

「透過光血小板凝集検査法の標準化：国際血栓止血学会 血小板機能標準化部会からの提言」の紹介と解説

学術標準化委員会 血小板部会

富山佳昭^{1*} 佐藤金夫² 尾崎由基男³ 清水美衣⁴ 田村典子⁵ 西川政勝⁶
野村昌作⁷ 堀内久徳⁸ 松原由美子⁹ 矢富 裕¹⁰ 山崎昌子¹¹ 羽藤高明¹²

1. はじめに

透過光血小板凝集検査法(light transmission aggregometry: LTA)は血小板機能解析における標準的な検査法であるが、時間がかかることや採血条件など検査結果に影響を与える因子が多くあるため、検査には技術の習熟が必要と考えられる。本法は世界で広く使われているものの、その手技の標準化が行われていない。2013年に国際血栓止血学会の血小板機能標準化部会において専門家作業部会からのコンセンサスの形で、透過光血小板凝集検査法の検査手技に関する提言がなされている¹⁾。日本血栓止血学会学術標準化委員会血小板部会においては、本邦における透過光血小板凝集検査法の検査手技の標準化を目指し、上記の国際血栓止血学会の提言に関し若干の補足[注]で表記を加えるとともに、この提言の内容を紹介する。なお、この提言を啓発するにあたり、血小板部会において検討委員会を開催し原文の内容を本邦の実情に照らして吟味したが、とくに修正すべき点はないとの結論になった。

国際血栓止血学会の提言において、検査手技等の標準化にあたっては、それまでの科学的論文を収集しそれに記載されたエビデンスを評価し作成するのが常套手段であるが、LTAに関してはエビデンスに乏しいため、専門家作業部会においてコンセンサスを得る方法(RAND法)を用いて決定したと記載されている。具体的には、国際血栓止血学会作業部会の11名の専門家に対しての意見聴取を行い、それぞれの項目に対して1(不適切)~9(適切)までの点数化を行い、草案を作成し、それに対して学会での血小板機能標準化部会ミーティングで広く意見聴取した上で修正し、5回にわたる改訂作業を行い最終的な提言として発表された¹⁾。なお各項目の後に11名のスコアに関し[スコア中央値、スコア範囲]を示している。したがって、このスコアが高いほど推奨度は高い(最高点は9点)。

2. 提言内容

1. 透過光血小板凝集検査法(LTA)の臨床上的有用性

1. LTAは出血性疾患患者の解析に有用である[スコア中央値9、スコア範囲8-9]。
2. 研究的な解析を除き、血栓症のリスク判定の基準としてLTAを用いない[7, 5-9]。この分野に関しては、更なる研究と標準化が必要であるとの意見である。
3. 抗血小板療法の薬効評価に関しては、研究的な目的以外ではLTAを用いての評価は行わない[7, 4-7]。この目的には、より迅速に効率よく判定できるVerifyNowなどのpoint of care検査が利用可能である。しかし、これらの装置が入手できない場合は、LTAにて代用してもよいかもしれない。抗血小板療法の薬効評価にLTAを用いない理由として、P2Y₁₂受容体阻害薬の用

¹ 大阪大学医学部附属病院 輸血部

² 山梨大学医学部附属病院 検査部

³ 笛吹中央病院

⁴ 名城大学薬剤部 環境科学研究室

⁵ 東海大学医学部 循環器内科

⁶ 三重大学医学部附属病院 臨床研究開発センター

⁷ 関西医科大学 内科学第一講座

⁸ 東北大学加齢医学研究所 基礎加齢研究分野

⁹ 慶應義塾大学医学部 発生・分化生物学講座

¹⁰ 東京大学大学院医学系研究科 臨床病態検査医学

¹¹ 東京女子医科大学 神経内科

¹² 愛媛大学医学部附属病院 輸血・細胞治療部

*責任者連絡先:

