

# 全自動血液凝固測定装置 CN-6000 における活性化部分トロンボプラスチン時間キット レボヘム™ APTT SLA の基礎的検討

下村 大樹\*<sup>1</sup>, 河野 紋\*<sup>1</sup>, 高田 旬生\*<sup>1</sup>, 高田 章美\*<sup>1</sup>, 上田 香織\*<sup>2</sup>, 熊野 穰\*<sup>3</sup>,  
嶋田 昌司\*<sup>1</sup>, 上岡 樹生\*<sup>1</sup>

\*1 公益財団法人 天理よろづ相談所病院 臨床検査部：奈良県天理市三島町 200 (〒 632-8552)

\*2 シスメックス株式会社 大阪支店

\*3 HYPHEN BioMed, SAS

新たに発売された活性化部分トロンボプラスチン時間キット レボヘム™ APTT SLA (シスメックス株式会社：以下、Rev, シスメックス) の基礎的検討を行った。同時再現性、日差再現性、オンボード安定性は結果に問題なく、ロット間差は十分に小さかった。136 検体を用いて設定した基準範囲は Rev が活性化部分トロンボプラスチン時間キット トロンボチェック APTT-SLA (シスメックス：以下、TC) より短縮傾向を示した。凝固因子感受性は、希釈試験 (*in vitro*) で Rev は TC より第 V 因子、第 VIII 因子、第 IX 因子、第 X 因子および第 XII 因子における低濃度域の感受性が高かった。臨床検体 (*in vivo*) による各種凝固因子低下検体は、第 VIII 因子活性 1% 未満 13 検体において Rev が TC より延長傾向を示した。第 VIII 因子インヒビターの感受性も同様であり、Rev は第 VIII 因子の低濃度域に対する感受性が高いことが示された。肝合成能低下検体の感受性は、Rev が TC に比べ凝固時間に有意な短縮を認めたが、健康人ボランティア 35 検体の平均値との ratio は同等であった。ループスアンチコアグラント (Lupus Anticoagulant：以下、LA) の感受性は、Rev が TC に比べ有意に延長し、希釈ラッセル蛇毒時間 (dilute Russell's Viper Venom Time：以下、dRVVT) ratio との相関性も良好であり、LA に対する高い感受性を示した。未分画ヘパリンの反応性は、*in vitro* で Rev が TC に比べ濃度依存性に著しく延長し、*in vivo* でも Rev が TC に比べ延長傾向を示した。*in vivo* は *in vitro* よりも乖離が小さかったが、未分画ヘパリン血中濃度が 0.3 U/mL を超えるとき、ratio は Rev が TC に比べ約 1.2 倍高値を示した。直接経口抗凝固薬 (Direct Oral Anticoagulants) の反応性は、ダビガトラン服用検体で 2 試薬の凝固時間の相関性が良好であり、いずれの試薬とも濃度依存性に同等の延長傾向を示した。一方、直接第 Xa 因子阻害薬であるリバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン服用検体は各血中濃度と APTT に相関性を認めなかった。アルガトロバンの反応性は、Rev が TC に比べ凝固時間、ratio とともに短縮傾向を示した。ナファモスタットメシル酸塩への反応性は、Rev が TC に比べ凝固時間、ratio とともに延長傾向を示した。以上の結果より、Rev は併行精度が高く、ロット間差が非常に小さいデータ管理に適した試薬であり、LA ならびに低濃度の凝固因子低下 (特に VIII 因子) を検出しやすいことが示唆された。しかし、TC と反応性が異なる薬剤があり、特に未分画ヘパリンは血中濃度が 0.3 U/mL を超えると TC との乖離が生じることに留意し、試薬の切り替えにあたっては自施設で試薬間のデータを比較し、事前に臨床側に周知を行うことが重要である。

キーワード

活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT), 合成リン脂質, エラグ酸, CN-6000

## はじめに

活性化部分トロンボプラスチン時間 (Activated Partial Thromboplastin Time: 以下, APTT) は、血液凝固スクリーニング検査の一つとして日常の臨床検査に用いられる。内因系凝固因子と共通系凝固因子のはたらきを反映し、それらの異常を検出するほか、LA の検出、未分画ヘパリンのモニタリングなど、現在では多様な性能が APTT 測定に求められている<sup>1)</sup>。

個々の APTT 測定試薬における組成の違い (リン脂質・活性化剤) が試薬間差を生み出しており、APTT 測定の標準化を阻んでいる。また、秒数報告であるがゆえに、他の検査項目に比べ原料由来の試薬ロット間差も課題となっている。

今回、合成リン脂質とエラグ酸を原料とした活性化部分トロンボプラスチン時間キット レボヘム™ APTT SLA (シスメックス株式会社: 以下, Rev, シスメックス) が発売されたため、従来試薬である活性化部分トロンボプラスチン時間キット トロンボチェック APTT-SLA (シスメックス: 以下, TC) と比較検討を行った。

## 実験材料および方法

### 1. 対象・試料

天理よろづ相談所病院臨床検査部に提出された患者検体 396 例、健常人ボランティア 35 名の計 431 検体、および市販 22 サンプルを対象とした。検体は 3.2 %クエン酸ナトリウム加血を 2,000 g × 10 分間遠心分離して得られた血漿を用いた。なお、本研究は、天理よろづ相談所病院倫理審査委員会の承認 (承認番号 1070) およびシスメックス株式会社倫理委員会の承認 (登録番号 2019-76) を得て実施した。

### 2. 測定装置

全自動血液凝固測定装置 CN-6000 (シスメックス: 以下, CN-6000) を使用した。

### 3. 測定試薬

検討試薬として Rev, 対照試薬として TC を用いた。いずれも合成リン脂質およびエラグ酸を原料とする試薬である。なお、薬剤血中濃度の測定は表 1 に示す試薬を使用した。

表 1. 使用試薬

測定項目	使用試薬	使用キャリブレーター	メーカー
APTT (検討)	活性化部分トロンボプラスチン時間キット レボヘム™ APTT SLA	—	シスメックス
	レボヘム 0.025 M 塩化カルシウム液	—	
APTT (対照)	活性化部分トロンボプラスチン時間キット トロンボチェック APTT-SLA	—	シスメックス
	0.02 M 塩化カルシウム液	—	
未分画ヘパリン血中濃度	BIOPHEN™ Heparin LRT	BIOPHEN™ UFH Calibrator	HYPHEN BioMed
ダビガトラン血中濃度	BIOPHEN™ DTI	BIOPHEN™ Dabigatran Calibrator	HYPHEN BioMed
リバーロキサバン血中濃度	BIOPHEN™ DiXal	BIOPHEN™ Rivaroxaban Calibrator	HYPHEN BioMed
アピキサバン血中濃度	BIOPHEN™ DiXal	BIOPHEN™ Apixaban Calibrator	HYPHEN BioMed
エドキサバン血中濃度	BIOPHEN™ DiXal	BIOPHEN™ Edoxaban Calibrator	HYPHEN BioMed
dRVVT	dRVVT 試薬 A	—	A 社

## 4. 検討方法

### 1) 再現性

#### ① 同時再現性

同時再現性は、コアグ QAP コントロール IX・IIX (シスメックス) および自家製プール血漿 (正常域および異常域) を連続 10 回測定して、平均値と SD より変動係数 (以下, CV %) を求めた。

#### ② 日差再現性

日差再現性は、自家製プール血漿 (正常域および異常域) を連続 22 日間測定して、平均値と SD より CV % を求めた。

### 2) オンボード安定性

CN-6000 装置内に試薬を終日開栓した状態で設置し、自家製プール血漿 (正常域および異常域) を 19 日間測定して、安定性を評価した。なお、日差再現性の上限値を安定性の判定基準とした。

### 3) 基準範囲の設定

健常人ボランティア 35 検体ならびに当院外来にて眼科, 耳鼻咽喉科, 歯科口腔外科, 形成外科の術前検査で抗凝固薬の服用がなく, PT, APTT, CRP, アルブミン, コリンエステラーゼが基準範囲内であった患者 101 検体の計 136 検体を用いて設定した。対象の年齢は中央値 63 歳 (6 ~ 85 歳), 男女比は 81 : 55 であった。方法は、基準範囲計算プログラム MCP-STAT ソフト Ver. 6 (シスメックス) を用いたパラメトリック法により求めた。

### 4) ロット間差

健常人ボランティア 35 検体ならびに患者 240 検体の計 275 検体について、検討試薬および対照試薬の各連続 3 ロットを用いて測定を行い、検体種別毎に 3 ロットの最大差を比較した。

### 5) 凝固因子感受性

#### ① 希釈試験 (*in vitro*)

自家製プール血漿 (正常域) を凝固因子欠乏血漿にて 1 ~ 256 倍までの希釈系列を作製し、検討試薬および対照試薬にて測定し、原倍との ratio を 2 試薬で比較した。凝固因子欠乏血漿には、第 II 凝固因子キット トロンボチェック Factor II, 第 V 凝固因子キット

トロンボチェック Factor V, 第 X 凝固因子キット トロンボチェック Factor X, 第 VIII 凝固因子キット トロンボチェック Factor VIII, 第 IX 凝固因子キット トロンボチェック Factor IX, 第 XI 凝固因子キット トロンボチェック Factor XI, 第 XII 凝固因子キット トロンボチェック Factor XII (シスメックス) を用いた。

