

新規 D-dimer 試薬 LPIA ジェネシス D ダイマーの基礎性能評価および試薬特性

下仮屋雄二¹⁾ 渡邊 真希¹⁾ 坂口 茜¹⁾ 西川 美有¹⁾
秋月 基伸²⁾ 桜井 錠治²⁾ 森本 誠¹⁾ 中谷 中¹⁾

1) 三重大学医学部附属病院中央検査部 (〒 514-8507 三重県津市江戸橋 2-174)

2) 株式会社 LSI メディエンス

要 旨

我々は、これまでの試薬とは異なる抗原エピトープを認識する新規 D-dimer 試薬である LPIA ジェネシス D ダイマー (LPIA-GENESIS D-dimer; LG-DD) の基本性能と試薬特性を検討したので報告する。連続 10 回測定した同時再現性は CV 値が 0.21~2.67%, 10 日間測定した日差再現性は 1.86~2.80%であった。希釈直線性は 56.3 μg/mL までの直線性が確認できた。最小検出感度は 0.34 μg/mL であった。エルピアエース D-D ダイマー II (LPIA-ACE-D-DimerII; ACE-DD) との相関性は $y = 0.964x + 0.092$, $r = 0.952$ であった。フィブリノゲンを線溶させて経時的に測定した結果、LG-DD は経過時間に伴う測定値の上昇は認めなかった。フィブリンを線溶させて経時的に測定した結果、経過時間に伴う測定値の上昇を認め ACE-DD より高値で推移した。凝固第 XIII 因子欠乏血漿を凝固させた後に線溶させた結果、経過時間に伴う測定値の上昇を認めるが ACE-DD より低値であった。採血管内で凝固した検体では測定値に影響を受けにくいことが示唆された。本検討結果から LG-DD は高性能であり、採血管内凝固の影響を受けにくく生体内で産生された D-dimer に特異性が高い特徴を有していることが考えられた。

キーワード

D-dimer, 架橋化フィブリン分解産物 (XDP), 深部静脈血栓症 (DVT), 肺塞栓症 (PE), 採血管内凝固

I はじめに

深部静脈血栓症 (deep vein thrombosis; DVT) および肺塞栓症 (pulmonary embolism; PE) の病態である静脈血栓塞栓症 (venous thromboembolism; VTE) のスクリーニングに D-dimer が用いられている^{1)~7)}。D-dimer は、血液が凝固し線溶が充進あるいは制御不能となった病態で高値となるが、フィブリノゲンの分解産物も測りこむフィブリノゲン・フィブリン分解産物 (fibrin/fibrinogen degradation products; FDP) とは異なり、安定化フィブリンが分解されて生じるフィブリン分解産物のみを反映することから、生体内での血栓形成の証拠となる。D-dimer の測定には様々な測定キットが販売されているが、認識する抗

原エピトープが異なることや D-dimer 分子の大きさによって異なる反応性を示すことが問題となっている^{8),9)}。今回我々は、これまでの試薬とは異なる抗原エピトープを認識する新規 D-dimer 試薬である LPIA ジェネシス D ダイマーを検討する機会を得たのでその結果を報告する。

II 対 象

当院中央検査部に提出された患者検体 96 例および健常人ボランティア 2 名を対象とした。検体は 3.2%クエン酸ナトリウム加血を 2,300 g × 10 分遠心分離して得られた血漿を用いた。なお、本研究は、三重大学臨床研究倫理審査委員会の承認を得て実施した (承認番号 2762 および 2839)。

(2018 年 4 月 27 日受付・2018 年 9 月 3 日受理)

III 方 法

1. 試薬

1) D-dimer 測定試薬—LPIA ジェネシス D ダイマー (LPIA-GENESIS D-dimer; LG-DD; LSI メディエンス)

2) D-dimer 測定試薬—エルピアエース D-D ダイマー II (LPIA-ACE-D-Dimer II; ACE-DD; LSI メディエンス)

3) FDP 試薬—エルピア FDP-P (LSI メディエンス)

