



## 高感度迅速トロンビン産生試験 SMAT - TF キット

### 組織因子凝固経路によって形成するプロトロンビナーゼ複合体検査キット

本製品は研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助の目的で使用することはできません

#### 【SMAT 検査の用途と特長】

トロンビンは、活性型の血液凝固第 X 因子と第 V 因子からなるプロトロンビナーゼ複合体がプロトロンビンを活性化することで産生します。当社が開発した SMAT\* (Smart Analysis of Thrombin Production) は血漿中で形成するプロトロンビナーゼ複合体の活性を検査するためのトロンビン産生試験です。従来の試験とは異なり、極低濃度のトロンビンを検出できる高い感度と特異性を有しており、これまで困難であった血液凝固開始初期に形成する微量のプロトロンビナーゼ複合体の活性が測定できます。また測定が 10 分以内に完了する事から検査結果が短時間で得られます。\*商標出願中。

#### 【SMAT - TF 検査】

SMAT - TF 検査は、組織因子 (tissue factor、TF) 凝固経路を介して形成するプロトロンビナーゼ複合体を検査するためのトロンビン産生試験です。カルシウムイオン存在下で TF を含む開始因子試薬を血漿と反応させてトロンビンを産生させ、産生したトロンビンの活性を測定することでプロトロンビナーゼ複合体の形成能を検査します。

#### 【SMAT - TF 検査キットによって提供される試薬溶液】

キットは 6 種類の凍結した試薬溶液で構成され、識別のため異なる色のマイクロチューブに入っています。1 キットは 20 検体測定用です。

- (1) 白色キャップ: 1 本 × 0.04mL TF Initiator (TF 開始因子試薬) ; プロトロンビナーゼ複合体の形成開始試薬
- (2) 黄色キャップ: 1 本 × 1mL CaCl<sub>2</sub> Solution (塩化カルシウム溶液)
- (3) 褐色キャップ: 1 本 × 1.4mL Thrombin Substrate / EDTA (トロンビン基質/エチレンジアミン四酢酸溶液) ; 蛍光性のトロンビン基質を含みます
- (4) 赤色キャップ: 1 本 × 0.1mL Human Control Plasma (ヒトコントロール血漿)
- (5) 青色キャップ: 1 本 × 1mL Initiator Dilution Buffer (TF 開始因子希釈緩衝液) ; 牛血清アルブミンと塩化ナトリウムを含むトリス緩衝液
- (6) 緑色キャップ: 1 本 × 0.15 mL Thrombin Calibrator (トロンビン校正溶液) ; 検査の測定管理用

#### 【検査のために必要な機器・器材など】

- (1) 蛍光プレートリーダー: 37°Cの温度制御、励起波長 (350nm 付近) / 蛍光波長 (460nm 付近) におけるカイネティクス測定が可能なプレートリーダー
- (2) エッペンドルフマルチペット: 試薬溶液添加用
- (3) 96 ウェル型マイクロプレート (平底)

#### 【血液と血漿検体の調製】

血液検体は、1 容の 3.2% クエン酸ナトリウム溶液を 9 容の血液に添加して泡立てないように慎重に混合して調製します。

血漿検体は、採血後 1 時間以内に血液検体を 25°Cにおいて遠心分離 (2,000×g で 15 分間) することによって調製します。血漿は速やかに-70°C以下において凍結、保存します。

#### 【用法・操作方法】

##### 1. 検査開始前の準備

###### (1) 検査試薬の調製

- 1) 試薬の融解: キットから 6 種類の凍結した試薬を取り出し、37°Cにおいて 2~5 分間加温して融解します。融解した試薬は常温 (約 25°C) に戻して静置します。塩化カルシウム溶液 (黄色キャップ) とトロンビン基質/エチレンジアミン四酢酸溶液 (褐色キャップ) はそのまま加温を継続します。
- 2) TF 開始因子試薬の希釈と調製: TF 開始因子試薬 (白色キャップ) は、検査直前に 0.28mL の開始因子希釈緩衝液 (青色キャップ) を添加し、十分に混合して希釈します。希釈後は常温静置してください。

###### (2) 血漿検体の準備

凍結保存の血漿検体はウオーターバスインキュベーター内で 37°Cにおいて 2~5 分間加温して融解し、その後常温静置。検査は 4 時間以内に終了してください。

###### (3) ワークフローの作成

検査は次に示す操作方法のワークフロー (プロトコル、手順) に従って行います。プレートリーダーの操作ソフトウェアを用いてワークフローのプログラムを予め作成してください。ワークフローを作成できない場合には、37°Cでの加温操作を恒温器内で行ってください。