#### ② 凝固因子低下

市販検体を含む各種凝固因子低下検体 34 検体 (第 VIII 因子低下 16 検体 [ $< 0.9 \sim 20.8 \%$ ], 第 IX 因子低下 2 検体 [ $< 0.9 \%$ ], 第 XI 因子低下 3 検体 [ $8.7 \sim 13.0 \%$ ], 第 XII 因子低下 4 検体 [ $< 10 \%$ ], von Willebrand factor (以下, VWF) 低下 7 検体 [VWF 活性  $< 10 \%$ ], 第 VIII 因子活性 [ $2.4 \sim 9.3 \%$ ], prekallikrein (以下, PK) 欠乏 1 検体, 第 X 因子低下 1 検体 [ $1.1 \%$ ]) について、検討試薬および対照試薬にて測定し、凝固時間を 2 試薬で比較した。

#### ③ 第 VIII 因子インヒビター

第 VIII 因子インヒビター保有 43 検体 ( $> 1.0$  Bethesda Unit/mL, 第 VIII 因子活性  $< 0.9 \sim 23.5 \%$ ) について、検討試薬および対照試薬にて測定し、凝固時間を 2 試薬で比較した。

#### ④ 肝合成能低下

抗凝固薬服用がなく、肝予備能を客観的に評価する指標である ALBI grade<sup>2)</sup> が 2 または 3 の患者 20 検体について、検討試薬および対照試薬にて測定し、凝固時間、健常人 35 検体の平均値からの ratio を 2 試薬で比較した。統計解析には、Wilcoxon の符号付き順位検定を用いた。

### 6) LA 感受性

健常人ボランティア 35 検体における希釈ラッセル蛇毒時間 (dilute Russell's Viper Venom Time : 以下, dRVVT) ratio の Mean + 2SD (1.24) を正常上限と設定し、dRVVT ratio 1.25 以上の患者 74 検体について、凝固時間を 2 試薬で比較した。統計解析には、Wilcoxon の符号付き順位検定を用いた。

7) 薬剤反応性

① 未分画ヘパリン

A) 添加実験 (*in vitro*)

自家製プール血漿 (正常域) にヘパリンナトリウム注を 0.1 ~ 1.0 U/mL の濃度に添加したサンプルを, 検討試薬および対照試薬にて測定し, 凝固時間および無添加 (0 U/mL) との ratio を 2 試薬で比較した。

B) 臨床検体 (*in vivo*)

未分画ヘパリン投与 43 検体 (血中濃度 0.16 ~ 1.04 U/mL) について, 検討試薬および対照試薬にて測定し, 凝固時間および健常人ボランティア 35 検体の平均値との ratio を 2 試薬で比較した。また, 未分画ヘパリン血中濃度を測定し, 2 試薬の凝固時間および ratio と比較した。

② 直接経口抗凝固薬 (Direct Oral Anticoagulants : 以下, DOACs)

ダビガトラン (15 検体), リバーロキサバン (23 検体), アピキサバン (20 検体), エドキサバン (17 検体) の血中濃度が 70 ng/mL 以上 (73.2 ~ 572.5 ng/mL) の患者検体について, 検討試薬および対照試薬にて測定し, 凝固時間を 2 試薬で比較した。

③ アルガトロバン

アルガトロバンが投与されている患者 26 検体について, 検討試薬および対照試薬にて測定し, 凝固時間および健常人ボランティア 35 検体の平均値との ratio を 2 試薬で比較した。

④ ナファモスタットメシル酸塩

ナファモスタットメシル酸塩が投与されている患者 22 検体について, 検討試薬および対照試薬にて測定し, 凝固時間を 2 試薬で比較した。

8) 相関性

431 検体 (検体内訳は表 2) について, 検討試薬および対照試薬にて測定し, 相関性を調べた。

表 2. 相関性に用いた検体内訳

検体内訳	n
健常人ボランティア	35
ループスアンチコアグラント (LA)	74
未分画ヘパリン	44
第 VIII 因子インヒビター	43
ダビガトラン	16
リバーロキサバン	26
アピキサバン	20
エドキサバン	17
ワルファリン + ビタミン K 欠乏	23
肝合成能低下	22
因子低下	34
アルガトロバン	26
ナファモスタットメシル酸塩	22
LA + 抗凝固薬	7
未分画ヘパリン + ワルファリン	22
総計	431

## 結 果

### 1) 再現性

同時再現性は、いずれも CV% が 2% 以下であった (表 3 A)。日差再現性は、CV% が 2% 以下であった (表 3 B)。

### 2) オンボード安定性

19 日間の測定において、日差再現性の上限値 (正常域 27.6 sec, 異常域 55.9 sec) を超えたのは、正常域が 16 日目, 異常域が 7 日目であった (図 1)。なお, 検討期間中, CN-6000 の使用環境条件 (相対湿度: 30 ~ 85 %) を下回るときがあった。

### 3) 基準範囲

基準範囲は, Rev が 22.7 ~ 30.7 sec, TC が 25.0 ~ 34.6 sec であった (図 2)。

### 4) ロット間差

275 検体の検体内訳, Rev および TC の 3 ロット平均の中央値 (sec), 差の最大値 (sec) を表 4 に示す。ロット間の相関は, Rev がいずれも  $r = 0.999$  以上, TC が  $r = 0.993 \sim 0.995$  となった (データ未提示)。3 ロット間の最大差について, 最大差の 10 ~ 90 % TILE は Rev が 0.3 ~ 2.1 sec, TC が 0.5 ~ 4.0 sec であった。さらに, 最大差が

表 3. 再現性

#### A. 同時再現性

試料	コアグ QAP コントロール		自家製プール血漿	
	IX	IIX	正常域	異常域
単 位	sec	sec	sec	sec
N	10	10	10	10
Mean	25.90	51.36	26.35	53.27
SD	0.183	0.580	0.097	1.055
CV%	0.70	1.13	0.37	1.98

#### B. 日差再現性

試料	自家製プール血漿	
	正常域	異常域
単 位	sec	sec
N	22	22
Mean	27.29	54.58
SD	0.193	0.876
CV%	0.71	1.60

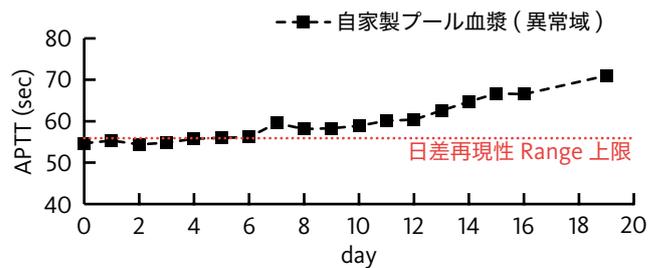
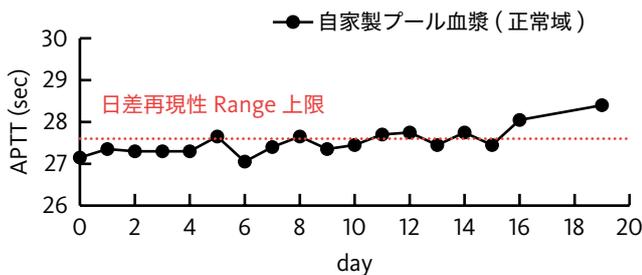


図 1. オンボード安定性

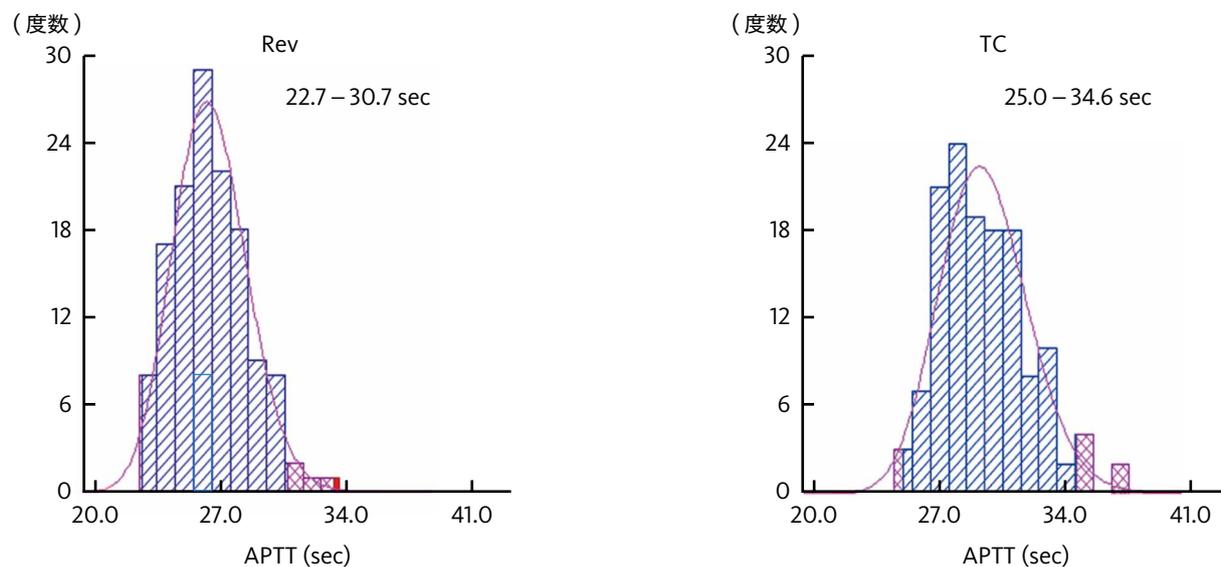


図2. 基準範囲

表4. ロット間差

検体内訳	n	3ロット平均の中央値 (sec)		3ロットの差の最大値 (sec)	
		Rev	TC	Rev	TC
健常人ボランティア	35	27.1	29.8	0.8	2.0
ワルファリン + VK 欠乏	18	53.0	49.8	3.6	7.1
未分画ヘパリン	31	47.0	48.7	2.5	7.1
未分画ヘパリン + ワルファリン	17	62.4	53.2	9.1	3.3
因子低下	2	65.4	68.8	2.5	1.8
肝合成能低下	20	36.3	42.8	1.3	4.3
第VIII因子インヒビター	14	84.0	87.1	2.7	16.4
ループスアンチコアグラント (LA)	46	58.0	48.4	5.3	7.7
リバーロキサバン	16	41.2	45.3	1.5	3.9
アピキサバン	14	33.5	37.2	1.1	3.8
エドキサバン	15	35.4	36.6	1.1	6.1
ダビガトラン	15	53.1	54.7	2.0	4.2
アルガトロバン	18	41.1	48.6	2.7	10.8
ナファモスタットメシル酸塩	14	74.7	60.9	5.5	11.0
総計	275				

