



## 高感度迅速トロンビン産生試験 SMAT® - FVIII/FIX キット

## 内因系テンナーゼ複合体を介し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。

## 【SMAT® - FVIII/FIX 検査】

SMAT® - FVIII/FIX は第 VIIIa 因子と第 IXa 因子から成る内因系テンナーゼ複合体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キットです。内因系テンナーゼ複合体は低濃度の組織因子 (TF) と第 XIa 因子を含む反応開始試薬を血漿と反応させて形成させ、最終的に産生したトロンビンの活性を測定することでトロンビン産生能を検査します。

## 【SMAT® - FVIII/FIX 検査キットに含まれる試薬】

キットは 2 種類の凍結乾燥試薬と 4 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 FVIII/FIX Initiator (FVIII/FIX 反応開始試薬)
- (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-4Na (トロンビン基質/エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム溶液) ; 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: 1 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 × 0.15 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) FVIII/FIX 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 4 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四ナトリウム溶液 (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 **2 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的ワークフロー (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. 操作法とトロンビン産生能の算出

- (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) トロンビン産生能は、プロトロンビナーゼ複合体の作用によって生じる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、Δ 蛍光強度 / Δ 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。



高感度迅速トロンビン産生試験 SMAT® - FVIII/FIX キット  
内因系テンナーゼ複合体を介し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

**ステップ 1: 血漿検体の添加と加温**

**35μL** 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 ウェルに添加。その後、同量の被験血漿検体を別の 1 ウェルに添加。マイクロプレートをプレートリーダーに挿入し、**37℃** で **2 分間** 加温

**ステップ 2: FVIII/FIX 反応開始試薬の添加と加温**

マイクロプレートをプレートリーダーから取り出し、**10μL** の FVIII/FIX 反応開始試薬（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、再度挿入し、**37℃** で **2 分間** 加温

**ステップ 3: 塩化カルシウム溶液の添加と反応**

マイクロプレートをプレートリーダーから取り出し、**10μL** 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、再度挿入し、**37℃** で **2.5 分間** 加温

**ステップ 4: トロンビン基質の添加と活性測定開始**

マイクロプレートをプレートリーダーから取り出し、**50μL** のトロンビン基質 / エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム溶液（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。その後、マイクロプレートをプレートリーダーに挿入し、**37℃** におけるカイネティクス測定を開始

**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 **1~2 分間** 測定

**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（ $\Delta$  蛍光強度 /  $\Delta$  秒）を算出

トロンビン産生能(%) = (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

**3. トロンビン活性測定の動作確認と測定管理**

活性型のトロンビンを含むトロンビン較正溶液（緑色キャップ）を用いて蛍光プレートリーダーが正常に作動するかどうかを確認してください。トロンビン較正溶液を 37℃ にて 5 分間加温した後、トロンビン基質溶液を加え、トロンビン活性をカイネティクス測定します。

**ステップ 1: 55μL** のトロンビン較正溶液をマイクロプレートの 1 ウェルに添加。別の 1 ウェルに同量の溶解用緩衝液（青色キャップ）を添加。プレートリーダー内でマイクロプレートを **37℃** で **5 分間** 加温

**ステップ 2:** マイクロプレートをプレートリーダーから取り出し、**50μL** のトロンビン基質 / エチレンジアミン四酢酸四ナトリウム溶液を添加し、カイネティクス測定を開始

**ステップ 3: トロンビン活性のカイネティクス測定**

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）において一定間隔（例えば 10 秒間隔）で **1~2 分間** 測定

**ステップ 4: 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（ $\Delta$  蛍光強度 /  $\Delta$  秒）を算出

**【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 2~8℃ で保存してください。溶解後の開始因子試薬は 2~8℃ 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) 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](mailto:info@t-trl.com)

