

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 におけるクロスミキシングテストによる病態 鑑別方法の検討

下村 大樹*¹, 松本 智子*², 河野 紋*¹, 高田 旬生*¹, 高田 章美*¹, 熊野 穰*³,
上田 香織*⁴, 北野 圭介*⁵, 新井 信夫*⁵, 嶋田 昌司*¹, 上岡 樹生*¹

*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 学校法人 天理よろづ相談所学園 天理医療大学 医療学部

*3 HYPHEN BioMed, SAS

*4 シスメックス株式会社 大阪支店

*5 シスメックス株式会社 診断薬エンジニアリング本部 タンパク技術グループ

活性化部分トロンボプラスチン時間（以下、APTT）の延長は、凝固因子低下および凝固因子インヒビターなどの出血を呈する症例でみられる一方、血栓症の危険因子であるループスアンチコアグラント（以下、LA）の存在する場合にも認められる。これらの病態鑑別として APTT によるクロスミキシングテストが用いられている。クロスミキシングテストの実施にあたっては、その病態鑑別能の向上のため LA 感度の高い APTT 試薬が推奨されている。本研究では、高い LA 感度を有す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（シスメックス株式会社：以下、レボヘム APTT SLA）を用いてクロスミキシングテストを実施して各検体での比較、解析を行った。

対象は、LA 陽性検体 34 例、凝固因子低下検体 54 例、凝固第 VIII 因子インヒビター検体 8 例、および抗凝固療法検体 39 例を用いた。なお、ワルファリン服用例は凝固因子低下検体、未分画ヘパリン、direct oral anticoagulants、アルガトロバン、およびナファモスタットメシル酸塩投与例は抗凝固療法検体として分類した。グラフ判定方法は目視判定法と定量化指標として Index of Circulating Anticoagulant（以下、ICA）を用いた。

目視判定法において、LA 陽性検体は 27 例が即時型インヒビター、7 例が判定困難、凝固因子低下検体は 52 例が凝固因子低下、2 例が判定困難、および凝固第 VIII 因子インヒビター検体は 7 例が遅延型インヒビター、1 例が判定困難の結果であった。抗凝固療法検体群では薬剤によりパターンの相違を確認した。目視判定法と ICA の一致率は、LA 検体が 79%、凝固因子低下検体が 96%、凝固第 VIII 因子インヒビターが 63%であり、凝固因子低下検体ならびに LA 陽性検体で高い一致率を示した。

クロスミキシングテストは LA、凝固因子低下および凝固因子インヒビターなどの APTT 延長原因を推定する有用な方法である。本研究において、レボヘム APTT SLA は目視判定法のグラフパターンに基づいて、それぞれの検体の大部分を判定することが可能であり、十分な性能を有すると考えられた。また、判定困難な例では、定量化指標を補助的に用いた慎重な判定が望ましい。

キーワード

活性化部分トロンボプラスチン時間（APTT）、クロスミキシングテスト、凝固因子低下、ループスアンチコアグラント（LA）、凝固因子インヒビター

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、内因系凝固因子のスクリーニング、抗凝固薬である未分画ヘパリンのモニタリングに用いられる凝固検査の一つである。これらの用途に加え、抗リン脂質抗体症候群 (Antiphospholipid Syndrome: 以下, APS) の責任抗体の一つであるループスアンチコアグラント (Lupus Anticoagulant: 以下, LA) および内因系凝固因子に対する凝固因子インヒビターの検出に用いられる¹⁾。APTT の異常はその凝固時間の延長により認識されるが、同じ APTT の凝固時間延長であっても、臨床症状として内因系凝固因子の活性低下および凝固因子インヒビターは出血傾向を示す一方、LA 陽性例は血栓傾向を示す。それぞれの明確な臨床所見を有する典型的な症例では鑑別が難しくないように考えられるが、実際は出血または血栓症状の乏しい症例も多く存在するため、臨床所見のみでは APTT 延長の原因を特定することが困難な場合がある^{2, 3)}。このような APTT 延長症例の病態鑑別方法として用いられる検査がクロスミキシングテストである。クロスミキシングテストは、正常検体と患者検体を複数の比率で混和して APTT を測定、得られた凝固時間をグラフ上にプロットし、グラフパターンから病態を判定する方法である。本法にて各病態を鑑別するためには、検査に用いる APTT 試薬の反応性が重要であり、LA 感度の高い試薬での実施が望ましいとされている⁴⁾。

APTT 試薬の主成分は活性化剤とリン脂質で、試薬の反応性はこれらの組成と濃度の違いに起因すると考えられ、特に LA 感度はリン脂質の組成ならびに濃度が関係していることが報告されている^{5~7)}。また、合成リン脂質を用いた APTT 試薬は、リン脂質原料の純度が高いことから LA 高感度の試薬が多く、広く浸透しつつある^{4, 7)}。今回、シスメックス株式会社 (以下、シスメックス) から新たに開発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: 以下、レボヘム APTT SLA) は合成リン脂質が用いられ、LA 感度の高さが特長であり⁸⁾、クロスミキシングテストにおける病態鑑別能についての検討を行った。本稿では、レボヘ

ム APTT SLA におけるクロスミキシングテストの結果とその解釈方法について報告する。

クロスミキシングテストの概要

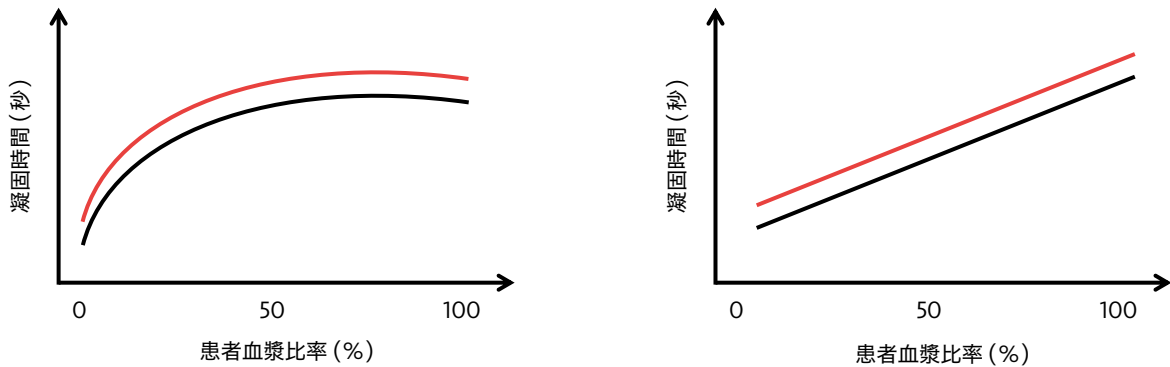
クロスミキシングテストは、正常血漿と患者血漿を一定比率で混和した後に APTT 凝固時間を測定し、測定結果をグラフ上にプロットしてグラフパターンから病態を鑑別する診断補助方法である。クロスミキシングテストには、正常血漿と患者血漿の混和直後に凝固時間測定を行う即時型と、混和後に 37°C で 2 時間インキュベーションした後に凝固時間測定を行う遅延型がある。即時型ならびに遅延型がともに上に凸または直線のパターンを示した場合は即時型インヒビター、一方、即時型ならびに遅延型がともに下に凸を示した場合は凝固因子低下と判定する。さらに、遅延型が即時型よりも上に凸のパターンを示した場合は遅延型インヒビターと判定する (図 1)^{9~11)}。正常血漿と患者血漿の混和比率について、即時型は 10:0, 9:1, 8:2, 5:5, 0:10 の 5 ポイント、遅延型は 10:0, 5:5, 0:10 の 3 ポイントが推奨されている (図 2)^{2, 12)}。

クロスミキシングテストのグラフパターンは各病態で異なり、各病態が凝固反応に与える影響が密接に関連している。LA は「個々の凝固因子活性を阻害することなく、リン脂質依存性の凝固反応を阻害する免疫グロブリン」と定義される⁹⁾。即ち、LA は凝固反応を阻害するリン脂質依存性のインヒビターであり、患者血漿中に LA が存在する場合、正常血漿と患者血漿を混和すると LA がリン脂質依存性の凝固反応を阻害することで、凝固時間の延長を示す。クロスミキシングテストでは混合血漿の凝固時間が延長するため、上に凸または直線のパターンを示す (図 1 A)。凝固因子低下は血友病などの先天的な凝固因子低下と肝疾患などの後天的な凝固因子低下の場合がある。この場合、患者血漿は凝固因子活性が低下しているが、正常血漿と混和することで凝固因子が補充されるため、混合血漿の凝固時間は正常血漿に近い値を示し、下に凸のパターンを示す (図 1 B)。凝固因子インヒビターは、後天的に凝固因子に対するインヒビターが生じることで凝固因子活性が低下する。特に、第 VIII 因子に対するインヒ

