

学内実習可能な交差混合試験(クロスミキシング試験)

山口 航^{*1§} 伊澤 美喜^{*1} 松田 萌^{*1} 近藤 明宏^{*2}
一原 直人^{*3} 宮川 朱美^{*4} 高嶋 眞理^{*5} 眞鍋 紀子^{*1,6}

[要 旨] クロスミキシング試験は、凝固時間延長の原因を追究するための検査である。昨年我々は、学内実習での実施を目的に、凝固因子欠乏および凝固因子インヒビター疑似検体の作製法を報告した。追加の検討課題としては、他の教育施設で使用されている複数の試薬と測定原理の異なる機器においてもインヒビターパターンが得られることと、疑似検体の安定性を確認することの2点であった。

検討の結果、複数の試薬および機器において、いずれも上に凸のグラフを描き、凝固因子インヒビター疑似検体として利用可能であった。

疑似検体の安定性については、室温静置で1時間、凍結保存で3ヵ月まで安定であることを確認した。凝固因子欠乏および凝固因子インヒビター疑似検体を使用して学内実習を行うことが、学生の凝固学の理解を深めることを期待する。

[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)、APTT 試薬、測定原理、安定性評価

はじめに

活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)はプロトロンビン時間(PT)とともに、最も一般的に実施されている凝固検査である。延長を示す場合はクロスミキシング試験を行い、凝固時間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を判定する¹⁾²⁾。APTT 延長症例において実施されることが多いが、PT と APTT がともに延長し第V因子インヒビターなどが疑われる場合は、PT クロスミキシング試験が実施

されることもある。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を描出する。凝固因子および凝固因子インヒビターはともに少量で機能を発揮するため、凝固因子欠乏の場合は、被検血漿と正常血漿を4:1で混合すると凝固時間は正常値に近くなり、下に凸のグラフとなる。凝固因子インヒビターが存在する場合は、被検血漿と正常血漿を1:4で混和しても凝固時間は延長するため、上に凸のグラフとなる。また、混和直

^{*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}香川大学医学部附属病院検査部、^{*3}純真学園大学保健医療学部検査科学科

^{*4}医療法人財団博仁会キナシ大林病院検査科、^{*5}新渡戸文化短期大学、^{*6}香川県立保健医療大学大学院

後に凝固時間を測定する即時反応と、混和した血漿を 37°C で 2 時間インキュベーションした後に測定する遅延反応を行うことが重要である¹⁾。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ためである。治療方針が異なるため、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の鑑別は重要であり、学内実習でもクロスミキシング試験を実施することが望ましいと考える。

しかしながら、臨床検体の常時確保が困難な教育施設もあるため、我々は昨年、凝固因子欠乏疑似検体と、安価で簡単に作製できる凝固因子インヒビター疑似検体の作製法について検討し報告した³⁾。吸着血漿に 3.5~5.0% 正常血漿を加えて作製した凝固因子欠乏疑似検体は、クロスミキシング試験により下に凸のグラフを描き、凝固因子欠乏パターンを示した。吸着血漿は各施設により吸着の度合いが異なるため、それぞれの施設にて加える正常血漿の割合を検討してから使用することを推奨した。凝固因子インヒビター疑似検体については、3 種類の薬剤にて検討を行い、最も安価で試薬の長期保存が可能なフソー(ナファモスタットメシル酸塩)が適していた。よく知られているように、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・植物由来または合成のリン脂質との組み合わせによりさまざまな種類が市販されている。また、自動凝固測定装置の測定原理にも、光学的凝固検出法、物理的凝固検出法などがある。APTT の測定結果は各施設が使用している試薬および機器の組合せで異なることが報告されているため⁴⁾、今回我々は薬剤を使用して作製する凝固因子インヒビター疑似検体が、異なる試薬や機器でも利用可能であるかを検討した。

さらに、学内実習で疑似検体を利用するにあたり、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、室温静置や凍結保存による影響を検討し、疑似検体の安定性の評価とした。

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 256)。他施設については各施設において倫理委員会の承認の必要性の有無を確認後、研究に同意を得ることのできた協力者より真空採血を行い、実施した。

2. 機器、試薬および疑似検体の作製

測定機器は CS2000i(シスメックス株式会社 : A 施設)、コアプレスタ 3000(積水メディカル株式会社 : B 施設)、KC1 デルタ(エル・エム・エス株式会社 : C 施設)、CA-650(シスメックス株式会社 : D 施設)、KC1 デルタ(エル・エム・エス株式会社 : E 施設)を使用した。

