

原 著

プロトロンビン時間測定における ISI/INR システムの問題点： 同一検体 4 施設同時測定による検討

上塚 芳郎*, 櫻川 信男**, 和田 英夫***
相沢 義房****, 小沢 哲夫**, 青崎 正彦*****
大木 勝義*, 井上 美幸*****, 笠貫 宏*

要 旨

1984年, ICTH (International Committee on Thrombosis and Haemostasis) 現 SSC (Scientific and Standardization Committee) は抗凝固療法のモニタリング法としてプロトロンビン時間 (PT) による場合は INR 表示を用いることを推奨したが, わが国ではいまだにトロンボテスト (TT) を用いている施設が多いのが現状である. 一方, わが国においては欧米におけるよりもより緩やかな凝固能のコントロールでも血栓症の発現が少ないとの報告もあり, わが国における PT-INR の治療域設定の必要性が言われている. 全国的に PT-INR 表示を普及するにあたっての問題点を洗い出すために第一段階の検討として以下の研究を行った.

東京女子医科大学において採血したワーファリン療法中の 7 症例の血漿を 3 施設に送付し, 同時に 4 施設において測定し, INR 表示を用いて比較検討した. 本来 PT-INR に換算すれば, たとえ異った試薬, 異った測定機器を使用して測定してもほぼ一致した値になることが予測されたが, 一部の施設間では測定値に有意差を認めた. すなわち施設 1 と施設 3 は同じシンプラスチンオート試薬を用いていたにもかかわらず, かえって秒数より

も INR で差異が認められた. 原因として INR の計算に必要な健常者の PT の設定と測定機器の違いからくる差異に問題があったと推定された.

今後 INR 表示を普及するに際しては正常者対照例の設定と機器の違いからくる差異にも注意が必要と考えられた.

緒 言

1984年に国際血栓止血学会は, 抗凝固療法のモニタリング法としてプロトロンビン時間による場合は International Normalized Ratio (INR) の使用を推奨した¹⁾. このことは, プロトロンビン時間 (prothrombin time : PT) の測定に用いられる市販の組織トロンボプラスチン試薬の鋭敏度が相当に異なるために施設間あるいは国際間の PT 値の比較がほとんど不可能であることに起因する. 世界保健機関 (WHO) のトロンボプラスチン国際標準品 (67/40) を基準とし, これの国際感受性指標 (International Sensitivity Index : ISI) を 1.0 として, 市販されている各メーカーの試薬はこれとの比較によりそれぞれ ISI が決められ, lot ごとに ISI が添付されている. INR は患者血漿の測定秒数を健常者のコントロール血漿の測定秒数で割ったものを ISI 乗して得られる. それでは INR 表示に換算すれば, 各施設の値が一致し問題がすべて解決するかどうかを検討するため本研究を行った.

目 的

ワルファリン療法中の患者の同一血漿検体を同

*東京女子医科大学循環器内科

**富山医科薬科大学臨床検査医学

***三重大学第二内科

****新潟大学第一内科

*****国立横浜病院

*****東京女子医科大学中央検査部

日に異なった複数の施設で異なった試薬と異なった測定機器の組み合わせを用いて測定した場合、INR 換算を行えば同じ結果が得られるかどうかを明らかにする。

方 法

1) 参加施設：東京女子医科大学付属日本心臓血圧研究所循環器内科，富山医科薬科大学臨床検査医学，三重大学第二内科，新潟大学第一内科の4施設。

2) 検体：東京女子医科大学においてインフォームド・コンセントを得た健常被験者9名とワルファリン療法中の患者7名から午前9時に9 mlずつの静脈血採血を行い，この9 mlに対し3.8%クエン酸ナトリウム液1 mlを添加した。直ちに転倒混和を行った後，速やかに3,000 rpmで10分間遠心して上清血漿を分離した。各血漿とも約1.0 mlずつプラスチック小試験管に分注し，試験管が直接保冷剤に接しないように紙に包んでから速やかに保冷剤とともに発泡スチロール箱にパッキングを行った。健常被験者の血漿は正常者プール血漿として用い，他のワルファリン投与患者の7名分の血漿とともに航空機または列車にて遠隔の各施設に運ばれた。検体は同日の午後5時頃に一斉に各施設の試薬および日常検査使用機器を用い測定された。