大阪大学医学部附属病院 輸血部

〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-15

Tel: 06-6879-5887, Fax: 06-6879-5889

E-mail: yoshi@hp-blood.med.osaka-u.ac.jp

量や種類を VerifyNow を用いて調整し個別療法を行った3つのランダム化臨床試験(GRAVITAS, TRIGGER-PCI, ARCTIC)²⁻⁴⁾や LTA を用いて調整した個別療法試験⁵⁾において、臨床成績の改善が得られなかったことを考慮し、LTA を含めた臨床検査による抗血小板薬の薬効モニターを推奨するデータは不足していると解説している。

本項で確認された LTA の臨床上の有用性に基づき、下記に述べる LTA 検査標準化手順は、血小板機能異常に起因すると考えられる出血性疾患患者の診断にのみ適用される。

II. 検査前の留意点

1. 運動によるアドレナリン放出の影響を減弱するため、短時間の休憩の後に採血する[スコア中央値 7, スコア範囲 2-8].
2. 少なくとも 30 分は喫煙を控えて採血する[7, 5-8].
3. 少なくとも 2 時間はカフェイン摂取を避けて採血する[7, 3-8].
4. 検査前 1 週間以内のすべての薬歴を把握する[7, 7-9].
5. 血小板機能を可逆的に抑制する薬剤(NSAIDs など)は少なくとも検査前の 3 日間は中止する[8, 7-9].
6. 血小板機能を不可逆的に抑制する薬剤(アスピリン, チェノピリジンなど)は少なくとも検査前の 10 日間は中止する[8, 8-9].
7. 血小板機能を抑制する薬剤の服用を中止できない場合は、結果を解釈する上で薬剤が血小板機能に与える影響を考慮する[9, 8-9].
8. 空腹時に採血するべきか否かに関しては、一定の見解はない[5, 3-8]. 高血糖や高脂血症が血小板凝集能の結果に若干影響を与えるかもしれないが、これらにより血小板機能低下症の診断に影響を及ぼすか否かは不明である。軽食の摂取が血小板凝集能に与える影響は無視しようと考えられる。しかし、血漿中のカイロミクロン生成は光透過性を変化させ検査結果に影響するため、高脂肪食を摂取したあとの検査は行わない。
9. 検体採取前にすべての薬剤を中止すべきであるかに関しては、一定の見解はない[4, 1-8]. 血

小板凝集能測定目的のために、すべての薬を中止することができない患者も存在するためである。

III. 採血上の留意点

操作中の血小板の活性化を最小限に抑えるために、以下の注意事項に留意し採血する必要がある。

1. 駆血は最小限に留める、あるいは駆血帯を使用しないで採血する[スコア中央値 8, スコア範囲 7-9]. 駆血帯を用いる場合は、採血開始時にできるだけ早く駆血を開放する。
2. 採血針は 21 G より太いもので採血する[8, 7-9].
3. プラスチック(ポリプロピレン)管あるいはシリコン加工したガラス管に採血する[9, 8-9].
4. サンプル調整や測定中の pH を安定させるため緩衝能のある抗凝固剤を用いて採血する[7, 3-8].
5. 緩衝作用のある抗凝固剤, 109 mM(3.2%)クエン酸ナトリウムを用いて採血する[8, 5-9].
6. 緩衝作用のある抗凝固剤, 129 mM(3.8%)クエン酸ナトリウムを用いて採血する[7, 4-9]. 11 名中 5 名の専門家は上記のクエン酸濃度の一方の濃度のみを推奨したが、最終案ではどちらかの濃度であればよいとした。
7. 採血した最初の 3~4 mL は検査には用いず、廃棄する、あるいは LTA 以外の検査に使う[8, 5-9].
8. LTA に対して十分量の採血が困難な場合は、その採血量不足血液は高度な血小板機能異常症(例えば血小板無力症, Bernard-Soulier 症候群など)を除外する目的にのみ使用することができる[7, 5-8].

