

ADAMTS13 活性測定用 ELISA キットの開発

伊藤 晋¹⁾ 山本 茂一¹⁾ 林 司¹⁾ 加藤 誠司²⁾ 日裏 久英³⁾
 松本 雅則²⁾ 藤村 吉博²⁾

ADAMTS13 は、止血因子であるフォンビレブランド因子 (VWF) の A2 ドメイン内の Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ 間のペプチド結合を特異的に切断する酵素である。この切断により新たに生じるペプチドの C 末端 Tyr1605 を特異的に認識するモノクローナル抗体を用いて、基質の切断生成物を ELISA 法で直接測定する原理に基づいた ADAMTS13 活性測定法のキット化を行い、そのキットの基本的な性能を評価した。

本キットの最小検出感度は、健常人の ADAMTS13 活性 100% に対して、0.4% と高感度であった。また、調製したプレート内のウェル間の均一性 (変動係数 (CV) = 3.3%) は良好で、濃度の違う検体での同時再現性 (CV = 1.1~4.7%) 及び日差再現性 (CV = 2.6~7.5%) も良好であった。希釈試験では、原点に回帰する良好な直線性が得られた。またヘモグロビンやビリルビン等の共存物質の影響は、検討した濃度範囲では認められなかった。反応は EDTA で完全に阻害された。

臨床検体及び健常人検体を本キットで測定したときの ADAMTS13 活性は、健常人プール血漿 100% に対し先天性の ADAMTS13 活性欠損症である Upshaw-Schulman 症候群 (USS) で 0.5% 以下~2.7%, USS 保因者群で 7.7~85.3%, 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) 群で 0.5% 以下~58.1%, 健常人で 54.7~134.4% と測定され、TTP の診断に必要な判別能を有しており、SDS-agarose ゲル電気泳動法との相関は相関係数 (r) = 0.931 と良好であった。本キットは優れた性能と操作性を有していることから、TTP の診断や血小板輸血時の適否判断などにおいて有用であると考えられた。

キーワード：ADAMTS13, von Willebrand 因子, 血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP), 血小板輸血, 活性測定 ELISA

はじめに

止血因子である von Willebrand 因子 (VWF) は血管内皮細胞で産生され、サブユニットの N 末端同士及び C 末端同士が SS 結合で結ばれた超巨大分子としてマルチマー構造 (UL-VWFM) をとって血流中に放出される。ADAMTS13 は VWF の A2 ドメインに存在するアミノ酸残基 Tyr¹⁶⁰⁵-Met¹⁶⁰⁶ 間のペプチド結合を特異的に切断する酵素であり、UL-VWFM のマルチマーサイズを調節していると考えられている¹⁾。本酵素の活性が著減或いは欠損すると血中 UL-VWFM が増加し、高い血圧にさらされると血小板血栓を形成し、血栓性血小板減少性紫斑病 (TTP) を発症すると考えられている¹⁾。ADAMTS13 活性が著減し、血中に UL-VWFM が出現する状況下において、血小板輸血を行うことは血小板血栓形成を誘導するため、臨床的に血小板減少

症を呈していても『血小板輸血は禁忌である』とされていることは容易に理解できる²⁾。従って ADAMTS13 の活性測定は TTP の確定診断、血小板輸血可否判定に必要な不可欠である。従来の古典的 ADAMTS13 活性測定法は、天然基質である精製 VWF を用いて、検体中の ADAMTS13 を反応させた後、VWF の分子量や機能の変化を基に ADAMTS13 活性を求めるもので、操作が煩雑で、測定に長時間を要するものであった^{3)~6)}。そこで TTP の確定診断前に出血予防目的で血小板輸血が行われて重篤かつ不幸な転帰をとらないため、通常の検査室で簡単に測定できる方法の開発が望まれていた。近年、Kokame ら⁷⁾は、ADAMTS13 が切断可能な VWF の最小単位である 73 のアミノ酸残基 (VWF73) を同定し、融合蛋白質として発現させた GST-VWF73-His が ADAMTS13 の良好な基質となりうることを報告した。

