

2 種の APTT 試薬の比較検討

杉原 崇大*	西山 記子	土手内 靖
尾崎 牧子	谷松 智子	清家 康子
西山 政孝	松井 完治	横田 英介

要 旨

活性化部分トロンボプラスチン時間 (activated partial thromboplastin time: APTT) はプロトロンビン時間 (prothrombin time: PT) とともに最も一般的に測定されている血液凝固スクリーニング検査の 1 つである。しかし試薬により活性化剤やリン脂質等の組成が異なるため、凝固因子や疾患に対する感受性に差があることが知られている。

今回、自施設の APTT 試薬の特性を理解するため、コアグピア APTT-N (N) およびトロンボチェック APTT-SLA (SLA) の比較検討を行った。その結果、N は抗リン脂質抗体および第 XI 因子、SLA は第 IX および XII 因子に対する感受性が高いことが示唆された。またステロイドを使用する患者では試薬間差が大きくなることが考えられた。ステロイドパルス療法時の血栓防止のためにヘパリンを使用する場合があるが効果判定には注意が必要である。

はじめに

APTT 試薬は活性化剤やリン脂質等の組成の違いにより凝固因子および疾患に対する感受性が異なるため、各試薬特性を理解しておくことは重要である。今回、2 種の APTT 試薬の比較検討を行ったので報告する。

対象および方法

対象はトロンボチェック APTT-SLA にて APTT 延長を認めた患者検体 214 例 (平均年齢 64.3 歳, 男性 88 例, 女性 126 例) およびコントロールとして凝血学的に異常を認めない健常者 50 例 (平均年齢 43.1 歳, 男性 24 例, 女性 26 例) の計 264 例。採血には 3.2% クエン酸ナトリウム採血管を用い、2270 G で 8 分間遠心後の血漿を検体とした。遠心直後の測定が不可能であった検体は -80°C で凍結保存し 37°C で 5 分間加温融解後に測定を行った。

検討試薬はコアグピア APTT-N (積水メディカル) およびトロンボチェック APTT-SLA (シスメックス) (Table 1), 測定機器はコアプレスタ 2000 (積水メディカル) を用いた。

Table 1 2 試薬の組成

試薬名	活性化剤	リン脂質	メーカー
コアグピア APTT-N	エラグ酸	合成	積水メディカル
トロンボチェック APTT-SLA	エラグ酸	ウサギ脳	シスメックス

検討内容は以下に示す 5 項目とした。

(1) 相関

健常者群 (n=50) および APTT 延長群 (n=214)

*松山赤十字病院 検査部

の相関を求めた。

(2) 抗リン脂質抗体感受性

抗リン脂質抗体保有群のうち、ループスアンチコアグラント (lupus anticoagulant: LA) のみ保有4例、抗カルジオリピン- β 2-グリコプロテインI (β 2-glycoprotein I : β 2-GPI) のみ保有2例、LAおよび抗カルジオリピン抗体 (anti-cardiolipin antibody: aCL) 保有3例、LAと β 2-GPIおよびaCL保有6例の計15例を対象とした相関を求めた。またAPTT比 (患者APTT秒/健常者群平均APTT秒) を求め、2試薬間での有意差検定を行った。有意差の検定にはMann-Whitney's U testを用い、 $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

(3) ヘパリン感受性

正常プール血漿に生理食塩水で10倍に希釈したヘパリンナトリウム1万単位/10 mL (味の素社) を終濃度が0.00, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60 U/mLとなるように加え、ヘパリン添加試験を行った。そして終濃度0.00 U/mLを基準としたAPTT比を求め感受性の比較を行った。

またヘパリン投与全群 ($n=48$)、他の抗凝固剤 (ワルファリン、ダビガトラン、フォンダパリヌクス、イドラパリヌクス、イドラバイオタパリヌクス、リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン、アルガトロバン) を併用していないヘパリン単独投与群 ($n=21$)、ヘパリンとステロイド系薬剤の併用群 ($n=8$)、ステロイド単独群 ($n=9$) の4群における相関を求めた。

(4) 第Ⅷ因子感受性

第Ⅷ因子活性測定群 ($n=6$) を対象に相関を求めた。また第Ⅷ因子欠乏患者 ($n=3$) を対象に、横軸 (X) に第Ⅷ因子活性の対数値 (%) を、縦軸 (Y) にAPTT比をとり相関図を作成した。この相関図よりAPTT比が健常者平均APTT比+2SD ($N=1.22$, $SLA=1.20$) を超える際の第Ⅷ因子活性を求めた。

