

## 学内実習のための交差混合試験(クロスミキシング試験) 疑似検体の作製

山口 航<sup>\*1§</sup> 瀬川 美桜<sup>\*1</sup> 瀧口 響子<sup>\*1</sup>

高嶋 眞理<sup>\*2</sup> 眞鍋 紀子<sup>\*1,3</sup>

[要 旨] クロスミキシング試験(交差混合試験)は活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)の延長が凝固因子欠損によるものかあるいは循環抗凝血素の存在によるものかを判定する検査である。病態により治療方針が異なるため、臨床現場での有用性が高いことや学生の血液凝固の教育効果を高めるために、学内実習にて実施することが望まれる。しかしながら異常値を示す患者検体の入手が困難な養成施設も多いため、簡易な疑似検体の作製を試みた。凝固因子欠損疑似検体は硫酸バリウムを使用した吸着血漿に正常血漿を添加することで、また凝固因子インヒビターを含む疑似検体も3種類の凝固因子活性阻害剤を使用することで、安価で簡単な、かつテキストにあるような典型的グラフを呈する疑似検体の作製が可能となった。

[キーワード] クロスミキシング試験(Cross Mixing Test)、活性化部分トロンボプラスチン時間(activated partial prothrombin time : APTT)、凝固因子欠損、循環抗凝血素

### 緒 言

血液凝固検査の主な項目には外因系の凝固反応を調べるプロトロンビン時間(PT)と内因系の凝固反応を調べる部分活性化トロンボプラスチン時間(APTT)がある。延長を示す場合は、凝固因子欠乏または活性低下による凝固因子の欠損、凝固因子インヒビターやループスアンチコアグラントなどの循環抗凝血素の存在、あるいはフィブリン活性の減少などを疑う。特に延長の原因が凝固因子欠損によるか循環抗凝血素によるかはクロスミ

キシング試験を行い判定する<sup>1-4)</sup>。凝固因子欠損と凝固因子インヒビターおよびループスアンチコアグラントとでは治療が全く異なるため、正確な検査が求められる。クロスミキシング試験は被検血漿と正常血漿を一定の割合で混合して凝固時間を測定し、横軸に混合比、縦軸に凝固時間をプロットしてグラフ化し、判定する。凝固因子欠損であれば、正常血漿から欠損している凝固因子が補填されることにより凝固時間は正常に近づき、グラフは下に凸のパターンをとる。循環抗凝血素が存在する場合は、インヒビター作用により、正常

\*1 香川県立保健医療大学 保健医療学部 臨床検査学科 §yamaguchi@chs.pref.kagawa.jp

\*2 新渡戸文化短期大学、\*3 香川県立保健医療大学大学院  
(2018年1月9日受理)

血漿に含まれる凝固因子も活性を失い、凝固時間があまり短縮せず、グラフは上に凸のパターンをとる。

学内実習においてクロスミキシング試験を行うことは、APTTの延長を示す検体が、凝固因子欠損なのか、循環抗凝血素の存在なのか、またなぜこうなるのかを学生に考えさせる機会となり、血液凝固の理解がより深まると考えられる。異常検体を用いた検査体験は教育上不可欠であるが、併設の病院を持たない養成施設では異常値を示す患者検体の入手は困難であるのが実状である。今回、安価で簡易な疑似検体の作製を試み、凝固因子欠損疑似検体および凝固因子インヒビターを含む疑似検体の作製において実習で利用可能な疑似検体を作製できたため報告する。

## I. 対象と方法

### 1. 対象

A 大学に在籍している学生および教員にアンケートを行い、疾患罹患および薬剤・サプリメントの服用がなく、研究に同意を得ることのできた20名を対象とし、真空採血を行った。本研究は、香川県立保健医療大学研究等倫理審査委員会の承認を受けて実施した(承認番号222)。

### 2. 機器および試薬調製

測定機器はCS-2000i(シスメックス株式会社)、APTT測定試薬はデータファイ・APTT(ウサギ脳セファリン・活性化剤:エラジン酸;シスメックス株式会社)を使用した。