3) 測定項目：7例のワルファリン療法患者の検体血漿をBからHまでのラベルをつけそれぞれPT (秒，INR)，トロンボテスト (TT：秒，INR)を測定した。

4) 測定試薬および測定機器：施設1ではPT，シンプラスチンオート (オルガノンテクニカ，ISI 2.33)，TT，エーザイTTO (エーザイ ISI 1.03)，測定機器はPT，STA(STAGO)，TT，KC-10 (Amelung)，施設4では，PT，トロンボレルS (ヘキスト，ISI 1.08)，TT，エーザイTTO (エーザイ ISI 1.02)，測定機器はPT，CA-4000 (シスメックス)，TT，KC-10 A (Amelung) を使用した。

5) 各施設での健常者秒数の求め方は以下のごとくであった。施設1においては，PT，TTともに健常者10名を採血し，その平均秒数を用いた。施設2では，PTおよびTTともに健常人52名の血漿をプールした検体の秒数を用いた。施設3においては健常者30名から採血した血液を混合した

ものから調整した血漿の秒数を健常者秒数とした。また施設4ではPT測定では，Dade社の標準血漿サイトロールレベル1を使用し，TT測定ではエーザイ製のエーザイ標準血漿ノルマルを用いて正常者秒数とした (表3)。

6) 健常者プール血漿を検体Aとし，これを各施設にて希釈し検量線を作成した。この検量線のデータに基づき，INRは以下の式より各試料の値を求めた。

$$\text{INR} = (\text{患者血漿の PT 秒数} / \text{各施設における健常者の PT 秒数})^{\text{ISI}}$$

分母には，表1Aの上段にある各施設における健常者のPT秒数を用いて計算した。また，比較のために試料AのPT秒数を分母とし，INRを算出したものをそれぞれ表1Bに示した。

7) 統計学的処理法

a) 8つの試料に関して4施設間での測定値のばらつきを調べるためPT秒数の平均値と標準偏差 (SD) を求めた。PT-INRに関しては平均値，SDのほかに分散分析 (analysis of variance) を行った。その結果，試料Bや試料GについてはCV (coefficient of variance) が10%であった (表1A)。同様に試料AのPTから求めたINRでも傾向は同様であった (表1B)。

b) 4施設間における測定値の傾向を検討するため，施設毎の8検体の平均値，標準偏差を求め，PT (秒)，PT-INRにつきノンパラメトリック検定法であるWilcoxon rank-sum testを用い検定した (表2A,B)。

c) TTの秒数，TT-INRに関してもa)と同様の検討を加えた (表3)。

結 果

1) 輸送による影響の調査：輸送による影響はごく軽微と考えられた。

採血直後と氷冷8時間後の検体の測定値の比較では，統計学的有意差は認められなかった。しかし，試料(G)は一部の施設で凍結していたとのことであり，考慮が必要と思われた。この原因としては保冷剤と試験管が直接接しないように注意していたにもかかわらず一部試験管の包装紙が剥がれていたためと考えられ，輸送そのものの影響と言うよりも氷冷の仕方に問題があったと思われる。

表 1A 各施設における健常者秒数をもとに算出した PT-INR

施設	PT (秒)				PT-INR				INR mean	±SD	CV
	1	2	3	4	1	2	3	4			
各施設の健常者秒数	10.68	12.70	11.40	11.90	ISI=2.24	ISI=1.63	ISI=2.33	ISI=1.08			
A	11.10	11.75	11.00	11.10	1.09	0.88	0.92	0.93	0.96	0.09	9.70
B	17.05	23.00	16.15	31.45	2.85	2.63	2.25	2.86	2.65	0.28	10.73
C	14.35	18.75	14.60	22.20	1.94	1.89	1.78	1.96	1.89	0.08	4.26
D	14.00	17.75	13.70	20.65	1.83	1.73	1.53	1.81	1.73	0.14	7.91
E	14.20	18.00	14.00	21.90	1.89	1.77	1.61	1.93	1.80	0.14	7.98
F	14.00	17.75	13.70	21.20	1.83	1.73	1.53	1.87	1.74	0.15	8.59
G	12.15	16.80	12.60	17.70	1.33	1.58	1.26	1.54	1.43	0.15	10.70
H	15.25	20.05	15.00	24.20	2.22	2.10	1.90	2.15	2.09	0.14	6.70

