

学位論文

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

旭川医科大学大学院医学系研究科博士課程医学専攻

内藤 澄悦

緒言

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[1]。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[2]されるが、その本体は明確にされていない。

LA の検出は、International Society on Thrombosis and Haemostasis (ISTH)の標準化委員会 (SSC) に従って[3]、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ないことをクロスミキシング試験 (Cross-Mixing test : CMT) で確認する。加えて過剰のリン脂質の添加により延長した凝固時間が短縮することでリン脂質依存性であることを確認する。さらに、ヘパリン添加や凝固因子インヒビターの存在が除外された場合に LA と判断する。ISTH-SSC は、2009 年に LA 診断改訂ガイドライン[4]を発表した。①まず希釈ラッセル蛇毒凝固時間 (dilute Russells' viper venom time : dRVVT) dRVVT によるスクリーニング (dRVVT-LA) を行い、② dRVVT-LA が陰性の場合には APTT によるスクリーニング検査 (APTT-LA) を行う、③ dRVVT および APTT で延長を認めた場合には、CMT により凝固因子欠損を除外する、④ dRVVT および APTT で過剰リン脂質の添加試験を行いリン脂質依存性を確認する、という手順を推奨した。この改訂では、LA は dRVVT-LA と APTT-LA の 2 者に絞られ、スクリーニングに用いる APTT 試薬や Cross-Mixing test における混合比率なども言及された。しかし、まだ幾つかの問題点が残されており、実臨床の現場での混乱はまだ続いている。その後、2012年に British Committee for Standards in Haematology (BCSH)のガイドライン改訂版[5]、2014年に Clinical and Laboratory Standards Institute(CLSI)のガイドライン初版[6]が提示されており、これらのガイドラインは一致する

部分も多いが、異なる点も存在しており、更なる混乱を招いている。いずれも実際の測定方法や手順を詳細には示しておらず、LA 測定は標準化が遅れている[7]。

我が国では、日本血栓止血学会標準化委員会や日本検査血液学会標準化委員会により APTT や dRVVT の LA 試薬としての標準化が検討されている[7]。

LA 検査の中で APTT による 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[8]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。詳細な問題点をあげると、(1) 最適な APTT 試薬の検討がなされていない、(2) 検査手順が統一（標準化）されていない（①患者血漿とコントロール血漿の混合比率、②その測定ポイント数）、(3) 最適な被検血漿の調整方法が検討されていない、(4) 混合するコントロール血漿が標準化されていない、(5) 測定サンプル数が多く、測定操作が煩雑である、(6) 測定のための検体（血漿）量が多い、(7) 判定方法が明確でない、などがあげられる。

CMT における APTT 測定に用いる試薬に関しては、我が国では多くの様々な試薬が市販されており、試薬に含有されるリン脂質の組成や濃度、活性化剤の種類の違いにより、LA に対する感受性が大きく異なることが知られている[8]。

また、LA 検査では血漿サンプルの調整も重要である。LA はリン脂質依存性検査で測定されるため、被検血漿および用いるコントロール血漿の中の残存している血小板数に影響される[8]。残存血小板由来のリン脂質が LA 検査の測定結果に影響する可能性がある。特にコントロール血漿は、検査施設毎に施設間差のない血小板除去プール血漿を作成することは難しく、CMT に適した市販正常血漿の決定が必要とされていた。我々は、これまでの検討から Precision BioLogic (PB) 社

製の凍結正常プール血漿が有用な結果をもたらす可能性を報告し、CMT おける正常血漿の標準品として推奨している[9].

このような背景において、本検討では 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、LA 測定における CMT の標準化を目的とした。

対象と方法

1. APTT-LA 測定に有用な APTT 試薬の検討

1) 対象

本研究は北海道医療大学歯学部倫理委員会で承認を受けて行われた（承認番号 154 号）。インフォームドコンセントにより同意の得られた患者および健常人を対象とした。LA 患者は、APS 分類基準であるシドニー改変 Sapporo Criteria[10]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。コントロール群（C 群）として APTT が基準範囲内（平均値 \pm 2SD）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。

血漿は 3.13%クエン酸ナトリウムを用いて採血し、遠心分離（1700g, 20 分）後の上清を 0.20 μ m のフィルター（Toyo Roshi 社，東京）で血小板を極力除去して作製した。このフィルター処理は極めてゆっくりと行い、フィルター処理による他の凝固因子への影響が少ないことを確認している（表 1）[11].

2) 試薬および測定装置

検討に用いた 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 種類である（表 2）。測定は全自動血液凝固分析装置 Coagrex-800（島津製作所，京都）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。各試薬で測定した C 群の APTT 比の平均値 + 2SD をカットオフ値とし、ROC 解析を行い LA 検出における感度、特異度を算出した。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、東京) [12] と各 APTT 試薬の測定値を比較した。

4) 統計学的検定

各測定値比較は、ANOVA (Tukey test) および student' s t-test にて比較検討し、 $p < 0.05$ の場合を有意な差があると判断した。

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 種類、および dRVVT-LA を LA テスト「グラディポア」 (株式会社医学生物学研究所、名古屋、日本) で、あるいは APTT-LA の確認をスタクロット LA (ロシュ・ダイアグノスティックス社、東京) よって LA 陽性であった患者血漿 10 例を用いた。

LA 陽性市販血漿の内訳は、ヒーモスアイエル LA 陽性コントロール (アイエルジャパン株式会社、東京、日本)、LA Positive Control Plasma (Trinity Biotech, Co.Wicklow, Ireland)、LA Control Low、LA Control High (共に SIEMENS, Munich, Germany)、Human Plasma Positive Lupus anticoagulant (George King Bio-Medical, USA) であった。

被検血漿は 3.2%クエン酸ナトリウム加採血管を用いて静脈血を採取し、1750g、20 分間遠心後、バフィーコート上 5mm までの上清を採取して用いた。

LA 陰性例として、市販の凝固因子欠乏血漿 Human Plasma FVIII DEFICIENT (George King Bio-Medical, USA)、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,

Munich, Germany) 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®を用いた. 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, 東京, 日本) 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.

結果

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

測定値の比較では, PTT-LA と最も近似した測定値を示したのは APTT-3 であり, 最も乖離したのは APTT-5 であった. 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. APTT-5 が 28.6%と最も低かった.

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 (表 3).

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, ROC 解析により感度および特異度を求めると, 表 4 のように APTT-3 は, 感度 100%, 特異度 100%とともに高い結果となり, LA スクリーニング試薬として極めて有用と思われた.