5 sec 以上を示した検体は、Revが6検体 (2.2%)、TCが21検体 (7.6%)であった (図3)。Revが5 sec 以上を示した検体はいずれも100 secを超えた検体で、未分画ヘパリンとワルファリン混合3検体、未分画ヘパリン1検体、ナファモスタットメシル酸塩1検体、LA1検体であった。

5) 凝固因子感受性

① 希釈試験 (*in vitro*)

第V因子、第VIII因子、第IX因子、第X因子および第XII因子はRevがTCに比べ低濃度域のratioが高く、第II因子および第XI因子はRevとTCがほぼ同等のratioを示した (図4)。

② 凝固因子低下

第VIII因子低下16検体およびVWF低下

7検体の計23検体 (第VIII因子活性0.9~20.8%)における2試薬の凝固時間の相関性は  $y = 1.285x - 15.18$  ( $r = 0.976$ ) であり、活性1%未満 (13検体) になるとRevがTCより延長傾向を示した (図5A)。さらに、第XII因子は活性3%未満 (3検体) でRevがTCよりも延長傾向を示した。また、第X因子は1検体のみであるが、活性1.1%でRev (222.0 sec) がTC (135.0 sec) に比べ著しく延長した (図5B)。

③ 第VIII因子インヒビター

2試薬の凝固時間の相関性は、 $y = 1.402x - 23.32$  ( $r = 0.961$ ) となり、第VIII因子活性1%未満でRevがTCよりも延長傾向を示した (図5C)。

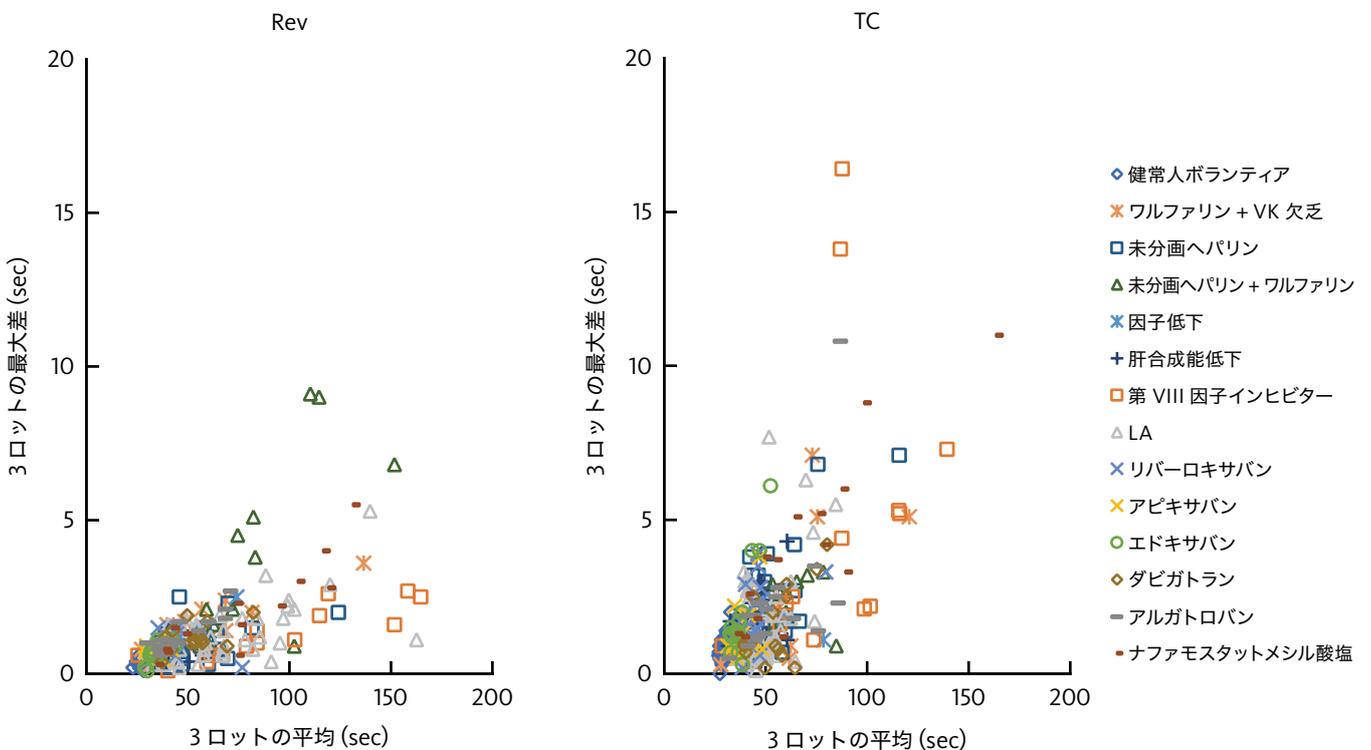
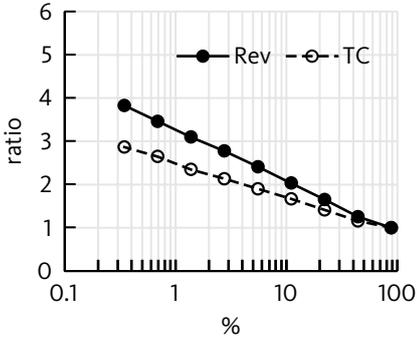


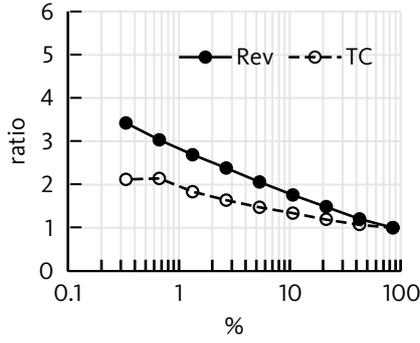
図3. ロット間差

内因系

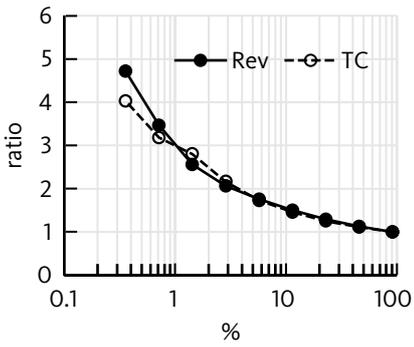
第 VIII 因子感受性



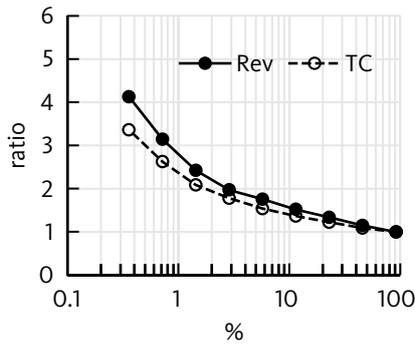
第 IX 因子感受性



第 XI 因子感受性

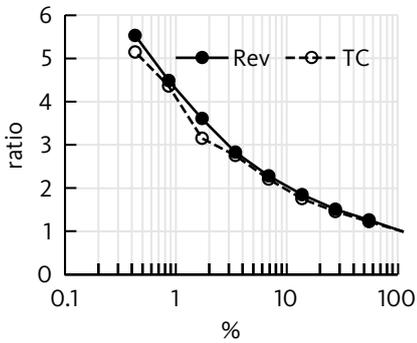


第 XII 因子感受性

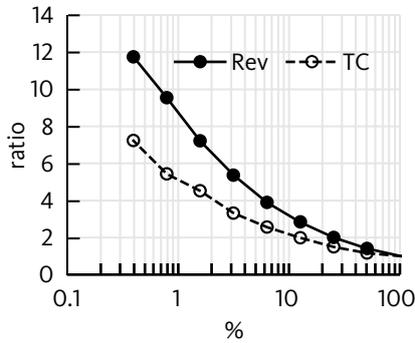


共通系

第 II 因子感受性



第 V 因子感受性



第 X 因子感受性

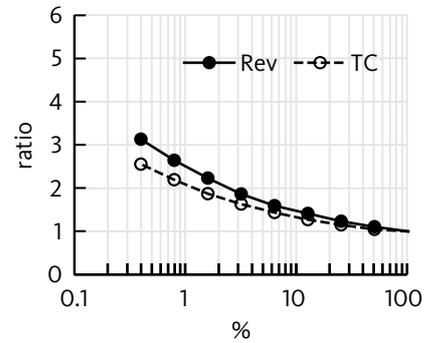


図4. 凝固因子感受性 (希釈試験 (in vitro))