2. 測定装置

LG-DD, ACE-DD および FDP は、全自動臨床検査システム STACIA (LSI メディエンス) で測定した。

3. 再現性

イアトロセーラ TH レベル I・II (LSI メディエンス) の 2 濃度とプール血漿 1 濃度を連続 10 回測定して同時再現性を評価した。また、試薬をオンボードでイアトロセーラ TH レベル I・II の 2 濃度を 10 日間測定し日差再現性を評価した。

4. 共存物質の影響

プール血漿に干渉チェック A および RF (シスメックス) を添加して共存物質の影響を検討した。

5. 希釈直線性

FDP・DD 用プロゾーン試料 (LSI メディエンス) を共通希釈液 II ステイシア用 (LSI メディエンス) で段階希釈して希釈直線性を検討した。

6. 最小検出感度

LPIA ジェネシス D ダイマーキャリブレーター (LSI メディエンス) を共通希釈液 II ステイシア用で段階希釈した試料に対してそれぞれ 5 回測定し 3SD 法で最小検出感度を求めた。

7. 相関性

患者検体 96 例を対象に LG-DD に対して ACE-DD との相関性を評価した。

8. フィブリノゲン溶解試験

健常人ボランティア 1 名の血漿 5 mL にウロキナーゼ (SIGMA) を最終濃度 200 IU/mL になるように添加してフィブリノゲンを溶解し、直後、30 分後、60 分後、120 分後、180 分後にそれぞれ 1 mL 分注した試料にトラネキサム酸 (Wako) を最終濃度 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になる様に添加して溶解を停止させて D-dimer および FDP を測定した。

9. フィブリン溶解試験

健常人ボランティア 1 名の血漿 5 mL に 1 M CaCl_2 を 62.5 μL , トロンビン試薬 (トロンボチェック Fib (L); シスメックス) 50 μL 添加してフィブリンを形成し、遺伝子組み換え組織型プラスミノゲン・アクチベーター (recombinant tissue plasminogen activator; rt-PA) であるアルテプラゼ (グルトバ注; 田辺三菱製薬) を最終濃度 50 IU/mL になる様に添加し、直後、30 分後、60 分後、120 分後、180 分後にそれぞれ 1 mL 分注した試料にトラネキサム酸を最終濃度 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になる様に添加して溶解を停止させて D-dimer を測定した。

10. フィブリンポリマー溶解試験

凝固第 XIII 因子欠乏血漿 (コスモ・バイオ) に トロンビン試薬を添加して凝固させた後に rt-PA を最終濃度 50 IU/mL になる様に添加し、15 分後、30 分後、60 分後にそれぞれ 1 mL 分注した試料にトラネキサム酸を最終濃度 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ になる様に添加して溶解を停止させて D-dimer および FDP を測定した。

11. 採血管内凝固検体と再採血後の測定値の比較

検査前あるいは検査後に検体が凝固していることが判明し、再採血を実施した 20 例を対象に、採血管内で凝固した検体と再採血した検体の測定値を比較した。

IV 結 果

1. 再現性

LG-DD の同時再現性は、SD 値が 0.02~0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CV 値が 0.21~2.67% であり、ACE-DD は SD 値 0.05~0.18 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CV 値 1.16~3.94% であった。LG-DD の日差再現性は、SD 値が 0.07~0.33 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CV 値が 1.86~2.80% であり、ACE-DD は SD 値 0.06~0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CV 値 0.83~4.82% であった (Table 1)。

2. 共存物質の影響

ビリルビン F および C は 25 mg/dL, ヘモグロビンは 500 mg/dL, 乳びは 2,500 FTU, RF は 500 IU/mL まで共存物質 0 濃度に対する相対誤差が $\pm 2\%$ を超える影響を認めなかった (Figure 1)。

3. 希釈直線性

理論値 56.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ までの直線性が確認できた (Figure 2)。

Table 1 Precision (N = 10)

