

## 交差混合試験の新規実習教材の開発： 直接経口抗凝固薬を用いた インヒビター疑似検体の可能性

登尾 一平\*<sup>1</sup> 山本 隆敏\*<sup>1</sup> 坂本 亜里紗\*<sup>1</sup> 田邊 香野\*<sup>1</sup>  
川口 辰哉\*<sup>1,2</sup> 檜原 真二\*<sup>1,2</sup> 杉内 博幸\*<sup>1,2</sup> 上妻 行則\*<sup>1,2§</sup>

**【要旨】** 交差混合試験(cross mixing test: CMT)は、活性化部分トロンボプラスチン時間(activated partial thromboplastin time: APTT)が延長した際に、凝固因子欠損や凝固因子インヒビターの存在などを鑑別するスクリーニング法である。しかし、現在はインヒビター検体の入手が難しく、学内実習では専らバリウム吸着血漿を用いた凝固因子欠損の状況のみを再現するため、CMTに対する学生の理解が深まらないことが問題となっている。今回我々は、インヒビター疑似検体として直接経口抗凝固薬、rivaroxabanを用いてCMTの学内実習を実施した。その結果、バリウム吸着血漿では下に凸のグラフであったが、rivaroxaban添加疑似検体は上に凸のグラフとなり、典型的なインヒビターパターンを呈した。さらに実習後のアンケートでは、バリウム吸着血漿とrivaroxaban添加疑似検体の使用によりCMTの意義が理解できると回答した学生が大幅に増加した。以上より、rivaroxaban添加血漿が学内実習におけるCMTのインヒビター疑似検体として使用できる可能性を見出した。

**【キーワード】** Rivaroxaban、交差混合試験(cross mixing test: CMT)、Rosner index(index of circulation anticoagulant: ICA)、インヒビター、凝固因子欠損

### はじめに

内因系凝固機序を反映する活性化部分トロンボプラスチン時間(activated partial thromboplastin time: APTT)が延長するケースとして、①凝固因子インヒビターの存在、②凝固因子欠損症、③ループスアンチコアグラント(lupus anticoagulant: LA)の存在などがあり、これら原因次第で治療方針が異なるため正確な検査が不可欠である。このような凝固時間の異常を鑑別する手法として交差

混合試験(cross mixing test: CMT)がある<sup>1)~4)</sup>。CMTは、横軸に被検血漿と正常血漿の混合比、縦軸に凝固時間をプロットした後グラフ化し、正常血漿添加(凝固因子の補充)により補正された凝固時間の程度で評価する方法である。作成したグラフを視覚的に判定し、上に凸のパターンをとった場合は凝固因子インヒビターの存在を疑い、下に凸のパターンを呈した場合は凝固因子の欠乏または低下を疑うなど凝固時間延長例を鑑別診断できる特徴をもつ。CMTは、APTTの延長を認め

\*<sup>1</sup>熊本保健科学大学保健科学部医学検査学科 §kozuma18@kumamoto-hsu.ac.jp

\*<sup>2</sup>熊本保健科学大学大学院保健科学研究科保健科学専攻

た検体に対して、その原因を振り分けるのに簡便かつ有用であるため、2008年に「凝固因子インヒビター定性」の名称で保険収載されたが、①CMTにおける被検血漿と正常血漿の混合比率や測定ポイント数など実際の検査方法や判定方法などが標準化されていないこと、②医師にCMTの意義が十分に認知されていないことなどから、実際の診療現場ではCMTが十分に活用されてはいない。従って、学生時にCMTに関する知識とその意義を十分に理解することは、診療現場には勿論、患者にとっても極めて有益であると考えられる。しかし、凝固因子インヒビター含有検体は、患者より提供してもらう以外には入手方法がないため、これまで大学の学内実習においてはバリウム吸着血漿を用いたCMTのみ実施してきた。そのため、学生はAPTT延長の原因がインヒビターの存在によるものであるか、凝固因子欠損によるものなのか、CMTの意義・重要性も含め十分に理解できていない現状があった。このようにインヒビター含有検体が入手困難であるため、学内実習でのCMTの実施に苦慮する臨床検査技師養成施設は少ない。そこで近年、インヒビター疑似検体の作製が試みられ、2018年山口らは選択的抗トロンビン剤アルガトロバン水和物注射液(ノバスタンHI)やパルナパリンナトリウム注射液(ミニヘパ)などを使用した簡単かつ安価な疑似検体の作製に成功している<sup>5)</sup>。