IV. 多血小板血漿 (PRP) および乏血小板血漿 (PPP) の作製手技

1. 血液試料は、遠心分離前に 15 分間、室温で「静置」する[スコア中央値 8, スコア範囲 6-8].
2. PRP は 200×g, 10 分間の遠心で調整する[8, 5-9]. 200×g(あるいは 250×g), 10 分間の遠心条件は、最近 Femia らによって、他の血球の混入や血小板反応性に関して最適条件であることが確認された。

注)Femia らが使用した採血管は長さ 98 mm,

採血量は 10 mL である。国内の採血管と規格および採血量が異なるので注意が必要である。

3. PRP は室温(約 21℃)で遠心し作製する[8, 8-9].
4. PRP はブレーキを使わずに作製する[8, 8-9].
5. 巨大血小板の場合の PRP は、沈降法によって分離して作製する[8, 5-9].
注)通常の遠心操作では血小板が沈降するため上手く PRP が作製できないため。
6. 上記の巨大血小板の場合の沈降法による PRP 作製時、チューブを 45°の角度にして傾けるべきか否かに関しては不明である[6, 4-8].
7. PPP は全血、あるいは PRP を除いた試験管を、室温で 1,500×g, 15 分間の遠心で作製する[8, 8-9].

V. PRP の品質管理

1. 肉眼的溶血が認められた検体は廃棄する[スコア中央値 9, スコア範囲 7-9].
2. 測定試料が高脂血症の場合、最終報告書にこのことを記載する[8, 2-8].
3. 作製された PRP の血小板数を測定する[9, 8-9].
4. PRP の血小板数が 15 万/ μL 未満の場合は、血小板凝集能検査の結果が不正確になる可能性がある[8, 5-9].
5. 血小板数低値の PRP から得られた異常値に関しては、慎重に解釈すべきである[9, 7-9].
6. 血小板数が低値の PRP は、高度な血小板機能異常症(血小板無力症, Bernard-Soulier 症候群, type2B & 血小板型 von Willebrand 病)を除外するための検査に用いることは可能である[8, 5-9].
7. PRP の血小板数を自己 PPP により標準的な血小板数に調整することは、行わない[8, 3-9].

正常血小板数の被験者から作製された PRP での血小板数のばらつき内であれば、LTA 検査結果に影響を与えないことが最近の研究で明らかにされている⁶⁻⁹⁾。そのため、血小板数の調整は不要であり、アゴニストに対する血小板反応性を損なう可能性があるため、自己 PPP を用いて PRP 中の血小板数を調整することは推奨しない。しかしながら PRP の血小板数が 60 万/ μL を超えた場合の血小板機能評価に関しては今後の検討を必要とするとして解説している。最

近、PRP の血小板数を調整しない方法と調整した方法の両法とも、出血性疾患の患者の解析に有用であることが示された。この論文では血小板数を調整した PRP では血小板数を調整しない PRP と比較すると、患者および健常者において血小板凝集能の異常が高頻度に観察されたと報告している¹⁰⁾。

VI. 血小板凝集検査法

1. LTA 施行に際しては、被検者検体とともに必ず健常者コントロールを同時に測定しなければならない[スコア中央値 8, スコア範囲 7-9].
2. 遠心後に、PRP は試験前に 15 分間室温で静置する[7, 7-9].
3. PRP は 0%の光透過率を設定するために用いる[9, 8-9].
4. 自己 PPP は 100%の光透過率を設定するために用いる[9, 8-9].
5. LTA は 37℃で実施する[9, 8-9].
6. 凝集計の製造業者によって指定された場合を除き、LTA の測定中 PRP は常に使い捨ての攪拌子を用いて 1000 rpm で攪拌する[8, 8-9].
7. LTA のベースラインは、アゴニストを添加する前に少なくとも 1 分の間、周期的変動と安定性を確認する[8, 7-9].
8. アゴニストの添加量は一定にすべきで、総容量の 10%以下とする[8, 7-9].
9. アゴニストを添加したあと、少なくとも 3 分間は血小板凝集能を観察する[8, 7-9].
10. 大部分のコントロール検体で 3 分までに最大凝集が起こらないアゴニストの場合、少なくとも 5 分間は血小板凝集能を観察する[8, 8-9].
11. 大部分のコントロール検体で 5 分までに最大凝集が起こらないアゴニストの場合、少なくとも 10 分間は血小板凝集能を観察する[8, 5-9].
12. LTA 測定は採血後 4 時間以内に完了する[8, 7-9].