(5) 第Ⅸ, X, XI, XII因子感受性

NがSLAよりも15秒以上延長した検体 ($n=5$) において、N-SLA値と第Ⅸ, X, XI, XII因子活性 (%) との相関を求めた。同様にSLAがNよりも10秒以上延長した検体 ($n=3$) において、SLA-

N値と第Ⅸ, X, XI, XII因子活性 (%) との相関を求めた。

結 果

(1) 相関

健常者群の相関は回帰式 $y = 1.041x - 0.223$ 、相関係数 $\gamma = 0.918$ と良好な結果であった (Fig. 1)。一方APTT延長群の相関は $y = 0.836x + 10.965$ 、 $\gamma = 0.817$ であり、27例で相対比30%以上の乖離を認めた (Fig. 2)。

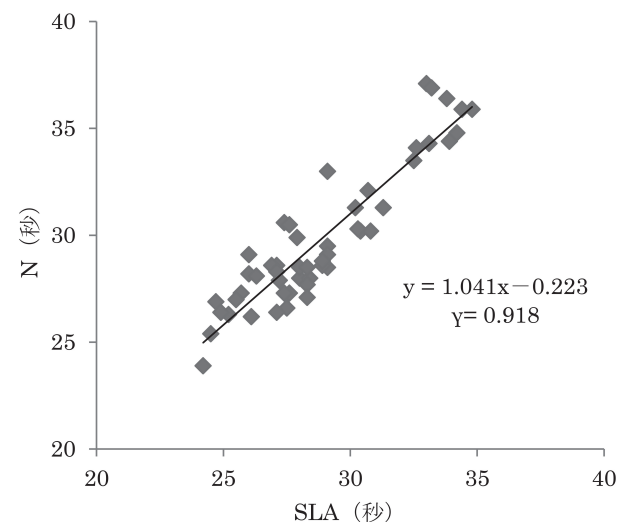


Fig. 1 健常者群の相関

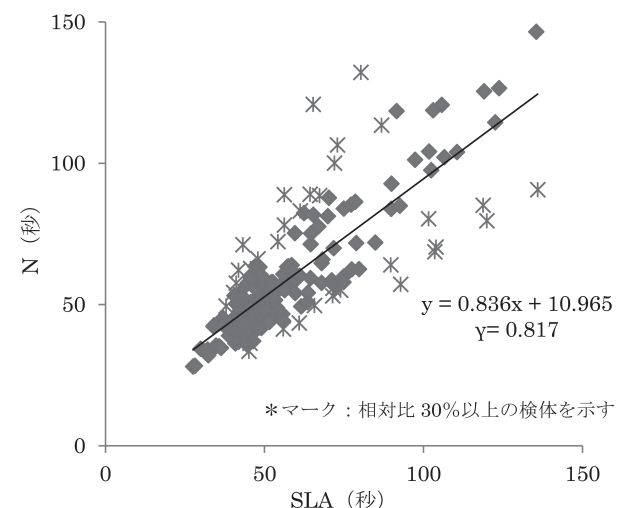


Fig. 2 APTT 延長群の相関

(2) 抗リン脂質抗体感受性

抗リン脂質抗体保有群の相関は $y = 2.010x -$

37.972, $\gamma=0.917$ であり, NがSLAに比し延長している傾向を認めた(**Fig. 3**). そこでAPTT比を求め有意差検定を行ったところ, 中央値はN=2.03, SLA=1.70でありNがSLAに比し有意な延長を認めた(**Fig. 4**).