1) 株式会社カイノス

2) 奈良県立医科大学輸血部

3) 株式会社日本医学臨床検査研究所

〔受付日：2008 年 8 月 8 日，受理日：2009 年 9 月 15 日〕

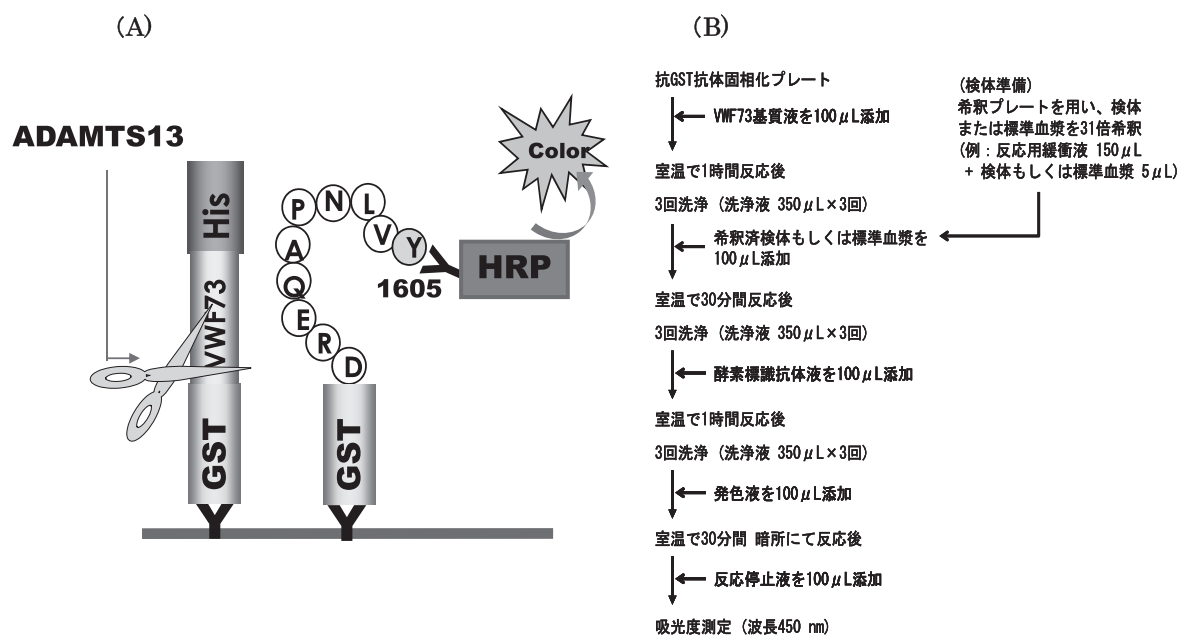


Fig. 1 Assay Principle and Scheme of Procedure of ADAMTS13 activity ELISA

(A) Assay principle: ADAMTS13 in a plasma sample cleaves the recombinant GST-VWF73-His substrate bound to anti-GST monoclonal antibody immobilized on a microtiter plate. The HRP-labeled monoclonal antibody (anti-N10) reacts to the cleavage site including Tyr1605 edge produced by the enzymatic reaction of ADAMTS13. The activity of bound HRP on the plate was measured, and the activity of ADAMTS13 was calculated.

(B) Scheme for assay procedure.

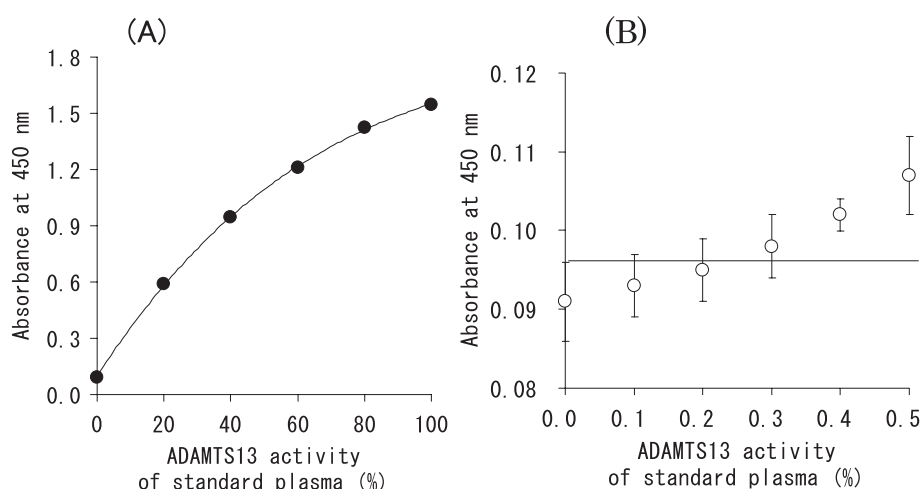


Fig. 2 Standard curve and detection limit

(A) The standard curve was obtained by assaying serially diluted normal plasma. The normal pooled plasma, defined as 100% activity, was serially diluted with plasma inactivated by heat treatment for 1 hour at 56°C.

(B) A detection limit was estimated by the intersection point of the curve of minus 2 standard deviations (SDs) for the standards with 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, and 0.5% activity measured in 8 replications and zero standards of plus 2 SDs.

さらに彼らは、VWF73に蛍光基と消光基を導入したFRET-VWF73蛍光測定法を開発した⁸⁾。一方、Katoら⁹⁾は、基質であるGST-VWF73-HisがADAMTS13により切断されて生成するVWF73の切断端のアミノ酸残基(Tyr1605)を特異的に認識するモノクローナル抗

体(抗N10抗体)の開発を行った。そして、西洋ワサビ由来ペルオキシダーゼ(HRP)標識した抗N10抗体を用いて、ADAMTS13による切断生成物量を直接測定する酵素免疫測定法によるADAMTS13活性測定法の開発に成功した。本測定法は、従来の古典的方法より

Table 1-1 Intra-assay reproducibility study for ADAMTS13 assay

		Absorbance at 450nm			ADAMTS13 activity(%)		
		1st assay	2nd assay	3rd assay	1st assay	2nd assay	3rd assay
Plasma L	Mean	0.248	0.265	0.292	6.5	6.6	6.8
	SD	0.003	0.005	0.004	0.1	0.2	0.2
	CV (%)	1.1	2.1	1.5	1.7	3.2	2.2
Plasma M	Mean	1.039	1.105	1.209	51.0	51.0	50.3
	SD	0.018	0.013	0.008	1.5	1.0	0.6
	CV (%)	1.7	1.2	0.6	2.8	2.0	1.1
Plasma H	Mean	1.326	1.408	1.493	79.9	80.0	77.0
	SD	0.023	0.012	0.030	2.9	1.5	3.8
	CV (%)	1.7	0.9	2.0	3.6	1.8	4.7

Each assay was performed by hexaplicate assay.