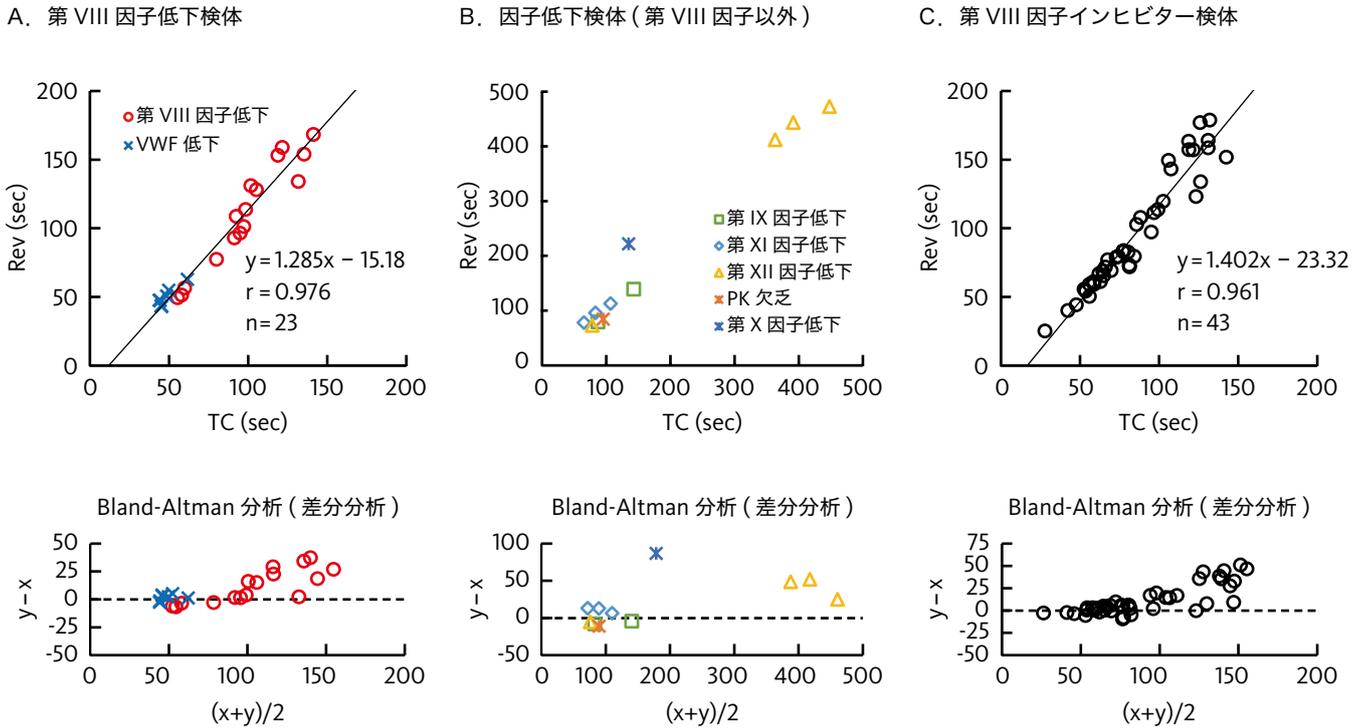


図5. 凝固因子低下および第 VIII 因子インヒビターへの反応性

④ 肝合成能低下

2 試薬の凝固時間の相関性は、 $y = 0.918x - 1.37$  ( $r = 0.902$ ) となり、Rev が TC に比べ有意に短縮した ( $P < 0.001$ )。一方、Rev と TC の ratio の中央値はそれぞれ 1.34 と 1.45 で有意差を認めなかった ( $P = 0.152$ ) (図 6)。

6) LA 感受性

2 試薬の凝固時間の相関性は、 $y = 2.096x - 38.18$  ( $r = 0.846$ ) であり、Rev が TC に比べ有意に延長し ( $P < 0.001$ )、延長するほど大きく乖離した (図 7A)。さらに、Rev は TC より dRVVT ratio との相関性が良好であり、LA 感受性に優れていた (図 7B, 7C)。また、3) で算出した基準範囲上限 (Rev : 30.7 sec, TC : 34.6 sec) と 74 検体を照合したところ、TC は全例が基準範囲上限を超えていたが、Rev は 1 例のみ基準範囲内であった。当該 1 例の dRVVT ratio は 1.54 であり、抗凝固療法を施行されておらず、眼科受診で膠原

病の診断に至っていない患者であった (他の抗リン脂質抗体関連検査は未実施)。

7) 薬剤反応性

① 未分画ヘパリン

A) 添加実験 (*in vitro*)

2 試薬の凝固時間および ratio は、未分画ヘパリン濃度が 0.3 U/mL のとき Rev が 2.5 倍、TC が 1.8 倍、0.7 U/mL のとき Rev が 9.6 倍、TC が 4.2 倍の延長となり、*in vitro* における未分画ヘパリンの感受性は Rev が著しく高かった (図 8A)。

B) 臨床検体 (*in vivo*)

2 試薬の凝固時間の相関性は、 $y = 1.240x - 9.73$  ( $r = 0.863$ )、健常人 35 検体の平均値 (Rev : 27.1 sec, TC : 29.8 sec) との ratio の相関性は、 $y = 1.364x - 0.36$  ( $r = 0.863$ ) であった (図 8B)。未分画ヘパリン血中濃度と両試薬の凝固時間の相関性は、Rev が  $y = 70.707x + 27.78$  ( $r = 0.744$ )、

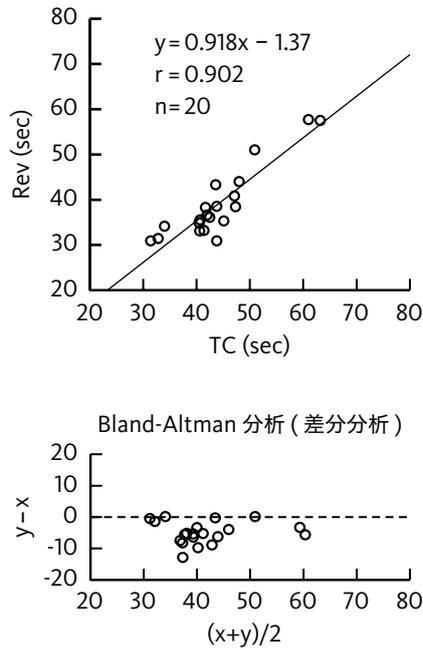
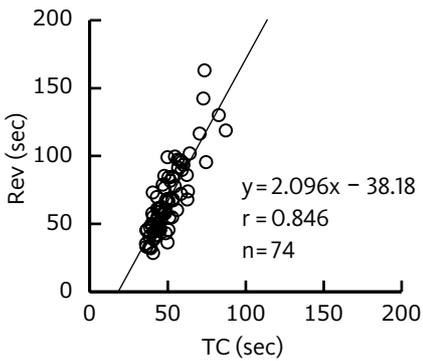
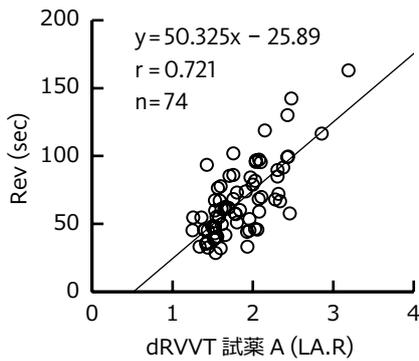


図6. 肝合成能低下への反応性

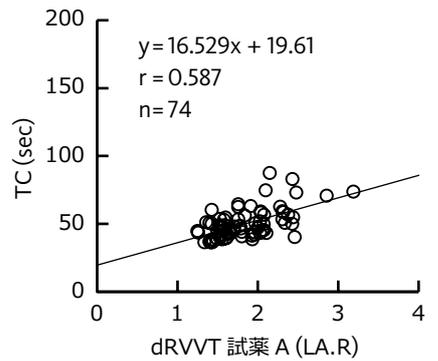
A. APTT (sec) の相関



B. dRVVT との相関 (Rev)



C. dRVVT との相関 (TC)



Bland-Altman 分析 (差分分析)

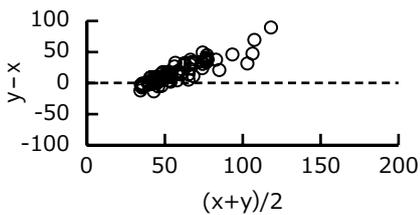
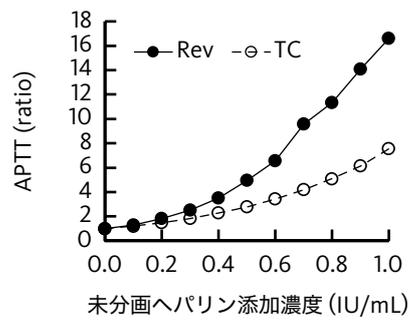
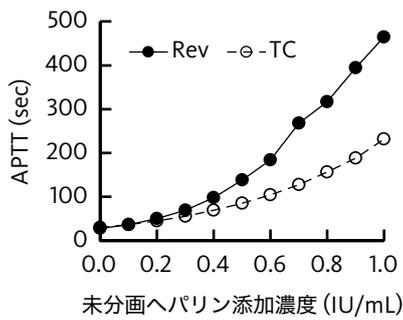


図7. LA 感受性

TCが  $y = 36.679x + 38.12$  ( $r = 0.555$ ), ratioは Revが  $y = 2.609x + 1.03$  ( $r = 0.713$ ), TCが  $1.231x + 1.28$  ( $r = 0.661$ ) であり, RevのほうがTCより高い相関性を認めた(図8C). RevとTCの凝固時間ならびにratioは傾きがそれぞれ約1.2, 1.4であったが, ヘパリン血中濃度との相関性はRevの傾きがTCに比べ約1.9, 2.1倍と高い結果となった. 未分画ヘパリン血中濃度別に0.16~0.29 U/mLの17検体, 0.30~

0.70 U/mLの22検体に分け, 2試薬におけるratioの相関性を調べたところ, それぞれ  $y = 0.937x + 0.20$  ( $r = 0.820$ ),  $y = 1.202x - 0.08$  ( $r = 0.810$ ) であり, 血中濃度別に差異を認めた(図8D). また, 臨床検体は未分画ヘパリン濃度が0.3 U/mLのときRevが1.8倍, TCが1.6倍, 0.7 U/mLのときRevが2.9倍, TCが2.1倍の延長と添加実験より低く, 両試薬の乖離が小さかった.