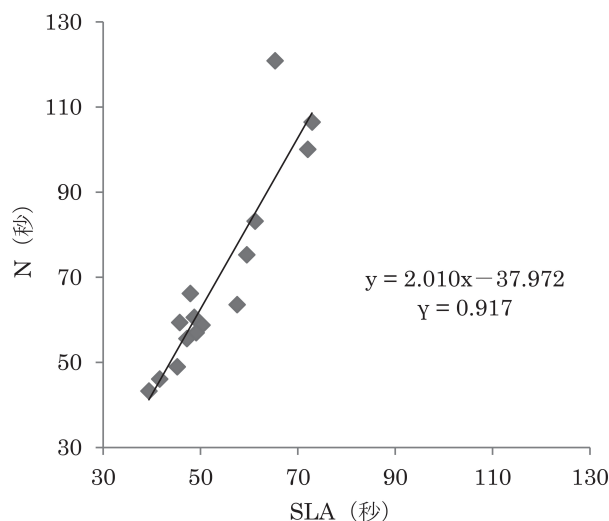


Fig. 3 抗リン脂質抗体保有群の相関

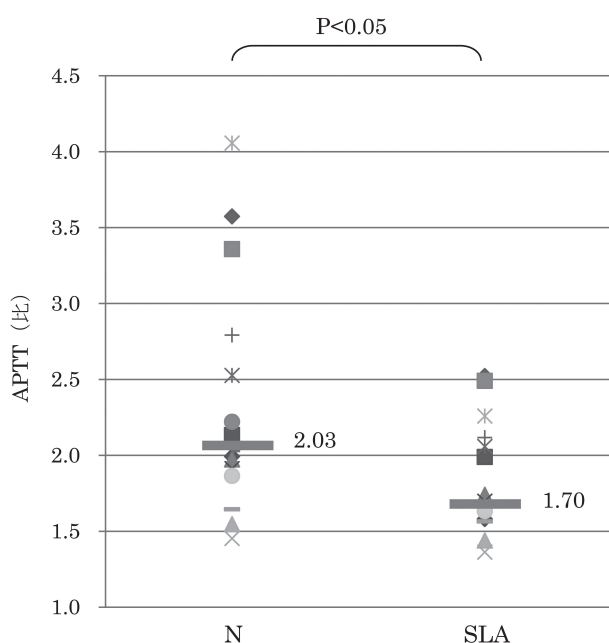


Fig. 4 抗リン脂質抗体保有群におけるAPTT比

(3) ヘパリン感受性およびヘパリン投与群の相関

ヘパリン添加試験の結果, ヘパリン添加終濃度 0.00, 0.05, 0.10, 0.20, 0.40, 0.60 U/mL のとき, NのAPTT比はそれぞれ1.099, 1.223, 1.550,

2.543, 4.067, SLAのAPTT比はそれぞれ1.092, 1.219, 1.551, 2.548, 4.017であり両試薬間に大きな差は認めなかった(**Fig. 5**).

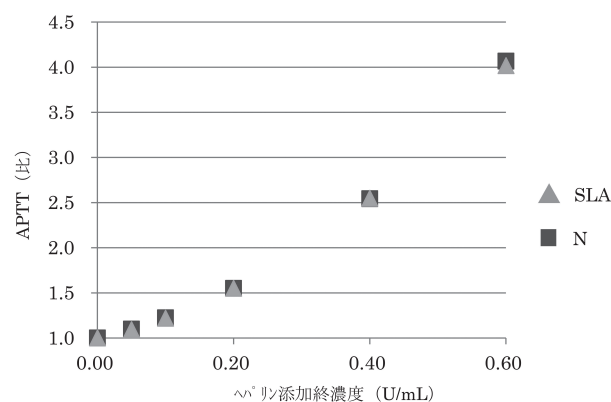


Fig. 5 ヘパリン添加試験

ヘパリン投与全群の相関は $y=0.951x-3.761$, $\gamma=0.908$ と良好な結果であったが14例で10秒以上の乖離を認めた. ヘパリン単独投与群は $y=1.051x+2.548$, $\gamma=0.957$ と良好な結果であった. 一方ヘパリンとステロイド系薬剤の併用群は $y=0.376x+29.414$, $\gamma=0.711$, ステロイド単独群は $y=1.355x-7.661$, $\gamma=0.720$ であり, ステロイドを使用した群においてバラつきを認めた(**Fig. 6**).