LG-DD	Within-run precision			Between-day precision	
	IATROSER A TH-I	IATROSER A TH-II	Pool Plasma	IATROSER A TH-I	IATROSER A TH-II
MEAN (μg/mL)	1.43	17.62	8.63	2.46	17.87
MAX (μg/mL)	1.49	17.70	8.66	2.57	18.11
MIN (μg/mL)	1.39	17.49	8.60	2.37	17.09
SD (μg/mL)	0.04	0.06	0.02	0.07	0.33
CV (%)	2.67	0.36	0.21	2.80	1.86

ACE-DD	Within-run precision			Between-day precision	
	IATROSER A TH-I	IATROSER A TH-II	Pool Plasma	IATROSER A TH-I	IATROSER A TH-II
MEAN (μg/mL)	1.21	12.55	7.89	1.20	12.40
MAX (μg/mL)	1.28	12.70	7.97	1.30	12.61
MIN (μg/mL)	1.13	12.07	7.65	1.09	12.24
SD (μg/mL)	0.05	0.18	0.09	0.06	0.10
CV (%)	3.94	1.42	1.16	4.82	0.83

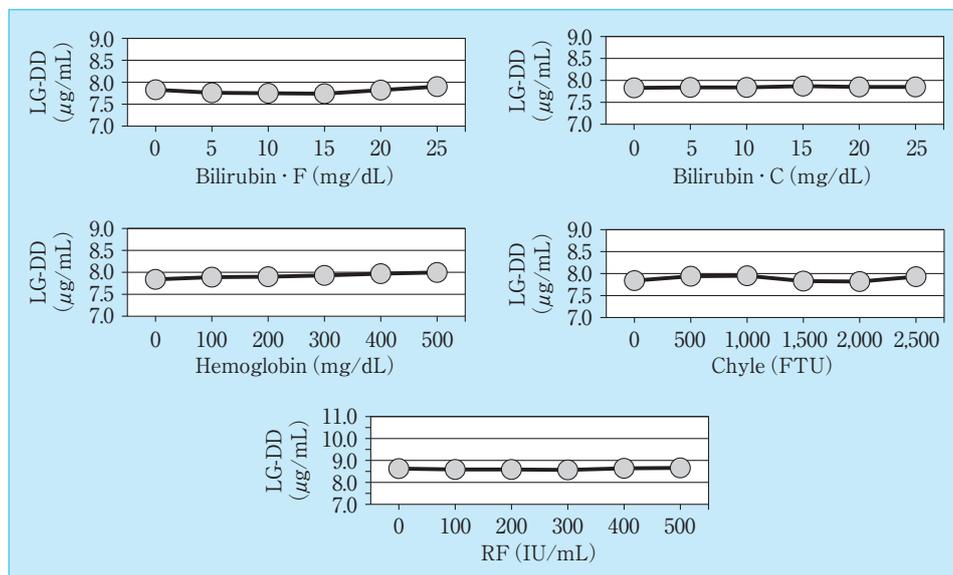


Figure 1 Effect of interfering substances
Measurement of interference check A and RF

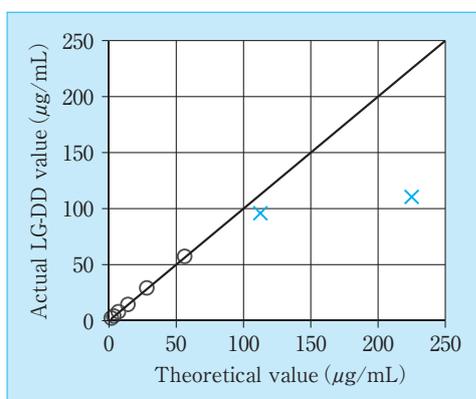


Figure 2 Dilution linearity
○ Theoretical value 1.8~56.3 μg/mL
× Theoretical value 112.5~225.0 μg/mL

4. 最小検出感度

標準品を段階希釈して3SD法で求めた最小検出感度は0.34 μg/mLであった (Figure 3)。

5. 相関性

ACE-DDとの相関性は、 $y = 0.964x + 0.092$, $r = 0.952$ であり、良好な相関性であったが、一部に直線信頼域を外れる乖離症例も認めた (Figure 4)。