A. 添加実験 (in vitro)



B. 臨床検体 (in vivo) における2試薬の相関性

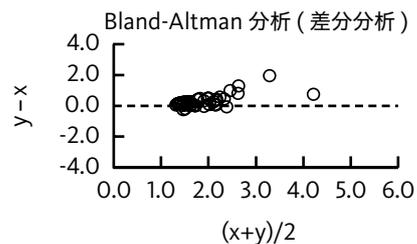
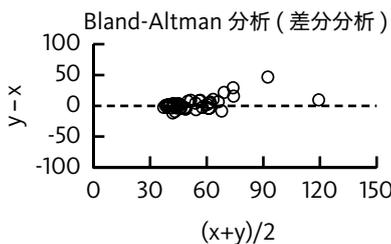
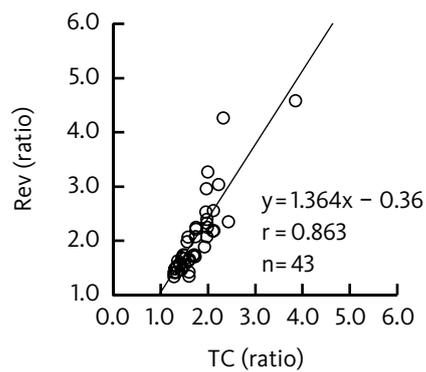
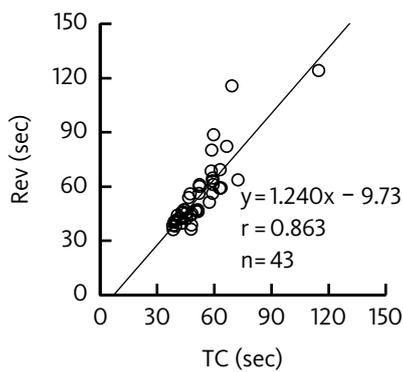
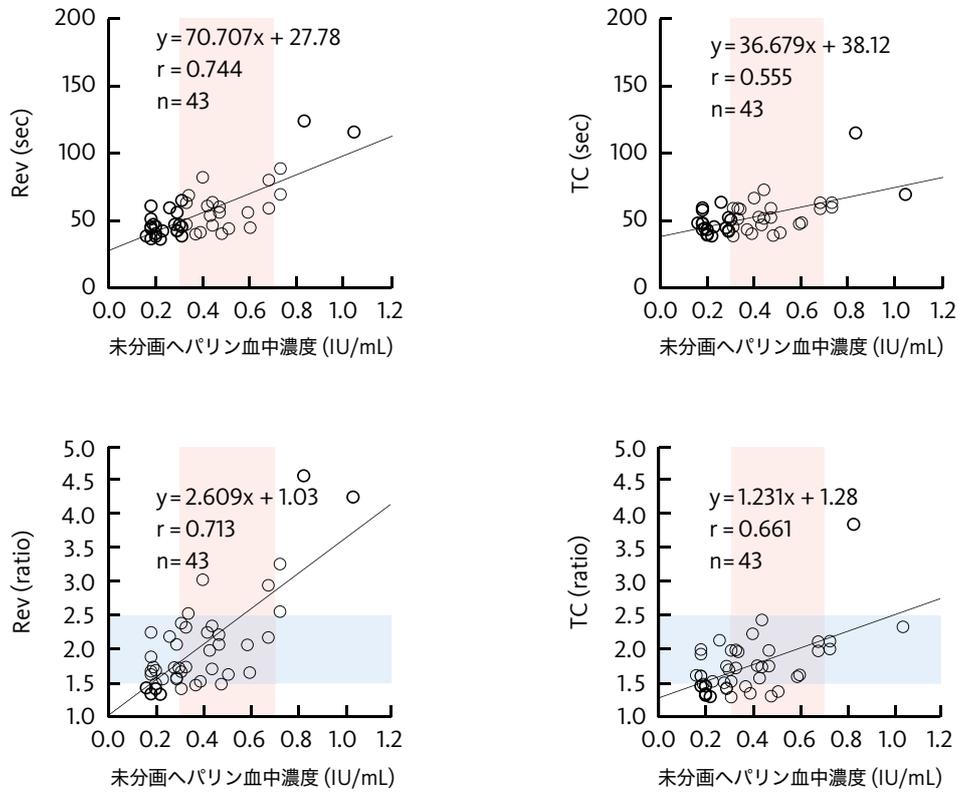


図8. 未分画ヘパリンへの反応性

C. 臨床検体 (in vivo) における未分画ヘパリン血中濃度と2試薬の相関性



D. 未分画ヘパリン血中濃度とAPTT ratioとの相関性 (血中濃度別)

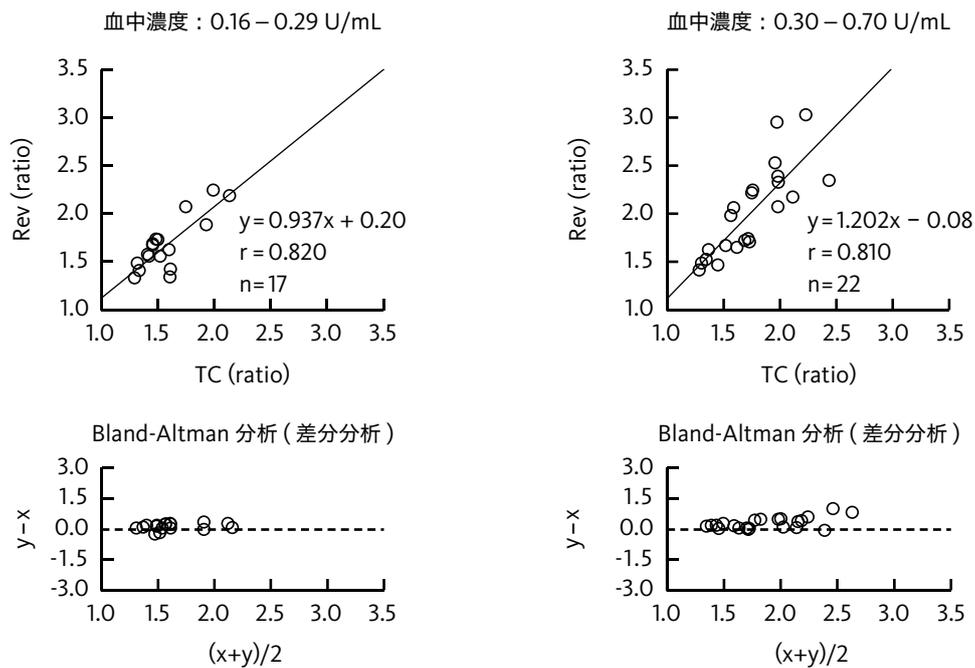


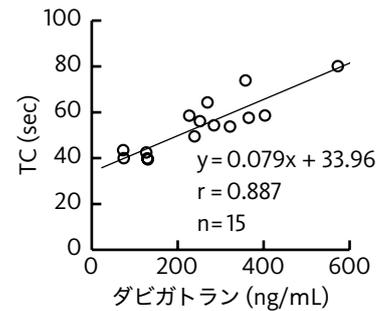
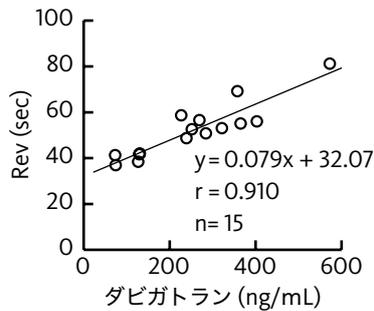
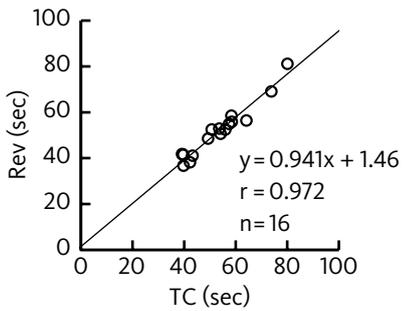
図8. 未分画ヘパリンへの反応性 (続き)

② DOACs

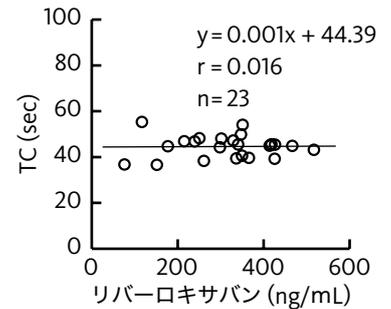
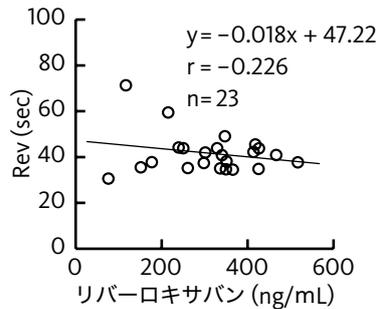
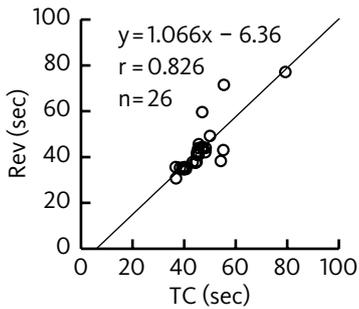
ダビガトラン服用患者検体における2試薬の凝固時間の相関性は  $y = 0.941x + 1.46$  ( $r = 0.972$ ) と良好であり、ダビガトラン血中濃度との相関性は2試薬ともに濃度依存的に同等