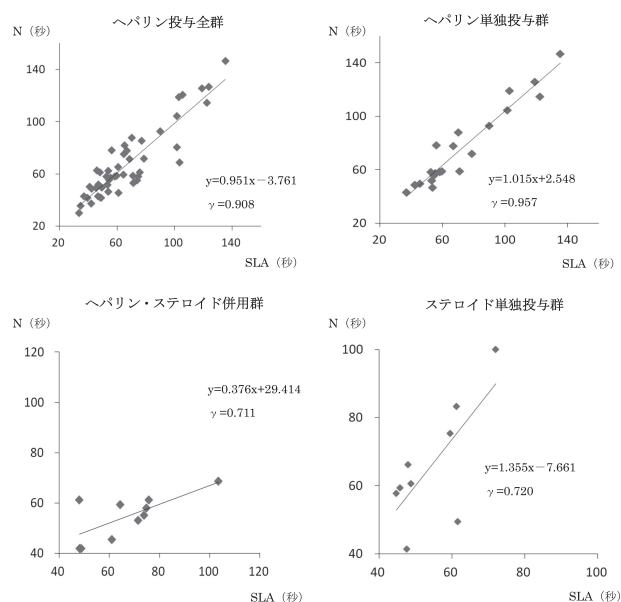


Fig. 6 ヘパリン, ステロイド投与群における相関

(4) 第Ⅷ因子感受性

第Ⅷ因子活性測定群の相関は $y = 0.989x + 0.370$, $\gamma = 0.999$ と良好な相関であった (Fig. 7). このうち、第Ⅷ因子欠乏患者を対象に APTT 比が健常者群平均 APTT 比 + 2SD (N = 1.22, SLA = 1.20) を超える際の第Ⅷ因子活性を求めたところ、N = 35.6%, SLA = 36.6% であり、両試薬間で大きな差は認めなかった (Fig. 8).

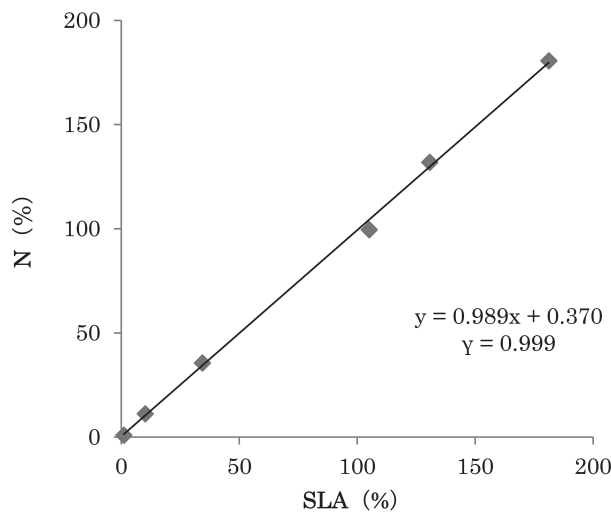


Fig. 7 第Ⅷ因子活性測定群の相関

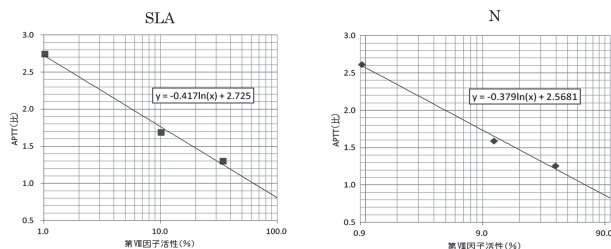


Fig. 8 第Ⅷ因子感受性

(5) 第Ⅸ, X, XI, XII因子感受性

N 延長例において N-SLA 値と第Ⅸ, X, XI, XII 因子活性 (%) との相関を求めた結果、相関係数 γ

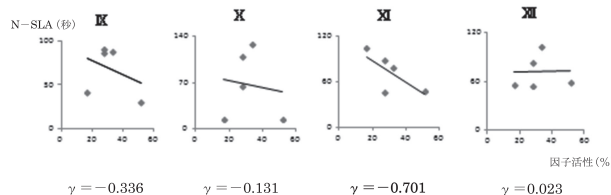


Fig. 9 N-SLA 値と第Ⅸ, X, XI, XII因子活性との相関

はそれぞれ -0.336 , -0.131 , -0.701 , 0.023 であり、第XI因子との間に弱い負の相関を認めた (Fig. 9).

同様に SLA 延長例において SLA-N 値と第Ⅸ, X, XI, XII因子活性 (%) との相関を求めた結果、 -0.562 , 0.197 , 0.859 , -0.503 であり、第Ⅸ因子およびXII因子との間に弱い負の相関を認めた (Fig. 10).