これまで心原性脳梗塞および静脈系血栓の予防においてはワルファリンが主として使用されてきたが、近年ワルファリンに代わる直接経口抗凝固薬(direct oral anticoagulants: DOACs)が開発され、注目されている。DOACsにはトロンビン活性を抑制するトロンビン阻害薬(dabigatran)と、トロンビンの上流にある活性型第X因子(FXa)を阻害するFXa阻害薬(apixaban、rivaroxaban、edoxaban)がある。そこで我々は、dabigatran、apixaban、rivaroxabanを用いてインヒビター疑似検体を作製し、学内におけるCMTの実習において使用が可能であるか否かを検討した。その結果、①rivaroxabanを用いたインヒ

ビター疑似検体は、山口らが報告しているノバスタンHIを用いた疑似検体と同等のAPTT延長を認めること、②rivaroxabanは長期間保管できることから計画的に実習前準備ができること、③rivaroxabanはコスト面から学内実習用のインヒビター疑似検体として有用である可能性を見出した<sup>6)</sup>。

そこで今回、インヒビター疑似検体としてrivaroxabanを用いたCMTの学内実習を実施し、さらには実習後に行ったCMTの理解度アンケートの結果も併せて報告する。

## I. 方 法

### A. 対 象

2018年度当学科3年次および2年次に在籍する学生(3年次:114名、2年次:115名)を対象とした。3年次生にはこれまで同様バリウム吸着血漿のみを検体として提供し、CMTを用手法で行ってもらった。一方、2年次生にはバリウム吸着血漿に加えて、rivaroxabanを添加したインヒビター疑似検体(以下rivaroxaban添加疑似検体)を提供した。実習後、CMTが学内実習を通して理解できたか、理解できなかったかを選択させる形式で無記名によるアンケートを実施した。

### B. 機器および検体

測定機器は、コアプレスタ<sup>®</sup>2000(積水メディカル、東京)、APTT試薬は、コアグピア<sup>®</sup>APTT-N(積水メディカル、東京)、塩化カルシウム液を使用した。正常血漿は血液凝固試験用標準ヒト血漿:STANDARD PLASMAをSIEMENS社(Berlin, Germany)から購入した。

### C. バリウム吸着血漿の作製

硫酸バリウム(和光純薬工業、大阪)を正常血漿に200 mg/mLとなるように添加した。37°Cで20分間混和した後、3,000 rpmで15分間遠心し、上清(バリウム吸着血漿)を得た。

### D. 第Xa因子阻害剤; rivaroxabanを用いた

#### インヒビター疑似検体の作製

rivaroxaban(Chemscene社、Monmouth Junction, NJ, USA)にdimethyl sulfoxide(DMSO)を添

加し 50 mg/mL の rivaroxaban 溶液を準備した後、DMSO で希釈し、様々な濃度の rivaroxaban 溶液を調整した。次に、rivaroxaban 溶液を正常血漿で希釈し、最終濃度が 1,600、3,200、4,800、6,400 ng/mL となるインヒビター疑似検体を作製した。

## E. クロスミキシングテスト

正常血漿と C.、D. で作製したバリウム吸着血漿または rivaroxaban 添加疑似検体を任意の比率 (0、20、50、80、100%) で混合し、混合直後の APTT を測定した。横軸を正常血漿比率 (%)、縦軸を凝固時間 (秒) としてグラフを作成した。なお、コアプレスタ®2000 を用いた測定では凝固時間 200 秒を、用手法による測定では凝固時間 150 秒を測定上限とし、波形パターン法と Rosner index の 2 法を用いて判定した。

### 1. 波形パターン法

正常血漿 (検体血漿比率 0%) とインヒビター疑似検体 (検体血漿比率 100%) との凝固時間を結ぶ直線を基準に反応曲線が上に凸か、下に凸であるかを視覚的に判定した。

### 2. Rosner index

Rosner index (index of circulation anticoagulant: ICA) は、APTT 延長の要因が凝固因子欠乏か、インヒビターによるものかを鑑別するため、国際血栓止血学会が推奨する数値判定法である<sup>7-9)</sup>。基準値は 15% 以上でインヒビター、15% 未満で凝固因子欠損と定義されている。正常血漿と検体血漿の 1:1 の混合血漿 (50%) の APTT (a) および正常血漿の APTT (b)、被験血漿 (100%) の APTT (c) より、 $ICA (\%) = (a - b) / c \times 100$  を算出した。