L: low, M: mid, H: high, SD: standard deviation, CV: coefficient of variation

Table 1-2 Inter-assay reproducibility study for ADAMTS13 assay

Day	ADAMTS13 activity (%)		
	Plasma L	Plasma M	Plasma H
1	5.9	47.9	72.9
2	5.7	50.3	81.5
3	6.5	51.0	79.9
4	6.6	51.0	80.0
5	6.8	50.3	77.0
Mean (%)	6.3	50.1	78.3
SD	0.5	1.3	3.4
CV (%)	7.5	2.6	4.4

L: low, M: mid, H: high, SD : standard deviation, CV : coefficient of variation

遙かに簡便で、測定に要する時間も短く、正常値の0.4%の最小検出感度を持つ高感度ELISA活性測定法である⁹⁾。今回、同測定系の汎用化を目的としてキット化を行い、そのキットの基本的な性能を検討したので報告する。

方 法

1. 測定原理

本キットの測定原理は、Kato らの方法⁹⁾に基づいたものである (Fig. 1 (A))。固相上の抗 GST モノクローナル抗体を介して固相化された基質 GST-VWF73-His が試料中の ADAMTS13 により水解を受けると VWF73 ペプチドが N 末端側の 10 アミノ酸残基からなる VWF 10 ペプチドと 63 アミノ酸残基のペプチドに切断され、固相上に GST-VWF10 のペプチドが生成する。そのペプチドの C 末端の Tyr を特異的に認識するモノクローナル抗体 (抗 N10 抗体) に HRP を標識した HRP 標識抗 N10 抗体を反応させると、基質の水解生成物量に対応して HRP 標識抗 N10 抗体が固相上に結合する。その固相に結合した HRP 活性量の測定は、試料中の ADAMTS13 活性を反映した基質の水解生成物量を測定することになる。すなわち、本キットによる ADAMTS13 活性測定法は基質の水解生成物量を直接的に酵素免

疫測定法で測定することを原理とするものである。

2. 測定試薬と操作法

構築した本キットは、抗 GST モノクローナル抗体固相化 96 ウエルマイクロプレート、GST-VWF73-His 基質 (凍結乾燥品)、HRP 標識抗 N10 抗体溶液及び反応緩衝液等から構成されている。

本キットの操作法の概略を示す (Fig. 1 (B))。まず、抗 GST 抗体固相化プレートウエルに GST-VWF73-His 基質溶液 100 μ l を分注し室温 1 時間反応させた後、洗浄する。次いで、反応緩衝液で予め 31 倍希釈した血漿検体 100 μ l を分注し、室温 30 分間反応後洗浄する。その後、HRP 標識抗 N10 抗体液を 100 μ l 分注反応させ (室温 1 時間)、洗浄した後、最後に固相に結合した HRP 活性を測定するための HRP 活性測定用基質液を分注し室温 30 分間反応後、反応停止液 100 μ l を加えて反応を停止させ、波長 450nm での吸光度を測定する。検体測定値は健常プール血漿 (標準血漿) の ADAMTS13 活性を 100% とし、作成した検量線から算出する。

3. 対象

奈良県立医科大学輸血部に保存されている、先天性の ADAMTS13 欠損症である Upshaw-Schulman 症候群 (USS) : 10 検体、USS 保因者 (USS Family) 群 : 21 検体、後天性の ADAMTS13 活性著減例を含む TTP 群 : 35 検体および健常人 : 43 検体を用いた。これらは全てクエン酸加血漿検体であり、測定まで -80℃ にて保存した。

4. 方法

1) 検量線及び測定範囲

健常人プール血漿 (n=10) を標準血漿 (ADAMTS13 活性=100%) とし、標準血漿を 56℃、1 時間の加熱処理した非働化血漿 (ADAMTS13 活性 0%) と標準血漿を混合することにより、0, 20, 40, 60, 80, 100% の標準血漿を作製した。これら各標準血漿を 2 重測定することにより検量線を得た。

最小検出限界の試験は、0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5%

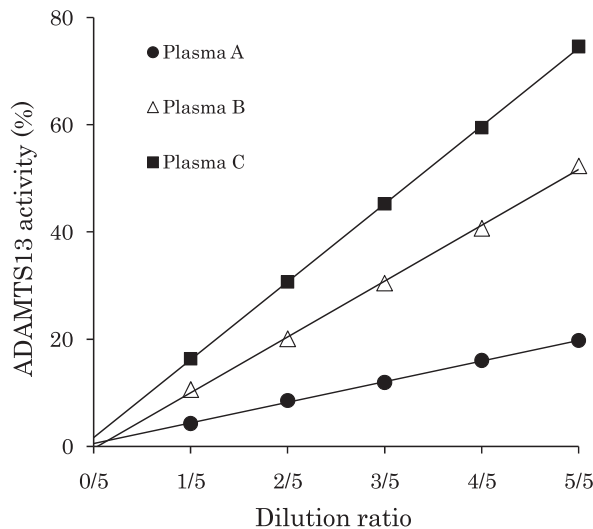


Fig. 3 Dilution test

Three kinds of plasma were diluted in 5 steps with inactivated normal plasma, and the linearity of each plasma sample was analyzed by measuring ADAMTS13 in the diluted samples.