ピターはIgGが原因であることが多く、時間と温度依存的に凝固因子の活性を阻害するため、正常血漿と患者血漿の混和直後は抗体が十分に反応せず、上

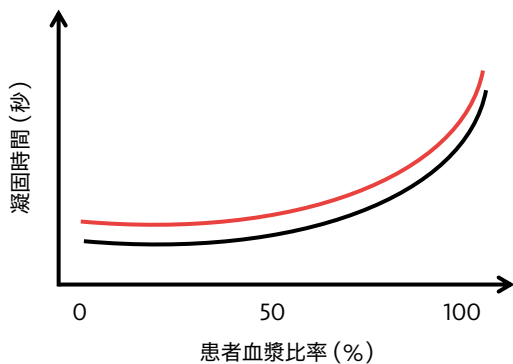
に凸のパターンを明確に呈さないことにしばしば遭遇するが、37°Cのインキュベーションによって2時間後に明確な上に凸のパターンを示す(図1C)。

A. LA 陽性パターン



LA 陽性検体は、即時型で上に凸または直線を示し、遅延型でグラフパターンが大きく変化しないことが特徴である。

B. 凝固因子低下パターン



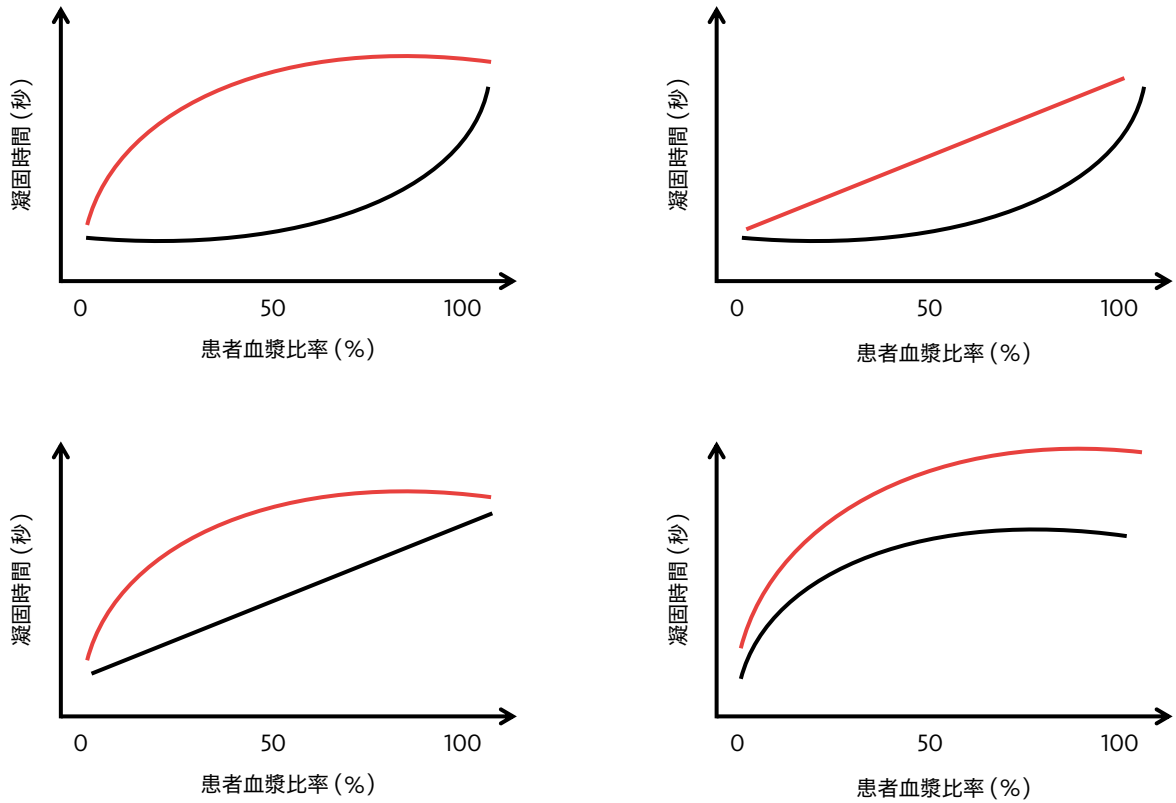
凝固因子低下の検体は、即時型と遅延型ともに下に凸のパターンを示す。特に、50%のポイントでは凝固時間の大幅な短縮を示し、下に凸のパターンとなる。

図1. 各病態のクロスミキシングテストのグラフパターン

黒線は即時型、赤線は遅延型を示す。

(参考文献10)より引用改変)

C. 凝固第 VIII 因子インヒターパターン



凝固第 VIII 因子インヒターを含有する検体は、即時型で下に凸を示し、遅延型で上に凸または直線を示す。また、インヒター力価が著しく高い場合、即時型で直線または上に凸を示し、遅延型でさらに上に凸を示すことがある。

図 1. 各病態のクロスミキシングテストのグラフパターン (続き)

黒線は即時型、赤線は遅延型を示す。
(参考文献 10) より引用改変)

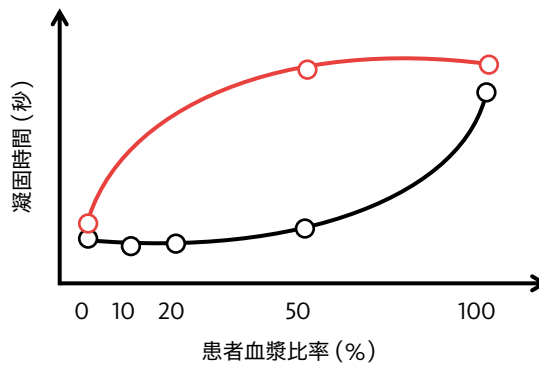


図 2. クロスミキシングテストの推奨ポイント数

黒線は即時型、赤線は遅延型を示す。

黒線と黒丸は即時型のグラフ、赤線と赤丸は遅延型のグラフを示す。即時型は正常血漿：患者血漿 = 10：0, 9：1, 8：2, 5：5, 0：10 の 5 ポイントで、遅延型は 10：0, 5：5, 0：10 の 3 ポイントで実施することが推奨されている。

対象および方法

1. 対象

天理よろづ相談所病院臨床検査部に測定依頼のあったLA陽性、凝固因子低下、凝固因子インヒビター、抗凝固療法中の患者の臨床検体、および人工試料を対象とした。臨床検体は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。

LA陽性検体として、抗凝固療法未施行の患者検体が27例、抗凝固療法中の患者検体が7例（ワルファリン4例、未分画ヘパリン1例、ナファモスタットメシル酸塩1例、リバーロキサバン1例）の計34例を用い、希釈ラッセル蛇毒時間（dilute Russell's Viper Venom Time：以下、dRVVT）が1.3以上の検体と定義した。凝固因子低下検体として、第VIII因子低下1例、第XII因子低下1例、肝不全2例、ワルファリン服用5例、ワルファリンおよび未分画ヘパリン療法5例の計14例を用いた。ワルファリン服用患者検体は凝固第II、VII、IX、X因子が低下するため、凝固因子低下検体として分類した。凝固因子インヒビター検体として、第VIII因子インヒビターを有する患者検体を8例用いた（1.89～123.2 Bethesda Unit/mL：以下、BU/mL）。また、抗凝固療法中の患者検体として、未分画ヘパリン投与9例、Direct Oral Anticoagulants（以下、DOACs）服用としてリバーロキサバン5例、アピキサバン7例、エドキサバン2例、加えてアルガトロバン投与8例、ナファモスタットメシル酸塩投与8例の計39例を用いた。さらに、第II、V、VIII、IX、X、XI、およびXII因子欠乏血漿（シスメックス）と正常血漿としてコアグトロールN（シスメックス）を混和し、凝固因子活性を20%、10%、5%、2.5%、1%、および<1%に調整した試料を凝固因子低下の人工試料とし、凝固点が検出できなかった第II、X因子<1%の試料を除外した計40例を解析に用いた。