2) 試薬の組成別の検討 (図 1)

APTT 試薬に含まれるリン脂質組成別に比較検討した. 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. 活性化剤別の比較では, エラグ酸に比べシリカ, 無水ケイ酸の陽性率

がやや高い傾向を示したが、今回の検討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 (表 5)

今回検討に用いた各コントロール血漿の凝固スクリーニング検査と内因系凝固因子活性値を示す。凝固スクリーニング検査の結果はいずれのコントロール血漿も正常域であったが、APTT 値において GK と RD は他の正常血漿に比較してやや延長していた。内因系凝固因子活性は、RD が他のコントロール血漿と比較して第 VIII 因子、および第 IX 因子、第 XII 因子活性が低下していた。特に、第 IX 因子および第 XII 因子活性値はそれぞれ基準値以下であった。

2) 再現性試験 (表 6)

同時再現性はいずれのコントロール血漿も CV 値 1%未満と良好であった。また、日差再現性においてもいずれも 5%未満で良好であり、特に凍結乾燥品のコントロール血漿では 1%未満であった。

3) LA 陽性市販血漿における CMT の比較 (図 2)

LA 陽性市販血漿におけるミキシングテストの結果を図 2 に示す。

いずれの LA 陽性血漿においても、GK を用いた時の凝固時間が最も延長しており、反応曲線が大きくなり極めて明瞭であった。PB、IL および RD はほぼ同じ形状を示した。一方、CN はいずれの LA 陽性血漿においても他のコントロール血漿に比べ凝固時間が短い傾向がみられ、反応曲線の上に凸の形状が小さく判断し難い傾向を認めた。

今回の LA 陽性市販血漿における検討では、コントロール血漿の違いによって凝固時間には差異がみられ判断のし易さに違いはあるものの、反応曲線の形状はほぼ同様で、判定が異なることはなかった。

4) LA 陽性患者血漿における CMT の比較 (図 3-A、B)

LA 陽性患者血漿において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 5 例についての比較では、いずれの LA 陽性例においても、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。

また、LA サンプル①および⑤では RD が GK に次いで大きな反応曲線を示したが、②および③では PB が、④で PB および IL が GK に次いで大きな反応曲線を示すなど、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た。しかしながら反応曲線の形状はほとんどかわらず、判定が異なることはなかった。

LA 陽性患者血漿において反応曲線が比較的非典型的なパターン、すなわち逆 S 字状や直線を呈した症例での比較では、GK を用いた時の反応曲線が最も凝固時間が延長し、CN を用いた時の凝固時間が短い傾向であったが、その差異は小さく、コントロール血漿の違いによって判定が異なることはなかった。

症例⑨および⑩はスタクロット LA または dRVVT 試薬グラディオアによる確認検査で LA と確認できたが、CMT では図 3-B に示す形状で LA 判定が明確にできず、コントロール血漿の違いにより判定が容易になることはなかった。

5) 市販凝固因子欠乏血漿における CMT の比較 (図 4)

市販凝固因子欠乏血漿における CMT の比較では、いずれの凝固因子欠乏血漿においても、下に凸の凝固因子欠損パターンを呈し、GK を除いたコントロール血漿では凝固時間や反応曲線の形状はほぼ同じであった。

GK では、被検血漿比率が低いポイント、すなわち正常血漿の比率が高いポイントでやや凝固時間が延長する傾向があり、下に凸の度合いが曖昧になる傾向が認められた。しかし、判定が異なることはなかった。

6) Warfarin 服用患者血漿における CMT の比較 (図 5)

Warfarin 服用症例における CMT の比較においても GK を除いたコントロール血漿では凝固時間および反応曲線の形状はほぼ同じであった。GK を用いた場合では、凝固時間が延長傾向を示し反応曲線の下に凸の度合いが低下する傾向であった。しかし、その判定が異なることは

なかった。また、PT-INR 値の違いによって、おのこのコントロール血漿での反応曲線の形状の差異もみられなかった。

7) 後天性血友病および vWD 患者血漿における CMT の比較 (図 6)

後天性血友病および vWD 患者血漿における CMT の比較においても GK を除いたコントロール血漿では凝固時間、反応曲線の形状はほぼ同じであった。GK を用いた場合では、凝固時間が延長傾向を示し反応曲線の下に凸の度合いが低下する傾向であった。しかし、いずれのコントロール血漿を用いても下に凸の因子欠損パターンが得られ、その判定が異なることはなかった。

考察

1. APTT-LA 測定に有用な APTT 試薬の検討

内因系凝固因子活性のスクリーニング検査である 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。前者は出血性病態を示し、後者は血栓性の病態を示すため、APTT 延長の解釈を誤れば治療方針を間違えることとなる。したがって、正確な診断のために適切な APTT 試薬を選ぶことは重要である。通常用いられる市販の APTT では、リン脂質抽出源や活性化剤の違いにより凝固因子やヘパリンなどに対する感受性が異なることが知られおり、これまでもヘパリンや LA に対する感受性の差異について検討[13-15]がなされている。近年開発された合成リン脂質を用いた試薬のいくつかは、ヘパリンや LA に対し良好な感受性を示し有用であったと報告されている[16-18]。

今回に検討に用いた 6 種の APTT 試薬は、各試薬により 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いる[13][14][19][20]。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。一方、APTT-1 および 5 では LA 検出率は極めて低く、LA 偽陰性となる可能性も否定できない。LA 測定の場合には APTT 試薬を選ぶ必要があると思われた。

APTT 試薬はウサギ脳など生物由来リン脂質を用いたものが中心であり、ヘパリン感度や LA 検出率も大きく異なる状況であったが、近年合成リン脂質による測定感度の高い試薬が開発された。これらの測定感度は、試薬に含まれるリン脂質組成や濃度および活性化剤の種類や調整方法に関係があると考えられるが、市販されている試薬の正確なリン脂質の構成は公表されてはいない。一般的に、合成リン脂質による APTT 試薬ではホスファチジルセリン (PS)、ホスファチジルエタノラミン (PE) およびホスファチジルコリン (PC) から構成され、特に PS が凝固時間の調整上重要であると考えられている[17] [21]。また PE は PS および PC のヘパリンに対する反応を調節しているとする報告[21]もある。

CMT における LA などのインヒビターに対する判定は、コントロールに対して凝固時間の延長が大きな試薬ほど良好で[21]、リン脂質濃度およびその構成に影響される。今回の検討では、合成リン脂質を用いた試薬が LA に高感度であり、その中でも APTT 比の大きい APTT-3 が最も感度が高く、リン脂質濃度がやや低いことによるものと推察できる。

様々な APTT 試薬がある中で、2009 年 ISTH-SSC では LA を高感度に検出する試薬としてシリカを活性化剤として用いている試薬を推奨している[4]。その根拠としては、Tripodi ら[23]が一部の市販 APTT 試薬で LA 検体を測定した結果、活性化剤にシリカを用いた試薬がエラグ酸を活性化剤とした試薬にと比較して LA 感受性が高く有用であったことが挙げられている。しかしながら、市販 APTT 試薬はリン脂質の濃度・組成や添加物が異なっており、簡単に活性化剤の違いで判断することはできない。今回の検討でも、それぞれの疾患群においてエラグ酸とシリカに有意な差を認めなかった。熊野ら[24]は、4 種類の市販 APTT 試薬と同一リン脂質濃度において活性化剤のみが異なるシリカとエラグ酸の 2 種類の調整 APTT 試薬を用いて LA に対する感度を検討した結果、エラグ酸を活性化剤として調整した試薬においても LA に対する感受性が高い結果であったと報告している。APTT 試