プール血漿(正常血漿)は、対象者より得た血液(3.2%クエン酸Na:血液=1:9)採血管を転倒混和後、2,000gで20分遠心し、乏血小板血漿(poor platelet plasma: PPP)をプールしたもので、これを本研究の正常血漿とした。

吸着血漿は、硫酸バリウム(和光一級:和光純薬工業株式会社)を上記の正常血漿に200mg/mLの割合で添加し、37°Cで30分混和した後、2,000gで5分遠心し、上清を集めて作製した(凝固因子II、VII、IX、X吸着)。

ノバスタンHI注10mg/2mL(アルガトロバン水和物注射液;田辺三菱製薬株式会社)(以後ノバス

タンHI)は、選択的抗トロンピン剤である。原液にオーレンベロナール緩衝液を加えて次の3濃度の試薬を調整した。①20 $\mu$ g/mL、②25 $\mu$ g/mL、③30 $\mu$ g/mL。

ナファモスタットメシル酸塩注射用50mg「フソー」(東菱薬品工業株式会社)(以後フソー)は、蛋白分解酵素阻害剤である。50mgバイアルに滅菌精製水5mLを加えて溶解した(10mg/mL)。溶解液はpHが低くAPTT測定に適さないため、同量の0.05mol/L水酸化ナトリウムを加えてpH8に調整した(5mg/mL)。

ミニヘパ透析用500単位/mLバイアル10mL(パルナパリンナトリウム注射液;扶桑薬品工業株式会社)は、凝固第X因子の抑制剤である。ミニヘパは原液を使用した。

### 3. 疑似検体の作製

#### a. 凝固因子欠損用疑似検体の作製

吸着血漿は本学での経験からAPTT測定値が120秒を超えることが推測できたので、吸着血漿に正常血漿を加えて機器でのAPTT測定が可能な疑似検体(被検血漿)を3検体作製した。①吸着血漿96.5%+正常血漿3.5%、②吸着血漿95.0%+正常血漿5.0%、③吸着血漿90.0%+正常血漿10%

#### b. 凝固因子インヒビター用疑似検体の作製

試薬を正常血漿に添加して疑似検体の作製を行う際の予備試験で、最終濃度が一定であっても薬液量の増加はAPTT測定に影響があることが確認できたため、正常血漿に添加する薬液量が5%以内になるようにした。

##### 1)ノバスタンHI

試薬添付文書を参考にして添加濃度を模索し、正常血漿95%に、調整した3濃度(20 $\mu$ g/mL、25 $\mu$ g/mL、30 $\mu$ g/mL)の各試薬を5%添加して次の3検体を作製した。①最終濃度1,000ng/mL、②最終濃度1,250ng/mL、③最終濃度1,500ng/mL。

##### 2)フソー

試薬添付文書を参考にして添加濃度を模索し、正常血漿に調整した5mg/mL濃度の試薬を加えて次の3検体(被検血漿)を作製した。①最終濃度1 $\mu$ g/mL、②最終濃度2 $\mu$ g/mL、③最終濃度3 $\mu$ g/mL。

### 3) ミニヘパ

試薬添付文書を参考にして添加濃度を模索し、正常血漿に原液を添加して2単位/mLの血漿を作製した。さらに、正常血漿に2単位/mLの血漿をそれぞれ添加し次の3検体(被検血漿)を作製した。  
①1.25 単位/mL、②1.50 単位/mL、③1.75 単位/mL。

### 4. 3.の各検体のクロスミキシング試験とグラフによるパターン確認

3.の被検血漿すべてにおいて、疑似検体と正常血漿を1:0、4:1、1:1、1:4、0:1の比で混和後、APTT測定(秒)を行った。

測定後、横軸に疑似検体と正常血漿の混合比、縦軸にAPTT測定(秒)をプロットした4つのグラフの作成を行った。各疑似検体について3回以上おこない、再現性についても確認した。

