

I-(3) フィブリノゲン基準測定法(案)

<第1次、第2次標準品の値付けのための測定法>

(JCCLS H5-P1(2002))

Definitive Method for the Determination of Plasma Fibrinogen Proposed

巽 典之 (日本臨床検査医学会標準委員会血液小委員会・委員長)

Chairholder: Noriyuki TATSUMI, MD, PhD

(Standardization Committee, Hematology Subcommittee
Japan Society of Laboratory Medicine Chairholder)

【概要】

本勧告案は臨床検査室における血漿フィブリノゲンの単位を規定する基準測定法について記述する。

【適用】

本測定法は、単位を規定する目的で準備された第一次標準物質(例: WHOフィブリノゲン標準品)にフィブリノゲンの濃度を値付けするためのものである。また、第一次標準物質から単位を伝達された第二次標準物質のフィブリノゲンの濃度を確認するために用いられる場合もある。特に、第一次標準物質を新しく調製・準備した際、その濃度を規定するために用いる¹⁾。

【試料とその取り扱い】

本測定法に適応するのは、臨床検査に適応することを目的として製造された第一次標準物質、もしくは第二次標準物質である。それらの性状として、臨床検体と同等のマトリックス効果を持ち、測定原理・計測原理の違いによって測定結果が大きくかけ離れないことが予め実験されわかっていること。また、長期間の安定性を確立するため通常凍結乾燥さ

れているので、これを再溶解後肉眼的に清澄であって濁りのないこと。また、保証されている有効期限内にあるもの。これらの標準品は指定された方法で再溶解後、臨床検体と同様、3.2%または3.8%クエン酸ナトリウムが血液との比率で1:9の割合になるよう採取された血漿と同等の濃度で含まれ、期待されるカルシウムキレート効果のあることが必要である。

試料は、測定に際し予め室温に戻し、指定された方法にしたがって再溶解する。溶解後は、室温におき2時間以内に使用すること。もし、それを越えて実験をする必要がある場合には、予め知られている方法で有効とされる時間内を限り保存すること。

【試薬】

1. 保存用緩衝液

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.822g

KH_2PO_4 2.770g

水に溶解して、全量1Lにする。pH 6.35

2. 使用緩衝液

保存用緩衝液を倍量の生理食塩水で希釈する(1:2)。

3. 生理食塩水

0.15 mol/L NaCl

4. トロンビン溶液・500IU/mL

ウシもしくはヒト・トロンビンを生理食塩水で溶解希釈する。

5. フィブリン凝集塊溶解液

400gの尿素を水に溶解し、1.0N NaOH 200mLを添加後、水で全量を1Lとする。

【測定条件】

検査室温度：23±2℃

環境：振動がなく、空調の風が直接当たらない場所とする。

【測定手順】

- 1) 対象とする標準品を室温で指示通りに溶解する。
- 2) 完全に溶解後、混和した標準品を1mL正確に秤取し、アクリル製のシャーレーに移す(注1)。アクリル製の時計皿でもよい。
- 3) 2mLの使用緩衝液をこれに加え混和する。
- 4) トロンビン溶液 50 μ Lを加え、清浄なガラス棒ですばやくかき混ぜる。
- 5) シャーレーにフタをして室温で2時間静置する。シャーレーはやや傾斜をつけておくとよい。
- 6) ペーパータオルを重ねた上に濾紙をおき、この上に凝集したフィブリン塊をガラス棒で移す。
- 7) ガラス棒でフィブリン塊をゆっくり転がすようにしてそれについた水分を濾紙に吸い取る。さらに新しい濾紙でフィブリン塊をはさんで水分を除去する。
- 8) 清浄な50mLビーカーにフィブリン塊を移す。
- 9) 生理食塩水を50mL加え、30分間静置する。
- 10) 再び新しいペーパータオルを重ねた上に濾紙をおき、この上に凝集したフィブリン塊をガラス棒で移して、フィブリン塊をゆっくり転がすようにしてそれについた水分を濾紙に吸い取る。
- 11) 新しいビーカーを用いて、操作9と10をもう一度繰り返す。
- 12) さらにもう一度、操作9と10を繰り返す。最後に新しい濾紙でフィブリン塊をはさんで水分を除去する。
- 13) 清浄な大試験管にフィブリン塊を移し入れる。
- 14) フィブリン凝集塊溶解液 7.5mLを加え、室温に4時間放置する。混和して、肉眼的に清澄である