## F. 統計処理

今回の検討で行ったコアプレスタ®2000 による APTT 測定は、同時再現性を考慮し、全て 3 重測定した。学内実習においては各検体 2 重測定した。2 群の平均値の比較には、Microsoft Excel (Microsoft 社、Seattle, WA, USA) を用いて、Student *t* 検定を行った。 $p < 0.05$  を統計学的有意とした。

## II. 結果

### A. Rivaroxaban の至適濃度の検討

我々のこれまでの研究から、rivaroxaban 添加検体 (1,600 ng/mL) では APTT の顕著な延長が認められ、CMT においてはグラフも典型的な上に凸のパターンとなることが明らかとなっている<sup>6)</sup>。そこでまず、rivaroxaban 最終濃度 1,600 ng/mL を基準として rivaroxaban の至適濃度の検討を行ったところ、APTT は正常血漿で  $35.7 \pm 0.1$  秒であったのに対して、rivaroxaban 最終濃度 1,600 ng/mL では  $113.7 \pm 0.7$  秒と有意に延長した (図 1-A)。また rivaroxaban 添加による APTT の延長は、rivaroxaban 濃度依存性であった (3,200 ng/mL:  $164.1 \pm 0.5$  秒、4,800 ng/mL: 200 秒以上、6,400 ng/mL: 200 秒以上) (図 1-B~D)。一方、CMT における ICA では 15% 以上でインヒビター、15% 未満で凝固因子欠損と定義されている。そこで ICA によって評価を行ったところ、図 2 のように、ICA は rivaroxaban 最終濃度 1,600 ng/mL で  $42.4 \pm 0.6\%$ 、3,200 ng/mL で  $49.9 \pm 0.3\%$ 、4,800 ng/mL で  $53.4 \pm 1.1\%$ 、6,400 ng/mL で  $65.6 \pm 0.2\%$  といずれの濃度の rivaroxaban においても 15% 以上であった。一方、学生は用手法により CMT を行い、5 秒ごとにフィブリン析出を確認するため、凝固時間に 5~10 秒の誤差が生じる。本研究の最終目的は、学生が CMT における典型的なグラフパターンを学内実習で確認し、CMT の意義を理解することである。そこで今回我々は、学生が確実にフィブリン析出の有無を判定できるよう、正常血漿と rivaroxaban 添加疑似検体の混合血漿 (50%) の凝固時間が正常血漿と rivaroxaban 添加疑似検体 (疑似検体 100%) との凝固時間を結ぶ直線より算出した凝固時間より 20 秒以上延長している rivaroxaban 濃度 4,800 ng/mL を最終濃度として採用した (図 1)。

### B. 学内実習における CMT

学内実習では、バリウム吸着血漿と rivaroxaban 添加疑似検体をそれぞれ検体 1 および検体 2 として学生に配布し、用手法により CMT を実施してもらった。検体 1 では、正常血漿比率 0% の