## II. 結 果

凝固因子欠損疑似検体では、正常血漿が3.5、5.0、10%のいずれの含有量においても下に凸のグラフとなった(図1)。被検血漿100%でのAPTTは、正常血漿含有量が少ないほど高度に延長したものの、被検血漿4容と正常血漿1容で混和した場合の凝固時間は3検体ともほぼ同じ値を示し、凝固時間は明らかに短縮した。

ノバスタンHIを使用した疑似検体ではいずれの濃度においても上に凸のグラフとなった(図2)。被検血漿100%ではノバスタンHIの濃度が高い

ほどAPTTは高度に延長し、正常血漿と等量混和した場合でも明らかな凝固時間の延長を認めた。

フソーを使用した疑似検体でも同様にいずれの濃度においても上に凸のグラフを描いたが、フソー濃度1 $\mu$ g/mLの検体は被検血漿1容と正常血漿4容で凝固時間は基準値に近い値を示した。フソー濃度が2 $\mu$ g/mLと3 $\mu$ g/mLの検体では、正常血漿と等量混和してもAPTTは高度に延長していた(図3)。

ミニヘパを使用した疑似検体ではほぼ直線のグラフ(やや下に凸)となった(図4)。被検血漿100%での凝固時間は他の疑似検体と同じく濃度が高いほど延長を示した。しかし、いずれの濃度においても、被検血漿と正常血漿の等量混和のAPTTは延長していたが、被検血漿1容と正常血漿4容のAPTTは基準値に近い値を示した。

## III. 考 察

凝固因子欠損疑似検体は、吸着血漿に正常血漿を添加して作製し、いずれの検体でも下に凸の結果が得られた。また被検血漿4容と正常血漿1容で混和した場合にいずれの検体でも凝固時間は補正され、正常の凝固時間に近いほぼ同じ値を示した。このことは正常血漿に含まれる凝固因子が少なくとも20%含まれると正常の凝固時間となることを示している<sup>3)</sup>。実習で使用する凝固因子欠損疑似検体としては、下に凸の度合いが明確であ