に調製した標準血漿を測定試料とし、それぞれ8重測定して得られた吸光度の測定値から平均値及び標準偏差 (SD) を求め、これからブランク (ADAMTS13 活性, 0%) の平均値+2SD と識別できる各活性の平均値-2SD を比較し、このときの平均値に対応する ADAMTS13 活性を求めることによって行った。

2) 再現性

1 種類の血漿検体を反応緩衝液で 31 倍希釈した測定試料を、調製した 1 枚のプレートの 96 ウェル全部に 100 μ l ずつ分注し、所定の測定操作を行い、全ウェルの吸光度の測定値から平均値、SD および CV を求め、プレート内のウェル間のバラツキを検討した。次いで、活性値の異なる 3 種類の血漿検体を測定試料とし、それぞれ 6 重測定し、同時再現性試験を行った。この同時再現性試験を別々に 3 回行った。各測定回毎に得られた測定値の平均値、SD および CV を求め同時再現性の評価を行った。さらに -80 $^{\circ}$ C に凍結保存した活性値の異なる 3 種類の血漿検体を測定試料とし、1 日 2 重測定し、それを 5 日間測定し、日差再現性の試験を行った。得られた測定値から平均値、SD および CV を求め日差再現性の評価を行った。

3) 希釈直線性

活性値の異なる 3 種類の血漿検体を非働化血漿で、5/5、4/5、3/5、2/5、1/5 の 5 段階希釈したものを測定試料とし、それぞれ 2 重測定し希釈直線性の評価を行った。

4) 共存物質の影響

市販の干渉チェック・A・プラス及び干渉チェック・

RF プラス (シスメックス (株)) を用いて、共存物質の本測定法に及ぼす影響を調べた。非抱合型ビリルビン (ビリルビン F) : 0~50mg/dl, 抱合型ビリルビン (ビリルビン C) : 0~50mg/dl, 溶血ヘモグロビン : 0~500 mg/dl, 乳ビ : 0~3,000 度, リウマトイド因子 (RF) : 0~500IU/ml となるように、活性値の異なる 2 種類の血漿又は血清検体各 9 容に対して、各共存物質調製液 1 容を添加して調製したものを測定試料とし、それぞれ 2 重測定し、共存物質の影響試験を行った。

5) 抗凝固剤の影響

ヘパリンナトリウム : 0~0.05%, フッ化ナトリウム : 0~2%, EDTA・2Na : 0~0.5%, クエン酸三ナトリウム二水和物 : 0~2.5% となるように、活性値の異なる 2 種類の血清検体各 9 容に対して、精製水で溶解した各抗凝固剤溶液 1 容を添加して調製したものを測定試料とし、それぞれ 2 重測定し、抗凝固剤の影響試験を行った。

6) 相関性試験

上述の対象で示した 109 例の検体について、本法で測定した活性値と、ADAMTS13 活性測定基準法といえる SDS-Agarose ゲル電気泳動法⁴⁾での測定値を比較し、相関分析を行った。

7) 構成試薬の安定性試験

凍結乾燥品の VWF73 基質液を精製水で溶解後、2~8 $^{\circ}$ C で保存したものの経時的変化及び、-80 $^{\circ}$ C で凍結保存後、凍結融解を繰り返すことによる変化を標準血漿による検量線の感度比較により構成試薬の安定性試験を行った。また、その他の溶液状の構成試薬及び抗 GST 抗体固相化マイクロプレートは、37 $^{\circ}$ C で 1 週間保存前後の検量線の感度比較により試験した。

結 果

1. 検量線及び測定範囲

標準血漿を段階希釈して標準液とした。本キットにより標準液を測定した結果、ADAMTS13 活性が 0~100% の範囲において、測定された吸光度が正の傾きをもつ検量線が得られた (Fig. 2 (A))。また、最小検出限界の試験結果より、ブランク試料と識別可能な ADAMTS13 活性は 0.4% であった (Fig. 2 (B))。

2. 再現性試験

調製したプレートの 96 ウェル全てを同一検体で測定することによって得られたウェル間の再現性試験の結果は、吸光度の平均値=1.230 (最大値-最小値=0.188), SD=0.041, CV=3.3% であった。Table 1-1 に示したように、得られた吸光度の測定値による同時再現性の CV は 0.6~2.1% (吸光度の平均値 : 0.248~1.493) であった。一方、これらの吸光度から検量線により算出した ADAMTS13 活性による CV は 1.1~4.7% (ADAMTS