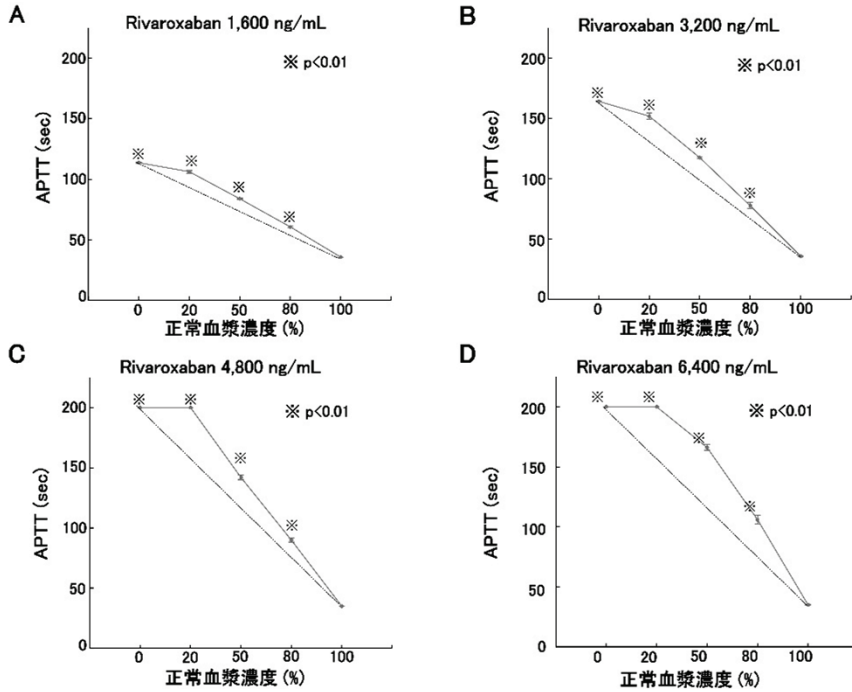


図 1 Rivaroxaban の至適濃度の検討

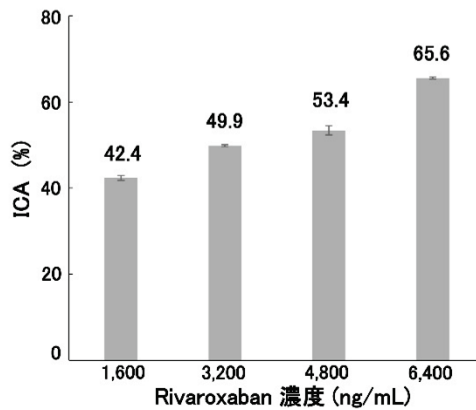


図 2 Rosner index によるRivaroxaban 至適濃度の評価

APTT は 96.7 ± 10.3 秒、20%で 57.1 ± 6.6 秒、50%で 45.9 ± 6.6 秒、80%で 37.9 ± 7.1 秒、100%では 32.6 ± 7.9 秒となり、グラフパターンは下に凸の傾向となった(図 3-A)。一方、検体 2 では、正常血漿比率 0%の APTT は 137 ± 26.3 秒、20%で 131.6 ± 32.2 秒、50%で 125.9 ± 40.0 秒、80%で 102.1 ± 37.3 秒、100%で 37.1 ± 9.1 秒となり、グラフパターンは上に凸の傾向となった(図 3-

B)。また一方、ICA は 図 3-C のように、検体 1 で 14.0 ± 3.9%、検体 2 で 63.1 ± 15.7%であった。

**C. アンケート結果**

実習後アンケートを実施し、回答した学生は 3 年次生 112 名と 2 年次生 113 名で、回収率はそれぞれ 98.2%、98.3%であった。CMT が理解できたと回答した学生の割合はバリウム吸着血漿のみで CMT を実施した場合 67%であったのに対し