表 1B 検体 A の秒数に基づいて算出した PT-INR

施設	PT (秒)				PT-INR				INR mean	±SD	CV
	1	2	3	4	1	2	3	4			
検体 A の秒数	11.10	11.75	11.00	11.10	ISI=2.24	ISI=1.63	ISI=2.33	ISI=1.08			
A	11.10	11.75	11.00	11.10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.00	0.00
B	17.05	23.00	16.15	31.45	2.62	2.99	2.45	3.08	2.78	0.30	10.81
C	14.35	18.75	14.60	22.20	1.78	2.14	1.93	2.11	1.99	0.17	8.54
D	14.00	17.75	13.70	20.65	1.68	1.96	1.67	1.96	1.82	0.16	8.98
E	14.20	18.00	14.00	21.90	1.74	2.00	1.75	2.08	1.89	0.18	9.27
F	14.00	17.75	13.70	21.20	1.68	1.96	1.67	2.01	1.83	0.18	9.87
G	12.15	16.80	12.60	17.70	1.22	1.79	1.37	1.66	1.51	0.26	17.12
H	15.25	20.05	15.00	24.20	2.04	2.39	2.06	2.32	2.20	0.18	8.15

PT: プロトロンビン時間, INR: 国際標準比, ISI: 国際感受性指標

SD: 標準偏差, CV: 分散係数

A: 健常者血漿, B-H: ワルファリン治療中の患者血漿

表 2A 4 施設間における PT 秒の比較と統計学的検定 (Wilcoxon 順位和検定)

健常者秒数	試薬の ISI	PT (秒)										
		A	B	C	D	E	F	G	H	mean	±SD	
施設 1	10.68	2.24	11.10	17.05	14.35	14.00	14.20	14.00	12.15	15.25	14.01	1.69
施設 2	12.70	1.63	11.75	23.00	18.75	17.75	18.00	17.75	16.80	20.05	17.98	3.00
施設 3	11.40	2.33	11.00	16.15	14.60	13.70	14.00	13.70	12.60	15.00	13.84	1.45
施設 4	11.90	1.08	11.10	31.45	22.20	20.65	21.90	21.20	17.70	24.20	21.30	5.36

※

表 2B 4 施設間における PT INR の比較と統計学的検定 (Wilcoxon 順位和検定)

健常者秒数	試薬の ISI	PT-INR										
		A	B	C	D	E	F	G	H	mean	±SD	
施設 1	10.68	2.24	1.09	2.85	1.94	1.83	1.89	1.83	1.33	2.22	1.87	0.50
施設 2	12.70	1.63	0.88	2.63	1.89	1.73	1.77	1.73	1.58	2.1	1.79	0.46
施設 3	11.40	2.33	0.92	2.25	1.78	1.53	1.61	1.53	1.26	1.9	1.60	0.38
施設 4	11.90	1.08	0.93	2.86	1.96	1.81	1.93	1.87	1.54	2.15	1.88	0.51

※※

PT: プロトロンビン時間

A: 健常者血漿, B-H: ワルファリン治療中の患者血漿

試薬の ISI: 製造元から与えられた国際感受性指標

*P<0.01 施設 1~3 と施設 4 との間に統計学的有意差がみられた

** 統計学的有意差なし

表3 トロンボテスト (秒・%) の4施設間の比較

	TT (秒)				TT-INR						
	1	2	3	4	1	2	3	4	mean	±SD	CV
A	38.90	34.90	34.40	35.55	0.94	0.96	0.98	0.96	0.960	0.016	1.701
B	111.90	101.80	92.00	111.90	2.60	2.65	2.70	2.56	2.628	0.061	2.312
C	90.05	79.95	74.80	76.00	2.10	2.11	2.18	2.09	2.120	0.041	1.926
D	74.70	69.30	64.60	64.65	1.76	1.84	1.87	1.77	1.810	0.054	2.958
E	84.40	78.00	71.80	69.90	1.98	2.06	2.09	1.92	2.013	0.077	3.835
F	78.45	74.80	66.45	67.40	1.94	1.98	1.93	1.85	1.900	0.067	3.518
G	75.60	69.15	63.30	63.35	1.78	1.83	1.84	1.73	1.795	0.051	2.822
H	94.75	89.95	80.15	82.15	2.21	2.36	2.35	2.26	2.295	0.072	3.152

TT: トロンボテスト, INR: 国際標準比, 1-4: 施設
 SD: 標準偏差, CV: 分散係数
 A: 健常者血漿, B-H: ワルファリン治療中の患者血漿

