

当院における APTT クロスミキシングテストの現状 —目視判定法と数値判定法の検討—

高松赤十字病院 検査部

和田紗侑里, 別枝 成美, 赤瀬 智美, 渡辺 典子, 宮本由美子, 高杉 淑子

要 旨

APTT クロスミキシングテストは, APTT 延長を鑑別するスクリーニング検査である。当院では, グラフによる目視判定法を実施しているが, 判定に苦慮する症例もあった。今回, 目視判定法と数値判定法の一つである Rosner index (index of circulating anticoagulant : ICA) を用いて, 12 症例の有用性について検討した。その結果, 凝固因子欠乏または低値の症例 (4 例) では, 3 例は共に凝固因子欠乏パターンと判定されたが, 1 例は判定が不一致となった。凝固因子インヒビターの症例 (4 例) では, 共にインヒビターパターンと判定された。ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant : LA) 陽性の症例 (4 例) では, 3 例は目視判定法で LA パターンとなり, ICA と一致したが, 直接経口抗凝固薬 (direct oral anticoagulants : DOAC) 投与中の症例 (1 例) において, 目視判定法で判定困難となったが, ICA はインヒビターパターンと判定された。クロスミキシングテストの判定方法として, 目視判定法と数値判定法の併用により, 明確な判定へ繋がることが示唆された。

キーワード

APTT クロスミキシングテスト, 目視判定法, 数値判定法, ICA

はじめに

活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time : APTT) 延長の原因には, 血友病などの凝固因子量低下, 後天性血友病などの凝固因子に対するインヒビター出現, 抗リン脂質抗体症候群などの LA 陽性が考えられる¹⁾。出血傾向となる凝固因子欠乏や凝固因子インヒビターと血栓傾向となる LA では治療方針が大きく異なり¹⁾, 迅速な結果報告が必要とされる。凝固因子活性などの外注検査は数日を要するが, クロスミキシングテストは当日中に院内で検査が可能のため, APTT 延長を鑑別するスクリーニング検査として有用である。今回, 当院で実施されたクロスミキシングテストにおいて, 一般的に用いられている目視判定法と国際血栓止血学会標準化委員会が推奨する数値判定法の ICA

について有用性を検討したので報告する。

対象・方法

対象

2012 年 11 月から 2019 年 9 月までに当院で実施したクロスミキシングテスト 12 症例。症例の内訳は, 凝固因子欠乏または低値が 4 例 (第Ⅷ・Ⅸ・Ⅺ・Ⅻ因子活性低値, 第Ⅸ因子欠乏, 第Ⅹ因子欠乏, 第Ⅺ因子欠乏), 凝固因子インヒビターが 4 例 (第Ⅴ因子インヒビター 1 例, 第Ⅷ因子インヒビター 3 例), LA 陽性が 4 例であった。

方法

1. 検体処理方法

患者血漿 (3.2% クエン酸ナトリウム加血漿) は, 1911g, 13 分で 2 回遠心後, 上清を分離した。上清は, 多項目自動血球分析装置 XE-5000 (シス

メックス社)で測定を行い、血小板数が $0 \times 10^3/\mu\text{L}$ であることを確認し、患者血漿とした。正常血漿は、コアグトロール N (シスメックス社)を使用した。

2. 測定方法

即時反応は、全自動血液凝固測定装置 CS-2100i (シスメックス社)の自動希釈機能を用いて、患者血漿比率 0, 10, 20, 50, 100% となるように正常血漿との混合血漿を作製し、APTT の凝固時間を測定した。遅延反応は、用手法で患者血漿比率 0, 50, 100% の混合血漿を作製し、37℃ 2 時間加温後に APTT の凝固時間を測定した。APTT の試薬は、トロンボチェック APTT-SLA (シスメックス社)と 0.02M 塩化カルシウム液 (シスメックス社)を用いた。

3. 判定方法

視覚的に判定を行う目視判定法と国際血栓止血学会標準化委員会が推奨する数値判定法の ICA^{2) 3)}を用いて判定を行った。目視判定法は表計算ソフト Excel (Microsoft) により、縦軸に APTT 凝固時間 (秒)、横軸を患者血漿比率 (%) としてグラフを作成し、即時反応と遅延反応共に、患者血漿比率 0 % と 100% を結ぶ直線より下に凸の反応曲線は凝固因子欠乏パターン、即時反応で下に凸、遅延反応でより上に凸を示す反応曲線であればインヒビターパターン、即時反応と遅延反応が同様な直線または上に凸の反応曲線の場合は LA パターンと判定した⁴⁾。