ことを確認する。

15) 溶液の一部をとり、280nmと315nmで吸光度を測定する。用いる光学セルは石英製で光路長10mmのもの。もし吸光度が1.00を越える場合には、フィブリン凝集塊溶解液で適宜に希釈すること。対象にはフィブリン凝集塊溶解液を使用する。

16) 315nmの吸光度が280nmの吸光度の10%未満であることを確認する。

17) 280nmの吸光度から315nmの吸光度を差し引き、フィブリノゲン濃度とする。

フィブリノゲン濃度(g/L) =

(280nmの吸光度 - 315nmの吸光度) × 4.70

【注 意】

注1: 1mLに溶解する標準品が多い。この場合には、まず、指示に従って1mLの精製水もしくは指定の溶解液を用いて、標準品を確実に溶解後、すべての内容をシャーレーにあけるとともに、標準品の容器に操作3. で添加する使用緩衝液の一部を加え標準の残滓を共洗いし、その内容をシャーレーに合すのがよい。

【フィブリノゲン濃度の報告】

フィブリノゲンは、g/Lで表記する。

これは従来、mg/dLで表現していたものに対して、係数0.01をかけることになる(例：200mg/dL=2.0g/L)。

また、フィブリノゲン mg/dLを μ mol/Lに換算するには、0.0294118を係数として用いるが、現在この表記が用いられることは極めてまれである。

【日本臨床検査医学会標準委員会血液小委員会】

委員長 巽 典之

委員 池本 卓, 土屋 達行, 福武 勝幸

松原 高賢, 山口 延男, 鈴木 是光

新谷 和夫, 松野 一彦, 渡辺 清明

協力研究者 中 恵一

文 献

- 1) Gaffney PJ, Wong MY : Collaborative study of a proposed international standard for plasam fibrinogen measurement. Thromb Haemast 68 : 428~432, 1992

解 説

【はじめに】

本測定は臨床検査に用いる血漿フィブリノゲンの基準的な単位を規定し、臨床検査領域におけるフィブリノゲン測定系のトレーサビリティを確立するためのものである。測定方法は、フィブリノゲンを凝固性タンパクとして測定するもので、WHOが規定したフィブリノゲンの基準単位を得るものである。

【概要と歴史的背景】

現在臨床検査室で、もっぱら利用されている血漿フィブリノゲン定量法は、血漿検体にトロンビンを添加し凝固までの時間を測定する方法で、Claussによってはじめて定量的測定法として確立された¹⁾。実際の臨床検査室にはある米国のメーカーがこれをキット化して1975年に発売を開始し、たちまちのうちにそれが米国の市場を席巻した結果、「トロンビン時間法」として普及したものである²⁾。それまでは、硫酸アンモニウムを用いる比濁法や³⁾、熱凝固させてネフェロメトリーで測定する方法⁴⁾などが主体に用いられていた。こうした動きの中、市場原理だけでフィブリノゲン測定が標準化されて行くのを米国のみならず欧州の臨床検査専門家が黙って見ていたわけではなく、より正確であって、しかも簡便な測定法で標準化されることを希望する活動がこの頃開始された⁵⁾。その実際の成果は、英国を中心に起きた標準化の活動で見られることになった⁶⁾。すなわち、ISTH(International Society on Thrombosis and Haemostasis)とNIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)の共同作業で標準物質が開発され、それは1991年に完成した。直ちにこれは、翌1992年WHOの委員会で認証され、WHO 89/644として国際的に利用されることとなった⁷⁾。

この初めてのフィブリノゲン国際標準品であるWHO 89/644は、1アンフルに2.4mg/mLの凝固活性を持ったフィブリノゲンが含まれていると表示された。この時その濃度検定に用いられた測定法によって、臨床検査に用いるフィブリノゲンの単位が、「凝固性タンパク」で規定されることと併せて、そのタンパク構成アミノ酸に由来する紫外外部吸収の吸光度に由来して規定されることが確立した。