6. フィブリノゲン溶解試験

LG-DD, ACE-DDともに経過時間に伴う測定値の上昇は認めなかった (Figure 5)。

7. フィブリン溶解試験

LG-DD, ACE-DDともに経過時間に伴う測定値の上

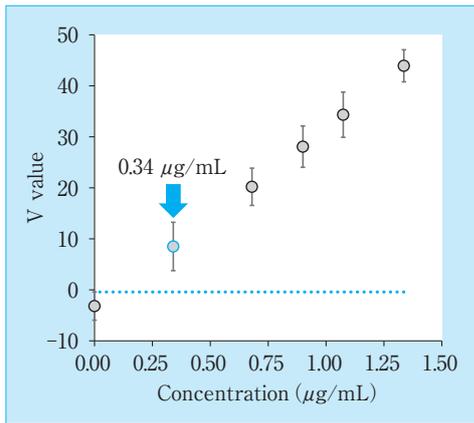


Figure 3 Detection limit

Barr indicate mean \pm 3SD

V value: Rate of change in absorbance

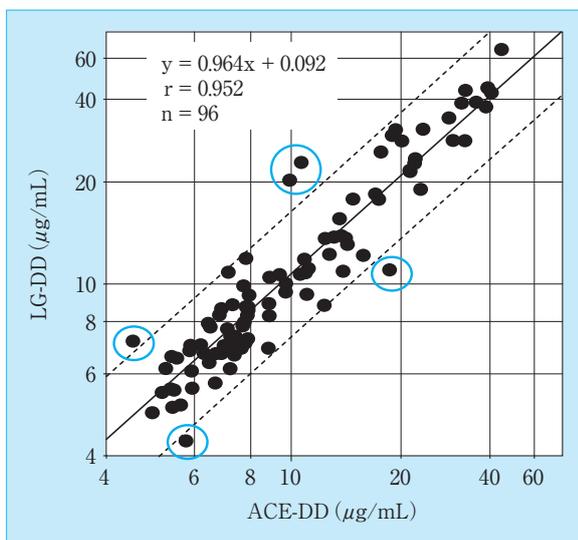


Figure 4 Correlation of D-dimer concentration between “LG-DD” and “ACE-DD”

Solid line: Regression line

Broken line: Linear confidence range

Plots surrounded by the blue circles: Dissociated patients

昇を認めたが、LG-DDがACE-DDに比して高値で推移した（Figure 6）。

8. フィブリンポリマー溶解試験

FDPは、30分後には上昇し始め、60分後には2,000 $\mu\text{g/mL}$ 付近まで急激に上昇した。ACE-DDも30分後には徐々に上昇を開始し、60分後には500 $\mu\text{g/mL}$ 以上となったのに対してLG-DDは、60分後に140 $\mu\text{g/mL}$ までの上昇に留まった（Figure 7）。

9. 採血管内凝固検体と再採血後の測定値の比較

採血管内で凝固した検体と再採血した検体の測定値の相関性は、ACE-DDで $y = 0.151x + 2.360$, $r =$

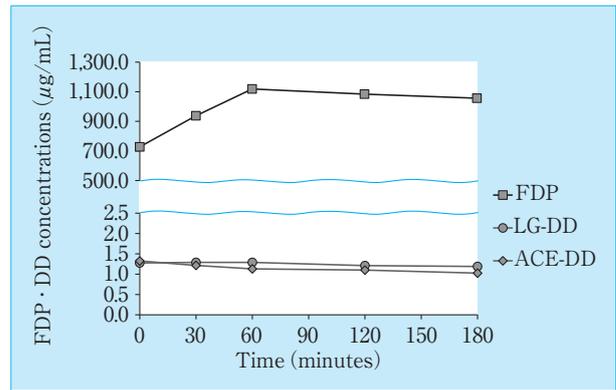


Figure 5 Analysis of D-dimer from urokinase (UK) dissolution of fibrinogen, which was obtained from normal plasma