薬の LA に対する感度は活性化剤に依存せずリン脂質の配合や濃度に依存する可能性を示唆している。

APTT 試薬の選択としては、使用する測定試薬のさまざまな変動因子に対する感度を考慮し、適切な測定試薬を使用することが求められる。本来、凝固異常を良好に検出するための APTT 測定のスタンダード試薬としては、内因系凝固因子欠損や LA などのすべての病態で高い感度を有する試薬がよいと思われる。

今回の結果から、APTT-3 がスタンダード試薬として最も有用と考えられる。また、APTT 測定では国際標準試薬がないため標準化が望まれており、APTT-3 のような合成リン脂質を用いた試薬がヘパリンや LA に感受性が高く内因系凝固因子欠損でも良好な感度を示したことは、APTT 試薬の標準化を進める上で方向性を与えるものと考えられる。LA の見落としを避けるためにも、LA 感度の高い試薬での日常検査を行うことが勧められる。

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 [25]。施設間差のない自家製血小板除去プール血漿の作製が可能であれば理想的であるが、現状では CMT に適した市販コントロール血漿の決定が必要である。

我々は、これまでの検討から Precision BioLogic (PB) 社製の凍結正常プール血漿が有用であることを報告し、CMT おけるコントロール血漿の標準品として推奨してきた [10]。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 CMT を実施し、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。コントロール血漿に含まれる残存血小板由来のリン脂質は LA 検出の精度に影響すると考えられるため、我々は健常人 20 名以上より採取したクエン酸加血漿をフィルター処理し、LA 用のコントロール血漿としている。我々のコントロール血漿を市販されて

いるコントロール血漿とを比較すると，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[26]．さらに市販コントロール血漿では，直線になるパターンや逆 S 字になるパターンも認められ，実臨床の場合においては LA の判断に迷う可能性も危惧された．コントロール血漿においても，フィルター処理コントロール血漿を各施設で作成することは難しく，LA 感度の良好な市販コントロール血漿が望まれる．今回の CMT に用いるコントロール血漿の検討では，いずれの市販コントロール血漿の再現性は良好であったが，正常範囲ながらも内因系凝固因子活性が低下しているコントロール血漿も存在した．ISTH の推奨[4]では，CMT 用のコントロール血漿は，血小板数 $< 10^7/\text{ml}$ ($=10^4/\text{mm}^3$ (μL))，全ての凝固因子活性が正常域であること，40 人以上の血漿を混和して用いること，上記を満たせば市販コントロール血漿も使用可としている．本検討で用いたコントロール血漿は，血漿中の残存血小板数や 40 人以上の血漿をプールしている否かについては確認できなかったが，それらの条件の確認の取れている PB と比較して判定が異なる結果は認められなかったことより，概ねこの条件に準じた作製がなされていると思われる．凝固因子活性においては RD のみいくつかの凝固活性低下が認められ，条件を満たさなかったが，その他の正常血漿は ISTH の推奨法通りに利用が可能と考えられた．

本検討では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．本検討では反応曲線の形状はほとんどかわらず判定が異なることはなかった．しかしながら，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，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る．

本検討では，CMT のコントロール血漿として，PB 社および GK 社

の凍結品が良好な結果をもたらす推奨できるコントロール血漿と思われた。また、凍結乾燥品では、本検討および基礎性状より IL 社製が有用であると思われた。

本検討では、LA 検査としての CMT の標準化において重要な最適な試薬および混合に用いる最適なコントロール血漿に着目して検討した。

しかしながら、CMT の標準化においては前述したように被検血漿の調整方法や混合血漿数などを含めた検査手技の統一、明確な判定方法の確立など、多数の課題がある。これらの課題の解決するためには、より多くの臨床例を含めた検討の積み重ねが必要である。多くの検討結果が蓄積されることで、CMT の標準化につながると思われる。

結語

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。また、凍結乾燥品としては、IL 社製のコントロール血漿は有用であり推奨できると思われた。

5. 謝辞

稿を終えるに当たり、本研究の機会を与えてくださるとともに、終始、御指導御助言を賜りました旭川大学医学部臨床検査医学講座藤井聡教授に深く感謝申し上げます。また本研究の全般にわたり、直接御指導、御高閲を賜りました北海道医療大学歯学部内科学分野家子正裕教授に深謝申し上げますとともに、同分野の諸氏に御礼の意を表します。

文献

- 1 家子 正裕, 内藤 澄悦, 吉田 美香, 他: 抗リン脂質抗体症候群の病態と検査 - 特にループスアンチコアグラントによる特殊病態 - . 臨床病理 63: 1220-1227, 2015.
- 2 家子正裕:抗リン脂質抗体症候群の診断と治療 日本血栓止血学会雑誌 8:407-417,2007.
- 3 Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. Thromb Haemost 1995; 74: 1185-90.
- 4 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.
- 5 Keeling D, Mackie I, Moore GW, Greer IA, Greaves M, British Committee for Standards in Haematology. Guidelines on the investigation and management of antiphospholipid syndrome. Br J Haematol 2012;157:47-58.
- 6 Clinical Laboratory Standards Institute. Laboratory Testing for the Lupus Anticoagulant Approved Guideline CLS document H-60A CLSI: Wayne, PA. 2014
- 7 山崎 哲, 内藤澄悦, 静 怜子, 家子正裕: 「特集 凝固検査の標準化」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. 日本血栓止血学会誌 27 2016.
- 8 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

- 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ミキシングテスト(交差混合試験). 臨床病理 57: 990-998, 2009.
- 9 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.
 - 10 Miyakis S, et al : International consensus statement on an update of the classification criteria for definite anti-phospholipid syndrome(APS). J Thromb Haemost 4 : 295-306, 2006.
 - 11 吉田美香, 内藤澄悦, 家子正裕, 他. 第 4 回日本血栓止血学会学術標準化委員会シンポジウム プログラム, p23. 2009.
 - 12 渥美達也, 山崎雅英. 厚生科学研究費補助金 難治性疾患克服研究事業「自己免疫性疾患に関する調査研究」平成 14~16 年度 総合研究報告書, p17-21.2005.
 - 13 Brandt JT, Triplett DA, Musgrave K, Orr C. The sensitivity of different coagulation reagents to the presence of lupus anticoagulants. Arch Pathol Lab Med. 1987; 111: 120-4.
 - 14 天谷初夫, 静怜子, 早川昌基, 小島順子, 三浦由美子, 今泉伸一, 他. ループスアンチコアグラントに関する基礎検討 第 3 報 活性化部分トロンボプラスチン時間測定試薬の感受性比較. 医学検査 1994; 43: 904-8.
 - 15 Martin M, et al. Heparin monitoring difficulties: assessment of different methods on a coagulation analyzer. Thromb Haemost 1995; 73: 1241.
 - 16 Ts'ao C, Neofotistos D, Oropeza M, Rogan M, Santos M. Performance characteristics of a new synthetic APTT reagent. Clin Lab Haematol. 1998; 20: 307-13.
 - 17 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 2001; 3: 124-31.