【測定原理】

ここに述べるフィブリノゲンの測定基準単位を決

定する方法は、Jacobsson法によって確立されたものである⁸⁾。試料にトロンビン添加を行い、フィブリノクロットを分取し粗精製したのち、アルカリ性尿素液に溶解後、紫外外部吸光度を測定し「係数」を乗じて濃度に換算するものである。この「係数」を得るため、平行して得たフィブリン塊の一つに対し、キエルダール法で窒素量の測定をし、これからフィブリンタンパク量に換算して、尿素液に溶解したフィブリンの吸光度と比較し「係数」を求めるものである。このキエルダール法によるフィブリノゲンの定量の試みは古く⁹⁾、比較的新しい報告では、フィブリノゲンの窒素含量は総タンパクあたり16.9%と報告されていた¹⁰⁾。Jacobssonはこの実験を精密に繰り返して、16.6%を得てこの数値を用いている。

【フィブリノゲン濃度への換算係数】

キエルダール法による窒素量測定から算出されたフィブリノゲンタンパク量に対して、フィブリン糸析出時に巻き込む他の血漿タンパクによる見かけ上のタンパク量の増加分を補正する必要があることが議論された。こうした誤差をできる限り少なくするため、フィブリン塊を生理食塩水で洗いという操作に留意を払うことが求められている。しかし厳密な操作をしたとしてもJacobssonはその補正は必要であり、巻き込みによる増加分を平均1.9%とした。つまりフィブリン塊を溶解した尿素液に、フィブリン以外のタンパクが含まれるのをこれだけ量見積もったものである。こうした補正をあわせて結果的に吸光度からg%濃度に換算する「係数」は、0.47とされた。

フィブリノゲンの濃度を求めるに際し、析出したフィブリン塊を溶媒に溶解してその吸光度を測定し、タンパク量に換算しようとする試みはいくつか見られる。Jacobssonの報告を標準的な光路長10mmの光学セルを用いたときの1%濃度に対する吸光度、E^{1%}で換算すれば、15.96と計算される。これに対してJacobssonの報告を精密に追試したBlombackらのE^{1%}は、16.17である¹¹⁾。ウシフィブリノゲンを用いてさらに詳細を検討したMihalyiの報告では、E^{1%}=15.06とされている¹²⁾。Mihalyiはフィブリノゲン精製法によっても異なることを指摘した上で、その2種類のフィブリン塊を測定しており、これは平均

値である。さらに、ヒトフィブリノゲンでの報告は Dellenback らが行っており、それによれば $E^{1\%} = 15.5$ とされている。ただしこの報告では用いられた溶媒とその pH が Jacobsson のものとは異なっている。フィブリン塊を溶解した試料の吸収は、とくに pH に依存する。pH の変化による等吸収点 (isosbestic point) は、273.5nm と 278.0nm にあり、280nm では pH が高くなれば、やや吸光度が高くなる傾向が見られる。pH の変化によってもっとも影響を受けるのは 290nm 近辺である。Jacobsson の報告は 279nm で行われている点で、isosbestic point により近い点で測定しているといえる。

いずれにしろ、報告者によりフィブリノゲンの $E^{1\%}$ 値はやや異なるが、現時点ではそれらが大きくかけ離れた値ではないことを認識した上で、280nm で吸光度を測定して「係数」の 0.47 をかけることが、すでに WHO によって採択された「絶対値」であることを受け入れざるを得ないだろう。ここではこの数値の正確さと精密さをこれ以上議論するのではなく、今後この基準測定法を国際的に見直す際に、この「係数」の取り扱いを議論するのが正しい措置であると考ええる。

なお、これまでは、g/dL を表示値としていたが、国際的な表記にあわせて分母をリットル (L) にするため、係数を 10 倍し 4.70 とする。

【試料】

本定量法は、第一次標準物質もしくはそれから単位を伝達された第二次標準物質に適応するものであるので、とくに抗プラスミン剤の添加が配慮されていない。これらの試料以外に適応を考える場合には、線溶系から受ける干渉について留意する必要がある。

