

学 位 論 文 の 要 旨

学位の種類	博 士	氏 名	内藤 澄悦
<p>学 位 論 文 題 目</p> <p>ループスアンチコアグラント検査における クロスミキシング試験の標準化に関する研究</p> <p>北海道医学雑誌 95巻 第1号 2020年 5月 掲載予定</p> <p>研 究 目 的</p> <p>Lupus anticoagulant (LA) は、抗リン脂質抗体 (antiphospholipid antibodies: aPL) の一つで、抗リン脂質抗体症候群 (antiphospholipid syndrome: APS) の診断的検査項目であるとともに独立した血栓症のリスク因子である。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」と定義されるが、その本体は明確にされていない。</p> <p>LA の検出は、活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) などのリン脂質依存性凝固時間の延長でスクリーニングされ、その凝固時間の延長が凝固因子欠損ではないこと、加えてリン脂質依存性であることを確認することで判断する。</p> <p>LA 検査の中で APTT によるクロスミキシング試験 (Cross-Mixing test : CMT) は、かつては内因系凝固因子欠損の除外目的で行われていたが、近年 APTT 延長例の鑑別診断として注目されている。特に LA の鑑別検査として極めて有用であることは十分に理解されているが、その利用は未だ十分ではない。これは CMT の標準化の遅れに原因があり、用いる APTT 試薬や具体的な手順、方法および判定方法が十分に検討されていないためと考えられる。</p> <p>本検討では LA 測定における CMT の標準化を目的として CMT における種々の APTT 試薬と様々な凍結乾燥市販正常血漿の有用性および判定方法を検討した。</p>			

材 料 ・ 方 法

1. APTT-LA 測定に有用な APTT 試薬の検討

1) 対象

LA 患者は、APS 分類基準であるシドニー改変 Sapporo Criteria を満たし、APTT-LA または dRVVT-LA における LA 検査が陽性である患者 (LA 群) 21 例の血漿を用いた。また、コントロール群 (C 群) として APTT が基準範囲内で他の凝血学的検査や問診上での異常を認めない健常人 50 名を用いた。

2) 試薬および測定装置

APTT 試薬は、トロンボチェック APTT (APTT-1)、トロンボチェック APTT-SLA (APTT-2)、ヒーモスアイエル APTT-SP (APTT-3)、コアグピア APTT-S (APTT-4)、APTT-EA (APTT-5)、APTT-P (APTT-6) の 4 社 6 種類を用いた。

3) APTT 測定値と LA の検出率

LA 群および C 群について、各検討試薬を用いて凝固時間を測定し、それぞれ C 群の平均凝固時間に対する比 (APTT 比) に換算して検討した。LA 検出の検討では、LA 試薬のスタンダードとして日本血栓止血学会標準化委員会が推奨している PTT-LA® (ロシュ・ダイアグノスティックス社) と比較した。

2. LA 検査としてのクロスミキシング試験(CMT)に用いるコントロール血漿の検討

1) 対象

LA 陽性例として、LA 陽性市販血漿 5 種、および dRVVT-LA あるいは APTT-LA の確認によって LA 陽性であった患者血漿 10 例を用いた。LA 陰性例として、市販凝固因子欠乏血漿 Human Plasma FVIII DEFICIENT (George King Bio-Medical)、第 IX 因子欠乏血漿、第 XI 因子欠乏血漿、第 XII 因子欠乏血漿 (いずれも SIEMENS) の 4 種類、および後天性血友病 (INH 群) 2 例、凝固因子欠損例として von Willebrand 病 (vWD) 1 例、Warfarin 服用者 1 例の血漿を用いた。

2) 測定装置および試薬

APTT 試薬には PTT-LA®を用い、測定装置は全自動血液凝固測定装置コアプレスタ 2000 (CP2000; 積水メディカル社) を用いた。検討に用いたコントロール血漿は、PB 社製 (PB) の凍結品、George King Bio-Medical 社製 (GK) の凍結品、Instrumentation Laboratory 社製 (IL) の凍結乾燥品、Roche Diagnostics 社製 (RD) の凍結乾燥品および Sysmex 社製 (CN) の凍結乾燥品の 5 社 5 種類を用いた。

成 績

1. APTT-LA 測定に有用な APTT 試薬の検討

1) PTT-LA と比較した各 APTT 試薬の有用性

凝固時間法による LA 陽性率では、APTT-3 が 100% と最も高く、次いで APTT-2 であった。JSTH が LA 試薬として推奨する PTT-LA との相関性は、APTT-4 が相関係数 $r=0.883$ と最も高く、次いで APTT-3 ($r=0.881$) が良好であった。コントロール血漿の測定値より算出した平均値+2SD をカットオフとして ROC 解析を行うと、APTT-3 は、感度 100%、特異度 100% とともに高い結果を示した。

2) 試薬の組成別の検討

APTT 試薬に含まれるリン脂質組成別に比較検討すると、合成リン脂質を用いた試薬がウサギ脳由来に比べ有意に LA 陽性率が高かった。一方、活性化剤別の比較では有意な差を認めなかった。