の延長を示した(図9A)。リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン服用検体は2試薬の凝固時間の相関性を認めたが、各血中濃度との相関性は2試薬ともに濃度依存的な延長を認めなかった(図9B, 9C, 9D)。

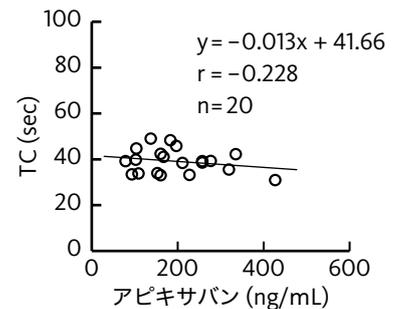
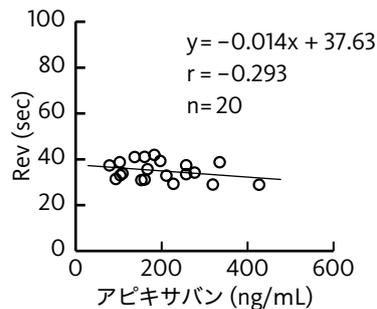
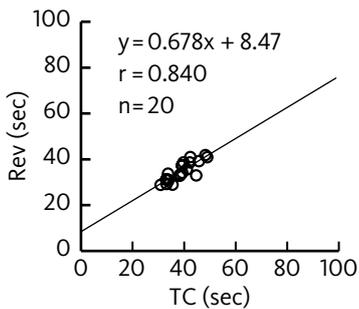
A. ダビガトラン服用検体



B. リバーロキサバン服用検体



C. アピキサバン服用検体



D. エドキサバン服用検体

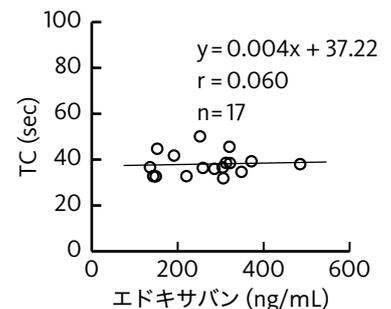
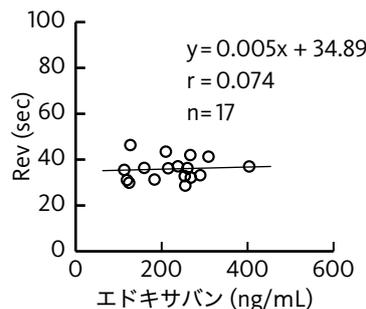
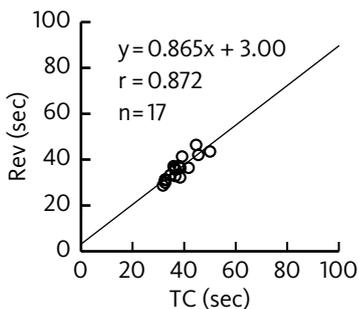


図9. DOACs への反応性

③ アルガトロバン

アルガトロバン投与患者検体における2試薬の凝固時間の相関性は  $y = 0.789x + 3.31$  ( $r = 0.835$ ), ratioの相関性は  $y = 0.867x + 0.12$  ( $r = 0.973$ ) と良好であったが, RevがTCに比べ短縮傾向を示した(図10A).

④ ナファモスタットメシル酸塩

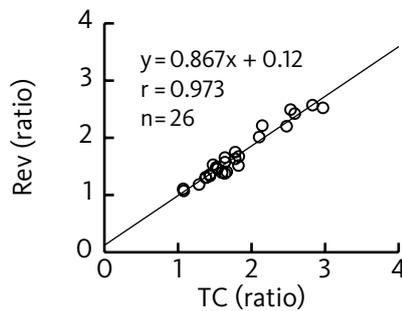
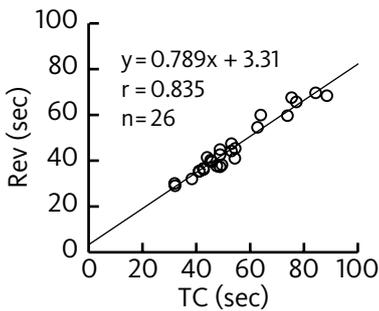
ナファモスタットメシル酸塩投与患者検体

における2試薬の凝固時間の相関性は  $y = 2.019x - 49.19$  ( $r = 0.966$ ) と良好であったが, 凝固時間が50 sec以上でRevがTCに比べ10 secを超える延長を示した(図10B).

8) 相関性

431 検体における2試薬の凝固時間の相関性は,  $y = 1.214x - 6.10$  ( $r = 0.944$ ) であった(図11).

A. アルガトロバン投与検体



B. ナファモスタットメシル酸塩投与検体

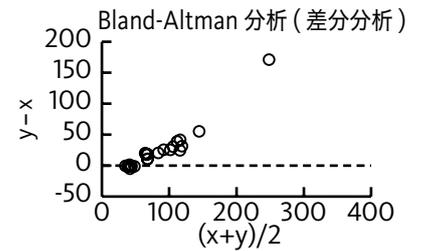
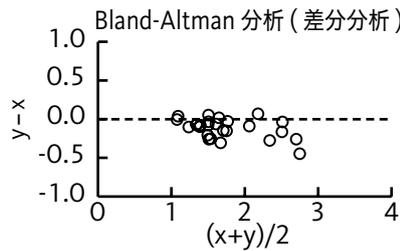
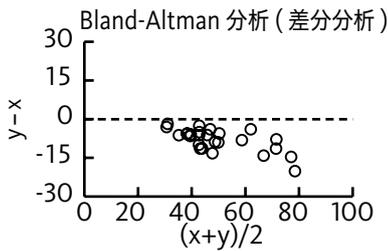
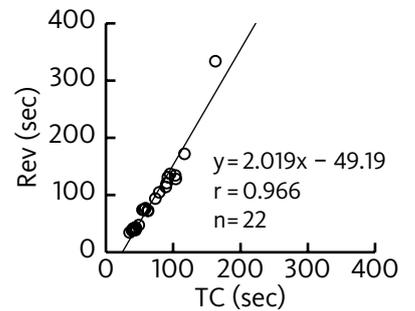


図10. アルガトロバン, ナファモスタットメシル酸塩への反応性

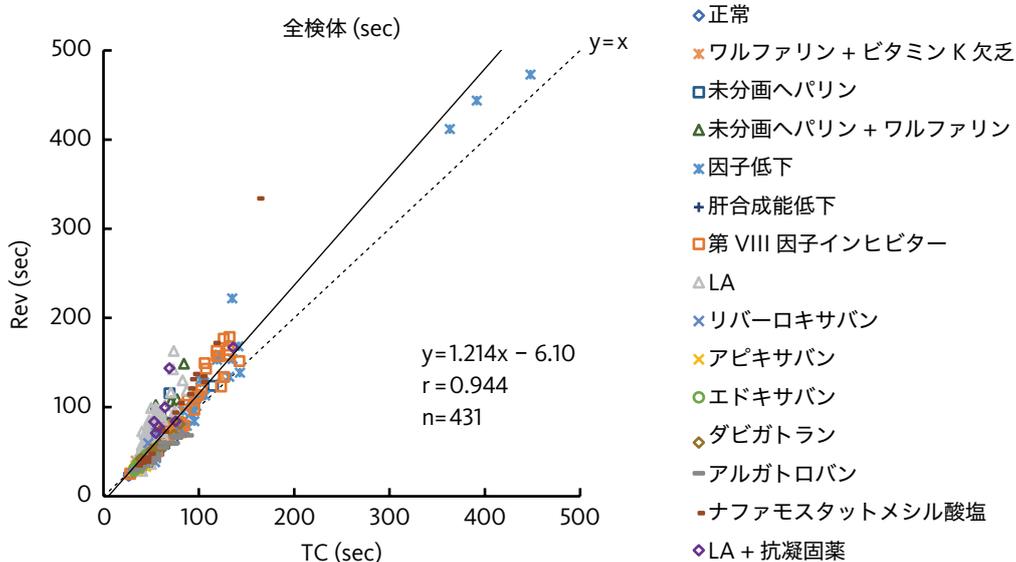


図11. 全検体の相関性

## 考 察

今回、我々は新たに発売された合成リン脂質とエラグ酸を原料とした Rev の基礎的検討を行った。同時再現性および日差再現性は良好であり、オンボード安定性は7日目に異常域が日差再現性の Range を超えた。評価期間は冬期であり、CN-6000 の使用環境条件（相対湿度：30～85%）を下回るときがあったことが影響した可能性は否定できないが、そのような時期でも終日開栓状態で6日間安定したことはルーチン使用として十分である。

基準範囲の算出において、健常人ボランティア 35 検体のほかに術前検査 101 検体を加えて設定した。術前検査検体は、凝固異常罹患の低い 4 診療科に限定し、凝固異常を招く病態が存在しないことを確認して測定した。術前検査検体を用いた理由として、幅広い年齢層のデータによる設定、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が基準範囲の設定に 120 サンプルを推奨しているためである<sup>3)</sup>。Rev の基準範囲 (22.7～30.7 sec (幅 8.0 sec)) は TC (25.0～34.6 sec (幅 9.6 sec)) よりも短縮傾向で範囲も狭くなった。それにより、後述する各種の感受性・反応性と相互して、凝固異常検体および抗凝固薬投与検体との凝固時間の隔たりが大きくなり、異常データを検出しやすくなると考えられた。