- 18 鈴木典子, 山崎哲, 井本清美, 安室洋子, 瀧正志. 合成リン脂質を用いた APTT 試薬の評価. 日本検査血液学会雑誌 2003; 4: 136-41.
- 19 天谷初夫, 他. 活性化部分トロンボプラスチン時間測定に関する基礎的検討(第三報)-プラテリン・プラス・アクチベーターとプラテリンエクセル LS を用いた結果の解離症例について-. 機器・試薬 1992; 15: 79-83.
- 20 Denis-Magdelaine A, Flahault A, Verdy E. Sensitivity of sixteen APTT reagents for the presence of lupus anticoagulants. Haemostasis 1995; 25: 98-105.
- 21 van den Besselaar AM, Neuteboom J, Bertina RM. Effect of synthetic phospholipids on the response of the activated partial thromboplastin time to heparin. Blood Coagul Fibrinolysis 1993; 4: 895-903.
- 22 Brandt JT, Triplett DA, Alving B, Scharrer I. Criteria for the diagnosis of lupus anticoagulants: an update. On behalf of the Subcommittee on Lupus Anticoagulant/Antiphospholipid Antibody of the Scientific and Standardisation Committee of the ISTH. Thromb Haemost 1995; 74: 1185-90.
- 23 Tripodi A, Biasiolo A, Chantarangkul V, Pengo V. Lupus anticoagulant (LA) testing: performance of clinical laboratories assessed by a national survey using lyophilized affinity-purified immunoglobulin with LA activity. Clin Chem. 2003 Oct;49(10):1608-14.
- 24 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 2338-2343.
- 25 Triplett DA. Screening for the lupus anticoagulant. Ric Clin Lab. 1989;19:379-389
- 26 吉田美香, 家子正裕. クロスミキシング試験におけるサンプル採取法の注意点. 医療と検査機器・試薬 2012; 36: 841-47.

図の説明

図 1. 各 APTT 試薬の組成別での LA 陽性率

LA 陽性では合成リン脂質を用いた試薬がウサギ脳由来に比べ有意 ($p < 0.05$) に陽性率は高かった (図 1. ①)。活性化剤の比較では、エラグ酸とシリカに有意な差を認めなかった (図 1. ②)。* t 検定 : $p < 0.05$ 。

図 2. 市販 LA 陽性コントロール血漿におけるミキシングテストの比較

PB : PB CRYO check PNP, GK : George King NORMAL PLASMA

IL : IL NEGATIVE CONTROL, RD : Roche POOL NORM

CN : COAGTROL N

横軸は被検血漿比率、縦軸は凝固時間を示す。また、各正常血漿を示すマーカーは図下に示した通りである。

図 3-A. LA 陽性患者血漿におけるミキシングテストの比較 (反応曲線 : 典型例)

PB : PB CRYO check PNP, GK : George King NORMAL PLASMA

IL : IL NEGATIVE CONTROL, RD : Roche POOL NORM

CN : COAGTROL N

横軸は被検血漿比率、縦軸は凝固時間を示す。また、各正常血漿を示すマーカーは図下に示した通りである。

図 3-B. LA 陽性患者血漿におけるミキシングテストの比較（反応曲線：
非典型例）

PB : PB CRYO check PNP, GK : George King NORMAL PLASMA
IL : IL NEGATIVE CONTROL, RD : Roche POOL NORM
CN : COAGTROL N

横軸は被検血漿比率、縦軸は凝固時間を示す。また、各正常血漿を示す
マーカーは図下に示した通りである。

図 4. 市販凝固因子欠乏血漿におけるミキシングテストの比較

PB : PB CRYO check PNP, GK : George King NORMAL PLASMA
IL : IL NEGATIVE CONTROL, RD : Roche POOL NORM
CN : COAGTROL N

横軸は被検血漿比率、縦軸は凝固時間を示す。また、各正常血漿を示す
マーカーは図下に示した通りである。

図 5. Warfarin 服用患者血漿におけるミキシングテストの比較（スライ
ド 10）

PB : PB CRYO check PNP, GK : George King NORMAL PLASMA
IL : IL NEGATIVE CONTROL, RD : Roche POOL NORM
CN : COAGTROL N

横軸は被検血漿比率、縦軸は凝固時間を示す。また、各正常血漿を示す
マーカーは図下に示した通りである。

図 6. 後天性血友病および vWD 患者血漿におけるミキシングテストの比較

PB : PB CRYO check PNP, GK : George King NORMAL PLASMA
IL : IL NEGATIVE CONTROL, RD : Roche POOL NORM
CN : COAGTROL N

横軸は被検血漿比率、縦軸は凝固時間を示す。また、各正常血漿を示すマーカーは図下に示した通りである。

表1. 各血漿処理方法による凝血学的検査

		原血漿	二重遠心処理	低速フィルター処理
APTT (sec)	未凍結	31.3 ± 1.2	31.5 ± 1.5	30.5 ± 1.3
	凍結融解後	31.6 ± 1.6	31.5 ± 1.5	30.3 ± 1.0
FBG(mg/dL)	未凍結	270 ± 44.5	270 ± 45.0	265 ± 45.0
	凍結融解後	272 ± 45.0	273 ± 45.0	274 ± 42.0
FVIII (%)	未凍結	90.6 ± 16.6	90.6 ± 16.8	91.0 ± 16.8
	凍結融解後	90.0 ± 18.6	90.0 ± 18.0	90.3 ± 18.2
vWF (%)	未凍結	115.0 ± 31.0	116.0 ± 30.0	120.0 ± 30.0
	凍結融解後	120.0 ± 34.0	118.0 ± 34.0	122.0 ± 34.5

健常人57名(男 35, 女 22; 平均年齢 51.8歳)の血漿を用いた, 二重遠心処理: 原血漿を再度 室温 3,000rpm 15分間遠心分離し, その上清を用いた. 低速フィルター処理: 血漿のフィルター通過速度を20 sec/ml (1秒間に約1滴滴下)の比較的低速度で処理した. 即日未凍結での測定値と-80°C凍結保存し, 37°C water bathで解凍後の測定値を比較したところ, 原血漿と有意な差を認められなかった.