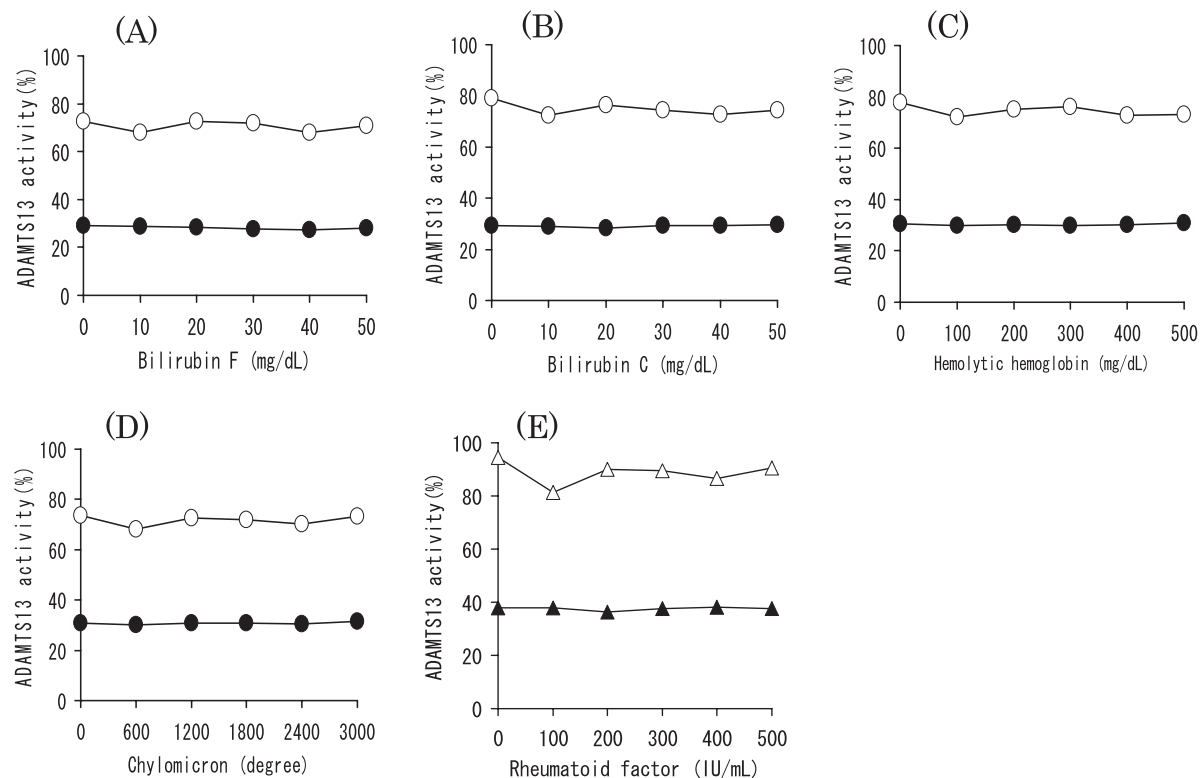


Fig. 4 Effect of various interferants on ADAMTS13 activity ELISA

(A) ADAMTS13 activity in the presence of various concentrations of unconjugated bilirubin (Bilirubin F). (B) ADAMTS13 activity in the presence of various concentrations of conjugated bilirubin (Bilirubin C). (C) ADAMTS13 activity in the presence of various concentrations of hemolytic hemoglobin. (D) ADAMTS13 activity in the presence of various concentrations of Chylomicron. (E) ADAMTS13 activity in the presence of various titers of rheumatoid factor. The interferants were prepared according to the respective manufacturers' instructions. The sample including each concentration of interferant was prepared as a 1 : 9 (v : v) mixture with interferant solution and plasma sample (low activity: ●, mid activity: ○) or serum sample (low activity: ▲, mid activity: △). ADAMTS13 activity in each sample was measured and the effects of contaminants were analyzed.

13 活性の平均値：6.5～80.0%）であった。

また、ADAMTS13 活性を指標とした日差再現性の CV は 2.6～7.5%（平均値：6.3～78.3%）の範囲であった（Table 1-2）。

3. 希釈直線性試験

検討した 3 種類の血漿検体ともにほぼ原点回帰する良好な直線が得られた（Fig. 3）。

4. 共存物質の影響

ビリルビン F：50mg/dl，ビリルビン C：50mg/dl，溶血ヘモグロビン：500mg/dl，乳ビ 3,000 度及び RF：500IU/ml まで測定に影響は認められなかった（Fig. 4）。

5. 抗凝固剤の影響

EDTA・2Na で強い反応阻害が認められた（Fig. 5 (C)）。一方、ヘパリン、フッ化ナトリウム及びクエン酸においても、測定値に多少影響する結果が認められたが、クエン酸はその影響が最も小さく、通常抗凝固剤として用いられている濃度（血漿中の最終濃度、約 0.7%）ではほとんど測定値に影響しなかった（Fig. 5

(A), (B), (D)）。

6. 臨床検体測定

臨床検体の測定結果は、USS では ADAMTS13 活性が 0.5% 以下～2.7%（平均値±SD=0.9±0.7%，0.5% 以下を全て 0.5% として計算した），USS 保因者群では 7.7～85.3%（平均値±SD=38.9±20.4%），TTP 群で 0.5% 以下～58.1%（平均値±SD=15.9±16.5%，0.5% 以下を全て 0.5% として計算した），健常人では 54.7～134.4%（男性：平均値±SD=94.6±18.4%，女性：平均値±SD=100.6±17.5%）に分布していた（Fig. 6）。

SDS-Agarose ゲル電気泳動法との相関分析の結果、109 例の測定において、相関係数は $r=0.931$ ，回帰式は $Y=0.915X+5.794$ となった（Fig. 7）。