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. 測定試薬および装置

試薬はAPTT試薬としてレボヘム APTT SLA、塩化カルシウム溶液としてレボヘム 0.025M 塩化カルシウム液（シスメックス）を用いた。クロスミキシングテストにおける混合用の正常血漿は本検討での使用量が多いため、コアグトロールNを自家製プール血漿と同等の結果が得られることを検証したうえでコアグトロールNを用い、全自動血液凝固測定装置CN-6000（シスメックス：以下、CN-6000）における自動希釈機能によりクロスミキシングテストを実施した。未分画ヘパリンおよびDOACsの血中濃度測定には、BIOPHEN™ Heparin LRT（HYPHEN BioMed）およびBIOPHEN™ DiXaI（HYPHEN BioMed）を用いた。

3. クロスミキシングテストの実施方法

推奨法に従い、即時型は正常血漿：患者血漿 = 10：0、9：1、8：2、5：5、0：10の5ポイント、遅延型は10：0、5：5、0：10の3ポイントで凝固時間を測定した^{12, 13}。遅延型は正常血漿と患者血漿を的手法で混和し、ウォーターバスにて37°Cで2時間インキュベーションし、CN-6000にて凝固時間を測定した。

4. クロスミキシングテストの判定方法

パターンを目視により、上に凸、直線、下に凸かを即時型と遅延型のそれぞれで評価し、各検体で即時型インヒビター、凝固因子低下、あるいは遅延型インヒビターと判定した。なお、判定が困難なパターンの場合は判定困難とした。また、定量化指標として、Index of Circulating Anticoagulant（以下、ICA）を用いた¹⁴。ICAの計算式を以下に示す。

$$ICA = (b - c) / a \times 100$$

a：患者血漿の凝固時間

b：5：5で混和した血漿の凝固時間

c：正常血漿の凝固時間

ICAの算出は即時型の凝固時間を用い、ICAが12.4以上をインヒビター、12.4未満を凝固因子低下と判定し¹⁵、目視判定法と比較した。

結果

1. LA 陽性検体

抗凝固療法の有無を含めた計 34 例に対し、目視判定法は 27 例が即時型インヒビター、7 例が判定困難の結果であった。ICA は 31 例がカットオフ値以上、3 例がカットオフ値未満であった。目視判定法で判定困難であった 7 例のうち、4 例は ICA が 12.7～24.8 とカットオフ値以上、3 例は 6.4～11.9 とカットオフ値未満であり、ICA が 24.8 を示した検体は抗凝固療法が施行されたりバーロキサバ

ン服用患者検体、他の 6 例は抗凝固薬の投与がなかった。典型的な即時型インヒビターのグラフと判定困難であったグラフを図 3 に示す。典型的な即時型インヒビターの症例では 5:5 のポイントに加え、9:1 および 8:2 のポイントにおいても上に凸を示し (図 3 A)、判定困難な症例はわずかに下に凸を示す傾向を認めた (図 3 B)。また、正常血漿と患者血漿の混合血漿が患者血漿の凝固時間を超えて延長する症例もみられた (図 3 C)。

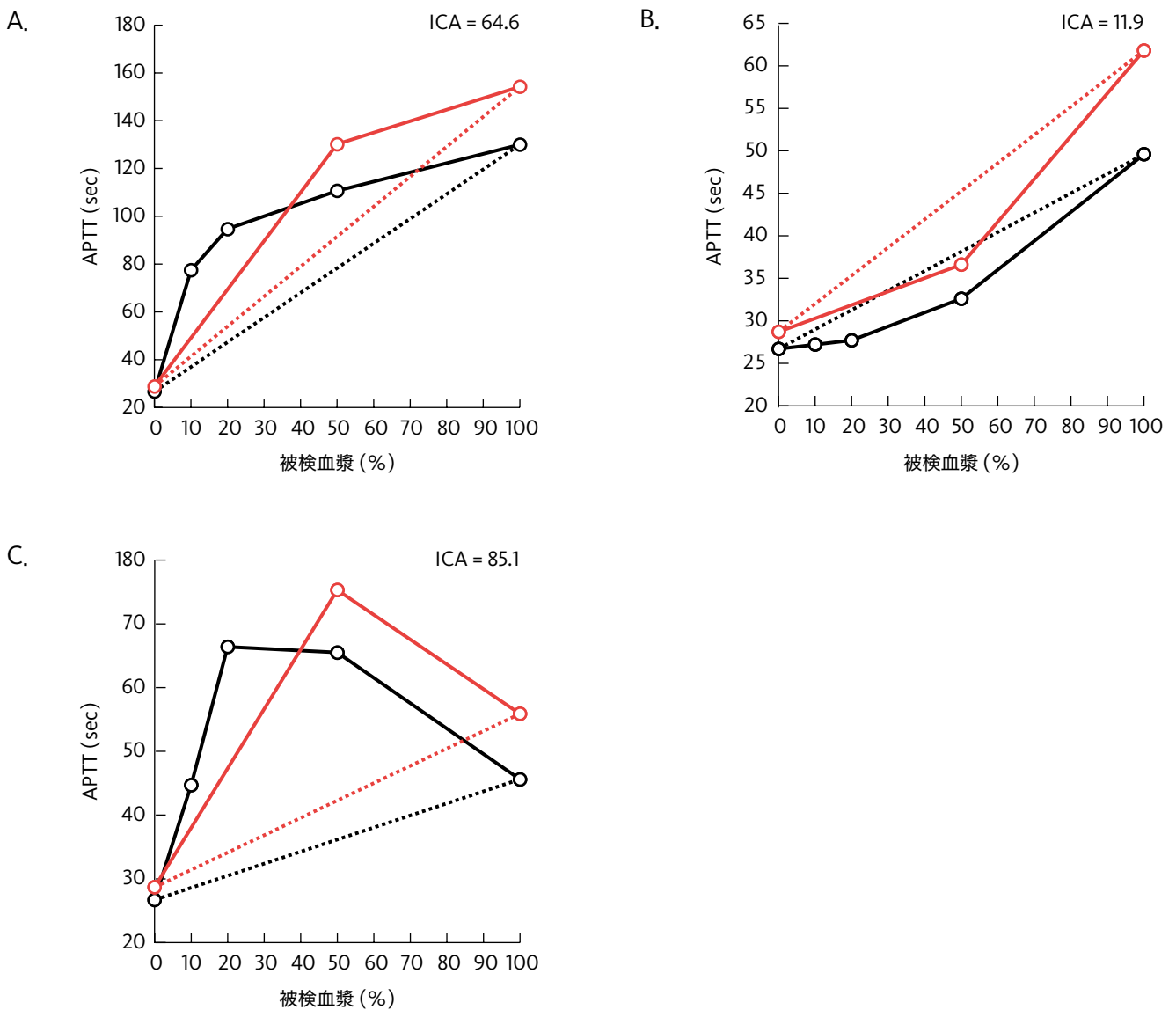


図 3. LA 陽性検体のクロスミキシングテスト

黒線と黒丸は即時型のグラフ、赤線と赤丸は遅延型のグラフを示す。点線は正常血漿と患者血漿を結んだ線である。即時型が上に凸または直線、かつ遅延型でグラフパターンに差がない検体を即時型インヒビターパターンと判断した。A. は典型的な LA 陽性検体の例であり、dRVVT が 2.28 で抗凝固薬無し。B. は判定困難の例であり、dRVVT が 1.60 で抗凝固薬無し。C. は正常血漿と患者血漿の混合血漿の凝固時間が患者血漿の凝固時間を超えた例であり、dRVVT が 1.96 で抗凝固薬無しであった。

2. 凝固因子低下検体

凝固因子低下検体として、第 VIII, XII 因子低下、肝不全、ワルファリン服用、ワルファリンおよび未分画ヘパリン療法の臨床検体 14 例に加えて、人工的に調製した凝固因子低下検体 40 例の計 54 例を対象として解析した。目視判定法は 52 例が凝固因子低下パターン、2 例が判定困難であり、ICA は 52 例が $-2.7 \sim 11.4$ でカットオフ値未満、2 例が $13.8 \sim 20.3$ でカットオフ値以上であった。典型的な凝固因子低下例、および目視判定法で判定困難と判断さ