VII. アゴニストの選択

血小板アゴニストは、適切に保存し、安定性をチェックする必要がある。以下の血小板アゴニストは、示された濃度で、診断のための血小板凝集能検査に使用する。

1. ADP : 2 μM [スコア中央値 7, スコア範囲 4-9]
2 μM で異常な結果が出た場合、より高濃度

のADPを使用する[8, 8-9].

注)以下に記載するすべてのアゴニストに関しても同様に、使用した濃度で異常な結果が出た場合、より高濃度のアゴニストを使用すると記載されている(以下の項目での記載省略).

2. エピネフリン：5 μ M[8, 5-9]

5 μ Mで異常な結果が出た場合、より高濃度のエピネフリンを使用する[8, 6-9].
3. コラーゲン：正常血小板の凝集を十分に惹起する低濃度のコラーゲンを使用する[8, 5-9]. (2 μ g/mLホルムコラーゲン, など)[8, 6-9].
4. Thrombin receptor(PAR1) activating peptide(PAR1-AP)：10 μ M[7, 3-9]

10 μ Mで異常な結果が出た場合、より高濃度のPAR1-APを使用する[8, 5-9].
5. トロンボキサンA2アナログU46619：1 μ M[7, 5-9]

1 μ Mで異常な結果が出た場合、より高濃度のU46619を使用する.
6. アラキドン酸：1 mM[8, 6-9]

1 mMで異常な結果が出た場合、より高濃度のアラキドン酸を使用する[7, 4-9].
7. リストセチン：1.2 mg/mL[8, 7-9]

1.2 mg/mL リストセチンによる凝集が正常であれば、0.5~0.7 mg/mL リストセチンによる再測定を行う[8, 7-9].

1.2 mg/mL リストセチンによる凝集がみられなければ、2 mg/mL リストセチンによる再測定を行う[7, 3-9].

VIII. 凝集検査の評価と報告

1. 血小板凝集曲線は以下の項目に関して評価する.
 - a. 形態変化(shape change)の存在[スコア中央値8, スコア範囲8-9]
 - b. 凝集開始までの時間(ラグタイム)の長さ[8, 5-9]
 - c. 凝集の傾き[7, 3-9]
 - d. 最大振幅あるいは最大凝集率%[9, 8-9]
 - e. 測定終了時の振幅あるいは凝集率%[8, 5-9]
 - f. 凝集の解離[8, 8-9]
 - g. 凝集曲線の目視検討[9, 8-9]
 - h. エピネフリン惹起凝集における“2次凝集”の

存在[7, 5-9]

2. 血液採取から4時間以上経過して完了した検査は、そのことを報告に記載する[8, 3-9].
3. 臨床検査室は必ず適切な基準範囲を設定し、各ロットの性能を検証しなければならない[8, 7-9].

3. おわりに

「透過光血小板凝集検査法の標準化：国際血栓止血学会血小板機能標準化部会からの提言」を原文に即した形で紹介した。この提言の普及が、本邦での血小板凝集検査の標準化の一助になれば幸いである。

著者の利益相反(COI)の開示：

富山佳昭：顧問(シスメックス社), 尾崎由基男：顧問(シスメックス社), 矢富 裕：臨床研究(シスメックス社).