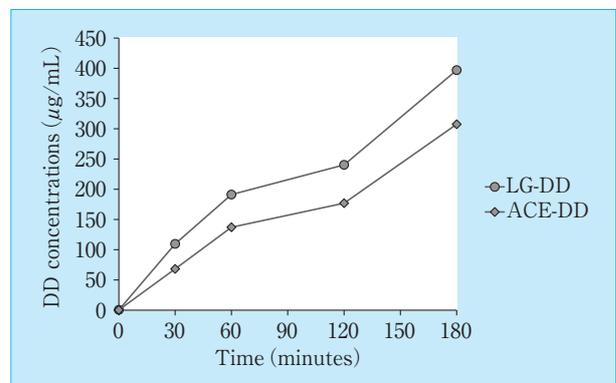


Figure 6 Analysis of D-dimer from tissue plasminogen activator (tPA) dissolution of cross-linked fibrin, that was obtained from normal plasma

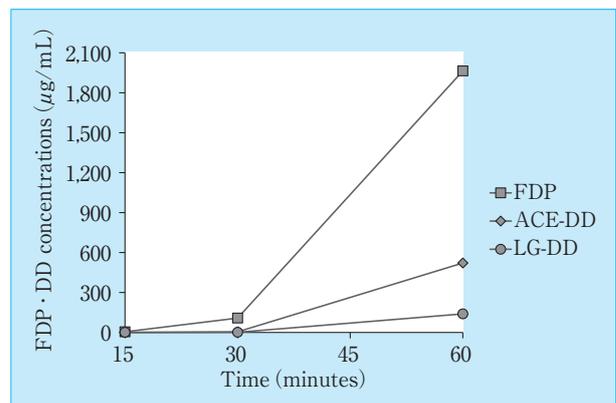


Figure 7 Analysis of D-dimer from tissue plasminogen activator (tPA) dissolution of fibrin polymer, which was obtained from factor XIII deficient plasma

0.580であったのに対し、LG-DDは、 $y = 0.464x + 2.014$, $r = 0.748$ であり、凝固検体と再採血検体との差が10 $\mu\text{g/mL}$ 以上の外れ値2点（Figure 8B 点線で