れた例を図 4 に示す。典型的な凝固因子低下パターンでは、5:5 のポイントの凝固時間が正常血漿の凝固時間とほぼ同程度であり (図 4 A), 凝固因子低下の人工試料 40 例においてもすべて同様の傾向を示した。目視判定法で判定困難であった 2 例はともに ICA がカットオフ値以上であり、1 例がワルファリンおよび未分画ヘパリン療法中の患者検体、もう 1 例が凝固第 VIII 因子低下検体 (軽症血友病 A) であり、両者ともに 5:5 のポイントで凝固時間が若干延長した (図 4 B, C)。

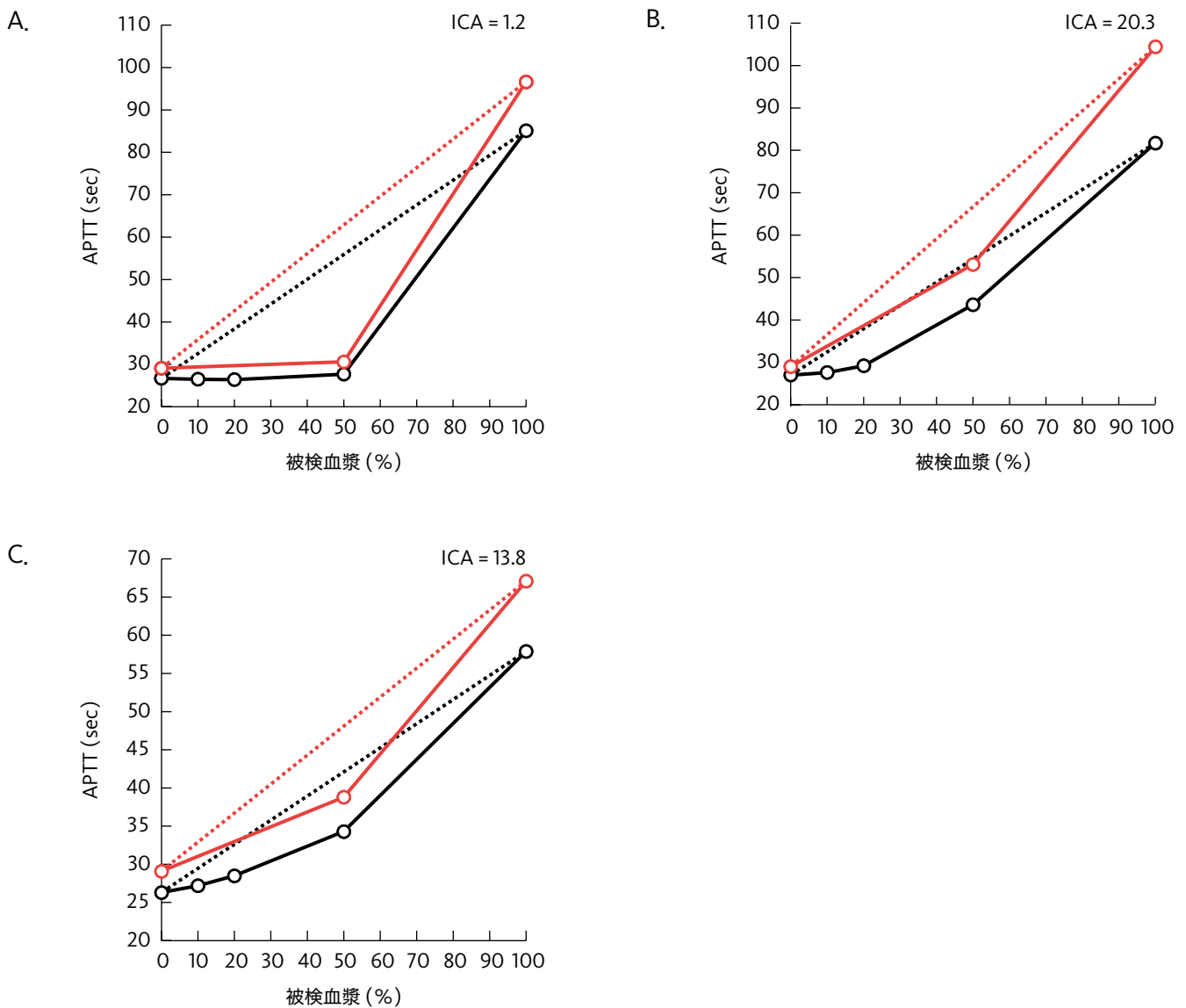


図 4. 凝固因子低下検体のクロスミキシングテスト

黒線と黒丸は即時型のグラフ、赤線と赤丸は遅延型のグラフを示す。点線は正常血漿と患者血漿を結んだ線である。即時型と遅延型ともに明確に下に凸を示す例を凝固因子低下パターンと判定した。A. は典型的な凝固因子低下検体の例であり、ワルファリン服用患者検体で目視判定法と ICA とともに明らかに凝固因子低下と判定した。B. は目視判定法で判定困難であったワルファリンおよび未分画ヘパリン療法中の検体、C. は目視判定法で判定困難であった凝固第 VIII 因子低下検体である。

3. 凝固第 VIII 因子インヒビター検体

凝固第 VIII 因子インヒビター検体における目視判定法は、8 例中 7 例が遅延型インヒビターと判定され、1 例は判定困難の結果であった。典型的な遅延型インヒビター、および判定困難であったグラフを図 5 に示す。典型的なパターンでは、5:5 のポイントにおける凝固時間が 2 時間インキュベーションで大幅な延長を示した (図 5 A)。一方、判定困難の例は、FVIII 活性が < 1.0 IU/dL でインヒビター力価は 12.88 BU/mL のエプタコグアルファ (活性型: rFVIIa) を投与中の患者検体であり、5:5 のポイントは 2 時間インキュベーションにより凝固時間が延長したが、患者血漿も同程度に延長したため判定困難であった (図 5 B)。なお、ICA が即時型でカットオフ値以上であった検体は 5 例であった。

4. 抗凝固療法検体

① 未分画ヘパリン投与検体

未分画ヘパリン投与検体は、目視判定法で全 9 例が凝固因子低下パターンを示し、2 例の ICA がカットオフ値以上であった。なお、9 例の血中濃度は 0.18 ~ 0.68 IU/mL であり、ICA がカットオフ値以上であった 2 例の血中濃度は 0.68 IU/mL と 0.42 IU/mL で、比較的高値を示した。ICA がカットオフ値以上であった例は 5:5 のポイントの凝固時間が若干延長した (図 6)。

② DOACs 服用検体

DOACs 服用検体は、目視判定法で 14 例中 12 例が即時型インヒビターパターンを示し、2 例は判定困難であった (図 7)。これらの 2 例はともにアピキサバン服用患者検体で、血中濃度は 78.7 ng/mL、68.2 ng/mL であり、他検体と比較して低い濃度であった。

