



高感度迅速トロンビン産生試験 SMAT®-TFPI

血漿中の組織因子経路インヒター (TFPI) の抗凝固活性の検査

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®-TFPI 検査の用途】

SMAT®-TFPI は、血漿中の組織因子経路インヒター (tissue factor pathway inhibitor: TFPI) の抗凝固活性を試験するための凝固検査です。本検査は、特異的に TFPI 活性を測定できることから、各種の血栓症及び出血症の患者において、血漿 TFPI の抗凝固活性の動態を解析するツールとして有用です。

【SMAT®-TFPI 検査の原理】

SMAT®-TFPI は、TF 凝固経路を介した凝固初期のトロンビン産生に対する TFPI の阻害作用を基にしたトロンビン産生能試験です。実際の検査においては、先ず TFPI 活性を測定するための被験血漿及び同じ被験血漿に抗 TFPI 中和抗体を添加して TFPI 活性を消失させた血漿の 2 種類を準備します。次に、それぞれの血漿を反応開始試薬と反応させることによってトロンビンを産生させます。最終的に産生したトロンビンは、トロンビン蛍光基質を用いて定量します。TFPI の抗凝固活性は、2 種類の血漿のトロンビン産生能 (% vs コントロール血漿) の相対比によって表示します (arbitrary units)。

【SMAT®-TFPI 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 (反応開始試薬)
- (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: 2 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 × 0.15mL Thrombin Calibrator (トロンビン校正溶液) ; 検査の測定管理用
- (7) 無色キャップ: 1 本 × 0.045mL 抗 TFPI 中和抗体溶液 ; 血漿に添加し、TFPI 抗凝固活性を中和、消失させます

【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 (2,500×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 0.64mL 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 0.15mL 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。

TFPI 活性中和血漿の調製: 38μL のコントロールあるいは被験血漿に 2μL の抗 TFPI 中和抗体溶液 (無色キャップ) を添加し、常温 (約 25°C) で 15 分間反応させてください。

(3) 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. 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。

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



高感度迅速トロンビン産生試験 SMAT®-TFPI

血漿中の組織因子経路インヒター (TFPI) の抗凝固活性の検査

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

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°C で 2 分間加温

ステップ 2: 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、10 μ L の反応開始試薬 (白色キャップ) をエッペンドルフマルチベ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°C 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、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ベ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°C 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、50 μ L 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ベ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°C 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 (Δ 蛍光強度/ Δ 秒) を算出

(注記) 抗 TFPI 中和抗体を含むコントロール及び被験血漿についても、上記の方法によってトロンビン活性値を求め、被験血漿のトロンビン産性能 (%) を算出してください。

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。操作は以下の方法で行います。

ステップ 1: 55 μ L 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°C 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、50 μ L 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) において一定間隔で 1~2 分間測定

ステップ 4: 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

4. TFPI 抗凝固活性の算出方法

血漿中の TFPI の抗凝固活性は、抗 TFPI 中和抗体を含む被験血漿 (所謂、TFPI 欠乏血漿に相当) のトロンビン産性能 (%) を、抗 TFPI 中和抗体を含まない被験血漿のトロンビン産性能 (%) によって除して算出します: **TFPI 抗凝固活性 (arbitrary units) = TFPI 活性中和血漿のトロンビン産性能 (%) $\div$ 中和抗体を含まない血漿のトロンビン産性能 (%)**。

【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 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) Kamikubo Y. *et al.*: Thromb Haemost. 2025 Mar 31. doi: 10.1055/a-2552-2050

【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