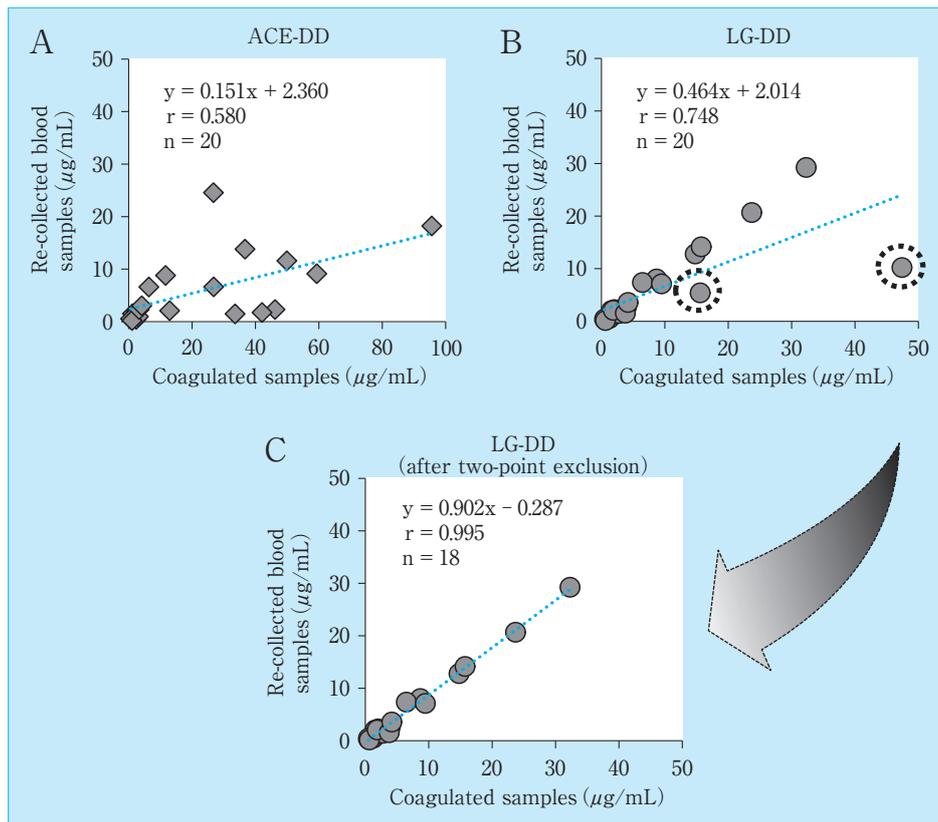


Figure 8 Comparison of values using coagulated samples in tubes with those from re-collected blood samples

- (A) Correlation of ACE-DD levels between coagulated samples in tubes and re-collected blood samples
- (B) Correlation of LG-DD levels between coagulated samples in tubes and re-collected blood samples
- (C) Correlation after excluding the measurements surrounded by the dotted lines from (B)

囲まれた部分) を除外すると $y = 0.902x - 0.287$, $r = 0.995$ となり、凝固した検体でも同等の測定結果が得られた (Figure 8)。

V 考 察

生体内で生じた安定化フィブリンがプラスミンにより切断され可溶化し D-dimer として血液に流入する。血液中の D-dimer を測定するにはフィブリノゲンには反応せず安定化フィブリンの分解産物のみを検出する必要がある。今回の検討で比較対象とした ACE-DD はモノクローナル抗体 JIF-23¹⁰⁾を用いたラテックス凝集法を原理としており、フィブリンをプラスミンが切断して初めて露呈する D ドメインの N 末端の立体構造を認識する。対して LG-DD に用いられているモノクローナル抗体 MIF-220¹¹⁾は、架橋化フィブリン分解産物 (Cross-linked fibrin degradation products; XDP) いわゆる安定化フィブリン分解産物

の E-D 結合によって生ずる立体構造を認識すると考えられている。従って、LG-DD はこれまでの試薬とは異なる抗原エピトープを認識しており、採用前には十分な性能評価が必要と考えられる。

LG-DD の基本性能は、全ての結果で ACE-DD を上回る性能であった。最小検出感度は ACE-DD では $0.8 \mu\text{g/mL}$ でメーカー設定の基準値である $1 \mu\text{g/mL}$ 未満と近い値であったのに対し、LG-DD では $0.3 \mu\text{g/mL}$ であり、基準値付近の精度が向上していた。また、希釈直線性が $56.3 \mu\text{g/mL}$ まで得られたことで ACE-DD の添付文書に記載されている $48 \mu\text{g/mL}$ から測定範囲が広がっており、希釈再検の件数を減らしコストを削減できることが期待できた。

ACE-DD との相関性は良好であったが、一部に LG-DD が高値に乖離する症例を認め、ACE-DD と反応性が異なる XDP が存在していることが示唆された。フィブリン溶解試験においても、rt-PA 添加早期からウエスタンブロット解析で DD 分画にバンドを

認めており（データ示さず）、線溶過剰による低分子までフィブリンが分解されている検体で LG-DD は ACE-DD に比較して高値で推移していた。このことから LG-DD は低分子 XDP への反応性が高い試薬であることが示唆され、LG-DD を検討した中西ら¹²⁾の報告でも同様の結果が得られている。桜井ら¹³⁾は、検体中の XDP は高分子 XDP で占められるものの D-dimer が高値の症例にフィブリン分解が亢進した例がみられると報告しており、今回の相関性で LG-DD が高値に乖離した症例はフィブリン分解が亢進した病態であったことが考えられる。ACE-DD より LG-DD が低値に乖離する例については、他の凝固・線溶系分子マーカーを測定して評価したが原因が特定できる傾向を認めなかった（データ示さず）。しかし、後述する採血管内凝固が乖離例で検知できない程度に起こっていたことは否定できない。