る。

2) 方法の5)に記載された各施設毎の方法により求めた健常者秒数と検体Aを測定して得られた秒数を表1に示した。

3) 各施設におけるPT測定秒数およびPT-INR

PTの秒数とINRを表1A,Bに示した。表はAからHまでの8つの検体を4つの施設で測定した値を示す。PT秒数では4つの施設間に有意差が認められた。一方INR表示では有意差は見られなかったものの分散分析を行ってみるとGの検体では10%もの差異が認められた。これは臨床的に無視できないと考えられる。ことに施設1と施設3では、lot番号は異なるものの同一製造業者の試薬を用いており、秒数表示ではあまり差異を認めなかったがINR表示では両者間に差が生じた。施設4は、ISI値がほぼ1であるトロンボレルSを試薬として用いている関係で、秒数は他の施設と比べて著明に延長していたが、INR変換したところでは、他施設と大きな差異は認められなかった。

ノンパラメトリック検定法であるWilcoxon rank-sum testを用い、施設間の差異についての検定を行ったところ、PT(秒)では、施設1, 2, 3と施設4との間に統計学的な有意差を認めたが、PT-INRでは施設間に統計学的な有意差を認めなかった(表2A, B)。

3) TT測定秒数およびTT-INR(表3)

表3はTTの秒数、INRの換算結果であるが、秒、TT-INRとも4つの施設間でばらつきは少な

かった。CVを求めたがいずれも許容範囲内と考えられた。

4) 試料Aの各施設での測定に基づく検量線

健常者血漿Aを希釈して用いて作成した検量線である。PTでは施設4の試薬のISIが1に近いので途中から急峻な立ち上がりを示している(図1A)。TTにおいても試料Aによる検量線を作成してみたが、全施設の試薬のISIがほぼ同一なので似通った検量線になった(図1B)。

考案

ISI/INRシステムは、国際間のPTの標準化のために考案されたものである²⁾。1985年にICTHは抗凝固療法の強度を表示する単位としてINRを使用していない論文は受理しないように勧告しているが、その勧告は必ずしも守られていない³⁾。また、欧米においてはワルファリンによる抗凝固療法の治療域を疾患別に定めたPT-INRによるガイドラインが発表されている⁴⁾。しかし、本邦においては欧米におけるよりも緩やかな抗凝固療法でもよいという報告⁵⁾もあり、抗凝固療法の疾患別のガイドラインは未だ完成されていない。疾患別の治療域を設定する前にISI/INRシステムの問題点を検討しておく必要があるため本研究を行った。

著者らは同一の検体を4つの施設で同日に測定し、PTとTTのそれぞれについて秒、INRを用いて測定結果を比較してみた。PTに関してはこれら4施設中2施設が同一のメーカーのPT試薬を用いていたが、測定機器は異なっており、また、

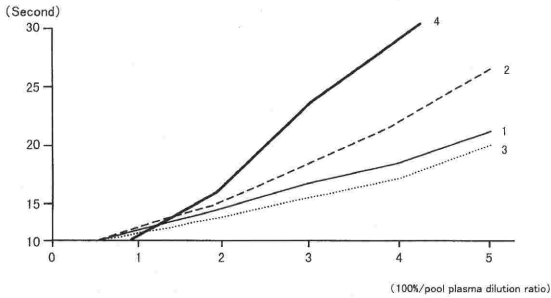


図 1 A 各施設で使用した PT 試薬の検量線。1-4: 施設番号

ISI が 1 に近いトロンボレル S を使用した施設 4 は検量線の立ち上がりが途中から急峻である。ISI が 1 に近い試薬でも健常者秒数は必ずしも延長しないことを示している。

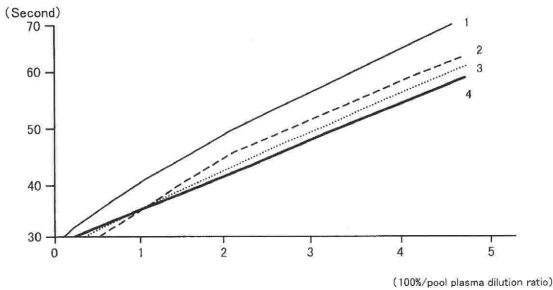


図 1 B 各施設で使用した TT 試薬の検量線。1-4: 施設番号

TT の場合は試薬間の ISI の差が少ないため、PT ほど検量線に大きな差が見られない。

他の 2 施設では ISI のかなり異なった試薬が用いられていた。本来ならばたとえ異なった試薬が用いられていても INR に変換すればさほど差のない値に倣うはずであるが、本研究により次の如き問題点が指摘された。