7. 構成試薬の安定性

VWF73 基質は溶解後、2～8℃ 保存で 2 日間、凍結融解は 5 回まで安定であった。その他の試薬は、37℃ 保存で、1 週間安定であることが確認された（data not shown）。

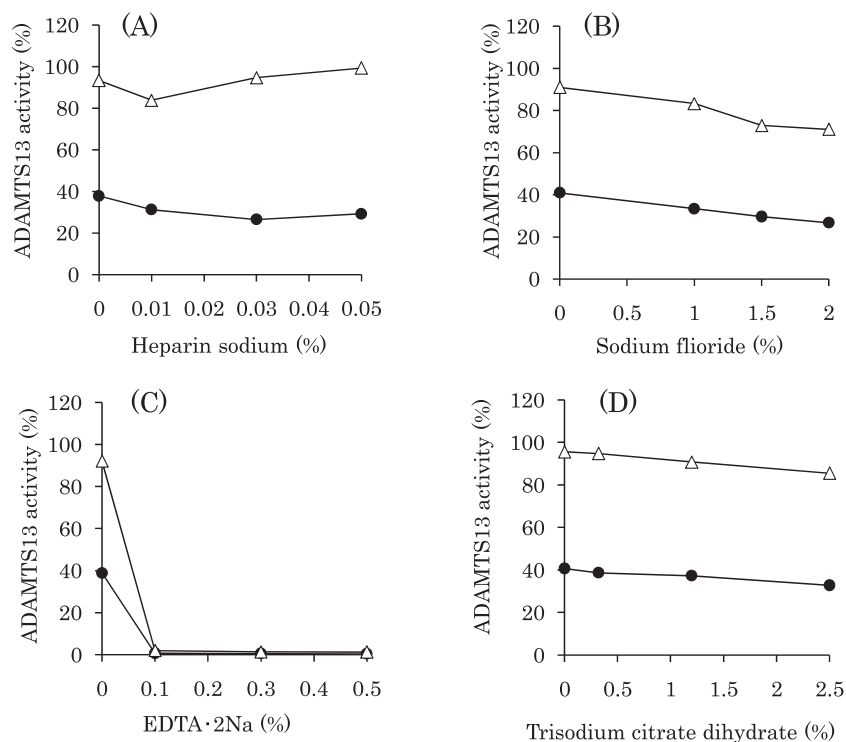


Fig. 5 Effect of various anticoagulants on ADAMTS13 activity as assessed by ELISA

(A) ADAMTS13 activity in the presence of various concentrations of heparin sodium. (B) ADAMTS13 activity in the presence of various concentrations of sodium fluoride. (C) ADAMTS13 activity in the presence of various concentrations of EDTA · 2Na. (D) ADAMTS13 activity in the presence of various concentrations of trisodium citrate dihydrate. The sample including each concentration of anticoagulant was prepared as a 1 : 9 (v : v) mixture with anticoagulant solution and serum sample (low activity: ●, mid activity: △). ADAMTS13 activity in each sample was measured and the effects of anticoagulants were analyzed.

考 察

ADAMTS13 活性の測定は、1998 年に天然の基質である精製 VWF の分解産物をゲル電気泳動で分離解析する方法が開発された後、いくつかの方法が用いられてきた。しかし、2004 年に Kokame ら⁷⁾によって VWF の A2 ドメインの部分ペプチドが好適基質となりうることが報告されて以来、簡便な活性測定法について、いくつか報告されている^{8)~11)}。しかし、通常の病院検査室でルーチン検査に適用できる方法は多くない。その中で、Kato ら⁹⁾の基質の切断生成物を ELISA 法で測定する方法は、特殊な操作や機器を必要としないことから、ルーチン検査に適した方法の 1 つと考えられ、それを応用して安定したデータが得られるようにキット化することは、TTP の診断や血小板輸血時の適否判断などの輸血医療の現場におけるルーチン検査に有用と考えられる。

今回開発した ADAMTS13 活性測定 ELISA は、従来の方法と比べて次のような特徴を持っている。

① ADAMTS13 活性測定のゴールドスタンダード

法である SDS-Agarose ゲル電気泳動法、さらに最近開発された FRETS-VWF73 法や VWF の酵素標識 A2 ドメインを用いる方法¹⁰⁾の最小検出感度が正常血漿の 3~5% であるのに対して、0.4% と超高感度である。このような高感度なキットの有用性は、ADAMTS13 の先天性欠損症である患者の ADAMTS13 活性が本キットの測定に於いて 0.5% 以下~2.7%、一方、臨床的に全く血栓症のエピソードを有しない USS 患者家族群の ADAMTS13 活性が 7.7~85.3% に分布していたことを考え合わせると、臨床的に 5% 以下の ADAMTS13 活性を正確に測定することが重要であると考えられ、本キットはその要求を満たすに十分な性能を有していると言える。

②測定に 2~3 日要する従来の SDS-Agarose ゲル電気泳動法より大幅に測定に要する時間が短縮され、操作性の点でも、本キットは通常の ELISA 法と何ら変ること事なく平易である。さらに、特殊な測定装置を必要とせず、可視吸光度測定用のプレートリーダーを備えた施設であれば、操作できるという特徴を有する。本