試料が含む抗凝固剤としてのクエン酸ナトリウムについて、臨床検体ではクエン酸三ナトリウム二水和物 (trisodium citrate dihydrate : 分子量 294.1) の 3.2% 溶液、もしくは 3.8% 溶液を全血に対して 1 : 9 に添加するように標準化されている。この方法でされた分離された血漿では、クエン酸ナトリウムが 10.9mmol/L、12.9mmol/L の終濃度で含まれていることになる。標準物質によって作製した検量線を実際の臨床検体に適応する時に考えられる実際的なこととして、血球成分を除いた血漿に対して溶液でクエン酸ナトリウムが添加されるため、その希釈率がヘマトクリットによって異なることが議論になるかもしれない。NCCLS 勧告¹⁹⁾では、ヘマトクリット値に

よってクエン酸ナトリウム溶液の添加量を変更するよう注意書きを与えているが、ここではこれを規定しない。これは、血球内成分の血漿への遊出問題も絡み現時点では取り扱いが複雑すぎるからである。本委員会から引き続いて出される予定の「フィブリノゲン標準物質の作製に関する勧告」において、おそらく議論されるだろう。

【試薬】

トロンビンについては、「フィブリノゲン定量のための日常的標準測定法(案)」の記載を参照する。

その他の試薬は特級のものを使用すること。

【測定操作】

測定操作は、すべて NIBSC の測定担当者と綿密にすりあわせを行い、第 1 回および第 2 回の WHO 標準品作製に当たり実施された本法が再現されるように日本語へ翻訳した。したがって、これを改変する場合には NIBSC のフィブリノゲン測定に関して責任ある担当者と相談の上、行われたい。

詳細について、NIBSC のグループと次のような了解がある。

手順 1. 対象とする標準品を室温で指示通りに溶解する。

<注意> 特になし

手順 2. 完全に溶解後、混和した標準品を 1mL 正確に秤取し、アクリル製のシャーレーに移す。

<注意> 1mL に溶解する標準品が多い。この場合には、まず、指示に従って 1mL の精製水もしくは指定の溶解液を用いて、標準品を確実に溶解後、すべての内容をシャーレーにあげるとともに、標準品の容器に操作 3. で添加する使用緩衝液の一部を加え標準の残滓を共洗いし、その内容をシャーレーに合すのがよい。

手順 3. 2mL の使用緩衝液をこれに加え混和する。

<注意> 特になし

手順 4. トロンビン溶液 50 μ L を加え、清浄なガラス棒ですばやくかき混ぜる。

<注意> 特になし

手順 5. シャーレーにフタをして室温で 2 時間静置する。シャーレーはやや傾斜をつけておくとよい。

<注意> 従前のチロジン法では 37 $^{\circ}$ C で 1 時間加熱する方法が推奨されていたが¹⁴⁾、作業を標準化するため、原法通り室温で 2 時間とする。

手順 6. ペーパータオルを重ねた上に濾紙をおき、この上に凝集したフィブリン塊をガラス棒で移す。

<注意> 原法では特にガラス棒は用いず、シャーレーを濾紙を引いた布の上に逆さまにして内容をあけ、布を持ち上げてフィブリン塊を分離するように指示しているが、NIBSCの測定担当者とのすりあわせで、チロジン法で行われていたように、ガラス棒もしくはプラスチックのスティックにフィブリン塊をからめ取って取り出す方法を採用した。すなわち机上に数枚のペーパータオルを引き、この上に濾紙をおいてそれにフィブリン塊を移してのせる。ガラス棒は先を匙のように加工しておくが良い。

手順7. ガラス棒でフィブリン塊をゆっくり転がすようにしてそれについた水分を濾紙に吸い取る。さらに新しい濾紙でフィブリン塊をはさんで水分を除去する。

<注意1> この作業は極めてデリケートである。できる限る大きな円を描くようにフィブリン塊を濾紙の上で転がし、余分な水分を濾紙上に吸い取るようする。

<注意2> 末尾補遺参照

手順8. 清浄な50mLビーカーにフィブリン塊を移す。

<注意> 必ず清浄な50mLビーカーを3個準備し、手順8と同様続く手順11と12も毎回新しいビーカーを利用すること。

手順9. 生理食塩水を50mL加え、30分間静置する。

<注意> 小さなフィブリン片が失われるのでガラス棒などで攪拌しないこと。手でもって攪拌することもしない。生理食塩水を50mL入れたビーカーに入れて放置するだけとする。