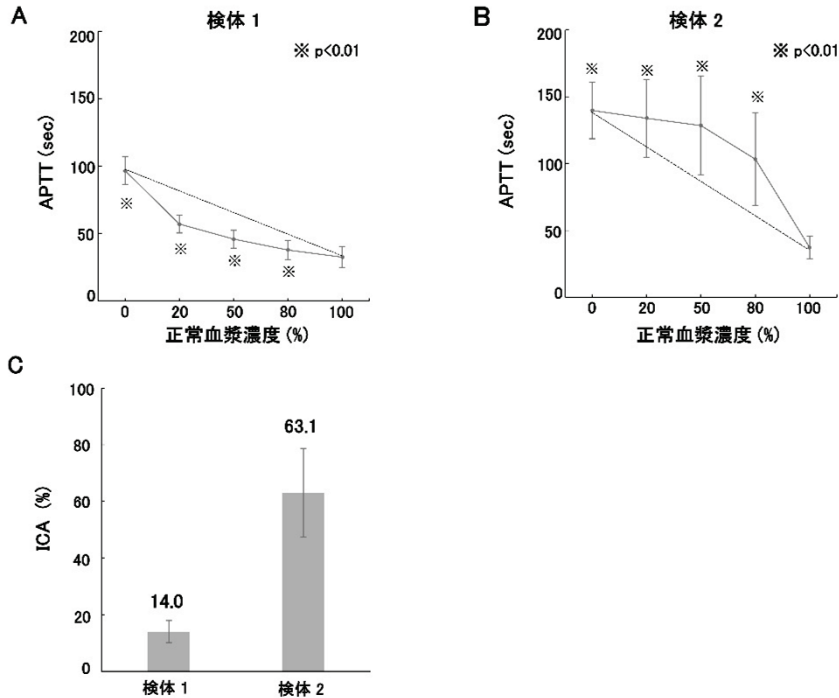


図3 学内実習における交差混合試験の結果

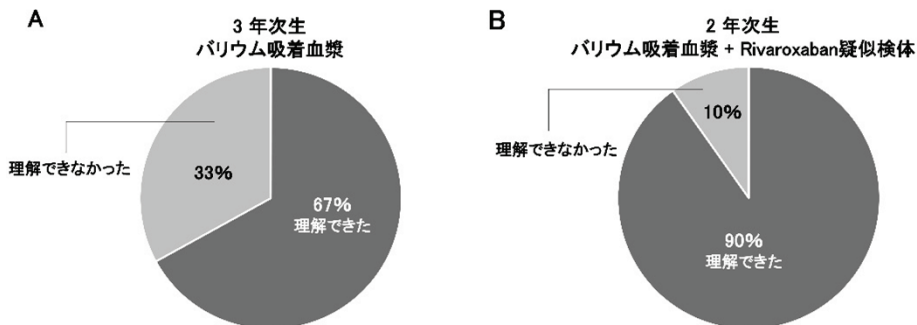


図4 交差混合試験の理解度に関するアンケートの結果

て、バリウム吸着血漿と rivaroxaban 添加疑似検体ともに使用して CMT を実施すると 90%に増加した(図4)。

### III. 考 察

現在「凝固因子インヒビター定性」として保険収載されている CMT だが、①CMT における被検血漿と正常血漿の混合比率や測定ポイント数など実際の検査方法や判定方法などが標準化

されていないこと、②医師に CMT の意義が十分に認知されていないことなどから、診療現場では CMT が十分に活用されているとは言い難い。一方、近年はインヒビター含有患者検体を入手することが難しく、バリウム吸着血漿のみを用いて実習を行うことが多い。しかし、学生時に CMT に関する意義を十分に理解することは、診療現場のみならず、患者にとって有益である。そこで、最近様々な養成施設においてインヒビ

ター疑似検体の作製が試みられており、特に2018年山口らによるノバスタンHIやミニヘパなどを使用した報告は、簡単かつ安価な疑似検体の作製に成功した点で注目し値する<sup>5)</sup>。一方、我々はDOACに着目し、インヒビター疑似検体として利用できないか基礎的検討を行ってきた。その結果、rivaroxabanは、①ノバスタンHIと同等のAPTT延長を認めること、②長期間凍結保管できること、③安価であることから学内実習用のインヒビター疑似検体として有用である可能性を見出した<sup>6)</sup>。そこで今回、実際に学内実習でrivaroxabanを使用し、CMTにおけるインヒビター疑似検体として有用であるか、さらには学生のCMTに関する理解が向上したか否かアンケートを実施し、検証した。

我々のこれまでの検討により、rivaroxaban添加疑似検体(1,600 ng/mL)ではAPTTの顕著な延長、そしてグラフも典型的な上に凸のパターンとなることが明らかとなっている<sup>6)</sup>。今回別ロットの正常血漿を用いた場合においても同様の傾向を示した(図1-A)。さらにはrivaroxaban添加疑似検体ではICAも42.4%であり(図2)、rivaroxaban最終濃度1,600 ng/mLでインヒビター疑似検体として使用できると考えられた。しかし、学内実習は用手法によりCMTを実施するため、凝固時間に5~10秒程度の誤差が生じる可能性は否定できない。つまり、コアプレスタ<sup>®</sup>2000を使用して得られたrivaroxaban濃度(1,600 ng/mL)では典型的な上に凸のグラフパターンとならない可能性がある。そこで、より詳細なrivaroxaban濃度検討を行い、用手法において5~10秒の誤差が生じても典型的なグラフパターンとなる4,800 ng/mLを見出し、学内実習におけるrivaroxaban最終濃度とした(図1)。実際、学内実習ではバリウム吸着血漿とrivaroxaban添加疑似検体をそれぞれ検体1および検体2として学生に配布し、用手法によりCMTを実施してもらったが、検体2の測定では、グラフは上に凸の傾向(図3-B)、ICAは15%以上(図3-C)で典型的なインヒビターのパターンを示した。また学生による実習後のアンケートでは、