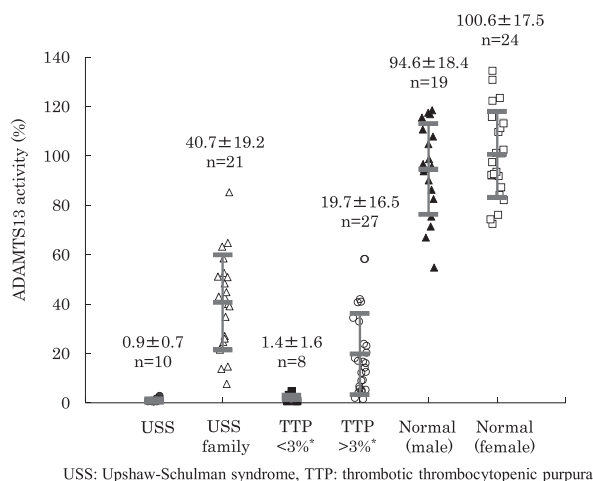


Fig. 6 Plasma levels of ADAMTS13 activity in normal subjects and patients with TTP

A total of 109 samples, including USS patients: 10 samples (●), USS family: 21 samples (△), TTP patients: 35 samples (< 3%: ■, > 3%: ○), and normal individuals: 43 samples (male: ▲, female: □) were assayed.

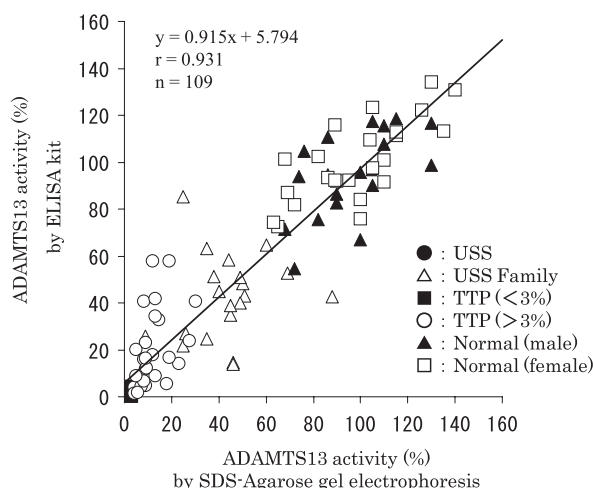


Fig. 7 Correlation between ADAMTS13 activity ELISA and VWF multimer method

The same samples shown in Fig. 6 were assayed by both methods.

キットで採用しているマイクロプレートによるELISA法では、プレートの端側ウェルと内部側ウェルで測定値に差が出ることが観測される場合があることが知られている。しかし、本キットのプレート内全ウェルのバラッキ検定ではそのような現象は認められず、プレート内の均一性が確認され、それに裏付けられるように、同時再現性および日差再現性の結果も十分に許容される範囲と考えられ、信頼性の高いデータを提供できるものと思われる。また、本キットは2~8℃で保存可能で、構成試薬の安定性にも優れていることから、血小板減少症に対する血小板輸血前の確認検査としてのルー

チン検査に適用できると考えられた。

③最近、Studtら¹²⁾は、ADAMTS13が高濃度のヘモグロビン(2g/l以上)の存在下において37℃で1時間インキュベーションすると、ヘモグロビン濃度依存的に失活すること、さらにHovinga及びそのグループ¹³⁾¹⁴⁾はFRETTS-VWF73アッセイでは、高濃度のヘモグロビン及びビリルビン(100μmol/l以上)が有意に低い測定値を与えることを報告している。しかし、本キットでは、通常の臨床検査の測定に影響を及ぼす可能性が知られている共存物質(ビリルビンF, ビリルビンC, 溶血ヘモグロビン, 乳ビ, RF)について、調べた濃度範囲では、これらの物質の影響を受けないことから、高い特異性と正確性を有していると考えられた。また、血漿検体だけでなく血清検体中のADAMTS13活性も測定可能であるが、検体調製条件が異なるため血漿測定値と血清測定値の単純比較は出来ない。FRETTS-VWF73アッセイと本キットとは使用している基質のアミノ酸の基本配列は同一であるが、上記のヘモグロビンやビリルビンによる測定値への影響の違いとして、以下のような原因が考えられる。FRETTS-VWF73アッセイでは測定温度が37℃で行われることから、ヘモグロビン存在下でのインキュベーションによるADAMTS13自身の失活促進、及びFRETTS-VWF73アッセイの測定波長(450nm)とヘモグロビンやビリルビンの吸収波長が近接していることによるフィルター効果により、測定されるべき蛍光強度が減じられて観測される。一方、本キットでは、ADAMTS13の基質切断反応が室温(25℃)で行われること、さらには、測定工程中に洗浄操作が行われることが、より高い特異性に寄与しているものと考えられる。

結 語

本キットは感度、特異性、再現性、希釈直線性など優れた性能及び操作性を有しており、また特殊な測定機器を必要としないことから、TTPの診断や血小板輸血時の適否判断などの輸血医療の現場におけるルーチン検査、また凝固線溶分野の研究において有用な試薬となることが期待される。

筆者¹⁾の3名と雇用関係にある企業の製品を検討した論文です。

文 献

- 1) Fujimura Y, Matsumoto M, Yagi H, et al: von Willebrand Factor-Cleaving Protease and Upshaw-Schulman Syndrome. *Int J Hematol*, 75: 25-34, 2002.
- 2) 藤村吉博: ADAMTS13-TMAの診断と血小板輸血の重要指標一. *日本血栓止血学会誌*, 17: 144-164, 2006.