表2. APTT試薬

	APTT試薬	リン脂質	活性化剤	塩化カルシウム
1	トロンボチェックAPTT	ウサギ脳由来	エラグ酸	0.02M
2	トロンボチェックAPTT-SLA	合成リン脂質	エラグ酸	0.02M
3	ヒーモス IL APTT-SP	合成リン脂質	シリカ	0.025M
4	ヒーモス IL APTT シンサシル	合成リン脂質	無水ケイ酸	0.02M
5	APTT-EA	ウサギ脳由来	エラグ酸	0.02M
6	APTT-P	ウサギ脳由来	シリカ	0.025M

表3. 各APTT試薬におけるLA陽性率とPTT-LAとの相関性

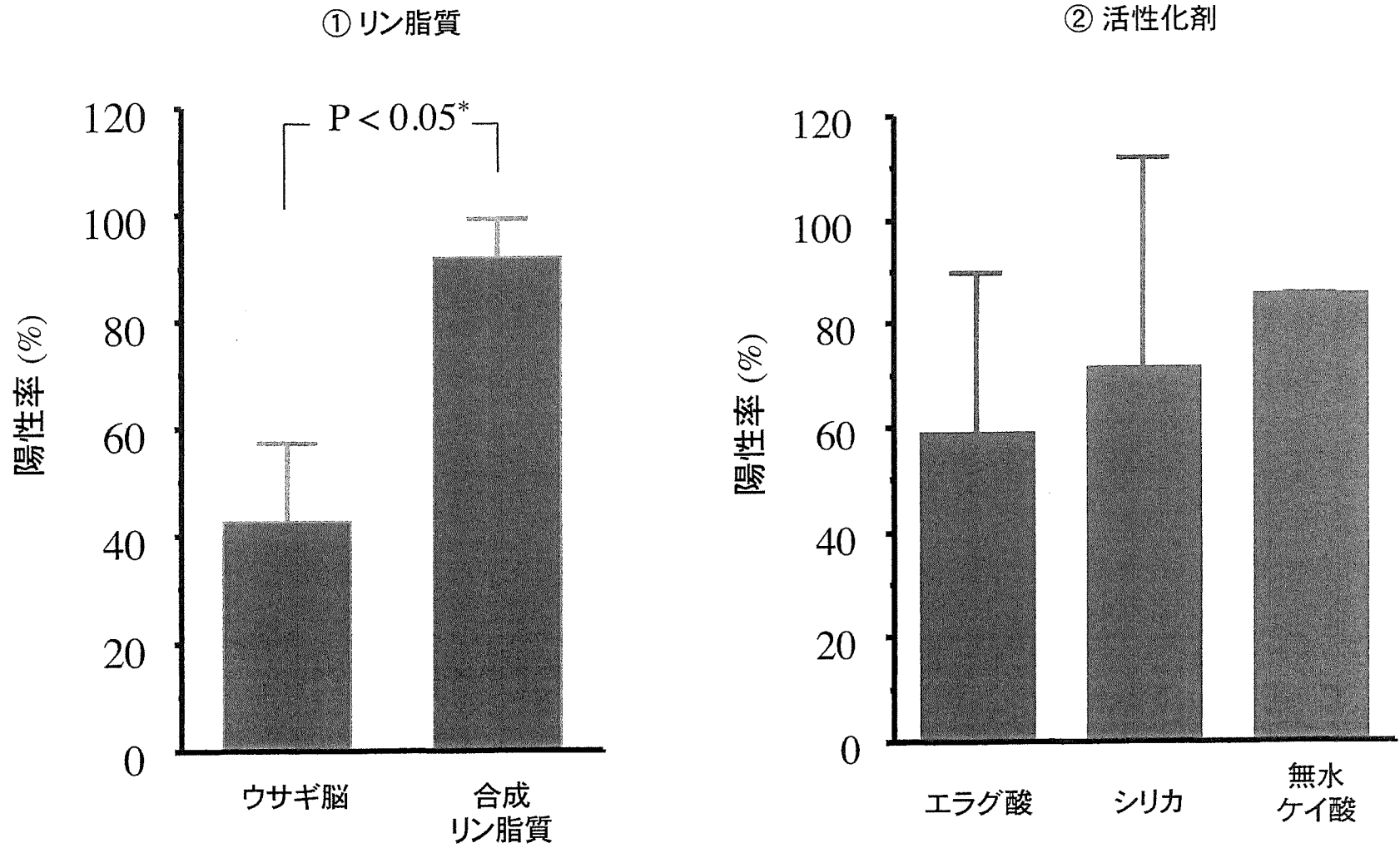
APTT試薬	測定結果		LA陽性率 (%)	PTT-LAとの相関* 相関係数(R)
	コントロール比	コントロールの 凝固時間(sec)		
1	1.38 ± 0.44	(37.8 ± 3.4)	57.1	R = 0.800
2	1.71 ± 0.48	(37.7 ± 4.2)	90.5	R = 0.672
3	2.40 ± 0.88	(45.2 ± 4.6)	100.0	R = 0.881
4	1.71 ± 0.49	(39.9 ± 3.9)	85.7	R = 0.883
5	1.21 ± 0.31	(40.3 ± 5.9)	28.9	R = 0.794
6	1.28 ± 0.34	(38.6 ± 4.0)	42.9	R = 0.837
PTT-LA	2.37 ± 0.82	(50.4 ± 5.2)	100.0	—

* analyzed with Pearson's correlation coefficient

表4. 各APTT試薬におけるLA検出の感度・特異度(ROC曲線による解析)

APTT試薬	感度 (%)	特異度 (%)
1	57.1	100.0
2	90.5	98.0
3	100.0	100.0
4	85.7	98.0
5	28.6	96.0
6	42.9	100.0

図1. 各APTT試薬の組成別でのLA陽性率



* analyzed with unpaired student t-test

表5. 各種正常血漿の性状

	PB	GK	IL	RD	CN
PT (%)	100	87	92	90	90
APTT (s)	26.4	31.3	26.5	32.6	26.9
FBG(mg/dL)	310	291	316	301	299
FVIII (%)	91	71	86	62	79
FIX (%)	103	94	101	49	98
FXI (%)	102	101	101	88	96
FXII (%)	89	74	78	48	86

PB: PB CRYO check PNP GK: George King NORMAL PLASMA IL: IL NEGATIVE CONTROL RD: Roche POOL NORM
CN: COAGTROL N

PT: トロンボチェックPT, APTT: トロンボチェックAPTT-SLA, FBG: コアグピアFbg,
凝固因子活性: トロンボチェックAPTT-SLA, トロンボチェック凝固因子欠乏血漿, 血液凝固試験用標準ヒト血漿

表6. 再現性試験

同時再現性 (N=10)	PB	GK	IL	RD	CN
平均	35.8	42.4	36.6	36.6	35.7
SD	0.11	0.19	0.17	0.17	0.08
CV(%)	0.30	0.46	0.46	0.46	0.24

日差再現性 (N=5)	PB	GK	IL	RD	CN
平均	35.7	42.3	36.5	36.3	35.8
SD	0.44	1.49	0.23	0.34	0.19
CV(%)	1.24	3.53	0.62	0.93	0.55

PB:PB CRYO check PNP GK:George King NORMAL PLASMA IL:IL NEGATIVE CONTROL RD:Roche POOL NORM
CN:COAGTROLN