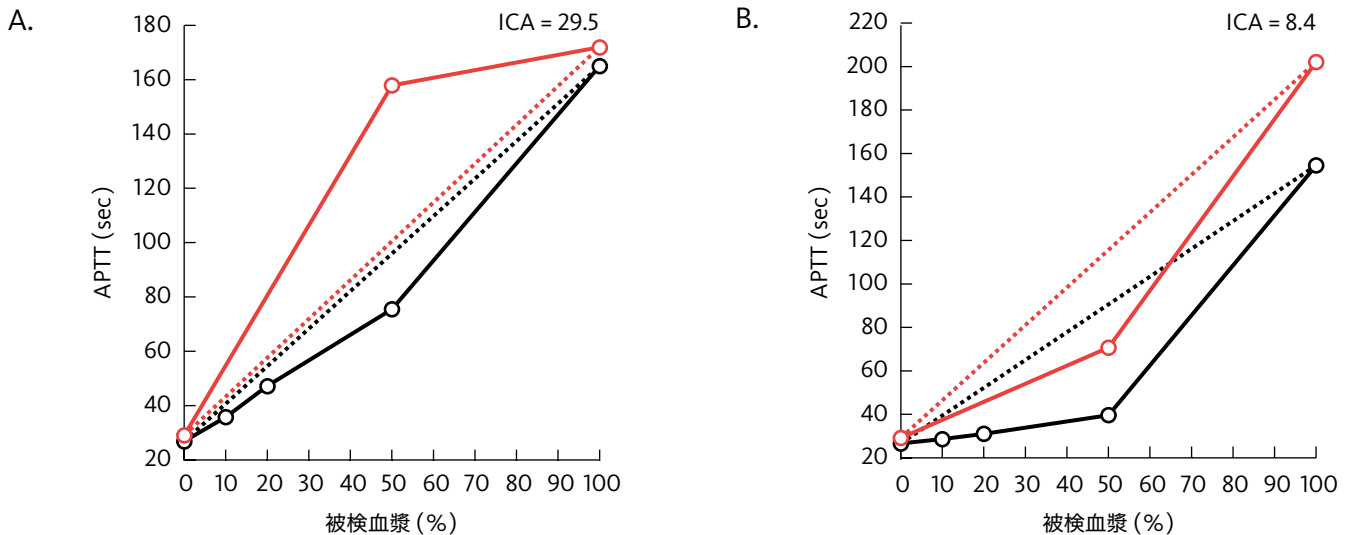


図 5. 凝固第 VIII 因子インヒビター検体のクロスミキシングテスト

黒線と黒丸は即時型のグラフ、赤線と赤丸は遅延型のグラフを示す。点線は正常血漿と患者血漿を結んだ線である。即時型が下に凸、直線、または上に凸から、遅延型が即時型と比較して上を示す例を遅延型インヒビターと判定した。A. は典型的な凝固因子インヒビターの例であり、FVIII 活性が < 1.0IU/dL、インヒビター力価が 123.20 BU/mL の検体、B. は目視判定法で判定困難であった例であり、FVIII 活性が < 1.0IU/dL、インヒビター力価が 12.88 BU/mL の検体である。

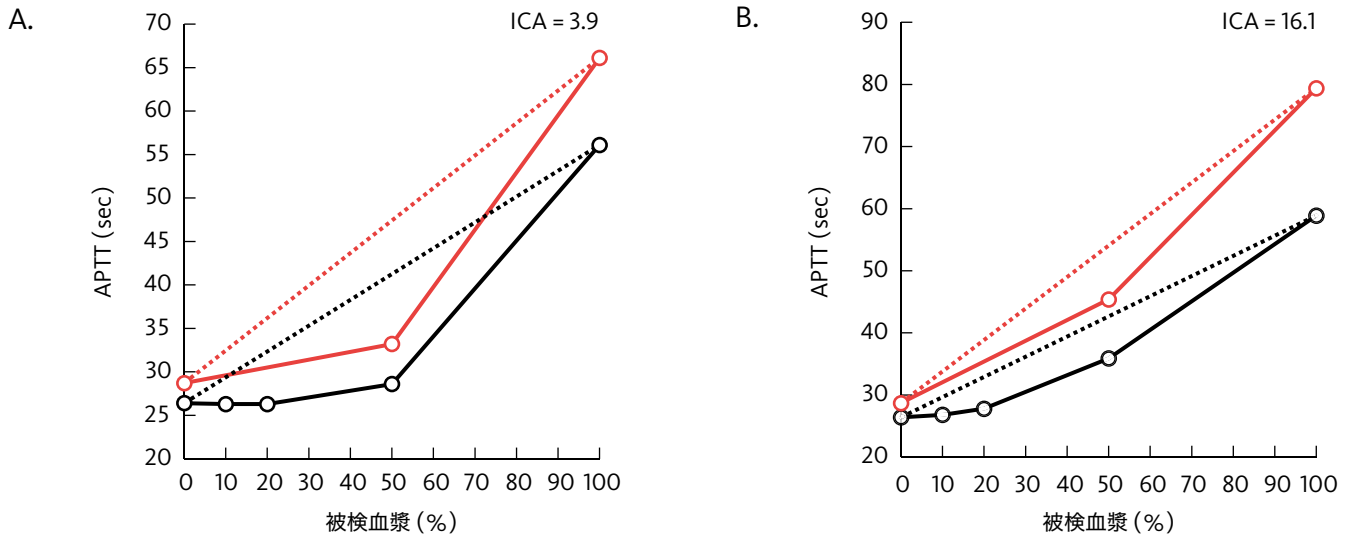


図6. 未分画ヘパリン投与検体のクロスミキシングテスト

黒線と黒丸は即時型のグラフ，赤線と赤丸は遅延型のグラフを示す。点線は正常血漿と患者血漿を結んだ線である。即時型と遅延型ともに明確に下に凸を示す例を凝固因子低下と判定した。A. は明らかに凝固因子低下と判定できた例であり，血中濃度は 0.29 IU/mL の検体，B. は目視判定法で判定困難であった例であり，血中濃度は 0.68 IU/mL の検体である。

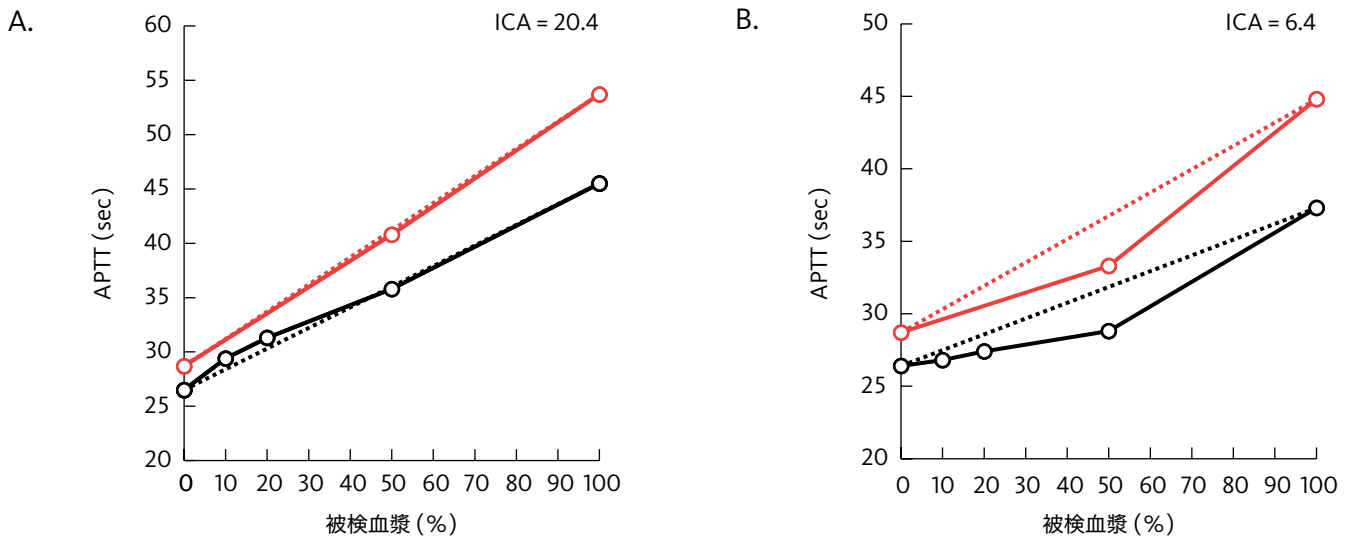


図7. DOACs 服用検体のクロスミキシングテスト

黒線と黒丸は即時型のグラフ，赤線と赤丸は遅延型のグラフを示す。点線は正常血漿と患者血漿を結んだ線である。即時型と遅延型ともに明確に直線または上に凸を示すかを目視判定法にて判断した。A. は明らかに上に凸または直線を示したりバーロキサバン服用の血中濃度が 417.8 ng/mL の検体，B. は目視判定法で判定困難を示したアピキサバン服用の血中濃度は 78.7 ng/mL の検体である。

③ アルガトロバン投与検体

アルガトロバン投与検体は、目視判定法で8例中7例が即時型インヒビターパターンを示し、1例が判定困難であった(図8)。ICAは5例がカットオフ値以上、3例がカットオフ値未満であり、目視判定法で判定困難であった1例はカットオフ値未満であった。また、ICAがカットオフ値未満

であった3例は患者検体の凝固時間が比較的短い傾向を示した。

④ ナファモスタットメシル酸塩投与検体

ナファモスタットメシル酸塩投与検体は、目視判定法で8例中7例が凝固因子低下パターンであり、1例が判定困難であった(図9)。ICAは4例がカットオフ値以上、4例がカットオフ値未満で