ロット間差において、各 3 ロット間の相関で Rev の相関係数は TC よりも高く、Rev で 5 sec 以上のロット差を認めた検体はいずれも 100 sec を超えた検体であった。合成リン脂質を使用した APTT 試薬は、ウサギ脳由来リン脂質や大豆由来リン脂質に比べロット間差が小さいことが報告されている<sup>4)</sup>。対照試薬である TC も合成リン脂質を使用しているためロット間差が小さい試薬であるが<sup>5)</sup>、Rev は合成リン脂質の粒子の均質化およびエラグ酸と金属イオンの錯体形成が均一となるような製造工程が組み込まれているため、さらにロット間差が小さくなったと考えられた。これより、Rev はロット間差が非常に小さく、データ管理に適した試薬であるといえる。

凝固因子の感受性において、*in vitro* の希釈試験で Rev は TC より第 V 因子、第 VIII 因子、第 IX 因子、第 X 因子および第 XII 因子の低濃度域の感受性が高かった。臨床検体では、複合して凝固因子

が低下することが多々あるため、単一因子での評価方法が臨床検体の凝固因子に対する感受性のすべてを反映しない。しかし、血友病 A ならびに血友病 B のような単一因子が低下する病態では、当該因子の感受性は重要である。第 VIII 因子低下検体および第 VIII 因子インヒビター検体の臨床検体においても、Rev は TC より第 VIII 因子活性が 1% 未満で延長傾向を示し、より重篤な病態を反映することが示唆された。他の因子低下検体は 4 検体未満と n 数が少なく、両試薬の傾向を明らかにするため、今後 n 数を増やして検討する必要があると考えられた。肝合成能低下検体は、Rev が TC に比べ凝固時間が有意に短縮したが、健常人ボランティア 35 検体の平均値との ratio は同等の値を示し、基準範囲からの隔たりに大きな差異を認めなかった。

LA の感受性において、Rev は TC に比べ有意に延長し、dRVVT ratio との相関性が良好で、LA の感受性が高いことが示された。Rev および TC ともに活性化剤はエラグ酸が使用されており、APTT 試薬の LA 感受性は活性化剤（エラグ酸、シリカなど）の種類よりもリン脂質濃度に依存することが示されている<sup>6)</sup>。また、APTT 試薬中のフォスファチジルセリン（以下、PS）含有量が LA 感度を左右し、PS 含有量が少ないと LA 感受性が高くなることが報告されている<sup>7)</sup>。これより、Rev の PS 含有量は TC に比べ少ないことが推察される。なお、最新の国際血栓止血学会の LA 検査のガイドラインでは、LA スクリーニング用の APTT 試薬として活性化剤は特に制限しておらず、感度が高い試薬を使用すべきとしている<sup>8)</sup>。また、dRVVT ratio が陽性かつ Rev の APTT が基準範囲内となった検体を 1 例認め、Rev に限らず APTT 測定の一般的な注意事項として、ごく一部の検体は凝固時間の延長を示さないことに注意する必要がある。

未分画ヘパリンの反応性において、添加実験 (*in vitro*) で Rev は TC に比べ著しく延長したのに対し、臨床検体 (*in vivo*) で Rev が TC に比べ延長傾向を示したものの *in vitro* よりも延長度が低く、両試薬の乖離が小さかった。ヘパリン感度における *in vitro* と *in vivo* の挙動の違いは兼ねてから報告されており、臨床検体での評価が重要といわれている<sup>9)</sup>。

ヘパリンはそのマイナスチャージの性質上、血管内皮細胞、単球などの細胞、およびアルブミン、血小板第4因子(Platelet Factor 4: PF4)などのタンパク質と結合する<sup>10)</sup>。*in vivo*では、ヘパリンが生体内に豊富にある細胞やタンパク質と十分に結合して抗凝固の機能を示すものの、*in vitro*では試験管内に限られたタンパク質とのみ結合して抗凝固能を発揮すると考えられ、この反応系の違いが*in vivo*と*in vitro*のヘパリンの挙動の違いとして表れる一つの要因と想定される。未分画ヘパリン血中濃度との相関性は、RevがTCよりも高い相関性を示した。肺血栓栓症および深部静脈血栓症の診断、治療、予防に関するガイドライン(2017年改訂版)<sup>11)</sup>では、「抗Xa因子ヘパリン濃度が0.3~0.7単位/mLに相当する治療域、即ちAPTTが対照値の1.5~2.5倍となるように調節する。」と記載されているが、同時に、「APTTを1.5~2.5倍にコントロールする根拠は強固ではなく、動物実験データと主に長年の臨床経験に基づいている。またAPTT試薬には多様性があり、個々の凝固因子に対する反応性が異なるため、注意を要する。」とも記載されている。本検討結果より、未分画ヘパリン血中濃度とAPTTの相関性の回帰式から求めた0.3~0.7単位/mLに相当するAPTT凝固時間は、Revが49.0~77.3 sec(健常人ボランティア35検体の平均値とのratio 1.8~2.9)に対し、TCは49.1~63.8 sec(健常人ボランティア35検体の平均値とのratio 1.6~2.1)と差異を認めた。さらに、血中濃度0.16~0.29 IU/mLでは両試薬のratioが同等であったが、0.30~0.70 IU/mLではRevがTCに比べ約1.2倍であった。我々は本検討で使用した測定装置以外の装置で検討したところ、両試薬の未分画ヘパリン投与検体での差がさらに大きくなったことを経験している(データ未提示)。未分画ヘパリンはAPTTを目安に投与量が調整されるため<sup>12)</sup>、試薬の切り替えにあたっては自施設で試薬間のデータを比較し、未分画ヘパリンの反応性が異なることを臨床側に十分に注意喚起する必要がある。最近では外傷などに伴い血管内皮細胞の傷害があると第VIII因子が血管内皮細胞から流入してAPTT短縮を示すことが報告されており、特に重度のCoronavirus Disease 2019(COVID-19)感染症患

者でもその傾向が認められたと報告がある<sup>13, 14)</sup>。COVID-19の重症度判断や予後予測として凝固線溶マーカーの重要性が報告されているが<sup>15~17)</sup>、これに加えて重症患者のExtracorporeal Membrane Oxygenation(ECMO)実施時のヘパリンモニタリングも極めて重要であり、APTT試薬の重要性が高まっていると考えられ、各施設でのより詳細な検討が求められる。

DOACsへの反応性は、直接トロンビン阻害薬のダビガトラン服用患者検体における2試薬の凝固時間は相関性が良好であり、いずれの試薬とも血中濃度依存的に同等の延長傾向を示した。ダビガトランの薬剤添付文書には、「日本人を含む第III相国際共同試験においては、トラフ時APTTが80秒を超える場合は大出血が多かった。」との記載があり<sup>18)</sup>、今回RevとTCでは80 secに相当するダビガトラン血中濃度は同等であった。一方、直接第Xa因子阻害薬であるリバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン服用検体における2試薬の凝固時間は相関性を認めたが、ダビガトランとは異なり血中濃度依存的な延長を認めなかった。APTTは直接第Xa因子阻害薬の一般的な治療濃度、特に低濃度での治療をモニターするには不十分であると報告されており<sup>19)</sup>、本検討結果においても血中濃度のモニタリングには不適であると考えられた。

選択的抗トロンビン剤であるアルガトロバンの反応性において、凝固時間、ratioともにRevはTCに比べ短縮傾向を示した。本邦におけるヘパリン起因性血小板減少症(Heparin-Induced Thrombocytopenia: HIT)患者の血栓治療の場合、「APTTを指標として基準値(投与前値)の1.5倍から3.0倍(ただし100秒以下)になるように投与量を調節する。」との記載がある<sup>20)</sup>。また、APTTが目標とする範囲に達するまでは、適宜APTTを測定し、目標とする範囲に達した後は1日に1回APTTを測定することと記載されているため<sup>21)</sup>、試薬切り替えにあたってはアルガトロバンの反応性が異なることを臨床側に注意喚起する必要がある。

蛋白分解酵素阻害剤であるナファモスタットメシル酸塩への反応性において、凝固時間が50 sec以上でRevはTCに比べ延長した。ナファモスタットメ

シル酸塩は血液浄化の抗凝固薬としても使用されているが、血液凝固のカスケードが一連の酵素反応によって成立していることから、凝固系各酵素の作用を抑制することで凝固の進行を抑制する薬剤である。全血活性化凝固時間 (Activated Clotting Time : ACT) が抗凝固モニタリングとして使用されているが<sup>22, 23)</sup>、APTT が測定されることがあり、ナファモスタットメシル酸塩の反応性の隔たりを臨床側に伝える必要がある。

最後に、患者検体 431 検体における Rev と TC の凝固時間の相関性は良好であったが、前述した各種感受性ならびに薬剤反応性の違いにより、LA、第 VIII 因子低下 (低濃度) に対する感受性、未分画ヘパリン、ナファモスタットメシル酸塩の反応性が Rev は TC よりも高いため、全体の傾きが大きくなった。

## 結 語

Rev は、併行精度が高く、ロット間差が非常に小さいデータ管理に適した試薬であり、LA ならびに低濃度の凝固因子低下 (特に VIII 因子) を検出しやすいことが示唆された。一方、TC と反応性が異なる薬剤があり、特に未分画ヘパリンの反応性が異なる点に注意が必要で、試薬の切り替えにあたっては自施設で試薬間のデータを比較し、事前に臨床側に周知することが重要である。