###### (4) 蛍光プレートリーダーの起動

プレートリーダーを起動し、ワークフローのプログラムを立ち上げ、プレートリーダー内を 37°Cに加温します。

###### (5) 96 ウェル型マイクロプレートの加温

マイクロプレートを 37°Cで事前に加温してください。

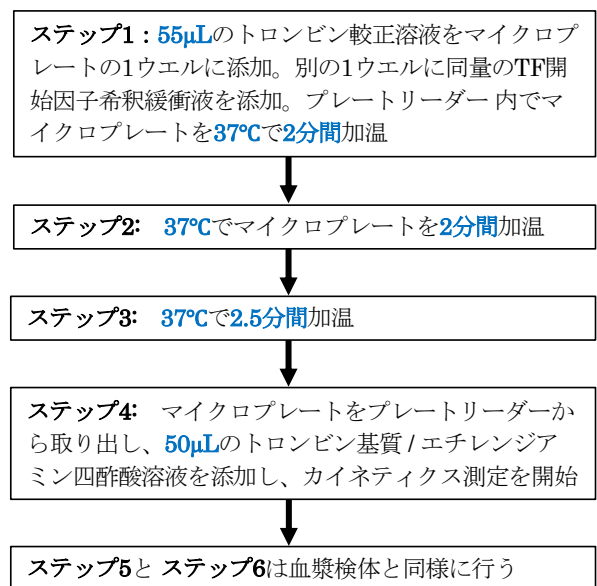
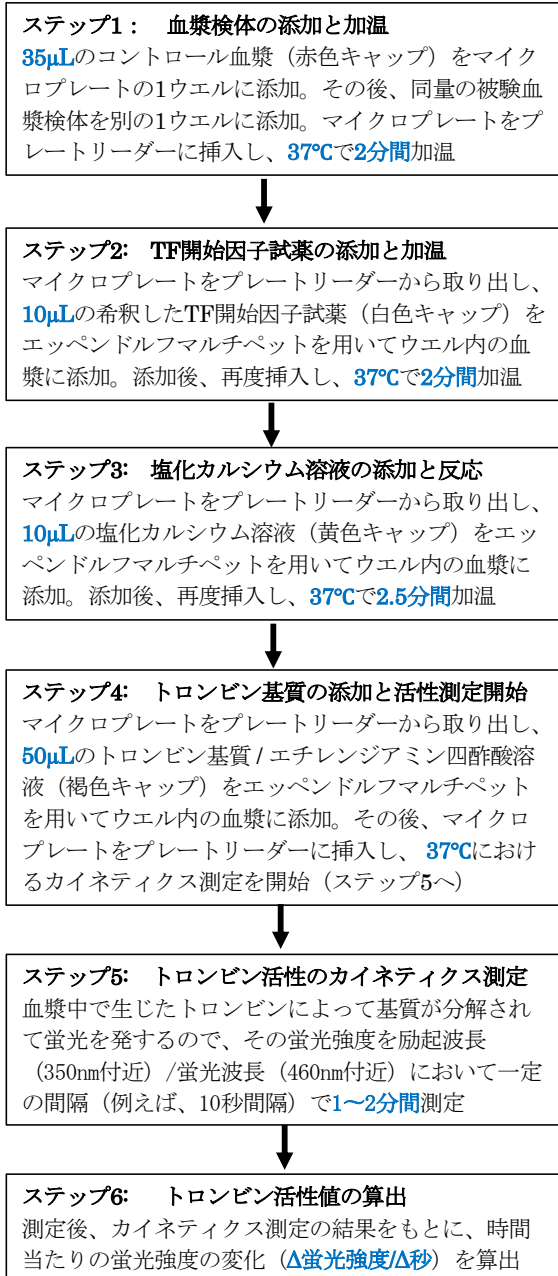
##### 2. 操作法とプロトロンビナーゼ複合体の形成能の算出

- (1) 操作は次のワークフローに従って正確に行ってください。
- (2) プロトロンビナーゼ複合体の形成能は、プロトロンビナーゼ複合体の作用によって生じたトロンビンの活性を測定する事で検査します。実際には、カイネティクス測定で得たトロンビン活性値 (時間当たりの蛍光強度の変化、 $\Delta$  蛍光強度 /  $\Delta$  秒) をコントロール血漿のトロンビン活性値によって除した値に 100 を乗して算出し、結果はコントロール血漿に対する相対値 (%) で表示します。検体はコントロール血漿 (赤色キャップ) と同時に測定してください。

プロトロンビナーゼ複合体の形成能(%) = (血漿検体のトロンビン活性値 ÷ コントロール血漿のトロンビン活性値) × 100



高感度迅速トロンビン産生試験 SMAT - TF キット  
 組織因子凝固経路によって形成するプロトロンビナーゼ複合体検査キット  
 本製品は研究用試薬であり、疾病の診断またはその補助の目的で使用することはできません



【使用上又は取扱い上の注意】

- (1) 血漿検体以外を使用しないでください。コントロール血漿や被験検体は感染性を考慮して取扱いには厳重な注意をしてください。
- (2) キットは個装箱ラベルに表示されている使用期限内のものを使用してください。
- (3) 使用後の試薬容器を廃棄する場合には、廃棄物に関する規定に従って、医療廃棄物又は産業廃棄物等区別して処理してください。

【貯蔵方法】

キットは-60 $^{\circ}$ C以下で凍結保存してください。融解した試薬は2~8 $^{\circ}$ Cで保存し、4日以内にご使用ください。融解したコントロール血漿は4時間以内に使用し、残りは廃棄ください。

【参考文献】

- (1) Selective factor VIII activation by the tissue factor-factor VIIa-factor Xa complex. Blood 130: 1661-1670, 2017
- (2) 内因系テンナーゼ複合体の新たな形成メカニズム: 外因系凝固開始複合体中の活性型第X因子による第VIII因子の選択的活性化. 日本血栓止血学会誌 32巻1号: p42-45, 2021年

【連絡先】

株式会社血栓トランスレーショナルリサーチラボ

【<https://t-trl.com>】

〒860-0812 熊本市中央区南熊本 3-14-3

くまもと大学連携インキュベータ 303号室

電話/ FAX 096-288-1742 E-mail info@t-trl.com



3. トロンビン活性測定の動作確認と測定管理

トロンビン較正溶液 (緑色キャップ) は活性型のトロンビンを含んでいます。血漿検体の検査前に、トロンビン較正溶液を用いて蛍光プレートリーダーによる測定及びワークフローのプログラムが正常に作動するかどうかを確認してください。操作は血漿検体と同様な方法で行いますが、ステップ2とステップ3においては、希釈した開始因子試薬及び塩化カルシウム溶液を添加せずに加温します。