第一に健常者プール血漿の秒数の問題である。INR は PT ratio (PT 比: PTR) の ISI 乗で表わされる。すなわち、患者血漿の PT 秒数を健常者血漿の PT 秒数で除したものに ISI 乗したものである。健常者秒数の違いによりかなり PT 値に差異が生じる。本研究でも lot 番号の異なる同一メーカーの試薬を用いている施設 1 と施設 3 で、秒数ではほぼ両者が等しいにもかかわらず、INR 変換すると施設 3 の数値が低値となっていた。この原因を検索するため次のような検証を行ってみた。各施設での PT-INR の計算に用いた健常者

PT 秒数は表 1 に記した通りである。これによると、施設 3 の健常者秒数は 11.40 となり、施設 1 と約 0.7 秒の差異が認められた。しかし、試料 A の測定秒数では両施設ともほぼ一致した成績であった。

TT 測定においては各施設が施設 2 をのぞいては lot 番号の異なる同一メーカー試薬を用いており、測定機器は異なるものの TT-INR では施設間格差がほとんど見られなかった (表 3)。そこで各施設の PT-INR 値の代わりに TT-INR を用い、施設 3 で PT 比の計算に用いられた PT 試薬の実際の ISI を計算すると $ISI = 3.13$ となり、この ISI 値を式

$ISI = \log(INR) / \log(PTR)$ にあてはめ、施設 3 の健常者秒数を求めると健常者秒数は平均値 $\pm SD = 10.56 \pm 0.100$ 秒となった。これは施設 1 の健常者秒数 10.68 とほぼ等しくなることより、施設 3 が用いた健常者血漿の秒数に問題があったことが推定された。

方法の 5) に記したように、健常者秒数の求め方は施設 1 においては 10 名の健常者から採血した血漿の平均値をとっており、施設 3 では 30 名の健常者からの採血を混合したものをを用いていた。WHO も、健常者の PT の平均値を用いることを推奨しており、健常者の数は 20 名が望ましいとしている⁶⁾。また、Burgess-Wilson らはプール血漿の PT 秒数は健常者の新鮮血漿の秒数と異なると報告している⁷⁾。しかし、現実には 20 名の健常者の採血は困難であることが多いので AK キャリブレーションなどの標準血漿を用いている施設も多い。

健常者秒数の設定に問題があった可能性をさらに検討するために、患者血漿 (B-H) の PT 秒数を試料 A の PT 秒数を用いて INR に変換し表を作成してみた。表 1 B にあるように施設 1 と施設 3 の INR の値の差はかなり小さくなった。

第二に WHO の勧告によれば、INR は用手法を用いて測定することを前提にして ISI 値が決定されているため、機械式、光学式等の測定機器の特性によってかなりのばらつきが考えられることである。器械により凝固の開始点の捉え方が異なることはよく知られている。従って、メーカーが出荷時につけてきた ISI 値をそのまま用いるのではなく、自施設での測定器機に合わせた補正 ISI を用いるべきであろう⁸⁾。

第三に、ISIが1に近い鋭敏な試薬を用いて測定した施設とISIが2に近い試薬を用いた施設間では、INR変換を行っても統計学的有意差を認められており、この点注意が必要である。ISIが1に近い試薬は図1Aからも明らかのように、検量線の立ち上がりが急峻であることが特徴であり、抗凝固療法のintensityが強い場合により秒数の延長が著しい。

一方TTの測定結果に関しては4つの施設間で秒、INRとも比較的一致した値が得られた。この理由としては施設2を除いて同一メーカーの試薬を用いていることによりISIのばらつきがないことがあげられた。これはまた、図1Bの4本の検量線がほぼ一致していることから裏付けられた。わが国においてはこのメーカーの市場占有率が高いという特殊事情がある点PTの場合とは状況が異なると考えられた。

以上、本研究はPT-INRを普及させるに当たっての問題点を提起したものと言える。これらを克服してこそ国際化時代の抗凝固療法も確立され、患者のQOL向上が期待される。