全自動血液凝固測定装置 CN-6000 : 医療機器製造販売届出番号 28B1X10014000001

活性化部分トロンボプラスチン時間キット レボヘム™ APTT SLA : 体外診断用医薬品製造販売認証番号 301ABEZX00005000

活性化部分トロンボプラスチン時間キット トロンボチェック APTT-SLA : 体外診断用医薬品製造販売承認番号 21300AMZ00523000

第 II 凝固因子キット トロンボチェック Factor II : 体外診断用医薬品製造販売届出番号 28A2X00030000013

第 V 凝固因子キット トロンボチェック Factor V : 体外診断用医薬品製造販売承認番号 20700AMZ00232000

第 X 凝固因子キット トロンボチェック Factor X : 体外診断用医薬品製造販売届出番号 28A2X00030000017

第 VIII 凝固因子キット トロンボチェック Factor VIII : 体外診断用医薬品製造販売届出番号 28A2X00030000015

第 IX 凝固因子キット トロンボチェック Factor IX : 体外診断用医薬品製造販売届出番号 28A2X00030000016

第 XI 凝固因子キット トロンボチェック Factor XI : 体外診断用医薬品製造販売承認番号 20700AMZ00236000

第 XII 凝固因子キット トロンボチェック Factor XII : 体外診断用医薬品製造販売承認番号 20700AMZ00237000

## 参考文献

- 1) 山崎 哲, 内藤澄悦, 静 怜子, 家子正裕. APTT 検査およびループスアンチコアグラント検査の標準化. 血栓止血誌. 2016 ; **27** (6) : 636-643.
- 2) Johnson PJ, Berhane S, Kagebayashi C, et al. Assessment of Liver Function in Patients With Hepatocellular Carcinoma : A New Evidence-Based Approach-The ALBI Grade. J Clin Oncol. 2015 ; **33** (6) : 550-558.
- 3) CLSI : Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP28-A3c. Wayne, PA Clinical and Laboratory Standards Institute ; 2008.
- 4) Okuda M, Yamamoto Y. Usefulness of synthetic phospholipid in measurement of activated partial thromboplastin time : a new preparation procedure to reduce batch difference. Clin Lab Haematol. 2004 ; **26** (3) : 215-223.
- 5) 下村大樹, 前川芳明, 山本慶和, 松尾取二. 合成リン脂質を用いたトロンボチェック APTT-SLA 試薬の基礎的検討 : データファイ・APTT 試薬との比較. 医学検査. 2006 ; **55** (8) : 940-944.
- 6) Kumano O, Ieko M, Naito S, et al. APTT reagent with ellagic acid as activator shows adequate lupus anticoagulant sensitivity in comparison to silica-based reagent : LA sensitivity of ellagic acid reagent. J Thromb Haemost. 2012 ; **10** (11) : 2338-2343.
- 7) 奥田昌宏, 菊川紀弘, 上村八尋. 合成リン脂質を用いた新しい APTT 試薬の開発. 日本検査血液学会雑誌. 2002 ; **3** (1) : 124-131.
- 8) Devreese KMJ, de Groot PG, de Laat B, et al.

- Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis : Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection and interpretation. *J Thromb Haemost.* 2020 ; **18** : 2828–2839.
- 9) Favaloro EJ, Kershaw G, Mohammed S, et al. How to Optimize Activated Partial Thromboplastin Time (APTT) Testing : Solutions to Establishing and Verifying Normal Reference Intervals and Assessing APTT Reagents for Sensitivity to Heparin, Lupus Anticoagulant, and Clotting Factors. *Semin Thromb Hemost.* 2019 ; **45** (1) : 22–35.
- 10) Hirsh J, Raschke R. Heparin and low-molecular-weight heparin : the Seventh ACCP Conference on Antithrombotic and Thrombolytic Therapy. *Chest.* 2004 ; **126** (3 Suppl) : 188S–203S.
- 11) 伊藤正明, 他. 肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断, 治療, 予防に関するガイドライン (2017年改訂版). 2020. [https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2017/09/JCS2017\\_ito\\_h.pdf](https://www.j-circ.or.jp/cms/wp-content/uploads/2017/09/JCS2017_ito_h.pdf) (アクセス日: 2021年5月2日)
- 12) 森田隆雄, 矢坂正弘. 今月の特集2 薬の効果・副作用と検査値. 抗血栓薬. 臨床検査. 2019 ; **63** (1) : 60–67.
- 13) Burggraf M, Payas A, Kautner MD, et al. Evaluation of clotting factor activities early after severe multiple trauma and their correlation with coagulation tests and clinical data. *World J Emerg Surg.* 2015 ; **10** : 43.
- 14) White D, MacDonald S, Bull T, et al. Heparin resistance in COVID-19 patients in the intensive care unit. *J Thromb Thrombolysis.* 2020 ; **50** (2) : 287–291.
- 15) Thachil J, Tang N, Gando S, et al. ISTH interim guidance on recognition and management of coagulopathy in COVID-19. *J Thromb Haemost.* 2020 ; **18** (5) : 1023–1026.
- 16) Song JC, Wang G, Zhang W, et al. Chinese expert consensus on diagnosis and treatment of coagulation dysfunction in COVID-19. *Mil Med Res.* 2020 ; **7** (1) : 19.
- 17) Kumano O, Ieko M, Komiyama Y, et al. Characterization of fibrin/fibrinogen degradation products reagents and their utility in critical care patients with enhanced fibrinolysis. *Int J Lab Hematol.* 2020.
- 18) プラザキサカプセル 75 mg / プラザキサカプセル 110 mg 添付文書. 日本ベーリンガーインゲルハイム株式会社. 2020年5月改訂 (第1版)
- 19) Dunois C. Laboratory Monitoring of Direct Oral Anticoagulants (DOACs). *Biomedicines.* 2021 ; **9** (5) : 445.
- 20) 宮田茂樹, 山本晴子. ヘパリン起因性血小板減少症 (HIT) の治療. 血栓止血誌. 2008 ; **19** (2) : 195–198.
- 21) スロンノン HI 注 10 mg/2 mL 付文書. 第一三共株式会社. 2020年3月改訂 (第10版)
- 22) 瓜生康平, 海津嘉蔵. II. 血液浄化療法 - 方法論 - 血液透析 抗凝固剤の種類と使用法. 日本臨床. 2004 ; **62** (増5) : 163–167.
- 23) コアヒビター注射用 10 mg 添付文書. エイワイファーマ株式会社. 2014年11月改訂 (第2版)

# The Basic Evaluation of Revohem™ APTT SLA in the Automated Coagulation Analyzer CN-6000

Daiki SHIMOMURA<sup>\*1</sup>, Aya KOUNO<sup>\*1</sup>, Tokio TAKATA<sup>\*1</sup>, Akimi TAKADA<sup>\*1</sup>, Kaori UEDA<sup>\*2</sup>,  
Osamu KUMANO<sup>\*3</sup>, Masashi SHIMADA<sup>\*1</sup> and Mikio KAMIOKA<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> Department of Laboratory Medicine, Tenri Hospital, 200 Mishima, Tenri, Nara, 632-8552, Japan

<sup>\*2</sup> Osaka Branch, Sysmex Corporation

<sup>\*3</sup> HYPHEN BioMed, SAS

---

*The basic performance of the newly developed reagent "Revohem™ APTT SLA" (hereinafter referred to as Rev: Sysmex Corporation) was evaluated. The results of within-run precision, between-day precision and on-board stability were good, and lot-to-lot variability was also acceptable. The reference interval established by 136 samples was a little lower than that of Thrombocheck APTT-SLA (hereinafter referred to as TC: Sysmex) as the reference reagent. The coagulation factor sensitivity of Rev was higher than that of TC at low-activity range in factor V, VIII, IX, X, and XII by in vitro examination using artificial deficient plasma. A comparison between Rev and TC obtained in vivo clinical samples was also performed. The clotting times of Rev were more prolonged than TC in factor VIII deficiency and inhibitor with less than 1% ; it indicated that the sensitivity of Rev was higher in low activity of factor VIII. Although the clotting times of liver disease samples in Rev were shorter than TC, the ratio calculated from the mean of 35 normal samples was similar to that of TC. The clotting times of lupus anticoagulant (LA) samples in Rev were significantly longer than those of TC and the correlation against dilute Russell's viper venom time (dRVVT) was good ; it indicated that the sensitivity of Rev was higher. While the reactivity to unfractionated heparin examined in vitro spiked samples showed Rev had much higher reactivity than TC, the discrepancy became smaller in the examination of in vivo clinical heparin samples, and Rev showed about 1.2-fold value of TC in the heparin sample with more than 0.3 U/mL. In the samples from patients taking direct oral anticoagulants (DOACs), the correlation between Rev and TC was good, and it was recognized that the clotting times were dependent on the drug concentrations. The correlations between APTT clotting times and drug concentrations in rivaroxaban, apixaban and edoxaban were poor. While the clotting times and ratios of Rev were lower than those of TC in argatroban samples, the reactivity to nafamostat mesylate was higher in Rev, Rev showed good repeatability and smaller lot-to-lot variability, and it was considered that the reagent was acceptable for data management. The data indicated that the sensitivity to LA and factor deficiency in low activity was high and it would be useful as a screening reagent. On the other hand, the sensitivity to some drugs was different from TC, especially for unfractionated heparin, and it was recognized that there was a discrepancy over 0.3 U/mL concentration. It is important to obtain the data between current and new reagents and confirm the difference in clinical samples. It is also important to notify medical doctors of these data if necessary.*

## Key Words

Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), Synthetic Phospholipids, Ellagic Acid, CN-6000