APTT 測定試薬はトロンボチェック APTT-SLA(以後 APTT-SLA)(合成リン脂質・活性化剤 : エラジン酸)、データファイ APTT(以後 APTT-ACT)(ウサギ脳セファリン・活性化剤 : エラジン酸)とパトロンチン SL(以後 APTT-PSL)(大豆レシチン・活性化剤 : シリカ)(シスメックス株式会社)を使用した。

プール血漿は、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 分遠心した乏血小板血漿(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。

凝固因子インヒビター用疑似検体の作製には、蛋白分解酵素阻害剤であるナファモスタットメシル酸塩注射用 10 mg「フソー」(東菱薬品工業株式会社)を使用した。10 mg バイアルに滅菌精製水 1 mL を加えて溶解した後、同量の 0.05 mol/L 水酸化ナトリウムを加えて pH 8 に調整した(5 mg/mL)。5 mg/mL フソー溶液(pH8) 5.0 μ L と滅菌精製水 620 μ L を混和し(40 μ g/mL)、最終濃度 2 μ g/mL となるよう PPP と混和したものを

疑似検体(被検血漿)とした。最終濃度 $2 \mu\text{g/mL}$ は先行研究より至適濃度と設定した³⁾。

3. クロスマキシング試験

被検血漿と正常血漿を1:0、4:1、1:1、1:4、0:1の比で混和後、APTT測定を行った。測定後、横軸に被検血漿と正常血漿の混合比、縦軸にAPTT測定(秒)をプロットした。各実験について3回以上行い、再現性についても確認した。

4. 検討課題

①測定機器の違いによる検討(A~E施設)

使用するAPTT試薬をAPTT-SLAで統一し、5施設にてクロスマキシング試験を行った。上記プロトコルに準じて、プール血漿および疑似検体は各施設で作製した。

②測定機器とAPTT試薬の組み合わせによる検討(A、B施設)

APTT-SLAとAPTT-ACTの2種類の試薬を

使用し、2施設にてクロスマキシング試験を行った。

③APTT試薬の違いによる影響(A施設)

APTT-SLA、APTT-ACTとAPTT-PSLの3種類の試薬を使用し、クロスマキシング試験を行った。

④室温静置と凍結保存による検討(A施設)

作製した疑似検体を0、1、3、6、24時間室温静置し、APTT-SLAとAPTT-ACTの2種類の試薬を使用し、各静置時間後のAPTTを測定した。作製した疑似検体を1週間、1ヵ月、3ヵ月凍結保存(-30°C)し、 37°C 3分で融解したのち、APTT-SLAとAPTT-ACTの2種類の試薬を使用し、APTTを測定した。