ICA は即時反応における APTT の凝固時間を a: 患者血漿の凝固時間, b: 患者血漿比率 50% の混合血漿の凝固時間, c: 正常血漿の凝固時間として、 $ICA = (b-c)/a \times 100$ を用いた³⁾。本検討では、Kumano らのカットオフ値より、12.4 未満は凝固因子欠乏パターン、12.4 以上をインヒビターパターンとした⁵⁾。

結 果

凝固因子欠乏または低値であった症例 (4 例) において、症例 1~4 (図 1~4) は、目視判定法では、即時反応と遅延反応共に下に凸を示し、凝固因子欠乏パターンとなった。ICA では、症例 1 は 17.8 でインヒビターパターンの判定となったが、他の症例では、症例 2 は 7.1, 症例 3 は 9.4, 症例 4 は 9.9 で凝固因子欠乏パターンとなった。

凝固因子に対するインヒビターが出現していた症例 (4 例) において、目視判定法では、症例 5, 8 (図 5, 8) は、即時反応で下に凸、遅延反応で直線上、症例 6, 7 (図 6, 7) は、即時反応で下に凸、遅延反応で上に凸を示しており、インヒビターパターンとなった。ICA では、症例 5 は 12.7, 症例 6 は 13.4, 症例 7 は 17.7, 症例 8 は 27.8 で、共にインヒビターパターンの判定となった。Bethesda 法によるインヒビター定量では、症例 5 は 19.1 BU/mL, 症例 6 は 13.3 BU/mL, 症例 7 は 22.3 BU/mL, 症例 8 は 26.0 BU/mL であった。

LA 陽性の症例 (4 例) において、症例 9 の DOAC 投与中 (図 9) における目視判定法では、即時反応は 0 % と 100% を結ぶ直線上、遅延反応は直線に近い下に凸となり、判定困難となったが、休薬後に行った再検査 (図 10) では、即時反応と遅延反応共に、上に凸を示し、LA パターンとなった。ICA では、DOAC 投与中は 35.8, 休薬後は 32.4 とインヒビターパターンの判定となった。症例 10~12 (図 11~13) は、目視判定法では、即時反応と遅延反応共に上に凸を示し、LA パターンとなった。ICA では、症例 10 は 35.2, 症例 11 は 40.6, 症例 12 は 45.0 で、インヒビターパターンの判定となった。

表 1 各症例における測定結果

症例	延長原因	外注検査結果 (基準値)	目視判定法	ICA
1	第Ⅷ, Ⅸ, Ⅺ, Ⅻ因子活性低値	Ⅷ : 51.4% (78.0~165.0%), Ⅸ : 32.0% (67.0~152.0%) Ⅺ : 43.4% (75.0~137.0%), Ⅻ 17.8% (36.0~152.0%)	凝固因子欠乏パターン	17.8
2	第Ⅺ因子欠乏	Ⅺ : 2.8% (75.0~137.0%)	凝固因子欠乏パターン	7.1
3	第Ⅹ因子欠乏	Ⅹ : 1.1% (58.0~200.0%)	凝固因子欠乏パターン	9.4
4	第Ⅸ因子欠乏	Ⅸ : 5.7% (67.0~152.0%)	凝固因子欠乏パターン	9.9
5	第Ⅷ因子インヒビター	Ⅷ : 19.1BU/mL (1.0BU/mL 以下)	インヒビターパターン	12.7
6	第Ⅷ因子インヒビター	Ⅷ : 13.3BU/mL (1.0BU/mL 以下)	インヒビターパターン	13.4
7	第Ⅷ因子インヒビター	Ⅷ : 22.3BU/mL (1.0BU/mL 以下)	インヒビターパターン	17.7
8	第Ⅴ因子インヒビター	Ⅴ : 26.0BU/mL (検出せず)	インヒビターパターン	27.8
9 (DOAC投与中)	LA	APTT 法 : 計算不能 (1.16 以下)	判定困難	35.8
9 (DOAC休薬後)	LA	APTT 法 : 2.44 (1.16 以下)	LA パターン	32.4
10	LA	APTT 法 : 33.2 秒 (8.0 秒未満) dRVVT 法 : 1.6 (1.3 以下*)	LA パターン	35.2
11	LA	APTT 法 : 45.2 秒 (8.0 秒未満)	LA パターン	40.6
12	LA	dRVVT 法 : 1.5 (1.2 以下*)	LA パターン	45.0

dRVVT : dilute Russell's viper venom time (希釈ラッセル蛇毒時間)

