



高感度迅速トロンビン産生試験 SMAT®-APCD

血液凝固活性化及び誘導物質の凝固活性を測定するための非活性化凝固検査

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®-APCD 検査の用途】

SMAT®-APCD (Active Pro-Coagulant Detector) は、血漿中に存在する活性型凝固因子や凝固開始因子等の凝固活性を測定するための非活性化凝固検査です。また本検査は、陰性コントロール血漿（凝固活性化及び誘導物質を含まない）と組み合わせる事によって、細胞培養液や体液などに含まれる凝固活性を有する物質の探索研究にも使用できます。

【SMAT®-APCD 検査の原理】

SMAT®-APCD は血漿中で凝固活性化あるいは誘導物質の作用によって生じるトロンビン量を指標にして、それらの物質の凝固活性を測定します。実際の検査において、キット中の反応開始試薬（リン脂質を含む）を被験血漿に添加し、カルシウム存在下で反応させた後、産生したトロンビンの活性を、トロンビン蛍光基質を用いて定量します。トロンビン濃度は、Thrombin Calibrator を用いて作成した検量線をもとに決定します。

【SMAT®-APCD 検査キットによって提供される試薬】

キットは2種類の凍結乾燥試薬と5種類の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 凍結乾燥 Initiator (開始試薬)
- (2) 黄色キャップ: 1本×1mL CaCl₂ 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 凍結乾燥 Human Control Plasma (ヒトコントロール血漿)
- (5) 青色キャップ: 2本×1mL Initiator Dilution Buffer (溶解用緩衝液) ; 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×0.15mL Thrombin Calibrator (トロンビンキャリブレーター、4,000 pM トロンビン) : トロンビン検量線作成用

【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ってい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(2,500×gで10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) 反応開始試薬の溶解: 反応開始試薬(白色キャップ)は、検査直前に0.32mLの溶解用緩衝液(青色キャップ)を添加し十分に混合して溶解します。溶解後は常温(約25°C)静置してください。
- 2) ヒトコントロール血漿の溶解: ヒトコントロール血漿(赤色キャップ)は検査直前に0.12mLの蒸留水(キットには含まれていません)を添加し、常温で15分間静置して溶解します。溶解後も常温静置し、検査は2時間以内に終了してください。
- 3) その他の検査試薬溶液: キットから5種類の試薬溶液を取り出し、常温(約25°C)に戻して静置します。なお、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)は検査の間、37°Cにおいて加温してください。

(2) 血漿検体の準備

凍結保存の血漿検体はウォ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2時間以内に終了してください。

(3) 血漿以外の検体を検査する場合

まず、凝固活性化及び誘導物質を含まない陰性コントロール血漿をご準備ください。血漿に適量の検体を加え、本検査を実施します。

(4) マイクロプレート及び蛍光プレートリーダーの加温

マイクロプレート及びプレートリーダー内を事前に37°Cにおいて加温してください。

2. 本検査の操作方法

(1) トロンビン検量線の作成

1) Thrombin Calibrator の調製

4,000 pMのThrombin Calibrator(緑色キャップ)と溶解用緩衝液(青色キャップ)を用いて検量線を作成します。なお、低濃度のトロンビン産生を試験する場合には、5 µLのThrombin Calibrator(4,000 pM)を495 µL溶解用緩衝液と混合して40 pMのThrombin Calibratorを調製してください。

2) 操作方法

次のワークフローに従って実施します。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、Δ蛍光強度/Δ秒)を求め、得られた活性値とトロンビン濃度(40 pMあるいは4,000 pM)をプロットした検量線を作成します。



高感度迅速トロンビン産生試験 SMAT®-APCD

血液凝固活性化及び誘導物質の凝固活性を測定するための非活性化凝固検査

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

① ステップ 1: Thrombin calibrator の加温
55 μ L の Thrombin calibrator (40 pM あるいは 4,000 pM) をマイクロプレートの 1 ウェルに添加、また同量の希釈緩衝液 (青色キャップ) を別の 1 ウェルに添加し、37°C にてマイクロプレートを 5 分間加温します。

