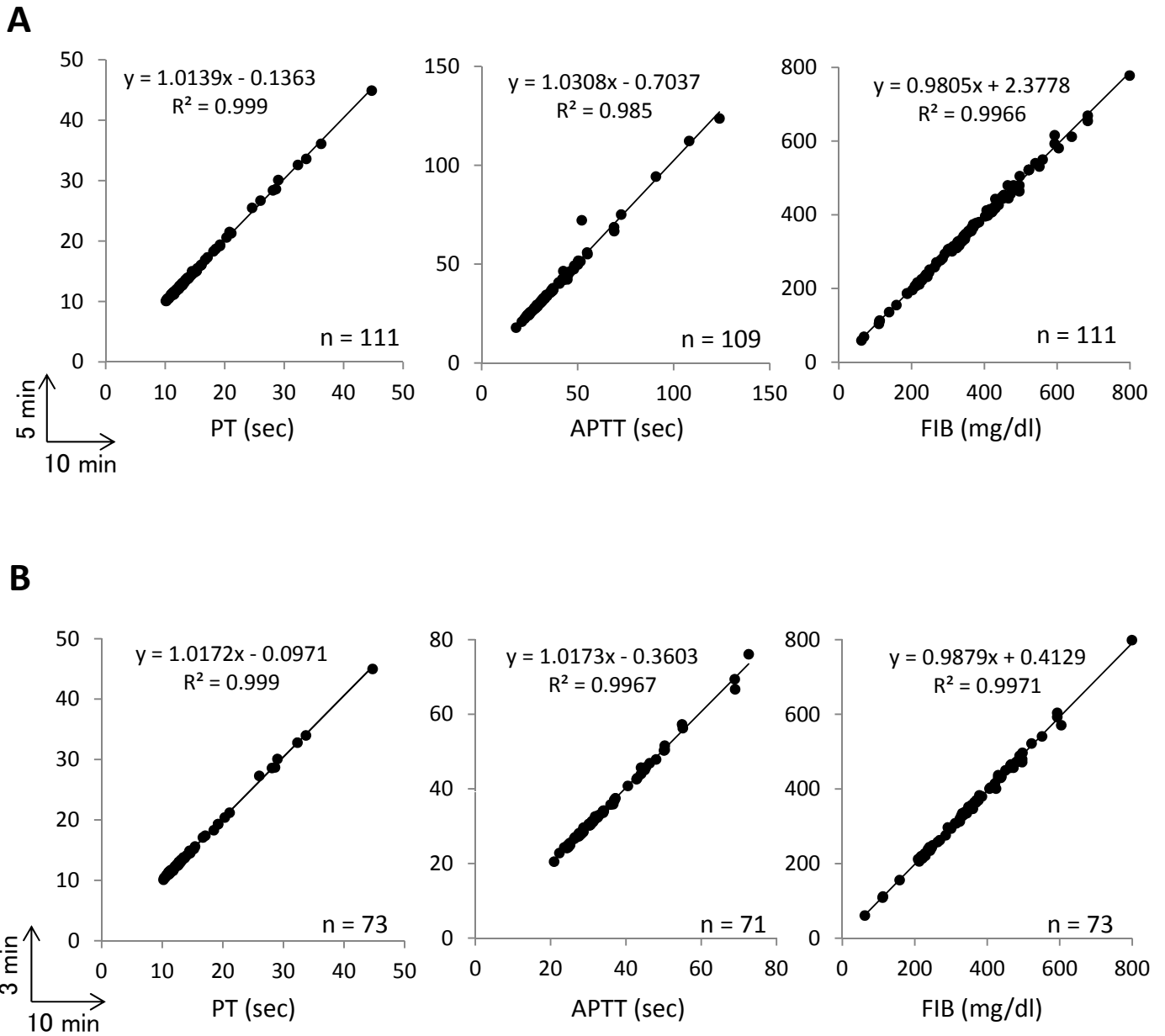


Table.2

	PT (sec)	APTT (sec)	FIB (mg/dl)
10 min	14.6 ± 5.76	36.4 ± 15.9	361 ± 134
5 min	14.7 ± 5.84	36.8 ± 16.5	356 ± 132
3 min	14.9 ± 6.40	34.7 ± 11.4	356 ± 125

Figure.3