II. 結果

測定機器の違いによる検討では、被検血漿100%の凝固時間が60~80秒の間の値となり、いずれの施設においても上に凸のグラフを描いた(図1)。

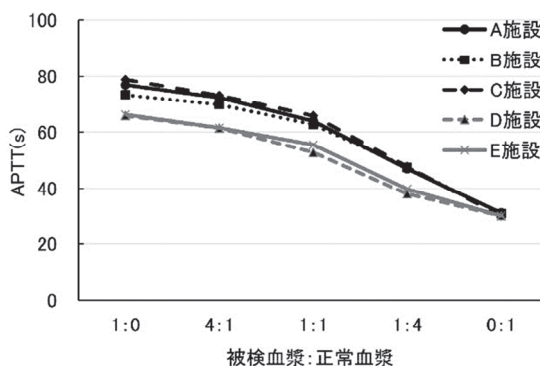


図1 APTT-SLA試薬を用いた5施設のクロスマキシング試験

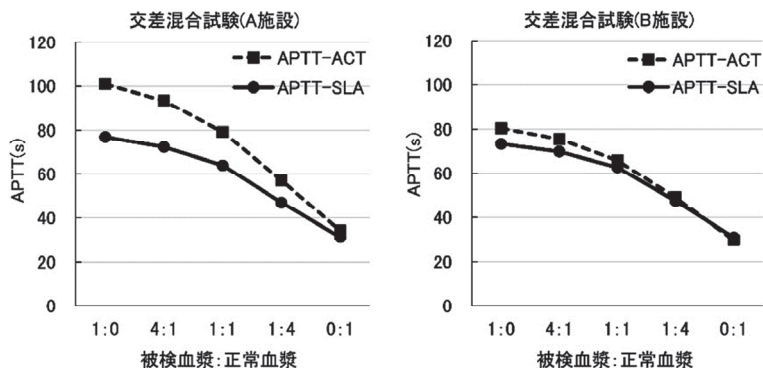


図2 2つのAPTT試薬を用いた、2施設のクロスマキシング試験

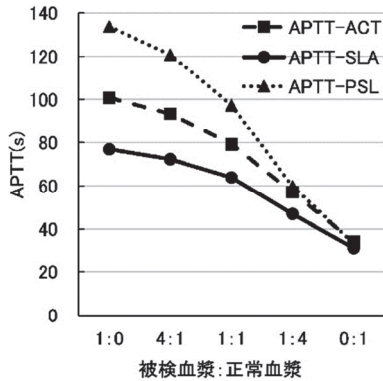


図3 3種類のAPTT試薬を用いたクロスミキシング試験

測定機器と試薬の組み合わせによる検討では、B施設では2つの試薬ではほぼ同じ上に凸のグラフを描いた(図2、右)。一方A施設では試薬の違いにより凝固時間に差を認めたと、どちらの試薬でも

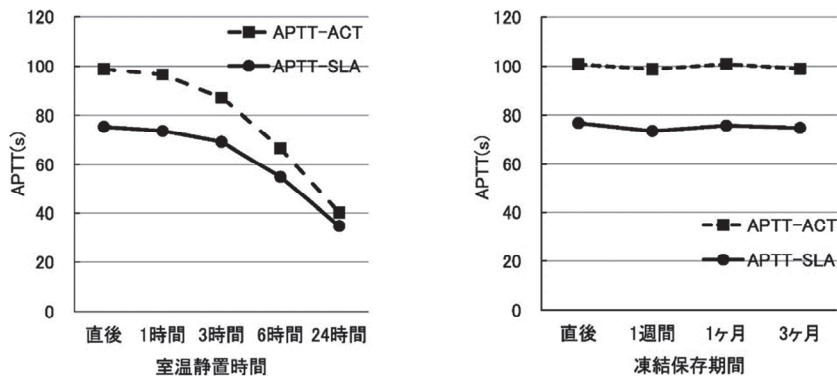


図4 凝固因子インヒビター疑似検体の室温静置と凍結保存による影響

III. 考 察

5施設による測定機器の違いによる検討で、試薬にAPTT-SLAを選択した理由は、リン脂質が動・植物由来ではなく合成リン脂質であり、ロット間差を小さくできることを期待したためである。5施設のクロスミキシング試験ではいずれの施設においても上に凸のグラフが得られ、いずれの機器を使用しても凝固因子インヒビターパターンを示すことが確認できた。ただ、被検血漿100%にて3施設は凝固時間が長めで、2施設は凝固時間

上に凸のグラフとなり、インヒビターパターンを示した(図2、左)。

試薬の違いによる検討では、被検血漿100%でAPTT-SLAでは約80秒、APTT-ACTでは約100秒、APTT-PSLでは約130秒と凝固時間に大きな差を認めたと、いずれの試薬でも上に凸のグラフとなり、インヒビターパターンを示した(図3)。

疑似検体の安定性の評価における室温静置時間の検討では、室温静置の時間が長くなるほど凝固時間は短くなり、24時間では40秒前後となった(図4、左)。直後と比較したところ、1時間後では2%程度、3時間後では10%前後凝固時間は短くなった。凍結保存による検討では、直後の凝固時間と比較してほとんど変化は見られず、2試薬とも直後~3ヵ月まで安定していた(図4、右)。

が短めであった。これは機器による測定原理の違いやプール血漿の違いなどが考えられる。また、疑似検体の作製は各施設でプロトコルに準じて実施したものの、作製してから測定までの時間については明記しておらず、測定までに時間を要した可能性も考えられる。さらに凝固時間の延長が短めであった施設において、ナファモスタットメシル酸濃度を2 $\mu\text{g/mL}$ から3 $\mu\text{g/mL}$ に変更した疑似検体を作製して再度測定したところ、凝固時間は2 $\mu\text{g/mL}$ 濃度の疑似検体に比べて凝固時間が長くなり、より上に凸を認めやすいグラフを描いた

という報告を得ている(データは未提示)。

機器と試薬の組み合わせによる凝固時間への影響では、いずれの機器および試薬においても上に凸のグラフが得られ、インヒビターパターンを示すことが確認できた。しかし、1施設ではほぼ同じ凝固時間であったが、もう1施設では試薬の違いにより凝固時間に差を認めた。これについては、APTT-ACTのリン脂質はウサギ脳由来セファリンであり、ロットの違いによる影響が考えられたが、本実験では同じロットを使用している。そのため析出してくるフィブリンに対する、散乱光の検出あるいは透過光の検出による測定原理の違い、もしくは解析方法の違いによるものであると考えられた。