- 3) Tsai HM, Lian EC: Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med*, 339: 1585—1594, 1998.
- 4) Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al: von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med*, 339: 1578—1584, 1998.
- 5) Böhm M, Vigh T, Scharrer I: Evaluation and clinical application of a new method for measuring activity of von Willebrand factor-cleaving metalloprotease (ADAMTS 13). *Ann Hematol*, 81: 430—435, 2002.
- 6) Gerritsen HE, Turecek PL, Schwarz HP, et al: Assay of von Willebrand factor (vWF)-cleaving protease based on decreased collagen binding affinity of degraded vWF: a tool for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP). *Thromb Haemost*, 82: 1386—1389, 1999.
- 7) Kokame K, Matsumoto M, Fujimura Y, et al: VWF73, a region from D1596 to R1668 of von Willebrand factor, provides a minimal substrate for ADAMTS-13. *Blood*, 103: 607—612, 2004.
- 8) Kokame K, Nobe Y, Kokubo Y, et al: FRETs-VWF73, a first fluorogenic substrate for ADAMTS13 assay. *Br J Haematol*, 129: 93—100, 2005.
- 9) Kato S, Matsumoto M, Matsuyama T, et al: Novel monoclonal antibody-based enzyme immunoassay for determining plasma levels of ADAMTS13 activity. *Transfusion*, 46: 1444—1452, 2006.
- 10) Wu JJ, Fujikawa K, Lian EC, et al: A rapid enzyme-linked assay for ADAMTS13. *J Thromb Haemost*, 3: 1—8, 2005.
- 11) Jin M, Cataland S, Bissell M, et al: A rapid test for the diagnosis of thrombotic thrombocytopenic purpura using surface enhanced laser desorption/ionization time-of-flight (SELDI-TOF)-mass spectrometry. *J Thromb Haemost*, 4: 333—338, 2006.
- 12) Studt JD, Johanna A, Kremer-Hovinga JA, et al: Fatal congenital thrombotic thrombocytopenic purpura with apparent ADAMTS13 inhibitor: in vitro inhibition of ADAMTS13 activity by hemoglobin. *Blood*, 105: 542—544, 2005.
- 13) Kremer-Hovinga JA: ADAMTS13 activity measurement: comparison of FRETs-VWF73 and other static assays 2006. 2006 Scientific Subcommittee Reports.
- 14) Meyer SC, Sulzer I, Lammle B, et al: Hyperbilirubinemia interferes with ADAMTS-13 activity measurement by FRETs-VWF73 assay: diagnostic relevance in patients suffering from acute thrombotic microangiopathies. *J Thromb Haemost*, 5: 866—867, 2007.

DEVELOPMENT OF ADAMTS13 ACTIVITY ELISA KIT AND EVALUATION OF ITS PERFORMANCE

*Shin Itoh*¹⁾, *Shigekazu Yamamoto*¹⁾, *Tsukasa Hayashi*¹⁾, *Seiji Kato*²⁾, *Hisahide Hiura*³⁾,
*Masanori Matsumoto*²⁾ and *Yoshihiro Fujimura*²⁾

¹⁾Kainos Laboratories, Inc.

²⁾Department of Blood Transfusion Medicine, Nara Medical University

³⁾Japan Clinical Laboratories, Inc.

Abstract:

ADAMTS13 specifically cleaves von Willebrand factor (VWF), which is a haemostatic factor, and hydrolyzes the peptide bond between Tyr1605-Met1606 in the VWF-A2 domain. The development of a mouse monoclonal antibody recognizing the C-terminal edge residue Tyr1605, the enzymatic cleavage site of the VWF-A2 domain, enabled the direct assay of the products cleaved by ADAMTS13. An ADAMTS13 activity ELISA kit based on this principle was developed, and its fundamental performance was studied.

The minimum detection limit was 0.4% of the normal detection limit. The intra- and inter- reproducibility study showed the results of CVs as 1.1-4.7% and 2.6-7.5%, respectively. The ideal linearity extrapolated to the original point was obtained in a dilution test. No interference with the ADAMTS13 activity assay was observed at the tested concentrations in the presence of various interferants such as hemoglobin, bilirubin, chylomicron, and rheumatoid factor. EDTA completely inhibited ADAMTS13 activity.

ADAMTS13 activities of 109 plasma samples were measured using this assay kit. The samples from Upshaw-Schulman syndrome (USS), Thrombotic Thrombocytopenic Purpura (TTP), USS carrier, and normal samples showed assay values 0.5-2.7%, 0.5-58.1%, 7.7-85.3%, and 54.7-134.4%, respectively. The test kit has been proven to have a sufficient clinical discriminate ability for diagnostic testing. We observed good correlation between this method and the SDS-Agarose gel electrophoresis method ($r = 0.931$).

This assay kit can be used for routine laboratory test in blood transfusion medicine and clinical laboratory practice.

Keywords:

ADAMTS13, von Willebrand factor, Thrombotic thrombocytopenic purpura, Platelet transfusion, activity-ELISA