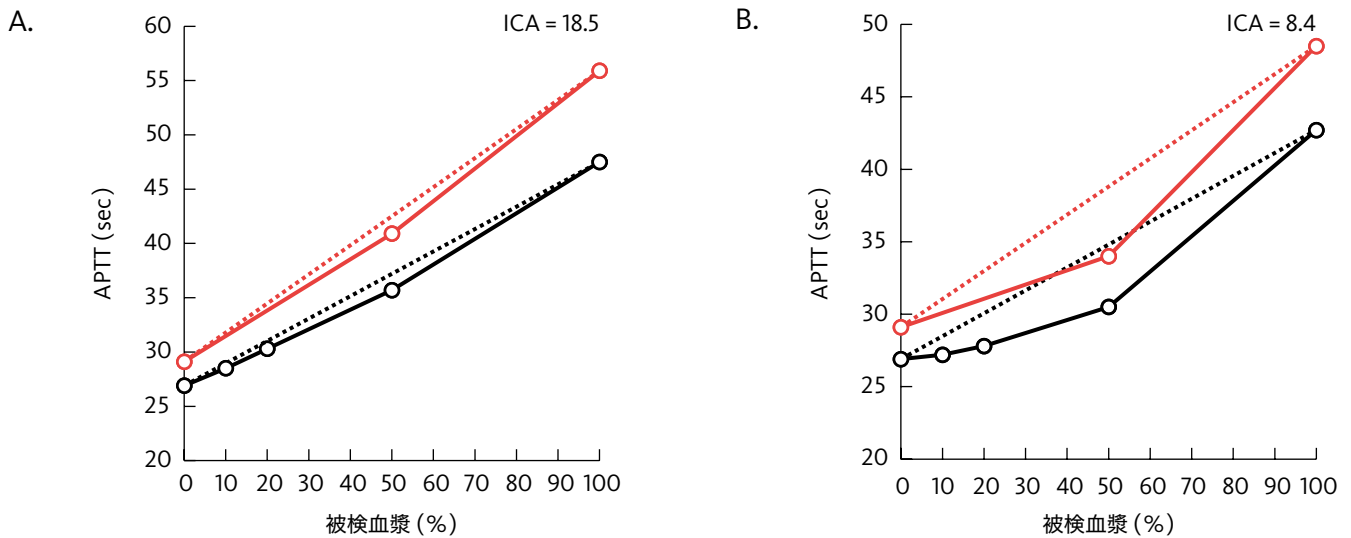


図8. アルガトロバン投与検体のクロスミキシングテスト

黒線と黒丸は即時型のグラフ、赤線と赤丸は遅延型のグラフを意味する。点線は正常血漿と患者血漿を結んだ線である。即時型と遅延型ともに直線または上に凸を示すかを目視判定法にて判断した。A. は直線を示した例であり、B. は目視判定法で判定困難であった例である。

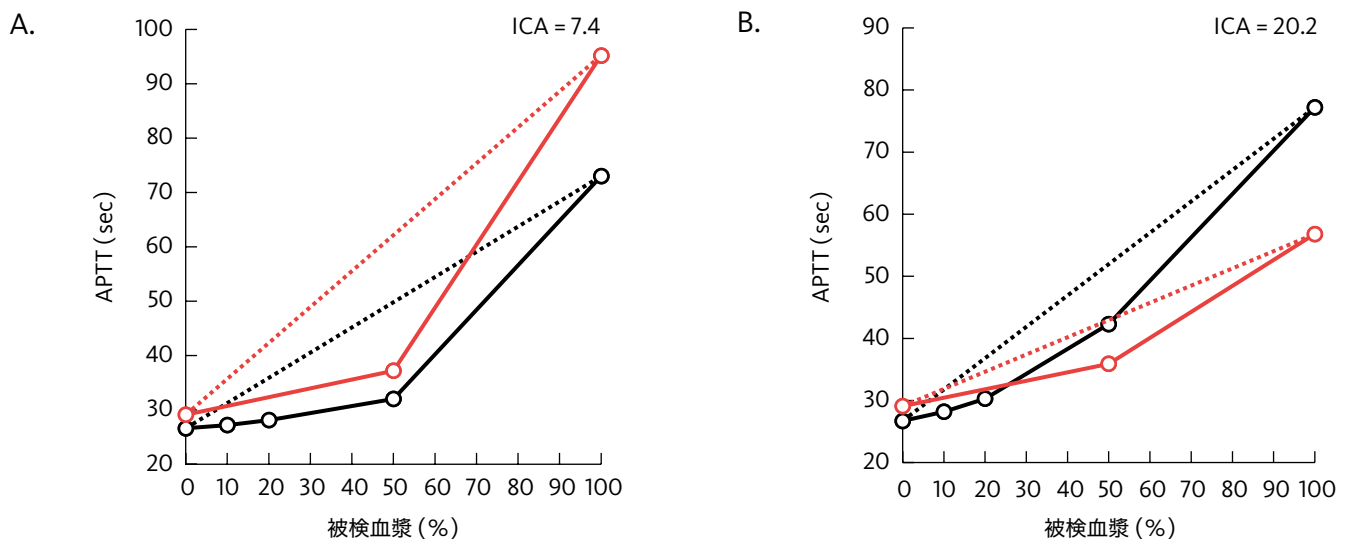


図9. ナファモスタットメシル酸塩投与検体のクロスミキシングテスト

黒線と黒丸は即時型のグラフ、赤線と赤丸は遅延型のグラフを示す。点線は正常血漿と患者血漿を結んだ線である。即時型と遅延型ともに下に凸を示すかを目視判定法にて判断した。A. は明確に下に凸を示した例であり、B. は目視判定法で判定困難であった例であり、患者血漿の2時間インキュベーション後の凝固時間が混和直後の凝固時間より短縮した検体である。

あった。目視判定法で判定困難であった1例はカットオフ値以上の結果を示した。検体により5:5のポイントにおける凝固時間延長の程度が大きく異なり、目視判定法とICAの乖離が比較的多い傾向となった。また、8例中6例の患者血漿の2時間インキュベーション後の凝固時間が混和直後の凝固時間より短縮した。

5. 目視判定法とICAの一致率

目視判定法とICAの一致率を算出したところ、LA陽性検体は79%、凝固因子低下検体は96%であった。凝固第VIII因子インヒビターは目視判定法と即時型のICAがカットオフ値以上である一致率が63%であった。抗凝固療法中検体は各薬剤における典型的な目視判定法のパターンに対して、ICAがカットオフ値以上か未満かを比較したときの一致率が64%であった。全体的に凝固因子低下検体およびLA陽性検体で高い一致率を示した。

考 察

APTTは内因系・共通系凝固因子活性を検査するグローバルアッセイとして確立されたが、今日ではLA陽性、凝固因子低下、凝固因子インヒビターなど幅広い凝固関連疾患のスクリーニング検査として用いられている。特に、出血症状を呈する凝固因子低下および凝固因子インヒビターと、血栓症状を呈するLA陽性を鑑別することは治療方針の決定に重要であり、クロスミキシングテストはこれらの病態を鑑別するうえで有用な検査である^{9, 10}。具体的な実施方法の多くは標準化されつつあるものの²、結果判定・解釈方法についてはグラフパターンが上に凸か下に凸かという目視判定法が主流であり、個人差が生じるなどの観点から標準化に未だ課題がある。本研究では、LA陽性、凝固因子低下、凝固因子インヒビター、および抗凝固療法中の検体を用いて、クロスミキシングテストを実施、目視判定法とICAによる判定を行い、各検体群の傾向を分析することを目的とした。

LA陽性検体は多くの検体で上に凸のグラフパターンを示したが、34例中7例(20.6%)が判定困難であった。判定困難の原因として、LAに加えて

凝固因子活性の低下、およびAPTT系に反応が乏しいLAの可能性が考えられる。LAはheterogenousな自己免疫疾患の責任抗体であり、単独のアッセイ系のみで検出することができず、APTTに加えてdRVVTなど複数のアッセイ系で検出することが推奨されている¹²。特に、本検討ではdRVVT陽性をLA陽性検体として定義したため、dRVVT系で反応を示すがAPTT系で反応に乏しい検体であった可能性が推定される。このようにLAの複雑な反応性をふまえ、確定診断はAPTT系とdRVVT系の両方で確認試験を実施することが推奨されている^{10, 14, 16}。そのため、臨床的にAPSが強く疑われる症例はAPTTのクロスミキシングテストの結果が上に凸を示すことなく、LAと明らかに判断できない場合でもdRVVTなどのLA確認試験の実施を考慮すべきである。また、本検討では34例中7例で、5:5のポイントの凝固時間が患者血漿の凝固時間よりも延長するという結果であった。この現象はClinical and Laboratory Standards Institute guideline H60-AでLA cofactor effectと定義されており、非常に高いLAを有する患者検体に認める現象と示されている¹⁷。混和血漿の凝固時間が患者血漿よりも延長するメカニズムとして、患者血漿中の凝固因子などが低下している場合、LAの阻害作用は限定的になるが、正常血漿との混和により凝固因子が補充されることで阻害作用が限定的でなくなり、凝固時間がさらに延長すると考えられている。これらの7例のdRVVT値は1.71~2.30と比較的高いLA活性を有していたことから、混合血漿における凝固時間延長はLA cofactor effectと考えられた。