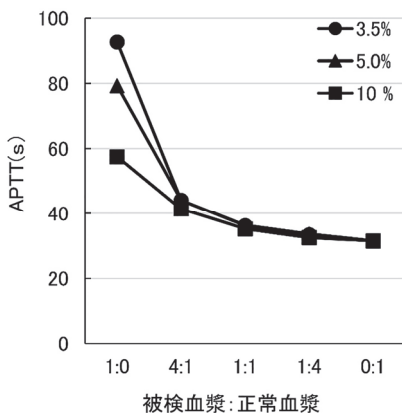


図1 凝固因子欠損疑似検体のクロスミキシング試験

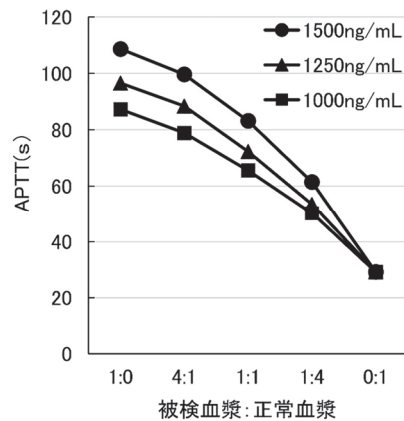


図2 凝固因子インヒビター疑似検体(ノバスタンHI)のクロスミキシング試験

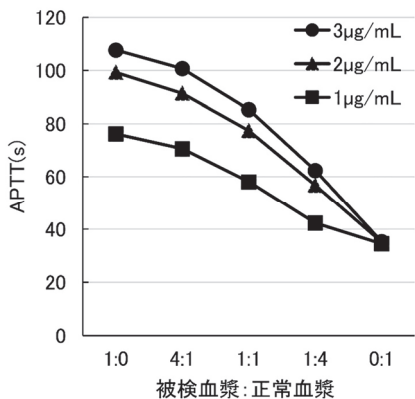


図3 凝固因子インヒビター疑似検体(フソー)のクロスミキシング試験

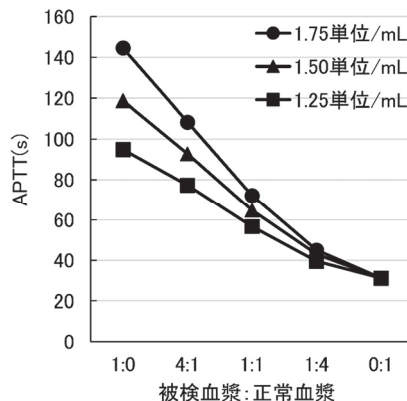


図4 凝固因子インヒビター疑似検体(ミニヘパ)のクロスミキシング試験

る、正常血漿 (3.5%、5.0%)の方が適していると考えられる。

凝固因子インヒビターを含む疑似検体のクロスミキシング試験において、ノバスタン HI とフソーではほぼ同等の結果が得られた。今回の結果から、凝固因子インヒビターを含む疑似検体として適しているのは、上に凸の度合いの強いノバスタン HI (1,250ng/mL、1,500ng/mL)、あるいはフソー (2µg/mL、3µg/mL) であると考えられる。アルガトロン水和物であるノバスタン HI はアンチトロンビンを介さずに直接かつ選択的にトロンビンを阻害する作用を持つため、正常血漿から補填されたトロンビンに対しても活性を阻害することでフィブリンの生成を抑制し、APTT が延長したと考えられる<sup>4)5)</sup>。ナファモスタットメシル酸塩を組成とするフソーは蛋白分解酵素阻害剤であり、IIa、VIIa、Xa、XIIa と複数の活性型凝固因子の蛋白分解酵素を阻害し、トロンビンに対する阻害はアンチトロンビン III 非依存的に作用する。特にトロンビンによるフィブリノゲンからフィブリンへの蛋白分解が阻害され、APTT 測定に影響を及ぼしたと推測した<sup>6)</sup>。フソーは複数の凝固因子活性を阻害するものの、*in vitro*での APTT 測定においては、主な作用機序としてノバスタン HI と大差ないと思われた。よって、価格の面で安価 (約 1/4~1/5 程度) であり、試薬の長期保存の可能なフソーが学内実習での利用には適していると

思われる。

ミニヘパを使用した疑似検体はほぼ直線的なグラフを示し、被検血漿と正常血漿を等量混和した APTT は延長していた。正常血漿を 50% 添加しても延長を示したことから、凝固因子インヒビターを含む疑似検体として利用可能と考えた。クロスミキシング試験では阻害反応の発現に時間を要するものもあり、混合血漿を 37°C で 2 時間程度静置したのち測定を行い遅延反応の有無を確認することも必要である<sup>7)</sup>。実際の検査においては、凝固因子欠損およびループスアンチコアグラントは即時反応を示すことが多く、凝固因子に対するインヒビターの場合は遅延反応を示すことが多い。本実験では混和後すぐに測定しており、即時反応のみの観察である。よって、ほぼ直線的なグラフを描いたミニヘパ使用の疑似検体が、37°C で 2 時間静置した際に遅延反応を示すか確認し、実習への利用を考えたい。パルナパリンナトリウムはヘパリンを分解して得られた低分子ヘパリンで、アンチトロンビン III と複合体を形成して Xa をより選択的に阻害する<sup>8)9)</sup>。ミニヘパがクロスミキシング試験において直線的なグラフを描いた理由については、アンチトロンビン III を介して間接的に凝固因子活性を抑制するため強力な阻害作用を有しておらず、補填された Xa 因子への阻害が不十分であった可能性が考えられる。あるいは、トロンビンはフィブリノゲンの活性だけでなく、