文献

- 1) Cattaneo M, Cerletti C, Harrison P, Hayward CPM, Kenny D, Nugent D, Nurden P, Rao KA, Schmeier A, Watson S, Lussana F, Pugliano M, Michelson AD: Recommendations for the standardization of light transmission aggregometry: a consensus of the working party from the platelet physiology subcommittee of SSC/ISTH. *J Thromb Haemost* **11**: 1183-1189, 2013.
- 2) Price MJ, Berger PB, Teirstein PS, Tanguay JF, Angiolillo DJ, Spriggs D, Puri S, Robbins M, Garratt KN, Bertrand OF, Stillabower ME, Stillabower ME, Aragon JR, Kandzari DE, Stinis CT, Lee MS, Manoukian SV, Cannon CP, Schork NJ, Topol EJ; GRAVITAS Investigators: Standard- vs high-dose clopidogrel based on platelet function testing after percutaneous coronary intervention: the GRAVITAS randomized trial. *JAMA* **305**: 1097-1105, 2011.
- 3) Trenk D, Stone GW, Gawaz M, Kastrati A, Angiolillo DJ, Müller U, Richardt G, Jakubowski JA, Neumann FJ: A randomized trial of prasugrel versus clopidogrel in patients with high platelet reactivity on clopidogrel after elective percutaneous coronary intervention with implantation of drug-eluting stents: results of the TRIGGER-PCI (Testing Platelet Reactivity In Patients Undergoing Elective Stent Placement on Clopidogrel to Guide Alternative Therapy With Prasugrel) study. *J Am Coll Cardiol* **59**: 2159-2164, 2012.
- 4) Collet JP, Cuisset T, Rangé G, Cayla G, Elhadad S, Pouillot C, Henry P, Motreff P, Carrié D, Boueri Z, Belle L, Van Belle E, Rousseau H, Aubry P, Monségu J, Sabouret P, O'Connor SA, Abtan J, Kerneis M, Saint-Etienne C, Barthélémy O, Beygui

- F, Silvain J, Vicaud E, Montalescot G; ARCTIC Investigators: Bedside monitoring to adjust antiplatelet therapy for coronary stenting. *N Engl J Med* **367**: 2100–2109, 2012.
- 5) Parodi G, Marcucci R, Valenti R, Gori AM, Migliorini A, Giusti B, Buonamici P, Gensini GF, Abbate R, Antoniucci D: High residual platelet reactivity after clopidogrel loading and long-term cardiovascular events among patients with acute coronary syndromes undergoing PCI. *JAMA* **306**: 1215–1223, 2011.
 - 6) Linnemann B, Schwonberg J, Mani H, Prochnow S, Lindhoff-Last E: Standardization of light transmittance aggregometry for monitoring antiplatelet therapy: an adjustment for platelet count is not necessary. *J Thromb Haemost* **6**: 677–683, 2008.
 - 7) van der Stelt CA, van Werkum JW, Seesing TH, Berg JM, Hackeng CM: To adjust or not to adjust the platelet count in light transmission aggregometry in patients receiving dual aspirin/clopidogrel treatment. *Platelets* **18**: 550–553, 2007.
 - 8) Cattaneo M, Lecchi A, Zighetti ML, Lussana F: Platelet aggregation studies: autologous platelet-poor plasma inhibits platelet aggregation when added to platelet-rich plasma to normalize platelet count. *Haematologica* **92**: 694–697, 2007.
 - 9) Mani H, Luxembourg B, Kläffling C, Erbe M, Lindhoff-Last E: Use of native or platelet count adjusted platelet rich plasma for platelet aggregation measurements. *J Clin Pathol* **58**: 747–750, 2005.
 - 10) Castilloux JF, Moffat KA, Liu Y, Seecharan J, Pai M, Hayward CP: A prospective cohort study of light transmission platelet aggregometry for bleeding disorders: is testing native platelet-rich plasma non-inferior to testing platelet count adjusted samples? *Thromb Haemost* **106**: 675–682, 2011.