測定試薬:PTT-LA®

図2. 市販LA陽性コントロール血漿における比較

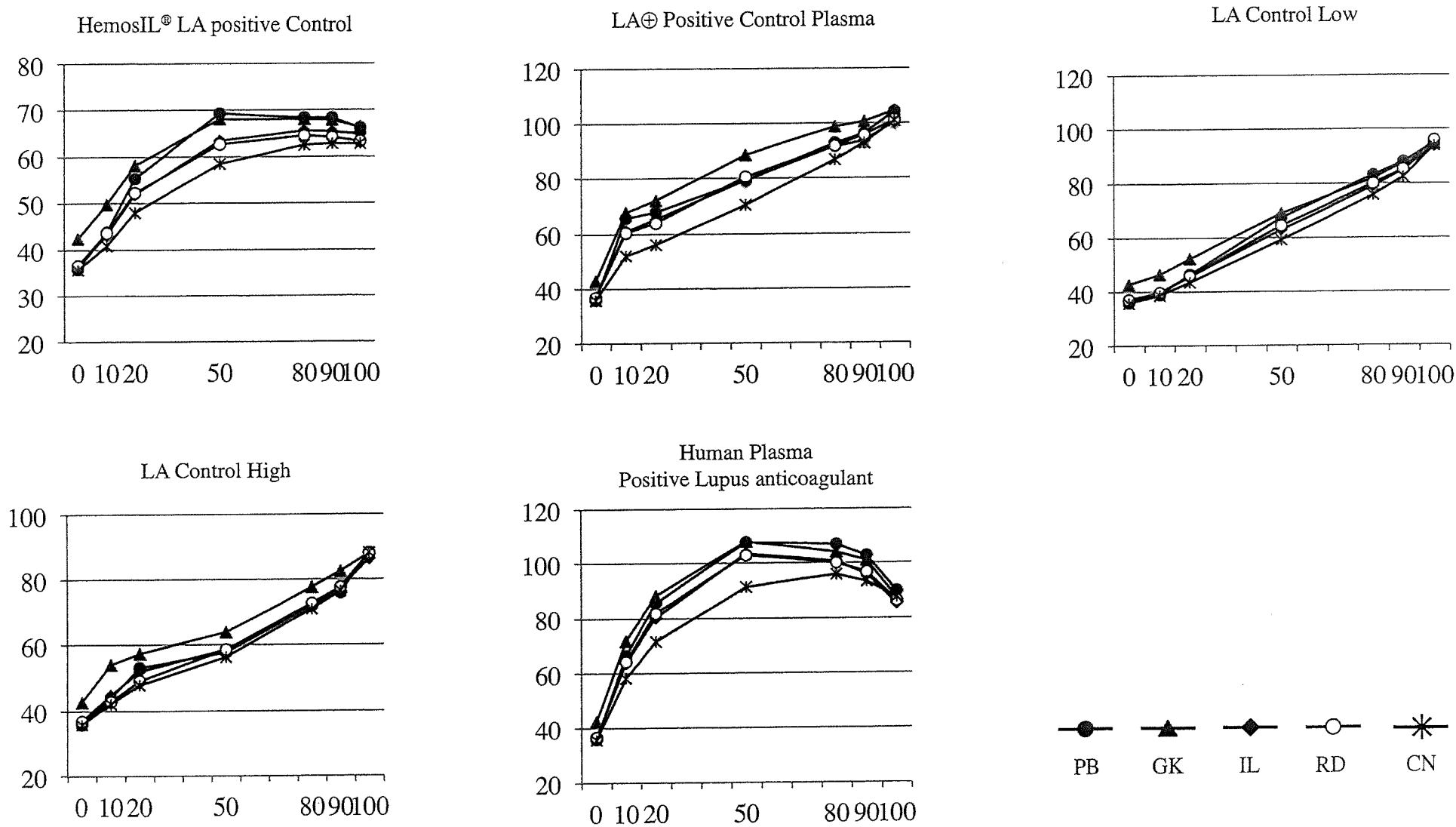


図3-A. LA陽性患者血漿における反応曲線: 典型例

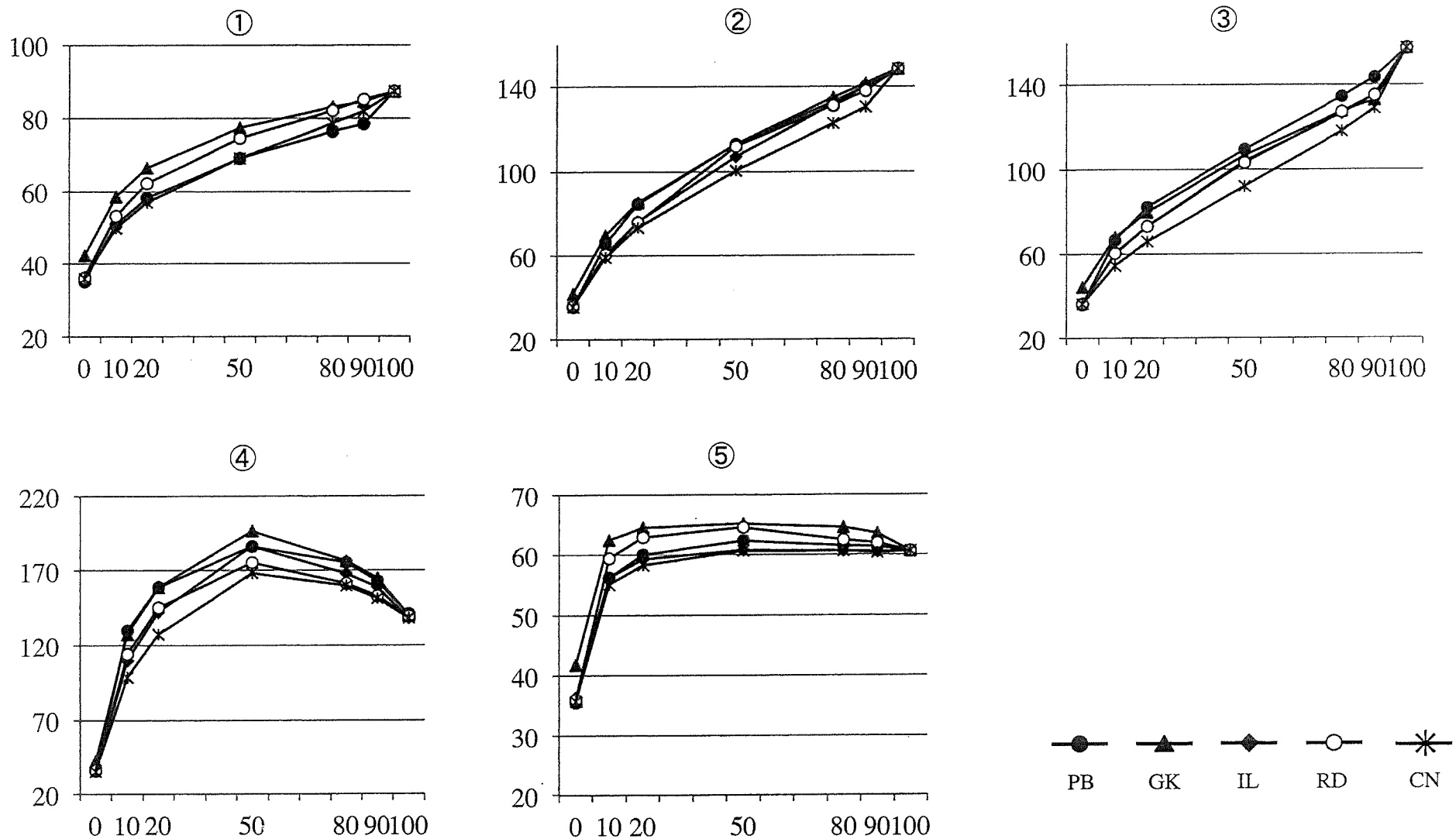
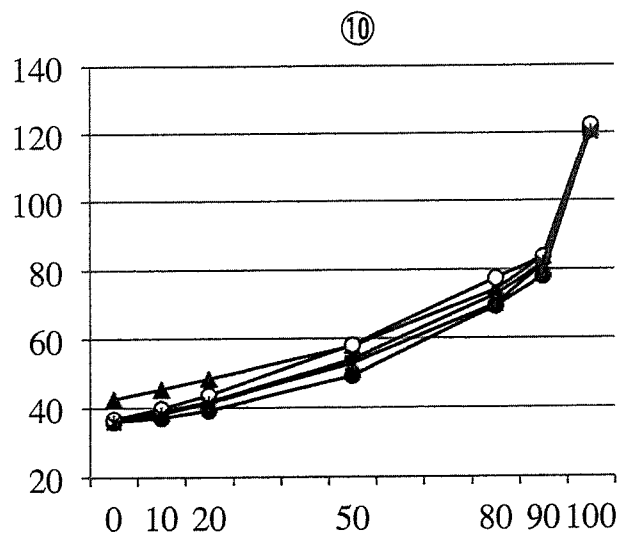
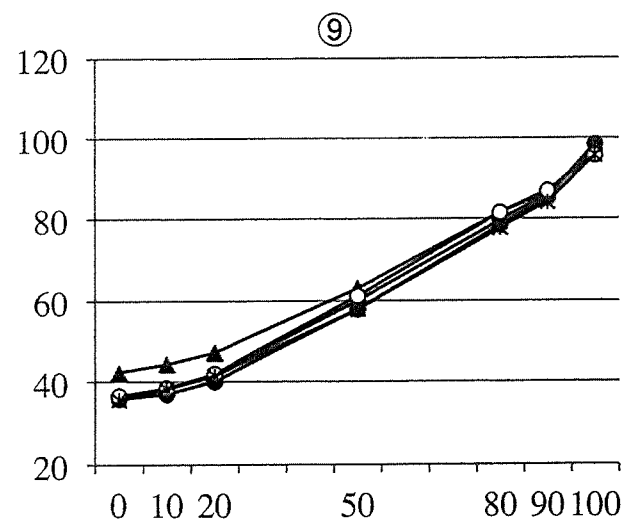
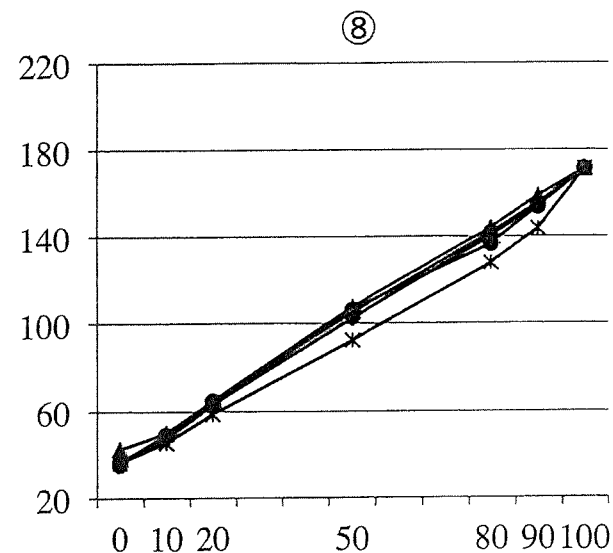