第 V、第 VIII 因子等も活性化する重要因子であるため、ノバスタン HI やフソーは抑制が強く、ミニヘパは Xa 因子抑制剤であるため、阻害作用が弱いとも考えられる。経口摂取した薬剤の血中濃度と APTT の相関<sup>10)11)</sup>、あるいは血漿に既知濃度の薬剤を外因性に添加して薬剤濃度と APTT との相関<sup>12)</sup>を検討した文献がいくつか報告されている。使用する薬剤によっては、APTT は薬剤濃度が高濃度になるに従いその直線性が失われることが報告され、薬剤の濃度が高くなるほど APTT 延長に反映され難いことがわかる<sup>13)</sup>。今後使用した薬剤について細かく濃度を設定し、薬剤濃度と APTT の関係を詳細に検討することでさらに至適な濃度を求めることができると考えられ、今後の課題としたい。また、ループスアンチコアグラントはリン脂質に対する自己抗体の存在が原因であるため、同様な安価な疑似検体の作製は困難であると思われる。

学内実習でクロスミキシング試験を行うにあたり、疑似検体の作製は実習直前に作製することが望ましいが、時間的な制約で困難なことも多い。そこで作製した疑似検体の安定性を評価するため、どれくらいの期間凍結保存が可能であるか、作製後室温放置で凝固時間に影響があるのかを検討したい。また APTT 試薬はシリカ、エラジン酸、セライトなどの活性化剤と動・植物または合成リン脂質との組み合わせにより構成されており、複数の試薬が市販されている。本学ではデータファイ・APTT を使用しており、今回はこの試薬を使用して検討したが、他の試薬においても同様の結果が得られるかも検討すべき課題と考えている。学内実習でクロスミキシング試験を学ぶことは、難しいとされている凝固学の理解度を高めることができ、臨地実習や臨床現場への足掛かりになると考えられる。多くの教育施設で疑似検体を用いたクロスミキシング試験が行われることを期待したい。

#### IV. 結 論

学内実習で利用可能な、クロスミキシング試験

のための安価で簡易な疑似検体を作製することができた。

#### 文 献

- 1) 小宮山豊, 正木浩哉, 高橋伯夫. クロスミキシング試験の標準化と利用 原因不明の出血や血栓を解明するために. 日本臨床検査自動化学会誌 2010; 35: 201-4.
- 2) 西岡淳二. 第 8 章 血小板, 凝固・線溶検査. IV 凝固・線溶阻止因子の検査. 血液検査学. 東京: 医歯薬出版株式会社 2016: 183-99.
- 3) 大森 司. 出血性疾患の診断アプローチ. 臨床血液 2013; 54: 1888-96.
- 4) 下條隆史. 抗凝固薬. 透析ケア 2016; 22: 525-7.
- 5) 玉尾嘉邦, 山本登志弘, 平田倫子, 衣笠真弓, 菊本亮二. 血液凝固に対する Argipidine (MD-805) の影響 1986; 14: 869-74.
- 6) 高橋芳右, 柴田 昭. メシル酸ナファモスタット (FUT-175), メシル酸ガベキサート (FOY) およびヘパリンの抗凝固・線溶作用の比較検討. 臨床と研究 1988; 65: 3503-10.
- 7) 家子正裕. クロスミキシング試験を臨床に活かすには. 医療と検査機器・試薬 2012; 35: 867-72.
- 8) Weitz JI. Low-molecular-weight heparins. N Engl J Med 1997; 337: 688-98.
- 9) Thomas DP, Merton RE. A low molecular weight heparin compared with unfractionated heparin. Thromb Res 1982; 28: 343-50.
- 10) van Ryn J, Stangier J, Haertter S, Liesenfeld KH, Wienen W, Feuring M, et al. Dabigatran etexilate—a novel reversible oral direct thrombin inhibitor; Interpretation of coagulation assays and reversal of anticoagulant activity. Thromb Haemost 2010; 103: 1116-27.
- 11) 堀 正二. 新規経口抗トロンビン薬 ダビガトランの特徴. Medicina 2012; 49: 964-8.
- 12) Hillarp A, Baghaei F, Fagerberg Blixter I, Gustafsson KM, Stigendal L, Sten-Linder M, et al. Effects of the oral, direct factor Xa inhibitor rivaroxaban on commonly used coagulation assays. J Thromb Haemost 2011; 9: 133-9.
- 13) 大森 司. 新規経口抗凝固薬の薬効マーカーは考えられるか. Medicina 2012; 49: 1002-6.