なお、本論文の要旨は *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 誌上に既に発表した⁹⁾。

文 献

- 1) ICSH/ICTH recommendation for reporting prothrombin time in oral anticoagulant control. *Thromb Haemost* 53 : 155-156, 1985
- 2) 風間陸美, 安部 英: 経口抗凝固療法ガイドライン. *血液と脈管* 16 : 431-440, 1989
- 3) Hirsh J : Standard monitoring of warfarin in North America: Time for change. *Arch Intern Med* 152 : 257-258, 1992
- 4) The Fourth ACCP Concensus Conference on Antithrombotic therapy. *Chest* 108(suppl) : 225S-522S
- 5) 上塚芳郎, 細田瑛一, 青崎正彦, 他: 経口抗凝固療法におけるトロンボテスト (%) とプロトロンビン時間 (INR) の臨床的意義について. *血栓止血誌* 3 : 123-130, 1992
- 6) WHO Expert Committee on Biological Standardization. 33rd Report. *World Health Organ Tech Rep Ser* 687 : 81-105, 1983
- 7) Burgess-Wilson MR, Buri R, Woodhams BJ : Important differences encountered in the normal plasma pools used for the control of oral anticoagulation. *Thromb Haemost* 69 : 1124, 1993
- 8) Kazama M, Suzuki S, et al : Evaluation of International Normalized Ratio by a controlled field survey with 4 different thromboplastin reagents. *Thromb Haemost* 64 : 535-541, 1990
- 9) Uetsuka Y, Sakuragawa N, Wada H, et al : ISI/INR System in Japan: Experience from simultaneous measurement of the same plasma at four different laboratories. *Seminars in Thromb Hemost* 26 : 109-112, 2000

Some Concern about ISI/INR System: Experience from Simultaneous Measurement of the Same Plasma at 4 Different Laboratories

Yoshio Uetsuka*, Nobuo Sakuragawa**, Hideo Wada***,
 Yoshifusa Aizawa****, Tetsuo Ozawa**, Masahiko Aosaki*****,
 Katsuyoshi Ooki*, Miyuki Inoue*****, Hiroshi Kasanuki*

*Department of Cardiology, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

**Department of Clinical Laboratory Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University,
 Toyama-shi, Japan

***Second Department of Internal Medicine, Mie University, School of Medicine, Mie, Japan

****First Department of Internal Medicine, Niigata University, School of Medicine, Niigata, Japan
 *****Yokohama National Hospital, Kanagawa, Japan

*****Central Clinical Laboratories, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan

In 1984, the Scientific and Standardization Committee (formerly ICTH) recommended the use of International Sensitivity Index and International Normalized Ratio (ISI/INR) System for the monitoring of oral anticoagulant therapy. This system is introduced because the sensitivity of thromboplastin reagents used for the measurement of prothrombin time (PT) is widely different and comparison among hospitals employing different reagents is virtually impossible.

In 1989 and 1994, therapeutic guidelines for monitoring oral anticoagulant were published in the western countries, but they might not fit Asians who were not so prone to thrombotic diseases compared to Caucasians. Therefore, we are in need of establishing the optimal therapeutic range of oral anticoagulant therapy for Japanese. Before we proceed to do so, the verification of the reliability of ISI/INR system is mandatory. In this study we simultaneously measured the plasma from 7 patients with warfarin therapy at 4 different institutions for PT seconds, PT-INR, thrombotest (TT) seconds and TT-INR. The comparison between these laboratories revealed clinically impor-

tant variances between 4 laboratories even when PT was converted to PT-INR.

The laboratory 1 and the laboratory 3 were using the same thromboplastin reagents for the measurement of PT. And PT (seconds) in both laboratories showed similar numbers, but when they converted into INR, the variances were of significance (maximum coefficient of variance 10.44). We investigated the reason why these differences occurred and found that the calculated PT seconds for normal control at the laboratory 3 were somewhat larger than those of other laboratories. If we assume that PT-INR is identical to TT-INR, the estimated PT (second) for normal control at the laboratory 3 can be calculated from TT-INR. And it was 10.56 ± 0.10 seconds. This was nearly the same as the one which was used at the laboratory 1.

In conclusion, there are some difficulties still existing to overcome before ISI/INR system will reliably be used. And we suggest attention should be given to the PT seconds used as normal control plasma.

Key words : Prothrombin time, Thrombotest, INR, ISI, Anticoagulanty.

(Circ Cont 21 : 271~277, 2000)