*測定試薬の変更に伴う基準値の変更

1. 凝固因子欠乏または低値症例

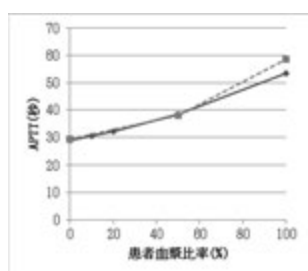


図 1 症例 1

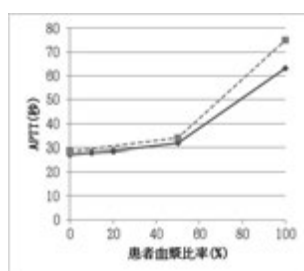


図 2 症例 2

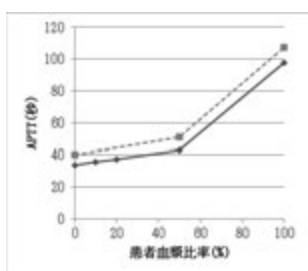


図 3 症例 3

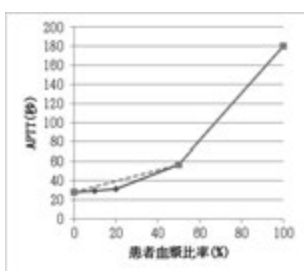


図 4 症例 4

—●— 即時反応
 ---■--- 遅延反応

2. 凝固因子インヒビター症例

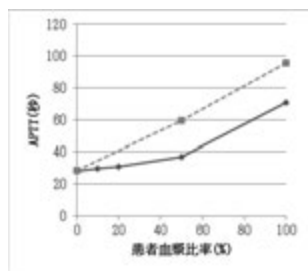


図5 症例5

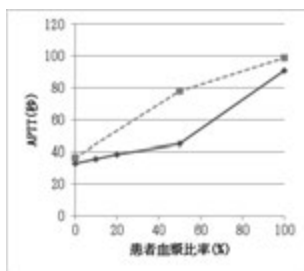


図6 症例6

—●— 即時反応
 ---■--- 遅延反応

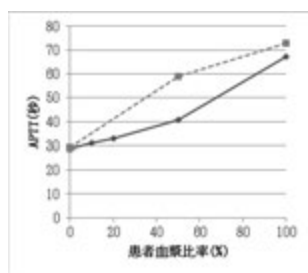


図7 症例7

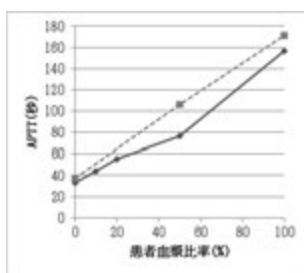


図8 症例8

3. LA 陽性症例

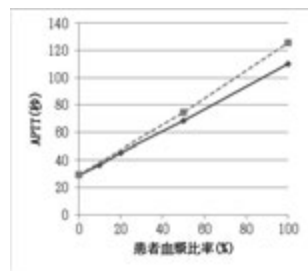


図9 症例9 (DOAC 投与中)

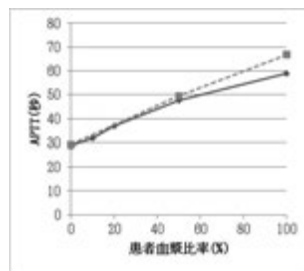


図10 症例9 (DOAC 休薬後)

—●— 即時反応
 ---■--- 遅延反応

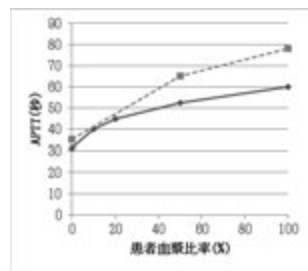


図11 症例10

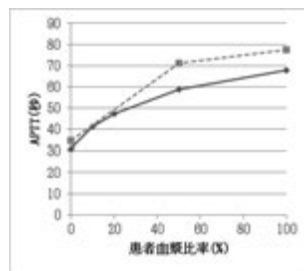


図12 症例11

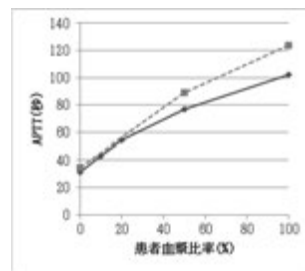


図13 症例12

考 察

当院では、クロスミキシングテストの判定方法として、目視判定法を用いており、視覚的な判定のため、苦慮する症例もあった。一方で、ICAは数値による判定であり、客観的に判定できるが、カットオフ値はAPTT試薬間差が大きく^{5) 6)}、自施設においてカットオフ値を設定しなければならない。今回は、同一試薬を使用していたKumanoらのカットオフ値⁵⁾で判定を行ったが、12症例中11例で判定は一致しており、有用であることが示唆された。症例2～4の凝固因子欠乏症例では、目視判定法とICA共に一致していた。症例5～8の凝固因子インヒビター症例では、目視判定法とICA共に一致しており、目視判定法で即時反応が下に凸となった。凝固因子インヒビターの場合、即時反応では、下に凸、直線、上に凸など様々な反応曲線を示すが、内藤らは、インヒビター力価によって、即時反応における抗原抗体反応に及ぼす影響が異なると推測しており⁷⁾、今回の症例5～8におけるインヒビター力価はやや低値であったため、即時反応で下に凸を示したと考えられる。