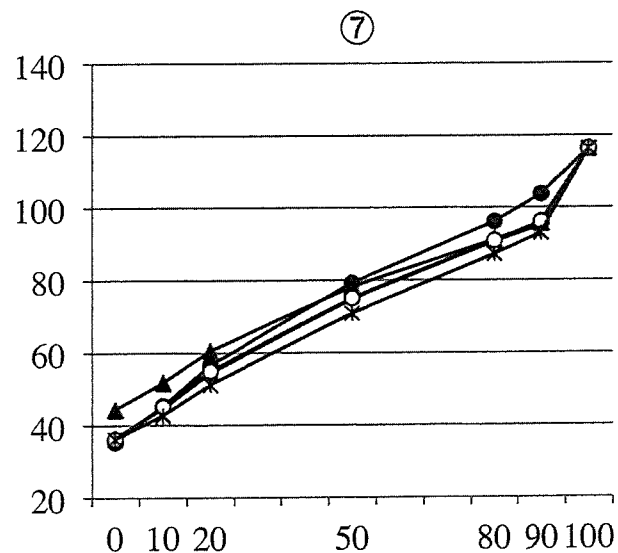
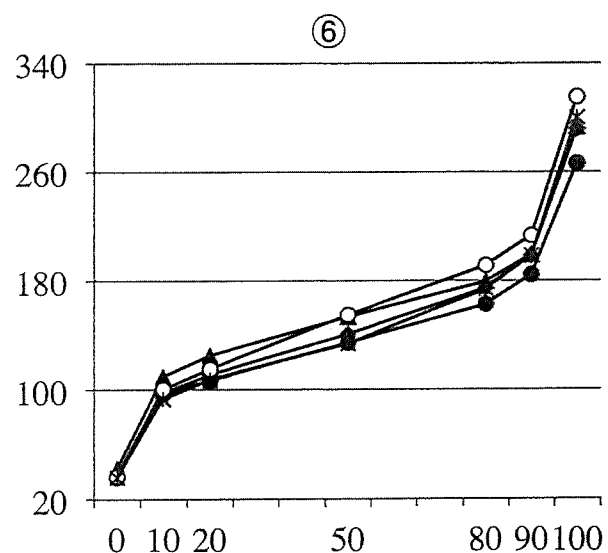
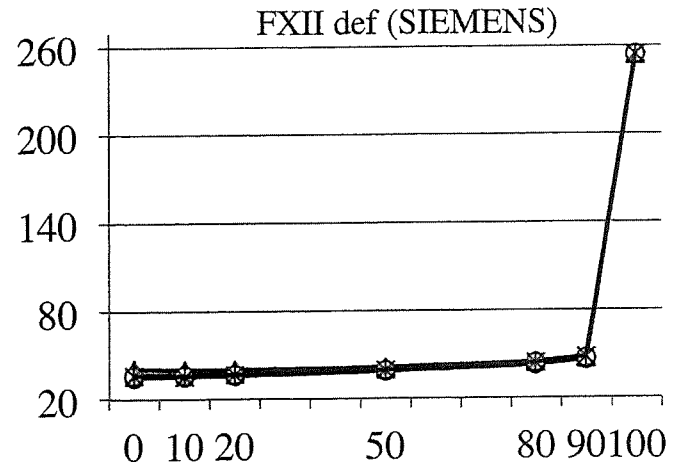
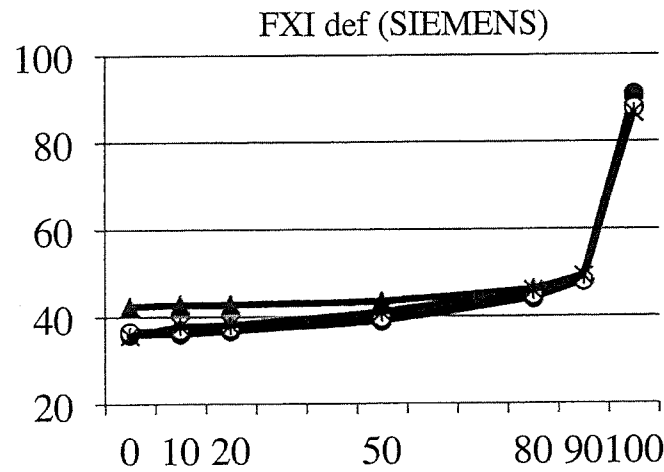
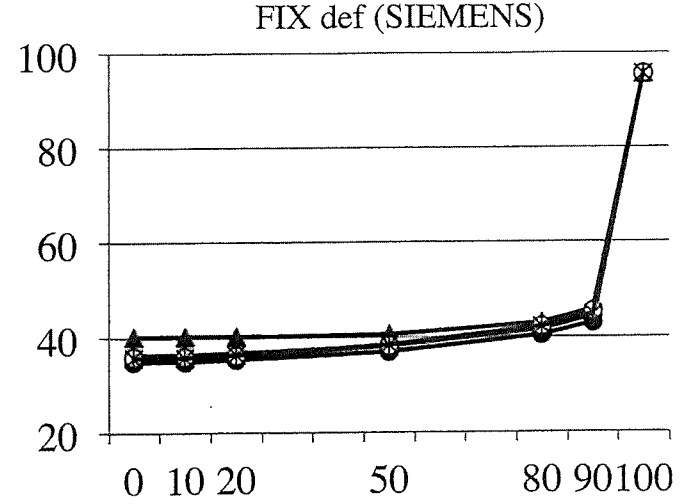
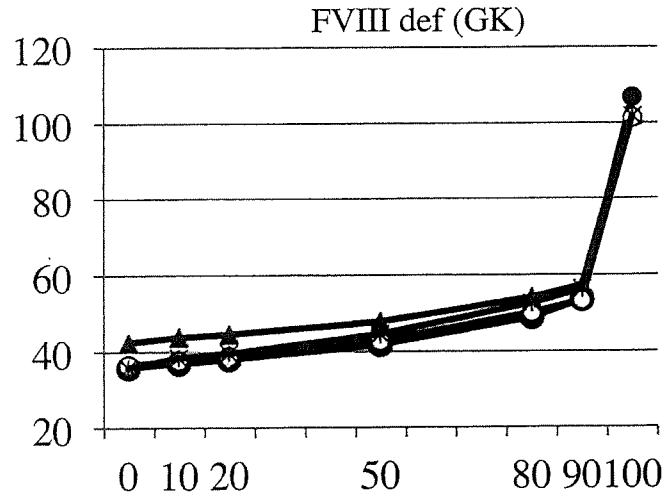