採血の際、血管内に注射針をスムーズに穿刺することが困難であった場合には、採血管内で血液が凝固することがあり D-dimer が偽高値となる。採血管内で凝固していることに気づかず結果を報告すると病態が過大評価される恐れがある。採血管内での凝固・線溶反応は生体内での凝固・線溶反応と異なり、クエン酸ナトリウムでカルシウム（Ca）がキレートされているため、Ca 非存在下での凝固・線溶反応となる。凝固第 XIII 因子は Ca の存在下でないと活性化部位に基質が接近できずフィブリンポリマーに架橋結合が形成され安定化フィブリンとなることが出来ない¹⁴⁾。採血管内で凝固した検体の測定値と再採血した検体の測定値を比較すると ACE-DD で凝固検体が高値となるのに対し、LG-DD では一部の症例を除き同様の測定値となった。これは、ACE-DD がフィブリンポリマー分解産物にも反応するのに対して、LG-DD は架橋結合のないフィブリンポリマー分解産物には反応しないため、長濱ら¹¹⁾の報告でも MIF-220 は Ca 存在下での E-D 結合によってあらわれる立体構造を認識することを報告している。我々も、凝固第 XIII 因子欠乏血漿に Ca を未添加で凝固させた後に線溶させた試料の D-dimer を測定したが、LG-DD は明らかに ACE-DD より低値となった。LG-DD の測定値がわずかに上昇したのは凝固第 XIII 因子欠乏血漿中に残存している凝固第 XIII 因子とトロピン試薬に含まれる Ca で形成された D-dimer に反

応したことが考えられるが、架橋結合のないフィブリンポリマー分解産物への反応も今回の検討では完全に否定できない。いずれにしても採血管内での凝固・線溶反応で産生されたフィブリンポリマー分解産物には影響しにくいことはこの結果からも明らかであり、生体内で産生された D-dimer に特異性が高い試薬であることが示唆された。注意したいのは採血管内凝固検体と再採血後の測定値の比較で認めた 2 例のように LG-DD でも採血後に D-dimer が上昇することがある。これは、採血時に血液とクエン酸ナトリウムの混和が不十分か遅れたことで Ca がキレートされる前に架橋化フィブリンが形成されて線溶されたことが考えられる。従って、D-dimer が患者状態に関係なく上昇している場合は検体が凝固していないかの確認が重要で、採血管内凝固が疑われる場合には可能な限り再採血することが望ましい。

今回の検討結果からも、D-dimer 試薬の特性がキットによって異なることは明らかであり標準化が望まれる。しかし、現状は自施設で採用している試薬でのカットオフ値や臨床判断値を設定する必要があり、LG-DD においても臨床検体を用いたカットオフ値および臨床判断値の設定が望まれる。

VI 結 語

LG-DD の基本性能は旧試薬から改善されており、低分子 XDP への反応性も高く異なる分子量をもつ D-dimer を確実に測定出来る特徴を有していた。また、採血後の採血管内凝固による偽高値の影響も受けにくく、生体内で産生された D-dimer に特異性が高い試薬であった。

■文献

- 1) Flores J *et al.*: “Clinical usefulness and safety of an age-adjusted D-dimer cutoff levels to exclude pulmonary embolism: A retrospective analysis,” *Intern Emerg Med*, 2016; 11: 69–75.
- 2) Keller K *et al.*: “D-Dimer and thrombus burden in acute pulmonary embolism,” *Am J Emerg Med*, 2018; 17: pii: S0735-6757 30048-2.
- 3) Arai A *et al.*: “Association of deep venous thrombosis with D-dimer values in patients with hemorrhagic stroke,” *No Shinkei Geka*, 2016; 44: 1019–1023.
- 4) Elms MJ *et al.*: “Measurement of crosslinked fibrin degradation products—an immunoassay using monoclonal antibodies,” *Thromb Haemost*, 1983; 50: 591–594.
- 5) Rowbotham BJ *et al.*: “Measurement of crosslinked fibrin