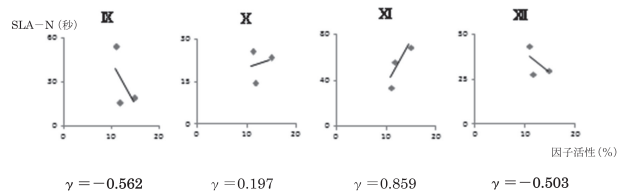


Fig. 10 SLA-N 値と第Ⅸ, X, XI, XII因子活性との相関

考 察

APTT は内因系凝固反応のスクリーニング検査やヘパリン療法のモニタリングなどに用いられる。PT とともに多くの検査室で行われている凝固検査であるが、試薬により活性化剤やリン脂質等の組成が異なるため、凝固因子や疾患に対する感受性に差があることが知られている^{1)~4)}。そこで自施設で使用する APTT 試薬の特性を理解するため、コagulピア APTT-N およびトロンボチェック APTT-SLA の比較検討を行った。

2 試薬の相関は健常者群は良好な結果を得たが、APTT 延長群では健常者群と比較し低い相関であり、27 例で相対比 30% 以上の乖離例を認めた。乖離例の中にはヘパリン使用者、第Ⅸ因子欠乏患者、抗リン脂質抗体保有者が含まれており、試薬組成の違いにより凝固因子および疾患に対する感受性が異なることを示唆する結果であった。そこで乖離の原因を明らかにするため APTT に影響を与える抗リン脂質抗体、ヘパリン、第Ⅷ・Ⅸ・X・XI・XII因子の感受性について検討を行った。

抗リン脂質抗体 (anti-phospholipid antibodies: aPL) は抗リン脂質抗体症候群 (anti-phospholipid syndrome: APS) 患者において認められるリン脂質またはリン脂質・リン脂質結合蛋白複合体に対す

る自己抗体の総称である。札幌クライテリアシドニー改訂によるAPS分類基準ではLA, aCL, β 2-GPIの3つが検査所見として挙げられており⁵⁾、これらの抗体のスクリーニングとしてAPTTは重要な役割を占めている。しかしaPLの感受性に関しては試薬により大きな差があるため、APSのスクリーニングではよりaPL感受性の高い試薬を使用することが望まれる。今回の検討ではNがSLAに比し有意なaPL感受性を有する結果であった。内藤らはウサギ脳由来のリン脂質よりも、合成リン脂質を用いた試薬のほうがLA感受性は良好であったと報告している⁶⁾。Nは合成リン脂質、SLAはウサギ脳由来のリン脂質を用いていること、対象であるAPS患者15例のうち13例がLAを保有していたことが有意差を生じた原因と考えられる。したがってaPLの中でも特にLAのスクリーニングには感受性の高いNを用いることが望まれる。

ヘパリン添加試験によるヘパリン感受性の比較では両試薬ともヘパリン添加濃度の増加に伴いAPTT比が増加し、その変化率も同様であったことから、ヘパリン感受性に関して大きな差はないと考える。一方でヘパリン投与患者群における2試薬の相関は $y=0.951x-3.761$, $\gamma=0.908$ と良好であったにもかかわらず、14例で10秒以上の乖離があり、特にステロイド併用患者5例においては平均20秒の大きな乖離を認めた。そこでヘパリン単独投与群とヘパリン・ステロイド併用群およびステロイド単独投与群における相関を比較し、ステロイド併用の影響について検討を行った。ヘパリン単独群の相関係数は $\gamma=0.957$ 、ヘパリン・ステロイド併用群は $\gamma=0.711$ 、ステロイド単独群は $\gamma=0.720$ でありヘパリン単独群と比較してステロイドを使用した群の相関が低かった。ステロイドの投与時には第Ⅷ、Ⅸ、Ⅻ因子の活性化が起こるとの報告があるが⁷⁾、この活性化が原因で2試薬間に乖離が生じたと考える。ステロイドパルス療法時の血栓防止のためにヘパリンを併用する場合があるが、APTTだけでは適切なヘパリン投与量をモニタリングできていない可能性があるため、臨床症状や線溶系マーカーを併用し効果判定を行うことが望ましいと考える。

第Ⅷ因子感受性試験では両試薬の相関は $\gamma=0.999$ と非常に良好であった。またAPTTが異常値を示す第Ⅷ因子活性は $N=35.6\%$ 、 $SLA=36.6\%$ であり、CLSIのガイドラインで示す「内因系凝固因子が30%未満に低下した場合に異常値となるべき」という条件を満たしていた。したがって第Ⅷ因子に関しては試薬間差を考慮する必要はなく、N、SLA共に有用な試薬と考える。

第Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、Ⅻ因子感受性試験ではN延長例において、N-SLA値と第Ⅺ因子の間に弱い負の相関を認めた。またSLA延長例において、SLA-N値と第Ⅸ因子およびⅫ因子の間に弱い負の相関を認めた。これより、症例数が少ないため更なる検討が必要であるが、Nは第Ⅺ因子、SLAは第Ⅸ因子および第Ⅻ因子に対する感受性に優れる可能性が示唆された。第Ⅸ因子は血友病Bや後天性第Ⅸ因子欠乏症の診断や治療の上で重要であり、第Ⅺ因子の低下は鼻出血、月経過多、扁桃腺摘出および抜歯に伴う異常出血⁸⁾、第Ⅻ因子は血栓症や流産との関連性の報告がある^{9)~11)}。これらの疾患を見逃さないためにも自施設で使用する試薬の凝固因子感受性を把握しておくことは極めて重要である。

結 語

コアグピア APTT-N およびトロンボチェック APTT-SLA の比較検討を行ったところ、Nは抗リン脂質抗体および第Ⅺ因子、SLAは第ⅨおよびⅫ因子に対する感受性が高いことが示唆された。またステロイド使用時には試薬間差が大きくなった。ステロイドパルス療法時の血栓防止のためにヘパリンを使用する場合があるが、その効果判定には注意が必要であり、APTTだけでなく臨床症状や線溶系マーカーを併せて判定を行うことが望まれる。

本検討でも示されたようにAPTT試薬はその組成の違いにより凝固因子および疾患感受性が異なる。よって自施設で使用する試薬の特性を理解しておくことは極めて重要である。

文 献

- 1) 香川和彦, 福武勝幸: プロトロンビン時間 (PT) と活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) 測定の現状と標準化に向けての課題. 臨床病理 **47**: 431-437, 1999.
- 2) 鈴木節子ほか: 凝固検査の標準化 PT, APTT の標準化の現状と将来. 日本検査血液学会雑誌 **3**: 13-22, 2001.
- 3) 桜井典子, 前場恵一子: APTT の測定. 検査と技術 **29**: 421-427, 2001.
- 4) Stevenson KJ. *et al.*: The reliability of activated partial thromboplastin time method and the relationship to lipid composition and ultrastructure. Thromb Haemostas., **55**: 250-258, 1986.
- 5) Miyakis S. *et al.*: International consensus statement on an update of the classification criteria for definite antiphospholipid syndrome (APS). J Thromb Haemost **4**: 295-306, 2006.
- 6) 内藤澄悦ほか: 種々の APTT 試薬における凝固異常検出の有用性に関する検討. 臨床病理 **56**: 195-202, 2008.
- 7) 秋保直樹: 原発性糸球体疾患におけるステロイド剤の凝血学的影響. 日本腎臓学会誌 **28**: 1429-1436, 1986.
- 8) 藤川和雄, 内藤幸嗣: 医学のあゆみ, 医歯薬出版株式会社, **160**: 546-549, 1992.
- 9) Mannhalter C. *et al.*: Factor XII activity and antigen concentration in patients suffering from recurrent thrombosis. Fibrinolysis., **1**: 259-263, 1987.
- 10) Ogasawara MS. *et al.*: Low dose aspirin is effective for treatment of recurrent miscarriage patients with decreased coagulation factor XII. Fertil Steril (in press).
- 11) 杉浦真弓, 鈴森 薫: 不育症と血栓性疾患. 産婦人科治療 **82**: 537-540, 2001.

Comparison of two kinds of APTT reagents

Takahiro SUGIHARA*, Noriko NISHIYAMA, Yasushi DOTEUCHI, Makiko OZAKI, Satoko TANIMATSU,
Yasuko SEIKE, Masataka NISHIYAMA, Kanzi MATSUI and Eisuke YOKOTA

*Department of Clinical Laboratory, Matsuyama Red Cross Hospital

Activated partial thromboplastin time (APTT) as well as prothrombin time (PT) are among the most common tests for screening blood coagulation. However, it is known that since each reagent has distinct composition such as activator and phospholipid, that makes a difference in sensitivity for coagulation factors or diseases.

We compared Coagupia APTT-N with Thrombocheck APTT-SLA to understand reagent characteristics of own facilities. As a result, we considered that N has high sensitivity for anti-phospholipid antibody and coagulation factor XI, and SLA has high sensitivity for coagulation factor IX and XII. In patients using a steroid, these differences become remarkable. Heparin may be used for them to prevent blood clot, and in this case, it is necessary to be careful about its effect measurement.