2. LA 検査としてのクロスミキシング試験(CMT)に用いるコントロール血漿の検討

1) 各種コントロール血漿の性状および再現性試験

各種コントロール血漿の凝固スクリーニング検査の結果はいずれも正常域であったが、APTT 値において GK と RD は他に比較してやや延長していた。内因系凝固因子活性は、RD が他と比較して第 VIII 因子、および第 IX 因子、第 XII 因子活性が低下していた。一方、同時再現性および日差再現性はいずれのコントロール血漿も CV 値 1~5% 未満と良好であった。

2) LA 陽性市販血漿および LA 陽性患者血漿における CMT の比較

LA 陽性市販血漿および LA 陽性患者血漿で反応曲線が比較的典型的な上に凸のインヒビターパターンを呈した症例では、GK を用いた時の反応曲線が最も凝固時間が延長し、反応曲線が大きく判断も明瞭であった。一方で CN ではいずれの LA 陽性例においても他の正常血漿に比べ凝固時間が短い傾向がみられた。

3) 内因系凝固因子欠損症血漿（市販凝固因子欠乏血漿、Warfarin 服用患者血漿、後天性血友病および vWD 患者血漿）における CMT の比較

いずれの血漿においても、下に凸の凝固因子欠損パターンを呈した。GK では、やや凝固時間が延長する傾向が認められた。

考 案

1. APTT-LA 測定に有用な APTT 試薬の検討

APTT は、抗リン脂質抗体のひとつである LA の検査にも用いられる。本検討に用いた 6 種の APTT 試薬は、試薬により LA 検出率は異なった。LA 測定では、APTT のリン脂質の組成

や濃度で感受性が異なる事は以前より知られており、本検討では合成リン脂質を用いた試薬が LA に高感度で、その中でも APTT 比の大きい APTT-3 が最も感度が高く、これはリン脂質濃度がやや低いことによるものと推察できる。PTT-LA との比較から、LA 試薬としては APTT-3 が最も有用で、APTT-3 も LA 試薬として推奨に値すると思われた。

2. LA 検査としての CMT に用いるコントロール血漿の検討

LA 検査としての CMT では、用いる被検血漿だけでなくコントロール血漿においても残存血小板由来のリン脂質が測定結果に影響するため、施設間差のない CMT に適した市販コントロール血漿の決定が必要である。本検討では、PB 社製凍結正常プール血漿と取扱いが簡便な凍結乾燥市販コントロール血漿を用いて LA 検査における CMT のコントロール血漿としての可能性を検討したところ LA 活性が強いサンプルや内因系凝固因子欠損症サンプルでは結果に大きな差を認めなかったが、LA 活性の弱いサンプルでは市販コントロール血漿では上に凸の明確な LA パターンを得ることができなかった。コントロール血漿の違いによって凝固時間には差異が認められ、反応曲線の大きさにも若干の差異が認められた。しかしながら反応曲線の形状はほとんどかわらずその判定が異なることはなかった。ただし、凝固時間の差異は一定ではなくサンプル毎に異なることから、LA 活性が弱く直線状や逆 S 字型の反応曲線を示すサンプルでは、コントロール血漿の違いが、視覚判定における判断に影響する可能性があると思われた。本検討では、いずれの市販コントロール血漿の CMT の判定は異なることはなかったが、PB 社および GK 社の凍結品が良好な結果であり推奨できるコントロール血漿と思われた。

結 論

1. 本邦において LA 検出用 APTT 試薬として PTT-LA が推奨されているが、今回の検討から合成リン脂質を用いた APTT 試薬も LA 検出率は高く、クロスミキシング試験においても LA 感度の高い試薬を用いることが推奨される。

2. クロスミキシング試験における市販の凍結乾燥コントロール血漿として、従来より評価、推奨されている PB 社製、および PB 社製コントロール血漿と同等の性能を示す GK 社製コントロール血漿が推奨される。

引用文献

- 1) Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al. Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis: 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: 1737-40.
- 2) 家子 正裕, 内藤 澄悦, 吉田 美香: 凝固検査の進歩 クロスマキシング試験を中心に 抗リン脂質抗体症候群における診断的臨床検査であるループスアンチコアグラントの検出方法としてのクロスマキシングテスト(交差混合試験). 臨床病理 57: 990-998, 2009.
- 3) 家子正裕, 福武勝幸, 内藤澄悦, その他. 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ー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(第1報)ー. 日本検査血液学会雑誌 2012; 12: 312-22.

参考文献

- 1) 内藤澄悦, 家子正裕, 吉田美香, 他: 種々の APTT 試薬における凝固異常検出の有効性に関する検討. 臨床病理 56: 195~202, 2008
- 2) 内藤澄悦, 家子正裕, 吉田美香, 他: Lupus Anticoagulant 診断に有用な試薬の検討. 日本臨床検査自動化学会誌 34(5): 833-838, 2009.
- 3) 内藤澄悦, 家子正裕, 家子正裕, 吉田美香, 他: ヘパリン治療のモニタリングにおける種々の APTT 試薬およびヘパリン投与量の相関性に関する検討. 日本検査血液学会雑誌 13: 160-166, 2012.