- derivatives—use in the diagnosis of venous thrombosis,” *Thromb Haemost*, 1987; 57: 59–61.
- 6) Liu JH *et al.*: “D-dimer may predict poor outcomes in patients with aneurysmal subarachnoid hemorrhage: A retrospective study,” *Neural Regen Res*, 2017; 12: 2014–2020.
 - 7) Riva N *et al.*: “Age-adjusted D-dimer to rule out deep vein thrombosis: Findings from the PALLADIO algorithm,” *J Thromb Haemost*, 2018; 16: 271–278.
 - 8) 福武 克幸: 「FDP/D dimer の標準化」, *日本血栓止血学会誌*, 2016; 27: 653–658.
 - 9) 田中 秀磨, 他: 「改良された D ダイマー測定試薬「エルピアエース D-D ダイマー II」の評価」, *医学検査*, 2005; 55: 901–910.
 - 10) Matsuda M *et al.*: “Fibrinogen 4. Current basic and clinical aspects,” 43–48, *Excerpta Medica*, Amsterdam, 1990.
 - 11) 長濱 裕, 他: 「D 領域との結合時にヒト・フィブリン E 領域に出現する構造を認識する抗体の架橋化フィブリン分解産物への反応性」, *日本検査血液学会誌*, 2017; 18: 30–37.
 - 12) 中西 加代子, 他: 「新規抗体を用いた D-dimer 試薬 LPIA ジェネシス D ダイマーの評価と試薬特性の検討」, *臨床病理*, 2017; 65: 978–987.
 - 13) 桜井 錠治, 他: 「血漿中強化フィブリン分解産物の分子量分布について」, *日本検査血液学会誌*, 2015; 16: 128–135.
 - 14) 一瀬 白帝: 「フィブリノゲンと第 XIII/13 因子の分子病態」, *新・血栓止血血管学*, 第 1 版第 1 刷, 8–19, 金芳堂, 2015.

本論文に関連し、開示すべき COI 状態にある企業等はありません。

Technical Article

Assessment of the basic performance of a new D-dimer reagent, LPIA-GENESIS D-dimer, and its characteristics

Yuji SHIMOKARIYA¹⁾ Maki WATANABE¹⁾ Akane SAKAGUCHI¹⁾ Miyu NISHIKAWA¹⁾
Motonobu AKIZUKI²⁾ George SAKURAI²⁾ Makoto MORIMOTO¹⁾ Kaname NAKATANI¹⁾

1) Department of Central Clinical Laboratory, The University of Mie Hospital (2-174, Edobashi, Tsu-shi, Mie 514-8507, Japan)

2) LSI Medience Corporation

Summary

We examined the basic performance and characteristics of a new D-dimer reagent, LPIA-GENESIS D-dimer (LG-DD), which recognizes an antigen epitope different from those recognized by conventional reagents. The CV values of precision test were from 0.21% to 2.67% for within run, and from 1.86% to 2.80% for 10 days' between run. A dilution linearity of $\leq 56.3 \mu\text{g/mL}$ was confirmed. The minimum detection sensitivity was $0.34 \mu\text{g/mL}$. The correlation with LPIA-ACE-D-Dimer II (ACE-DD) was $y = 0.964x + 0.092$ ($r = 0.952$). When serially measuring each parameter after fibrinogen fibrinolysis, there was no serial increase in any parameter of LG-DD. When serially measuring each parameter after fibrin fibrinolysis, there was a serial increase in each parameter. The values of all parameters of LG-DD were higher than those of ACE-DD. Fibrinolysis was promoted after coagulation-factor-XIII-deficient plasma coagulation, and there were serial increases in all parameters, but their values were lower than those of ACE-DD. This suggests that there is no influence on values in samples coagulated in blood collection tubes. From the results of this study, LG-DD may show a high performance without being affected by coagulation in blood collection tubes and also a high specificity for the D-dimer produced in vivo.

Key words: D-dimer, cross-linked fibrin degradation products, deep vein thrombosis, pulmonary embolism, samples coagulated in blood collection tube

(Received: April 27, 2018; Accepted: September 3, 2018)