手順10. 再び新しいペーパータオルを重ねた上に濾紙をおき、この上に凝集したフィブリン塊をガラス棒で移して、フィブリン塊をゆっくり転がすようにして、それについた水分を濾紙に吸い取る。

手順11. 新しいビーカーを用いて、操作9と10をもう一度繰り返す。

<注意> ガラス棒などで攪拌しないこと。手でもって攪拌することもしない。生理食塩水を50mL入れたビーカーに入れて放置するだけとする。

手順12. さらにもう一度、操作9と10を繰り返す。最後に新しい濾紙でフィブリン塊をはさんで水分を除去する。

<注意> ガラス棒などで攪拌しないこと。手でもって攪拌することもしない。生理食塩水を50mL入れたビーカーに入れて放置するだけとする。また、

最後に余分な水分を拭うために新しい濾紙でフィブリン塊の表面に触れるようにする。濾紙を折り畳んで水分を絞るのは厳禁。

手順13. 清浄な大試験管にフィブリン塊を移し入れる。

<注意> 特になし

手順14. フィブリン凝集塊溶解液7.5mLを加え、室温に4時間放置する。混和して、肉眼的に清澄であることを確認する。

<注意> 溶解は室温に4時間放置するだけとし、チロジン法によって採用されたように、湯浴中で加温しない。4時間の放置で完全に溶解する。これを攪拌し均質にすればよい。

手順15. 溶液の一部をとり、280nmと315nmで吸光度を測定する。用いる光学セルは石英製で光路長10mmのもの。対象にはフィブリン凝集塊溶解液を使用する。もし吸光度が1.00を越える場合には、フィブリン凝集塊溶解液で適宜に希釈する。280nmにおける吸光度が0.2~0.8にあるのが理想的である。

手順16. 315nmの吸光度が280nmの吸光度の10%未満であることを確認する。これを上回る場合には、白濁があり妨害をしていることを疑う。

<注意> 標準物質の製造に当たってリポタンパク等の処置が適宜に配慮されていない場合、強度の濁りを生じることがある。このような標準物質はそれ自体好ましくない。

手順17. 280nmの吸光度から315nmの吸光度を差し引き、フィブリノゲン濃度とする。

フィブリノゲン濃度(g/L)=

$$(280\text{nmの吸光度}-315\text{nmの吸光度})\times 4.70$$

<注意> 手順16にある基準を満足する場合には、これを光散乱による干渉と考え、315nmの吸光度で補正してフィブリノゲン濃度とすることをNIBSCと合意している。満足しない標準品は保存中において変成があったことを考える。

【注 意】

本法の適応範囲は、あくまでもフィブリノゲン測定用の標準物質を対象とするものである。しかし、もし精製されていないプール血漿などに本法を応用する場合には、改良されたチロジン法で考慮されたように、抗プラスミン剤の添加を行い線溶系の反応を阻止する必要がある¹³⁾。このためには、上記手順3に続いて、5%AMCHA 1.0mLを加え、混和後手順

4 にすすんでトロンビン試薬を添加する¹⁶⁾。
(AMCHA : tranexamic acid ; *trans*-4-(aminomethyl)
cyclohexanecarboxylic acid)

【謝 辞】

本案を作成するにあたり次の方々のご指導とご協力を得た。ここに深謝いたします。

NIBSC(National Institute for Biological Standards and Control)のDr. Anthony R Hubbard, Dr. Trevor Barrowcliffe, University of Vermont・Department of PathologyのDr. Edwin G Bovill, St. Vincentus Hospitals・Institut for Laboratory DiagnosticのDr. Nicodemo Weinstock, TUV Rheinland Product Safety GmbHのDr. Francesco Dati, NCCLSのMr. David P. Kelly, 産業医科大学病院中央検査部, 今里浩子, 土橋正子, 福岡大学筑紫病院中央検査部, 篠原克幸, 九州大学医学部附属病院検査部, 和田結, 大阪市立大学医学部附属病院検査部, 久保田浩, 横須賀共済病院中央検査科, 国分まさ子, 聖マリアンナ医科大学付属病院臨床検査部, 安室洋子, 神奈川県立衛生短期大学血液学, 桜井典子, 帝京大学医学部付属病院血液検査室, 島津千里, 福田晃子, 山梨医科大学付属病院中央検査部, 雨宮憲彦, 順天堂大学付属病院中央検査部血液検査室, 大竹順子, 微研東北中央研究所検査部, 前場恵一子, 福祉・医療技術振興会, 鈴木節子, 杏林大学保健学部臨床検査技術学科臨床血液学教室, 中竹俊彦, 京都府立医科大学附属病院臨床検査部, 岡本茂高, 由木洋一, 日東紡企画開発学術グループ/メディカル事業部, 田仁健二, 榎本 毅, 国際試薬研究開発本部研究部, 奥田昌宏, 花村卓司, 上村八尋(順不同, 敬称略)