凝固因子低下検体は、一般的に凝固因子活性が30~40%程度でAPTTが延長すると考えられている^{1, 4}。クロスミキシングテストの5:5のポイントは正常血漿と患者血漿が等分の割合で存在し、凝固因子活性が低下している検体であっても正常血漿の凝固因子が補充されるため、凝固因子活性が理論上50%以上となり、凝固時間が正常域付近まで短縮する。そのため、人工試料の検体群では5:5のポイントが正常域付近レベルになることで、目視判定法が凝固因子低下パターンとなり、ICAもカットオフ値未満で一致した結果を示した。一方、一部の臨床

検体およびワルファリン服用で複数の凝固因子活性が低下している検体では、5:5のポイントにおいて正常血漿から凝固因子が補充された場合でも凝固時間の延長を示すことが報告されている^{18, 19)}。凝固因子低下検体の評価において、目視判定法で判定困難であった2例はワルファリンと未分画ヘパリン療法中の患者検体と軽症血友病A患者検体であり、抗凝固薬の影響、ならびに他の凝固因子活性などの影響が関係していると考えられた。

凝固第VIII因子インヒビターの検体は、8例中7例が目視判定法で遅延型インヒビターと判定可能であった。残りの1例は5:5のポイントで即時型と遅延型に差を認めたものの、患者血漿も同程度に延長したため、判定が困難であった。判定困難であった検体はインヒビター力価12.88 BU/mL、VIII因子活性<1.0 IU/dLで他検体と比べ大きな差異を認めず、2時間インキュベーションにて患者血漿が著しく延長した原因は十分に解明できていない。クロスミキシングテストで明確な遅延型インヒビターと判定できない場合においても、2時間インキュベーションで即時型と遅延型の差が大きい、あるいは臨床的に凝固因子インヒビターの存在が疑われる場合は、Bethesda法の実施を考慮する必要がある。

抗凝固療法検体は各薬剤で異なる傾向を認めた。未分画ヘパリン投与検体は、目視判定法で全9例が凝固因子低下パターン(下に凸のパターン)を示す傾向があると考えられた。ただし、ICAでは2例がカットオフ値以上であり、未分画ヘパリン濃度が上昇するにつれてICAが上昇する傾向が報告されている²⁰⁾。一方、未分画ヘパリン濃度が低い場合、直線に近いパターンになる可能性が報告され²¹⁾、我々も経験している。DOACs服用検体は、その血中濃度に依存したが、多くが即時型インヒビターのパターンを示した。これは、DOACsの凝固第Xa因子に対する直接的な凝固因子阻害のメカニズムと一致しており、直接的に阻害することでインヒビターパターンを示すことが確認され、既報とも類似した結果であった¹⁸⁾。また、アルガトロバン投与検体はDOACsと同様に活性化凝固因子への直接的阻害作用を有し、即時型インヒビターのパターンを示した。これより、DOACsおよびアルガトロバンのような

トロンビンまたは凝固第Xa因子に対する直接的凝固因子阻害作用を有する薬剤は、クロスミキシングテストにおいて即時型インヒビターのパターンを示すと考えられた。一方、ナファモスタットメシル酸塩投与検体は、8例中7例が凝固因子低下パターンを示した。ナファモスタット酸塩はトロンビン、凝固第Xa因子を含む複数の凝固因子、プラスミン、トリプシンなどのタンパク質を強力に阻害する薬剤である。DOACsとアルガトロバンとの違いは、複数の凝固因子に作用する点であり、同じ抗凝固薬であっても作用機序の違いがクロスミキシングテストのパターンに影響を与えていると考えられた。また、ナファモスタットメシル酸塩投与検体は、患者血漿の凝固時間が混和直後より2時間インキュベーション後に短縮を認め、インキュベーションによる抗凝固作用の減弱が示唆された。抗凝固療法中の患者検体のLA検査実施については、2020年に発表された国際血栓止血学会標準化委員会(ISTH-SSC: Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis)のLA検査ガイドラインに記載がある^{16, 22)}。本ガイドラインにおいて、クロスミキシングテストは抗凝固療法中でない患者検体のみを対象とし、抗凝固療法中の患者検体は解釈が困難であることを理由に推奨はしていない。一方、実際の臨床現場では、抗凝固療法を施行している症例の検体に予期せずして遭遇することがしばしばある。これより、抗凝固療法を施行していない患者において、APTTが延長した場合はその原因推定のためにクロスミキシングテストを実施する。それに対し、抗凝固療法中の患者はクロスミキシングテストに影響を及ぼすことを留意し、抗凝固療法を中止する、あるいは中止できない場合はトラフで検査するように臨床へ伝えて実施するのが望ましい。重要な点として、APTT延長検体に遭遇した場合は、第一に抗凝固薬の有無を確認することである。未分画ヘパリンはプロタミン補充APTT^{23, 24)}、DOACsはDOAC-Stop処理²⁵⁾の有用性が報告されており、抗凝固薬の有無が不明確な場合は、これらの手段を講じて確認すべきである。これを怠ると不必要な確認検査の実施に

つながる恐れがある。

本研究は、レボヘム APTT SLA にてクロスミキシングテストを実施し、その結果に対してグラフパターンと ICA での比較検討を行った。クロスミキシングテストはその標準化が課題となっているものの、そのポイント数は即時型で 10:0, 9:1, 8:2, 5:5, 0:10 の 5 ポイント、遅延型で 10:0, 5:5, 0:10 の 3 ポイントが推奨されており、標準化された方法に従い実施した。また、本研究ではコアグトロール N を正常血漿として使用した。コアグトロール N は、LA 陽性検体のクロスミキシングテストの判定において自家製プール血漿と同等の結果が得られたことを、我々は過去の検討で示している²⁶⁾。APTT 試薬は LA 高感度の試薬が推奨され¹⁶⁾、レボヘム APTT SLA は高い LA 感度を有しており⁸⁾、本研究でもクロスミキシングテストの目視判定法で各検体群の大部分を鑑別可能であったことから、十分な性能を有すると考えられた。また、目視判定法と ICA の一致率は、特に LA 陽性検体と凝固因子低下検体で高い一致率を認めた。一方、目視判定法で判定困難のケースならびに典型的なパターンでないケースは、定量化指標と判定が乖離する傾向があり、これらの症例では慎重な判定が必要である。本研究において、凝固第 VIII 因子インヒビターは目視判定法が即時型と遅延型での判定、ICA が即時型のみ判定を実施しており、遅延型における ICA の定量化を評価できていないため、即時型と遅延型を含めた定量化指標との比較は今後の課題とした。クロスミキシングテストの定量化指標は複数検討されており、各指標にそれぞれの特徴がある²⁷⁻³⁰⁾。定量化指標の活用法については、その特性を十分に理解したうえで、グラフパターンの目視判定法を基に判定しつつ、目視判定法で判定困難な場合などに補助的に用いることが望ましい。

結 語

クロスミキシングテストは LA、凝固因子低下、凝固因子インヒビターなどの APTT 延長原因を推定する有用な方法であり、本研究で用いたレボヘム APTT SLA は目視判定法にて LA 陽性検体、凝固因子低下検体、凝固第 VIII 因子インヒビター検体の

大部分を判別可能であり、十分な性能を有すると考えられた。一方、目視判定法にて判定困難な場合は定量化指標を補助的に用いて慎重に判定することが望ましい。

注 釈

本研究では、クロスミキシングテストの正常血漿としてコアグトロール N を使用しているが、コアグトロール N はクロスミキシングテスト用に製造販売されている製品ではない。