CMTの意義が理解できたという学生がバリウム吸着血漿とrivaroxaban添加疑似検体の2検体を使用することにより増加した(図4)。またアンケートには「正常血漿の割合を増やすにつれ、APTTがどのように補正されていくのか、2検体を用いたことによりはっきりとその差がみられたので良かった。」や「講義の内容と似たグラフになり、2つの検体を対照実験としてみることができ、理解しやすかった。」など今回の試みについて肯定的な意見が多かった。しかしながら、rivaroxaban添加疑似検体と正常血漿の1:1の混合血漿(50%)を用いた測定結果では、凝固時間が測定上限の150秒であると報告した班が半数以上であったのに対し、100秒未満とする班も複数あった。また今回APTT試薬としてコアグピア<sup>®</sup>APTT-Nを使用した、合成リン脂質の試薬と比較してウサギ脳抽出物系試薬ではLAに対する感度が低いなどの報告もある<sup>10)</sup>。従って、各養成施設で使用するAPTT試薬によってrivaroxabanの至適濃度が異なる可能性もあることから、今後はrivaroxabanの最終濃度4,800 ng/mLが適当であるかについて様々なAPTT試薬を使用し、より詳細に検証する必要があると考えている。一方、凝固因子インヒビター(第Ⅷ、Ⅴ因子に対する抗体)の存在を証明するためには、2時間の加温後の判定が極めて重要である。しかし、実習の時間の都合により、現在は加温の意義について講義するにとどまっている。今後はrivaroxaban添加疑似検体を2時間加温した結果を検討し、実習での実施を目指したいと考えている。

一方、本研究ではrivaroxabanは5 mgの製品を購入して使用した。以前我々は、rivaroxabanの最終濃度1,600 ng/mLで使用すると仮定すると、1回の実習(各班0.5 mL、30班分)で用いる薬剤量は $1,600 \text{ ng/mL} \times 0.5 \text{ mL} \times 30 \text{ 班} = 2.4 \text{ } \mu\text{g}$ であり、約208回分の実習で使用可能であると報告した<sup>6)</sup>。今回rivaroxabanの最終濃度を4,800 ng/mLと変更したが、1回の実習で用いる薬剤量は72  $\mu\text{g}$ 、約70回分の実習で使用できる。また我々は、凍結融解を繰り返したrivaroxabanの安

定性を評価し、凍結融解による影響は少ないことも明らかにしている<sup>6)</sup>。よって、rivaroxabanは予め高濃度にDMSOで溶解した後に分注し、 $-80^{\circ}\text{C}$ にて凍結保管することや実習時に必要量のみ使用することで長期間使用が可能となり、インヒビター疑似検体としてのrivaroxabanの使用は対費用効果の側面からも有用であると思われる。

以上の結果から、インヒビター疑似検体としてrivaroxabanの使用は、①用手法においても典型的なグラフパターンを呈したこと、②学生によるアンケート結果からもCMTの理解が深まったこと、経済的負担も少ないことなどから、学生実習用のインヒビター疑似検体として極めて有用である可能性が示唆された。

#### IV. 結 語

CMTに関する実習は、将来臨床検査技師として働く学生にとって極めて重要であるが、今回学内実習において対費用効果の側面からも有用なrivaroxabanの使用によりCMTに関する学生の知識・理解がより深まることが明らかとなった。

#### 文 献

- 1) Pengo V. ISTH guidelines on lupus anticoagulant testing. *Thromb Res* 2012; 130(Suppl 1): S76-7.
- 2) 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学会誌* 2010; 35: 201-4.
- 3) 山崎 哲, 内藤澄悦. 10. 2 凝固系の検査. 監修 一般社団法人 日本臨床衛生検査技師会, JAMT 技術教本シリーズ 血液検査技術教本. 2015. p.196-216.
- 4) 大森 司. 出血性疾患のアプローチ. *臨床血液* 2013; 54: 1888-96.
- 5) 山口 航, 瀬川美桜, 瀧口響子, 高嶋眞理, 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.
- 6) 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. *保健科学研究誌* 2019; 16: 131-40.
- 7) Pengo V, Tripodi A, Reber G, Rand JH, Ortel TL, Galli M, et al. 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.
- 8) Rosner E, Pazner R, Lusky A, Modan M, Many A. Detection and quantitative evaluation of lupus circulating anticoagulant activity. *Thromb Haemost* 1987; 57: 144-7.
- 9) Umer Usman MH, Raza S, Raza S, Ezekowitz M. Advancement in antithrombotics for stroke prevention in atrial fibrillation, *J Interv Card Electrophysiol* 2008; 22: 129-37.
- 10) 家子正裕, 内藤澄悦, 吉田美香. 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* 2009; 57: 990-8.