3種類の試薬を用いての測定では、全ての試薬において上に凸のグラフが得られ、いずれの試薬を使用しても凝固因子インヒビターパターンを示すことが確認できた。しかし、被検血漿100%では試薬の違いにより凝固時間に差を認め、APTT-PSL、APTT-ACT、APTT-SLAの順に凝固時間は長かった。CとE施設においてもAPTT-PSLが本学と同様に高度延長を示しており(データは未提示)、試薬の違いにより凝固時間に差を認める結果を得た。APTTの測定秒数は試薬により異なること⁵⁾⁶⁾、同一条件で作製した検体においても各施設が使用している試薬および機器の組み合わせで異なることが報告されている⁷⁾。特に試薬は、各凝固因子、LA(ループスアンチコアグラント)やヘパリンに対する感受性の違いにより測定結果に影響を及ぼすことが知られており⁸⁾⁹⁾、ナファモスタットメシル酸に対する感受性の違いが測定結果に影響を及ぼしていると考えられた。以上のことより、使用するAPTT試薬と機器により凝固時間が異なることを考慮し、至適なナファモスタットメシル酸濃度を求めることで、各施設に最適な凝固因子インヒビター疑似検体の利用が可能になると思われる。

疑似検体の安定性の評価では、室温静置の影響と凍結保存による影響を検討した。室温静置では時間経過とともに凝固時間は短縮した。3時間室温静置では10%程度凝固時間の短縮を認めたこ

とから、1時間までであれば安定して測定できると判断した。生体内においてナファモスタットメシル酸の半減期は10分程度と報告されていることから¹⁰⁾、長時間の室温静置により薬剤効果が低下し凝固時間が短縮すると考えられた。次に凍結保存では、疑似検体作製後すぐに凍結し、3ヵ月まで保存したところ、ほとんど凝固時間の短縮は認められず、安定していることが確認できた。以上のことから、凝固因子インヒビター疑似検体作製後は室温静置せずすばやく凍結保存し、使用直前に凍結融解して使用するのが望ましいと考えられた。

香川県立保健医療大学においても、学内実習で疑似検体を利用したクロスミキシング試験はまだ実施しておらず、次年度初めて行う予定である。教員があらかじめ準備しておいた疑似検体を用いて、被検血漿と正常血漿の各比率での混和、測定結果を元にしたグラフの描出、凝固因子欠乏か凝固因子インヒビターが存在するかの判定を学内実習で実施することは、自ら手を動かして能動的に学修活動を行うため、クロスミキシング試験についての理解が深まると考えられる。また、即時反応と遅延反応ならびにPTクロスミキシング試験の必要性を含めた講義を併せて行うことで、凝固学全体の理解に繋がることを期待できる。

IV. 結 論

機器や試薬の違いがあっても、各施設に最適な凝固因子インヒビターおよび凝固因子欠乏疑似検体を利用することにより、学内でクロスミキシング試験を実施することが可能となった。凍結保存した疑似検体は融解後1時間以内に使用することが望ましい。

文 献

- 1) 家子正裕. クロスミキシング試験を臨床に活かすには. 機器・試薬 2012; 35: 867-72.
- 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) 山口 航, 瀬川美桜, 瀧口響子, 高嶋真理, 眞鍋紀子.

- 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. 臨床検査学教育 2018; 10: 14-8.
- 4) 山崎哲, 鈴木典子, 後藤宏実, 高山成伸. APTT の現状と標準化に向けた課題. 生物試料分析 2009; 32: 365-70.
 - 5) 内藤澄悦, 家子正裕, 吉田美香, 垂水隆志, 中林透, 内場光浩, その他. 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 2008; 56: 195-202.
 - 6) 小島彩, 佐野将也, 後藤秀之, 石井清, 西村敏治. 4 種類の全自動血液凝固測定装置における測定処理時間および APTT (6 種類) の感受性についての検討. 医学と薬学 2009; 61: 87-91.
 - 7) 田中紀子, 眞部正弘, 山下昭一郎, 池田勝義, 大林光念, 内場光浩, その他. APTT 検査における検査試薬による実測値の違い. 臨床病理 2013; 61: 576-82.
 - 8) 山崎哲, 鈴木典子, 高山成伸, 瀧正志. APTT 試薬の特性と利用上の注意. 機器・試薬 2012; 35: 848-53.
 - 9) 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. 日臨検自動化会誌. 2010; 35: 201-4.
 - 10) 下條隆史. 抗凝固薬. 透析ケア 2016; 22: 525-7.