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

参考文献

- 1) 山崎 哲, 他. APTT の現状と標準化に向けた課題. 生物試料分析. 2009; **32** (5): 365-370.
- 2) 家子正裕, 他. 交差混合試験における混合比率およびコントロール血漿に関する検討: コアプレスタミキシングテスト研究会における結果報告. 日本検査血液学会雑誌. 2011; **12** (3): 312-322.
- 3) 天野景裕. 後天性血友病 A に関する凝血学的検査の注意点. 臨床病理. 2009; **57** (10): 999-1003.
- 4) 山崎 哲, 他. APTT の注意点と標準化. 日本検査血液学会雑誌. 2012; **13**: S83.
- 5) Okuda M, et al. 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.
- 6) Kumano O, et al. APTT reagent with ellagic acid as activator shows adequate lupus anticoagulant sensitivity in comparison to silica-based reagent. J Thromb Haemost. 2012; **10** (11): 2338-2343.
- 7) 奥田昌宏, 他. 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) 下村大樹, 他. 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. *Sysmex Journal Web*. 2021 ; **22** (2) : 31–49.
- 9) 家子正裕. 抗リン脂質抗体症候群の診断と治療. *臨床血液*. 2014 ; **55** : 917–924.
- 10) 熊野 穰, 他. ループスアンチコアグラントの検出方法 –現状の課題と今後の展望–. *日本検査血液学会雑誌*. 2015 ; **16** (3) : 232–246.
- 11) 内藤澄悦, 他. クロスマキシングテストによる病態鑑別方法. *Sysmex Journal Web*. 2016 ; **17** (1) : 1–11.
- 12) 内藤澄悦, 他. APTT 交差混合試験の標準化への試み: コアプレスタミキシングテスト研究会における結果報告. *日本検査血液学会雑誌*. 2014 ; **15** : S153.
- 13) 吉田美香, 他. ループスアンチコアグラントの測定法とその解釈. *日本検査血液学会雑誌*. 2007 ; **8** : S52.
- 14) Pengo V, et al. Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2009 ; **7** (10) : 1737–1740.
- 15) Kumano O, et al. Lupus anticoagulant diagnosis in activated partial thromboplastin time mixing test: optimization of the index of circulating anticoagulant cut-off value. *Clin Lab*. 2014 ; **60** (12) : 2115–2118.
- 16) Devreese KMJ, 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** (11) : 2828–2839.
- 17) CLSI. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant; Approved Guideline. CLSI document H60-A. Clinical and Laboratory Standard Institute. 2014.
- 18) Kumano O, et al. Ruling out lupus anticoagulants with mixing test-specific cutoff assessment and the index of circulating anticoagulant. *Res Pract Thromb Haemost*. 2019 ; **3** (4) : 695–703.
- 19) Kumano O, et al. Applying index of circulating anticoagulant to mixing tests with lupus anticoagulant screen and confirm reagents can distinguish with high specificity between lupus anticoagulants and direct factor Xa inhibitors. *Int J Lab Hematol*. 2021 ; **43** (4) : 771–778.
- 20) Kumano O, et al. Verification of the guidelines for lupus anticoagulant detection: usefulness of index for circulating anticoagulant in APTT mixing test. *Thromb Res*. 2014 ; **134** (2) : 503–509.
- 21) 松田将門, 他. 5. クロスマキシングテスト試験における正しい検体取扱い. *医療と検査機器・試薬*. 2021 ; **44** (1) : 17–21.
- 22) Tripodi A, et al. Lupus anticoagulant detection in anticoagulated patients. Guidance from the Scientific and Standardization Committee for lupus anticoagulant/antiphospholipid antibodies of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *J Thromb Haemost*. 2020 ; **18** (7) : 1569–1575.
- 23) 下村大樹, 他. 未分画ヘパリン混入検体におけるプロタミン補充活性化トロンボプラスチン時間の方法と有用性. *日本検査血液学会雑誌* 2010 ; **11** : S64.
- 24) 松田将門, 他. 液剤の硫酸プロタミンを用いた簡便かつ効果的なプロタミン補充 APTT 測定手順の検討. *臨床病理* 2017 ; **65** (6) : 640–645.
- 25) Baker SA, et al. DOAC- Stop in lupus anticoagulant testing: Direct oral anticoagulant interference removed in most samples. *Res Pract Thromb Haemost*. 2021 ; **5** (2) : 314–325.
- 26) 下村大樹, 他. クロスマキシングテスト用正常血漿としてのコアグトロール N の評価. *医学検査*. 2017 ; **66** (suppl) : 269–269.
- 27) 下村大樹, 他. 新規 APTT クロスマキシングテスト判定法である WaS-ALD50 法の確立. *医学検査*. 2021 ; **70** (4) : 613–621.
- 28) 徳永尚樹, 他. 全自動臨床検査システム STACIA を用いた APTT クロスマキシングテスト法の考案. *医学検査*. 2015 ; **64** (5) : 583–590.

29) 盛合亮介, 他. 当院で実施したクロスミキシングテストの有用性の評価－波形パターン法と index of circulating anticoagulant の比較－. 医学検査. 2019; **68**(2): 328–332.

30) Kumano O, et al. Lupus anticoagulant mixing tests

for multiple reagents are more sensitive if interpreted with a mixing test-specific cut-off than index of circulating anticoagulant. Res Pract Thromb Haemost. 2017; **2**(1): 105–113.

Investigation of Disease Identification Using Cross-mixing Test in Revohem™ APTT SLA

Daiki SHIMOMURA^{*1}, Tomoko MATSUMOTO^{*2}, Aya KOUNO^{*1}, Tokio TAKATA^{*1},
Akimi TAKADA^{*1}, Osamu KUMANO^{*3}, Kaori UEDA^{*4}, Keisuke KITANO^{*5}, Nobuo ARAI^{*5},
Masashi SHIMADA^{*1} and Mikio KAMIOKA^{*1}

^{*1} Department of Laboratory Medicine, Tenri Hospital, 200 Mishima, Tenri, Nara, 632-8552, Japan

^{*2} Department of clinical laboratory, Tenri Health Care University

^{*3} HYPHEN BioMed, SAS

^{*4} Osaka Branch, Sysmex Corporation

^{*5} Protein Technology, Department of Reagent engineering, Sysmex Corporation

Prolongation of activated partial thromboplastin time (APTT) can be caused by coagulation factor deficiency or coagulation inhibitor in bleeding patients. Lupus anticoagulant (LA) which increases the risk of thrombosis also shows APTT prolongation. The APTT cross-mixing test is used to differentiate these diseases. APTT reagents with high LA sensitivity is recommended for this test. In this study, we investigated the cross-mixing test function by Revohem™ APTT SLA in several sample groups, compared the tendency among the groups, and reported the results and the interpretation.

Samples including 34 LA positive, 54 coagulation factor deficiency, 8 factor VIII coagulation inhibitor and 39 anticoagulant drugs were used. Warfarin samples were used as coagulation factor deficiency, and other anticoagulants including unfractionated heparin, direct oral anticoagulants, argatroban and nafamostat were classified as anticoagulant drug group. The graphs were identified by the visual method and index of circulating anticoagulant (ICA) as the quantitative index.

Twenty-seven LA positive samples were recognized as immediate inhibitor pattern and it was difficult to identify 7 samples as LA by the visual method. 52 coagulation factor deficiency pattern and 2 unidentified samples in coagulation factor deficiency, and 7 coagulation inhibitor pattern and 1 unidentified samples in coagulation inhibitor were also recognized. The results in the anticoagulant drug samples showed the different tendency among the drugs. The agreement between the visual method and ICA were 79% in LA positive, 96% in coagulation factor inhibitor, 63% in coagulation inhibitor and 63% in anticoagulant drugs, and LA and coagulation factor deficiency groups showed high agreement.

Cross-mixing test is useful method to discriminate LA positive, coagulation factor deficiency and coagulation inhibitor with APTT prolongation. This study showed Revohem APTT SLA had enough characteristics to identify these diseases in cross-mixing test. Although there are several difficult cases to identify these diseases in the visual method, the quantitative index is useful and helpful for the interpretation with the visual method.

Key Words Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), Cross-mixing Test, Coagulation Factor Deficiency, Lupus Anticoagulant (LA), Coagulation Factor Inhibitor