文 献

- 1) Clauss vA : Gerinnungsphysiologische Schnellmethode zur Bestimmung des Fibrinogens. Acta Haemat 17 : 237~246, 1957
- 2) Koepke JA, Gilmer Jr PR, Filip DJ, Eckstein JD, Sibley CA : Studies of fibrinogen measurement in the CAP survey program. Am J Clin Pathol 63 : 984~989, 1975
- 3) Parfentjev IA, Johnson ML, Cliffon EE : The determination of plasma fibrinogen by turbidity with ammonium sulfate. Arch Biochem Biophys 46 : 470~480, 1953
- 4) Thorp JM, Horsfall GB, Stone MC : A new red-sensitive micronephelometer. Med Biol Eng 5 : 51~56, 1967

- 5) Koepke JA : Standardization of fibrinogen assays. Scand J Haematol Suppl 37 : 130~138, 1980
- 6) Furlan M, Felix R, Escher N, Lammle B : How high is the true fibrinogen content of fibrinogen standards? Thromb Res 56 : 583~592, 1989
- 7) Gaffney PJ, Wong MY : Collaboration study of a proposed International standard for plasma fibrinogen measurement. Thromb Haemost 68 : 428~432, 1992
- 8) Jacobsson K : Studies on the determination of fibrinogen in human blood plasma. Scand J Clin Lab Invest 7 suppl 14 : 1~54, 1955
- 9) Cullen GE, Van Slyke DD : Determination of the fibrin, globulin and albumin nitrogen of blood plasma. J Biol Chem 42 : 587~597, 1920
- 10) Brand E, Kassel B, Saidel LJ : Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. III. Amino acid composition of plasma proteins. J Clin Invest 23 : 437~444, 1944
- 11) Blomback B, Blomback M : Purification of human and bovine fibrinogen. Arkiv Kemi 10 : 415~443, 1956/1957
- 12) Mihalyi E : Physicochemical studies of bovine fibrinogen. IV. Ultraviolet absorption and its relation to the structure of the molecule. Biochemistry 7 : 208~223, 1968
- 13) NCCLS Document H21-A3 : Collection, transport, and processing of blood specimens for coagulation testing and general performance of coagulation assays ; Approved Guideline 3rd Ed. Pennsylvania, USA 1998
- 14) 松岡松三, 佐竹清人, 深沢英 : Tyrosine法による血漿フィブリノーゲンの定量法. 臨床検査 2 : 61~63, 1958
- 15) Astrup T, Brankman P, Nissen U : The estimation of fibrinogen. Scand J Clin Lab Invest 17 : 57~65, 1965
- 16) 藤巻道男 : 第I因子(フィブリノーゲン). 臨床検査技術全書第3巻 血液検査 : 三輪史朗編, 東京 : 医学書院, 1982. p497~498

補 遺

平成13年8月15日の再確認時におけるコメントとそれに対する処置

本測定操作の実施を, 協力施設によって二度にわたり行っていただいた結果, 正確性を確保する上で最も難しい作業は, フィブリン塊の洗浄とその水分除去である事が少なからず指摘された。

また, 実施者の内から, より操作しやすい方法とし

て、遠心しその上清を除去する方法が提案された。これに対して、NIBSCのグループとの協議を行ったところ、本操作書に示された方法で実際の値付けが行われたこと、並びに彼らの検討の結果、最も有効な方法がこの方法であったことを理由に、この改変を受け入れ

ないとされた。意見の提案の際に、繰り返し実験して遠心による洗浄液除去を行う方法でもデータに差がないことが示されれば議論の余地はあるかもしれない。しかしながら現在そのデータがなく、今後の課題とすべきであろう。