図3-B. LA陽性患者血漿における反応曲線:非典型例



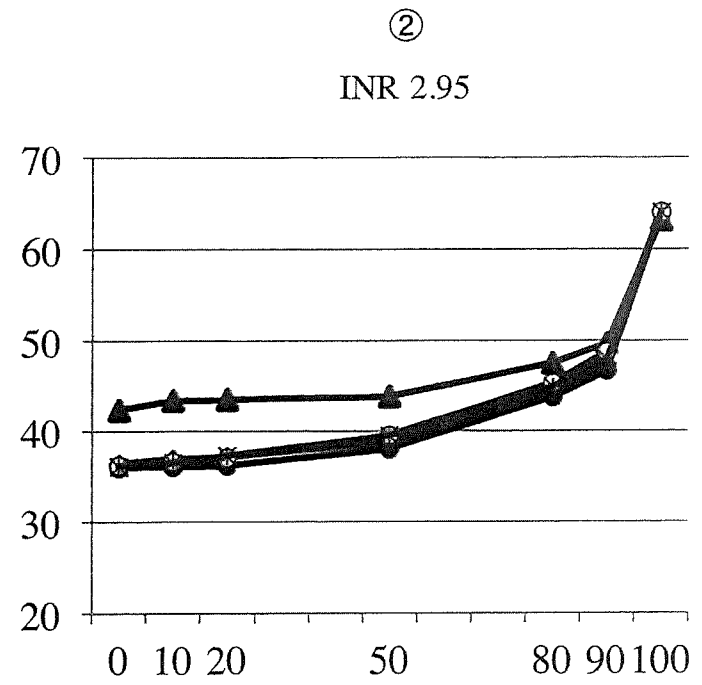
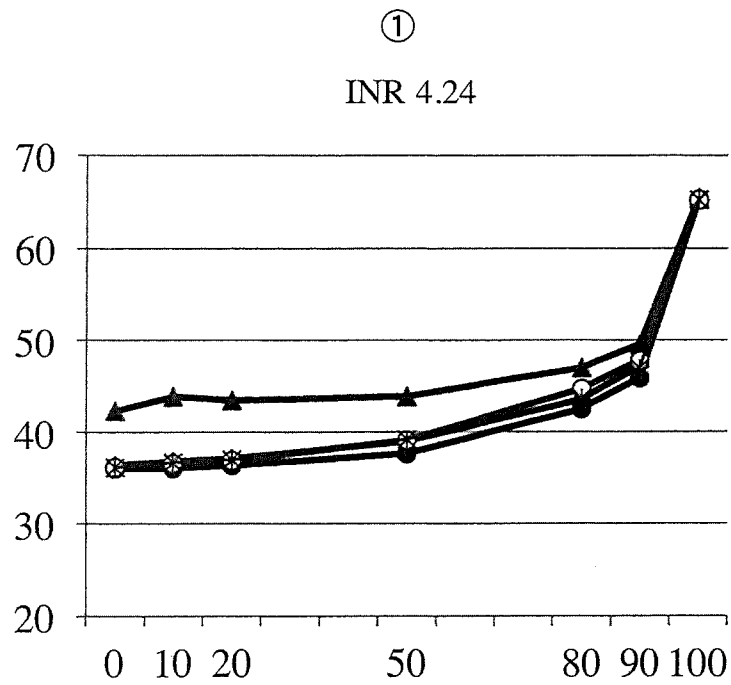
● PB ▲ GK ◆ IL ○ RD ✱ CN

図4. 市販凝固因子欠乏血漿



PB
 GK
 IL
 RD
 CN

図5. Warfarin服用患者血漿



● PB ▲ GK ◆ IL ○ RD * CN

図6. 後天性血友病AおよびvWD患者血漿