② ステップ 2: トロンビン基質の添加
加温後、50 μ L のトロンビン基質/エチレンジアミン四酢酸溶液 (褐色チューブ) を、エッペンドルフマルチペットを用いて速やかにウェルに添加。その後、マイクロプレートをプレートリーダーに挿入します。

③ ステップ 3: トロンビン活性のカイネティクス測定
ウェル内のトロンビンによって基質が分解されて蛍光を発するので、37°C で蛍光強度を励起波長 (350nm 付近) / 蛍光波長 (460nm 付近) において一定の間隔 (例えば、10 秒間隔) で一定時間 (40 pM Thrombin calibrator: 3 分間; 4,000 pM Thrombin calibrator: 約 1 分間) 測定します。

④ ステップ 4: トロンビン活性値の算出
測定終了後、カイネティクス測定によって得られた時間当たりの蛍光値の変化 (スロープ: Δ 蛍光強度/ Δ 秒) を算出します。

(2) 被験血漿のトロンビン産生とトロンビン活性測定
操作は下記のワークフローに従って実施してください。

① ステップ 1: 血漿検体の添加と加温
35 μ L のコントロール血漿 (赤色キャップ) をマイクロプレートの 1 ウェルに、また同量の被験血漿検体を別の 1 ウェルに添加。その後、マイクロプレートを 37°C で 2 分間加温します。

② ステップ 2: 反応開始試薬の添加と加温
加温後、10 μ L の反応開始試薬溶液 (白色キャップ) を、エッペンドルフマルチペットを用いてウェル内の血漿に添加。添加後、37°C で 2 分間加温します。

③ ステップ 3: 塩化カルシウム溶液の添加とトロンビン産生反応
加温後、10 μ L の塩化カルシウム溶液 (黄色キャップ) を、エッペンドルフマルチペットを用いてウェル内の血漿に添加。添加後、37°C で 2.5 分間インキュベーションします。

④ ステップ 4: トロンビン基質の添加
インキュベーション後、50 μ L のトロンビン基質/エチレンジアミン四酢酸溶液 (褐色キャップ) を、エッペンドルフマルチペットを用いてウェル内の血漿に添加。速やかに、マイクロプレートをプレートリーダーに挿入し、37°C におけるカイネティクス測定を開始します。

⑤ ステップ 5: トロンビン活性のカイネティクス測定
血漿中で生じたトロンビンによって基質が分解されて蛍光を発するので、その蛍光強度を励起波長 (350nm 付近) / 蛍

光波長 (460nm 付近) において一定の間隔 (例えば、10 秒間隔) で 3 分間測定します。

⑥ ステップ 6: トロンビン活性値の算出
測定後、カイネティクス測定の結果をもとに、時間当たりの蛍光強度の変化 (Δ 蛍光強度/ Δ 秒) を算出します。

3. 被験血漿中で産生したトロンビンの濃度の算出方法

被験血漿中で産生したトロンビンの濃度は、算出されたトロンビン活性値 (Δ 蛍光強度/ Δ 秒) を、Thrombin Calibrator のトロンビン活性値 (Δ 蛍光強度/ Δ 秒) をプロットした検量線をもとに、トロンビン濃度に変換する事によって決定します。凝固活性化あるいは誘導物質の活性は、トロンビン濃度 (例えば、pM) で表示します。さらに、被験血漿中のトロンビン産生濃度を、コントロール血漿のトロンビン産生濃度によって除した値に 100 を乗して算出し、コントロール血漿に対する相対値 (%) で表示することも可能です。

【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に区別して処理してください。

【貯蔵方法】

キットは 4~8°C で保存してください。溶解後の開始因子試薬は 4~8°C で保存し 3 日以内にご使用ください。溶解したコントロール血漿は 2 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) 新規の包括的血液凝固機能検査: 凝固初期のトロンビン産生を解析する高感度トロンビン産生試験について. 臨床化学 53(1): 17-24, 2024

【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

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