症例10～12のLA症例において、目視判定法とICA共に一致していた。一方、症例9では、目視判定法で判定困難となったが、家子らは、DOACなどの抗凝固薬を投与している際に、インヒビターパターンとなることがあると報告している⁸⁾。本症例では、DOACのリバーロキサバンが使用され、休薬後に行った再検査でLAパターンを示し、ICAを併用することで判定に至った症例であった。

判定が不一致となった症例1において、内藤らは、複数の凝固因子活性が低下している場合、LAの影響によって、目視判定法とICAでは不一致となったと報告している⁷⁾。本症例はLA陰性であったが、複数の凝固因子活性低下を認め、目視判定法で凝固因子欠乏パターン、ICAでインヒビターパターンとなった。判定結果が目視判定法とICAで一致しなかった症例において、LA検出の指標とされるICA⁴⁾は、凝固因子欠乏を検出する感度が低い⁹⁾ため、LA陰性で、凝固因子活性の低下が見られる場合は、目視判定法の方が、信頼性の高い結果が得られると考えられた。また、ヘパリン混入の検体でも、ICAが偽高値となる可能性もあり¹⁰⁾、採血の状況を確認する必要がある。

おわりに

当院で実施されたAPTTクロスミキシングテストにおいて、目視判定法と数値判定法の検討を行ったが、目視判定法で判定困難となった場合でもICAでは判定に至った症例もあった。しかし、ICAのみでは、偽高値となる可能性もあり、目視判定法と数値判定法を併用することが必要であると考えられた。より明確なクロスミキシングテストの判定結果へと繋がるように、今後も検討していきたい。

●文献

- 1) 朝倉英策：血液凝固検査（基本）。しみじみわかる血栓止血 Vol.1 DIC・血液凝固検査編：27-31，中外医学社，東京，2014。
- 2) Pengo V, Tripodi A, Reber G, et al: Update of the guidelines for lupus anticoagulant detection. *J Thromb Haemost.* 7 (10) : 1737-1740, 2009.
- 3) Rosner E, Pauzner R, Lusky A, et al: Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemost.* 57 (2) : 144-147, 1987.
- 4) 酒井道生，天野景裕，小川孔幸，他：後天性血友病A診療ガイドライン2017年改訂版。日本血栓止血学会誌 28 (6) : 715-747, 2017.
- 5) Kumano O, Ieko M, Naito S, et al: Lupus anticoagulant diagnosis in activated partial thromboplastin time mixing test: optimization of the index of circulating anticoagulant cut-off value. *Clin Lab.* 60 (12) : 2115-2118, 2014.
- 6) Kumano O, Ieko M, Naito S, et al: Index of circulating anticoagulant cut-off value establishment in activated partial thromboplastin time mixing test for lupus anticoagulant diagnosis. *J Thromb Haemost.* 11 (10) : 1919-1922, 2013.
- 7) 内藤澄悦，家子正裕，吉田美香，他：クロスミキシングテストによる病態鑑別方法。 *Sysmex Journal* 17 (1) : 1-11, 2016.
- 8) 家子正裕：その凝固因子インヒビター値は本当ですか？～偽陰性・偽陽性をきたす病態～。 *日本血栓止血学会誌* 29 (1) : 3-9, 2018.
- 9) 徳永尚樹，森さゆり，池亀彰茂，他：APTTクロスミキシングテスト数値判定法の考案～波形パターン法と数値判定法の比較～。 *日本検査血液学*

会雑誌 15 (1) : 45-55, 2014.

- 10) Kumano O, Ieko M, Naito S, et al: Verification of the guidelines for lupus anticoagulant detection: usefulness of index for circulating anticoagulant in APTT mixing test. Thromb Res. 134 (2) : 503-509, 2014.
- 11) 萩原紀子, 佐々木駿, 高橋綾香, 他 : クロスミキシング試験への Index of circulating anticoagulant (ICA) 併用による有用性の検討. 岡山赤十字病院医学雑誌 30 (1) : 20-25, 2019.
- 12) 小宮山豊, 吉賀正亨 : PT, APTT 止血異常のスクリーニング検査としての PT, APTT. 臨床検査 60 (2) : 130-135, 2016
- 13) 登尾一平, 山本隆敏, 上妻行則 : Rivaroxaban は学内実習における交差混合試験の凝固因子インヒビターとして有用である. 熊本保健科学大学研究誌 16 : 131-140, 2018.